UNIVERSIDAD DE PIURA

REPOSITORIO INSTITUCIONAL PIRHUA

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

Luis Eduardo Salazar Pérez

Piura, 29 de Marzo de 2012

FACULTAD DE INGENIERÍA

Área Departamental de Ingeniería Industrial y de Sistemas

Marzo 2012

Esta obra está bajo una licencia
Creative Commons Atribución-
NoComercial-SinDerivadas 2.5 Perú

Repositorio institucional PIRHUA – Universidad de Piura

U N I V E R S I D A D D E P I U R A

FACULTAD DE INGENIERÍA

"Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para producción de biodiesel"

Tesis para optar el Título de
Ingeniero Industrial y de Sistemas

Luis Eduardo Salazar Pérez

Asesor: Dr. Ing. Gastón Cruz Alcedo

Piura, enero 2012

PRÓLOGO

Debido al incremento del precio del petróleo, recursos limitados de combustibles fósiles y a las consecuencias ambientales negativas de su uso, se ha producido un renovado enfoque en la producción de biocombustibles. El Perú no es ajeno a esta realidad y mediante la Ley No 28054 para la Promoción del Mercado de Biocombustibles, se estableció la obligatoriedad del uso en mezcla del biodiesel y del bioetanol a partir del año 2009.

El biodiesel, potencial combustible alternativo del diesel de petróleo, es renovable y biodegradable, además de emitir menos gases contaminantes a la atmósfera, como dióxido de carbono y sulfuros, siendo así beneficioso para el ambiente y la salud. Desafortunadamente, el biodiesel a partir de aceite de plantas, aceite de cocina usado y grasa animal, ha producido un incremento en el precio de los alimentos además, de no satisfacer, ni en una pequeña fracción, la existente demanda de combustible; por lo que se buscan nuevas y económicas fuentes de lípidos que puedan ser convertidos en biodiesel.

De esta forma es que surge el interés en las microalgas como un recurso potencial para la producción de biodiesel. Esto debido a su mayor eficiencia fotosintética, mayor producción de biomasa y más rápido crecimiento. Por estas razones las microalgas serían capaces de producir más aceite por unidad de área en comparación a los cultivos agrícolas.

Sin embargo, aun cuando muchas investigaciones y reportes avalan lo concerniente a la producción de lípidos en microalgas, hasta donde se sabe, no existen reportes sobre estudios que discutan respecto al efecto de las condiciones de crecimiento y el método de extracción en la producción de aceite, así como respecto a la base para determinar el porcentaje de aceite en la biomasa. Siendo estos parámetros de suma importancia para la aplicación de un sistema a gran escala.

Debido a esto, se observa la necesidad de realizar un estudio sistemático de los distintos métodos de extracción de aceite, que no sólo mida el mayor o menor rendimiento de aceite obtenido por biomasa, sino que permita evaluar de forma global el rendimiento del proceso -desde el cultivo de microalgas hasta la extracción de aceite y aprovechamiento de los co y sub-productos generados- ya que, la ecuación económica del biodiesel dependerá también

del tipo de subproducto sólido que la extracción de aceite genere; de modo que todo el proceso sea económicamente efectivo.

Cabe mencionar que la Universidad de Piura viene ejecutando, conjuntamente con las empresas Ecoenergías del Perú SAC y Agromar del Pacífico SAC, un proyecto de innovación financiado por el FINCyT, en cuyo marco se cuenta con una planta piloto para la producción de microalgas en foto-biorreactores y *raceways*. El objetivo es generar un protocolo de cultivo de microalgas de elevada productividad orientado a un alto contenido de aceite y/o compuestos de interés industrial. La presente tesis se realiza en el marco de este proyecto, dada la importancia de evaluar un método de extracción de aceite técnica y económicamente viable y reproducible a nivel industrial.

Es oportuno agradecer a todas aquellas personas que contribuyeron e hicieron posible el desarrollo de este trabajo de investigación. En primer lugar a mi asesor, Dr. Ing. Gastón Cruz, por la confianza depositada en mi persona y por su incondicional apoyo y orientación a lo largo de toda la carrera; a los docentes del Laboratorio de Química de la Universidad de Piura por sus sugerencias y recomendaciones durante el periodo que abarcó el presente estudio; así mismo hago extensivo mi agradecimiento a los miembros del equipo del proyecto , Alfonso Rivera y Jenny Soria, así como también al personal técnico del Laboratorio de Química de la Universidad de Piura por las facilidades brindadas durante la etapa experimental del trabajo.

RESUMEN

El presente trabajo es un estudio de métodos de extracción de aceite de biomasa de microalgas, con el propósito de determinar el de mayor rendimiento, económicamente viable y amigable con el medio ambiente.

La metodología empleada en el estudio comprende la revisión y experimentación, sistemática y comparativa, de distintos métodos de extracción de aceite en tres especies de microalgas. Se evalúa la influencia de los solventes y de los distintos métodos de pre-tratamiento en el rendimiento de aceite, en tres especies distintas de microalgas, dado que cada especie, al tener características fisicoquímicas diferentes, podría tener una respuesta distinta frente a los solventes.

Así mismo, se aplicaron variaciones a los métodos de extracción más eficientes a fin de lograr un mayor rendimiento. Finalmente, se realizó un procesamiento estadístico de los resultados a fin de proponer un proceso que utilice el método de extracción a escala industrial.

La especie que presentó un mayor contenido de lípidos, independientemente del método de extracción utilizado, fue *Dunaliella tertiolecta*. Los métodos que ofrecieron un mayor rendimiento para las tres especies de microalgas fueron Folch et al. modificado I, Ramos 2010 modificado y Zhu alcanzando rendimientos de 25,15%, 22,92% y 25,44% en *Dunaliella tertiolecta* y de 16,27%, 18,84% y 18,50% en *Chaetoceros calcitrans* respectivamente.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

Capítulo I.....3
Antecedentes 3

1.1. Microalgas 3
1.1.1. Descripción general 3
1.1.2. Macroalgas vs microalgas.....4
1.1.3. Clasificación de las microalgas 5
1.1.4. Hábitat de las microalgas.....6
1.1.5. Importancia de las microalgas 6
1.1.6. Composición química 7
1.1.7. Aprovechamiento tradicional.....9
1.1.8. Nuevas aplicaciones de las microalgas 12
1.2. Lípidos en microalgas.....14
1.3. Biodiesel de tercera generación.....18
1.3.1. Descripción…. 18
1.3.2. Aspectos relevantes del biodiesel de tercera generación.....21

Capítulo II 25
Tecnología de microalgas para la producción de biodiesel.....25

2.1. Cultivo de microalgas 25
2.1.1. Parámetros de cultivo 25
2.1.1.1 Luz..... 26
2.1.1.2 Dióxido de carbono (CO_2)..... 26
2.1.1.3 Nutrientes..... 27
2.1.1.4 Salinidad..... 28
2.1.1.5 Temperatura..... 28
2.1.1.6 Agitación del medio 29
2.1.2. Métodos de cultivo 30
2.1.2.1 En lotes *(batch)* 30
2.1.2.2 Continuo..... 32
2.1.2.3 Semi-continuo 33
2.1.3. Sistemas de cultivo..... 34
2.1.3.1 Sistemas abiertos..... 35
2.1.3.2 Sistemas cerrados 36
2.1.3.3 Sistemas híbridos (mixtos)..... 39
2.1.4. Sistema de cultivo apropiado 39
2.2. Cosecha de microalgas..... 41

2.2.1. Por floculación 42
2.2.2. Sedimentación por gravedad y centrifugación..... 43
2.2.3. Filtración 44
2.3. Secado de la biomasa algal 46
2.4. Sales presentes en la biomasa algal seca 47
2.4.1. Medición del índice de refracción..... 47
2.4.2. Por determinación química de cloruros y sulfatos.....48
2.4.2.1. Determinación de cloruros por métodos argentométricos o volumétricos.....48
2.4.2.2. Determinación de cloruros por método potenciométrico.....48
2.4.2.3. Determinación de sulfatos por método turbidimétrico.....49
2.4.2.4. Determinación de sulfatos por método gravimétrico.....49
2.4.2.5. Determinación de sulfatos por método volumétrico.....49
2.5. Extracción de aceite de microalgas.....49
2.5.1. Métodos de pretratamiento.....50
2.5.1.1. Destrucción mecánica 50
2.5.1.2. Autoclavado 50
2.5.1.3. Sonicación.....50
2.5.1.4. Microondas.....50
2.5.1.5. Shock osmótico.....51
2.5.2. Métodos de extracción de lípidos.....51
2.5.2.1. Extracción mediante fluidos supercríticos 51
2.5.2.2. Extracción enzimática 51
2.5.2.3. Extracción con solvente químico 52
2.5.2.4. Extracción húmeda.....53
2.6. Determinación del rendimiento de aceite.....54
2.6.1. Base biomasa seca bruta 55
2.6.2. Base biomasa seca neta 55

Capítulo III.....57
Parte experimental 57

3.1. Materiales y equipos 57
3.2. Microalgas analizadas 58
3.2.1. *Dunaliella tertiolecta* 59
3.2.2. *Chaetoceros calcitrans* 59
3.2.3. *Nannochloropsis sp* 59
3.3. Determinación de lípidos presentes en microalgas.....59
3.3.1. Preparación de las muestras 60
3.3.1.1. Desintegración mecánica (molienda).....61
3.3.1.2. Sonicación.....61
3.3.2. Métodos de extracción 61
3.3.2.1. Extracción con solvente hexano.....62
A. Extracción Soxhlet 63
3.3.2.2. Extracción con solución propanol:hexano 63
A. Método Ramos 2010 modificado por IMARPE.....63
B. Método Ramos 2010 64
C. Método Ramos 2010 modificado 64
3.3.2.3. Extracción con solución cloroformo:metanol.....65
A. Método Folch et al. 1957 original 66
B. Método Folch et al. modificado I.....66
C. Método Folch et al. modificado II.....67

D. Método Bligh & Dyer modificado por IMARPE..... 67
E. Método Zhu 68
3.3.3. Determinación de sales presentes 69
3.3.3.1. Medida del índice de refracción 69
3.3.3.2. Determinación química de cloruros.....70

Capítulo IV 73
Resultados y discusión 73

4.1. Contenido de aceite con diferentes métodos de extracción con solvente.....73
4.1.1. Extracción con hexano 74
4.1.1.1. Extracción con Soxhlet.....74
4.1.2. Extracción con solución hexano:propanol.....74
4.1.2.1. Método Ramos 2010 modificado por IMARPE..... 74
4.1.2.2. Método Ramos 2010 75
4.1.2.3. Método Ramos 2010 modificado 75
4.1.3. Extracción con cloroformo:metanol 75
4.1.3.1. Método Folch et al. 1957 (original).....76
4.1.3.2. Método Folch et al. modificado I 77
4.1.3.3. Método Folch et al. modificado II.....78
4.1.3.4. Método Bligh & Dyer modificado por IMARPE..... 79
4.1.3.5. Método Zhu 79
4.2. Resultados de la determinación de las sales presentes en la muestra..... 80
4.2.1. Medida del índice de refracción 80
4.2.2. Método volumétrico de Móhr.....80
4.3. Comparación general de los métodos de extracción y preparación.....82
4.3.1. Análisis de varianza de dos factores con interacción entre los motores..... 83
4.3.1.1. Análisis global de los métodos con más alto rendimiento..... 83
4.3.1.2. ANOVA subgrupo uno.....85
4.3.1.3. ANOVA subgrupo dos 87
4.3.2. Prueba de contraste de hipótesis.....88
4.3.2.1. Prueba *t* subgrupo 1 88
4.3.2.2. Prueba *t* subgrupo 2 91

Capítulo V 95
Consideraciones para un proyecto industrial 95

5.1. Rendimiento de aceite y biodiesel de un cultivo de microalgas..... 96
5.2. Proyección de costos para obtención industrial de aceite de microalgas..... 98
5.2.1. Costo de equipamiento e implementación.....98
5.2.2. Costo de proceso de cultivo a nivel de laboratorio y a nivel industrial.....99
5.2.3. Costeo energético del proceso 100
5.2.4. Costo de extracción 101
5.2.5. Costeo de mano de obra 101
5.3. Determinación de costo global y rendimiento del proceso.....102
5.4. Consideraciones para la rentabilidad global del proyecto.....103

CONCLUSIONES 105

Referencias bibliográficas..... 109
Bibliografía recomendada 113

ANEXOS..... 117

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones en torno a la producción de combustibles a partir de fuentes renovables, ha aumentado exponencialmente en los últimos años. Los biocombustibles de tercera generación son también llamados avanzados debido a las materias primas y a los procesos tecnológicos utilizados para su producción.

La materia prima potencial para el biodiesel de tercera generación son las microalgas, las que prometen una elevada producción de aceite por unidad de área de cultivo en un corto periodo, esto debido a su alto contenido de lípidos y a la capacidad de duplicar su número en un solo día. Adicionalmente, las microalgas al ser organismos autótrofos, solo requieren de un medio líquido de cultivo, algunos nutrientes, dióxido de carbono y luz solar para promover su producción.

Actualmente se realizan estudios para evaluar distintos métodos de extracción de aceite de microalgas, debido a la importancia de esta etapa en la eficiencia y costo global del proceso de producción de biodiesel. Los métodos desarrollados se basan en fundamentos físicos y químicos para lograr la extracción; así mismo es importante mencionar los métodos de pretratamiento de la biomasa microalgal, utilizados conjuntamente a los métodos de extracción, que están orientados a alcanzar un mayor rendimiento de aceite.

En la presente tesis, se hace una revisión y evaluación de métodos de extracción de aceite, y de pretratamiento, de la biomasa microalgal a nivel de laboratorio. La estructura del trabajo es la siguiente:

En un primer capítulo se realiza una descripción general de las microalgas y se detallan antecedentes relacionados con el aprovechamiento de la biomasa microalgal. En el capítulo II se describe la tecnología de producción de microalgas requerida para la producción de biodiesel, incluyendo las etapas y variantes de cultivo, cosecha y extracción. En el tercer capítulo se presenta la metodología y procedimiento seguido para la experimentación y evaluación de los métodos de extracción de aceite ensayados. En el capítulo IV se presentan los resultados obtenidos en la experimentación, así mismo se discute en torno a la viabilidad práctica y económica de cada uno. Finalmente, en el quinto capítulo, se presenta la proyección de costos y las consideraciones a tomar en cuenta para el cultivo y desarrollo de microalgas para la producción de biodiesel a nivel industrial.

Capítulo I

Antecedentes

1.1. Microalgas

1.1.1. Descripción general [4, 19, 30]

Ficología es el estudio científico de las algas, deriva del griego *phykos* que significa "alga marina"; otro término utilizado es algología, un término ilegítimamente construido con una raíz latina (alga) y otra griega (logos), el cual ha sido desacreditado porque se presta a confusión con la ciencia homónima del dolor, que es una especialidad médica.

En la literatura se pueden encontrar distintas definiciones de alga debido, principalmente, a la gran variedad de especies existentes y a las distintas formas de aprovechamiento y utilización que se han desarrollado; si bien no se contradicen, no definen de forma completa y especifica al grupo. Una definición sencilla y bastante aceptable es la que denomina alga a los diversos organismos autótrofos de organización sencilla que contienen clorofila *a*, realizan la fotosíntesis oxigénica (productora de oxígeno) y que viven en el agua o en ambientes muy húmedos. Bajo este contexto, las cianobacterias o algas verde-azules, procariotas se han considerado tradicionalmente dentro del grupo; así mismo, según esta definición, quedan excluidas las bacterias fotosintéticas, ya que no contienen clorofila *a* sino bacterioclorofila y realizan fotosíntesis anoxigénica. Como se mencionó es una definición aceptable, sin embargo la Ficología agrega conceptos y características importantes que definen de una mejor manera -completa y específica- al grupo de algas; así pues los ficologistas consideran alga a cualquier organismo con clorofila *a* y un cuerpo no diferenciado en raíces, tallo y hojas (Lee, 1989). Las cianobacterias también se incluyen en esta definición, a pesar de que son organismos procariotas. Además se debe mencionar que las algas son *thallophytes* (plantas que carecen de raíces, tallos y hojas) que tienen clorofila *a* como pigmento fotosintético primario y carecen de una cubierta de células estériles alrededor de las células reproductoras. Esta definición abarca una serie de formas vegetales que no necesariamente están estrechamente relacionadas; por ejemplo, las cianobacterias que están más cerca en evolución de las bacterias que al resto de las algas. Por otro lado, las algas y las plantas producen los mismos compuestos de almacenamiento, usan mecanismos similares de defensa contra depredadores y parásitos, y existe una fuerte similitud

morfológica entre algunas algas y plantas. Sin embargo, esto no lleva a una mayor confusión dado que, si bien hay muchas similitudes entre ambas, son muchas más sus diferencias; así las algas no tienen ninguna de estas características propias de las plantas: raíces, tallos, hojas, ni tejidos vasculares bien definidos. A pesar que muchas algas tiene el aspecto de las plantas y algunos de ellas muestran la especialización y diferenciación de las células vegetativas, ellas no forman embriones, sus estructuras reproductivas están formadas por células que son potencialmente fértiles y carecen de células estériles de recubrimiento o protección. El desarrollo parenquimatoso está presente sólo en algunos grupos y tienen ciclos de vida monogenéticos y digenéticos. Por otra parte, las algas se presentan en formas diferentes, tales como células microscópicas individuales, macroscópicos multicelulares conglomerados sueltos o vaporosos, colonias mates o ramificadas, o formas de hoja o cuchilla más complejas, que contrastan fuertemente con la uniformidad de las plantas vasculares. En conclusión tenemos que las algas son un grupo independiente sin superposición con los vegetales ni con ningún otro conjunto.

La vasta diversidad de dimensiones de plancton -que oscilan de sólo 0,2 a 2,0 µm de diámetro a *kelps* gigantes con hojas de hasta 60 m de longitud-, la ecología y los hábitats colonizados, la estructura celular, los niveles de organización y la morfología, los pigmentos para la fotosíntesis, la reserva y los polisacáridos estructurales, y el tipo de historia de vida refleja los orígenes diversos de evolución de este conjunto heterogéneo de organismos, tanto procariotas como eucariotas.

1.1.2. Macroalgas vs microalgas [19, 26]

El término alga se refiere tanto a macroalgas como a un grupo muy diversificado de microorganismos conocidos como microalgas. Las macroalgas son protistas fotosintéticos multicelulares de rápido crecimiento, marinas y de agua fresca, que crecen a un tamaño considerable; viven principalmente fijas en rocas, pudiendo crecer también en la arena, caparazones de tortugas, arrecifes de coral, raíces de plantas, cascos de barcos, pilares de puertos, etc.; pero siempre en ambientes con presencia de luz y nutrientes, siendo muy abundantes en la zona entre mareas donde forman densas fajas en los cinturones costeros rocosos. Sus representantes son las algas verdes, pardas y rojas; las laminarias (*Kelpbeds*) son algas verdes gigantes que pueden alcanzar las varias decenas de metros de largo, estas macroalgas mantienen una fauna bastante diversificada, la cual vive protegida entre sus filamentos. En cambio las microalgas son cuerpos microscópicos, a veces unicelulares, que normalmente crecen en suspensión dentro de un cuerpo acuático; algunas de ellas con algunas características de las bacterias, como es el caso de las cianofíceas o algas azules, las cuales tienen núcleos celulares indiferenciados y sin membrana (carioteca). La mayoría posee flagelos móviles los cuales favorecen su traslado, constituyendo los principales componentes del fitoplancton marino, o plancton vegetal. Estas microalgas se desarrollan en el agua de mar, apenas en la región donde existe penetración de luz (zona fótica), o sea, básicamente hasta los 200 metros de profundidad. Son responsables de la bioluminiscencia observada en la playa por la noche, pues las mareas rojas en verdad son explosiones poblacionales de ciertos tipos de algas (dinoflagelados), las cuales cambian la coloración del agua.

Ambos tipos de algas crecen muy rápidamente, esta característica las vuelve un cultivo prometedor para uso humano. Se sabe que las microalgas, en comparación

con las macroalgas, contienen grandes cantidades de lípidos dentro de su estructura celular, siendo entonces la microalga una mejor opción para el cultivo y la producción de biodiesel. El número de especies de algas se ha estimado en de uno a diez millones, y la mayoría de ellos son microalgas, representando en la actualidad un recurso prácticamente inexplorado, ya que solamente unas 50 especies han sido estudiadas con detalle desde el punto de vista fisiológico y bioquímico. Por lo tanto, en Ficología aplicada el término microalga se refiere, en stricto sensu, a algas microscópicas, y la bacteria fotosintética oxigénica, es decir, las cianobacterias, anteriormente conocidas como *Cyanophyceae*. El interés en estos dos grupos de organismos fototróficos radica en su potencial de utilización, de forma similar a los microorganismos heterótrofos, para producir biomasa para alimentación, piensos y productos químicos finos, utilizando energía solar. Las microalgas, caracterizadas por tener la mayor eficiencia en cuanto a la utilización de la energía solar para realizar fotosíntesis debido a su sencilla estructura celular, son claves en el equilibrio planetario: aprovechan la energía del sol para producir biomasa, son la base de las cadenas tróficas que viven en los océanos y absorben buena parte del dióxido de carbono (CO_2) de la atmósfera que transforman en oxígeno -al estar suspendidas en agua, tienen un mejor acceso al O_2, CO_2 y diversos nutrientes-. Sin ellas, gran parte de la vida de la tierra no sería posible.

1.1.3. Clasificación de las microalgas [4, 19, 30]

Tradicionalmente, las algas han sido clasificadas según su color -según sea el pigmento fotosintético que posean en los denominados cromoplastos. Así, pueden ser verdes, si tienen abundante clorofila (*Chlorophyta*), pardas o rojas, si predominan otros pigmentos como la ficoxantina de color pardo-amarillenta o la ficoeritrina de color rojo (*Rhodophyta*), o verdeazuladas (*Cyanophyta*)- y esta característica sigue siendo de cierta importancia. Sin embargo, no existe un sistema de clasificación, fácilmente definible y ampliamente aceptado, debido a que la taxonomía es objeto de rápida y constante revisión a todos los niveles siguiendo cada día nuevas evidencias genéticas y ultraestructurales. Se debe tener en cuenta, además, que el carácter polifilético del grupo de algas es de algún modo incompatible con los tradicionales agrupamientos taxonómicos, a pesar de que siguen siendo útiles para definir el carácter general y el nivel de organización, y el hecho de que la opinión taxonómica puede cambiar a medida que la información se acumula. No obstante, y dada la necesidad e importancia de clasificar este grupo, la investigación con microscopios electrónicos ha demostrado diferencias en las características, dando lugar a la determinación de los actuales sistemas de clasificación de las algas, los que se basan en los siguientes criterios principales: tipo de pigmentos, la naturaleza química de los productos de almacenamiento y componentes de la pared celular; así mismo se toma en cuenta, como criterios adicionales, los siguientes caracteres citológicos y morfológicos: la presencia de células flageladas, la estructura de los flagelos (por ejemplo, las escalas, el ángulo de inserción de los flagelos, raíces microtubulares y raíces estriadas), el esquema y la trayectoria de la división nuclear (mitosis) y el proceso de división citoplasmática (citocinesis), la presencia de una envoltura de retículo endoplasmático alrededor del cloroplasto, y la posible conexión entre el retículo endoplasmático y la membrana nuclear.

Uno de los primeros científicos en destacar la importancia filogenética de las membranas adicionales alrededor de la envoltura del cloroplasto fue Lee (1989), de

esta manera se pueden encontrar cuatro grupos distintos dentro de las microalgas: El primer grupo incluye las algas procarióticas, procariotas, siendo las únicas las cianobacterias. Los otros grupos se clasifican con respecto a la evolución del cloroplasto, y son las algas eucariotas, que probablemente contrajeron el cloroplasto a lo largo de diferentes eventos evolutivos: El segundo grupo, algas eucariotas con cloroplastos rodeados por las dos membranas de la envoltura del cloroplasto; el tercer grupo, algas eucariotas con el cloroplasto rodeado por una membrana del retículo endoplasmático cloroplasto; y el cuarto grupo, algas eucariotas con los cloroplastos rodeados por dos membranas de retículo endoplasmático cloroplasto.

En la sistemática de las algas se utiliza el sistema estándar de clasificación botánica: Filo – *phyta*, Clase – *phyceae*, Orden – *ales*, Familia – *aceae*, Género, Especie. La posición sistemática del grupo de las algas ha cambiado varias veces en los últimos años. El sistema de clasificación propuesto por Lee (1989) ha sido ampliamente adoptado, así se puede dar una breve descripción de algunas de las divisiones que este autor considera, estas se presentan en el Anexo A de la presente tesis.

1.1.4. Hábitat de las microalgas

Sobre la distribución de las algas puede afirmarse que son cosmopolitas, es decir viven en todos los climas, se encuentran adaptadas a las más diversas situaciones ambientales. Hay algas en todos los ambientes acuáticos donde existe luz, ya sea de agua dulce, marina o salobre; sin embargo, también se pueden encontrar en casi cualquier otro entorno sobre la tierra, desde las algas que crecen en la nieve de algunas montañas de América a las que viven en las asociaciones de líquenes en las rocas desnudas, desde algas unicelulares en el suelo del desierto a las que viven en fuentes termales. Los mares y océanos contienen enormes cantidades de algas planctónicas, estimándose que el 90% de la fotosíntesis total de la tierra es realizada por estos organismos acuáticos.

En la mayoría de los hábitats funcionan como los productores primarios en la cadena alimenticia, produciendo materia orgánica a partir de la inorgánica en el mar -con la presencia de luz solar y dióxido de carbono-, de esta manera la materia orgánica ingresa a las cadenas tróficas. Este paso puede producirse por el consumo de algas, la absorción de nutrientes disueltos de origen vegetal por otros organismos, o por la descomposición de éstas. Además de conformar la fuente básica de alimentos para estas cadenas alimenticias, también forman el oxígeno necesario para el metabolismo de los organismos consumidores. En el caso de los seres humanos rara vez se consumen directamente las algas como tal, pero cosecha organismos que se encuentran más arriba en la cadena alimentaria (es decir, peces, crustáceos, moluscos); algunas algas, sobre todo las rojas y marrones, se recolectan y se comen como vegetales, o los mucílagos son extraídos de los tallos para ser utilizados como coagulantes y espesantes.

1.1.5. Importancia de las microalgas

Como ya se mencionó las microalgas son organismos muy diversos en forma, tamaño y capacidad de adaptación a distintos ambientes, por lo que algunas especies pueden modificar su metabolismo para "sobreproducir" algunos compuestos celulares. Es aquí donde reside la importancia en la investigación de estos

organismos, de modo que se pueda aprovechar adecuadamente el enorme potencial que presentan, mediante el cultivo y producción masiva orientado a la obtención, en gran escala, de un determinado compuesto. Una de las grandes ventajas del uso de cultivos de microalgas con respecto al uso de vegetales superiores (maíz, trigo, caña), es que en las microalgas los lípidos son sintetizados en toda la célula, en tanto que en plantas superiores sólo se producen en una parte de ésta, por lo que una gran cantidad de energía fisiológica se destina al mantenimiento de la planta y no a la síntesis del compuesto que los investigadores están buscando: lípidos, carbohidratos, pigmentos y vitaminas. Además, al trabajar con cultivos de microalgas de una determinada especie en condiciones controladas o semi-controladas en laboratorio, se puede obtener biomasa celular de una composición bioquímica similar, con lo que se garantiza la reproducción de los resultados.

Finalmente, la gran ventaja de utilizar microalgas es que son recursos renovables que tienen altas tasas de crecimiento y no son utilizadas para consumo humano directo; por lo anterior, el uso de cultivos de microalgas para la producción de energéticos no compite con los costos económicos relacionados con los insumos alimenticios, además, estos cultivos de microalgas pueden ser utilizados para obtener otros productos que pueden ser de uso alimenticio, farmacéutico o biotecnológico (Pilar Sánchez, 2009).

1.1.6. Composición química

Las algas están compuestas, principalmente, por proteínas, carbohidratos y lípidos; así como también por una gran variedad de vitaminas y elementos (yodo, potasio, hierro, magnesio, calcio, etc.) en diferentes proporciones dependiendo de la cepa que se esté analizando.

Hace 50 años Parsons et al. (1961) analizaron once diferentes especies de plancton marino que representan seis clases taxonómicas, todas cultivadas en similares condiciones físicas y químicas y cosechadas en la fase exponencial -se verá en el segundo capítulo-. Su estudio reveló que la composición de las células es similar cuando se comparan expresando las cantidades de las fracciones principales en términos de carbono orgánico total en las células. De hecho, las microalgas de diferentes orígenes tienen una tendencia, salvo algunas excepciones, se parecen entre sí en términos de composición celular, particularmente en lo relativo a las cantidades de proteína cruda, lípidos y carbohidratos que contienen cuando se cultivan en condiciones de crecimiento cercanas a las óptimas. Para una sola especie, por otra parte, la variación en la composición de la célula puede diferir muchas veces, de acuerdo con las condiciones de cultivo. Por ejemplo, *Chlorella sp.*, *braunii Botryococcus*, y *Dunaliella salina*, que están todas clasificadas en *Chlorophyceae*, muestran la composición bioquímica típica: 30-50% de proteínas, 20-40% de hidratos de carbono y 8-15% de lípidos en buenas condiciones ambientales; estas especies, sin embargo, en condiciones ambientales desfavorables pueden acumular por encima de 80% de ácidos grasos, 80% de hidrocarburos y 40% de glicerol, respectivamente, sobre la base del peso seco. Evidentemente, los factores ambientales, especialmente la luz, temperatura, nivel de nutrientes y la salinidad, no sólo afectan la fotosíntesis y la productividad de biomasa celular, sino que también influyen en el modelo, la vía y la actividad del metabolismo celular y por lo tanto en

la composición celular dinámica. Los efectos de estas últimas tienen implicaciones biotecnológicas de gran alcance y consecuencias.

La composición de aminoácidos y proteína de microalgas es muy similar entre las especies y relativamente poco afectada por la fase de crecimiento y las condiciones de luz. Además, la composición de aminoácidos esenciales en las microalgas es muy similar al de proteína a partir de larvas de ostras (*Crassostrea gigas*), esto indica que es poco probable que la calidad de las proteínas sea un factor que contribuya a las diferencias en el valor nutricional de especies de microalgas. Esteroles, minerales y pigmentos, pueden contribuir a las diferencias nutricionales.

El contenido de vitaminas puede variar entre cepas. El ácido ascórbico muestra la mayor variación, hasta 16 veces. Las concentraciones de otras vitaminas muestran típicamente una diferencia de dos a cuatro veces, entre las especies, es decir, β-caroteno 0,5-1,1 mg, niacina 0,11-0,47 mg, a-tocoferol desde 0,07 hasta 0,29 mg, tiamina 29-109 mg, riboflavina 25-50 mg, ácido pantoténico 14-38 mg, folatos 17-24 mg, piridoxina 3,6 a 17 mg, cobalamina 1,8-7,4 mg, biotina 1,1-1,9 mg, retinol 2,2 mg y vitamina D, 0,45 mg. Se presenta a continuación una tabla con las características de algunas cepas de microalgas utilizadas comúnmente para la producción de biocombustibles.

Tabla 1.1. Composición celular de cepas de microalgas.

Cepa **Algas de agua dulce**	**Proteína (%)**	**Carbohidratos (%)**	**Lípidos (%)**
Scenedesmus obliquus	50-56	10-17	12-14
Scenedesmus quadricauda	47	-	1,9
Scenedesmus dimorphus	8-18	21-52	16-40
Chlamydomonas rheinhardii	48	17	21
Chlorella vulgaris	51-58	12-17	14-22
Dunaliella bioculata	49	4	8
Euglena gracilis	39-61	14-18	22-38
Prymnesium parvum	28-45	25-33	22-38
Tetraselmis maculata	52	15	3
Porphyridium cruentum	28-39	40-57	9-14
Spirulina platensis	46-63	8-14	4-9
Spirulina máxima	60-71	13-16	6-7
Anabaena cylindrica	43-56	25-30	4-7
Cepa **Algas marinas (de agua salada)**	**Proteína (%)**	**Carbohidratos (%)**	**Lípidos (%)**
Isochrysis sp.	44	9	25
Isochrsis galbana	41	5	21
Paulova lutheri	49	31	12
Chaetoceros calcitrans	33	17	10
Phaeodactylum tricornutum	33	24	10
Skeletonema costatum	37	21	7
Thalassiosira pseudonana	29	17	10
Dunaliella salina	57	32	9
Tetraselmis suecica	39	8	7

Fuente: Información de las cepas obtenida de AlgaeLink [44]

No obstante, para la producción de biodiesel a partir de microalgas, es de gran importancia que el porcentaje de lípidos sea lo más alto posible, ya que estos son la

base de los compuestos aceitosos que constituyen la materia prima para producir biocombustibles. La influencia y efectos de cada una de los parámetros -tales como luz, temperatura, nivel de nutrientes y salinidad- en la composición de las microalgas se explicará con mayor detalle en el Capítulo 2 cuando se hable de la tecnología de producción de microalgas.

1.1.7. Aprovechamiento tradicional [4, 33]

El hombre ha utilizado microalgas y macroalgas durante cientos de años como alimento humano, forraje, remedios y fertilizantes. La gente que emigró de países como China, Japón y Corea, además de Indonesia y Malasia, donde las algas se han utilizado siempre como alimento, han llevado esta costumbre con ellos, de modo que hoy en día hay muchos más países en el mundo en el que no es inusual el consumo de algas.

Además del consumo directo, en las que las especies más utilizadas son *Cyanophyta*, *Rhodophyta*, *Heterokontophyta* y *Chlorophyta*, están los aditivos alimentarios como agar y carragenatos, extraídos de algas rojas y alginatos a partir de microalgas y macroalgas pardas, que se utilizan principalmente para modificar la viscosidad o la textura de una enorme variedad de productos alimenticios.

Se ha puesto de manifiesto la potencialidad de las microalgas como una fuente, viable y económica, para la producción de gran variedad de sustancias, algunas de ellas de elevado precio, como ácidos grasos, carotenoides, pigmentos, proteínas y vitaminas que pueden ser utilizados para la producción de nutracéuticos, productos farmacéuticos, cosméticos -por sus propiedades hidratantes, antioxidantes y regeneradoras-, aditivos para la alimentación animal y otros productos químicos de interés; aunque su utilización como fuente de proteínas es actualmente muy controvertida debido principalmente a que los elevados costes de producción de la biomasa microalgal le impiden competir con los alimentos tradicionales. Las algas pueden ser utilizadas en otras aplicaciones como biofertilizantes, en la purificación de aguas residuales, como acondicionadores de suelo y como alimento en acuicultura. A pesar de la gran diversidad de microalgas, las investigaciones tendientes a la obtención de metabolitos de interés económico son muy limitadas, consagrándose en su mayoría a estudios de ecofisiología y composición bioquímica.

La producción comercial a gran escala de biomasa de microalgas se limita a *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Arthrospira*, y *Chlorella*, que se cultivan en estanques abiertos en fincas alrededor del mundo. Se puede mencionar los siguientes usos comerciales de las microalgas:

<u>En alimentación animal:</u>
Las microalgas se utilizan en la acuicultura como alimento vivo en todas las etapas de crecimiento de los moluscos bivalvos (ostras, vieiras, almejas y mejillones), para las larvas y primeras etapas juveniles de abalones, crustáceos y algunas especies de peces y para zooplancton utilizado en las cadenas alimenticias de acuicultura. Durante las últimas cuatro décadas, varios cientos de especies de microalgas fueron probados como alimento, pero probablemente menos de 20 ganaron un amplio uso en la acuicultura. Las microalgas deben poseer una serie de atributos clave para ser útiles en las especies de acuicultura: deben tener un tamaño adecuado para la

ingestión (de 1 a 15 µm para los filtradores, de 10 a 100 µm para los herbívoros) y ser de fácil digestión, deben tener altas tasas de crecimiento, ser dócil al cultivo en masas y también ser estables frente a las fluctuaciones de temperatura, luz y nutrientes -como puede ocurrir en los criaderos-; por último, deben tener una buena composición de nutrientes, incluyendo la ausencia de toxinas que podrían ser transferidos a la cadena alimentaria. Cepas con resultados exitosos para el cultivo de bivalvos incluyen *Isochrysis galbana*, *Isochrysis sp*., *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Pseudoisochrysis paradoxa*, *Chaetoceros calcitrans* y *Skeletonema costatum*.

Isochrysis sp., *P. lutheri* y *C. calcitrans* son las especies más comúnmente utilizadas para alimentar la etapa larval, juvenil temprana, y reproductiva (durante el acondicionamiento de incubación) de los moluscos bivalvos, las cuales se usan generalmente juntas como una dieta mixta. Muchas de las cepas utilizadas con éxito para los bivalvos también se utilizan para la alimentación directa de crustáceos (especialmente camarones) durante los primeros estados larvarios, especialmente las diatomeas como *Skeletonema spp*. y *Chaetoceros spp*.; diatomeas bentónicas como *Navicula spp*. y *Nitzschia* son comúnmente cultivadas en masa y colocadas en placas como una dieta para abalones jóvenes. *Isochrysis sp*., *P. lutheri*, *T. suecica*, o *Nannochloropsis spp*. Alimentan comúnmente a Artemia y rotíferos, los que luego se usan de alimento en las postrimerías de la etapa larval de crustáceos y peces.

Como se mencionó anteriormente, las especies de microalgas pueden variar significativamente su valor nutritivo, y esto también puede cambiar bajo diferentes condiciones de cultivo; sin embargo, una mezcla selecta de microalgas puede ofrecer un excelente paquete nutricional para las larvas, ya sea directa o indirectamente (a través del enriquecimiento de zooplancton). Las microalgas que tienen buenas propiedades nutricionales -ya sea como monoespecies o dentro de una dieta mixta- incluyen *C. calcitrans*, *C. muelleri*, *P. lutheri*, *Isochrysis sp*., *T. suecica*, *S. costatum* y *Thalassiosira pseudonana*. Varios factores pueden contribuir al valor nutricional de una microalga, incluyendo su tamaño y forma, la digestibilidad (relacionado con la estructura de la pared celular y composición), composición bioquímica (por ejemplo, nutrientes, enzimas y toxinas de estar presentes), y los requerimientos alimenticios de la especie animal que se desea criar.

Un procedimiento común en el cultivo de larvas de peces y camarones es añadir microalgas (es decir, "agua verde") a los sistemas de cultivo intensivo, junto con las presas de zooplancton. Las especies de algas más utilizadas para aplicaciones de agua verde son *N. oculata* y *T. suecica*. La adición de microalgas a los tanques larvales puede mejorar la producción de larvas, aunque el mecanismo exacto de acción no es claro, por lo que se requiere mayor investigación sobre la aplicación de las microalgas, especialmente aquellas especies ricas en DHA, a los sistemas de agua verde. El agua verde también puede ser aplicada a los sistemas extensivos de producción al aire libre mediante la fertilización de los estanques para estimular el crecimiento de microalgas, y en consecuencia, la producción de zooplancton, como alimento para las larvas.

<u>Suplementos para rehabilitación física:</u>
Las microalgas son una fuente única de compuestos de alto valor y de obtención sistemática de sustancias terapéuticas, en particular las cianobacterias han destacado

en este aspecto. Entre las cianobacterias la *Spirulina sp*. ha sido objeto de numerosos y rigurosos estudios toxicológicos que han puesto de relieve sus potenciales aplicaciones terapéuticas en el ámbito de la inmunomodulación, anticancerígeno, antivirales, y efectos en la reducción del colesterol. Una serie de extractos son muy activos en la protección de T-células linfoblastoides humanas de los efectos citopáticos de la infección por VIH (virus de inmunodeficiencia humana). Entre las microalgas eucariotas, una glicoproteína preparada a partir de sobrenadante de cultivo de *Chlorella vulgaris* mostró actividad de protección contra la metástasis del tumor y la inmunosupresión inducida por quimioterapia en ratones.

Entre los compuestos de microalgas de alto valor están los carotenoides como el beta-caroteno, astaxantina, ácidos grasos poliinsaturados como el DHA y EPA, y los polisacáridos como el β-glucano. Los carotenoides por su acción supresora sobre especies oxígeno reactivas poseen propiedades anti-inflamatorias intrínsecas, los ácidos grasos poli-insaturados (AGPI, o PUFA por sus siglas en inglés) presentan actividad antioxidante y los polisacáridos actúan como inmunoestimulantes. También se tiene que la astaxantina, además de su uso en la acuicultura presenta una importancia nutracéutica relacionada con los radicales libres de barrido, inmunomodulación y prevención del cáncer; la *Haematococcus pluvialis* puede producir y acumular astaxantina a concentraciones de 1-8% del peso seco. Así mismo las microalgas son una óptima fuente de AGPIs, las que están ganando cada vez mayor importancia como valiosos productos farmacéuticos e ingredientes de alimentos, debido a su efecto beneficioso sobre la salud humana; en particular, DHA (22:6 ω3) y EPA, (20:5 ω3) son importantes en el desarrollo y funcionamiento del cerebro, la retina y los tejidos reproductivos, tanto en adultos y niños, también se puede utilizar en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, incluyendo problemas cardiovasculares, diversos tipos de cáncer y enfermedades inflamatorias.

Finalmente podemos mencionar el *paramylon* que es el término utilizado para el polisacárido de reserva de *Euglena* y *euglenoids* en general, consta de β-1, 3-glucano, un polisacárido lineal que se encuentran en las paredes celulares de muchas bacterias, plantas y levaduras. Pertenece a un grupo de polisacáridos naturales como *lentinan*, glucanos de hongos, *sizofiran* y *pachyman*, que son considerados compuestos bioactivos; *lentinan* y *sizofiran* inhiben el crecimiento de diversos tumores, mientras que glucanos de hongos se utilizan clínicamente por su efecto estimulante sobre el sistema inmune, en particular, en los macrófagos. El interés principal en β-glucanos se debe a su capacidad de actuar como estimulantes del sistema inmunológico no-específico, al vincularse a un sitio específico en los monocitos/macrófagos y granulocitos, todos ellos se utilizaron con éxito en la acuicultura para fortalecer la defensa no-especificada de importantes especies de peces y camarones por inyección, inmersión, o en piensos. Derivados sulfatados de *Euglena paramylon* han demostrado actividad contra el VIH. Por otra parte, se ha sugerido que este polisacárido tiene un efecto reductor del colesterol cuando se incorpora a la dieta de seres humanos o animales, y modera la glucemia postprandial y la respuesta de la insulina en los seres humanos. Se pueden acumular grandes cantidades de *paramylon* en *Euglena gracilis* cuando crece en presencia de una fuente de carbono utilizable, la *Saccharomyces cerevisiae* representa una fuente alternativa de este compuesto (levadura de panadería), que es actualmente explotado industrialmente para su extracción. Además, la *Euglena* es una fuente potencial de proteínas y un suplemento dietético prometedor debido a su contenido de proteínas

altamente nutritivas y AGP, y para la producción simultánea de compuestos antioxidantes, como el β-caroteno, y vitaminas C y E.

1.1.8. Nuevas aplicaciones de las microalgas [5]

Gracias a recientes investigaciones se sabe que las microalgas podrían ser la base de combustibles ecológicos, de alimentos que ayudarían a cuidar la dieta y luchar contra el cáncer, o de sistemas que absorberían el dióxido de carbono (CO_2) y óxidos de nitrógeno, contribuyendo a mitigar el cambio climático. Diversos proyectos de investigación se centran en esta virtud y plantean la construcción en las instalaciones industriales de sistemas con microalgas que actúen como sumideros de esos gases.

El potencial que presentan las microalgas como proveedores de lípidos para la posterior producción de biodiesel es impresionante. Esto debido a su rápido desarrollo y multiplicación celular, llegando a duplicar su número en un día, y a la capacidad de estos seres de producir y almacenar gran cantidad de lípidos en el interior de las células, esto en condiciones naturales, las que se maximizan cuando se enfrentan a ciertas condiciones de stress celular, como limitaciones nutricionales, de luz; etc. La producción de lípidos en microalgas es superior a la de cualquier otro vegetal utilizado tradicionalmente para la obtención de aceite -como se verá en el siguiente acápite- así mismo, el espacio necesario para su desarrollo es mucho menor. La cadena de producción de biodiesel se vuelve más rentable mediante la utilización de la materia seca resultante de la extracción de lípidos, esta biomasa remanente se puede aprovechar en sistemas de producción como abono orgánico, producción de metano, extracción de pigmentos, y otras de acuerdo al tipo de microalga a cultivar y a los solventes utilizados en la extracción.

Por otro lado se tiene al hidrógeno, el cual es considerado como una potencial fuente energética del futuro, dado que se convierte fácilmente en electricidad y se quema de manera limpia, actualmente es producido mediante procesos basados en combustibles fósiles, los cuales emiten grandes cantidades de dióxido de carbono, y cantidades relativamente pequeñas de otros contaminantes atmosféricos como el dióxido de azufre y óxidos de nitrógeno. Es así que la producción biológica de hidrógeno ha recibido recientemente una renovada atención debido a la preocupación por la contaminación del aire urbano y al calentamiento global. Los procesos para la producción de combustibles gaseosos, hidrógeno (H_2) y metano (CH_4), con cultivos de microalgas se han estudiado desde hace varias décadas, no obstante la única aplicación práctica actual es en el aprovechamiento de la biomasa de algas de los estanques de tratamiento de aguas residuales por floculación química, seguida por la digestión anaeróbica de la biomasa de algas. Sin embargo, los procesos microalgales basados en el aprovechamiento de energía solar que implican la utilización de CO_2 fósil y la generación de combustibles renovables, en particular, hidrógeno o metano, son de creciente interés en el desarrollo de las tecnologías de mitigación de gases de efecto invernadero, donde las microalgas pueden hacer una contribución significativa.

La producción de hidrógeno por biofotólisis directa implica la transferencia de electrones desde el agua a través del aparato fotosintético a la ferredoxina y luego a la hidrogenasa, en lugar de la enzima Rubisco de fijación de CO_2. Por otro lado, las fermentaciones de metano como combustible aprovechan la mayor parte de la

energía solar captada por la biomasa algal, y están disponibles comercialmente para la producción de combustibles gaseosos por fotosíntesis microalgal. Un proceso potencialmente plausible para la producción de hidrogeno de microalgas, consiste en convertir los hidratos de carbono de almacenamiento endógeno en H_2 bajo condiciones de fermentación oscura, acoplado a las reacciones de generación de energía respiratoria, en lugar de la fotosíntetica, factible utilizando un enfoque de ingeniería metabólica (Keasling et al., 1998). Por otra parte, el proceso práctico de fermentación bacteriana de CH_4, utilizando tecnologías comerciales de digestión anaeróbica (Augenstein et al., 1994) se puede utilizar en la actualidad para convertir la biomasa de microalgas a combustible CH_4. La fermentación de metano incluye la producción intermedia de hidrógeno y este podría obtenerse como un subproducto de la, así llamada, fermentación de dos etapas (Harper & Pholand, 1986). Independientemente del mecanismo, todos los procesos de producción de combustible de microalgas requieren de alta eficiencia de conversión de energía solar, lo que se logrará en un largo plazo de investigación y desarrollo.

El bioetanol puede utilizarse como un biocombustible que puede reemplazar parte del combustible derivado de fósiles. Actualmente, el bioetanol es producido por la fermentación de azúcares, por ejemplo de la caña de azúcar, y que en el caso del maíz se deriva de la hidrólisis del almidón. Se han reportado especies de algas con contenido de almidón de más del 50 por ciento; la pared celular de las algas está compuesta en gran parte por polisacáridos, los que junto a la celulosa y la hemicelulosa pueden ser hidrolizadas a azúcares con las nuevas tecnologías, (Hamelinck et al., 2005), creando la posibilidad de convertir una parte aún mayor de la materia seca de las algas en etanol. Las algas tienen algunas características beneficiosas en comparación con la biomasa de origen agrícola, la materia prima tradicional de esta tecnología, la más notable es la ausencia de lignina, volviendo innecesaria su eliminación. Por otra parte, la composición de las algas es en general mucho más uniforme y consistente que la biomasa de las plantas terrestres, porque el alga carece de partes con funciones especificas como raíces y hojas. Se está desarrollando otra tecnología específica para la producción de etanol a partir de algas, en la que las algas verdes son genéticamente modificadas para producir etanol a partir de la luz solar y el dióxido de carbono (Deng y Coleman, 1999). La producción de etanol a partir de o por las algas presenta muy interesantes perspectivas, pero por el momento se encuentra en la fase preliminar de investigación, es necesario mayor desarrollo para analizar un sistema de producción a gran escala.

El aprovechamiento de las microalgas para la producción de nuevos alimentos saludables igualmente ofrece muchas expectativas; según sus impulsores, se podrían diseñar productos que paliarán los desequilibrios en la composición de ácidos grasos de la dieta o que tuvieran diversas propiedades antioxidantes y anticancerígenas. Y no hay que olvidar que, al igual que su vertiente como biocombustible, se podrían cultivar en zonas no destinadas a plantaciones convencionales de alimentos.

Las microalgas también podrían ser utilizadas en el tratamiento de aguas residuales, y ser mucho más ecológicos. Las depuradoras convencionales necesitan productos químicos y energía para realizar su trabajo; estos organismos podrían, al menos en la última fase del proceso de tratamiento, limpiar el agua al aprovechar los desechos orgánicos como nutrientes. La importancia de esta capacidad se enaltece al utilizarla

como un medio para el desarrollo y producción de microalgas con una finalidad más elaborada, como producción de biodiesel, hidrógeno o metano, por ello, algunos investigadores también estudian sus posibilidades para desarrollar sistemas de biorremediación de zonas contaminadas.

Algunas tecnologías de conversión, sobre todo la pirólisis, dan lugar a la formación del residuo de carbón vegetal sólido *biochar*, que tiene potenciales aplicaciones agrícolas como biofertilizante y para el secuestro de carbono. Cuando se aplica para el secuestro de carbono, se considera un disipador de largo plazo que podría ser utilizado para reducir las emisiones de dióxido de carbono hasta en un 84%. Lehmann sugirió que el secuestro de *biochar* ofrece el potencial para producir un biocombustible de carbono negativo, sin embargo, el valor neto de la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero debido a la incorporación de *biochar* en los suelos todavía no es concluyente.

Finalmente se puede aprovechar el desarrollo de las microalgas para la generación de energía, esto gracias a la celda de combustible microbiana (MFC), esta es una nueva tecnología que permite generar corriente eléctrica de las reacciones de oxidación-reducción que ocurren dentro de los microorganismos vivos. Las investigaciones han demostrado que una sola celda de combustible microbiano puede producir voltajes de hasta 800 mV y corrientes que se mide en decenas de mA, aumentando tanto el voltaje como la corriente con el apilamiento de múltiples celdas MFC. La mayoría de microorganismos, y las microalgas no son la excepción, crecen por la absorción de productos químicos orgánicos, los cuales pasan a través de una serie de procesos de reacción metabólica que involucran cientos de reacciones de oxidación-reducción; los electrones liberados por estas reacciones pueden ser capturados por mediadores químicos que tienen la capacidad de penetrar en las células en su estado oxidado y salir de las células en su estado reducido, una vez liberados en medios de fermentación, los mediadores químicos en su estado reducido se oxidan espontáneamente a su estado original y liberan electrones en el ánodo que, posteriormente, entran en el circuito eléctrico. Actualmente se estudia la optimización de las condiciones para la generación de electricidad mediante el empleo de células de microalgas cultivadas en los efluentes industriales, cuando esta tecnología sea optimizada puede ser una forma alternativa de generación de energía a partir de los residuos.

Es importante resaltar que varias formas de aprovechamiento de microalgas no son excluyentes entre sí, es decir se pueden aplicar simultáneamente para obtener un proceso productivo global más eficiente y económicamente viable que permita su aplicación práctica en un corto plazo y favorezca su evolución a gran escala.

1.2. Lípidos en microalgas [8, 27, 28]

Los lípidos son uno de los principales componentes de las microalgas, son componentes importantes de las membranas celulares, productos de almacenamiento, metabolitos y almacenes de energía. Mientras que muchas cepas de microalgas por naturaleza tienen un alto contenido de lípidos (alrededor de 20-50% peso seco), es posible aumentar la concentración mediante la optimización de los factores determinantes del crecimiento tales como el control de nivel de nitrógeno, la intensidad de luz, la temperatura, la salinidad, la concentración de dióxido de

carbono y el proceso de cosecha. Sin embargo, el incremento de la acumulación de lípidos no se traducirá en aumento de la productividad de lípidos, así como la productividad de biomasa y acumulación de lípidos no están necesariamente correlacionados.

Tabla 1.2. Contenido lipídico y productividades de diferentes especies de microalgas.

Especies de microalgas marinas y de agua dulce	Contenido de lípidos (% biomasa peso seco)	Productividad lipídica (mg/L/día)	Productividad volumétrica de biomasa (g/L/día)	Productividad de biomasa por área (g/m^2/día)
Ankistrodesmus sp.	24,0–31,0	–	–	11,5–17,4
Botryococcus braunii	25,0–75,0	–	0,02	3,0
Chaetoceros muelleri	33,6	21,8	0,07	–
Chaetoceros calcitrans	14,6–16,4/39,8	17,6	0,04	–
Chlorella emersonii	25,0–63,0	10,3–50,0	0,036–0,041	0,91–0,97
Chlorella protothecoides	14,6–57,8	1214	2,00–7,70	–
Chlorella sorokiniana	19,0–22,0	44,7	0,23–1,47	–
Chlorella vulgaris	5,0–58,0	11,2–40,0	0,02–0,20	0,57–0,95
Chlorella sp.	10,0–48,0	42,1	0,02–2,5	1,61–16,47/25
Chlorella pyrenoidosa	2,0	–	2,90–3,64	72,5/130
Chlorella	18,0–57,0	18,7	–	3,50–13,90
Chlorococcum sp.	19,3	53,7	0,28	–
Crypthecodinium cohnii	20,0–51,1	–	10	–
Dunaliella salina	6,0–25,0	116,0	0,22–0,34	1,6–3,5/20–38
Dunaliella primolecta	23,1	–	0,09	14
Dunaliella tertiolecta	16,7–71,0	–	0,12	–
Dunaliella sp.	17,5–67,0	33,5	–	–
Ellipsoidion sp.	27,4	47,3	0,17	–
Euglena gracilis	14,0–20,0	–	7,70	–
Haematococcus pluvialis	25,0	–	0,05–0,06	10,2–36,4
Isochrysis galbana	7,0–40,0	–	0,32–1,60	–
Isochrysis sp.	7,1–33	37,8	0,08–0,17	–
Monodus subterraneus	16,0	30,4	0,19	–
Monallanthus salina	20,0–22,0	–	0,08	12
Nannochloris sp.	20,0–56,0	60,9–76,5	0,17–0,51	–
Nannochloropsis oculata.	22,7–29,7	84,0–142,0	0,37–0,48	–
Nannochloropsis sp.	12,0–53,0	37,6–90,0	0,17–1,43	1,9–5,3
Neochloris oleoabundans	29,0–65,0	90,0–134,0	–	–
Nitzschia sp.	16,0–47,0	–	–	8,8–21,6
Oocystis pusilla	10,5	–	–	40,6–45,8
Pavlova salina	30,9	49,4	0,16	–
Pavlova lutheri	35,5	40,2	0,14	–
Phaeodactylum tricornutum	18,0–57,0	44,8	0,003–1,9	2,4–21
Porphyridium cruentum	9,0–18,8/60,7	34,8	0,36–1,50	25
Scenedesmus obliquus	11,0–55,0	–	0,004–0,74	–
Scenedesmus quadricauda	1,9–18,4	35,1	0,19	–
Scenedesmus sp.	19,6–21,1	40,8–53,9	0,03–0,26	2,43–13,52
Skeletonema sp.	13,3–31,8	27,3	0,09	–
Skeletonema costatum	13,5–51,3	17,4	0,08	–
Spirulina platensis	4,0–16,6	–	0,06–4,3	1,5–14,5/24–51
Spirulina maxima	4,0–9,0	–	0,21–0,25	25
Thalassiosira pseudonana	20,6	17,4	0,08	–
Tetraselmis suecica	8,5–23,0	27,0–36,4	0,12–0,32	19
Tetraselmis sp.	12,6–14,7	43,4	0,30	–

Fuente: Mata, T. et al., 2010 [20]

La acumulación de lípidos se refiere a la mayor concentración de lípidos en las células de microalgas sin tener en cuenta la producción de biomasa en general, y la productividad de lípidos tiene en cuenta tanto la concentración de lípidos en las células y la biomasa producida de estas células y por lo tanto es un indicador más útil de los posibles costos de producción de aceites y, por consiguiente, de biocombustibles líquidos (se verá en el punto 1.3). La tabla 1.2 presenta tanto el contenido de lípidos como la productividad de lípidos y de biomasa de diferentes especies de microalgas marinas y de agua dulce, con diferencias significativas entre las distintas especies.

Como se aprecia en la tabla 1.2, el contenido de aceite en las microalgas puede alcanzar el 75% en peso de biomasa seca, pero asociadas a una baja productividad. La mayoría de las algas comunes (*Chlorella*, *Crypthecodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Chizochytrium*, *Tetraselmis*) tienen niveles de aceite entre el 20 y el 50% pero pueden alcanzar mayor productividad.

Muchas especies de microalgas pueden ser inducidas a acumular grandes cantidades de lípidos, lo que contribuye a un mayor rendimiento de aceite. Estos lípidos se pueden utilizar como combustible líquido en motores adaptados como *Straight Vegetable Oil* (SVO). Triglicéridos y ácidos grasos libres, una fracción del contenido total de lípidos, se pueden convertir en biodiesel. En comparación con SVO, el aceite de algas es en mayor medida insaturado por lo que es menos apropiado para la combustión directa en los motores inestables. Con el fin de producir de manera eficiente el biodiesel a partir de algas, se seleccionan cepas con una alta tasa de crecimiento y contenido de aceite. La acumulación de lípidos en las algas ocurre generalmente durante períodos de estrés ambiental, el cultivo en condiciones deficientes en nutrientes es al que se hace referencia más a menudo. La investigación inicial se centró en el aislamiento de microalgas con alto contenido de lípidos que pueden ser cultivadas en estanques abiertos a gran escala para la producción de biodiesel, y la captura de CO_2 de las centrales eléctricas alimentadas a carbón como proceso biológico de control de emisiones. Los principales hallazgos de la investigación fueron: el incremento en la acumulación de aceite en células de algas debido a la deficiencia de nitrógeno es inversamente proporcional a la productividad global de aceite del cultivo debido a la disminución de la productividad de biomasa total, resultante de la reducción de los niveles de nutrientes; la producción en estanques abiertos es más apropiada para la producción de microalgas a gran escala debido a los bajos costos; el mantenimiento de cultivos, de una única microalga específica, en estanques abiertos, sin contaminar, orientado a una alta producción sostenible es excesivamente difícil.

La acumulación de lípidos en las microalgas se produce cuando un nutriente se agota en el medio y se convierte en el factor limitante del crecimiento. El método más efectivo para aumentar la acumulación de lípidos en microalgas es la limitación de nitrógeno, que no sólo genera la acumulación de lípidos, sino que también da lugar a un cambio gradual de la composición lipídica de ácidos grasos libres a triglicéridos (TAG) [3], siendo estos más útiles para la conversión a biodiesel (Meng, X. et al, 2009). La proliferación celular se restringe, pero el carbono sigue siendo asimilado por las células y se convierte en lípidos TAG que se almacenan dentro de las actuales células aumentando así la concentración. Wu y Hsieh (2008) investigaron los efectos

de la salinidad, concentración de nitrógeno y la intensidad de la luz en la productividad de los lípidos, registrando hasta 76% de aumento en la producción de lípidos para condiciones específicas de crecimiento en comparación con los procesos de crecimiento más típicos. Weldy y Huesemann [32] argumentan que para la producción de lípidos, el porcentaje de contenido de lípidos en las microalgas es menos importante que la maximización de las tasas de crecimiento. Por ejemplo, se registró una mayor productividad de lípidos (0,46 g/L por día) en condiciones de N-suficiente y luz de alta intensidad en comparación con los cultivos N-deficientes (0,12 g/L por día). Chiu et al. (2009) estableció que el 2% (v/v) de concentración de CO_2 es óptimo para lograr la máxima productividad de biomasa y lípidos en *Nannochloropsis oculata*, logrando 0,48 g/L por día y 0,142 g/L por día de producción de biomasa y lípidos, respectivamente.

En la última década, la biotecnología microalgal ha hecho grandes avances con relación a las especies destinadas a la obtención de biomoléculas de alto valor agregado. Una de las ficomoléculas de gran interés industrial son los ácidos grasos; sustancias naturales de origen lipídico (forman parte del 20 al 40% del total de los lípidos). Su biosíntesis en microalgas está relacionada indirectamente al proceso de conversión de la energía solar en energía química, vía fotosíntesis, ya que en condiciones estándar, la fase de crecimiento exponencial se obtiene después de 5 a 7 días; este tiempo dependerá principalmente del tamaño del inóculo, medio, temperatura, iluminación así como también de la tasa de crecimiento de la especie. De manera general, un ácido graso es una cadena de hidrocarburos terminada por un grupo carboxilo que participan en la constitución de los lípidos, esterificando al glicerol y otros alcoholes. Las microalgas debido a su capacidad de sintetizar ácidos grasos polienoicos se sitúan como una de las fuentes principales de estos ácidos en el medio acuático. De las microalgas, los ácidos grasos se transportan a través de la cadena alimenticia y se incorporan así en los lípidos de organismos superiores; estos son en su mayoría moléculas de cadena recta con un número par de átomos de carbono, pueden ser saturados o insaturados con 1 a 6 dobles enlaces, cuya función está relacionada a la de las membranas celulares, al almacenamiento de energía y a los procesos metabólicos. Los ácidos grasos poli insaturados (AGPIs), derivados de microalgas son el ácido docosahexaenoico (DHA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido araquidónico (ARA). Las microalgas se consideran como una de las fuentes naturales que más acumulan ácidos grasos insaturados de cadena larga en medios acuáticos; y aun cuando la ruta biosintética en estas especies es análoga a la de las plantas superiores, los ácidos grasos altamente insaturados presentan ciertas particularidades:

- Su composición varía de acuerdo a las fluctuaciones de las condiciones de cultivo.
- El alga que sintetiza el lípido realiza la fotosíntesis, lo que significa que tanto la fijación de CO_2, como la síntesis de glicéridos a partir de ácidos grasos y glicerol se realiza en la misma célula.
- Efectivamente, al disminuir la radiación incidente, disminuye la actividad fotosintética y por ende la producción proteínica también disminuye, así los carbonos fijados por fotosíntesis son derivados hacia la producción de lípidos, tanto de ácidos grasos como de glicerol.
- La concentración de DHA, y por ello la calidad de lípidos, se ve afectada negativamente por los aumentos en la concentración de lípidos. Los lípidos de

más alta calidad se obtienen cuando se utiliza la glucosa como fuente de carbono, y cuando la concentración celular y el contenido lipídico en las células son los más bajos.

El contenido de ácidos grasos muestra diferencias sistemáticas según el grupo taxonómico, aunque se encuentran ejemplos con diferencias significativas entre microalgas de la misma clase. La mayoría de especies de microalgas tienen de un moderado a alto porcentaje de EPA (7-34%). Primnesioficeas, así como dinoflagelados y criptomonadales son relativamente ricos en DHA (0,2-11%), mientras que *eustigmatophytes* (*Nannochloropsis spp*.) y diatomeas tienen los más altos porcentajes de ARA (0-4%). Las clorofitas (*Dunaliella spp*. y *Chlorella spp*.) son deficientes tanto en AGPIs C20 y C22, aunque algunas especies tienen una pequeña cantidad de EPA (hasta 3,2%). Las especies *Prasinophyte* contienen una proporción significativa de C20 (*Tetraselmis spp*.) o C22 (*Micromonas spp*.), pero rara vez ambos. En la postrimería de la fase logarítmica, las primnesioficeas, en promedio, contienen los más altos porcentajes de grasas saturadas (33% de ácidos grasos totales), seguido de las diatomeas y *eustigmatophytes* (27%), prasinofitas y clorofitas (23%), y dinoflagelados y criptomonadales (18%). Las microalgas representan también uno de los productores más prometedores de EPA, pues la purificación de este AGPI del aceite de pescado, que sigue siendo la principal fuente comercial de EPA, implica muchas desventajas. Varios *Eustigmatophyceae*, como *Nannochloropsis sp.* y otras especies como *Monodus subterraneus* y *Bacillariophyceae* contienen una cantidad considerable de EPA. Así mismo, el género *Nitzschia* es un potencial productor de EPA, se sabe que el contenido de aceite de *N. alba* llega al 50% del peso seco de la célula y la EPA comprende el 5,4% del aceite y la *N. laevis* puede utilizar la glucosa o glutamato como sustrato único para el crecimiento heterotrófico, y el contenido celular de la EPA del alga en condiciones heterotróficas también es mayor que aquel en condiciones autótrofas lo que sugiere que esta diatomea es un buen productor heterotrófico de EPA.

Los AGPIs están ganando cada vez mayor importancia como valiosos productos farmacéuticos e ingredientes de alimentos debido a su efecto beneficioso sobre la salud humana. DHA (22:6 ω3) y la EPA, (20:5 ω3), en particular, son importantes en el desarrollo y el funcionamiento del cerebro, la retina y los tejidos reproductivos, tanto en adultos y niños. También se puede utilizar en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, incluyendo problemas cardiovasculares, diversos tipos de cáncer y enfermedades inflamatorias. En la actualidad, los AGPI se producen comercialmente a partir de aceite de pescado, pero esta es una fuente insuficiente de estos productos, mientras que las microalgas son una fuente óptima de AGPI.

De todas las líneas energéticas producidas a partir de algas, el biodiesel ha recibido la mayor atención y es la única iniciativa que se encuentra en la frontera de la implementación a escala piloto y en gran escala.

1.3. Biodiesel de tercera generación

1.3.1. Descripción [9, 20]

La ASTM (American Society for Testing and Materials) define biodiesel como el éster monoalquílico de cadena larga de ácidos grasos derivados de recursos

renovables, como por ejemplo aceites vegetales o grasas animales, para utilizarlos en motores Diesel. Aunque “diesel” es parte de su nombre, el biodiesel puro no contiene ningún diesel basado en petróleo (también llamado "petrodiesel"). El biodiesel es creado a partir de materia orgánica nueva, se puede hacer de casi cualquier aceite vegetal, incluidos los de soya, maíz, colza (canola), maní o girasol, así como de aceite de cocina reciclado, grasas animales o incluso algas. Al biodiesel se le ha llamado “energía solar líquida” debido a que su contenido energético proviene de plantas que captan la energía solar en la fotosíntesis. Las plantas cultivadas para producir biodiesel consumen dióxido de carbono (CO_2), por lo que se equilibra de forma natural la mayor parte del CO_2 que se libera en la combustión, compensando un importante factor que contribuye al calentamiento global. El uso de aceite vegetal como combustible no es una idea nueva, cuando Rudolf Diesel inventó el motor diesel original en la década de 1890, se diseñó para trabajar con una amplia gama de combustibles, incluyendo los aceites vegetales; a partir de la década de 1900, los motores diesel fueron adaptados para funcionar principalmente con petrodiesel, un combustible más barato, no obstante, durante la crisis energética de la década de 1970, los investigadores comenzaron a reconsiderar los combustibles de aceite vegetal y encontraron un método sencillo para convertir aceite vegetal en un útil combustible diesel.

El biodiesel es una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos obtenidos por transesterificación (reacción de intercambio de esteres) de aceites vegetales o grasas animales. Estas materias primas están compuestas por 90-98 % (en peso) de triglicéridos y pequeñas cantidades de mono y diglicéridos, ácidos grasos libres (1-5%), y cantidades residuales de fosfolípidos, fosfátidos, carotenos, tocoferoles, compuestos de azufre y trazas de agua (Bozbas, K., 2008). La transesterificación es una reacción química de varios pasos, entre ellos tres etapas reversibles en serie, donde los triglicéridos se convierten en diglicéridos, a continuación, los diglicéridos se convierten en monogliceridos y estos se convierten en ésteres (biodiesel) y glicerina que es un co-producto de alto valor. En la figura 1.1 se observa la reacción de transesterificación, donde los radicales R representan los hidrocarburos de cadena larga, conocida como cadenas de ácidos grasos; sólo hay cinco cadenas que son comunes en la mayoría de los aceites vegetales y grasas animales (los demás están presentes en pequeñas cantidades), las cantidades relativas de los cinco ésteres metílicos determinar las propiedades físicas del combustible, incluido el número de cetano (NC), el flujo en frío, y la estabilidad oxidativa.

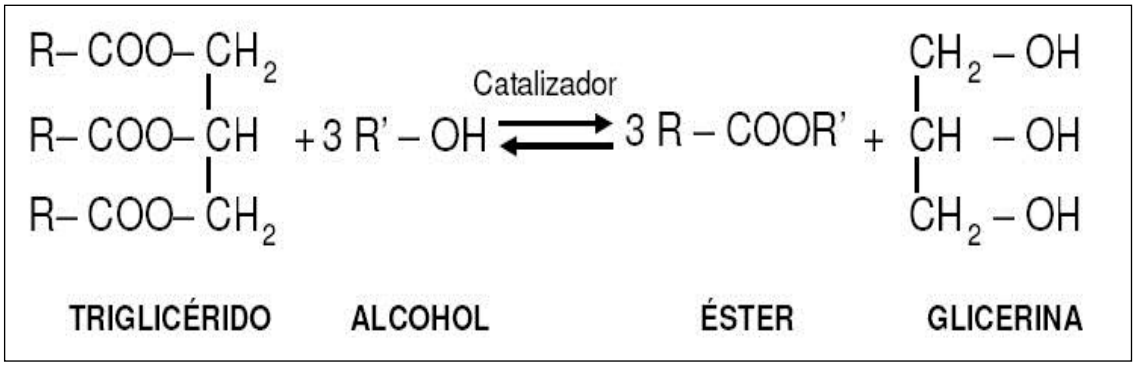

Figura 1.1. Reacción de transesterificación

El proceso para la fabricación de biodiesel es relativamente simple y puede requerir baja tecnología; así, para la reacción de transesterificación, aceite o grasa y un alcohol de cadena corta (generalmente metanol) se usan como reactivos en presencia de un catalizador (generalmente NaOH). Aunque la relación molar teórica del alcohol:aceite es 3:1; se utiliza generalmente la relación molar de 6:1 para completar la reacción con precisión. La relación entre la entrada de materia prima y la producción de biodiesel es alrededor de 1:1, lo que significa que, en teoría, 1 kg de aceite da lugar a 1 kg de biodiesel. Un catalizador ácido o básico, homogéneo o heterogéneo se puede utilizar para mejorar la velocidad de reacción de transesterificación, aunque para algunos procesos con fluidos supercríticos (metanol o etanol) puede que no sea necesario utilizar un catalizador (Warabi, Y. et al., 2004). La mayoría de los procesos industriales de uso común utilizan catalizadores alcalinos homogéneos (NaOH o KOH) en un reactor agitado, de funcionamiento en modo *batch*.

Si bien prácticamente todos los productores de biodiesel comercial usan un catalizador alcalino para el proceso de transesterificación, se han propuesto otros enfoques, como catálisis ácida (Canakci, M. et al., 1999) y las enzimas (Wu, W. et al., 1999). El uso de catalizadores ácidos es más útil para el pretratamiento de altos ácidos grasos libres, pero la velocidad de reacción de conversión de los triglicéridos en ésteres de metilo es mucho menor. Las enzimas muestran buena tolerancia para el nivel de ácidos grasos libres de la materia prima, pero las enzimas son caras y no pueden proporcionar el grado de realización de reacción necesario para satisfacer las especificaciones de los combustibles ASTM (Coyle, W. 2007). La inmovilización de la enzima y el uso de múltiples enzimas de forma secuencial pueden ofrecer futuras oportunidades en este ámbito (Wu, W. et al., 1999). Recientemente se han propuesto algunas mejoras para este proceso, en particular para poder operar en modo continuo con el tiempo de reacción reducido, como con reactores de mezcla mejorada, reacción asistida con microondas (Cravotto, G. et al., 2008; Azcan, n. et al., 2008), reactores de cavitación (Gogate PR, 2008-2009) y reactores de ultrasonido (Kalva, A. et al., 2008; Deshmane VG. et al.).

El biodiesel, puede ser utilizado en motores convencionales sin cambios de consideración, sólo requieren el remplazo de las mangueras de conducción del combustible por elementos no fabricados sobre la base de caucho o espuma de poliuretano; puede usarse puro, en cuyo caso se conoce como B100, sin embargo, con frecuencia es mezclado con combustible diesel basado en petróleo y cuando esto se hace la mezcla se denomina "BXX", donde XX es el porcentaje de biodiesel en la mezcla. La experiencia comercial con el biodiesel es muy prometedora (European Engine Manufacturers, 1995), funciona tan bien como el diesel de petróleo, mientras reduce las emisiones de partículas de CO_2, hidrocarburos y SO_X; aunque, en muchos motores las emisiones de NO_X son mayores. El biodiesel prácticamente elimina las emisiones de hollín negro asociados a los motores diesel, la emisión total de partículas es también mucho más baja (Graboski, M. et al., 1994). Otros beneficios ambientales del biodiesel, en relación con diesel de petróleo, incluyen el hecho de que es altamente biodegradable y que parece reducir las emisiones de tóxicos al aire y sustancias cancerígenas (Lee, K. et al. 2007).

1.3.2. Aspectos relevantes del biodiesel de tercera generación [8, 20]

Puesto que en el mundo se entendió que la utilización de recursos renovables es esencial para el desarrollo sostenible, las políticas energéticas se han desplazado poco a poco a los recursos renovables como biocombustibles. En particular, los biocombustibles líquidos se han convertido en la prioridad, ya que el 40% del consumo total de energía en el mundo se hace en la forma de combustibles líquidos. La producción mundial de biocombustibles líquidos muestra una tendencia al alza entre el 2000 y 2007. Las tecnologías están entonces, concentradas en la explotación de cultivos que tienen un alto valor energético, tales como aceite comestible y la caña de azúcar para producir biodiesel y bioetanol, respectivamente. Si bien el desarrollo de combustibles de biomasa continúa a buen ritmo, los biocombustibles de primera generación a partir de cultivos comestibles han planteado cuestiones de ética, ya que hay millones de personas en todo el mundo que aún sufren de desnutrición y hambre. Para superar este problema el objetivo viró hacia la búsqueda de nuevas alternativas de biocombustibles que no compitan con los alimentos; es decir, cuya fabricación no implique el uso de materias primas potencialmente consumibles, como granos o aceites de maíz o de soya, dando lugar a los biocombustibles de segunda generación (SGB) a partir de materiales lignocelulósicos (madera), los que ofrece una gran opción que es compatible con el crecimiento económico sostenible y las cuestiones de ética. Sin embargo, a pesar de que los SGB son atractivos pues usan materia prima no comestible, es una cuestión muy controvertida, debido a que el cultivo de plantas terrestres requiere los recursos que podrían utilizarse para la alimentación, por otra parte, la separación de la lignina de las lignocelulosas se convirtió en un obstáculo. En este contexto, los biocombustibles de tercera generación a base de subproductos (como cáscaras, *expellers*, aceites usados y desechos) u otras materias primas (algas marinas, por ejemplo) ofrecen una excelente alterativa para desplazar a los combustibles fósiles, pues no demandan la utilización de áreas con potencial agrícola, en detrimento de la superficie implantada para cultivos alimenticios.

El interés en el aceite de algas no es nuevo, pero el amplio interés en la utilización de este aceite para la producción de biodiesel es más reciente. Sin embargo, para que el biodiesel de algas sea aceptado como un combustible que sustituya a los combustibles fósiles, sus propiedades debe igualar o superar la Norma de Biodiesel Internacional para Vehículos (EN14214). El aceite de microalgas contiene un alto grado de ácidos grasos poliinsaturados en comparación con los aceites vegetales, lo que lo hace susceptible a la oxidación por almacenamiento limitando su utilización (Chisti, Y., 2007); no obstante, el biodiesel de algas tiene propiedades físicas y químicas similares al diesel de petróleo, además de presentar varias ventajas sobre este pues deriva de la biomasa y por lo tanto es renovable, biodegradable, y casi neutro en carbono en la producción sostenible, no es tóxico y contiene bajos niveles de partículas, monóxido de carbono, hollín, hidrocarburos y SO_X. Cabe señalar que en comparación con el biodiesel de primera generación, el biodiesel de microalgas es más adecuado para su uso en la industria de la aviación en los que los bajos puntos de congelación y las altas densidades de energía son criterios clave, otra gran ventaja del biodiesel de microalgas es que reduce las emisiones de CO_2 hasta en un 78% en comparación con las emisiones de diesel de petróleo (Sheehan, J. et al., 1998).

Si bien la productividad de aceite de microalgas depende de la cepa, es generalmente mucho mayor que otros vegetales, como se muestra en la tabla 1.3, que compara la

eficiencia de la producción de biodiesel y el uso de tierras de cultivo de microalgas y otros vegetales, incluida la cantidad de contenido de aceite en base a peso seco y el rendimiento de aceite por hectárea y año (Chisti, Y. 2007). En la tabla se evidencia que, aunque el contenido de aceite es similar entre las plantas y las microalgas, hay variaciones significativas en la productividad de la biomasa total y el rendimiento de aceite resultante y, por consiguiente, en la productividad de biodiesel con una clara ventaja para las microalgas. En términos de uso de tierra, las microalgas seguido por el biodiesel de aceite de palma tienen una clara ventaja debido a su mayor productividad de biomasa y rendimiento de aceite.

Tabla 1.3. Eficiencia de producción de biodiesel para vegetales y microalgas

Origen	Contenido de aceite (por peso biomasa)	Rendimiento de aceite (L aceite/ha año)	Uso de tierras (m^2 año/kg biodiesel)	Productividad biodiesel (kg biodiesel/ ha año)
Maíz (*Zea mays L.*)	44	172	66	152
Cáñamo (*Cannabis sativa L.*)	33	363	31	321
Soya (*Glycine max L.*)	18	636	18	562
Piñón (*Jatropha curcas L.*)	28	741	15	656
Camelina (*Camelina sativa L.*)	42	915	12	809
Canola/colza (*Brassica napus L.*)	41	974	12	862
Girasol (*Helianthus annuus L.*)	40	1070	11	946
Ricino (*Ricinus communis*)	48	1307	1156	9
Aceite de palma (*Elaeis guineensis*)	36	5366	2	4747
Microalgas (contenido aceite bajo)	30	58700	0,2	51 927
Microalgas (contenido aceite medio)	50	97800	0,1	86 515

Fuente: Mata, T. et al., 2010 [20]

Volviendo un instante a la tabla 1.2, se puede observar que *Chlorella* parece ser una muy buena opción para la producción de biodiesel. Sin embargo, como otras especies son también eficientes y productivas, la selección de las especies más adecuada debe tener en cuenta otros factores, como la capacidad de las microalgas para desarrollar la utilización de los nutrientes disponibles o en condiciones ambientales específicas. Todos estos parámetros deben ser considerados simultáneamente en la selección de las especies o cepas más adecuadas para la producción de biodiesel. También es significativa la composición de ácidos grasos de las diferentes especies de microalgas, ya que pueden tener un efecto significativo sobre las características del biodiesel producido (se componen de ácidos grasos saturados e insaturados con de 12 a 22 átomos de carbono, algunos de ellos de familias ω3 y ω6). Diferentes factores nutricionales y ambientales, condiciones de cultivo y las fases de crecimiento pueden afectar la composición de ácidos grasos.

Desde un punto de vista práctico, las microalgas son fáciles de cultivar, sus nutrientes son fáciles de obtener y pueden crecer con poca o ninguna atención, utilizando agua no apta para el consumo humano. Se reproducen mediante la fotosíntesis para convertir la energía solar en energía química, completando un ciclo de crecimiento completo todos los días (Sheenhan, J. 1998). Tienen tasas de crecimiento y productividad mucho mayores en comparación con el sector forestal convencional, los cultivos agrícolas, y otras plantas acuáticas, requiriendo una superficie mucho menor de tierra que otras materias primas para biodiesel de origen agrícola, hasta 49 o 132 veces menor en comparación con los cultivos de colza o

soya, para un 30% (p/p), del contenido de aceite en la biomasa de algas (Chisti, Y. 2007).

Las ventajas del uso de biocombustibles derivados de microalgas son: las microalgas son capaces de producirse durante todo el año, por lo tanto, la productividad de aceite de cultivos de microalgas supera el rendimiento de los mejores cultivos de semillas oleaginosas; crecen en medios acuosos, pero necesitan menos agua que los cultivos terrestres, reduciendo la carga sobre las fuentes de agua dulce; las microalgas pueden cultivarse en agua salobre y tierras no cultivables, por lo tanto no podrán incurrir en el cambio de uso del suelo, minimizando los impactos ambientales asociados, sin comprometer la producción de alimentos, forraje y otros productos derivados de cultivos; las microalgas tienen un potencial de rápido crecimiento y muchas tienen un contenido de aceite en el rango de 20-50% del peso seco de biomasa, las tasas de crecimiento exponencial puede duplicar su biomasa en períodos tan cortos como 3,5 horas; con respecto al mantenimiento y la mejora de la calidad del aire, la producción de biomasa de microalgas puede afectar la biofijación de CO_2 (1 kg de biomasa seca de las algas utilizan alrededor de 1,83 kg de CO_2); los nutrientes para el cultivo de microalgas (especialmente nitrógeno y fósforo) pueden obtenerse de aguas residuales, por lo tanto, además de proporcionar un medio de crecimiento, existe un doble potencial para el tratamiento de efluentes orgánicos de la industria agroalimentaria; el cultivo de algas no requiere la aplicación de herbicidas o pesticidas; se pueden producir valiosos co-productos, tales como las proteínas y biomasa residual después de la extracción de aceite, lo que puede ser utilizado como pienso o fertilizante, o fermentado para producir etanol o metano; la composición bioquímica de la biomasa de algas puede ser modulada con condiciones de crecimiento diferentes, por lo tanto, la producción de aceite puede ser significativamente mayor; y las microalgas pueden producir fotobiológicamente "biohidrógeno". La combinación del potencial de producción de biocombustibles, la fijación de CO_2, la producción de biohidrógeno y el tratamiento biológico de aguas residuales subrayan las potenciales aplicaciones de las microalgas.

Sin embargo, a pesar de su inherente potencial como un recurso de biocombustibles, muchos inconvenientes han impedido el desarrollo de la tecnología de biocombustibles a base de microalgas a la viabilidad comercial que podría permitir su producción y utilización sostenibles, estos incluyen: la selección de especies debe equilibrar los requisitos para la producción de biocombustibles y la extracción de valiosos co-productos; lograr mayores eficiencias a través del desarrollo continuo de los sistemas de producción; desarrollo de técnicas para el cultivo de una sola especie, la reducción de la evaporación y las pérdidas en la difusión del CO_2; potencial de balance energético negativo después de considerar las necesidades de bombeo de agua, transferencia de CO_2, la recolección y extracción; la incorporación de los gases de combustión que no son adecuados en altas concentraciones, debido a la presencia de compuestos tóxicos tales como el NO_X y SO_X. Existen pocas plantas comerciales en operación, por lo tanto, falta información sobre plantas sostenibles a gran escala. La sostenibilidad es clave para el manejo o explotación de los recursos naturales y envuelve consideraciones operativas, ambientales y socio-económicas, las cuales son interdependientes y hacen necesario seguir investigando.

Una discusión adecuada sobre biodiesel requeriría de un análisis más extenso y profundo, el cual escapa del alcance, propósito y objetivo central de la presente tesis.

Basta decir que, dado sus muchos beneficios ambientales y el éxito emergente como combustible en distintos países, el biodiesel es un producto combustible muy prometedor.

Capítulo II

Tecnología de microalgas para la producción de biodiesel

Recientemente las microalgas han recibido gran atención como una nueva fuente de biomasa para la producción de energía renovable. Algunas de las principales características que ponen de relieve a las microalgas frente a otras fuentes es su alto rendimiento de biomasa por unidad de luz y área, pueden tener un alto contenido de aceite o almidón, no requieren tierras de cultivo, el agua fresca no es esencial y los nutrientes pueden ser suministrados de aguas residuales y el dióxido de carbono de un gas de combustión. Como se explicó en el primer capítulo, existen distintas especies de microalgas con una amplia variedad de composiciones celulares, viven como células individuales o colonias sin ningún tipo de especialización. Aun cuando esto hace que su cultivo sea más fácil y controlable, su pequeño tamaño hace que la posterior cosecha sea más complicada. Las algas presentan un claro potencial para ser utilizados como fuente para la producción de energía renovable, a fin de lograr este objetivo, se ha investigado los sistemas más comunes para su cultivo.

En este capítulo se examinan los insumos y condiciones necesarias para el cultivo de microalgas y los sistemas y métodos de producción, así mismo se presentan los métodos de recolección o cosecha y secado de la biomasa, finalmente se expone las distintas metodologías para la extracción de aceite y su posterior uso como insumo para la producción de biodiesel.

2.1. Cultivo de microalgas

El cultivo de microalgas, además de adquirir el producto de interés, provoca un flujo de entradas y salidas; entonces, con el propósito de la producción de energía, se requiere de un análisis de estos flujos a fin de poder elegir la opción más económicamente viable y amigable con el medio ambiente.

2.1.1. Parámetros de cultivo [4, 20, 29]

Un cultivo de microalgas tiene tres componentes primarios: un medio de cultivo contenido en un recipiente adecuado, células de algas que crecen en dicho medio y aire para permitir el intercambio de dióxido de carbono entre el medio y la atmósfera. Para algas completamente autótrofas, todo lo que se necesita para el crecimiento es luz, agua, dióxido de carbono, nutrientes y oligoelementos; ya que, a través de la fotosíntesis las microalgas serán capaces de sintetizar todos los compuestos bioquímicos necesarios para su desarrollo. Sin embargo, sólo una minoría de algas

son completamente autótrofas, y muchas son incapaces de sintetizar ciertos compuestos bioquímicos y requieren que éstos estén presentes en el medio.

Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las microalgas son la calidad y cantidad de nutrientes, la luz, el pH, la agitación y mezcla, la salinidad y la temperatura. Los parámetros óptimos, así como los rangos de tolerancia son específicos para cada especie, los distintos factores pueden ser interdependientes y un parámetro que es óptimo para un conjunto de condiciones no necesariamente lo es para otro.

2.1.1.1 Luz

Al igual que en las plantas, la luz es la fuente de energía que impulsa las reacciones de fotosíntesis en las algas, y por tanto su crecimiento, en este sentido se debe considerar la intensidad, la calidad espectral, y la necesidad de fotoperiodo. La intensidad de la luz juega un papel importante, pero los requerimientos varían ampliamente de acuerdo a la profundidad y la densidad del cultivo algal, a mayor profundidad y concentración celular se debe aumentar la intensidad de la luz para atravesar el cultivo; pero una intensidad de luz demasiado alta (luz solar directa, cultivo muy cerca de luz artificial) puede dar lugar a la foto-inhibición. Por lo tanto, todos los sistemas de cultivo de algas son poco profundos y optimizados para capturar la cantidad suficiente de luz; a menudo se emplean intensidades de luz entre 100 y 200 $\mu E\ sec^{-1}\ m^{-1}$ correspondientes a un 5-10% de plena luz del día (2000 $\mu E\ sec^{-1}\ m^{-1}$). Sólo una parte, alrededor del 45 por ciento, del espectro de luz total es la radiación activa fotosintéticamente (PAR, ~ 400-700 nm), lo que puede ser utilizado por las algas para la captación de CO_2 durante la fotosíntesis, un proceso con eficiencia máxima del 27%; al multiplicar estos dos factores se obtiene el factor máximo teórico de conversión de energía luminosa en energía química mediante la fotosíntesis: 11% (Gao et al, 2007). La intensidad y calidad de la luz puede ser manipulada con filtros, ya que esta puede ser natural o suministrada por tubos fluorescentes que emiten, ya sea el espectro luminoso azul o rojo, que son las partes más activas del espectro de luz para la fotosíntesis.

Por la noche, o en la oscuridad, no se realiza la fotosíntesis, por lo que las algas consumen energía almacenada para la respiración y, dependiendo de la temperatura y otras condiciones, hasta el 25% de la biomasa producida durante el día se puede perder de nuevo en la noche (Chisti, 2007). No obstante muchas especies no crecen bien bajo iluminación constante, a pesar de que el cultivo de microalgas normalmente se desarrolla de esta forma, por lo tanto se utiliza un ciclo luz/oscuridad (LD), (16:08 máxima LD, generalmente 14:10 o 12:12). Por otra parte, se debe evitar el sobrecalentamiento debido a la iluminación tanto natural como artificial.

2.1.1.2 Dióxido de carbono (CO_2)

Como todos los organismos fotosintéticos, las algas utilizan CO_2 como fuente de carbono. No hay crecimiento en ausencia de dióxido de carbono, y su suministro insuficiente es a menudo un factor limitante de la productividad. Sobre la base de la composición química promedio de la biomasa de algas, se necesita aproximadamente 1,8 toneladas de CO_2 para producir una tonelada de biomasa. La disolución natural de CO_2 del aire en el agua no es suficiente, esto se podría mejorar con el burbujeo de

aire a través del agua, pero, ya que el aire contiene aproximadamente 0,0383 por ciento de CO_2, todo el dióxido de carbono en alrededor de 37 000 m^3 de aire sería necesario para producir una tonelada de biomasa seca. Frente a esto surgen otras opciones como el uso de CO_2 puro, lo que es bastante caro, o una fuente de CO_2 de desecho como gas de combustión de una caldera; los gases de combustión generalmente contienen de 4% a 15% de CO_2 y es gratuito e incluso produce ingresos si se enmarca en un plan de prevención de emisiones de gases de efecto invernadero, el único costo es el suministro de la fuente para el sistema de cultivo, que pueden ser significativo dependiendo de la distancia y la profundidad del agua. El dióxido de carbono sólo es necesario durante el día pues de noche es producido debido a la respiración de las algas, como todos los organismos aeróbicos, una alternativa posible es la disolución de CO_2 de los gases de combustión a la concentración máxima en la noche, y agregar esta agua para el sistema de cultivo durante el día.

En los sistemas abiertos de cultivo -se explicará más adelante- no todo el dióxido de carbono suministrado será absorbido, por lo que se añade gas de combustión en exceso; en principio, todos los gases de salida disponibles se pueden añadir al estanque de algas, parte del CO_2, NO_X y SO_X se disolverá, y el resto entrará en la atmósfera como ocurre normalmente. Después de estudiar el cultivo de algas con gases de combustión, Negoro et al. informaron que el SO_2 y NO_X en los gases de combustión inhiben el crecimiento de las algas, pero unos años más tarde, informaron que la diferencia es mínima en comparación con el crecimiento usando CO_2 puro (Negoro et al, 1991. Negoro et al, 1993). Más recientemente, otros científicos también han confirmado que los gases de combustión pueden ser utilizados para el cultivo de algas, sin efectos nocivos. Además, los NO_X disueltos pueden ser utilizados por las algas como fuente de nitrógeno. La cantidad de gases de combustión necesaria por hectárea será diferente para cada especie de alga, y también variará a lo largo del día con la intensidad de luz y temperatura, por lo que es necesaria la optimización para cada aplicación específica.

Por otra parte, las altas concentraciones de dióxido de carbono y dióxido de azufre disuelto afectan el pH del medio, por lo que deben ser controlados o atenuados -la solubilidad del CO_2 en un sistema de agua salada (un pH más alto) es más alta que en agua dulce-. El rango de pH para cultivos de la mayoría de especies de algas es entre 7 y 9, siendo el rango óptimo de 8,2 a 8,7, aunque hay especies que habitan en entornos más ácidos y básicos. Se logra mantener el nivel de pH mediante la aireación del cultivo. En el caso de cultivos de alta densidad, la adición de dióxido de carbono permite corregir un elevado pH, lo que puede llegar a valores límite de hasta pH 9 durante el crecimiento de algas. El no mantener un nivel de pH aceptable puede provocar el colapso de un cultivo completo debido a la interrupción de muchos procesos celulares; además, el CO_2 extra puede ser captado por las algas y formar escamas duras, de carbonato de calcio ($CaCO_3$), alrededor de sus células (Moheimani y Borowitzka, 2007).

2.1.1.3 Nutrientes

Además del dióxido de carbono y la luz, las algas necesitan nutrientes para crecer, siendo los más importantes nitrógeno (N) y fósforo (P). Estos pueden ser suministrados en forma de abono como en agricultura lo que es simple y de fácil

acceso, pero puede ser un factor de coste significativo (Braun y Reith, 1993; Chisti, 2008b). Hay varias opciones para abaratar las fuentes de estos nutrientes, Aresta et al. (2005) mencionan los efluentes de aguas residuales, Olguín et al. (2003) describen un sistema en el que fue eliminado 84 a 96 por ciento de nitrógeno y 72 a 87 por ciento de fósforo del efluente anaeróbico de aguas residuales debido al cultivo de algas, lo que reduce la eutrofización en el medio ambiente. Otra opción es el reciclaje de nutrientes dentro del proceso, dependiendo de la tecnología de producción elegida. Por ejemplo, el reciclaje de nutrientes después de la digestión anaeróbica (Braun y Reith, 1993) o después de la gasificación (Minowa y Sawayama, 1999).

2.1.1.4 Salinidad

La salinidad, tanto en sistemas abiertos como cerrados, pueden afectar el crecimiento y la composición celular de las microalgas. Cada alga tiene un rango óptimo de salinidad diferente, que puede aumentar en condiciones de calor debido a la alta evaporación, la mayoría de especies crecen mejor a un nivel de salinidad ligeramente inferior al de su hábitat natural. Los cambios de salinidad suelen afectar a las microalgas de tres formas: estrés osmótico, estrés iónico (sal) y los cambios de los ratios iónicos celulares debido a la permeabilidad selectiva de iones de la membrana. La forma más sencilla para el control de la salinidad es mediante la adición de agua dulce o salada según sea necesario. En general se encontraron óptimas salinidades entre 20-24 g/L.

2.1.1.5 Temperatura

La temperatura es el factor limitante más importante, después de la luz, para los cultivos de algas en sistemas abiertos y cerrados al aire libre. Los efectos de la temperatura para muchas especies de microalgas en laboratorio están bien documentados, pero la magnitud de los efectos de la temperatura en la producción anual de biomasa al aire libre aún no se conoce de forma suficiente. La temperatura ideal a mantener en los cultivos debe ser lo más cercana posible a la temperatura del hábitat natural de los organismos (o temperatura de recolección); organismos polares (<10 °C), templados (10-25 °C); tropicales (>20 °C). La mayoría de especies de microalgas comúnmente cultivadas toleran temperaturas entre 16 y 27 °C, aunque esto puede variar con la composición del medio de cultivo, la especie y cepa cultivada; generalmente se emplea un valor intermedio de 18-20 °C. Las incubadoras de temperatura controlada suelen utilizar una temperatura constante -transferencias a diferentes temperaturas, deben llevarse a cabo por etapas de 2 °C por semana-, aunque algunos modelos permiten ciclos de temperaturas. Las temperaturas inferiores a 16 °C ralentizará el crecimiento, mientras que las superiores a 35 °C son letales para un número importante de especies.

En las regiones templadas y subtropicales, las algas tienen una temporada de crecimiento, en el invierno la temperatura exterior disminuye y las algas crecen solamente a una fracción de la tasa de crecimiento del verano. En muchos procesos industriales, se produce calor; a veces, este calor se utiliza en otra parte del proceso, se vende a industrias vecinas o se utiliza para temperar casas u otros edificios; pero muchas veces este exceso de calor no se llega a utilizar. Este calor puede ser empleado para optimizar la temperatura del medio en el que las algas crecen; especialmente interesante es la combinación con dióxido de carbono de las plantas de

energía, ya que estas centrales son importantes fuentes de exceso de calor. Por otro lado, los sistemas cerrados pueden llegar a calentarse demasiado y requieren de refrigeración, que se puede hacer con intercambiadores de calor (Chisti, 2007) o rociando agua en el exterior (Chini Zittelli et al., 1999).

2.1.1.6 Agitación del medio

La agitación es necesaria para evitar la sedimentación de las algas, garantizar que todas las células estén expuestas a la luz y a los nutrientes, evitar la estratificación térmica y para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire; esto último es de vital importancia, ya que, el aire contiene CO_2, fuente de carbono para la fotosíntesis.

La agitación de cultivos de microalgas puede ser necesaria en determinadas circunstancias: cuando las células se deben mantener en suspensión a fin de desarrollarse (especialmente importante para los dinoflagelados heterótrofos), en cultivos concentrados para evitar los efectos de limitación de nutrientes debido al apilamiento de las células, y para aumentar la difusión de gas. Además, un cierto grado de turbulencia es deseable a fin de promover la circulación rápida de las células de microalgas de la zona oscura del reactor a la iluminada, especialmente si se trata de producción a gran escala. Por otro lado la alta velocidad del medio y los grados de turbulencia (debido a la agitación mecánica o al burbujeo de aire) puede dañar las microalgas debido al esfuerzo cortante; el nivel óptimo de la turbulencia (por encima del cual se produce la muerte celular) depende de la cepa y debe ser investigado a fin de evitar la disminución de la productividad. Dependiendo de la escala del sistema de cultivo, la mezcla se logra por agitación diaria con la mano (tubos de ensayo, Erlenmeyers), aireación (bolsas, tanques, foto-biorreactores), o usando agitadores de paletas y bombas de inyección (estanques, *raceways*). No todas las especies de algas pueden tolerar una mezcla vigorosa, para esto se pueden utilizar métodos suaves dentro de los ya mencionados como burbujear aire, agitadores de paletas (alrededor de 1 rpm) y suaves movimientos circulares manuales. A la mayoría de cultivos les va bien con una baja agitación, sobre todo cuando no están muy concentrados, pero siempre que sea posible, se recomienda suave agitación manual diaria.

Al considerar el uso de algas para la producción de biodiesel, es importante definir cuantitativamente la influencia de estos parámetros operacionales y su interrelación en el aumento de la acumulación de lípidos, de modo que puedan ser manipulados. De esta manera se puede tener éxito en la obtención de cierto control sobre la composición de las poblaciones microalgales, incluso a gran escala. Como señala De Pauw et al., la experiencia ha demostrado en repetidas ocasiones que los cultivos de algas manejados adecuadamente son muy resistentes y que la contaminación de los medios es, a menudo, un indicio de condiciones de cultivo pobres. Bajo condiciones climáticas apropiadas y con suficientes nutrientes, las microalgas pueden crecer profusamente, comúnmente duplican su biomasa en 24 horas o en 3,5 horas durante la fase de crecimiento exponencial.

2.1.2. Métodos de cultivo [1, 4, 20]

Las algas pueden ser producidas de acuerdo a una gran variedad de métodos, desde los altamente controlados en laboratorio hasta los menos predecibles estanques al aire libre. Los cultivos en ambientes cerrados permiten controlar los parámetros de cultivo, la contaminación de agentes depredadores y el ingreso de algas no deseadas al cultivo; mientras que los sistemas al aire libre, aunque más económicos, dificultan el cultivo de algas especificas -y deseadas- por periodos prolongados. Los sistemas de cultivo abiertos, estanques y tanques no cubiertos (en ambientes cerrados y al aire libre), se contaminan más fácilmente que los sistemas de cultivo cerrado como tubos, frascos, bolsas; etc. También se tiene los cultivos axénicos, libres de todo organismo extraño, aunque es más laborioso pues requiere rigurosa esterilización de todos los materiales de vidrio, medios de cultivo y contenedores para evitar la contaminación; por lo que se vuelve impráctico y costoso para operaciones comerciales. Por otro lado, los cultivos no axénicos, aunque menos costosos y laboriosos, están más propensos al colapso, son menos predecibles y a menudo de calidad variable. Mundialmente se utilizan distintos tipos de cultivo de microalgas, los más ampliamente adoptados incluyen: por lotes, continuo y semi-continuo en depósitos, estanques y biorreactores.

2.1.2.1 En lotes (*batch*)

El sistema de cultivo más común, debido a su simplicidad y bajo costo, es el proceso por lotes. Este es un sistema cerrado, de volumen limitado, en el que no hay entrada ni salida de materiales, es decir, los recursos son finitos. La densidad de células microalgales aumenta constantemente hasta el agotamiento de algún factor limitante, mientras que otros componentes del cultivo disminuyen con el tiempo, así mismo todos los productos producidos por las células durante el crecimiento también aumentan su concentración en el medio de cultivo. Una vez que los recursos han sido utilizados por las células los cultivos mueren a menos que se suministre un nuevo medio, en la práctica esto se hace mediante un subcultivo; es decir, la transferencia de un volumen pequeño del cultivo existente a un gran volumen de medio de cultivo fresco a intervalos regulares. Bajo este método las células pueden crecer y reproducirse en un recipiente cerrado; un típico cultivo por lotes puede ser un matraz de 250 mL con un tapón de algodón y gasa, en algunos casos, el tapón se puede equipar con una pipeta Pasteur y se burbujea aire en el cultivo para mantener altos niveles de oxígeno y dióxido de carbono, así como para inducir la agitación.

Los sistemas de cultivo por lotes son muy dinámicos. La población muestra un patrón típico de crecimiento de acuerdo a una curva sigmoidea (Figura 2.1 a), que consiste en una sucesión de seis fases, que se caracteriza por variaciones en la tasa de crecimiento (Figura 2.1 b). Después de la inoculación, el crecimiento no empieza de inmediato, porque la mayoría de las células pueden ser viables, mas no estar en condiciones de dividirse. El intervalo necesario para que las células transferidas se adapten al nuevo ambiente y empiecen a desarrollarse es la primera fase de la curva de crecimiento, la fase de ajuste. El ajuste o inducción, durante el que la tasa de crecimiento es cero, se atribuye a la adaptación fisiológica del metabolismo celular al crecimiento, así como al aumento de los niveles de enzimas y metabolitos implicados en la división celular y la fijación de carbono. Esta fase es relativamente larga cuando un cultivo de algas se transfiere de una placa a cultivo líquido, así mismo

cultivos inoculados en la fase de crecimiento exponencial tienen una fase de ajuste corta, que puede reducir considerablemente el tiempo requerido para la ampliación de la escala.

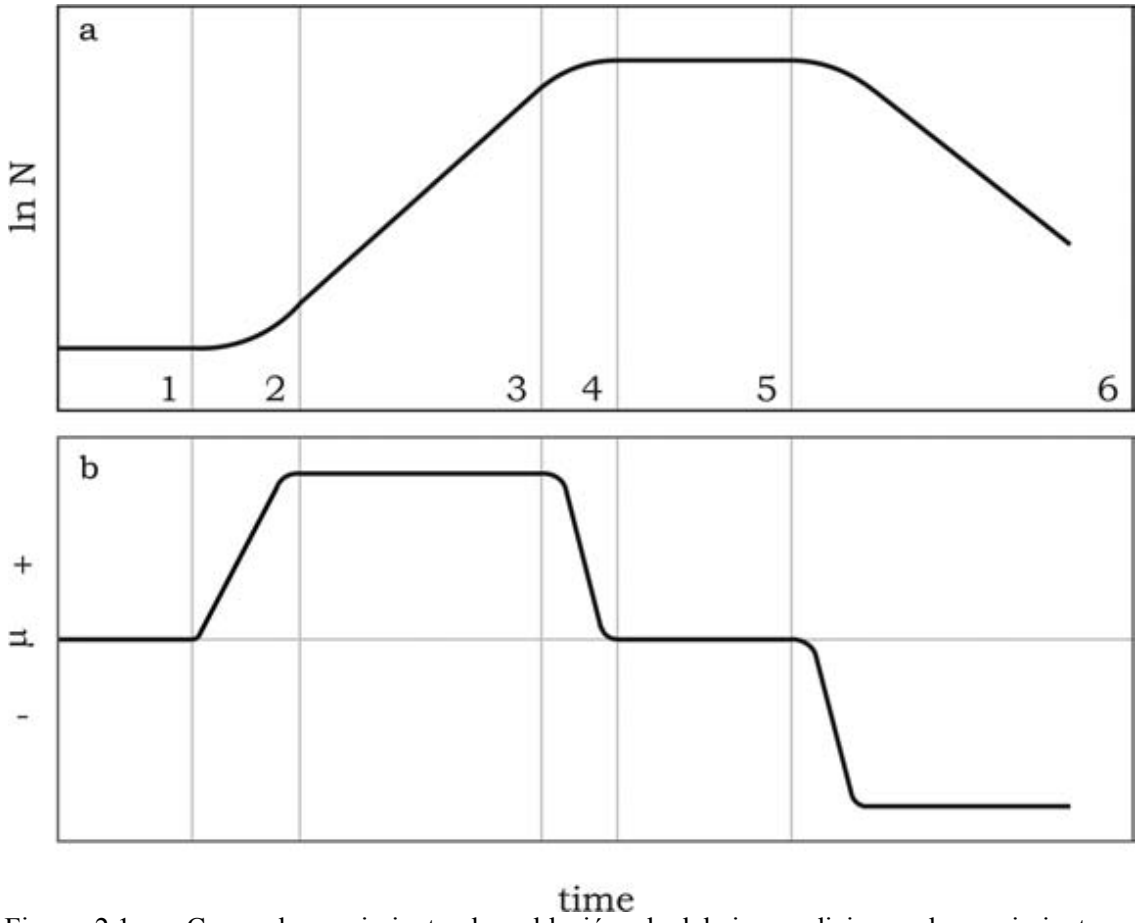

Figura 2.1. a. Curva de crecimiento de población algal bajo condiciones de crecimiento método *batch*.
b. Variaciones correspondientes a la tasa de crecimiento.

Después de una breve fase de aceleración del crecimiento, caracterizada por una tasa de crecimiento con incremento continuo, el cultivo alcanza su valor máximo en la fase exponencial, donde el aumento de la densidad celular, en función del tiempo t, se da de acuerdo a la función exponencial:

$$N_2 = N_1 * e^{\mu}$$

Donde N_2 y N_1 representan el número de células en dos momentos sucesivos y μ es la tasa de crecimiento.

Durante esta fase, la tasa de crecimiento alcanzada se mantiene constante y depende principalmente de la especie con que se está trabajando y los parámetros de cultivo, tales como la intensidad de la luz, disponibilidad de nutrientes y temperatura.

La fase de crecimiento exponencial normalmente dura un período muy corto, porque las células comienzan a darse sombra entre sí a medida que aumenta su concentración; por lo tanto, el cultivo entra en la fase de retardo o declinación, y la tasa de crecimiento de las células disminuye debido principalmente a la luz, y también a los nutrientes, el pH, dióxido de carbono, y otros factores físicos y

químicos que empiezan a limitar el crecimiento. Tras esta fase, la población celular sigue aumentando, pero la tasa de crecimiento va disminuyendo hasta llegar a cero, momento en el que el cultivo entra en la fase estacionaria, durante la cual la concentración de células se mantiene constante en su valor máximo. La etapa final es la muerte, que se caracteriza por una tasa de crecimiento negativa, durante esta fase la calidad del agua se deteriora, debido principalmente a la acumulación catabólica y el agotamiento de los nutrientes a un nivel incapaz de sostener el crecimiento. La densidad celular disminuye rápidamente y el cultivo colapsa. En la práctica, el colapso de los cultivos puede darse por una variedad de razones, incluyendo el agotamiento de nutrientes, la deficiencia de oxígeno, el recalentamiento, alteraciones del pH o la contaminación. La clave para el éxito de la producción de algas es mantener los cultivos en la fase exponencial de crecimiento; además, el valor nutricional de las algas producidas es inferior una vez que el cultivo pasa la fase estacionaria debido a la reducción de la digestibilidad, la composición deficiente y la posible producción de metabolitos tóxicos.

En los cultivos por lotes las propiedades celulares como tamaño, composición nutricional y función metabólica varían considerablemente durante las fases de crecimiento, a menudo esto puede dificultar la interpretación de resultados. Durante la fase de crecimiento exponencial, las propiedades celulares tienden a ser constantes; sin embargo, esta fase por lo general sólo dura un corto período, y si se quiere estimar las tasas de crecimiento, el muestreo diario puede ser insuficiente para permitir una estimación razonable.

Los sistemas de cultivo por lotes se aplican ampliamente debido a su simplicidad y flexibilidad operacional, que permite cambiar las especies y corregir defectos en el sistema rápidamente, lo que constituye una ventaja significativa; pero, aunque a menudo se considera como el método más fiable, no es necesariamente el método más eficiente. Los cultivos se cosechan justo antes de la iniciación de la fase estacionaria y por lo tanto siempre se mantienen por un tiempo sustancial más allá de la tasa de crecimiento máxima, así mismo, la calidad de las células recolectadas pueden ser menos predecible que en los sistemas continuos y, por ejemplo, varían con el tiempo de la cosecha (hora del día, fase de crecimiento exacta). Otra desventaja es la necesidad de evitar la contaminación durante la inoculación y el período de crecimiento inicial; pues, debido a que la densidad de la especie deseada es baja y la concentración de nutrientes es alta, cualquier contaminante con una tasa de crecimiento más rápida es capaz de rebasar el cultivo. Cabe mencionar además que se requiere bastante mano de obra para la cosecha, limpieza, esterilización, llenado e inoculado de los recipientes.

2.1.2.2 Continuo

En cultivos continuos, los recursos son potencialmente infinitos, los cultivos se mantienen en un punto elegido en la curva de crecimiento mediante la adición regulada de medio de cultivo fresco. En la práctica, se agrega automáticamente un volumen de medio de cultivo fresco a una velocidad proporcional a la tasa de crecimiento de las algas, mientras que se separa un volumen igual del cultivo. Los nutrientes se suministran a las células cultivadas a un ritmo constante y, con el fin de mantener un volumen constante, se retira un volumen igual de cultivo celular. Esto permite que la población celular pueda alcanzar un "estado estacionario" (es decir,

crecimiento y división celular donde la tasa de crecimiento y el número total de células por mililitro de cultivo se mantiene constante). Este método permite mantener el cultivo muy cerca de la máxima tasa de crecimiento, pues no se queda sin nutrientes.

Según Fogg y Thake (1987), se pueden distinguir dos categorías de cultivos continuos:
Turbidostat culture, en el que se entrega medio fresco sólo cuando la densidad celular del cultivo llega a un punto predeterminado, medido por la extinción del paso de la luz a través del cultivo; en este punto se añade medio fresco y un volumen igual se retira del cultivo, el cultivo diluido aumenta en densidad celular hasta que el proceso se repite.
Chemostat culture, en el que se introduce un flujo de medio fresco al cultivo a un ritmo constante y predeterminado, este último añade un nutriente vital limitante (por ejemplo, nitrato) a una tasa fija y de esta manera la tasa de crecimiento, y no la densidad celular, se mantiene constante. Aquí, la adición del medio determina, en última instancia, la tasa de crecimiento y densidad celular.

En el sistema continuo se bombea aire en el recipiente de cultivo a través de un filtro estéril, este aire burbujeante tiene tres efectos: suministra oxígeno y dióxido de carbono, ayuda a la circulación y agitación, y presuriza el espacio superior del recipiente de cultivo a fin de proporcionar la fuerza para "remover" una cantidad de medio -y células- igual al volumen de flujo de medio fresco entrante. Un verdadero cultivo continuo entregará medio fresco a un volumen constante por unidad de tiempo ("tasa de dilución"); sin embargo los sistemas de entrega, tales como bombas peristálticas o puertas solenoide son poco fiables, por lo que, con el fin de ofrecer exactamente la misma cantidad de medio de cultivo a varios cultivos a la vez, se puede tomar un enfoque semi-continuo.

La principal ventaja del cultivo continuo es que la tasa de dilución controla la velocidad de crecimiento microalgal a través de la concentración del nutriente limitante del crecimiento en el medio. Siempre que la tasa de dilución sea inferior a la tasa de crecimiento máximo alcanzable por la especie de algas, la densidad celular aumentará a un punto en el que la tasa de división celular ("tasa de natalidad") equilibre exactamente la tasa de células eliminadas ("tasa de mortalidad"). Por otro lado, si la tasa de dilución supera a la tasa máxima de división celular, entonces las células son eliminadas más rápido de lo que son producidas y eventualmente se produce la eliminación total de la población celular. Los cultivos continuos tienen, además, la ventaja de producir algas de una calidad predecible, así como ser susceptibles al control tecnológico y a la automatización, lo que aumenta la fiabilidad del sistema y reduce la necesidad de mano de obra; en tanto las desventajas del sistema continuo son su complejidad y costo relativamente alto; así mismo los requerimientos de iluminación y temperatura constantes los restringen a ambientes cerrados y esto sólo es posible para escalas de producción relativamente pequeñas.

2.1.2.3 Semi-continuo

En un sistema semi-continuo se entrega al cultivo todo el medio fresco simplemente abriendo una válvula en el conducto de suministro. El flujo de medio fresco entra al recipiente de cultivo y el cultivo gastado desemboca en un recipiente aparte. Una vez

que el medio requerido ha entrado al cultivo, se cierra la válvula y se permite crecer durante 24 horas, tiempo después del cual el procedimiento se repite. La técnica semi-continua prolonga el uso de tanques grandes de cultivo mediante una cosecha parcial periódica seguida, inmediatamente, por el llenado del cultivo hasta alcanzar el volumen original; agregando también nutrientes para alcanzar el nivel original de enriquecimiento. Los cultivos semi-continuos pueden hacerse en ambientes cerrados o al aire libre, pero por lo general su duración es impredecible; algas no deseadas, depredadores o contaminantes y metabolitos se acumulan con el tiempo, volviendo el cultivo inadecuado para su uso posterior. Cabe señalar que, como el cultivo no se cosecha completamente, el método semi-continuo proporciona un mayor rendimiento de algas que el proceso por lotes para un determinado tamaño de recipiente.

2.1.3. Sistemas de cultivo [4, 8, 20, 29]

Una vez conocidos los métodos de cultivo se presentan las distintos sistemas bajo los que se puede cultivar microalgas, ya que debido a su pequeño tamaño (μm), su alta variedad e influencia de las condiciones de crecimiento, las microalgas se deben cultivar en un sistema diseñado para tal fin, situado en tierra firme o flotando en el agua, de modo que funcione de forma óptima conjuntamente a la aplicación de una de las metodologías antes mencionadas.

El desarrollo de sistemas de cultivo orientado a las microalgas, se inició en la década de 1950 cuando se investigaba a las algas como una fuente alternativa de proteínas para la creciente población mundial; más tarde, se estudiaron las algas por los interesantes compuestos que producen, para convertir dióxido de carbono a oxígeno durante los viajes espaciales y para la remediación de las aguas residuales; finalmente fue la crisis energética en la década de 1970 la que dio lugar a la investigación de las algas como fuente de energía renovable. Como se explicó anteriormente se deben dar algunas condiciones, relativamente simples, para el desarrollo de algas: luz, carbono, agua, nutrientes y una temperatura adecuadamente controlada. A lo largo de los años se han desarrollado varios sistemas de cultivo diferentes que cumplen con estos requisitos, sin embargo, es difícil que se cumplan estas condiciones en los sistemas a escala industrial. Un importante prerrequisito para cultivar microalgas comercialmente para la producción de energía es la necesidad de sistemas de gran escala que puede ir desde los sencillos sistemas de cultivo abierto, que exponen las algas al ambiente como lagos o estanques, hasta los altamente controlados sistemas de cultivo cerrado llamados foto-biorreactores (FBR). Un biorreactor se define como un sistema en el que se logra una conversión biológica; por lo tanto, un foto-biorreactor es un reactor en el que se desarrollan fotótrofos o se usan para llevar a cabo una reacción fotobiológica. Aunque esta definición puede aplicarse tanto a los sistemas de cultivo abiertos y cerrados, para propósitos de esta tesis se limita la definición a estos últimos.

La tecnología necesaria para el desarrollo rentable de combustible a base de microalgas se encuentra todavía en varios estados de desarrollo y la configuración final aún está por ser determinada y demostrada a escala industrial.

2.1.3.1 Sistemas abiertos

Este sistema se puede categorizar en naturales, lagos, lagunas y estanques, y estanques o contenedores artificiales. El sistema de cultivo de algas al aire libre más simple es en estanques no agitados y poco profundos, cuyas dimensiones van desde unos pocos m^2 hasta 250 ha (Figura 2.2 a y b).

En estos sistemas la dilución del dióxido de carbono, del aire al agua, limita la tasa de crecimiento, haciendo que el rendimiento por hectárea sea relativamente bajo; otras influencias negativas son la difusión lenta de nutrientes y la flotación y sedimentación de algas vivas y muertas, lo cual limita el uso de la luz solar disponible. Esto se puede evitar con alguna forma de agitación, que en la práctica se realiza en estanques circulares con un brazo de agitación mecánica como los estanques centro-pivote (Figura 2.3 a), o más comúnmente en los estanques artificiales denominados *raceways* (Figura 2.3 b) que normalmente son circuitos cerrados con canales de recirculación en forma de óvalo, usualmente hechos de concreto -aunque se ha usado también tierra compactada con plástico blanco-, con una profundidad de 0,2 a 0,5 m generalmente, en el que un agitador de paletas (Figura 2.4) proporciona la agitación y recirculación requeridas para estabilizar el crecimiento de las algas y la productividad. En un ciclo de producción continuo las algas y nutrientes se introducen delante del agitador de paletas, el que está en continuo movimiento, para ser circulados y cosechados detrás de este. El CO_2 requerido es tomado del aire pero se pueden instalar aireadores sumergidos para aumentar la absorción, así como la agitación del medio; se puede aplicar aire, CO_2 comprimido o CO_2 conteniendo otros gases de combustión.

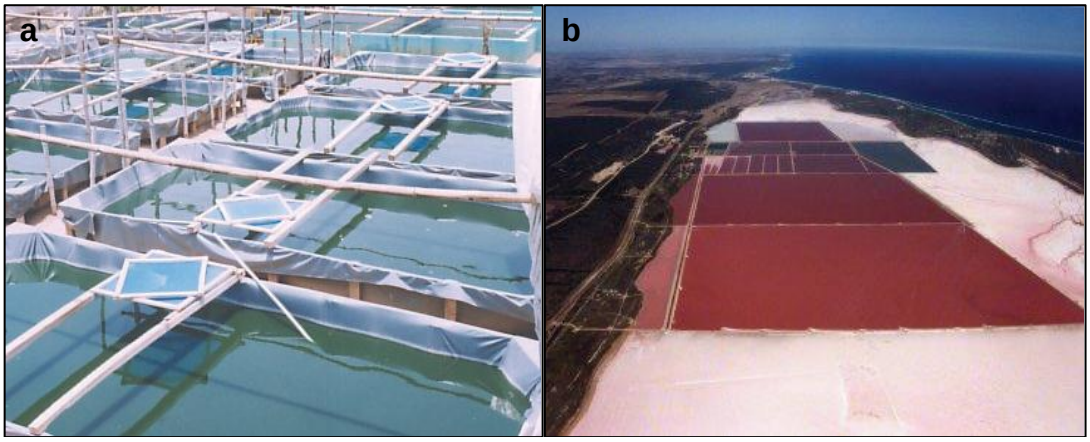

Figura 2.2a Estanques pequeños, Asia (Wikipedia 2007)
Figura 2.2b Estanques de Cognis, Australia (BEAM)

Los estanques abiertos no necesariamente compiten por tierras de cultivo existentes, pues pueden ser implementados en áreas con potencial marginal de cultivo, así mismo requieren baja energía y el mantenimiento y limpieza regular es sencillo, por lo que tendría el potencial de devolver gran cantidad de energía neta. Estos sistemas son normalmente más económicos de construir, operar y son más duraderos; sin embargo respecto a la producción de biomasa, los sistemas abiertos son menos eficientes que los foto-biorreactores, esto se le puede atribuir a su mayor susceptibilidad frente a varios factores determinantes como perdidas por evaporación, fluctuación de temperatura en el medio de cultivo, CO_2 deficiente, agitación ineficiente y limitaciones de iluminación. Aun cuando las pérdidas por

evaporación contribuyen al enfriamiento, puede provocar cambios significativos en la composición iónica del medio de cultivo en detrimento del crecimiento de las algas; las fluctuaciones de temperatura debido a los ciclos diarios y variaciones estacionales son difíciles de controlar; las deficiencias de CO_2 debido a la difusión en la atmósfera, así como la agitación pobre, por mecanismos de mezclado ineficientes que puede ocasionar una baja tasa de transferencia de CO_2, provocan una reducción de la producción de biomasa; por último la limitación de iluminación debido al espesor de la capa superior puede también disminuir dicha producción.

Figura 2.3a Estanque centro-pivote, Taiwan (BEAM)
Figura 2.3b Estanque de cultivo abierto tipo *raceway*, California (spirulina.org.uk)

Figura 2.4 Agitador de paletas de *raceway* (NMSU)

De acuerdo a las investigaciones, las altas tasas de producción de biomasa se logran con sistemas abiertos; sin embargo existen todavía inconsistencias en las tasas de producción reportadas en la literatura. Además, pueden producir grandes cantidades de microalgas, pero ocupan superficies más amplias de terreno siendo más susceptibles a la contaminación por parte de depredadores de algas, algas parasitarias u otras cepas de algas que crecen mejor en las condiciones aplicadas, dejando fuera de competencia a las especies deseadas. Sólo un número limitado de especies son suficientemente fuertes para mantenerse en un sistema abierto (Carlsson et al, 2007; Chisti, 2007; Pulz, 2001; Rodolfi et al, 2009.).

2.1.3.2 Sistemas cerrados

La producción de microalgas basada en la tecnología de biorreactores cerrados es diseñada para superar algunos de los mayores problemas asociados al sistema de

cultivo abierto descrito anteriormente. Son sistemas flexibles que se pueden optimizar de acuerdo a las características biológicas y fisiológicas de las especies de microalga que se desean cultivar, permitiendo principalmente el cultivo de especies únicas de microalgas por periodos prolongados con menor riesgo de contaminación, por lo que son apropiados para cepas sensibles que no se pueden cultivar en estanques abiertos. Así, los problemas de temperatura, intercambio de gases y competencia pueden ser aliviados mediante el cierre de un sistema abierto, por medio de una cubierta de material transparente o un invernadero, no obstante esta solución es cara para grandes superficies. Otro modo sencillo y económico es el uso de bolsas de polietileno o de mangas (Figura 2.5) para el cultivo en lotes. Los lotes son de hasta 1000 litros, pero la sensibilidad a las condiciones ambientales y corta esperanza de vida hacen de este sistema inadecuado para su uso a la intemperie. Las paredes del reactor limitan o impiden el intercambio directo de gases y contaminantes entre las células cultivadas y el ambiente, además, una gran proporción de la luz no incide directamente sobre la superficie de cultivo, sino que tiene que atravesar dichas paredes transparentes. Se han desarrollado varios sistemas avanzados basados en materiales transparentes más duraderos como vidrio, polietileno y policarbonato.

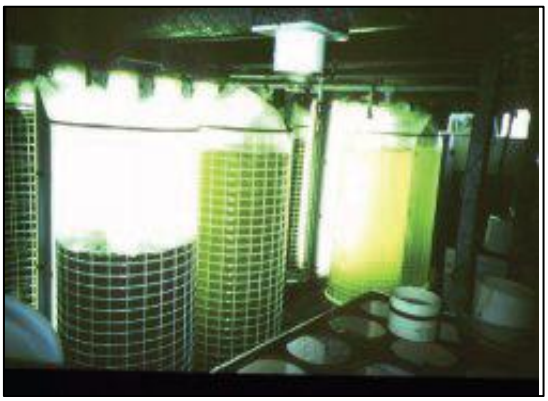

Figura 2.5 *Big bag* cultivo de microalgas (BEAM)

Figura 2.6 Foto-biorreactor tubular (Bioprodukte-steinberg.de)

Los sistemas cerrados incluyen los foto-biorreactores (FBRs) tubulares, de columna y de placa plana. Estos reactores ofrecen un funcionamiento continuo, un alto grado de control y elevadas concentraciones de biomasa, que se traduce en menor requerimiento de espacio y reducción significativa de costos de recolección por tonelada de alga; sin embargo los costos de estos sistemas cerrados están muy por encima del de los sistemas abiertos. Los foto-biorreactores tubulares consisten en un arreglo de tubos rectos de vidrio o plástico (figura 2.6 a y b). El arreglo tubular

captura la luz solar y puede ser alineado de forma horizontal, vertical, oblicua o como hélice; los tubos generalmente tienen un diámetro de 0,1 m o menos. Los cultivos son recirculados ya sea con bombas mecánicas o con un sistema de aire, este último permitiendo el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre el medio líquido y el gas aireado así como propiciando la agitación y la mezcla, los que son importantes para favorecer el intercambio gaseoso en los tubos. Los FBRs tubulares tienen limitaciones de diseño respecto a la longitud de los tubos, lo cual depende del potencial de acumulación de oxígeno, agotamiento de CO_2 y variación de pH en el sistema.

Figura 2.7 Foto-biorreactor en columna (Universidad de Piura, 2010)

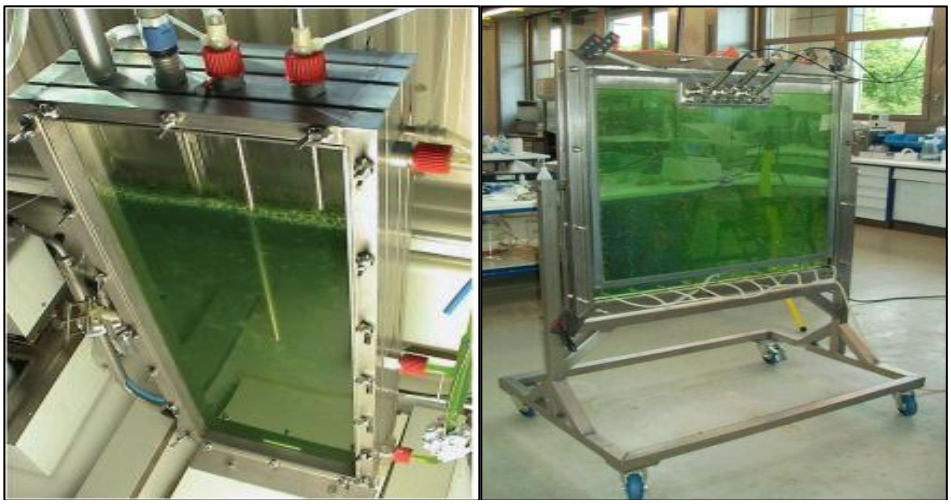

Figura 2.8 Foto-biorreactor de placa plana (Wijffels, 2007)

Las algas consumen los nutrientes y CO_2, mientras que producen O_2 que podría inhibir el crecimiento de las algas a elevadas concentraciones, por lo que las condiciones de crecimiento se irán deteriorando a lo largo del tubo. Por lo tanto no pueden ser ampliados indefinidamente, es por esto que la producción a gran escala está basada en la integración de múltiples módulos individuales con una óptima relación tamaño vs longitud del tubo. Sin embrago se considera que los FBRs tubulares son más adecuados para la producción al aire libre, pues exponen una gran superficie a la luz solar. Los FBRs en columna ofrecen la agitación y mezcla más eficiente (Figura 2.7), la más alta tasa de transferencia de masa volumétrica y las mejores condiciones de crecimiento controlables, además son de bajo costo, compactas y fácil de operar. Las columnas verticales son aireadas desde la base e

iluminadas a través de paredes transparentes o internamente; no obstante, la escalabilidad de este sistema es limitado, ya que, al poner varios sistemas uno cerca del otro se proyecta sombra. Para hacer uso óptimo de la superficie de recepción de la irradiación solar, se puede utilizar un foto-biorreactor plano (Figura 2.8). Este sistema puede producir potencialmente una concentración de biomasa mucho mayor, aunque aún está en desarrollo. Las dificultades son el régimen de flujo en el interior del complejo del reactor y la escalabilidad, aunque esto último se ha mejorado en gran medida por un diseño llamado *green wallpanel* (Rodolfi et al., 2009).

Dependiendo de su forma o diseño, se considera que los foto-biorreactores tienen varias ventajas sobre los estanques abiertos, ofrecen un mejor control sobre las condiciones de cultivo y los parámetros de crecimiento, evitan la evaporación, reducen las pérdidas de CO_2, permite alcanzar mayores densidades o concentraciones celulares, mayor productividad volumétrica y ofrecen un entorno más seguro y protegido. A pesar de sus ventajas no se espera que los foto-biorreactores tengan un impacto significativo, en un futuro próximo, sobre cualquier producto o proceso que se puede conseguir en grandes *raceways* al aire libre. Los FBRs sufren de varias desventajas que deben ser consideradas y resueltas como sobrecalentamiento, acumulación de oxígeno, dificultad en la ampliación, el alto costo de construcción, operación y del cultivo de la biomasa de algas, el daño celular debido al esfuerzo cortante y el deterioro del material utilizado para el foto-periodo.

2.1.3.3 Sistemas híbridos (mixtos)

El cultivo híbrido de dos etapas es un método que combina distintas etapas de crecimiento en FBRs y estanques abiertos. La primera etapa es en FBR donde las condiciones controladas minimizan la contaminación y favorece la continua división celular. La segunda etapa de producción está orientada a la exposición de las células a nutrientes en estrés, lo cual intensifica la producción del producto lipídico deseado. Esta etapa es adecuada para sistemas abiertos, pues el estrés ambiental, que estimula la producción, se puede dar naturalmente al transferir el cultivo de los FBRs a los estanques abiertos.

2.1.4. Sistema de cultivo apropiado

La energía es un producto de bajo valor. Los "elevados" precios del petróleo están decenas de centavos de US$ por litro, mientras la biomasa de algas para la salud, alimentos y cosméticos pueden costar US$ 3500 por kg; esto significa que el cultivo de microalgas debe ser lo más económico posible a fin de conseguir productores de energía económicamente viables. Los actuales sistemas de producción de microalgas suministran el conocimiento y la experiencia en el cultivo, pero no ofrecen biomasa a un precio de producción que pueda competir con otras fuentes, renovables y no renovables, de energía. Los sistemas tienen que ser optimizados para un mínimo suministro financiero y energético; las economías de escala tienen que ser utilizadas para reducir los precios de producción y buscar obtener ingresos adicionales que provienen de fuentes diferentes a los de puramente energía a partir de algas, a través de co-producción o el tratamiento de aguas residuales -véase nuevas aplicaciones de las microalgas, acápite 1.1.8-.

Dentro de los sistemas abiertos, los *raceways* ofrecen un rendimiento mayor que muchos otros sistemas extensivos, mientras se mantiene un bajo capital de inversión, siendo a veces mencionado en la literatura científica, como el único sistema abierto posible para la producción a gran escala (Carvalho et al, 2006; Chisti, 2007). Una condición importante, sin embargo, es la disponibilidad de una microalga que puede permanecer dominante durante todo el año y tenga buenas propiedades de rendimiento energético; esto se vuelve costoso en caso de que resulte difícil o se requiera terrenos. Frente a esto un sistema tubular horizontal es el que tiene las mejores características, aunque el costo de producción de biomasa puede ser de un orden de magnitud superior; en algunos casos, para algunas especies de microalgas y aplicaciones puede ser lo suficientemente bajo, incluso, como para ser atractivo para su uso en acuicultura; y en otros casos, la mayor concentración de células y la mayor productividad logrados puede no compensar su elevado capital y costos de operación. De cualquier forma ofrece un rendimiento mucho mayor por hectárea y un mejor control, mientras que a mayor escala es más fácil que cualquier otro sistema cerrado.

La comparación del rendimiento alcanzado por foto-biorreactores y los estanques abiertos puede no ser fácil, ya que la evaluación depende de varios factores; no obstante hay tres parámetros utilizados para evaluar la productividad en las unidades de producción de algas:

Productividad volumétrica (VP): productividad por unidad de volumen del reactor (expresado como g/L día).
Productividad por área (AP): productividad por unidad de área de terreno ocupado por el reactor (expresado como g/m^2 día).
Productividad por superficie iluminada (ISP): productividad por unidad de superficie iluminada del reactor (expresado como g/m^2 día).
Donde g, para los tres casos anteriores, corresponde a gramos de biomasa microalgal seca. A pesar de que los sistemas cerrados no ofrecen ninguna ventaja en términos de productividad por área, superan largamente a los estanques en términos de productividad volumétrica (8 veces más) y concentración celular (alrededor de 16 veces mayor). Así mismo, los sistemas abiertos y cerrados no deben ser vistos como tecnologías competidoras, pues la verdadera competencia tecnológica será la ingeniería genética.

Finalmente, mientras que existen unos pocos ejemplos de *raceways* comerciales a gran escala, los más grandes sistemas cerrados cubren unas pocas hectáreas; en cualquier caso, no existe un ejemplo comercial de producción de microalgas para fines energéticos. En los últimos años, se han hecho muchas afirmaciones sobre las posibles productividades, y muchas veces sobre el contenido de aceite, que se acercan o incluso cruzan el máximo teórico. A menudo, estos son el resultado de la extrapolación de pruebas preliminares de laboratorio y experimentos dando resultados de peso seco por horas o días o de aceite por hectárea y por año, propiciando la sospecha de haber sido realizados para alcanzar beneficios económicos. Esto ha dado lugar al aumento de la euforia tanto sobre el potencial de las algas para producir energía renovable por un lado, y la decepción y desconfianza por la buena información por el otro. Esto ha provocado un crecimiento exponencial del interés en el tema, pero también en una percepción negativa sobre los esfuerzos comerciales. El hecho es que ningún productor comercial de energía de algas existe

aún, que los cultivos terrestres de alto rendimiento no serán fácilmente superados por las algas en términos de contenido de energía (pero por ahora el área disponible para el cultivo algal supera el de los cultivos terrestres), que la inversión inicial en el sistema de cultivo, un balance positivo de energía de la operación y producción del sistema de cultivo y los subsecuentes ingresos financieros para cubrir los costes del proceso son muy desafiantes.

2.2. Cosecha de microalgas [8, 20, 21, 22, 29]

Todo el procesamiento posterior al cultivo de microalgas implica una o varias etapas de separación sólido-líquido. La biomasa puede requerir separarse del medio de cultivo, o excluir los restos celulares tras la disrupción celular para la liberación de los metabolitos de interés. Las concentraciones de microalgas permanecen siempre bajas durante su crecimiento, por lo general de un 0,02% a un 0,05% de materia seca en *raceways* y entre un 0,1% y 0,5% de materia seca en los reactores tubulares (Tredici, 2009) (es decir, una tonelada de biomasa seca tiene que ser recuperada de entre 200 m^3 a 5000 m^3 de agua); además el tamaño de las algas es sólo unos pocos micrómetros (3-40 μm de diámetro). Estos dos aspectos hacen de la cosecha y posterior concentración de algas un proceso difícil y por tanto costoso. En general, la recolección de microalgas es un proceso de dos fases, que incluyen: a) la cosecha en masa (*bulk harvesting*), destinada a la separación de la biomasa de la suspensión; los factores de concentración para esta operación son generalmente 100 a 800 veces para llegar a 2,7% de materia sólida total, dependiendo de la concentración inicial de biomasa y las tecnologías empleadas, como la floculación, flotación o sedimentación por gravedad; y b) el espesamiento (*thickening*), cuyo objetivo es concentrar la mezcla a través de técnicas como la centrifugación, filtrado y ultrasonido, por lo tanto, es generalmente una etapa de consumo de energía más intenso que la cosecha en masa. Gudin y Therpeneier (1986) reportaron que la recolección de las células de microalgas representa al menos el 20-30% del coste total de producción; entonces, con el fin de producir energía a partir de algas de la forma más económica posible, es esencial utilizar la forma más económica de concentrar la biomasa de algas con un contenido de agua que sea lo suficientemente bajo para la extracción del aceite; así mismo cualquier método adecuado de cosecha debe ser capaz de procesar grandes volúmenes, propios de los procesos de producción de biomasa de algas.

La elección de la técnica de cosecha depende de las características de las microalgas, por ejemplo, tamaño, densidad, y el valor de los productos de destino. Así mismo, como las algas producen aceites como una forma de almacenamiento de energía, cuando se extraen de su reactor, pueden consumir parte de la energía almacenada para su mantenimiento. Según Benemann y Oswald (1996) esto no causa una pérdida significativa, siempre y cuando esas condiciones no duren más de 24 horas. La cosecha por filtración puede ser insatisfactoria porque esta puede ser relativamente lenta. Para los productos de extremadamente bajo valor, la sedimentación por gravedad, posiblemente reforzada por floculación, puede ser el mejor método. Los tanques o lagunas de sedimentación se utilizan generalmente en la recuperación de biomasa a partir de procesos basados en aguas residuales. La recolección por centrifugación es viable para productos de alto valor; las centrifugas pueden procesar grandes volúmenes relativamente rápido y la biomasa puede permanecer contenida durante la cosecha.

La selección de la tecnología de recolección es crucial para la producción económica de biomasa de microalgas. Uno de los factores de importante consideración es la selección de la cepa, ya que algunas especies son mucho más fáciles de cosechar, otra consideración en la selección del método de cosecha más conveniente es el nivel aceptable de humedad en el producto -la pasta de la sedimentación por gravedad es generalmente más diluida que la biomasa recuperada por centrifugación-, ya que demasiada humedad en la biomasa cosechada pueden influir sustancialmente en la economía de la recuperación del producto en las siguientes etapas del proceso (Mohn, 1978), si se requiere la deshidratación de la biomasa después de la cosecha. Debido a que el secado térmico es más costoso que la deshidratación mecánica, el secado térmico debe estar precedido por un paso de deshidratación mecánica, tales como filtración o centrifugación.

Es probable que la cosecha de algas siga siendo un área de investigación muy activa. Aunque no existe un método universal para la cosecha, la experiencia ha demostrado que para todas las especies de algas es posible desarrollar un adecuado sistema de cosecha. Por otra parte, cada sistema de producción requiere un proceso de recolección óptimamente adaptado a las exigencias tanto del organismo, como a los pasos de procesamiento que sigan a la cosecha (Gudin y Chaumont, 1991). A continuación se presentan algunos métodos de cosecha específica:

2.2.1. Por floculación

Esta es la primera etapa en el proceso de recolección en masa que pretende agregar las células de microalgas con el fin de aumentar el tamaño efectivo de las “partículas". La agregación como resultado del ajuste del pH o la adición de electrolitos es considerada como coagulación, mientras que la acumulación como resultado de la adición de un polímero se denomina floculación. Este es un paso previo antes de otros métodos de recolección, tales como filtración, flotación o sedimentación por gravedad.

Dado que las células de microalgas tienen una carga negativa que impide la agregación natural de las células en suspensión, la adición de floculantes como cationes multivalentes y polímeros catiónicos neutralizan o reducen esta carga de la superficie celular y forman precipitados que mejoran el proceso de agrupación y la sedimentación. Existen dos fuerzas principales involucradas: a grandes distancias, domina la repulsión electrostática (células negativas repelen otras células con carga negativa); en distancias muy cortas, sin embargo, se produce la atracción intermolecular o fuerzas de Van der Waals, esta fuerza es grande en comparación con las fuerzas electrostáticas, pero actúa en un rango muy corto. Los coagulantes se pueden utilizar para reducir las fuerzas de repulsión electrostática, lo que aumenta la distancia a la que la atracción puede ocurrir. También puede vincular físicamente una o más partículas a través de un proceso llamado de transición, facilitando la agregación. La eficiencia de los electrolitos para inducir la coagulación de las células en suspensión es por lo general expresada por la concentración necesaria para lograr una coagulación rápida, llamada concentración crítica de coagulación, esto aumenta la eficiencia a medida que aumenta el ion contrario. Sales de metales polivalentes como el cloruro férrico ($FeCl_3$), sulfato de aluminio ($Al_2(SO_4)_3$) y sulfato férrico ($Fe_2(SO_4)_3$) son floculantes adecuados.

Varios métodos de recolección por floculación han sido probados. Knuckey et al. desarrollaron un proceso que implicó el ajuste del pH del cultivo de algas de entre 10 y 10,6 con NaOH, seguido por la adición de un polímero no iónico Magnafloc LT-25. La floculación fue cosechada desviando las aguas superficiales después de un período de sedimentación, y posteriormente neutralizado para obtener una concentración de biomasa final de 6-7 g/L. El proceso se aplicó con éxito a una serie de especies con una eficiencia de floculación mayor al 80%, así mismo Divakaran y Pillai utilizaron con éxito el Quitosano como biofloculante. La eficacia del método es muy sensible al pH, registrando una floculación máxima a un pH de 7 para las especies de agua dulce, y más bajos para las especies marinas. El agua residual puede ser reutilizada para producir nuevos cultivos de algas. La agregación suave inducida acústicamente seguida por un aumento de la sedimentación también se puede utilizar para la cosecha de biomasa de microalgas. Bosma et al. 2003 utilizaron con éxito el ultrasonido para optimizar la eficiencia de la agregación y el factor de concentración alcanzando así un 92% de eficiencia de separación y un factor de concentración de 20 veces (el factor por el cual la mezcla líquida original ha sido concentrada). Las principales ventajas de la recolección con ultrasonido es que es una técnica limpia y puede funcionar de forma continua sin inducir esfuerzo cortante en la biomasa, lo que podría destruir metabolitos potencialmente valiosos.

La recolección de células de algas por floculación es más conveniente que por métodos convencionales como la centrifugación o filtración, porque permite tratar grandes cantidades de cultivo. La floculación química se ha convertido en el método de elección para remover las algas de los estanques de tratamiento de residuos y otras aplicaciones residuales. Los productos químicos y el proceso de floculación, sin embargo, son costosos, siendo sólo ligeramente más barato que la centrifugación. Para aplicaciones de productos químicos finos, la floculación se considera como un tratamiento previo a otras operaciones. A pesar de que la floculación es considerada como el método más adecuado para la cosecha de biomasa de microalgas, este método implica desventajas económicas o técnicas, tales como un elevado coste energético, la adición de impurezas a la biomasa cosechada, la toxicidad floculante o la no viabilidad de la ampliación (Hee-Mock et al., 2001).

2.2.2. Sedimentación por gravedad y centrifugación

Los métodos de sedimentación por gravedad y centrifugación se basan en la Ley de Stoke, es decir, las características de sedimentación de sólidos en suspensión se determina por la densidad y el radio de las células de las algas (radio de Stokes) y la velocidad de sedimentación. La sedimentación por gravedad es la técnica más común de cosecha de biomasa de algas en el tratamiento de aguas residuales debido a los grandes volúmenes tratados y al bajo valor de la biomasa generada. Sin embargo, el método sólo es adecuado para microalgas grandes (aproximadamente de 70 μm) como la *Spirulina*.

La mayoría de las microalgas se pueden separar del medio de cultivo por centrifugación. Una centrífuga es básicamente un tanque de sedimentación con mayor fuerza gravitatoria para aumentar la tasa de sedimentación. Aunque la centrifugación es una operación unitaria ampliamente tratada en los libros de texto, se sugieren guías prácticas en raras ocasiones; sin embargo las directrices establecidas por Chisti y Moo-Young (1991) para la selección y el uso de centrífugas

son especialmente relevantes para la recuperación de la biomasa de microalgas. La cosecha en centrífuga de células de algas es un método de recuperación preferido por su rapidez, aunque consume mucha energía. Esta forma de recolección de la biomasa depende de las características de sedimentación de las células (tasa de sedimentación), el tiempo de permanencia de la biomasa en la centrífuga y la profundidad de asentamiento. Así pues, la profundidad de asentamiento se puede reducir mediante el diseño de la centrífuga y el tiempo de permanencia de la suspensión en la centrífuga se puede controlar mediante la modulación de la velocidad de flujo, mejorando así la recuperación de la biomasa.

Los avances en aceros estructurales han hecho posible el uso de centrífugas de alta velocidad y resistentes a la corrosión para bioprocesos a gran escala. La fácil limpieza y la disponibilidad de máquinas esterilizables han hecho de la centrifugación la principal operación de separación de la biomasa de microalgas. Se pueden utilizar tres tipos de centrífugas en función de los rangos de tamaño de las partículas: tubular (*tubular bowl*), de discos (*disc-stack bowl*) y *scroll discharge decanter*. La selección de una centrífuga para cualquier aplicación frecuentemente implica costosas evaluaciones a escala piloto. Algunas pruebas simples de centrifugación y sedimentación gravitacional en laboratorio pueden proporcionar indicaciones sobre la dificultad de la separación.

La centrifugación se utiliza a menudo para la concentración de algas de alto valor, y generalmente se considera costoso por el alto consumo de energía y el potencial aumento de los requisitos de mantenimiento debido a las piezas con movimiento libre; sin embargo, es el método más conocido de concentración de pequeñas algas unicelulares. Dentro del Programa de especies acuáticas, los costes de centrifugación se estiman en 40% del costo de producción y 50% del coste de inversión; no obstante, la aplicación de la centrifugación como un método de cosecha secundaria, para concentrar de 1 a 5 por ciento de materia seca a 15-20 por ciento reduciría los costos de centrifugación por lo menos 50 veces (Benemann y Oswald, 1996). Benemann recomienda en el informe Sazdanoff (2006) usar la centrifugación después de los estanques de asentamiento, y se menciona una centrífuga específica con un consumo de energía aceptable. Las condiciones operativas de la centrifugación también determinan la eficiencia del proceso; así, Heasman et al. (2000) estudiaron la influencia del proceso de centrifugación en la eficiencia de la cosecha y la viabilidad celular, en diferentes condiciones de centrifugación, de nueve diferentes cepas de microalgas. La fuerza de centrifugación varió de 1300 a 13000 g, la eficiencia de la cosecha fue superior al 95% sólo en la máxima fuerza de centrifugación, 13000 g, disminuyendo a 60% en 6000 g, y a 40% en 1300 g. La viabilidad celular varió significativamente con respecto a las especies, los métodos de centrifugación y la interacción de los dos factores.

Varios cambios en la tecnología de centrifugación han afectado el rendimiento de las máquinas desde 1990, proporcionando una torta más pura y seca, así como unidades con auto-limpieza.

2.2.3. Filtración

La filtración convencional es más adecuada para la cosecha de microalgas relativamente grandes (mayores que 70 μm) como *Coelastrum* y *Spirulina* y no para

la cosecha de especies de algas de dimensiones cercanas a la bacteriana (menores que 30 μm) como *Scenedesmus*, *Dunaliella* y *Chlorella* (Mohn, 1980).

Los filtros de tambor rotativo de vacío y el filtro de prensa parecen ser los tipos de filtro más comúnmente empleados en la recolección de microalgas de gran tamaño. Los filtros rotatorios, que consisten en un marco de tambor cubierto con filtro de tela (lienzo, nylon, dacrón, metal o fibra de vidrio), están disponibles para la operación de succión (o vacío) o para las operaciones de presión. Estos filtros tienen la ventaja de la operación continua y son útiles cuando la esterilidad y la contención no son factores determinantes.

Mohn (1980) estudió la recolección de dos cultivos de algas de diferente tamaño mediante el uso de la filtración bajo las condiciones de presión o vacío. Con un filtro prensa, se obtuvo un factor de concentración de 245 veces la concentración original de *Proboscideum coelastrum* lo que permite tortas con un contenido de sólidos del 27%, este alto contenido de sólidos reduce fuertemente el proceso de deshidratación posterior. Así mismo se ha descrito un proceso de filtración a precapa en tambor giratorio para la recuperación de la biomasa de microalgas (Gudin y Therpenier, 1986; Gudin y Chaumont, 1991). Primero se filtra las tierras diatomeas o celulosa (es decir, el *filter aid*) a través del filtro de tela para formar una torta o capa preliminar de *filter aid*, luego se filtra la mezcla de la biomasa a través de la precapa. La biomasa sedimentada se recupera raspando, junto con una delgada capa del *filter aid*. Esta forma de cosecha no es aplicable si la contaminación de la biomasa con el *filter aid* no es aceptable; en general, este sería el caso si la biomasa se destina a la acuicultura o si son necesarios procesos posteriores para la extracción de productos intracelulares de la biomasa.

Para la recuperación de células de algas más pequeñas (menor que 30 μm), la membrana de microfiltración y ultrafiltración (una forma de filtración por membrana con una presión hidrostática) son alternativas técnicamente viables a la filtración convencional (Petrusevski et al., 1995). La microfiltración es adecuada para células frágiles, pero los procesos a gran escala para la producción de biomasa de algas no suelen utilizar la filtración por membrana.

Rossignol et al. (1999) investigó el uso de membranas de polímeros para la recuperación continua de dos microalgas marinas. Se evaluaron ocho membranas comerciales, encontrando satisfactoria una membrana de ultrafiltración de poliacrilonitrilo de 40 kDa de peso molecular para la recuperación de las células (Rossignol et al, 1999.). Estas membranas podrían utilizarse a largo plazo en condiciones de baja presión trans-membrana y una velocidad de cruce del flujo relativamente baja (para mantener bajas velocidades de corte para las células frágiles). A pesar de que las membranas de microfiltración presentan un flujo inicial superior al de las membranas de ultrafiltración, tiene una tendencia a obstruirse más fácilmente. Con las membranas de ultrafiltración se alcanzaron valores de flujo de entre 15 y 60 $l/m^2 \cdot h$. Además, la filtración, de por sí, es un proceso lento (Sazdanoff, 2006), por lo que se requiere un sistema de gran capacidad para continuar con la producción de biomasa.

Para el procesamiento de bajos volúmenes de medio (menor a 2 m^3 por día), la microfiltración puede ser más rentable que la centrifugación; para mayores escalas de

producción (mayor a 20 m^3 por día), el centrifugado puede ser un método más económico de recuperación de biomasa, debido al costo de remplazo de la membrana y el bombeo que genera la recolección por filtración para grandes escalas de producción.

2.3. Secado de la biomasa algal [8]

El secado de algas se basa en el secado de cultivos y prácticas de deshidratación. Después de la cosecha, que debería traducirse en una concentración de 50 a 200 veces la biomasa de algas, la mezcla de algas (típica 15,5% de contenido de sólidos secos) debe ser procesada rápidamente para que no se estropee (en sólo unas pocas horas en un clima cálido); utilizándose comúnmente la deshidratación o secado de la biomasa para extender su vida útil, especialmente si la biomasa es el producto final.

El procesamiento postcosecha es altamente específico y necesariamente depende en gran medida del producto deseado, este procesamiento representa una importante limitación económica para la producción de materia prima de bajo costo (alimentos, piensos, combustibles) y también para los productos de alto valor (β-caroteno, polisacáridos). Los métodos que se han utilizado son el secado al sol (Prakash J. et al., 1997), la plataforma de secado de baja presión (Prakash J. et al., 1997), el secado por aspersión (Desmorieux H. et al., 2006), el secado en tambores o rodillos (Prakash J. et al., 1997), secado en lecho fluido (Leach G. et al., 1997), liofilización (Molina Grima E, et al., 1994), y la tecnología de secado Refractance Window™ (Nindo C. et al., 2007).

Basándose en la experiencia agrícola con el secado solar, se asumió que el secado solar de algas era factible. El secado al sol es el método de deshidratación más económico, pero las principales desventajas son los prolongados tiempos de secado, requerimiento de grandes superficies, y el riesgo de pérdida de material. Aunque se necesita una pequeña cantidad de electricidad para los ventiladores, no se incluye entradas de energía para esta etapa, pues la potencia necesaria estimada para los ventiladores es menor al 5% del total de electricidad, lo que se considera dentro del margen de error. Por otro lado, el secado por aspersión se utiliza comúnmente para la extracción de productos de alto valor (mayor a US$ 1000/tonelada), pero es relativamente costoso y puede causar un deterioro significativo en algunos componentes de las algas, como los pigmentos. El secado por congelación o liofilización, ha sido ampliamente utilizado en los laboratorios de investigación para el secado de las microalgas, sin embargo, es demasiado costoso para su uso en la recuperación comercial a gran escala de productos de microalgas. Los elementos intracelulares tales como aceites pueden ser difíciles de extraer con solvente a partir de biomasa húmeda sin disrupción celular, pero se extraen fácilmente si la biomasa ha sido liofilizada.

El costo de la deshidratación, cuando se añade a los costos de cultivo y la cosecha de algas, forma una barrera económica para la producción masiva de algas en polvo para productos de bajo costo, como proteínas o piensos.

2.4. Sales presentes en la biomasa algal seca

Como se verá en el apartado 2.6, la determinación del rendimiento de aceite obtenido de microalgas se calcula en relación a la cantidad de biomasa seca que se utiliza para realizar el análisis. Sin embargo, es importante señalar que la biomasa seca no está conformada únicamente por células de microalgas, sino que también se encuentran presentes otros compuestos como cloruros y sulfatos, esto dependiendo de la mayor o menor participación de dichos compuestos en el cultivo y cosecha de la biomasa, respectivamente. La importancia de esto recae en el hecho de que dichos elementos distintos a las microalgas ocasionan, como es lógico, errores en la determinación del rendimiento de aceite obtenido, debido a que la base de cálculo, la masa de muestra de biomasa seca, será menor si se descuentan las sales y sulfatos presentes en la misma; este escenario se acentúa mientras más pequeña sea la muestra y mayor sea el contenido de estos compuestos.

En el capítulo anterior se explicó que el medio en el que se desarrollan las microalgas puede ser de agua dulce o salada, dependiendo de la especie con la que se esté trabajando. Frente a la posibilidad de que se trate del desarrollo de una especie en medio salino, como la mayoría de especies que han mostrado un mayor rendimiento de aceite de acuerdo a la literatura revisada, surge la necesidad de conocer la cantidad de sales presentes en la biomasa seca, ya que el principal agente extraño presente en la biomasa seca será el cloruro de sodio (NaCl). Por otro lado, la determinación de sulfatos estará sujeta, principalmente, a la metodología empleada para la cosecha de la muestra; si se realiza por floculación entonces será necesario realizar dicho cálculo debido a que, como se explicó en el acápite 2.2.1, restos del floculante -sales polivalentes, especialmente sulfato de aluminio- estarán presentes en la muestra cosechada; por otro lado, si la cosecha se realiza por centrifugación, al no ser agregado agente externo alguno, no es necesario dicho cálculo pues su incidencia en los resultados no es significativa.

La determinación del cloruro de sodio presente en una muestra puede hacerse por medición del índice de refracción de la solución, o por determinación química de cloruros. Así mismo, se puede realizar la determinación de sulfatos. A continuación se describen brevemente dichos métodos:

2.4.1. Medición del índice de refracción [31, 36, 39]

La determinación del índice de refracción, se usa con frecuencia para investigar la composición de una disolución o la pureza de una sustancia. En el caso de la biomasa algal cosechada, se medirá el índice de refracción de la solución obtenida a partir de una pequeña muestra mezclada con agua destilada y, con ayuda de una tabla, se obtendrá el valor de la concentración de NaCl en dicha solución para finalmente determinar el porcentaje presente en la muestra seca.

Esta propiedad física está basada en la ley de la refracción descrita por Snell. Los instrumentos para medir el índice de refracción se llaman refractómetros, generalmente clasificados en óptico-mecánicos y digitales, que brindan mayor precisión.

Para realizar correctamente la medición del índice de refracción con un instrumento óptico-mecánico, es necesario controlar la longitud de onda de la fuente luminosa empleada, así como la temperatura; generalmente los datos disponibles en la literatura para los cálculos posteriores están referidos a una temperatura de 20 °C. Así mismo es importante la calibración del instrumento, que habitualmente se realiza con agua destilada, confirmando que el índice de refracción sea 1,33320.

2.4.2. Por determinación química de cloruros y sulfatos [11, 23, 42]

Esta forma de determinación de cloruros implica la realización de pruebas experimentales en laboratorio. Puede realizarse por métodos volumétricos o potenciómetros, los cuales se describen a continuación:

2.4.2.1. Determinación de cloruros por métodos argentométricos o volumétricos

Estos métodos de determinación química de cloruros se basan en un estudio cuantitativo, a través de la aplicación de una valoración o titulación de la muestra que contiene los cloruros (concentración desconocida), con una solución de concentración exactamente conocida (y que reaccione con el cloruro) hasta que la reacción química entre las dos soluciones se complete. Es recomendable para agua con concentraciones entre 1,5 y 100 mg/L de cloruros. En el caso de aguas cuya concentración de cloruros sea inferior a 30 ppm no es recomendable utilizar este método.

Dentro de los métodos volumétricos para la determinación de cloruros más ampliamente utilizados se puede mencionar Möhr, Volhard y el de nitrato de mercurio; métodos que se describen y explican en el Anexo B del presente trabajo.

2.4.2.2. Determinación de cloruros por método potenciométrico

Los métodos potenciométricos están basados en la medida de la diferencia de potencial entre dos electrodos introducidos en una disolución. Los electrodos y la disolución constituyen lo que se conoce con el nombre de celda electroquímica. El potencial entre ambos electrodos es normalmente medido con la ayuda de un equipo conocido como potenciómetro. Uno de los electrodos involucrado en el proceso se denomina indicador, el cual tiene una respuesta respecto de una especie particular presente en el seno de la disolución y cuya actividad se mide durante el experimento, y el otro recibe el nombre de referencia, cuya característica más importante es que el potencial de semicelda de este electrodo permanece siempre constante.

Este método es apropiado para la determinación de cloruros en aguas con elevado color y turbidez que pueden dificultar la observación del color indicativo del punto final de la titulación en otros métodos. El método potenciómetro puede usarse sin necesidad de pretratamiento en muestras que contengan iones férrico (si no está presente en concentraciones mayores que los cloruros), crómico, fosfato, ferroso y otros iones de metales pesados.

Los cloruros se determinan por valoración potenciométrica con solución de nitrato de plata con un sistema de electrodo de vidrio y plata – cloruro de plata. Durante la valoración se usa un voltímetro electrónico para detectar la variación de potencial

entre los dos electrodos. El punto final de la valoración es aquella lectura del instrumento en la que se aprecia el máximo cambio de voltaje para un incremento pequeño y constante del nitrato de plata añadido.

2.4.2.3. Determinación de sulfatos por método turbidimétrico

Los sulfatos suelen ser sales solubles en agua a excepción de los de Pb, Ba y Sr por lo que se hayan profusamente repartidos en agua. El fundamento de esta determinación es la reacción entre el anión sulfato y el catión Ba para formar un producto insoluble, que con ayuda de suspensión de goma arábiga permanece en disolución un tiempo adecuado para su análisis turbidimétrico.

2.4.2.4. Determinación de sulfatos por método gravimétrico

La gravimetría es un método analítico cuantitativo, es decir, que determina la cantidad de sustancia, midiendo el peso de la misma (por acción de la gravedad). El análisis gravimétrico o gravimetría consiste en determinar la cantidad proporcionada de un elemento, radical o compuesto presente en una muestra, eliminando todas las sustancias que interfieren y convirtiendo el constituyente o componente deseado en un compuesto de composición definida, que sea susceptible de pesarse.

La determinación de sulfatos se realiza mediante precipitación con cloruro de bario. Es un método preciso y aplicable a concentraciones superiores a 10 mg/L. Los resultados previamente precipitados con cloruro bárico, en medio ácido, son secados a 110 °C y calcinados a 600 °C.

2.4.2.5. Determinación de sulfatos por método volumétrico

Son métodos que se basan en un estudio cuantitativo y siguen el mismo principio que la determinación volumétrica de cloruros. En este caso consiste en la determinación de los iones sulfatos mediante la aplicación de una titulación o valoración en presencia de sulfato de bario y en medio alcohólico. Este método es aplicable para la determinación de sulfatos en concentración inferior a 100 mg/L. El contenido de sulfatos se determina por valoración con sal sódica del EDTA, del cloruro de bario que no se utilizó en la precipitación de los sulfatos.

Este método es recomendable para casos en los que no se disponga del equipo necesario para aplicar el método gravimétrico.

2.5. Extracción de aceite de microalgas [8, 9, 14, 20, 21]

Los investigadores han evaluado y propuesto distintos métodos para la extracción de aceite de microalgas, siendo conscientes de la importancia de esta etapa para la eficiencia y costo global del proceso de producción de biodiesel. Los métodos desarrollados se basan en fundamentos físicos y químicos para lograr la extracción; así mismo es importante mencionar los métodos de pretratamiento de la muestra microalgal utilizados conjuntamente a los métodos de extracción y que están orientados a alcanzar un mayor rendimiento de aceite.

2.5.1. Métodos de pretratamiento

2.5.1.1. Destrucción mecánica

Consiste en la pulverización, mediante impactos, de la muestra de biomasa seca de microalgas. Este método cumple una doble función, en primer lugar permite la homogeneización de la muestra, permitiendo también que la superficie de contacto de la biomasa microalgal con el solvente a utilizar sea máxima; y en segundo destruye la pared celular liberando lípidos además de otras sustancias presentes en las células, lo que resalta su preferente utilización en conjunto con métodos de extracción por solvente químico. Este procedimiento abarca varias clases de dispositivos mecánicos como homogeneizadores celulares, molinos de bolas, sistemas de prensado, morteros; etc.

2.5.1.2. Autoclavado

Un autoclave es un dispositivo que se utiliza para esterilizar instrumentos, materiales médicos y de laboratorio, por medio de vapor de agua a alta presión y temperatura, evitando que el agua llegue a ebullir. El principio de disrupción es similar al producido mediante agua subcrítica. La ventaja del uso de esta técnica con microalgas es que se puede trabajar con la biomasa húmeda, evadiendo así la etapa de secado, en la que se pueden degradar los lípidos presentes y aumentar los costos.

2.5.1.3. Sonicación

Consiste en la exposición de las microalgas a ondas acústicas de una frecuencia determinada, estas ondas son producidas por la transmisión de corriente eléctrica a un sistema mecánico. Estas ondas de ultrasonido, en medio líquido, generan millones de burbujas microscópicas las cuales se expanden y colapsan (cavitación) contra las células causando la ruptura de la pared celular. Ha sido demostrado experimentalmente que la aplicación de ultrasonido a baja frecuencia causa una alta destrucción celular algal, incluso mayor que aplicando ondas de alta frecuencia.

El sonicador puede operar de dos formas:
Por pulsos: las vibraciones de ultrasonido pueden transmitirse en una solución en un rango de 0,1 a 0,9 pulsos por segundo, permitiendo una adecuada sonicación sin generación importante de calor.
Continuo: se aplican las ondas de ultrasonido de forma continua hasta por 15 minutos, esto permite rupturas de membranas y pared celular, el inconveniente es que produce una elevada generación de calor, además de generar radicales libres.

2.5.1.4. Microondas

Este método de pretratamiento aprovecha la polaridad de las moléculas que componen la estructura de la microalga, como lípidos y proteínas, para crear fricción y por consiguiente calor lo cual hace que el agua contenida en la célula escape debilitando la pared celular.

2.5.1.5. Shock osmótico

Consiste en una reducción repentina de la presión osmótica; inicialmente las células se encuentran equilibradas en un medio de alta presión osmótica, luego este medio es interrumpido repentinamente, entonces el agua ingresa a la célula por ósmosis incrementando la presión interna y causando ruptura. De esta manera las células se hacen estallar al someterlas a un medio hipotónico, lo cual hace que la membrana no resista la presión osmótica.

2.5.2. Métodos de extracción de lípidos

2.5.2.1. Extracción mediante fluidos supercríticos

Estos métodos de extracción surgieron como alternativa frente al empleo tradicional de solventes tóxicos, de estos procesos, los más prometedores son la extracción con fluidos supercríticos (SFE), y la extracción con agua subcrítica (SWE), estas técnicas se caracterizan por poseer cortos tiempos de extracción y altas selectividades (King, J.W., 2000).

Un fluido recibe el nombre de supercrítico cuando es forzado a permanecer a unas condiciones de presión y temperatura superiores a sus presiones y temperaturas críticas, bajo esas condiciones, el fluido posee características tanto de un gas como de un líquido, lo que le da algunas propiedades especiales como baja viscosidad y alta difusividad relativa, lo que les permite penetrar fácilmente en los sólidos y ofrecer una extracción más rápida. Adicionalmente, a estos fluidos se les puede modificar su densidad con un cambio de presión y/o temperatura; como la densidad está ligada con la solubilidad, la selectividad del fluido puede ser modificada. Otra característica que hace interesante la utilización de la extracción con fluidos supercríticos, es la posibilidad de acoplar el sistema de extracción, con sistemas de caracterización tales como cromatografía de gases, o cromatografía de fluidos supercríticos.

El dióxido de carbono es el solvente más utilizado como fluido supercrítico debido a su fácil eliminación después de la extracción y a su baja toxicidad y costo; aunque posee la desventaja de tener una baja polaridad, por lo que su eficiencia disminuye al extraer componentes polares como los lípidos. La extracción mediante agua subcrítica (SWE), también ha surgido como una técnica útil para reemplazar la extracción tradicional, posee la ventaja de ser amigable con el ambiente y de gran eficiencia cuando se hace extracción en muestras sólidas. En esta técnica se utiliza agua a temperaturas entre 100 y 374 °C y presiones entre 10 y 60 bares (Herrero, M. et al. 2006) para mantenerla en estado líquido, a estas condiciones, la constante dieléctrica del agua disminuye considerablemente, comparándola con la misma a temperatura ambiente, acercándose a la constante dieléctrica del etanol (solvente orgánico tradicional en extracción).

2.5.2.2. Extracción enzimática

En la extracción enzimática se degrada la pared celular de las microalgas mediante el empleo de enzimas, esto facilita la salida de los aceites presentes en la célula para su posterior transformación en biodiesel. Estas enzimas también pueden ser utilizadas

para transformar los ácidos grasos presentes en las microalgas, en lípidos aptos para su posterior transesterificación (Ward & Singh, A., 2005); sin embargo, la actividad enzimática se ve afectada por muchas variables como: la naturaleza de la enzima, las concentraciones y las razones de los reactantes, la composición de los aceites o mezclas de ácidos grasos, la composición de la pared celular, el contenido inicial de agua, la temperatura, entre otros.

2.5.2.3. Extracción con solvente químico

La extracción de lípidos con solventes químicos ha sido utilizada tradicionalmente para obtener lípidos de origen animal y vegetal, en el caso de las microalgas, el solvente es por lo general adicionado a la biomasa seca aunque en algunos casos es utilizado en biomasa con cierta cantidad de agua, lo que disminuye los costos globales del proceso, pero disminuye también la eficiencia de la extracción.

Una gran variedad de solventes orgánicos suelen ser utilizados en la extracción de aceite de microalgas, siendo los más populares el hexano y el etanol, mediante una mezcla hexano:etanol es posible extraer más del 98% de los ácidos grasos presentes en la biomasa (Richmond A., 2004); sin embargo, al ser el etanol un buen solvente de extracción, pero con selectividad relativamente baja hacia los lípidos comparada con otros solventes, en extracciones con etanol pueden aparecer otros componentes de las microalgas, como azúcares, pigmentos o aminoácidos.

Una metodología basada en solventes químicos fue propuesta por Folch et al., la cual extrae lípidos tanto polares como no polares; esto se logra con la utilización de un solvente apolar, el cual disuelve los lípidos neutros, en combinación con un solvente relativamente polar, el cual disuelve los lípidos polares presentes en la muestra sometida a extracción, estas propiedades de los solventes fueron originalmente aprovechadas para desarrollar un método basado en la mezcla cloroformo:metanol 2:1 (v/v) en una proporción de veinte volúmenes de solución por uno de muestra, seguido de una purificación de los extractos con una solución salina. Luego, en 1959, Bligh & Dyer, modificaron el método de Folch et al.; utilizando una mezcla cloroformo:metanol 1:2 en una proporción (v/v) de 1:3,75 muestra:solución extractora, seguidamente se agrega una parte de cloroformo para finalmente agregar una parte de agua. Se obtuvo así un método de extracción de lípidos más rápido, económico y amigable con el ambiente -pues se reduce significativamente el volumen de solvente utilizado- que es usado en la actualidad.

Estos métodos han dado muy buenos resultados en la extracción de aceite de microalgas y se utilizan con frecuencia como complemento de métodos de disrupción mecánica, de autoclavado o sonicación, aunque poseen la desventaja de ser poco amigables con el ambiente debido a la toxicidad de los solventes utilizados.

El sistema de extracción Soxhlet ha sido ampliamente utilizado en la extracción de aceite de microalgas, este sistema, se compone de un balón donde se encuentra un solvente orgánico que se calienta hasta ebullición, un tubo de extracción Soxhlet, donde se coloca la muestra, la cual va contenida en un cartucho de celulosa, y un condensador; en el cual, después de evaporarse, el solvente orgánico se condensa y cae al tubo Soxhlet, donde extrae el aceite contenido en la biomasa seca hasta que el

tubo se llena, cuando el tubo está lleno de solvente, este, por medio de un sifón, vuelve al balón que contiene el resto de solvente y se repite el proceso (Figura 2.9).

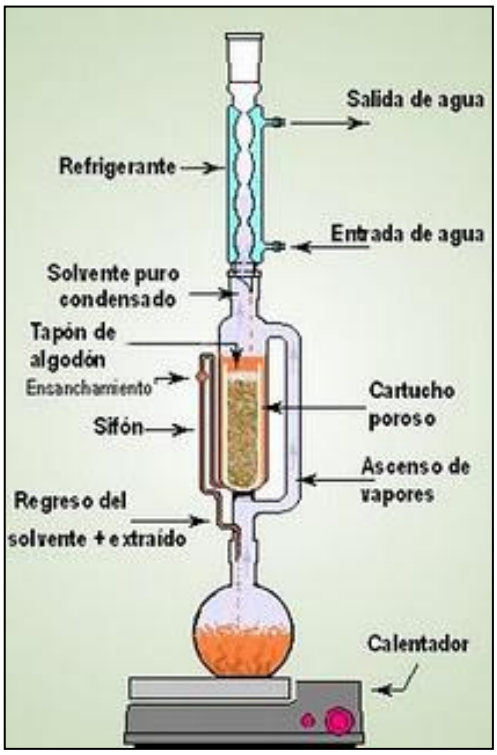

Figura 2.9 Aparato de extracción Soxhlet

Una gran cantidad de solventes se han utilizado como medio de extracción en el método Soxhlet, el uso de éter de petróleo se recomienda por ser éste un solvente no polar que será selectivo al extraer lípidos no polares de las microalgas como los triglicéridos, los cuales son lípidos ideales para la producción de biodiesel; el éter etílico también posee esta propiedad, el inconveniente que presentan los éteres, es su alta volatilidad, lo que conlleva a una significativa perdida de solvente durante el proceso de extracción. El solvente hexano también ha sido ampliamente utilizado como solvente de extracción para microalgas en el sistema Soxhlet con resultados interesantes (Anderson & Sorek; 2008), el hexano es relativamente económico, fácil de recuperar después de la extracción y posee selectividad hacia lípidos neutros, también puede ser utilizado en mezcla con isopropanol, esta mezcla se considera segura a escala industrial, eficiente en la extracción de ácidos grasos y de baja toxicidad. Si el objetivo es una gran eficiencia y la selectividad no es prioritaria la mezcla diclorometano:hexano, permite aumentar la cantidad de lípidos totales extraídos. Otra mezcla que se ha utilizado en la extracción Soxhlet para microalgas, es una combinación de diclorometano:metanol, la cual es muy eficiente y recupera una gran cantidad de lípidos neutros.

2.5.2.4. Extracción húmeda [34, 38]

Un método innovador es el desarrollado por OriginOil Inc.; este método, denominado OriginOil Single-Step Extraction™ (figura 2.10), consiste en un proceso de extracción húmeda de lípidos de microalgas, que realiza la extracción directamente del medio acuático de cultivo, agrupando la cosecha, secado y extracción en un solo paso.

Para lograr la extracción, Quantum Fracturing™, una tecnología de patente pendiente, combina la pulsación de campos electromagnéticos con la modificación de pH para romper las paredes celulares, liberando el aceite de las células. Gran parte del aceite de algas se eleva a la parte superior para ser extraído y refinado, mientras que la biomasa restante se deposita en el fondo para su posterior procesamiento como combustible y otros co-productos valiosos.

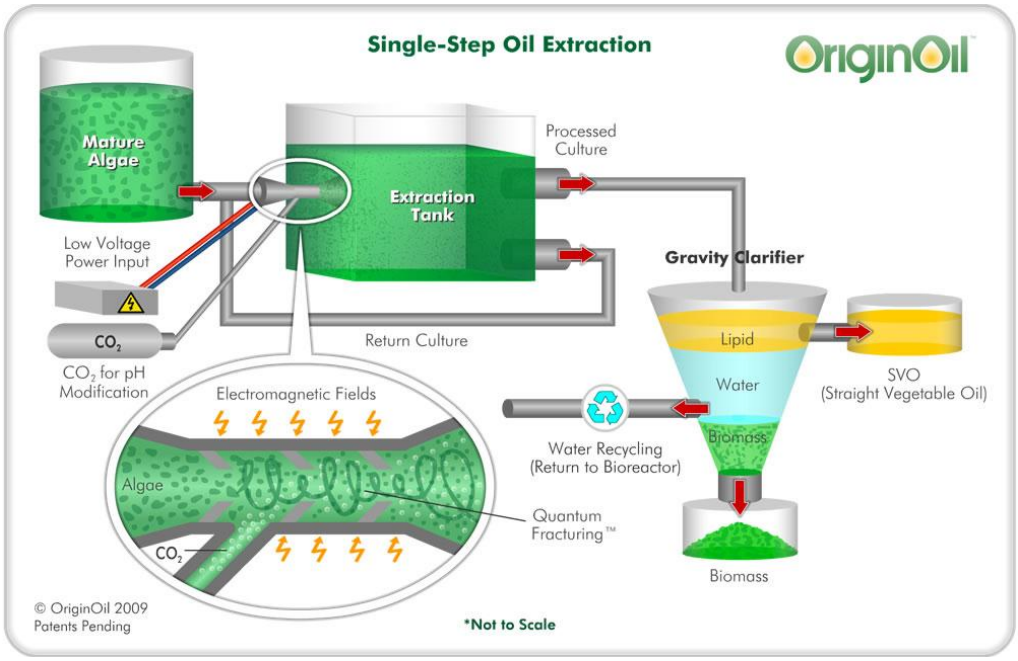

Figura 2.10 Proceso de extracción de aceite Single-Step (originoil.com)

Se indica que este proceso de extracción de aceite de microalgas es más simple y eficiente que los sistemas actuales antes mencionados, sin necesidad de productos químicos o inversiones en maquinaria pesada; además, la cantidad de energía que se utiliza para romper las células de microalgas puede ser significativamente menor que otras tecnologías de extracción obteniendo como resultado la marcada separación de aceite, agua de reciclo y biomasa.

Un método alternativo es el hidrotratamiento, el cual usa hidrógeno en lugar de metanol y catalizadores para acelerar la reacción química de conversión directa. Este enfoque produce un combustible idéntico a los combustibles fósiles, pero es complejo y más costoso como lo es producir hidrógeno y catalizadores.

2.6. Determinación del rendimiento de aceite

La determinación del porcentaje de aceite extraído se calcula en base al peso seco de la muestra de microalgas a la que se aplicó la extracción. Sin embargo, como se mencionó en el acápite 2.4, la biomasa seca no está conformada únicamente por células microalgales, sino que también se pueden encontrar presentes otros agentes como cloruros y sulfatos; por lo que la expresión del rendimiento de aceite puede hacerse de dos formas, en función de si se descuentan o no dichos compuestos de la biomasa seca tomada como base. Así, para la expresión de los resultados que se presentan más adelante, se aplican las siguientes definiciones:

2.6.1. Base biomasa seca bruta

La determinación del rendimiento de aceite extraído de microalgas se hace tomando como base la masa de biomasa seca total tomada como muestra para realizar la extracción. Así el rendimiento estará determinado por el cociente de la masa de aceite obtenido y la masa total de la muestra sometida a extracción.

2.6.2. Base biomasa seca neta

Para la determinación del rendimiento de aceite extraído de una muestra de microalgas en base a biomasa seca neta; primero se debe contar con el resultado de la determinación de cloruros presentes en la muestra con la que se trabajó; entonces se resta el porcentaje de cloruro de sodio (NaCl) hallado, de la cantidad de biomasa seca tomada como muestra. En el caso que la cosecha de biomasa se haya realizado por floculación, se debe determinar también la cantidad de sulfatos presentes; e igualmente restar este cálculo de la cantidad de biomasa seca tomada como muestra; finalmente se realiza el cálculo del porcentaje de aceite extraído en función del resultado hallado. Es fácil darse cuenta que esta forma de cálculo es más precisa y muestra resultados más exactos en comparación al método anterior.

Capítulo III

Parte experimental

3.1. Materiales y equipos

Para la reproducción sistemática de los distintos métodos de extracción de aceite, ensayados en la presente tesis, se emplearon los siguientes materiales y equipos:

- Materia prima
  Biomasa seca y pulverizada de microalgas, de las especies *Dunaliella tertiolecta*, *Chaetoceros calcitrans* cultivadas a nivel de planta piloto UDEP y *Nannochloropsis sp*. proporcionada por IMARPE; cosechadas por centrifugación.

- Reactivos
  Cloroformo ($CHCl_3$)
  Hexano (C_6H_{14})
  Metanol (CH_3OH)
  Propanol (C_3H_7OH)

- Equipos
  Balanza analítica (marca: Ohaus, modelo: Discovery)
  Extractor Soxhlet
  Agitador Vortex (marca: Thermolyne-Barnstead, modelo: 63210-26)
  Centrífuga (marca: Hettich, modelo: Universal 16)
  Sonicador (marca: Bicasa, modelo: Ultrasonic)
  Agitador magnético (marca: J. SELECTA. S.A, modelo: 6003284)
  Estufa (marca: Memmert, modelo: Universal 500)
  Refrigerador
  Plancha de calentamiento (marca: HW Kessel S.A)
  Desecador

- Materiales y vidriería de uso frecuente en laboratorio

Para la determinación de cloruros en las muestras se utilizaron los siguientes materiales:

- Materia prima e insumos
  Biomasa seca de microalgas
  Cloruro de sodio (99% pureza)

- Reactivos
  Cromato de potasio (K_2CrO_4)
  Nitrato de plata ($AgNO_3$)

- Equipos
  Agitador magnético (marca: J. SELECTA. S.A, modelo: 6003284)
  Refractómetro (marca: Sper Scientific, modelo: 300052)
  Bomba de vacío (marca: Vacuubrand, modelo: MZ 2C)

- Materiales y vidriería de uso frecuente en laboratorio

Los distintos reactivos, equipos y materiales utilizados en el desarrollo de la tesis fueron proporcionados por el Laboratorio de Química de la Universidad de Piura, a excepción de la tina de sonicación (baño ultrasónico), la cual fue suministrada por el Laboratorio de Metalotecnia de la Universidad de Piura. Cabe mencionar, además, que todos los solventes químicos utilizados en los distintos ensayos y determinaciones son de grado analítico (p.a.).

3.2. Microalgas analizadas

Los ensayos se realizaron con tres especies de microalgas: *Dunaliella tertiolecta* y *Chaetoceros calcitrans*; que son dos de las algas estudiadas y producidas en la planta piloto de la Universidad de Piura en el marco del proyecto financiado por FINCyT Contrato 025-2008-PITEA "Desarrollo de tecnología para el diseño y construcción de un foto-biorreactor piloto para la producción de microalgas (FBR-MA) para biodiesel y otras aplicaciones". Se escogieron estas dos cepas debido a que fueron las que mostraron mayor rendimiento de aceite en las pruebas de extracción realizadas como parte del referido proyecto, demostrando una mejor adaptación para su producción a gran escala en la región Piura. La otra especie utilizada es *Nannochloropsis sp*. producida y proporcionada por el Instituto del Mar de Perú IMARPE; se utilizó esta cepa debido a su alto contenido de lípidos, de acuerdo a información proporcionada por dicha institución, además de contar con gran cantidad de biomasa seca. Las muestras de biomasa seca de cada especie fueron colectadas en recipientes plásticos con tapa y almacenadas en un ambiente acondicionado a 23 °C. Para facilitar la identificación de las muestras en la experimentación, se estableció una abreviatura para designar a cada una ellas, así se tiene Dun para *Dunaliella tertiolecta*, Ccal para la *Chaetoceros calcitrans* y Nanno para la *Nannochloropsis sp*.

La decisión de realizar ensayos con diferentes especies de microalgas obedece a la importancia de evaluar la respuesta de distintas cepas frente a un mismo método de extracción de lípidos; es decir si estas ofrecen un rendimiento proporcional a los demás métodos o si, para una determinada cepa, se obtiene un mayor rendimiento asociado a un determinado método de extracción, dado que cada especie presenta características biológicas y fisicoquímicas particulares lo que podría producir una mejor respuesta frente a determinados solventes. A continuación se expondrá brevemente las principales características de las microalgas seleccionadas:

3.2.1. *Dunaliella tertiolecta*

Dunaliella tertiolecta es un alga verde unicelular, móvil y en forma de varilla que es común en las aguas saladas. Pertenece a la familia *Dunaliellaceae*, clase *Chlorophyceae* del filo *Chlorophyta*.

Dunaliella tertiolecta es un flagelado marino verde con células de 5-8 µm de longitud y de 5-6 µm de ancho. Esta alga puede ser fácilmente cultivada en laboratorios. Su morfología la hace ideal para su recuento, pues no se agrupan ni forman cadenas. Su crecimiento es lo suficientemente rápido para medir con precisión el número de células después de 72 horas, lo que también significa que su consumo de CO_2 es elevado. La especie es moderadamente sensible a las sustancias tóxicas y se reporta que esta cepa tiene un rendimiento de aceite de 37%.

3.2.2. *Chaetoceros calcitrans*

Chaetoceros calcitrans es una diatomea marina ampliamente utilizada en la industria de la acuicultura, ya que se compone de valor nutricional adecuado para la mayoría de animales filtradores marinos. Pertenece a la familia *Chaetocerotaceae*, clase *Bacillariophyceae* del filo *Heterokontophyta*.

Chaetoceros calcitrans es un organismo unicelular flotante, una diatomea rectangular con cuatro largas acantha (partes espinosas y afiladas) en sus esquinas. Generalmente, el crecimiento celular y la reproducción se lleva a cabo mediante la división en dos células. Estas algas unicelulares microscópicas están rodeadas por una pared celular que está altamente impregnada de sílice ($SiO_2 \cdot nH_2O$). El tamaño de la célula es de 3-7 µm de longitud y de 3-5 µm de ancho. La *Chaetoceros* contiene lípidos con ácidos grasos altamente insaturados y un buen balance de vitaminas. Se reporta que esta especie presenta un rendimiento de aceite de 27%.

3.2.3. *Nannochloropsis sp.*

La *Nannochloropsis* tiene una ultraestructura muy simple y reducida en comparación a otros taxones cercanos. Pertenece a la familia *Eustigmataceae*, clase *Eustigmatophyceae* del filo *Heterokontophyta*.

Nannochloropsis sp., es una microalga generalmente marina, aunque se le ha encontrado también en agua dulce; sus células tienen un tamaño de 3-5 µm de longitud y de 3-5 µm de ancho. Se considera un alga prometedora para aplicaciones industriales debido a su capacidad de acumular altos niveles de ácidos grasos poli-insaturados. Su valor nutricional estriba en ser fuente de vitamina B_{12} y ácidos grasos no saturados EPA. Se utiliza principalmente como fuente de alimento energético para larvas de peces y rotíferos. Se reporta que esta cepa tiene un rendimiento de aceite de 32%.

3.3. Determinación de lípidos presentes en microalgas

A continuación se describe cada uno de los métodos de extracción de lípidos aplicados a las muestras de microalgas para su posterior evaluación, lo que constituye el objetivo central de este trabajo. De los distintos métodos de extracción

recogidos en la literatura científica y descritos en el capitulo anterior, se escogieron aquellos que fueron probados en biomasa de microalgas y que, aplicados en distintas investigaciones relacionadas con la producción de biodiesel, presentaron el mayor rendimiento de aceite extraído, por lo que se les asume como los métodos más eficientes y compatibles con las características de las microalgas.

Dentro de los métodos utilizados por los investigadores destacan aquellos basados en la extracción directa con solventes químicos por lixiviación, entre otras razones por su alta selectividad hacia los lípidos, la posibilidad de generar soluciones más eficientes en base a la mezcla de solventes con selectividades diferentes (hacia lípidos polares o neutros), así como su mejor respuesta al trabajar conjuntamente a un método de pretratamiento de biomasa.

Sin embargo, la selección del solvente o mezcla de solventes apropiada, así como las relaciones "solvente 1:solvente 2" (v/v) y "muestra:solución extractora" para un proceso altamente eficiente es muy variada. De este modo se determinó aplicar la extracción con solvente hexano, la extracción con solución propanol:hexano y la extracción con solución cloroformo:metanol. El por qué se decidió evaluar estos métodos, dejando de lado otros solventes y soluciones posibles, así como las relaciones volumétricas tomadas para los mismos, se explicará más adelante, cuando se describa a detalle los métodos de extracción.

Mención aparte merece la reciente metodología de extracción húmeda denominada OriginOil Single-Step Extraction™ la cual -aunque hubiera sido especialmente interesante evaluar en el presente trabajo dada la expectativa que ha generado en el mundo científico por su simplicidad y rapidez- se encuentra actualmente procesando su patente, por lo que no se pudo tener acceso al procedimiento de extracción propiamente dicho y, consecuentemente, se dejó de lado.

Antes de describir el proceso de experimentación desarrollado en la presente tesis, y a fin de facilitar su comprensión, se definirán algunos términos que se usarán de manera continua en el presente y siguiente capítulo. Así se tiene que, para propósitos del presente trabajo, **una muestra** es una cantidad determinada de biomasa seca de una especie de microalga, la que será sometida a experimentación; **una prueba** hace referencia a cada uno de los cuatro experimentos realizados por muestra de especie de microalga analizada y método de extracción aplicado; mientras que **un ensayo** hace referencia a las cuatro pruebas realizadas por especie y método utilizado, es decir que el ensayo engloba los resultados de las cuatro pruebas realizadas. Hecha esta aclaración se expondrá el procedimiento seguido, el cual ha sido dividido en dos etapas (pretratamiento y extracción), para la determinación del rendimiento de aceite por distintos métodos de extracción en distintas especies de microalgas.

3.3.1. Preparación de las muestras

La preparación de las muestras consiste en un tratamiento previo que se aplica a la biomasa seca de microalgas con la finalidad, principalmente, de permitir al solvente penetrar las células y lograr una extracción completa.

Es importante mencionar que la cantidad de muestra a utilizar en algunos ensayos se vio limitada, según el método empleado, por la centrífuga utilizada en la

experimentación -la cual sólo permite tubos de ensayo de hasta 15 mL-; teniendo presente que se trata de una investigación a nivel de laboratorio. A continuación se presenta los métodos de pretratamiento utilizados:

3.3.1.1. Desintegración mecánica (molienda)

Las tres especies de microalgas con las que se trabajó fueron sometidas a un pretratamiento de molienda en mortero de porcelana, de modo que la muestra quede completamente pulverizada y homogeneizada.

- En un mortero de porcelana se colocó 15 g de biomasa seca.
- Se procedió a la molienda, por un periodo que asegure que la muestra quede finamente pulverizada.
- Con ayuda de un pincel se depositó la muestra en un recipiente hermético.

3.3.1.2. Sonicación

Este método de pretratamiento fue aplicado a todas las muestras que serían luego tratadas con los métodos Folch et al. y Bligh & Dyer modificado por el IMARPE -como se verá más adelante-, esto debido a que se adoptó los métodos desarrollados por Zhu et al. (2002) [3] y Takagi et al. (2006) [28] respectivamente, los que fueron aplicados en sendas investigaciones de extracción de aceite de microalgas.

Para la aplicación de las ondas de ultrasonido se hizo uso de una tina de sonicación. Cada muestra mezclada con solvente(s) fue expuesta a sonicación de forma continua, en ciclos de 15 minutos, a la única frecuencia permitida por el sonicador utilizado. Así:

- Se coloca agua en un vaso de precipitados, al igual que en la tina de sonicación.
- En dicho vaso se colocan los tubos de ensayo conteniendo las muestras con el solvente de extracción aplicado.
- Las muestras fueron expuestas a 3 ciclos de ondas de ultrasonido por espacio de 15 minutos cada ciclo.

3.3.2. Métodos de extracción

La realización repetitiva de ensayos de métodos de extracción de aceite de microalgas se desarrolló de modo que se pueda comparar los resultados obtenidos en cada uno de ellos, con las distintas especies utilizadas, de manera objetiva, sistemática y estadísticamente significativa. Con esta finalidad, cada uno de los métodos se aplicó a cada una de las tres especies de microalgas escogidas y anteriormente descritas. Para asegurar la consistencia estadística de los resultados y minimizar la posibilidad de cometer error sistemático y/o aleatorio en la experimentación se realizaron cuatro pruebas por especie analizada y por método empleado, asegurando que las condiciones experimentales fueran las mismas para cada uno de los casos. Los cuatro resultados obtenidos, por especie y método aplicado, fueron registrados y tratados estadísticamente en Ms Excel; así mismo se puso especial cuidado en los parámetros experimentales para que los resultados sean comparables.

De los distintos solventes generalmente utilizados para la extracción de lípidos de tejidos de diferentes especies vegetales y animales, marinas y terrestres, se escogieron aquellos que, habiendo sido probados en microalgas, mostraron mejores rendimientos en la bibliografía consultada. Así mismo se tuvo un especial interés por aquellos solventes que obedecen a algún método de extracción de lípidos estudiado y que arrojan resultados positivos y reproducibles.

Por tanto, para la presente investigación se consideraron los siguientes solventes:

- El hexano, solvente orgánico de fácil recuperación, ampliamente utilizado en la extracción de lípidos y comúnmente asociado a la extracción Soxhlet.
- La solución cloroformo:metanol, de alta selectividad hacia lípidos totales al combinar un solvente polar y otro apolar además de utilizarse extensamente en la extracción de lípidos de tejidos marinos bajo los métodos Folch et al. y Bligh & Dyer; y
- La solución hexano:isopropanol, también ampliamente utilizada, y que para la presente tesis se toma en su versión modificada por Ramos et al. (2010) [26], que proponen la metodología de extracción de lípidos neutros y polares, procedimiento que también es adoptado por el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) especialmente modificada, según los autores, para su aplicación en microalgas.

Es importante mencionar que en el mes de marzo del 2011, el tesista tuvo la oportunidad de asistir al curso de postgrado "Biotecnología en el sector pesquería: biotecnología algal" organizado por la Universidad Nacional Agraria La Molina en Lima. El curso ofrecía una parte teórica y otra practica, esta última se desarrolló en los laboratorios del IMARPE y fue dictada por los especialistas que ahí laboran. El IMARPE venía trabajando con microalgas meses antes que la Universidad de Piura también como parte de un proyecto financiado por el FINCyT orientado a la producción de biocombustibles, lo que hacía de la experiencia muy enriquecedora para los fines de la tesis. En esa ocasión se pudo apreciar la metodología aplicada en dicha institución para la extracción de aceite de microalgas. Es así que, más adelante se describirá de qué forma y a qué métodos se aplicaron modificaciones basadas en la experiencia recogida en este curso.

Cabe advertir también que, a fin de mantener las mismas condiciones experimentales en sendos experimentos, se aplicó el mismo procedimiento para la tara de los materiales utilizados para la determinación gravimétrica del rendimiento de aceite obtenido.

Teniendo definidos los solventes y mezcla de solventes a evaluar en la presente tesis y habiendo mencionado algunas observaciones de importante incidencia en el proceso de experimentación, se describe a continuación las distintas metodologías seguidas para la aplicación de cada método a las muestras a analizar.

3.3.2.1. Extracción con solvente hexano

Como se mencionó anteriormente, el hexano es un solvente utilizado en la extracción de lípidos de tejidos animales y vegetales, debido principalmente a su alta selectividad hacia los lípidos, fácil recuperación y a que es poco nocivo para el ambiente. La metodología utilizada en la presente tesis fue la denominada extracción

Soxhlet, la cual se basa en la utilización de un aparato del mismo nombre descrito en el segundo capítulo (ver acápite 2.5.2.3).

A. Extracción Soxhlet

El proceso utilizado se basa en la metodología seguida en el proyecto FINCyT en la Universidad de Piura. Se trabajó con 5 g de muestra en aparato Soxhlet con balones de 500 mL. El tiempo de extracción sugerido en la bibliografía es de 4 horas, sin embargo, a fin de asegurar una extracción completa, se duplicó el tiempo de extracción en las pruebas realizadas (8 horas).

Al ser este un sistema extracción en el que existe una baja probabilidad de cometer error sistemático/aleatorio, sólo se realizaron pruebas por duplicado. La precisión del método se hace evidente en la similitud de los resultados obtenidos, los cuales se presentarán en el siguiente capítulo. El proceso seguido para este método fue:

- Se coloca 5 g de muestra previamente molida en un cartucho de doble papel filtro Whatman 42 cerrado. Se lleva el paquete al extractor Soxhlet.
- Se añaden 300 mL de hexano al balón del Soxhlet y se enciende las hornillas, se deja trabajar por 8 horas a 70 °C.
- Se retira el balón y se recupera el hexano en rotavapor a 60 °C y 40 rpm por 20 min.
- Se retira el balón y se elimina el hexano remanente en baño maría a 60°C por 30 min.
- Finalmente se pesan los balones para determinar el contenido de lípidos por diferencia.

3.3.2.2. Extracción con solución propanol:hexano

El método de extracción en base a una solución propanol:hexano que se evaluó en el presente trabajo fue planteado por Ramos et al. (2010) como parte de su tesis en la que se busca la maximización del rendimiento de aceite en microalgas [26]. El interés en esta solución se sustenta en la adopción y modificación del método por parte del IMARPE, que, como se mencionó, se encontraba trabajando en la producción de microalgas de alto contenido lipídico. Se asumió que dicha institución apuntaba a este método como el más eficiente después de haber evaluado distintos solventes. De esta forma, con esta solución se probaron los siguientes métodos de extracción:

A. Método Ramos 2010 modificado por IMARPE

Las pruebas realizadas bajo este método obedecen al interés de reproducir y confirmar, según los informes brindados a la empresa Ecoenergías del Perú en el marco del proyecto antes mencionado, el alto rendimiento de aceite obtenido por el IMARPE. El método utilizado es una variación de Ramos et al. (2010) aplicando una solución hexano:propanol de proporción 1:4 (v/v). Llamo la atención la baja proporción de hexano utilizada, pues se trata de un solvente apolar de alta selectividad hacia los lípidos. Aun así, se siguió la metodología bajo las mismas condiciones descritas por el IMARPE, guardando expectativa

por la biomasa proporcionada por esta institución -*Nannochloropsis sp.*- la cual se informó que alcanzaba hasta 45% de rendimiento de aceite. El procedimiento es sencillo y se presenta a continuación:

- Por cada gramo de biomasa algal se añade 18 mL de solución hexano:isopropanol 1:4 (v/v).
- Con ayuda de un Vortex se agita la mezcla hasta que la biomasa se disperse (10 min).
- Se filtra la mezcla con papel filtro de 1,5 μm (Whatman 42) en un kitasato previamente tarado.
- Se evapora la solución filtrada a 95 °C, bajo campana de seguridad.
- Se determina el contenido de lípidos gravimétricamente.

B. Método Ramos 2010

El bajo contenido de aceite obtenido con el método anterior, corroboró la hipótesis de que esto se debía a la baja proporción de hexano propuesto por IMARPE. Por tanto, se prefirió evaluar el método original de Ramos et al. 2010 [26], el cual aplica una solución hexano:isopropanol de proporción 3:2 (v/v); por lo demás el procedimiento seguido es idéntico al anterior:

- Por cada gramo de biomasa algal se añade 18 mL de solución hexano:isopropanol 3:2 (v/v).
- Con ayuda de un Vortex se agita la mezcla hasta que la biomasa se disperse (10 min).
- Se filtra la mezcla con papel filtro de 1,5 μm (Whatman 42) en un kitasato previamente tarado.
- Se evapora la solución filtrada a 95 °C, bajo campana de seguridad.
- Se determina el contenido de lípidos gravimétricamente.

C. Método Ramos 2010 modificado

Tras la experiencia en el curso de biotecnología algal en Lima, se propuso realizar una leve variación al método de Ramos et al. 2010; es así que, a fin de lograr una extracción más limpia y completa, se tomó algunos lineamientos del protocolo de extracción de lípidos presentado por dicha institución [40] -presentado en el Anexo I-. De esta forma se cambió el proceso de filtrado con papel filtro Whatman 42 por la extracción directa de la solución conteniendo los lípidos previa sedimentación de la muestra, además se dejó reposar la solución extractora con la muestra por 24 horas a 4 °C y protegida de la luz. Se presenta a continuación el procedimiento seguido:

- En un tubo de ensayo, por cada gramo de biomasa algal se añade 18 mL de solución hexano:isopropanol 3:2 (v/v), agitar en Vortex hasta que la biomasa se disperse.
- Se deja reposar los tubos por 24 horas a 4 °C y protegidos de la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.
- En un Vortex se agita la mezcla por espacio de 1 minuto.
- Se centrifuga a 4500 rpm por 20 min. Se recupera el extracto con una pipeta Pasteur y se pasa a un nuevo tubo de vidrio de 15 mL.

- A la biomasa residual se agrega más solución hexano:isopropanol 3:2 (v/v), en un volumen igual al 50% del usado inicialmente, es decir 9 mL por gramo de biomasa; se agita en Vortex por 1 minuto y se centrifuga nuevamente a 4500 rpm por 20 min recuperando el nuevo extracto en el mismo tubo de la recuperación anterior.
- Se evapora la solución resultante en baño maría a 95 °C, bajo campana de seguridad.
- El contenido de lípidos es determinado gravimétricamente.

3.3.2.3. Extracción con solución cloroformo:metanol

Esta es la solución extractora planteada en el método de extracción Folch et al. (1957) utilizado sobre tejido animal de origen marino. Este método consiste en la homogeneización de tejido con solución extractora y el posterior lavado del extracto con una apropiada solución salina para, finalmente, obtener un sistema bifásico bien definido, en el que la fase inferior -fase clorofórmica- contiene los lípidos extraídos del tejido y la fase superior -fase metanol-agua- contiene las sustancias no lipídicas. La función de las sales en el agua es la de alterar la distribución de los lípidos y prácticamente eliminarlos de la fase superior; en la ausencia de sales, permanecen cantidades significativas de ácidos lipídicos en la fase acuosa y se pierden en el lavado [12].

De acuerdo a la literatura científica, este método, que ha sufrido varias modificaciones, continúa siendo considerado el medio clásico y más confiable para la extracción cuantitativa de lípidos; debido principalmente a que extrae lípidos totales de los tejidos. Esto gracias -como se explica en el capítulo anterior- a la combinación de un solvente relativamente polar y uno no polar con alta selectividad; sin embargo, posee la desventaja de no ser muy amigable con el ambiente debido a la alta toxicidad de los solventes utilizados.

Frente a este inconveniente Bligh & Dyer [6] plantean un método con una relación cloroformo:metanol distinta, además de reducir la proporción muestra:solución extractora en más de la mitad de la aplicada por Folch et al. [12], este método rápido ha sido ampliamente usado para la determinación de lípidos ofreciendo resultados confiables; sin embargo, presenta un importante inconveniente -se explicará en el siguiente acápite- por lo que, en un principio, no fue tomado en cuenta para la evaluación realizada en el presente trabajo.

Debido a que la relación muestra:solución extractora es volumétrica, fue necesario determinar la densidad de cada una de las muestras utilizadas. Para esto, con ayuda de una balanza analítica, se determinó el peso de un mililitro de muestra en una probeta previamente tarada.

Si bien se empezó con el método Folch et al. 1957, se probaron distintas metodologías dadas las modificaciones que se aplicaron a este método, modificaciones basadas en la experiencia recogida en el curso de la UNALM así como en los resultados obtenidos a lo largo de la experimentación. De este modo se tiene:

A. Método Folch et al. 1957 original

Se decidió realizar pruebas con el método Folch et al. debido a que, si bien Bligh & Dyer [6] ofrece un método más simple y económico, en la investigación realizada por Iverson, Lang y Cooper (2001) [17], se encontró que para muestras con un contenido de lípidos esperado menor que el 2% ambos métodos -Folch y Bligh & Dyer- obtienen rendimientos muy similares, sin embargo para muestras con un contenido lipídico esperado mayor al 2% el método Bligh & Dyer produce resultados de contenido de lípidos significativamente menores a los de Folch et al., y esta diferencia en los rendimientos se incrementa conforme mayor es el contenido lipídico de la muestra. Entonces, dado que se espera un contenido de lípidos mucho mayor al 2%, es que se prefirió aplicar el método Folch et al.

Por otro lado, dado el gran número de autores que realizan investigaciones utilizando el método Folch et al. con alguna variación -la cual no siempre se reporta-, se optó por seguir el procedimiento original del método [12], el cual se presenta a continuación:

- En un tubo de ensayo, se agrega 20 partes de solución cloroformo:metanol 2:1 (v/v) por cada parte de muestra, lo cual puede hacerse a cualquier escala técnicamente posible.
- Se agita en Vortex por 10 min.
- Se filtra la mezcla, en vacío, con papel Whatman 42.
- Al filtrado resultante se añade una solución salina (0,58% NaCl) de modo que la solución final cloroformo/metanol/agua contenga una proporción 8:4:3, agitar en Vortex por un lapso de 1 min.
- Se centrifuga la mezcla por 10 minutos a 4500 rpm y, con ayuda de una pipeta Pasteur, se recupera la fase superior y se desecha.
- Se evapora la fase $CHCl_3$:lípido en baño maría a 70 °C, bajo campana de seguridad.
- El contenido de lípidos se determina gravimétricamente.

B. Método Folch et al. modificado I

Frente a las modificaciones observadas en el protocolo de extracción de lípidos del IMARPE, se propuso aplicar ciertos criterios de éste en el método Folch et al. 1957 descrito anteriormente. Al igual que las modificaciones realizadas al método Ramos 2010, se adoptó la extracción directa de la solución clorofórmica conteniendo los lípidos, previa sedimentación de la muestra por centrifugación, y se dejó reposar la solución extractora con la biomasa por 24 horas a 4 °C y protegida de la luz. Esperando de este modo obtener una extracción más limpia y completa. Se desarrolló el procedimiento como sigue:

- En un tubo de ensayo, para un determinado volumen de muestra se añade 20 volúmenes de $CHCl_3$:CH_3OH 2:1 (v/v) y se agita en Vortex por espacio de 1 minuto.
- Se deja reposar la mezcla (tubo 1) al menos 24 h a 4 °C y protegidos de la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.
- En un Vortex se agita la mezcla por espacio de 1 minuto.

- Se centrifuga a 4500 rpm por 20 min. Se recupera el extracto con una pipeta Pasteur y se pasa a un tubo de vidrio de 15 mL (tubo 2). A la biomasa residual se agrega más solución $CHCl_3$:CH_3OH (2:1), en un volumen igual al 50% del usado inicialmente (es decir 10 volúmenes por volumen de biomasa); se agita en Vortex por espacio de un minuto y se centrifuga nuevamente a 4500 rpm por 20 min recuperando el extracto (tubo 2).
- Se agrega una solución salina de 0,58% NaCl, de modo que la solución final cloroformo/metanol/agua contenga una proporción 8:4:3, esta mezcla se agita en Vortex (1 min).
- Se centrifuga a 4500 rpm por 10 min, se separa el 90% de la fase superior y se desecha.
- Se recupera la fase inferior ($CHCl_3$:lípido), introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur (se debe tratar de recuperar sólo cerca del 90% de esta fase, no toda). Se coloca la fase clorofórmica recuperada en un nuevo tubo (tubo 3).
- Se lava la fase acuosa remanente con 1 mL de $CHCl_3$, se mezcla en Vortex y se centrifuga nuevamente a 4500 rpm durante 10 min, se recupera la fase inferior ($CHCl_3$:lípido) y se coloca en el tubo 3.
- Se evapora la fase clorofórmica (tubo 3) en baño maría a 70 °C, bajo campana de seguridad.
- El contenido de lípidos se determina gravimétricamente.

C. Método Folch et al. modificado II

Si bien los resultados obtenidos con las variaciones realizadas mostraron un aumento de la eficiencia del método -se verá en el siguiente capítulo-, surgió la necesidad de definir si esto se debía realmente a dichas modificaciones o si era producto del arrastre inadvertido de una pequeña cantidad de biomasa algal al realizar la recuperación del extracto con la pipeta -descrito en esta sección-. Es así que, a fin de poner a prueba esta hipótesis, se realizó un nuevo ensayo del método Folch et al. modificado I, con la única variación de realizar la separación de la biomasa del extracto por filtración, con papel Whatman 42, en lugar de la sedimentación por centrifugación. A efecto de presentar los resultados obtenidos bajo este método en el siguiente capítulo se le denominó Folch et al. modificado II.

D. Método Bligh & Dyer modificado por IMARPE

Aun cuando se había decidido dejar de lado este método, surgió el interés en evaluarlo debido a que el IMARPE presentó una modificación del mismo adaptada para microalgas -esto como parte de la experiencia en el curso organizado por la UNALM-, en cuya demostración, se observaron interesantes variaciones, como la aplicación de ultrasonido -metodología estudiada por Takagi [28]-, además de obtener resultados alentadores. De este modo se evaluó el método siguiendo el procedimiento del protocolo para la determinación de lípidos proporcionado por el IMARPE en el curso [40], con dos únicas variaciones: no se agregó antioxidante BHT y el secado del extracto se realizó por evaporación en lugar de en atmosfera inerte con nitrógeno -esto debido a que no se contaba con dichos productos-; además, la metodología alterna aplicada no supone una variación significativa del procedimiento de extracción en sí, por lo que no afecta el rendimiento obtenido. Así se tiene:

- Se pesa entre 5 y 50 mg de microalgas en un tubo de ensayo de 15 mL (tubo 1). Se adiciona 3 mL de una mezcla de solventes cloroformo:metanol (1:2) sin agua.
- Se somete a ultrasonido por 3 ciclos de 15 min en un baño de agua.
- Se deja reposar los tubos por 24 h a 4 °C y protegidos de la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.
- Se somete a ultrasonido por 3 ciclos de 15 min en un baño de agua.
- Se centrifuga a 4500 rpm por 20 min. Se recupera el extracto con una pipeta Pasteur y se pasa a un tubo de vidrio de 15 mL (tubo 2). A la biomasa residual (tubo 1), se agrega 1,5 mL de solución $CHCl_3$:CH_3OH (1:2); se agita en Vortex por espacio de un minuto y se centrifuga nuevamente a 4500 rpm por 20 min recuperando el extracto (tubo 2).
- Se agrega 2 mL de solución salina de 0,58% NaCl al tubo 2, que contiene el extracto, y se agita en Vortex (1 min).
- Se centrifuga a 4500 rpm por 10 min y se elimina el 90% de la fase superior.
- Se separa la fase inferior ($CHCl_3$:lípido), introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur (se debe tratar de recuperar sólo cerca del 90% de esta fase, no toda). Se coloca la fase clorofórmica recuperada en un nuevo tubo (tubo 3).
- Se lava la fase acuosa remanente con 1 mL de $CHCl_3$, se mezcla en Vortex y se centrifuga nuevamente a 4500 rpm durante 10 min, se recupera la fase inferior ($CHCl_3$:lípido) y se coloca en el tubo 3.
- Se seca la fase clorofórmica (tubo 3) en baño maría a 70 °C, bajo campana de seguridad.
- El contenido de lípidos se determina gravimétricamente.

E. Método Zhu

Si bien en la bibliografía se habla, y no en pocas oportunidades, de la aplicación de ultrasonido para aumentar la eficiencia de la extracción de lípidos de microalgas, sólo se encontraron dos investigaciones que aplican este método de pretratamiento en microalgas, estas fueron realizadas por Takagi et al. (2006) [28], quien aplicó ultrasonido a una variación del método Bligh & Dyer [6], y Zhu et al. (2002) [3], quien aplicó dicha técnica a una variación del método Folch et al. 1957.

Dado que en el protocolo de extracción de lípidos del IMARPE se aplica ultrasonido a un Bligh & Dyer modificado, se decidió evaluar la metodología planteada por Zhu añadiendo este método de pretratamiento al método Folch et al. modificado I -el que mostró mejores resultados-. El procedimiento seguido se presenta a continuación:

- En un tubo de ensayo, para un determinado volumen de muestra se añade 20 volúmenes de $CHCl_3$:CH_3OH 2:1 (v/v) y se agita en Vortex por espacio de 1 minuto.
- Se somete a ultrasonido por 15 min (3 ciclos) en un baño de agua.
- Se deja reposar la mezcla (tubo 1) al menos 24 h a 4 °C y protegidos de la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.
- Se somete a ultrasonido por 15 min (3 ciclos) en un baño de agua.
- Se centrifuga a 4500 rpm por 20 min. Se recupera el extracto con una pipeta Pasteur y se pasa a un tubo de ensayo de 15 mL (tubo 2). A la biomasa

residual se agrega más solución $CHCl_3$:CH_3OH (2:1), en un volumen igual al 50% del usado inicialmente (es decir 10 volúmenes por volumen de biomasa); se agita en Vortex por espacio de un minuto y se centrifuga nuevamente a 4500 rpm por 20 min recuperando el extracto (tubo 2).
- Se agrega una solución salina de 0,58% NaCl, de modo que la solución final cloroformo/metanol/agua contenga una proporción 8:4:3, esta mezcla se agita en Vortex (1 min).
- Se centrifuga a 4500 rpm por 10 min, se separa el 90% de la fase superior y se desecha.
- Se separa la fase inferior ($CHCl_3$:lípido), introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur (se debe tratar de recuperar sólo cerca del 90% de esta fase, no toda). Se coloca la fase clorofórmica recuperada en un nuevo tubo (tubo 3).
- Se lava la fase acuosa remanente con 1 mL de $CHCl_3$, se mezcla en Vortex y se centrifuga nuevamente a 4500 rpm durante 10 min, se recupera la fase inferior ($CHCl_3$:lípido) y se coloca en el tubo 3.
- Se evapora la fase clorofórmica (tubo 3) en baño maría a 70 °C, bajo campana de seguridad.
- El contenido de lípidos se determina gravimétricamente.

3.3.3. Determinación de sales presentes

Las muestras de microalgas Dun y Ccal cultivadas en la planta piloto de la Universidad de Piura, se cosecharon por centrifugación; también la muestra de Nanno proporcionada por el IMARPE se cosechó por este método. Cuando se cosecha por centrifugación (a diferencia de la floculación -ver Capítulo 2-), hay un menor contenido de agua salada que acompaña a la biomasa cosechada, y no hay adición de sulfato de aluminio, por lo que se espera encontrar contenidos ínfimos de sulfatos en dichas muestras. Por esta razón, no se realizó la determinación de sulfatos para ninguna de las muestras.

La determinación de cloruros presentes en las muestras se realizó atendiendo a dos metodologías:

3.3.3.1. Medida del índice de refracción

La determinación de cloruros por medición del índice de refracción de las muestras se realizó de acuerdo al procedimiento habitual encontrado en la bibliografía, utilizando para ello un refractómetro óptico-manual. Es importante tener presente que la temperatura afecta significativamente los resultados, por lo que la prueba se llevó a cabo en un ambiente acondicionado a 20 °C, que es la temperatura en la que se presentan las tablas de conversión de concentración de cloruros de soluciones acuosas en los manuales de química. Así mismo hay que resaltar la relevancia de limpiar cuidadosamente la superficie del prisma con alcohol después de cada prueba, a fin de que no queden residuos que afecten la siguiente lectura. A continuación se presenta el procedimiento seguido:

Preparación de la muestra
- En un vaso de precipitados, se pesa 5 g de muestra y se agrega 100 mL de agua destilada.

- Se agita la muestra en agitador magnético por un periodo de 30 minutos, de modo que se disuelvan las sales presentes en la microalga.
- Con ayuda de una bomba de vacío y con papel filtro Whatman 42, se filtra la disolución.

Ajuste de la escala
- Con ayuda de un gotero, se coloca de 2 a 3 gotas de agua destilada en la superficie del prisma principal.
- Se cierra el prisma secundario y se observa a través del ocular.
- Se confirma que la escala se ajusta a 1,333 (Brix 0%).

Medición del índice de refracción de las soluciones
- Se coloca de 2 a 3 gotas de solución en el centro de la superficie del prisma y se tapa cuidadosamente.
- Se observa por el ocular y se gira la perilla de compensación de luz hasta que aparezca una línea clara y definida en el campo de visión.
- Se gira la perilla de medición alineando la línea delimitadora con las líneas de intersección y se lee en la escala superior el índice de refracción.
- Finalmente el dato tomado se contrasta en las tablas de conversión de las propiedades de concentración de cloruros de soluciones acuosas. Determinando así el contenido de cloruros en la muestra.

3.3.3.2. Determinación química de cloruros

Al no existir diferencia significativa entre los métodos de determinación química de cloruros expuestos en el capitulo anterior; se consideró conveniente, acorde al alcance de la presente tesis, realizar dicha determinación de acuerdo a la Norma Técnica Peruana (NTP 400.042): método de ensayo para la determinación cuantitativa de cloruros y sulfatos solubles en agua para agregados en hormigón [23], la cual se basa en el método volumétrico de Möhr para la determinación del ion cloruro con nitrato de plata. Se utilizó este método debido a que es el aplicado normalmente por el Laboratorio de Química - Servicios Externos de la Universidad de Piura, por lo que se cuenta con todo el material y conocimiento práctico para su desarrollo.

Preparación de la muestra
- En un vaso de precipitados, se pesa 5 g de muestra y se agrega 100 mL de agua destilada.
- Se agita la muestra en agitador magnético por un periodo de 30 minutos, de modo que se disuelvan las sales presentes en la microalga.
- Se filtra la disolución con ayuda de una bomba de vacío y con papel filtro Whatman 42, se trasvasa a un matraz aforado y se enrasa con agua destilada a 250 mL. Se tapa y agita vigorosamente por 20 segundos.

Estandarización de la solución de $AgNO_3$
- Se pesa 0,32968 g de cristales de cloruro de sodio (NaCl) de alta pureza, previamente secado a 110 °C durante 1 hora y enfriado en desecador a temperatura ambiente.
- Se transfieren los cristales a un matraz aforado de 200 mL, se disuelven, diluyen y mezclan completamente.

- Se pipetea una alícuota de 10 mL de solución de NaCl para estandarizar la solución de $AgNO_3$ (teórico 0,028 N).
- Se añade 1 mL de la solución al 5% del indicador cromato de potasio.
- Se titula la disolución hasta la aparición de un color anaranjado que precede a la aparición de un precipitado rojo.
- El cálculo se realiza restando el valor de un blanco.

Para propiciar una rápida y correcta determinación de cloruros, fue necesario realizar un análisis cualitativo previo de las muestras, con el fin de tener una idea de la alta o baja concentración de cloruros presentes, de tal modo que se pueda elegir correctamente la concentración de la solución estándar a utilizar y la adecuada alícuota a tomar de la muestra. Para esto se toma una pequeña cantidad de muestra en un tubo de ensayo, a la cual se le agrega unas gotas de nitrato de plata y -puesto que ya se conoce los posibles resultados de las reacciones que ocurren en esta solución, se explicó en el capítulo 2- por simple observación se puede determinar que: si el precipitado es intenso -precipitación blanca debido a la formación de cloruro de plata- significa que hay una elevada concentración de cloruros, por lo que se debe tomar una alícuota pequeña y se agrega agua destilada para llevarlo hasta el volumen deseado para la determinación; caso contrario la concentración de cloruros en la muestra es pobre por lo que se puede tomar una alícuota grande y no se hace necesario agregar agua destilada.

Determinación del blanco

- En un matraz se toma una muestra de agua destilada igual a la cantidad de disolución que se empleará para la determinación de cloruros en las muestras de microalgas, esto se puede estimar gracias al resultado de la prueba cualitativa descrita anteriormente.
- Se añade 1 mL de solución indicadora de cromato de potasio.
- Se titula con solución de nitrato de plata hasta que el indicador comience a virar de amarillo a anaranjado.
- El blanco del indicador es el volumen de $AgNO_3$ requerido para el punto final.
- Se registra este valor como el blanco del ensayo.

Una vez listas las muestras, estandarizada la solución y determinado el blanco se procede a aplicar el método para la determinación de cloruros en microalgas, de la siguiente manera:

Los resultados de los ensayos cualitativos mostraron baja concentración de cloruros en todas las muestras; por ello se tomó una alícuota de 50 mL para la determinación, por duplicado y por cada muestra.

- Se coloca los 50 mL de disolución de la muestra en un matraz y se añade 1 mL de solución indicadora de cromato de potasio.
- Se titula con solución de nitrato de plata hasta que el indicador comience a virar de amarillo a anaranjado.
- Se registra el volumen de $AgNO_3$ empleado hasta llegar al punto final y se calcula el contenido de cloruros, deduciendo el blanco previamente determinado.

Capítulo IV

Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados de los análisis realizados siguiendo los métodos descritos en el capítulo anterior; así mismo, al final se realiza una evaluación comparativa y estadística de los distintos métodos de extracción.

Los resultados se expresan como porcentajes de aceite extraído de microalgas, los que presentan cuatro cifras significativas. Los datos tomados para el cálculo del rendimiento de aceite presentan siete cifras significativas (0,01 mg), el máximo que permite la balanza analítica empleada, esto a fin de obtener resultados más exactos.

Es importante recordar que, para propósitos de esta tesis, una muestra es la cantidad determinada de biomasa seca de una especie de microalga que será sometida a análisis; una prueba hace referencia a cada uno de los cuatro experimentos realizados por muestra de especie de microalga analizada y método de extracción aplicado; mientras que un ensayo hace referencia a las cuatro pruebas realizadas por especie y método utilizado, es decir que el ensayo engloba los resultados de las cuatro pruebas realizadas.

4.1. Contenido de aceite con diferentes métodos de extracción con solvente

Los resultados expresan el porcentaje de lípidos presentes en las microalgas, la determinación química de los lípidos acumulados se realiza gravimétricamente, tomando como lípidos el remanente obtenido tras la evaporación del solvente utilizado.

Por cada ensayo realizado se presenta una tabla con los resultados obtenidos, señalando el método aplicado y la especie de microalga empleada. En la tabla también se presentan dos importantes datos: la media aritmética y el coeficiente de variación de los resultados obtenidos en cada ensayo. El coeficiente de variación se define como el cociente entre la desviación estándar y la media aritmética de un conjunto de datos, esta se usa para comparar el grado de dispersión de dos o más conjuntos de datos, incluso si se trata de medias diferentes [2]; en tanto la media aritmética es el promedio de los datos, siendo éste el resultado final que se brinda del rendimiento alcanzado por ensayo.

Dada la posibilidad de encontrar algún valor atípico en los resultados de las pruebas realizadas, se evalúa, para cada ensayo, si la eliminación de uno de los datos produce una reducción significativa del coeficiente de variación. Si este fuera el caso, dicho

dato es descartado -la muestra se señala con un asterisco (*)-. De esta manera, el cálculo de la media aritmética se hace en función de tres o cuatro resultados por ensayo, dependiendo del descarte, o no, de un dato sospechoso.

Se debe indicar que los resultados que se presentan a continuación han sido calculados en base a biomasa seca bruta -descrita en el acápite 2.6.1-. No obstante, conforme se exponga los resultados de la determinación de cloruros presentes en las muestras de microalgas, se presentarán los resultados calculados en base a biomasa neta, descontando cloruros, -ver acápite 2.6.2- para cada método estudiado.

4.1.1. Extracción con hexano

4.1.1.1. Extracción con Soxhlet

Los resultados obtenidos bajo este método se presentan en la tabla 4.1. Los rendimientos obtenidos se tomaron como datos de control, es decir, se considerarán como punto de partida para comparar el desempeño obtenido con los demás métodos. Como se explicó en el capítulo anterior para este método sólo se realizaron dos pruebas por ensayo.

Tabla 4.1. Determinación de lípidos en Ccal, Dun y Nanno: extracción con hexano – método Soxhlet

Masa de cada muestra: 2,5 g en Ccal y Dun; 5 g en Nanno					
Cepa	**Muestra**	**Lípidos (g)**	**Porcentaje de lípidos**	**PROMEDIO**	**CV**
Chaetoceros calcitrans	C1	0,25890	10,356%	10,31%	0,66%
	C2	0,25650	10,260%		
Dunnaliella tertiolecta	D1	0,31530	12,612%	12,67%	0,60%
	D2	0,31800	12,720%		
Nannochloropsis sp.	N1	0,31920	6,384%	6,35%	0,87%
	N2	0,31530	6,306%		

4.1.2. Extracción con solución hexano:propanol

A continuación se presentan los resultados obtenidos por cada método aplicado que utiliza esta solución extractora:

4.1.2.1. Método Ramos 2010 modificado por IMARPE

Dado el bajo rendimiento obtenido en las primeras pruebas realizadas bajo esta metodología, se decidió descontinuar la evaluación de este método; pues, si bien se suponía que era un método especialmente modificado para su aplicación en microalgas, los resultados obtenidos fueron muy diferentes a lo esperado.

De este modo se confirmó la hipótesis sobre la baja capacidad extractora de la solución aplicada (por una inusual proporción de solventes utilizada, 1:4 hexano:propanol).

4.1.2.2. Método Ramos 2010

Como se puede observar los resultados obtenidos con este método (tabla 4.2) son similares a los de la extracción Soxhlet. Lo interesante, y que realza la importancia del método, es que la extracción se realiza en un tiempo mucho más corto (más de 7 horas de diferencia) produciendo un gran ahorro de energía y ejecución. Además, no hay que olvidar que este práctico método puede ser aplicado a escala industrial.

Tabla 4.2. Determinación de lípidos en Ccal, Dun y Nanno: extracción con propanol:hexano por método Ramos 2010

Masa de cada muestra de biomasa microalgal: 0,5 g					
Cepa	**Muestra**	**Lípidos (g)**	**Porcentaje de lípidos**	**PROMEDIO**	**CV**
Chaetoceros calcitrans	C1	0,04720	9,440%	9,59%	1,39%
	C2	0,04840	9,680%		
	C3	0,04830	9,660%		
	C4*	0,04399	8,798%		
Dunnaliella tertiolecta	D1	0,07320	14,640%	14,66%	1,44%
	D2	0,07440	14,880%		
	D3*	0,07540	15,080%		
	D4	0,07230	14,460%		
Nannochloropsis sp.	N1	0,02190	4,380%	4,39%	3,01%
	N2	0,02260	4,520%		
	N3	0,02128	4,256%		
	N4*	0,02376	4,752%		

* Valores no incluidos en el tratamiento estadístico.

4.1.2.3. Método Ramos 2010 modificado

Dados los resultados obtenidos con el método original, existía cierta expectativa al incluir las variaciones descritas, pues estas produjeron resultados alentadores al aplicarse al método Folch et al. 1957, como se explicará más adelante. Así, se obtuvieron los resultados reportados en la tabla 4.3.

4.1.3. Extracción con cloroformo:metanol

Como se explicó en el acápite 3.3.2.3 es necesario conocer la densidad de las muestras a fin de obtener las proporciones correctas de solventes a utilizar en los procedimientos. Así se obtuvo:

Muestra	**Densidad (g/mL)**
Chaetoceros calcitrans (Ccal)	0,63801
Dunaliella tertiolecta (Dun)	0,618535
Nannochloropsis sp. (Nanno)	0,63801

Teniendo en cuenta estos datos se presenta a continuación los resultados obtenidos por cada método evaluado que aplica esta solución extractora.

Tabla 4.3. Determinación de lípidos en Ccal, Dun y Nanno: extracción con propanol:hexano por método Ramos 2010 modificado

Masa de cada muestra de biomasa microalgal: 0,25 g					
Cepa	**Muestra**	**Lípidos (g)**	**Porcentaje de lípidos**	**PROMEDIO**	**CV**
Chaetoceros calcitrans	C1	0,04583	18,332%	17,60%	5,17%
	C2*	0,03805	15,220%		
	C3	0,04469	17,876%		
	C4	0,04145	16,580%		
Dunnaliella tertiolecta	D1	0,05270	21,080%	22,02%	6,25%
	D2	0,05900	23,600%		
	D3	0,05345	21,380%		
	D4*	0,06483	25,932%		
Nannochloropsis sp.	N1	0,01134	4,536%	4,33%	4,47%
	N2*	0,01210	4,840%		
	N3	0,01075	4,300%		
	N4	0,01038	4,152%		

* Valores no incluidos en el tratamiento estadístico.

4.1.3.1. Método Folch et al. 1957 (original)

Los resultados se muestran en la tabla 4.4, como se esperaba, este método arrojó rendimientos más elevados en comparación a los métodos anteriores, sin embargo hay que tomar en cuenta que esta mezcla extrae lípidos totales, que su aplicación supone un mayor consumo de energía, así como la alta toxicidad de los solventes utilizados.

Tabla 4.4. Determinación de lípidos en Ccal, Dun y Nanno: extracción con cloroformo:metanol por método Folch et al. 1957

Masa de cada muestra de biomasa microalgal: 0,25 g					
Cepa	**Muestra**	**Lípidos (g)**	**Porcentaje de lípidos**	**PROMEDIO**	**CV**
Chaetoceros calcitrans	C1	0,03172	12,688%	12,98%	2,76%
	C2*	0,03031	12,124%		
	C3	0,03219	12,876%		
	C4	0,03345	13,380%		
Dunaliella tertiolecta	D1*	0,05232	20,928%	21,68%	0,79%
	D2	0,05447	21,788%		
	D3	0,05371	21,484%		
	D4	0,05444	21,776%		
Nannochloropsis sp.	N1*	0,03732	7,928%	8,65%	2,14%
	N2	0,03883	8,532%		
	N3	0,03891	8,564%		
	N4	0,03967	8,868%		

* Valores no incluidos en el tratamiento estadístico.

4.1.3.2. Método Folch et al. modificado I

Después del curso en la UNALM, y con el protocolo de extracción de grasa proporcionado por el IMARPE, era imperativo iniciar su evaluación, sin embargo no se contaba aún con el sonicador. Se decidió entonces probar los lineamientos del protocolo excluyendo la sonicación, sobre el método que, hasta el momento, había dado los mejores resultados: Folch et al. lo cual, posteriormente, permitiría evaluar de forma apropiada la influencia de este método de pretratamiento. Se debe mencionar también que a partir de este punto la proporción muestra:solución extractora se hizo en función de un volumen de 0,25 mL de muestra pulverizada, en contraste a los anteriores ensayos que se basaban en una masa de 0,25 g. En la primera corrida de ensayos se obtuvieron los resultados que se reportan en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Determinación de lípidos en Ccal, Dun y Nanno: extracción con cloroformo:metanol por método Folch et al. modificado I

Volumen de la muestra de biomasa microalgal: 0,25 mL						
Cepa	**Masa (g)**	**Muestra**	**Lípidos (g)**	**Porcentaje de lípidos**	**PROMEDIO**	**CV**
Chaetoceros calcitrans	0,15950	C1	0,08776	55,021%	42,04%	34,33%
		C2	0,03556	22,294%		
		C3	0,07989	50,087%		
		C4	0,06502	40,764%		
Dunaliella tertiolecta	0,15463	D1	0,06664	43,095%	52,26%	21,55%
		D2	0,10577	68,400%		
		D3	0,07914	51,179%		
		D4	0,07168	46,355%		
Nannochloropsis sp.	0,13905	N1	0,05373	38,642%	46,44%	16,92%
		N2	0,07750	55,737%		
		N3	0,05755	41,389%		
		N4	0,06949	49,977%		

Como se puede observar en la tabla 4.5; los resultados obtenidos en cada prueba son altamente imprecisos e incongruentes en comparación con los resultados obtenidos anteriormente, lo cual se evidencia en los elevados coeficientes de variación calculados. Dado que esto puede deberse a errores sistemáticos y/o aleatorios cometidos durante el desarrollo del método, se realizó una nueva corrida de ensayos, teniendo cuidado en el desarrollo del procedimiento, de manera especial en la succión del extracto -principal modificación del método susceptible a producir errores-, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.6.

Como se puede apreciar en la tabla 4.6, los resultados obtenidos en esta oportunidad son mucho más precisos en cada ensayo y la fiabilidad se respalda en los bajos coeficientes de variación obtenidos.

Tabla 4.6. Repetición de determinación de lípidos en Ccal, Dun y Nanno: extracción con cloroformo:metanol por método Folch et al. modificado I

Volumen de la muestra de biomasa microalgal: 0,25 mL						
Cepa	**Masa (g)**	**Muestra**	**Lípidos (g)**	**Porcentaje de lípidos**	**PROMEDIO**	**CV**
Chaetoceros calcitrans	0,15950	C1	0,02425	15,203%	15,20%	0,33%
		C2	0,02431	15,241%		
		C3	0,02415	15,141%		
		C4*	0,02342	14,683%		
Dunaliella tertiolecta	0,15463	D1	0,03826	24,742%	24,16%	2,20%
		D2*	0,03416	22,091%		
		D3	0,03665	23,701%		
		D4	0,03716	24,031%		
Nannochloropsis sp.	0,13905	N1	0,01576	11,334%	10,67%	6,24%
		N2*	0,01846	13,276%		
		N3	0,01391	10,004%		
		N4	0,01482	10,658%		

* Valores no incluidos en el tratamiento estadístico.

4.1.3.3. Método Folch et al. modificado II

Dado los resultados anteriores, era pertinente evaluar la influencia que tendría el aplicar una filtración en lugar de la succión del extracto, por lo que se realizó tres nuevos ensayos con papel filtro Whatman 42. De este modo se obtuvieron los resultados reportados en la tabla 4.7.

Tabla 4.7. Determinación de lípidos en Ccal, Dun y Nanno: extracción con cloroformo:metanol por método Folch et al. Modificado II

Volumen de la muestra de biomasa microalgal: 0,25 mL						
Cepa	**Masa (g)**	**Muestra**	**Lípidos (g)**	**Porcentaje de lípidos**	**PROMEDIO**	**CV**
Chaetoceros calcitrans	0,15950	C1	0,02040	12,790%	12,86%	1,82%
		C2	0,02093	13,122%		
		C3*	0,01921	12,044%		
		C4	0,02021	12,671%		
Dunaliella tertiolecta	0,15463	D1	0,03003	19,420%	19,25%	4,24%
		D2	0,03087	19,963%		
		D3*	0,02558	16,542%		
		D4	0,02839	18,359%		
Nannochloropsis sp.	0,13905	N1	0,01235	8,882%	9,23%	8,14%
		N2*	0,01459	10,493%		
		N3	0,01213	8,724%		
		N4	0,01404	10,097%		

* Valores no incluidos en el tratamiento estadístico.

Como se puede apreciar, los valores obtenidos con la filtración aplicada son más bajos que los obtenidos por el método Folch et al. modificado I (tabla 4.6); esto avalaría la hipótesis que motivó la comparación (posible arrastre de sólidos durante la succión del extracto y, en consecuencia, un aparente aumento del rendimiento). Sin embargo, esto quedaría descartado dada la precisión de los resultados obtenidos en todos los otros métodos donde se aplicó la operación de succión del extracto, los que además se muestran coherentes entre sí y acordes a lo esperado. Por otro lado es importante resaltar que no por esto el proceso de extracción de la fase clorofórmica deja de ser un paso en el que actuar con cuidado es de vital importancia, a fin de obtener resultados confiables.

4.1.3.4. Método Bligh & Dyer modificado por IMARPE

En la tabla 4.8 se reportan los resultados obtenidos con este método. Como se puede apreciar en dicha tabla, los resultados son cercanos a los obtenidos con el método Folch et al. 1957; esto es contrario a lo que se esperaba tomando en cuenta lo planteado por Iverson, Lang y Cooper (2001) [17] (ver 3.3.2.3.A). Entonces el rendimiento alcanzado se puede deber a la proporción de solvente utilizada -la relación muestra:solución extractora utilizada en este método es mayor a la propuesta en el método original [6]- o al método de pretratamiento aplicado -sonicación-.

Tabla 4.8. Determinación de lípidos en Ccal, Dun y Nanno: extracción con cloroformo:metanol por método Bligh & Dyer modificado IMARPE

Masa de la muestra de biomasa microalgal: 0,050 g					
Cepa	**Muestra**	**Lípidos (g)**	**Porcentaje de lípidos**	**PROMEDIO**	**CV**
Chaetoceros calcitrans	C1*	0,00658	13,160%	13,72%	1,39%
	C2	0,00685	13,700%		
	C3	0,00696	13,920%		
	C4	0,00677	13,540%		
Dunaliella tertiolecta	D1	0,01026	20,520%	21,09%	2,86%
	D2	0,01051	21,020%		
	D3*	0,01300	26,000%		
	D4	0,01086	21,720%		
Nannochloropsis sp.	N1	0,00426	8,520%	9,07%	6,06%
	N2*	0,00364	7,280%		
	N3	0,00454	9,080%		
	N4	0,00481	9,620%		

* Valores no incluidos en el tratamiento estadístico.

4.1.3.5. Método Zhu

En base a los resultados obtenidos bajo el método Folch et al. modificado I y Bligh & Dyer modificado por el IMARPE, se esperaba obtener resultados prometedores bajo el método Zhu, cuya principal característica es la aplicación de un método de pretratamiento -sonicación- sobre el método Folch et al. Los resultados se pueden apreciar en la tabla 4.9:

Tabla 4.9. Determinación de lípidos en Ccal, Dun y Nanno: extracción con cloroformo:metanol por método Zhu

Volumen de la muestra de biomasa microalgal: 0,25 mL						
Cepa	**Masa (g)**	**Muestra**	**Lípidos (g)**	**Porcentaje de lípidos**	**PROMEDIO**	**CV**
Chaetoceros calcitrans	0,15950	C1	0,02816	17,655%	17,29%	3,32%
		C2	0,02652	16,627%		
		C3*	0,02609	16,357%		
		C4	0,02804	17,580%		
Dunaliella tertiolecta	0,15463	D1	0,03668	23,721%	24,44%	3,18%
		D2*	0,04056	26,230%		
		D3	0,03764	24,341%		
		D4	0,03907	25,266%		
Nannochloropsis sp.	0,13905	N1	0,01769	12,722%	12,72%	0,34%
		N2*	0,01912	13,751%		
		N3	0,01774	12,758%		
		N4	0,01762	12,672%		

* Valores no incluidos en el tratamiento estadístico.

4.2. Resultados de la determinación de las sales presentes en la muestra

4.2.1. Medida del índice de refracción

Los resultados de la determinación de cloruros por medición del índice de refracción se obtuvieron en base a la tabla de conversión de concentración de cloruros en soluciones acuosas presentada por R. Weast [31], la que se puede apreciar en el Anexo C. En la tabla 4.10 se presenta los resultados de la medición para cada especie de microalga analizada.

Tabla 4.10. Determinación de cloruros por medición del índice de refracción

Especie	Masa (g)	Muestra	Volumen (L)	n*	NaCl g/L	% NaCl
Ccal	0,9997	C1	0,025	1,3349	11,1	27,758
Dun	1,0005	D1	0,025	1,3346	9,0	22,489
Nanno	1,0005	N1	0,025	1,3347	10,1	25,237

*n: índice de refracción

4.2.2. Método volumétrico de Möhr

Para presentar los resultados obtenidos en esta determinación se empleó la hoja de cálculo del Laboratorio de Química de la Universidad de Piura. La tabla 4.11 presenta el resultado de la estandarización de nitrato de plata y los resultados de la determinación de cloruro de sodio.

Al observar los resultados en ambos métodos -medida del índice de refracción y volumétrico- salta a la vista la gran diferencia en el porcentaje de cloruro de sodio encontrado en cada uno, lo cual exige una explicación. Tomando en cuenta la exactitud comprobada de la determinación de cloruros por método volumétrico -añadiendo que se realizaron pruebas por duplicado, mostrándose precisas-, se puede

concluir que los resultados obtenidos bajo este método son los reales. En cambio, el método refractométrico arroja resultados mucho más elevados porque en la medida del índice de refracción intervienen no sólo cloruros sino el total de sólidos solubles presentes en la solución (pigmentos, etc.); por lo que se descarta dichos resultados y se toma en cuenta los obtenidos por el método volumétrico de Möhr para calcular el contenido de aceite real en la biomasa de microalgas (descontando el cloruro de sodio que la acompaña).

Tabla 4.11 Determinación química de cloruros y cloruro de sodio en microalgas

Muestras analizadas	**Ccal**	**Dun**	**Nanno**
Peso de muestra (g)	0,50030	0,50020	0,50050
Volumen final (mL)	250	250	250
Alícuota (mL)	50	50	50
N $AgNO_3$ (estandarización)	0,02738	0,02738	0,02738
Gasto blanco (mL)	0,20	0,20	0,20
Gasto muestra (mL)	4,20	2,70	4,00
Gasto muestra (mL) réplica	4,40	2,60	4,10
% cloruros (Cl^-)	3,97731	2,37716	3,73330
% NaCl	6,56	3,92	6,16

De esta forma, en la tabla 4.12 se presenta los rendimientos promedio obtenidos en cada ensayo; y en la tabla 4.13 se presenta estos resultados en base a biomasa neta, es decir descontando cloruros de sodio.

Tabla 4.12. Rendimiento de aceite respecto a biomasa algal bruta por método ensayado

Especies / Métodos	***Chaetoceros calcitrans***	***Dunaliella tertiolecta***	***Nannochloropsis sp.***
Método Soxhlet	10,31%	12,67%	6,35%
Método Ramos 2010	9,59%	14,66%	4,39%
Método Ramos 2010 modificado	17,60%	22,02%	4,33%
Método Folch et al. 1957	12,98%	21,68%	8,65%
Método Folch et al. modificado I	15,20%	24,16%	10,67%
Método Folch et al. modificado II	12,86%	19,25%	9,23%
Método Bligh & Dyer IMARPE	13,72%	21,09%	9,07%
Método Zhu	17,29%	24,44%	12,72%

Tabla 4.13. Rendimiento de aceite respecto a biomasa neta (descontando cloruros de sodio)

Especies / Métodos	***Chaetoceros calcitrans***	***Dunaliella tertiolecta***	***Nannochloropsis sp.***
Método Soxhlet	11,03%	13,19%	6,77%
Método Ramos 2010	10,26%	15,26%	4,68%
Método Ramos 2010 modificado	18,84%	22,92%	4,61%
Método Folch et al. 1957	13,89%	22,56%	9,22%
Método Folch et al. modificado I	16,27%	25,15%	11,37%
Método Folch et al. modificado II	13,76%	20,04%	9,84%
Método Bligh & Dyer IMARPE	14,68%	21,95%	9,67%
Método Zhu	18,50%	25,44%	13,55%

4.3. Comparación general de los métodos de extracción y preparación

A fin de realizar una primera comparación global de los métodos de extracción, se presentan los resultados obtenidos de forma gráfica en la figura 4.1.

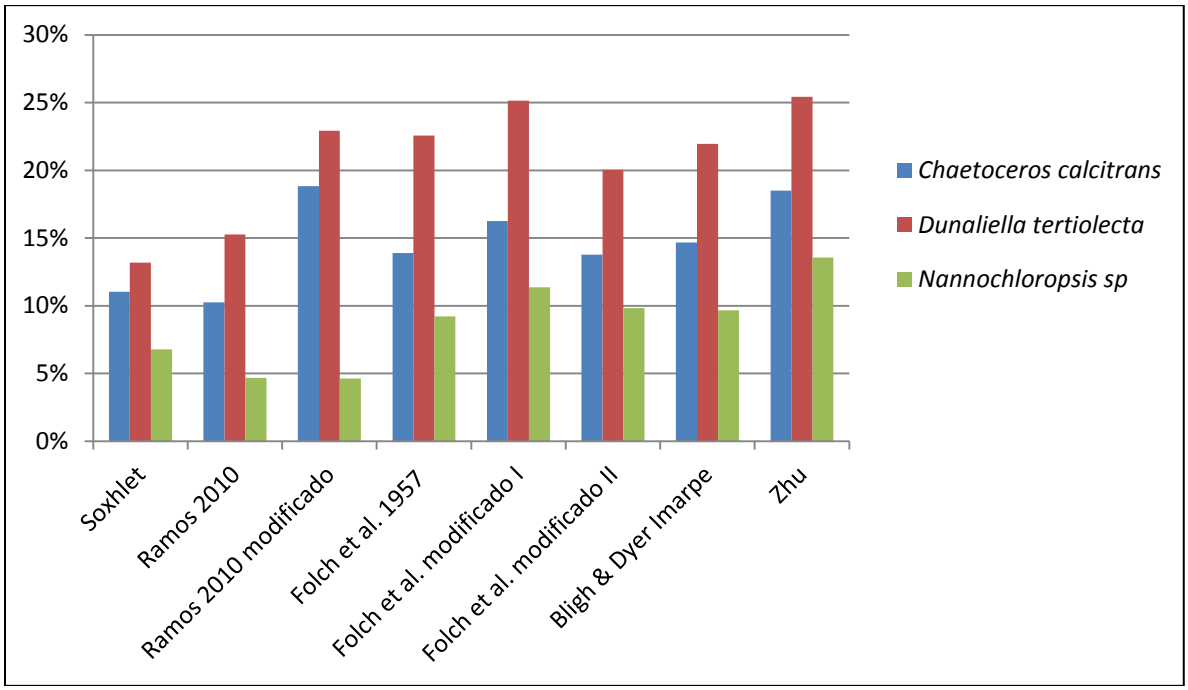

Figura 4.1. Gráfico de barras de los rendimientos obtenidos por método y especie

En el gráfico comparativo se puede observar que la especie *Dunaliella tertiolecta* es la que ofrece un marcado mayor contenido de aceite para todos los métodos empleados; así mismo que la *Nannochloropsis sp*. es la que, para todos los métodos, presenta el menor contenido. Respecto a los métodos ensayados, aparentemente los métodos que ofrecen mejores rendimientos de aceite extraído son: el método Ramos 2010 modificado, el método Folch et al. 1957 y su modificación, y los dos métodos que aplican ultrasonido; para validar esto se realizó el análisis estadístico que se detalla a continuación:

La comparación sistemática de los métodos evaluados en la presente tesis se realizó en función de la fiabilidad estadística de los resultados. Para ello se recurre a herramientas de análisis estadístico como el análisis de varianza y la prueba de contraste de hipótesis [2]. El análisis de varianza, o ANOVA, permite comparar dos o más medias poblacionales a partir de muestras tomadas de dichas poblaciones, analizando qué tan dispersas están las medias de dichas muestras, es decir que tanto difieren entre sí. En tanto, el contraste de hipótesis es una prueba de la validez de una aseveración, mediante el análisis de datos extraídos de una muestra.

Para facilitar el entendimiento de esta sección, se debe tomar en cuenta los siguientes conceptos: Se denomina **unidades experimentales** a los elementos sobre los que se va a experimentar para obtener las medidas que se desea comparar, en este caso la biomasa seca de microalgas pulverizada, las que formarán grupos experimentales. Estos grupos experimentales son sometidos a distintos **tratamientos**, en este caso los métodos de extracción, a fin de medir resultados y evaluarlos. Generalmente, sobre las unidades experimentales actúan, además de los tratamientos, factores externos

que influyen en el resultado del experimento; esta acción, en la experimentación realizada, fue controlada mediante la formación de **bloques** homogéneos, constituidos por cada especie de microalga analizada. Por otro lado, se denomina región de aceptación al conjunto de posibles resultados del muestreo que llevarían a aceptar la hipótesis nula (H_0), la región de rechazo es el conjunto de posibles resultados que llevarían a rechazar H_0 y, por lo tanto, aceptar la hipótesis alternativa (H_1), la que provoca la investigación.

De acuerdo a como se presentan los resultados, obtenidos por ensayo, se hace necesario comparar no sólo la eficiencia de los métodos de extracción sino también confirmar la evidencia de **interacción** entre determinados métodos de extracción frente a una determinada especie de microalga. En este contexto, para poder desarrollar esta evaluación de forma completa, sistemática y concreta, en primer lugar se somete, a los cinco mejores métodos -mencionados anteriormente-, a un análisis de varianza de dos factores con interacción entre los factores, siendo los dos factores considerados los tratamientos (métodos de extracción) y el factor externo que se desea eliminar mediante la formación de bloques (especies de microalgas). Finalmente se realizan pruebas de hipótesis para determinar qué medias son las mayores (métodos más eficientes) basándose para ello en el resultado obtenido en el análisis ANOVA.

Cabe resaltar que todas las pruebas se realizan con un nivel de confiabilidad del 95%.

4.3.1. Análisis de varianza de dos factores con interacción entre los factores.

4.3.1.1. Análisis global de los métodos con más alto rendimiento.

Al considerar que actúan dos factores sobre las unidades experimentales se realiza dos investigaciones simultáneamente: comparar las medias de los *K* tratamientos y comparar las medias de los *n* bloques; además de considerar la posibilidad que haya interacción entre los factores.

De este modo se investigará las siguientes hipótesis:

Para los tratamientos: H_0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$
H_1: al menos una es diferente
Para los bloques: H_0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$
H_1: al menos una es diferente
Para la interacción: H_0: los factores no interactúan respecto a la variable investigada
H_1: los factores sí interactúan respecto a la variable investigada

Siguiendo la metodología ANOVA, se llevan los datos que se presentan en la tabla 4.14 para desarrollar el análisis en Ms Excel. De esta forma Excel arroja dos tablas: la primera es un resumen de los datos del problema la cual se presenta en el Anexo D y la segunda es la tabla ANOVA del problema la cual se presenta en la tabla 4.15.

Tabla 4.14. Datos del análisis global de los métodos de extracción de aceite que presentaron mejor resultado.

	Ramos 2010 modificado	Folch et al. 1957	Folch et al modificado I	Bligh & Dyer IMARPE	Zhu
Chaetoceros calcitrans	19,62	13,58	16,27	14,66	18,89
	19,13	13,78	16,31	14,90	17,79
	17,74	14,32	16,20	14,49	18,81
Dunaliella tertiolecta	21,94	22,68	25,75	21,36	24,69
	24,56	22,36	24,67	21,88	25,33
	22,25	22,66	25,01	22,61	26,30
Nannochloropsis sp.	4,83	9,09	12,08	9,08	13,56
	4,58	9,13	10,66	9,68	13,60
	4,42	9,45	11,36	10,25	13,50

Tabla 4.15. Tabla ANOVA - análisis global

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	**Suma de cuadrados**	**Grados de libertad**	**Promedio de los cuadrados**	**F**	**Probabilidad**	**Valor crítico para F (F*)**
Muestra	1453,41254	2	726,70627	1852,92342	3,7238E-32	3,3158295
Columnas	108,997022	4	27,2492554	69,4789432	9,837E-15	2,68962757
Interacción	110,95331	8	13,8691638	35,3629789	3,271E-13	2,26616327
Dentro del grupo	11,7658333	30	0,39219444			
Total	1685,1287	44				

Para las muestras (métodos de extracción) se observa que F > F*, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (H_0). Se puede afirmar entonces que los métodos no tienen la misma eficiencia.
Para los bloques (especies de microalgas) se observa que F > F*, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (H_0). Se puede afirmar entonces que la eficiencia de los métodos de extracción no es la misma para las distintas especies de microalgas.
Para la interacción se observa que F > F*, por lo tanto se rechaza la hipótesis de que los factores no interactúan. Se puede afirmar entonces que el método empleado y el tipo de especie de microalga utilizada sí interactúan, lo cual afecta la eficiencia de los métodos utilizados.

Se comprueba estadísticamente que dentro de los métodos que presentan mejores resultados hay alguno más eficiente que los demás lo que se evidencia aun más en el amplio margen de diferencia entre F y F*; así mismo de este modo se comprobó la existencia de interacción entre métodos y especies, lo que significa que ciertas especies responden mejor frente a determinados métodos de extracción. Ahora bien, tomando esto en cuenta, se debe determinar cuál o cuáles son los métodos de extracción de aceite más eficientes. Para esto se aplican nuevos análisis de varianza a dos subgrupos de métodos de extracción afines con resultados cercanos, finalmente se identificará los mejores métodos mediante pruebas de contraste de hipótesis.

Tomando en cuenta los resultados presentados en la figura 4.1, en primer lugar se comparan los métodos Ramos 2010 modificado, Folch et al. 1957 y Folch et al. modificado I. Seguidamente se comparan los métodos que aplican ultrasonido como pretratamiento, estos son Bligh & Dyer modificado por IMARPE y Zhu. En las figuras 4.2 y 4.3 se presentan gráficamente los rendimientos de ambos subgrupos.

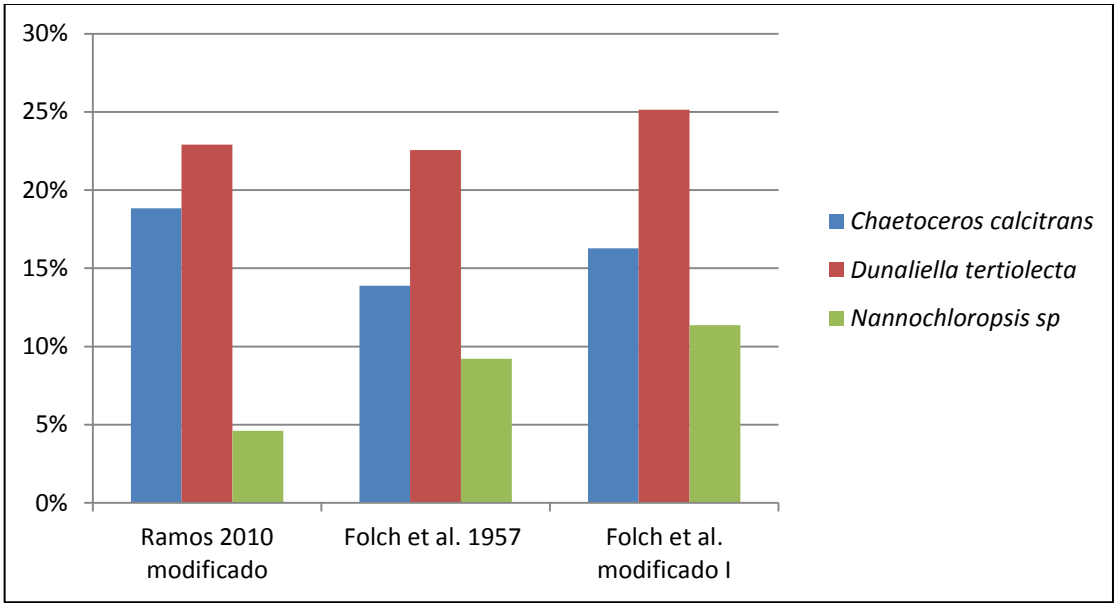

Figura 4.2. Gráfico de barras rendimiento subgrupo 1

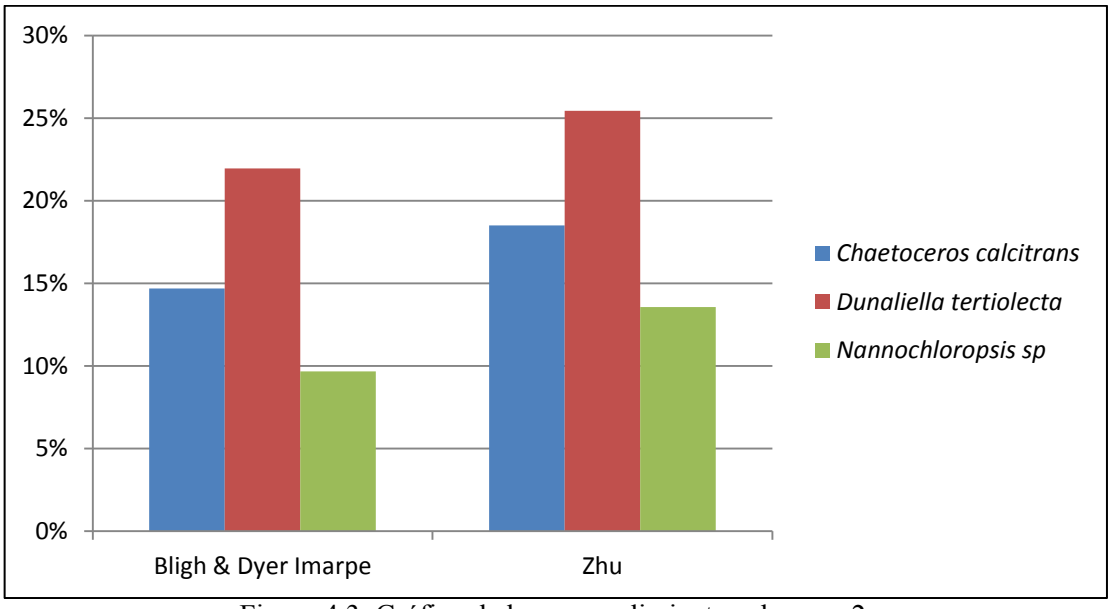

Figura 4.3. Gráfico de barras rendimiento subgrupo 2

Se organizó de esta forma la comparación debido a la cercanía de resultados entre los métodos, como se puede apreciar en las Figuras 4.2 y 4.3, así como la similitud en el procedimiento desarrollado.

4.3.1.2. ANOVA subgrupo uno.

Siguiendo el mismo procedimiento del apartado anterior, se realiza dos investigaciones simultáneamente: comparar las medias de los *K* tratamientos y

comparar las medias de los *n* bloques, pero en este caso sólo se evalúan los métodos Ramos 2010 modificado, Folch et al. 1957 y Folch et al. modificado I; además de considerar la posibilidad que haya interacción entre los factores.

De esta manera se investigará las siguientes hipótesis:

Para los tratamientos: H_0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$
H_1: al menos una es diferente
Para los bloques: H_0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$
H_1: al menos una es diferente
Para la interacción: H_0: los factores no interactúan respecto a la variable investigada
H_1: los factores sí interactúan respecto a la variable investigada

Siguiendo la metodología del análisis de varianza, se llevan los datos que se presentan en la tabla 4.16 para ser procesados en Ms Excel. De esta forma Excel arroja dos tablas: la primera es un resumen de los datos del problema la cual se presenta en el Anexo D y la segunda es la tabla ANOVA del problema la cual se presenta en la tabla 4.17.

Tabla 4.16. Datos análisis para subgrupo 1.

	Ramos 2010 modificado	**Folch et al. 1957**	**Folch et al. modificado I**
Chaetoceros calcitrans	19,62	13,58	16,27
	19,13	13,78	16,31
	17,74	14,32	16,20
Dunaliella tertiolecta	21,94	22,68	25,75
	24,56	22,36	24,67
	22,25	22,66	25,01
Nannochloropsis sp.	4,83	9,09	12,08
	4,58	9,13	10,66
	4,42	9,45	11,36

Tabla 4.17. Tabla ANOVA subgrupo 1.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	**Suma de cuadrados**	**Grados de libertad**	**Promedio de los cuadrados**	**F**	**Probabilidad**	**Valor crítico para F (F*)**
Muestra	1032,5959	2	516,297952	1141,42333	1,0976E-19	3,55455715
Columnas	30,5869119	2	15,293456	33,8105299	8,021E-07	3,55455715
Interacción	89,1555007	4	22,2888752	49,2758918	1,8605E-09	2,92774417
Dentro del grupo	8,14190749	18	0,45232819			
Total	1160,48022	26				

Para las muestras (métodos de extracción) se observa que F > F*, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (H_0). Se puede afirmar entonces que los métodos no tienen la misma eficiencia.
Para los bloques (especies de microalgas) se observa que F > F*, por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa (H_1). Se puede afirmar entonces que la eficiencia de los métodos de extracción no es la misma para las distintas especies de microalgas.
Para la interacción se observa que F > F*, por lo tanto se rechaza la hipótesis de que los factores no interactúan. Se puede afirmar entonces que el método empleado y el tipo de especie de microalga utilizada sí interactúan, lo cual afecta la eficiencia de los métodos utilizados.

Se puede apreciar que, para este caso, el margen de diferencia entre F y F* es mucho menor, sin embargo es igualmente amplio.

4.3.1.3. ANOVA subgrupo dos.

En esta oportunidad se evalúan los métodos Bligh & Dyer modificado por IMARPE y Zhu, los que incluyen en su procedimiento la aplicación de ultrasonido como pretramiento, bajo el mismo enfoque de los dos análisis anteriores.

De este modo se investigará las siguientes hipótesis:

Para los tratamientos: H_0: $\mu_1 = \mu_2$
H_1: al menos una es diferente
Para los bloques: H_0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$
H_1: al menos una es diferente
Para la interacción: H_0: los factores no interactúan respecto a la variable investigada
H_1: los factores sí interactúan respecto a la variable investigada

Los datos de la tabla 4.18 se procesaron en Excel, obteniendo el resumen de los datos del problema, presentado en el Anexo D, y la tabla ANOVA mostrada en la tabla 4.19.

Tabla 4.18. Datos análisis para subgrupo 2.

	Bligh & Dyer IMARPE	**Zhu**
Chaetoceros calcitrans	14,66	18,89
	14,90	17,79
	14,49	18,81
Dunaliella tertiolecta	21,36	24,69
	21,88	25,33
	22,61	26,30
Nannochloropsis sp.	9,08	13,56
	9,68	13,60
	10,25	13,50

Tabla 4.19. Tabla ANOVA subgrupo 2.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	**Suma de cuadrados**	**Grados de libertad**	**Promedio de los cuadrados**	**F**	**Probabilidad**	**Valor crítico para F (F*)**
Muestra	442,483379	2	221,24169	732,603376	2,8737E-13	3,88529383
Columnas	62,6517848	1	62,6517848	207,460489	6,1758E-09	4,74722534
Interacción	0,13106671	2	0,06553335	0,2170023	0,80801855	3,88529383
Dentro del grupo	3,6239258	12	0,30199382			
Total	508,890156	17				

Para las muestras (métodos de extracción) se observa que F > F*, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (H_0). Se puede afirmar entonces que los métodos no tienen la misma eficiencia.
Para los bloques (especies de microalgas) se observa que F > F*, por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa (H_1). Se puede afirmar entonces que la eficiencia no es la misma para las distintas especies de microalgas.
Para la interacción se observa que F < F*, por lo tanto se acepta la hipótesis de que los factores no interactúan (H_0). Se puede afirmar entonces que el método empleado y el tipo de especie de microalga utilizada no afectan la eficiencia de los métodos. Esto se hace evidente en la proporcionalidad de los resultados obtenidos por cada método en cada especie de microalga.

4.3.2. Prueba de contraste de hipótesis

En los análisis de varianza anteriores se hizo evidente que los métodos evaluados no tienen la misma eficiencia, es decir que los rendimientos obtenidos bajo los distintos métodos de extracción son distintos. Es así que ahora se hace necesario determinar qué método de extracción de aceite es el más eficiente, esto se logra mediante una prueba de contraste de hipótesis entre los dos métodos con mayor media muestral. De este modo se aplicó una prueba *t* de contraste hipótesis por cada subgrupo, sin cerrar la posibilidad de una tercera prueba en caso sea necesaria.

4.3.2.1. Prueba *t* subgrupo 1

Se realiza la prueba para las dos combinaciones método-especie con mayor media muestral. De esta forma se evalúan los métodos Ramos 2010 modificado y Folch et al. modificado I, ambos aplicados a la especie *Dunaliella tertiolecta* que fue la que ofreció mayor rendimiento de aceite para todos los casos. Dado que para Dun el método Folch et al. modificado I muestra un promedio más alto se plantearán las siguientes hipótesis:

H_0: $\mu_{Fm} - \mu_R = 0$
H_1: $\mu_{Fm} - \mu_R > 0$

Se presenta a continuación los datos del problema (tabla 4.20) los cuales serán procesados en Ms Excel, programa que nos presenta la tabla 4.21:

Tabla 4.20. Datos Dun subgrupo 1

Ramos 2010 modificado	21,94	24,56	22,25
Folch et al. modificado I	25,75	24,67	25,01

Tabla 4.21. Prueba *t* Dun subgrupo 1

Prueba *t* para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
Dun	**Folch mod.**	**Ramos mod.**
Media	25,1436303	22,9184013
Varianza	0,30658192	2,05256721
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	2,50932918	
P(T<=t) una cola	0,04349446	
Valor crítico de t (una cola)	2,35336343	
P(T<=t) dos colas	0,08698891	
Valor crítico de t (dos colas)	3,1824463	

La región de rechazo está hacia la derecha del valor critico t*. Por lo tanto se rechaza H_0, pues t=2,509 > 2,353=t*, se acepta H_1, o sea que sí se puede afirmar que el método Folch et al. modificado I es mejor que Ramos 2010 modificado -por lo tanto también es mejor que Folch et al. 1957-, cuando se aplican a la microalga *Dunaliella tertiolecta*.

Siguiendo este mismo procedimiento es posible determinar el mejor método de extracción para cada especie, así tenemos los siguientes resultados:

Para *Chaetoceros calcitrans*:

Debido a que para Ccal el método Ramos 2010 modificado muestra un promedio más alto, se plantearán las siguientes hipótesis:

H_0: $\mu_R - \mu_{Fm} = 0$
H_1: $\mu_R - \mu_{Fm} > 0$

Tabla 4.22. Datos Ccal subgrupo 1

Ramos 2010 modificado	19,62	19,13	17,74
Folch et al. modificado I	16,27	16,31	16,20

Tabla 4.23. Prueba *t* Ccal subgrupo 1

Prueba *t* para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
Ccal	**Ramos mod.**	**Folch mod.**
Media	18,8313356	16,2617723
Varianza	0,94625223	0,00291833
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	4,56822861	
P(T<=t) una cola	0,02236409	
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	
P(T<=t) dos colas	0,04472817	
Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	

Se rechaza H_0, pues t=4,5682 > 2,9199=t*, se acepta H_1, o sea que sí se puede afirmar que el método Ramos 2010 modificado es mejor que Folch et al. modificado I cuando se aplican a la microalga *Chaetoceros calcitrans*.

Para *Nannochloropsis sp.*:

En este caso se evaluarán los métodos Folch et al. 1957 y Folch et al. modificado I, al ser estos los que presentan un mayor rendimiento de aceite. Debido a que para Nanno el método Folch et al. modificado I muestra un promedio más alto, se plantearán las siguientes hipótesis:

H_0: $\mu_{Fm} - \mu_F = 0$
H_1: $\mu_{Fm} - \mu_F > 0$

Tabla 4.24. Datos Nanno subgrupo 1

Folch et al. modificado I	12,08	10,66	11,36
Folch 1957	9,09	9,13	9,45

Tabla 4.25. Prueba *t* Nanno subgrupo 1

Prueba *t* para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
Nanno	**Folch mod.**	**Folch 1957**
Media	11,3654447	9,22279057
Varianza	0,50223491	0,0390524
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	5,0442753	
P(T<=t) una cola	0,01856303	
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	
P(T<=t) dos colas	0,03712606	
Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	

Se rechaza H_0, pues t=5,0442 > 2,9199=t*, se acepta H_1, o sea que sí se puede afirmar que el método Folch et al. modificado I es mejor que Folch et al. 1957 cuando se aplican a la microalga *Nannochlorpsis sp*.

4.3.2.2. Prueba *t* subgrupo 2

Procediendo de la misma forma que en el apartado anterior se contrastarán las combinaciones de ambos métodos con la especie *Dunaliella tertiolecta*, la que, como es evidente, presenta el mayor rendimiento de aceite obtenido para todos los casos. Dado que para Dun el método Zhu presenta un rendimiento promedio más alto, se plantearán las siguientes hipótesis:

H_0: $\mu_Z - \mu_I = 0$
H_1: $\mu_Z - \mu_I > 0$

Se presentan a continuación los datos del problema (tabla 4.26) los cuales serán procesados en Excel, programa que nos da la tabla 4.27.

Tabla 4.26. Datos Dun subgrupo 2

Bligh & Dyer IMARPE	21,36	21,88	22,61
Zhu	24,69	25,33	26,30

Tabla 4.27. Prueba t Dun subgrupo 2

Prueba *t* para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
Dun	**Zhu**	**B&D IMARPE**
Media	25,4399112	21,9469886
Varianza	0,65484166	0,39358565
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	5,90854329	
P(T<=t) una cola	0,00205354	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,00410709	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

La región de rechazo está hacia la derecha del valor critico t*. Por lo tanto se rechaza H_0, pues t=5,9085 > 2,1318=t*, se acepta H_1, o sea que sí se puede afirmar que el método Zhu es mejor que Bligh & Dyer modificado por IMARPE cuando se aplican a la microalga *Dunaliella tertiolecta*.

Una vez identificados los mejores métodos de extracción en cada subgrupo, es necesario hacer un último análisis; pues, si bien la diferencia fundamental entre ambos grupos es la aplicación de ultrasonido como método de pretratamiento en el segundo, es posible comparar los mejores métodos de ambos grupos, tomando en cuenta no sólo el rendimiento de aceite obtenido; lo cual, si bien es importante, no es determinante para la elección del método más eficiente. En efecto, en los primeros

dos capítulos se explicó la relevancia de la ecuación económica de la producción de biodiesel -desde la producción de microalgas hasta el aprovechamiento de los residuos de la extracción y transesterificación- por lo que es de suma importancia tomar en cuenta para la selección del mejor método factores como el costo del proceso de extracción y calidad de materia remanente de la extracción, de modo que se pueda sacar el máximo provecho.

Ahora bien, tomando en cuenta lo anterior y volviendo a la evaluación de los métodos de extracción, se debe determinar si el rendimiento obtenido por el método Zhu frente al Folch et al. modificado I o Ramos 2010 modificado justifica la aplicación de un proceso de elevado costo como la sonicación. Revisando los datos mostrados en la Figura 4.4 se puede apreciar que no se presenta una diferencia fundamental entre el método Folch et al. modificado I y el método Zhu -cuya única diferencia entre procedimientos es la aplicación de ultrasonido- de modo especial para la *Dunaliella tertiolecta* (especie que presenta los mayores rendimientos para todos los métodos) para las otras dos especies la diferencia es sólo de dos puntos porcentuales. Así mismo se puede apreciar que para la *Chaetoceros calcitrans* el método que presenta un mayor rendimiento de aceite es Ramos 2010 modificado.

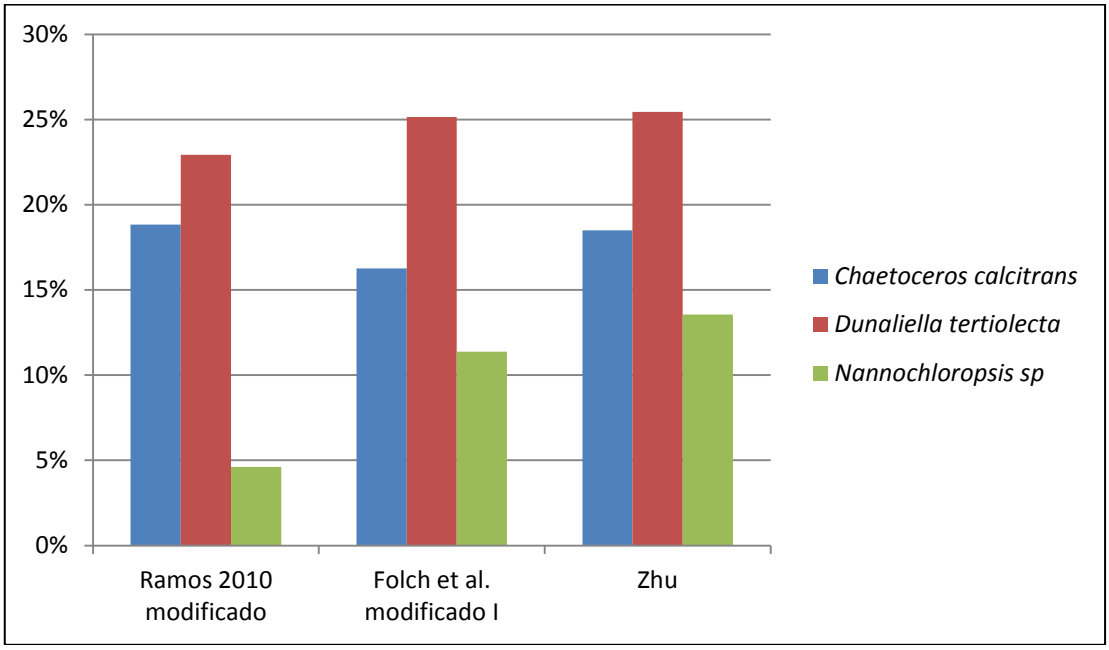

Figura 4.4. Gráfico de barras rendimientos métodos más eficientes

A la luz de lo expuesto se puede descartar el método Zhu como un método para la extracción de aceite de microalgas con miras a una producción a escala industrial. Sin embargo se puede considerar éste un excelente método para pruebas de rendimiento a nivel de laboratorio para fines de investigación, especialmente si lo que se desea es determinar el contenido de lípidos totales de una muestra, pues permite aumentar la cantidad de lípidos totales extraídos, si el objetivo es una gran eficiencia y la selectividad no es prioritaria.

Finalmente, se tiene dos métodos con bastante potencial para la extracción de aceite de microalgas a nivel industrial, Ramos 2010 modificado y Folch et al. modificado I. Como se puede observar en la Figura 4.4, y como se comprobó estadísticamente con las pruebas *t*; el método Folch et al. modificado I ofrece un ligero mayor rendimiento

con *Dunaliella tertiolecta* (menor que 3%), la diferencia es amplia en cuanto *Nannochloropsis sp*. (mayor que 6,5%), sin embargo respecto a la *Chaetoceros calcitrans* es el método Ramos 2010 modificado el que presenta un ligero mayor rendimiento (mayor que 2,5%). En este punto interviene otro factor determinante mencionado anteriormente: la calidad de la biomasa remanente después de la extracción y su potencial uso como fuente de proteínas. Tomando en cuenta este importante criterio para la rentabilidad global del proceso, se debe considerar la elevada toxicidad del cloroformo, solvente principal empleado en el método Folch et al. modificado I, además del metanol –hojas de seguridad se presentan en el Anexo H-, lo cual merma drásticamente la viabilidad de un adecuado aprovechamiento de la biomasa remanente, además de causar contaminación medioambiental, más aun si se trata de un proceso a gran escala.

Por otro lado, la solución empleada en Ramos 2010 modificado -hexano y propanol-, es una mezcla considerada segura a escala industrial, eficiente en la extracción de ácidos grasos y de baja toxicidad. El hexano es relativamente económico, fácil de recuperar después de la extracción y posee selectividad hacia los lípidos neutros, que son los que más interesan para la producción de biodiesel; así mismo el hexano es un solvente ampliamente usado en la extracción de grasas de tejidos animales y vegetales (terrestres y marinos), por lo que la investigación en cuanto el aprovechamiento de biomasa remanente de este solvente está considerablemente desarrollada, permitiendo escoger entre un no escaso abanico de posibilidades para el correcto aprovechamiento de la biomasa remanente. De esta forma el método Ramos 2010 modificado se presenta como la mejor opción para la extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel, de manera especial si se trata de un proyecto de nivel industrial.

Capítulo V

Consideraciones para un proyecto industrial

Como se expuso en el primer capítulo, el biodiesel es un combustible que consiste en un éster metílico o etílico, el cual puede ser obtenido de aceites vegetales o animales a través de un proceso denominado transesterificación. La reacción química es la siguiente:

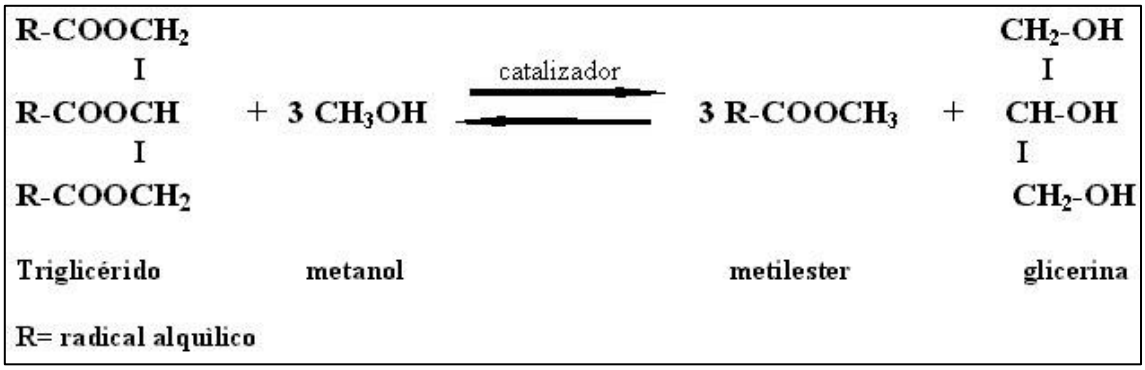

Fig. 5.1. Reacción de transesterificación

De esta forma un triglicérido es transformado en biodiesel, en presencia de una base como catalizador -usualmente hidróxido de potasio- (Chisti, 2007; Demirbas, 2007). Se utiliza exceso de metanol para favorecer la reacción hacia la derecha. Luego el exceso de metanol es recuperado por destilación y reutilizado.

Dadas las controversias suscitadas debido a la proveniencia de la materia prima utilizada para la producción de biodiesel, hay un mejor consenso sobre la producción del llamado biodiesel de tercera generación, el que tiene como principal y potencial insumo al aceite extraído de microalgas. Así mismo, se habla de una mayor ventaja comparativa en la utilización de microalgas para la producción de biocombustibles con respecto a otras plantas agrícolas -ver acápite 1.3-.

El valor energético del biodiesel es comparable a la del diesel de petróleo. Mientras que el poder calórico del diesel a base de petróleo es 42,7 MJ/kg, los valores para el biodiesel varían dependiendo de la fuente de biomasa involucrada. Normalmente, el biodiesel derivado de aceites vegetales, como colza o soya, tiene un poder calórico de 37 MJ/kg, mientras que el biodiesel derivado de algas alcanzaría los 41 MJ/kg (Rakopoulos et al., 2006; Xu et al., 2006).

Debido a la importancia de la producción de este recurso energético renovable para su utilización a gran escala, es que se hace necesario presentar simples pero importantes consideraciones y estimaciones para un proyecto a nivel industrial. Cabe recordar que el desarrollo de esta tesis se hizo en el marco del proyecto de innovación financiado por el FINCyT, Contrato 025-2008-PITEA "Desarrollo de tecnología para el diseño y construcción de un foto-biorreactor piloto para la producción de microalgas (FBR-MA) para biodiesel y otras aplicaciones", en el que participó la Universidad de Piura. En este proyecto se evaluó la adaptación y producción de distintas especies de microalgas a las condiciones ambientales en Piura -región que dadas sus características climáticas es favorable para la producción de microalgas-. El presente capítulo se basa principalmente en los resultados obtenidos en la planta piloto de producción de microalgas de la Universidad de Piura.

5.1. Rendimiento de aceite y biodiesel de un cultivo de microalgas

El proceso de producción de *Dunaliella tertiolecta*, desarrollado en el marco del proyecto, por el equipo de investigación de la Universidad de Piura; se basa en un sistema de cultivo *batch*, utilizando como medio de cultivo únicamente el medio Walne -descrito en el Anexo E- en agua potable con sal; este proceso presenta dos etapas bien diferenciadas: primero a nivel de laboratorio y posteriormente al aire libre, en la planta piloto para la producción a mayor escala. Así se tiene:

A nivel de laboratorio:

Todos los cultivos de microalgas fueron mantenidos en el cepario a una temperatura de 24 °C, se suministró aire sólo a los que pasaron a la etapa de producción (matraces de 2000 mL), para que con esta aireación se logre una mejor homogeneidad tanto de luz como de nutrientes y de dióxido de carbono.

Los cultivos iniciales se refieren a cepas axénicas (libres de bacterias) cultivadas y mantenidas en matraces de 500 mL, a partir de ellos se pasa a la etapa producción. Sin embargo, cada vez antes de pasar a producción, se deja una cantidad de cultivo denominada *stock* en otro matraz inicial.

Fig. 5.2. Cepas en matraces de 300 y 2000 mL

La etapa de producción, se hace a partir de matraces de 2000 mL inoculados de los matraces iniciales. Una vez alcanzada la densidad celular deseada, éstos fueron inoculados en botellones de 20 litros -dos matraces de 2000 mL por cada botellón de 20 L-, con agua purificada, tratada y nutrificada.

En planta piloto:

Para la etapa de producción a gran escala se inoculan los foto-biorreactores cilíndricos verticales (FBR CV) ubicados en la planta piloto de la Universidad de Piura -dos botellones de 20 L por cada FBR cilíndrico vertical de 500 L-.

Luego de siete días la biomasa en el medio de cultivo se centrifuga y la biomasa húmeda obtenida es pesada y posteriormente secada en estufas con ventilación forzada (60 °C por 48 horas). Luego del secado de la biomasa esta se pesa en una balanza digital de precisión.

Los rendimientos de biomasa cosechada en este tipo de FBR alcanzaron 0,05 g/L de biomasa seca, verificándose además que a densidades celulares más altas, se producía una disminución de la concentración de lípidos en la biomasa.

El protocolo para el cultivo y producción de *Dunaliella tertiolecta* se presenta descrito a detalle en el Anexo F del presente trabajo.

Fig. 5.3. Foto-biorreactores cilíndricos verticales de 500 L

Para un proceso de producción en foto-biorreactores cilíndricos verticales de 500 L situados en hileras separadas 3 m (3200 FBR CV por hectárea), y teniendo en cuenta la concentración de 0,05 g/L de biomasa cosechada en un período de cultivo de 7

días correspondientes a los ensayos realizados en la Universidad de Piura, se obtienen los siguientes rendimientos proyectados para un área de producción abierta de una hectárea (ha) en un año:

Medio de cultivo con biomasa algal: 83200 m^3/ha/año.
Biomasa algal húmeda: 14780 kg/ha/año.
Biomasa seca bruta: 4900 kg/ha/año.
Biomasa seca neta: 4600 kg/ha/año.
Aceite extraído: 1055 kg/ha/año.
Biodiesel: 1055 kg/ha/año.
Como se puede observar, anualmente se podría obtener 1055 kg de biodiesel por hectárea.

En el caso hipotético que una producción industrial se hiciese en *raceways* de 100 m^3 (28 *raceways* por hectárea) y considerando la misma productividad y período de cultivo de 7 días, se tendría 145600 $m^3.ha^{-1}.año^{-1}$ de cultivo, y 1850 $kg.ha^{-1}.año^{-1}$ de biodiesel.

Estos valores son mucho más bajos que las proyecciones de Chisti (2007), quien plantea, por hectárea y año, 47000 kg de biodiesel para foto-biorreactores y 34000 kg de biodiesel para *raceways*, con contenidos de lípidos de 30% sobre biomasa seca. La mayor diferencia se presenta en la concentración celular, que según Chisti alcanzaría 4 g/L en FBR y 0,14 g/L en *raceways*.

5.2. Proyección de costos para obtención industrial de aceite de microalgas

Uno de los aspectos de suma importancia para poder desarrollar el proceso a escala industrial es determinar los costos y la inversión inicial necesaria.

5.2.1. Costo de equipamiento e implementación

Los costos para la implementación de materiales y equipos requeridos para la producción piloto de *Dunaliella tertiolecta*, en el marco del proyecto FINCyT desarrollado, se presentan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Inversión realizada para implementar planta piloto de cultivo de microalgas

Descripción	Costo (S/.)
Maquinarias, equipos e instrumentos	
Instrumentos para monitoreo y control del cultivo de microalgas	40 747,22
Centrífuga para la cosecha de microalgas	44 244,20
Bombas, sopladores y filtros	16 346,50
Tuberías, válvulas y accesorios	5 131,70
Tanques de cultivo y de cosecha	10 038,20
Construcción de foto-biorreactores	15 000,00
Sub-total bienes:	**S/. 131 507,82**
Materiales e insumos	
Compra de cepas de microalgas	1 770,00
Materiales de laboratorio	6 310,93
Medios nutritivos y otros insumos para el cultivo microalgal	4 949,82
Sub-total materiales e insumos:	**S/. 13 030,75**

5.2.2. Costo de proceso de cultivo a nivel de laboratorio y a nivel industrial

El costeo de este proceso involucra las operaciones a nivel de laboratorio, para lo cual tenemos el costo de la preparación del medio de cultivo y sus sucesivos escalonamientos hasta llegar a los volúmenes a nivel de planta piloto los que se tomarán como referencia para estimar los costos de producción a nivel industrial.

Tabla 5.2. Nutrientes para medio de cultivo Walne (solución A)

Medio de cultivo	Compuesto	Cantidad	Costo unitario (S/.)	Costo total (S/.)
Solución stock de nutrientes para medio de cultivo Walne o F2	Hierro cloruro hexahidrato ($FeCl_3.6H_2O$)	1,30 g	0,557	0,72
	Cloruro de manganeso tetrahidratado ($MnCl_2{\cdot}4H_2O$)	0,36 g	1,030	0,37
	Acido bórico (H_3BO_3)	33,60 g	0,121	4,08
	$Na_2{\cdot}$EDTA	45 g	0,217	9,75
	Sodio dihidrógenofosfato dihidrato ($NaH_2PO_4{\cdot}2H_2O$)	20 g	0,153	3,05
	Nitrato de sodio ($NaNO_3$)	100 g	0,171	17,03
	Agua destilada	1 L	4,000	4,00
Costo total de 1000 mL de solución stock de nutrientes				**S/. 39,01**

Tabla 5.3. Solución de elementos traza para medio de cultivo (solución B)

Medio de cultivo	Compuesto	Cantidad	Costo unitario (S/.)	Costo total (S/.)
Solución stock de elementos traza 100 mL	Cloruro de zinc ($ZnCl_2$)	2,1 g	0,279	0,59
	Cobalto (II) cloruro hexahidrato ($CoCl_2{\cdot}6H_2O$)	2 g	6,859	13,72
	Amonio heptamolibdato tetrahidrato ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}{\cdot}4H_2O$)	0,9 g	0,403	0,37
	Sulfato de cobre pentahidrato ($CuSO_4{\cdot}5H_2O$)	2 g	0,118	0,24
	Agua destilada	100 mL	0,400	40,00
Costo total de 100 mL de solución stock de elementos traza				**S/. 54,90**

Tabla 5.4. Solución de vitaminas para medio de cultivo (solución C)

Medio de cultivo	Compuesto	Cantidad	Costo unitario (S/.)	Costo total (S/.)
Solución stock de vitaminas	Cianocobalamina (B12)	10 mg	0,630	6,30
	Tiamina HCl (B1)	200 mg	0,002	0,45
	Biotina (Vit. H)	10 mg	0,350	3,50
	Agua destilada	100 mL	0,400	40,00
Costo total de 100 mL de solución stock de vitaminas				**S/. 50,25**

Tabla 5.5. Costo del medio de cultivo para 300 mL

Volumen	Compuesto	Cantidad (mL)	Costo unitario (S/.)	Costo total (S/.)
Medio de cultivo para cepas puras 300 mL	Solución A + B	0,30	0,5900	0,18
	Solución C	0,04	0,5025	0,02
	Agua de mar	300	0,0006	0,17
Costo total para 300 mL				**S/. 0,37**

Tabla 5.6. Costo del medio de cultivo para 2000 mL

Volumen	Compuesto	Cantidad	Costo unitario (S/.)	Costo total (S/.)
Medio de cultivo para producción de 2 L	Solución A + B	2 mL	0,590	1,18
	Solución C	0,26 mL	0,503	0,13
	Agua de mar artificial	2 L	0,060	0,12
Costo total para 2000 mL				**S/. 1,43**

Tabla 5.7. Costo del medio de cultivo para 20 L

Volumen	Compuesto	Cantidad	Costo unitario (S/.)	Costo total (S/.)
Medio de cultivo para producción de 20 L	Medio Bayfolan	2 mL	0,018	0,03
	Solución de nutrientes	20 mL	0,039	0,78
	Elementos traza	20 mL	0,055	1,09
	Solución de vitaminas	20 mL	0,050	1,01
	Agua de mar artificial	20 L	0,060	1,20
Costo total para 20 L				**S/. 4,12**

Tabla 5.8. Costo del medio de cultivo para 500 L

Medio de cultivo	Compuesto	Cantidad	Costo unitario (S/.)	Costo total (S/.)
Medio de cultivo para FBR cilíndrico vertical: 2 inóculos de 20 L + 480 L agua de mar artificial	Medio Bayfolan	50 mL	0,017	0,86
	Agua de mar artificial	460 L	0,060	27,60
	Inóculos de 20 L	2 unid.	4,120	8,24
	Solución de nutrientes	500 mL	0,040	19,50
	Elementos traza	500 mL	0,050	27,45
	Solución de vitaminas	500 mL	0,050	25,12
Costo total FBR cilíndrico vertical 500 L				**S/. 108,78**

5.2.3. Costeo energético del proceso

Los costos (tablas 5.9, 5.10 y 5.11) se han calculado con una tarifa de S/. 0,3839 por kW-hora.

El costo total de la tabla 5.10 corresponde a una planta piloto de cultivo de microalgas (6 FBR CV). Para la determinación del costo global del proceso, se estimará que en una instalación industrial de gran escala (3200 FBR CV por hectárea), el costo diario de energía sería de 30 veces el de la planta piloto, es decir, S/. 643,20 por día.

Tabla 5.9. Costo diario de energía en kW-hora **laboratorio**

Equipos	Potencia kW	Horas uso	Costo total (S/.)
Balanza de precisión	0,02	0,5	0,01
Luminarias 24	0,96	24	8,85
Autoclave	1,50	2	1,15
Cámara luz UV	0,04	0,5	0,01
Aire acondicionado	5,30	24	48,83
Blower	0,19	24	1,72
Esterilizador	0,04	24	0,37
Total			**S/. 60,93**

Tabla 5.10. Costo diario de energía en kW-hora para seis **FBR cilíndricos verticales**

Equipos	Potencia kW	Horas uso	Costo total (S/.)
Esterilizador UV	0,04	24	0,37
Blower	0,19	24	1,72
Bomba	1,00	24	9,21
Centrífuga	1,10	24	10,14
Total			**S/. 21,44**

Tabla 5.11. Costo de energía en kW-hora **etapa de secado,** por cosecha de FBR CV

Equipos	Potencia kW	Horas uso	Costo total (S/.)
Estufa	2,00	100	76,78
Total			**S/. 76,78**

En una operación industrial, el secado de la biomasa se haría en un secador a gas, con un costo estimado de S/. 6,00 por kg de biomasa seca resultante.

5.2.4. Costo de extracción

Tabla 5.12. Costo de extracción de aceite por cosecha de FBR CV (según método Ramos 2010 modificado)

Biomasa seca	Compuesto	Cantidad (mL)	Costo (S/.)	Costo total (S/.)
26 g/FBR CV cosechado	Hexano	280,8	0,03	8,27
	Propanol	187,2	0,03	5,98
Total				**S/. 14,25**

Para el caso de una planta industrial, consideraremos que el 90% de los solventes se recupera, y por tanto el costo de esta etapa del proceso sería sólo de S/. 1,425 por cada cosecha de un FBR CV.

5.2.5. Costeo de mano de obra

El costo de mano de obra incluye a los profesionales que intervendrían una vez implementados los procesos de producción. Básicamente se requerirían 3 personas:

- Un jefe de proceso; biólogo profesional a cargo de supervisar el proceso de cultivo, evaluar calidad y resultados.
- Personal técnico, encargado de realizar todas las operaciones de cultivo en laboratorio y en planta.
- Operario de planta, encargado de apoyar en las operaciones y mantenimiento y limpieza de materiales, equipos y planta.

Tabla 5.13. Costo de mano de obra mensual

Costos de mano de obra	Costo total (S/.)
Jefe de procesos-biólogo	3 500,00
Técnico de laboratorio	2 000,00
Operario de planta	1 000,00
Costo total mano de obra operativa	**S/. 6 500,00**

Para el caso de una planta industrial de 1 hectárea, se considerará 1 jefe de procesos, 1 técnico de laboratorio y 5 operarios de planta.

5.3. Determinación de costo global y rendimiento del proceso

Tomando la información presentada se puede determinar el costo anual de producción y extracción de aceite por hectárea de *Dunaliella tertiolecta*.

Se debe recordar que el proceso de producción de Dun abarca 20 días (6 días en matraz de 2000 mL, 6 días en bidón de 20 L y 7 días en el FBR cilíndrico vertical de 500 L); considerando un día de limpieza y mantenimiento, el proceso toma 21 días. Sin embargo, en un sistema *batch*, y considerando que el área de laboratorio opera en paralelo, se obtendrían cosechas de biomasa semanalmente. Por otro lado en un una hectárea se trabajan adecuadamente alrededor de 3200 foto-biorreactores cilíndricos verticales -de acuerdo a la disposición descrita anteriormente-.

Tabla 5.14 Costo global del proceso de extracción de aceite de Dun por hectárea y año

Costos variables	Sección	Costo FBR CV (S/. FBR CV^{-1}· $semana^{-1}$)	Costo por hectárea (S/. ha^{-1}·$cosecha^{-1}$)	Costo por año (S/. ha^{-1} ·$año^{-1}$)
Costos de cultivo	Laboratorio (300 mL + 2 L)	3,22	10 318,71	536 573,02
	Planta	108,78	348 092,61	18 100 815,90
Costos energía eléctrica	Planta	25,01	4 502,40	234 124,80
Costos de secado		0,16	499,20	25 958,40
Costos de extracción de aceite		1,42	4 559,79	237 109,27
Costos fijos			**Costo por mes (S/.)**	**Costo por año (S/.)**
Costos de mano de obra			10 500,00	126 000,00
Costos de energía eléctrica	Laboratorio		1 827,79	21 933,53
Costo total		139,79	382 312,72	**S/. 19 282 514,92**

De este modo se tiene que el costo global de producción de *Dunaliella tertiolecta* por año y hectárea asciende a S/. 19 282 514,92, esto sin considerar la inversión inicial en equipos. A partir de este costo, y con el dato del rendimiento de aceite brindado anteriormente (1055 $kg \cdot ha^{-1} \cdot año^{-1}$), se puede determinar el costo por gramo de aceite obtenido, siendo éste de S/. 18,28.

Cabe resaltar que estos costos no son definitivos, sino proyectados y pueden reducirse en el futuro teniendo en cuenta las economías de escala y la curva de aprendizaje, así como factores como los sugeridos a continuación. Sin embargo, aun tomando en cuenta lo mencionado, el costo del aceite de microalgas dista de poder competir con otros aceites para la fabricación del biodiesel y más aún con el diesel de petróleo.

5.4. Consideraciones para la rentabilidad global del proyecto

Este acápite toma importancia debido a la relevancia de la ecuación económica de la producción de biodiesel. Esta abarca el proceso en su totalidad y es absolutamente necesario para poder competir con los combustibles fósiles, aminorar costos y generar ingresos con los sub y co-productos obtenidos (torta de la extracción y glicerina, respectivamente).

Según el proceso descrito anteriormente, y tomando en cuenta los insumos necesarios para la producción de microalgas se presentan las siguientes consideraciones:

- Algunos autores plantean el uso de aguas residuales como fuente de los nutrientes necesarios para el desarrollo de microalgas reduciendo la eutrofización en el medio ambiente. Se puede, incluso, llegar a generar un ingreso con esta metodología tomando en cuenta la responsabilidad que tienen actualmente las empresas con el cuidado del medio ambiente.

- Se puede obtener el dióxido de carbono necesario de una fuente de CO_2 de desecho, éste es gratuito e incluso produce ingresos si se enmarca en un plan de prevención de emisiones de gases de efecto invernadero, el único costo es el suministro de la fuente para el sistema de cultivo. Los gases de combustión pueden ser utilizados para el cultivo de algas, sin efectos nocivos (Brown 1996, Hauck et al. 1996 y al Doucha et al. 2005). Además, los NO_X disueltos pueden ser utilizados por las algas como fuente de nitrógeno. De este mismo recurso puede aprovecharse el calor necesario para algunas operaciones, como por ejemplo el secado.

- Es recomendable el aprovechamiento del agua de mar como medio de cultivo, pues es prácticamente gratuito, por lo que es importante ubicar la planta de producción en la costa, en una zona que permita el fácil acceso al agua marina.

- En la extracción con solventes se genera una biomasa remanente que puede ser aprovechada como fuente de proteína o como fertilizante; de éstas se debe escoger la que ofrezca un mayor rendimiento económico de acuerdo a la demanda del subproducto en el medio.

Sólo tomando en cuenta lo anterior y teniendo presente que es imperativa la optimización para cada aplicación específica, será posible desarrollar una metodología de producción rentable y capaz de competir con los combustibles fósiles a gran escala. Finalmente se debe destacar que aún es necesaria mayor investigación y desarrollo para lograr dicho objetivo.

CONCLUSIONES

De todos los ensayos de extracción de aceite realizados, si comparamos el método Soxhlet con poca intervención manual, con el resto de métodos en los que hay operaciones de separación de fases que implican una cierta destreza del analista, se concluye que la probabilidad de producirse error sistemático y/o aleatorio es relativamente alta para las pruebas a excepción del Soxhlet. Esto se evidencia en el hecho de que para todos los ensayos realizados se descartó un dato atípico, frente a la similitud de los resultados obtenidos para el método Soxhlet.

Para las tres especies de microalgas analizadas los contenidos de aceite promedio obtenidos estuvieron en el rango de 14-18% para *Chaetoceros calcitrans*, 20-25% para *Dunaliella tertiolecta* y 9-13% para *Nannochloropsis sp.* de la biomasa microalgal seca. Los valores obtenidos con el método Soxhlet son más bajos que el resto de métodos, y en general, todos los resultados son más bajos que los reportados en la literatura para estas u otras especies de microalgas.

En primera instancia se observó un bajo poder de extracción y selectividad de la solución propuesta por el IMARPE en su modificación del método Ramos 2010; se concluye que los bajos rendimientos obtenidos se deben a la inusual proporción de solventes utilizada (hexano:propanol 1:4), teniendo en cuenta que el hexano es el solvente que ofrece una alta selectividad hacia los lípidos. Esto llevó a descontinuar la evaluación de ese método en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos con el método Ramos 2010, son similares a los encontrados con la extracción Soxhlet. Lo interesante, y que realza la importancia de este método, es que la extracción se realiza en un tiempo mucho más corto (7 horas menos que el Soxhlet) produciendo un gran ahorro energético y en mano de obra. A esto se añade que el método Ramos 2010 permitiría la ejecución de la extracción a gran escala, que es lo que finalmente se busca.

Los rendimientos obtenidos para las microalgas *Chaetoceros calcitrans y Dunaliella tertiolecta*, por el método Ramos 2010 modificado, son casi el doble de los obtenidos con el método original, lo que resalta la importancia del tiempo de contacto de las muestras con la solución extractora (no menos de 24 horas) para dichas especies. Sin embargo, para el caso de *Nannochloropsis sp.*, no se observó diferencia alguna en el rendimiento alcanzado con ambos métodos, lo que refleja la baja influencia del tiempo de contacto de la solución extractora sobre esta especie de microalga.

Al aplicar las modificaciones por primera vez sobre el método Folch et al. (original), se obtuvieron resultados distintos y altamente imprecisos para cada prueba, lo cual se evidencia en el elevado coeficiente de variación (CV) obtenido en cada ensayo. Al repetir la experiencia teniendo especial cuidado en la extracción de la fase clorofórmica -de modo que no se arrastre muestra sólida- se obtuvieron resultados similares y por tanto más precisos. Esto refleja que la parte del procedimiento antes mencionada requiere de especial destreza por parte del analista para reducir la posibilidad de errores aleatorios durante la ejecución del método.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en los métodos Folch et al. modificado I y modificado II, cuya única diferencia en el procedimiento es el uso de papel filtro para la separación de la fase clorofórmica, se puede concluir que el uso de papel filtro produce rendimientos más bajos. Se descartó también la hipótesis de que un posible arrastre de sólidos durante la succión de la fase clorofórmica estaba produciendo un aparente aumento del rendimiento. No obstante, dicho procedimiento no deja de ser un paso en el que conviene actuar con atención y cuidado a fin de obtener resultados reales, exactos y precisos.

Al comparar los resultados obtenidos con los métodos Folch et al. 1957 y Folch et al. modificado II, cuyos procedimientos solo difieren en el tiempo de contacto de la solución con la muestra, se aprecia que, para esta solución extractora, el tiempo de contacto no influye en el rendimiento de aceite para ninguna de las tres especies de microalgas. Por lo que basta una hora para realizar una extracción total.

Los rendimientos obtenidos con el método Bligh & Dyer modificado por IMARPE, son cercanos a los del método Folch et al. 1957, para las tres especies de microalgas analizadas; sin embargo, tomando en cuenta los resultados del estudio realizado por Iverson, Lang y Cooper (2001) [17] -ver acápite 3.2.3.1-, se esperaba menores contenidos de aceite, por lo que los resultados obtenidos se pueden deber a la mayor proporción de solvente utilizado por muestra en relación al método original [6] o al método de pretratamiento aplicado. De esta forma se concluye que el rendimiento obtenido -mayor al esperado- está directamente relacionado a las modificaciones propuestas por el IMARPE.

La determinación de cloruros por el método de medición del índice de refracción no es recomendable para su aplicación en microalgas. Se comprobó que el valor obtenido es mayor al real, puesto que se está considerando la cantidad total de sólidos solubles, que no son sólo cloruros sino otras sales y pigmentos propios del alga.

La especie *Dunaliella tertiolecta* es la que mostró un marcado mayor rendimiento de aceite para todos los métodos evaluados, mientras que la *Nannochloropsis sp.* es la de menor rendimiento. Se realza la importancia de este dato al tomar en cuenta que esta especie, *Dunaliella tertiolecta*, fue producida y cosechada en la planta piloto de la Universidad de Piura, presentando una mejor adaptación a las condiciones de la zona.

Tomando en cuenta los distintos análisis de varianza aplicados, se puede concluir que no existe interacción entre los métodos de extracción que utilizan la misma mezcla de solventes y las distintas especies de microalgas. Sin embargo, se puede afirmar que la solución extractora empleada y el tipo de especie de microalga utilizada sí muestran interacción, lo cual afecta la eficiencia de la extracción; es decir, que es la solución extractora empleada, y no el método en sí, el que responde mejor al trabajar con

determinada especie de microalga. Así se tiene que la solución cloroformo metanol es más eficiente al aplicarse a *Dunaliella tertiolecta* o podría significar que esta especie posee una mayor cantidad de lípidos polares en relación a las otras algas pues esta solución extrae lípidos totales, mientras que hexano propanol tiene alta selectividad por lípidos neutros.

Para la elección del mejor método de extracción, se debe tomar en cuenta no sólo el rendimiento de aceite obtenido, que, si bien es importante, no es determinante. En efecto, lo principal es asegurar la rentabilidad del balance económico global de la producción de biodiesel -desde la producción de microalgas hasta el aprovechamiento de los residuos de la extracción y transesterificación- por lo que para la selección del mejor método es de suma importancia tomar en cuenta factores como el costo del proceso de extracción y la calidad de la biomasa remanente de la extracción, de modo que se pueda sacar el máximo provecho.

Debido a que la diferencia entre los rendimientos obtenidos con los métodos Zhu y Folch et al. modificado I no es significativa -siendo la única diferencia entre ambos procedimientos la aplicación de ultrasonido-, se puede descartar el método Zhu para la extracción de aceite de microalgas con miras a una escala industrial, ya que este margen no justifica la aplicación de un proceso altamente costoso como la sonicación. Sin embargo se puede considerar este un excelente método para pruebas de rendimiento a nivel de laboratorio para fines de investigación, especialmente si lo que se desea es determinar el contenido de lípidos totales de una muestra.

Siendo importante la calidad de la biomasa remanente después de la extracción para la rentabilidad global del proceso de producción de biodiesel, se descarta el método Folch et al. modificado I para su aplicación en la extracción de aceite de microalgas a nivel industrial, debido a la elevada toxicidad del cloroformo y del metanol, lo cual merma drásticamente la viabilidad de un aprovechamiento de la materia remanente, además del impacto ambiental que causaría, más aun si se trata de un proceso a gran escala.

La solución empleada en el método de Ramos 2010 modificado -hexano y propanol-, es una mezcla considerada segura a escala industrial, eficiente en la extracción de triglicéridos y de baja toxicidad. El hexano es relativamente económico, fácil de recuperar después de la extracción y posee selectividad hacia los lípidos neutros, que son los que más interesan para la producción de biodiesel; además el hexano es un solvente ampliamente usado en la extracción de grasas de tejidos animales y vegetales (terrestres y marinos), por lo que la investigación en cuanto el aprovechamiento de biomasa resultante de la extracción con este solvente está bien desarrollada, lo cual permite plantear un no escaso abanico de posibilidades para el adecuado aprovechamiento de dicha biomasa.

El método Ramos 2010 modificado se presenta como la mejor opción para la extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel a nivel industrial. Además de presentar uno de los mayores rendimientos de aceite entre los distintos métodos evaluados, es un proceso relativamente sencillo y reproducible -lo cual disminuye los costos-; así mismo provee una biomasa remanente aprovechable, que contribuye a la rentabilidad del proceso de producción.

El costo global proyectado de producción de aceite de *Dunaliella tertiolecta* por año y hectárea asciende a S/. 19 282 514,92, generando un costo por gramo de aceite de S/. 18,28 (1055 kg de biomasa·ha^{-1}·año^{-1}). Si bien estos costos no son definitivos y pueden reducirse

en el futuro, aún distan de poder competir con otros combustibles como el diesel de petróleo.

Referencias bibliográficas

[1] Álvarez Arellano, H. Cultivo de algas. Escuela superior politécnica de litoral. Ecuador. 1994.

[2] Angulo, C. Estadística. 2da edición. Universidad de Piura. Piura, Perú. 2007.

[3] Arief Widjaja, Chao-Chang Chien, Yi-Hsu Ju. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. **40**: 13–20. 2009.

[4] Barsanti, L., Gualtieri, P. Algae anatomy, biochemistry, and biotechnology. Taylor & Francis Group. 2006.

[5] Benemann, J. R. Hydrogen and methane production by microalgae. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Chapter **23**: 403-416. 2004.

[6] Bligh, E.G. and Dyer, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*. **37:** 911-917. 1959.

[7] Borowitzka, M. A. Culturing Microalgae in Outdoor Ponds. *Algal Culturing Techniques*. **14**: 205-218. 2005.

[8] Brennan, L., Owende, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **14**: 557-577. 2010.

[9] Byung-Hwan Um, Young-Soo Kim. Review: A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry.* **15**, 1–7. 2009.

[10] Chisti Yusuf. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. **25** 294–306. 2007.

[11] Eaton, A., Greenberg, A., Clesceri, L. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. American Public Health Association. Ed. Diaz de Santos. 1992.

[12] Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *Department of Biological Chemistry, Harvard Medical School.* 497-509. 1956.

[13] Goh, C. S., Lee, K.T. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **14**: 842-848. 2009.

[14] Gonzales, A., Kafarov, V., Guzman, A. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. *Prospectiva*. **Vol 7, Nº 2**, 53-60. Ed. Universidad Autónoma del Caribe. Colombia. 2009.

[15] Harris, Daniel C. Análisis químico cuantitativo. 2da edición correspondiente a la 5ta original norteamericana. Editorial Reverté S.A. Barcelona España. 2001

[16] Informes presentados por el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) en relación a un proyecto de investigación en el que participa Ecoenergías del Perú SAC, financiado por el FINCyT. 2010.
[17] Iverson, S., Lang, S., Cooper, M. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue (2001). *Lipids*. **Vol 36, Nº 11,** 1283-1287**.** 2001.
[18] Kadam KL. Microalgae production from power plant flue gas: environmental implications on a life cycle basis. *Technical report*. National Renewable Laboratory (U.S.). 2001.
[19] Lee, R. E. Phycology. Cambridge University Press. 2008.
[20] Mata, T., Martins, A., Caetano, N. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **14**, 217–232. 2010.
[21] Molina Grima E, Belarbi EH, Acién Fernández FG, Robles Medina A, Chisti Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*. **20** (7–8):491–515. 2003.
[22] Molina Grima, E., Acién Fernández, F.G. and Robles Medina, A. Downstream processing of cell-mass and products. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Chapter: **10**: 215-251. 2004.
[23] Norma Técnica Peruana NTP 400.042. Agregados: método de ensayo para la determinación cuantitativa de cloruros y sulfatos solubles en agua para agregados de hormigón. 2001.
[24] Preisig H. R, Andersen R. A. Historical review of algal culturing techniques. In: *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Science & Technology Books. 2005.
[25] Qin, J. Bio–Hydrocarbons from algae: impacts of temperature, light and salinity on algae growth. RIRDC Publications. Australia. 2005.
[26] Ramos Encarnación, C., Salazar Benítez, G., Méndez Santos, G., Currás Medina, S. Maximization of Scenedesmus dimorphus lipid yield for the production of biodiesel. Tesis para optar el título de Bachelor of Science. 2010. Universidad Politécnica de Puerto Rico. 2010.
[27] Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobiorreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. **102, No. 1**, 100-112. 2009.
[28] Sheng-Yi Chiu, Chien-Ya Kao, Ming-Ta Tsai, Seow-Chin Ong, Chiun-Hsun Chen, Chih-Sheng Lin. Lipid accumulation and CO_2 utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO_2 aeration. *Bioresource Technology*. **100**, 833–838. 2009.
[29] Sjors van Iersel, Gamba, L., Rossi, A., Alberici, S., Dehue, B., van de Staaij, J., Flammini, A. Algae-based biofuels: a review of challenges and opportunities for developing countries. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2009.
[30] Tomaselli L. The microalgal cell. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. **1**:3-19. 2004.
[31] Weast, Robert C. Handbook of Chemestry and Physics. 67th edition. CRC Press. Florida, USA. 1986-1987.
[32] Weldy, C. S., Huesemann, M. Lipid production by dunaliella salina in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. U.S. Department of Energy Journal of Undergraduate Research; 115-122. 2007.
[33] Becker, Wolfgang. Microalgae in human and animal nutrition. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. **19**: 312-351. 2004.

[34] Broere, W. Extrayendo energía de las algas. Shell World. Shell International B.V. 2008. www.shell.com/swonline

[35] *Chaetoceros calcitrans*. http://masterorg.wu.ac.th/file/ird-20090614-ZEd8X.pdf y https://lirias.kuleuven.be/bitstream/1979/226/1/Complete+thesis.pdf Revisadas el 19 de mayo 2011.

[36] Determinaciones comunes a los productos envasados: Gravedad específica, refractometría y fase estructural. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Departamento de Tecnología de Alimentos. Asignatura Análisis de Alimentos. Actualizado por Profª. Elevina Pérez. Revisada el 13 mayo 2011. http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/mmedina/archivos/Practica3.pdf

[37] *Dunaliella tertiolecta*. http://www.mfe.govt.nz/publications/water/whole-effluent-toxicity-nov98/whole-effluent-toxicity-appendix-1-nov98.pdf y http://en.wikipedia.org/wiki/Dunaliella revisadas el 19 de mayo 2011.

[38] Extracción húmeda. http://www.originoil.com/technology/single-step-extraction.html revisada el 3 de mayo 2011.

[39] Refractometría. http://campus.usal.es/~Inorganica/zona-alumnos/erf-tecnespec/Refractometria.pdf revisado el 13 de mayo 2011.

[40] Instituto del Mar del Perú IMARPE. Protocolo para determinación de lípidos. Ed. 01. 2011. Lima Perú.

[41] http://miprimerbiodiesel.blogspot.com/2009/12/como-cultivar-algas-para-producir.html

[42] http://www.ambientum.com/enciclopedia_medioambiental/aguas/Determinacion_de_sulfatos.asp

[43] http://www.quimica.unam.mx/cont_espe2.php?id_rubrique=54&id_article=1341&color=e6ad04&rub2=564

Bibliografía recomendada

(No consultada directamente sino citada en las referencias)

- Anderson, Jordan & Sorek, Benjamin. Microalgae: the fuel of tomorrow. University of Pittsburg. 2008.
- Aresta, M., Dibenedetto, A. and Barberio, G. Utilization of macro-algae for enhanced CO_2 fixation and biofuels production: Development of a computing software for an LCA study. Fuel Process. Technol. **86** (14-15): 1679-1693. 2005.
- Augenstein, D.C., Benemann, J.R. & Hughes, E. Electricity from biogas. Proceedings 2nd Inter-American Biomass Conference, Reno, Nevada. 1994.
- Benemann, J. R. and Oswald, W. J. Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO_2 to biomass. Final report: Size: 214 p. 1996.
- Bozbas K. Biodiesel as an alternative motor fuel: production and policies in the European Union. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 12: 542–52. 2008.
- Braun, A. and Reith, J. Algen in de Nederlandse energiehuishouding, in opdracht van het programma, Energiewinning uit Afval en Biomassa (EWAB) van Novem. Utrecht, Braun Consultants. 1993.
- Canakci M., J.H. Van Gerpen, Trans. ASAE 42 (5) 1203. 1999.
- Carlsson, A., Beilen van, J., Möller, R., Clayton, D. and Bowles, D. Micro and macroalgae - utility for industrial applications. In: Bowles, D (ed). Outputs from the EPOBIO project. CNAP. University of York. 2007.
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A. and Malcata, F. X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. Biotechnol. Prog. 22(6): 1490-1506. 2006.
- Chini Zittelli, G., Lavista, F., Bastianini, A., Rodolfi, L., Vincenzini, M. and Tredici, M. R. Production of eicosapentaenoic acid by Nannochloropsis sp. cultures in outdoor tubular photobiorreactors. *J. Biotechnol*. 70(1-3): 299-312. 1999.
- Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25(3): 294–306. 2007.
- Chisti, Y. & Moo-Young, M. Fermentation technology, bioprocessing, scale-up and manufacture. In: Biotechnology: the science and the business (eds M. Moses & R.E. Cape), 167–209. 1991. Harwood Academic Publishers, New York.
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25(3): 294-306. 2007.
- Chisti, Y. Response to Reijnders: Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants? Trends Biotechnol. 26(7): 351-352. 2008.
- Chiu S-Y, Kao C-Y, Tsai M-T, Ong S-C, Chen C-H, Lin C-S. Lipid accumulation and CO_2 utilization of Nanochloropsis oculata in response to CO_2 aeration. *Bioresource Technology*. 100(2):833–8. 2009.

- Coyle W., A Global Perspective: The Future of Biofuels, Economic Research Service. 2007. US Dept. of Agriculture, Washington, DC. <http://www.ers.usda.gov/AmberWaves/November07/PDF/Biofuels.pdf>.
- Cravotto G, Boffa L, Mantegna S, Perego P, Avogadro M, Cintas P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*. 15(5):898–902. 2008.
- De Pauw N, Morales J, Persoone G. Mass culture of microalgae in aquaculture systems: progress and constraints. *Hydrobiologia*. 116/117: 121–34. 1984.
- Deng, M. D. and Coleman, J. R. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65(2): 523-528. 1999.
- Deshmane VG, Gogate PR, Pandit AB. Ultrasound-assisted synthesis of biodiesel from palm fatty acid distillate. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. **47**: 723-7927. 2009.
- Desmorieux, H. and Decaen, N. Convective drying of spirulina in thin layer. Journal of Food Engineering. 66 (4), pp. 497–503. 2006.
- Fogg, G. E., and Thake, B., Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. 1987. University of Wisconsin Press, Madison.
- Gao, K. S., Wu, Y. P., Li, G., Wu, H. Y., Villafane, V. E. and Helbling, E. W. Solar UV radiation drives CO2 fixation in marine phytoplankton: A doubleedged sword. *Plant Physiol*. 144(1): 54-59. 2007.
- Gogate PR. Cavitational reactors for process intensification of chemical processing applications: a critical review. *Chemical Engineering and Processing*. 47:515–27. 2008.
- Graboski M., R. McCormick, Final Report: Emissions from Biodiesel Blends and Neat Biodiesel from a 1991 Model Series 60 Engine Operating at High Altitude, Colorado Institute for High Altitude Fuels and Engine Research, Subcontractor's Report to National Renewable Energy Laboratory. Golden, CO. 1994.
- Gudin, C. & Chaumont, D. Cell fragility: the key problem of microalgae mass production in closed photobiorreactors. *Bioresour. Technol*., 38, 145–51. 1991.
- Gudin, C. & Therpenier, C. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Adv. Biotechnol. Proc*. **6**, 73–110. 1986.
- Hamelinck, C. N., van Hooijdonk, G. and Faaij, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. Biomass Bioenerg. 28(4): 384-410. 2005.
- Harper, S.R. & Pholand, F.G. Recent developments in hydrogen managment during anaerobic biological wastewater Treatment. *Biotechnol. Bioeng*., 28, 585–602. 1986.
- Heasman, M., Diemar, J., O'Connor, W., Sushames, T., Foulkes, L. & Nell, J.A. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs – a summary. Special issue: Live feeds and microparticulate diets. *Aquaculture Res*., 31, 8–9, 637–59; 59 ref. 2000.
- Hee-Mock, O., Lee, S.J., Park, M.H., Kim, H.S., Kim, H.C., Yoon, J.H., Kwon, G.S. & Yoon, B.D. Harvesting of Chlorella vulgaris using a bioflocculant from Paenibacillus sp. AM49, *Biotechnol. Lett*., 23, 1229–34. 2001.
- Herrero M., Cifuentes A., Ibáñez E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: a review *Food Chemistry*, 98, 1, 136-148. 2006.
- Kalva A, Sivasankar T, Moholkar VS. Physical mechanism of ultrasound assisted synthesis of biodiesel. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 48(1):534–44. 2008.

- Keasling, J.D., Benemann, J.R., Pramanik, J., Carrier, T.A., Jones, K.L. & VanDien, S.J. A toolkit for metabolic engineering of bacteria: applications to hydrogen production. In: *Biohydrogen* (ed. O. Zaborsky), pp. 87–98. Plenum Press, New York.
- King, J.W. (2000). Advances in critical fluid technology for food procesing. *Food Science and Technology Today* 14, 186-191. 1998.
- Knuckey RM, Brown MR, Robert R, Frampton DMF. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*. 35(3):300–13. 2006.
- Leach, G., Oliveira, G. and Morais, R. Spray-drying of Dunaliella salina to produce a β-carotene rich powder. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 20 (2), pp. 82–85. 1998.
- Lee K.W., J.X. Yu, J.H. Mei, L. Yan, Y.W. Kim, K.W. Chung, J. Ind. Eng. Chem. 13 (5) 799. 2007.
- Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. Renewable Energy. 34(1):1–5. 2009.
- Minowa, T. and Sawayama, S. A novel microalgal system for energy production with nitrogen cycling. Fuel 78: 1213. 1999.
- Moheimani, N. R. and Borowitzka, M. A. Limits to productivity of the alga Pleurochrysis carterae (Haptophyta) grown in outdoor raceway ponds. *Biotechnol. Bioeng*. 96(1): 27-36. 2007.
- Mohn, F.H. Improved technologies for the harvesting and processing of microalgae and their impact on production costs, *Archiv fur Hydrobiologie, Beihefte Ergebnisse der Limnologie*, 1, 228–53. 1978.
- Mohn, F.H. Experiences and strategies in the recovery of biomass from mass cultures of microalgae. Algae Biomass (eds G. Shelef & C.J. Soeder), 547–71. 1980.
- Molina Grima, E., Medina, A., Giménez, A., Sánchez Pérez, J., Camacho, F. And García Sánchez, J. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 71 (9), pp. 955–959. 1994.
- Nindo, C.I., Powers, J.R., Tang, J. Influence of Refractance Window evaporation on quality of juices from small fruits. *Swiss Society of Food Science and Technology*. LWT 40 1000–1007. 2007.
- Negoro, M., Hamasaki, A., Ikuta, Y., Makita, T., Hirayama, K. and Suzuki, S. Carbon-Dioxide Fixation by Microalgae Photosynthesis Using Actual Flue-Gas Discharged from a Boiler. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 39: 643-653. 1993.
- Negoro, M., Shioji, N., Miyamoto, K. and Miura, Y. Growth of Microalgae in High CO_2 Gas and Effects of SO_X and NO_X. Appl. *Biochem. Biotechnol*. 28-9: 877-886. 1991.
- Olguín, E. J., Galicia, S., Mercado, G. and Pérez, T. Annual productivity of Spirulina (Arthrospira) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*. 15(2): 249. 2003.
- Parsons, T.R., Stephens, K. & Strickland, J.D.H. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd Can*. 18, 1001–16. 1961.
- Prakash, J., Pushparaj, B., Carlozzi, P., Torzillo, G., Montaini E. and Materassi, R. Microalgae drying by a simple solar device. International Journal of Solar Energy. 18 (4), pp. 303–311. 1997.
- Pulz, O. Photobiorreactors: production systems for phototrophic microorganisms. Appl. *Microbiol. Biotechnol*. 57(3): 287-293. 2001.
- Richmond A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd. 2004.

- Rossignol, N., Vandanjon, L., Jaouen, P. & Quemeneur, F. Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration. *Aquacultural Eng.*, 20(3), 191–208. 1999.
- Sazdanoff, N. Modeling and Simulation of the Algae to Biodiesel Fuel Cycle, College of Engineering, Department of Mechanical Engineering, The Ohio State University. 2006.
- Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. NREL/TP-580-24190, National Renewable Energy Laboratory, USA. 1998.
- Warabi Y, Kusdiana D, Saka S. Reactivity of triglycerides and fatty acids of rapeseed oil in supercritical alcohols. *Bioresource Technology*. 91(3): 283–7. 2004.
- Ward O. P., Singh A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. Process Biochemistry, 40, Issue 12, Pages 3627-3652. 2005.
- Wu W.H., T.A. Foglia, W.N. Marmer, J.G. Phillips, JAOCS 76 (4) 517. 1999
- Wu W-T, Hsieh C-H. Cultivation of microalgae for optimal oil production. *Journal of Biotechnology*. 136 (Suppl. 1): S521–1521. 2008.

ANEXOS

Anexo A

Clasificación de microalgas descrita por Lee (1989)

Grupo 1 algas procarióticas.
Cyanophyta (cianobacterias): clorofila *a*, ficobiliproteínas.

Grupo 2 algas eucariotas con cloroplastos rodeados sólo por las dos membranas de la envoltura del cloroplasto.
Glaucophyta: las algas que representan una posición intermedia entre la evolución de los cloroplastos; fotosíntesis se lleva a cabo por las cianobacterias endosimbióticas modificadas.
Rhodophyta (algas rojas): clorofila *a*, ficobiliproteínas; no hay células flageladas, producto de almacenamiento es un almidón florideano.
Chlorophyta (algas verdes): clorofilas *a* y *b*; de almacenamiento del producto, el almidón, se encuentra en el interior del cloroplasto.

Grupo 3 algas eucariotas con cloroplastos rodeados por una membrana del retículo endoplasmático cloroplasto.
Euglenophyta (OID euglen): clorofilas *a* y *b*; un flagelo con una fila de una espiral de pelos fibrilar; película proteica en tiras debajo de la membrana de plasma, producto de almacenamiento es el paramylon; tipo característico de la división celular.
Dinophyta (dinoflagelados): núcleo *mesokaryotic*; clorofilas *c1*; célula comúnmente dividida en un epicono e hipocono por una faja; flagelo helicoidal transversal; placas de teca en las vesículas en la membrana plasmática.
Apicompexa: flagelados heterotróficos con plastídios incoloros.

Grupo 4 algas eucariotas con cloroplastos rodeados por dos membranas de retículo endoplásmico cloroplasto.
Cryptophyta (criptofitas): nucleomorfo presente entre la membrana interna y externa del retículo endoplasmático cloroplasto, almidón formado como granos entre la membrana interna del retículo endoplasmático cloroplasto y la envoltura del cloroplasto, clorofila *a* y *c*; ficobiliproteínas; periplasto dentro de la membrana plasmática.
Heterokontophyta: malla anterior y flagelo cervical posterior; clorofila *a* y *c*; fucoxantina, el producto de almacenamiento usual es *chrysolaminarin* presente en las vesículas.
Chrysophyceae(algas de color oro-marrón)

Synurophyceae
Eustigmatophyceae
Pinguiophyceae
Dictyochophyceae (silicoflagelados)
Pelagophyceae
Bolidophyceae
Bacillariophyceae (diatomeas)
Raphidophyceae (chloromonads)
Xanthophyceae (algas verde-amarillo)
Phaeothamniophyceae
Phaeophyceae (algas pardas)
Prymnesiophyta (algas calcáreas): dos flagelos cervicales; haptonema presente, clorofila *a* y *c*; fucoxantina; escalas de células fuera de lo común; producto de almacenamiento *chrysolaminarin* presente en las vesículas.

Anexo B

Métodos de determinación de cloruros

a. Método de Möhr

Este método es aplicable para la determinación de iones cloruro y bromuro de metales alcalinos, magnesio y amonio, en aguas potables o superficiales, siempre que no tengan excesivo color o turbidez; es recomendable para agua con concentraciones entre 1,5 y 100 mg/L de cloruros. En el caso de aguas cuya concentración de cloruros sea inferior a 30 ppm no es recomendable utilizar este método.

La determinación de cloruros por este método se basa en una valoración con solución patrón de nitrato de plata ($AgNO_3$) utilizando como indicador cromato de potasio (CrO_4^{-2}).

Sobre una muestra ligeramente alcalina -debe tener un pH entre 7 y 10; ya que, si pH < 7 se disolvería el Ag_2CrO_4 y dificultaría la detección del punto final de la valoración y si pH > 7 precipitaría el AgOH, de color pardo, y se cometería error- se añade disolución de $AgNO_3$valorante, y disolución indicadora K_2CrO_4. La solución debe tener un pH neutro o cercano a la neutralidad, un pH de 8,3 es adecuado para la determinación. El indicador es el ion cromato CrO_4^{-2}, que comunica a la solución en el punto inicial una coloración amarilla. Los Cl^- precipitan con el ion Ag^+ formando un compuesto muy insoluble, cloruro de plata, de color blanco. Cuando todo el producto ha precipitado, se forma el cromato de plata Ag_2CrO_4, de color rojo ladrillo, que es menos insoluble que el anterior y nos señala el fin de la valoración.

Las reacciones que ocurren en la determinación de iones cloruro son:

Reacción de valoración:

$$NaCl + AgNO_3 \rightarrow AgCl\downarrow \text{ (Precipitado blanco)} + NaNO_3$$

Reacción indicadora (exceso de $AgNO_3$):

$$K_2CrO_4 + 2\ AgNO_3 \rightarrow Ag_2CrO_4\downarrow \text{ (Precipitado rojo ladrillo)} + 2KNO_3$$

Interferencias: La materia orgánica debe eliminarse. Los Br^- , I^- , y CN^- se registran como concentraciones equivalentes de Cl^-. Los iones sulfuro, tiosulfuro y sulfito interfieren pero se eliminan con agua oxigenada, al 30%. Los fosfatos interfieren por encima de 25 ppm por precipitar como Ag^3PO^4. El Fe_2^- interfiere por encima de 10 ppm al reaccionar con K_2CrO_4 y enmascarar el punto final.

b. Método de Volhard

Este método de titulación se usa para la determinación de aniones que precipitan con plata como Cl^-, Br^-, I^-, en disolución acida, además de plata y compuestos de plata, SCN^- y $AsO4^{-4}$.

La determinación de cloruros por este método se basa en una valoración de sales de plata con tiocianatos, usando una sal de Fe^{+3} como indicador.

La adición de la disolución de tiocianato, de concentración conocida, produce en primer lugar la precipitación de AgSCN, y cuando ha precipitado toda la plata, el primer exceso de tiocianato produce una coloración rojiza debido a la formación de tiocianato de hierro. Para el caso de determinación de un anión, se acidula con HNO_3, se agrega un exceso de solución tipo de $AgNO_3$ para precipitar el anión y se valora por retroceso el exceso de Ag^+, con solución patrón de tiocianato de potasio.

Las reacciones que ocurren en la determinación de iones cloruro son:

Precipitación:	$Ag^+ + Cl^- \rightarrow AgCl\ (s) \downarrow$
Valoración:	$Ag^+ + SCN^- \rightarrow AgSCN$
Punto final:	$Fe^{+3} + SCN^- \rightarrow FeSCN^{+2}$(complejo rojo)

Al aplicar este procedimiento puede aparecer un error bastante grande debido a que el AgSCN es menos soluble que el AgCl, y por tanto puede producirse la reacción:

$$AgCl + SCN^- \rightarrow AgSCN + Cl^-$$

Para evitar que tenga lugar esta reacción se separa por filtración el precipitado de AgCl y se valora con el SCN^- el líquido filtrado-reunido con las aguas de lavado del precipitado. Se adiciona unos mililitros de nitrobenceno que provocan la coagulación.

Este método puede usarse para la determinación de bromuros y yoduros sin que esté presente el error antes expuesto, debido a que el AgBr y el AgI tienen solubilidades similares a la del AgSCN.

c. <u>Determinación de cloruros por método del nitrato de mercurio</u>

Este método muy adecuado para la determinación de cloruros en aguas industriales relativamente puras como agua de caldera, agua de alimentación de caldera y condensado.

En este método los cloruros pueden ser titulados con nitrato de mercurio debido a la formación de cloruro de mercurio soluble y ligeramente disociado. En el intervalo de pH de 2,3–2,8 la difenilcarbazona indica el punto final de la titulación por la formación de un complejo purpura con exceso de iones mercúricos. El xilenocianol FF sirve de indicador del pH y potenciador del punto final. Aumentando la concentración del titulante y modificando las mezclas indicadoras, se amplía la gama de concentraciones mensurables de cloruro. Éste método tiene la ventaja que el punto final de la reacción es fácilmente apreciable.

Interferencia: el bromuro y yoduro se valoran con $Hg\ (NO_3)_2$ del mismo modo que el cloruro. Los iones cromato, férrico y sulfito interfieren cuando se encuentran presentes en cantidades superiores a 10 mg/L.

Anexo C

Propiedades de concentración de soluciones acuosas: Tablas de conversión

71 SODIUM CHLORIDE, NaCl

MOLECULAR WEIGHT = 58.44
RELATIVE SPECIFIC REFRACTIVITY = 0.794

0.00 % by wt. data are the same for all compounds.
For Values of 0.00 wt. % solutions see Table 1, Acetic Acid.

A % by	ρ D_4^{20}	D_{20}^{20}	C_v g/l	M g-mol/l	C_w g/l	$(C_w - C_v)$ g/l	$(n - n_w) \times 10^4$	n	Δ °C	O Os/kg	S g-mol/l	η/η_w	η/ρ cS	ϕ rhe	γ mmho/cm	T g-mol/l
0.10	0.9989	1.0007	1.0	0.017	997.9	0.3	2	1.3332	0.062	0.033	0.017	1.002	1.005	99.61	1.7	0.017
0.20	0.9997	1.0014	2.0	0.034	997.7	0.6	4	1.3333	0.121	0.065	0.034	1.004	1.006	99.43	3.3	0.034
0.30	1.0004	1.0021	3.0	0.051	997.4	0.9	5	1.3335	0.181	0.097	0.051	1.006	1.007	99.24	5.0	0.051
0.40	1.0011	1.0028	4.0	0.069	997.1	1.2	7	1.3337	0.240	0.129	0.069	1.007	1.008	99.06	6.6	0.069
0.50	1.0018	1.0036	5.0	0.086	996.8	1.5	9	1.3339	0.299	0.161	0.086	1.009	1.009	98.89	8.2	0.086
0.60	1.0025	1.0043	6.0	0.103	996.5	1.8	11	1.3340	0.358	0.192	0.103	1.011	1.011	98.71	9.8	0.103
0.70	1.0032	1.0050	7.0	0.120	996.2	2.1	12	1.3342	0.417	0.224	0.120	1.013	1.012	98.54	11.4	0.120
0.80	1.0039	1.0057	8.0	0.137	995.9	2.4	14	1.3344	0.475	0.256	0.137	1.015	1.013	98.37	12.9	0.137
0.90	1.0046	1.0064	9.0	0.155	995.6	2.7	16	1.3346	0.534	0.287	0.155	1.016	1.014	98.20	14.4	0.155
1.00	1.0053	1.0071	10.1	0.172	995.3	3.0	18	1.3347	0.593	0.319	0.172	1.018	1.015	98.04	16.0	0.172
1.10	1.0060	1.0078	11.1	0.189	995.0	3.3	19	1.3349	0.652	0.351	0.189	1.020	1.016	97.87	17.5	0.189
1.20	1.0068	1.0085	12.1	0.207	994.7	3.6	21	1.3351	0.711	0.382	0.207	1.021	1.017	97.72	18.9	0.207
1.30	1.0075	1.0093	13.1	0.224	994.4	3.9	23	1.3353	0.770	0.414	0.224	1.023	1.017	97.56	20.4	0.224
1.40	1.0082	1.0100	14.1	0.241	994.1	4.2	25	1.3354	0.829	0.446	0.241	1.025	1.018	97.41	21.8	0.241
1.50	1.0089	1.0107	15.1	0.259	993.8	4.5	26	1.3356	0.888	0.478	0.259	1.026	1.019	97.26	23.2	0.259
1.60	1.0096	1.0114	16.2	0.276	993.5	4.8	28	1.3358	0.948	0.509	0.276	1.028	1.020	97.11	24.6	0.276
1.70	1.0103	1.0121	17.2	0.294	993.1	5.1	30	1.3360	1.007	0.541	0.294	1.029	1.021	96.96	26.0	0.294
1.80	1.0110	1.0128	18.2	0.311	992.8	5.4	32	1.3362	1.067	0.573	0.311	1.031	1.022	96.82	27.4	0.311
1.90	1.0117	1.0135	19.2	0.329	992.5	5.7	33	1.3363	1.126	0.605	0.329	1.032	1.022	96.67	28.8	0.329
2.00	1.0125	1.0143	20.2	0.346	992.2	6.0	35	1.3365	1.186	0.638	0.346	1.034	1.023	96.52	30.2	0.346
2.10	1.0132	1.0150	21.3	0.364	991.9	6.3	37	1.3367	1.246	0.670	0.364	1.036	1.024	96.37	31.6	0.364
2.20	1.0139	1.0157	22.3	0.382	991.6	6.6	39	1.3369	1.306	0.702	0.382	1.037	1.025	96.22	33.0	0.382
2.30	1.0146	1.0164	23.3	0.399	991.3	7.0	40	1.3370	1.366	0.734	0.399	1.039	1.026	96.07	34.3	0.399
2.40	1.0153	1.0171	24.4	0.418	991.0	7.3	42	1.3372	1.426	0.767	0.418	1.040	1.027	95.93	35.7	0.418
2.50	1.0160	1.0178	25.4	0.435	990.6	7.6	44	1.3374	1.486	0.799	0.435	1.042	1.028	95.78	37.1	0.435
2.60	1.0168	1.0185	26.4	0.452	990.3	7.9	46	1.3376	1.547	0.832	0.452	1.044	1.028	95.64	38.5	0.452
2.70	1.0175	1.0193	27.5	0.470	990.0	8.2	47	1.3377	1.607	0.864	0.470	1.045	1.029	95.49	39.9	0.470
2.80	1.0182	1.0200	28.5	0.488	989.7	8.6	49	1.3379	1.668	0.897	0.488	1.047	1.030	95.35	41.2	0.488
2.90	1.0189	1.0207	29.5	0.505	989.4	8.9	51	1.3381	1.729	0.930	0.505	1.048	1.031	95.21	42.6	0.505
3.00	1.0196	1.0214	30.6	0.523	989.0	9.2	53	1.3383	1.790	0.962	0.523	1.050	1.032	95.06	44.0	0.523
3.10	1.0203	1.0221	31.6	0.541	988.7	9.5	54	1.3384	1.851	0.995	0.541	1.051	1.033	94.92	45.3	0.541
3.20	1.0211	1.0229	32.7	0.559	988.4	9.9	56	1.3386	1.913	1.028	0.559	1.053	1.033	94.78	46.7	0.559
3.30	1.0218	1.0236	33.7	0.577	988.0	10.2	58	1.3388	1.974	1.061	0.577	1.055	1.034	94.64	48.0	0.577
3.40	1.0225	1.0243	34.8	0.595	987.7	10.5	60	1.3390	2.036	1.094	0.595	1.056	1.035	94.50	49.4	0.595
3.50	1.0232	1.0250	35.8	0.613	987.4	10.8	61	1.3391	2.098	1.128	0.613	1.058	1.036	94.35	50.7	0.613
3.60	1.0239	1.0257	36.9	0.631	987.1	11.2	63	1.3393	2.160	1.161	0.631	1.059	1.037	94.21	52.0	0.631
3.70	1.0246	1.0265	37.9	0.649	986.7	11.5	65	1.3395	2.222	1.194	0.649	1.061	1.037	94.07	53.3	0.649
3.80	1.0254	1.0272	39.0	0.667	986.4	11.8	67	1.3397	2.284	1.228	0.667	1.063	1.038	93.93	54.7	0.667
3.90	1.0261	1.0279	40.0	0.685	986.1	12.2	68	1.3398	2.347	1.262	0.685	1.064	1.039	93.78	56.0	0.685
4.00	1.0268	1.0286	41.1	0.703	985.7	12.5	70	1.3400	2.409	1.295	0.703	1.066	1.040	93.64	57.3	0.703
4.10	1.0275	1.0293	42.1	0.721	985.4	12.8	72	1.3402	2.472	1.329	0.721	1.067	1.041	93.49	58.6	0.721
4.20	1.0282	1.0301	43.2	0.739	985.1	13.2	74	1.3404	2.535	1.363	0.739	1.069	1.042	93.35	59.9	0.739
4.30	1.0290	1.0308	44.2	0.757	984.7	13.5	75	1.3405	2.598	1.397	0.757	1.071	1.043	93.20	61.2	0.757
4.40	1.0297	1.0315	45.3	0.775	984.4	13.9	77	1.3407	2.662	1.431	0.775	1.072	1.044	93.06	62.5	0.775
4.50	1.0304	1.0322	46.4	0.794	984.0	14.2	79	1.3409	2.725	1.465	0.794	1.074	1.045	92.91	63.8	0.794
4.60	1.0311	1.0330	47.4	0.812	983.7	14.5	81	1.3411	2.789	1.500	0.812	1.076	1.046	92.76	65.1	0.812
4.70	1.0318	1.0337	48.5	0.830	983.4	14.9	82	1.3412	2.853	1.534	0.830	1.078	1.046	92.61	66.3	0.830
4.80	1.0326	1.0344	49.6	0.848	983.0	15.2	84	1.3414	2.917	1.569	0.848	1.079	1.047	92.46	67.6	0.848
4.90	1.0333	1.0351	50.6	0.866	982.7	15.6	86	1.3416	2.982	1.603	0.866	1.081	1.048	92.31	68.9	0.866
5.00	1.0340	1.0358	51.7	0.885	982.3	15.9	88	1.3418	3.046	1.638	0.885	1.083	1.049	92.15	70.1	0.885
5.20	1.0355	1.0373	53.8	0.921	981.6	16.6	91	1.3421	3.176	1.708	0.921	1.087	1.052	91.84	72.6	0.921
5.40	1.0369	1.0387	56.0	0.958	980.9	17.3	95	1.3425	3.307	1.778	0.958	1.090	1.054	91.53	75.1	0.958
5.60	1.0384	1.0402	58.1	0.995	980.2	18.0	98	1.3428	3.438	1.848	0.995	1.094	1.056	91.22	77.5	0.995
5.80	1.0398	1.0417	60.3	1.032	979.5	18.7	102	1.3432	3.570	1.919	1.032	1.098	1.058	90.90	80.0	1.032
6.00	1.0413	1.0431	62.5	1.069	978.8	19.4	105	1.3435	3.703	1.991	1.069	1.102	1.060	90.59	82.4	1.069
6.20	1.0427	1.0446	64.6	1.106	978.1	20.2	109	1.3439	3.837	2.063	1.106	1.106	1.062	90.27	84.7	1.106
6.40	1.0442	1.0460	66.8	1.144	977.4	20.9	112	1.3442	3.972	2.135	1.144	1.109	1.065	89.95	87.1	1.144
6.60	1.0456	1.0475	69.0	1.181	976.6	21.6	116	1.3446	4.107	2.208	1.181	1.113	1.067	89.63	89.4	1.181
6.80	1.0471	1.0490	71.2	1.218	975.9	22.3	119	1.3449	4.244	2.282	1.218	1.117	1.069	89.31	91.8	1.218
7.00	1.0486	1.0504	73.4	1.256	975.2	23.1	123	1.3453	4.378	2.354	1.256	1.122	1.072	88.99	94.1	1.256
7.20	1.0500	1.0519	75.6	1.294	974.4	23.8	126	1.3456	4.516	2.428	1.294	1.126	1.074	88.66	96.4	1.294
7.40	1.0515	1.0533	77.8	1.331	973.7	24.6	130	1.3460	4.655	2.503	1.331	1.130	1.077	88.33	98.7	1.331
7.60	1.0530	1.0548	80.0	1.369	972.9	25.3	133	1.3463	4.795	2.578	1.369	1.134	1.079	88.00	101.	1.369
7.80	1.0544	1.0563	82.2	1.407	972.2	26.1	137	1.3467	4.937	2.654	1.407	1.138	1.082	87.67	103.	1.407
8.00	1.0559	1.0578	84.5	1.445	971.4	26.8	140	1.3470	5.079	2.731	1.445	1.143	1.084	87.33	105.	1.445
8.20	1.0574	1.0592	86.7	1.484	970.7	27.6	144	1.3474	5.222	2.808	1.484	1.147	1.087	86.99	107.	1.484
8.40	1.0588	1.0607	88.9	1.522	969.9	28.3	147	1.3477	5.367	2.885	1.522	1.152	1.090	86.65	109.	1.522
8.60	1.0603	1.0622	91.2	1.560	969.1	29.1	151	1.3481	5.512	2.964	1.560	1.156	1.093	86.30	112.	1.560
8.80	1.0618	1.0637	93.4	1.599	968.3	29.9	154	1.3484	5.659	3.043	1.599	1.161	1.096	85.95	114.	1.599
9.00	1.0633	1.0651	95.7	1.637	967.6	30.7	158	1.3488	5.807	3.122	1.637	1.166	1.099	85.60	116.	1.637
9.20	1.0647	1.0666	98.0	1.676	966.8	31.4	161	1.3491	5.956	3.202	1.676	1.171	1.102	85.25	118.	1.676
9.40	1.0662	1.0681	100.2	1.715	966.0	32.2	165	1.3495	6.106	3.283	1.715	1.176	1.105	84.89	120.	1.715
9.60	1.0677	1.0696	102.5	1.754	965.2	33.0	168	1.3498	6.258	3.364	1.754	1.181	1.108	84.53	122.	1.754
9.80	1.0692	1.0711	104.8	1.793	964.4	33.8	172	1.3502	6.410	3.446	1.793	1.186	1.111	84.16	124.	1.793
10.00	1.0707	1.0726	107.1	1.832	963.6	34.6	175	1.3505	6.564	3.529	1.832	1.191	1.115	83.80	126.	1.832
10.50	1.0744	1.0763	112.8	1.930	961.6	36.6	184	1.3514	6.954	3.739	1.930	1.204	1.123	82.86	131.	1.930
11.00	1.0781	1.0801	118.6	2.029	959.5	38.7	193	1.3523	7.353	3.953	2.029	1.218	1.132	81.90	136.	2.029
11.50	1.0819	1.0838	124.4	2.129	957.5	40.8	202	1.3532	7.760	4.172	2.129	1.233	1.142	80.94	140.	2.129
12.00	1.0857	1.0876	130.3	2.229	955.4	42.9	211	1.3541	8.176	4.396	2.229	1.248	1.152	79.95	145.	2.229
12.50	1.0894	1.0914	136.2	2.330	953.3	45.0	220	1.3549	8.602	4.625	2.330	1.264	1.162	78.96	149.	2.330
13.00	1.0932	1.0952	142.1	2.432	951.1	47.1	228	1.3558	9.038	4.859	2.432	1.280	1.173	77.97	154.	2.432
13.50	1.0970	1.0990	148.1	2.534	948.9	49.3	237	1.3567	9.484	5.099	2.534	1.297	1.184	76.97	158.	2.534
14.00	1.1008	1.1028	154.1	2.637	946.7	51.5	246	1.3576	9.940	5.344	2.637	1.314	1.196	75.97	163.	2.637
14.50	1.1047	1.1066	160.2	2.741	944.5	53.7	255	1.3585	10.408	5.596	2.741	1.331	1.207	74.97	167.	2.741
15.00	1.1085	1.1105	166.3	2.845	942.2	56.0	264	1.3594	10.888	5.854	2.845	1.349	1.219	73.98	171.	2.845
16.00	1.1162	1.1182	178.6	3.056	937.6	60.6	282	1.3612	11.885	6.390	3.056	1.385	1.243	72.07	179.	3.056
17.00	1.1240	1.1260	191.1	3.270	932.9	65.3	300	1.3630	12.935	6.954	3.270	1.421	1.267	70.21	186.	3.270
18.00	1.1319	1.1339	203.7	3.486	928.1	70.1	318	1.3648	14.044	7.550	3.486	1.460	1.293	68.34	193.	3.486
19.00	1.1398	1.1418	216.6	3.706	923.2	75.0	336	1.3666	15.216	8.181	3.706	1.504	1.322	66.36	199.	3.705
20.00	1.1478	1.1498	229.6	3.928	918.2	80.0	354	1.3684	16.458	8.849	3.928	1.554	1.357	64.22	204.	3.928
21.00	1.1558	1.1579	242.7	4.153	913.1	85.1	372	1.3702	17.776	9.557	4.153	1.611	1.396	61.95	209.	4.153
22.00	1.1640	1.1660	256.1	4.382	907.9	90.4	391	1.3721	19.176	10.310	4.382	1.673	1.441	59.64	213.	4.382
23.00	1.1721	1.1742	269.6	4.613	902.6	95.7	409	1.3739	20.667	11.111	4.613	1.742	1.489	57.29	217.	4.613
24.00	1.1804	1.1825	283.3	4.848	897.1	101.1	428	1.3757			4.848	1.817	1.542	54.93	220.	4.848
25.00	1.1887	1.1909	297.2	5.085	891.6	106.7	446	1.3776			5.085	1.898	1.600	52.58	222.	5.085
26.00	1.1972	1.1993	311.3	5.326	885.9	112.3	465	1.3795			5.326	1.986	1.662	50.26	225.	5.326

Anexo D

Tablas resumen de datos de problema para análisis de varianza ANOVA (capítulo IV)

Tabla D.1. Resumen datos análisis global de los métodos que presentaron mejor resultado

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo						
RESUMEN	**Ramos 2010 modificado**	**Folch et al. 1957**	**Folch et al. modificado I**	**Bligh & Dyer IMARPE**	**Zhu**	**Total**
Ccal						
Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	56,4940068	41,6780822	48,7853168	44,0496575	55,5029966	246,51006
Promedio	18,8313356	13,8926941	16,2617723	14,6832192	18,5009989	16,434004
Varianza	0,94625223	0,14664625	0,00291833	0,04169037	0,37617119	4,4104185
Dun						
Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	68,755204	67,7019151	75,4308909	65,8409659	76,3197336	354,048709
Promedio	22,9184013	22,567305	25,1436303	21,9469886	25,4399112	23,6032473
Varianza	2,05256721	0,03210503	0,30658192	0,39358565	0,65484166	2,64098962
Nanno						
Cuenta	3	3	3	3	3	15
Suma	13,8405797	27,6683717	34,0963342	29,0068201	40,6564365	145,268542
Promedio	4,61352657	9,22279057	11,3654447	9,66894004	13,5521455	9,68456948
Varianza	0,04259546	0,0390524	0,50223491	0,34355576	0,00211827	9,49974656
Total						
Cuenta	9	9	9	9	9	
Suma	139,089791	137,048369	158,312542	138,897444	172,479167	
Promedio	15,4544212	15,2275966	17,5902824	15,4330493	19,1643518	
Varianza	70,0001838	34,4460684	36,7904117	28,7766853	27,0031112	

Tabla D.2. Resumen datos análisis subgrupo 1

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo				
RESUMEN	**Ramos 2010 modificado**	**Folch et al. 1957**	**Folch et al. modificado I**	**Total**
Ccal				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	56,4940068	41,6780822	48,7853168	146,957406
Promedio	18,8313356	13,8926941	16,2617723	16,3286006
Varianza	0,94625223	0,14664625	0,00291833	4,84962517
Dun				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	68,755204	67,7019151	75,4308909	211,88801
Promedio	22,9184013	22,567305	25,1436303	23,5431122
Varianza	2,05256721	0,03210503	0,30658192	2,06185911
Nanno				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	13,8405797	27,6683717	34,0963342	75,6052856
Promedio	4,61352657	9,22279057	11,3654447	8,40058729
Varianza	0,04259546	0,0390524	0,50223491	9,07405573
Total				
Cuenta	9	9	9	
Suma	139,089791	137,048369	158,312542	
Promedio	15,4544212	15,2275966	17,5902824	
Varianza	70,0001838	34,4460684	36,7904117	

Tabla D.3. Resumen datos análisis subgrupo 2

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo			
RESUMEN	**Bligh & Dyer IMARPE**	**Zhu**	**Total**
Ccal			
Cuenta	3	3	6
Suma	44,0496575	55,5029966	99,5526541
Promedio	14,6832192	18,5009989	16,592109
Varianza	0,04169037	0,37617119	4,53977713
Dun			
Cuenta	3	3	6
Suma	65,8409659	76,3197336	142,160699
Promedio	21,9469886	25,4399112	23,6934499
Varianza	0,39358565	0,65484166	4,07952334
Nanno			
Cuenta	3	3	6
Suma	29,0068201	40,6564365	69,6632566
Promedio	9,66894004	13,5521455	11,6105428
Varianza	0,34355576	0,00211827	4,66205499
Total			
Cuenta	9	9	
Suma	138,897444	172,479167	
Promedio	15,4330493	19,1643518	
Varianza	28,7766853	27,0031112	

Anexo E

Medio de cultivo para producción de *Dunaliella tertiolecta*

Medio Walne (1966)

Solución básica de nutrientes:(*)

$FeCl_3.6H_2O$	1,3 g	Hierro (III) cloruro hexahidrato
$MnCl_2.4H_2O$	0,36 g	Cloruro de magnesio tetrahidratado
H_3BO_3	33,6 g	Acido bórico
$Na_2.EDTA$	45 g	EDTA disódico
$NaH_2PO_4.2H_2O$	20 g	Sodio dihidrógenofosfato dihidrato
$NaNO_3$	100 g	Nitrato de sodio

Solución metales traza 1 mL.
Agua destilada 1 L.
*Agitar en cada aplicación.
Agregar 1 mL de ésta solución por cada litro de agua salada a enriquecer.

Solución de metales traza:

$ZnCl_2$	2,1 g	Cloruro de zinc
$CoCl_2.6H_2O$	2 g	Cloruro de cobalto hexahidrato
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0,9 g	Amonio heptamolibdato tetrahidrato
$CuSO_4.5H_2O$	2 g	Sulfato de cobre pentahidrato

Agua destilada 100 mL
Es necesario acidificar ésta solución con HCl para obtener un líquido claro.

Solución de vitaminas:

Cianocobalamina (B12)	10 mg
Tiamina. HCl (B1)	200 mg
Biotina (vit. H)	10 mg
Agua destilada	100 mL

Esta solución debe ser acidificada a pH 4.5 antes de autoclavarse. Agregar 0,1 mL por cada litro de agua salada.

Anexo F

Protocolo para cultivar *Dunaliella tertiolecta*

1. Salinidad a 17 psu (practical salinity units, aproximadamente equivalentes a partes por mil) = 1,7%
2. Medio nutritivo: Medio "f/2" Guillard (1968).

Solución básica de nutrientes:

(1) $NaNO_3$	7,5 g/100 mL agua destilada
(2) $NaH_2PO_4.H_2O$	0,5 g/100 mL agua destilada
(3) $Na_2SiO_3.9H_2O$*	3,0 g/100 mL agua destilada

*Los silicatos se emplean cuando se va a cultivar diatomeas.

Solución de metales traza:

(4) $CuSO_4.5H_2O$	0,19 g/50 mL agua destilada
(5) $ZnSO_4.7H_2O$	1.10 g/50 mL agua destilada
(6) $CoCl_2.6H_2O$	0.50 g/50 mL agua destilada
(7) $MnCl_2.4H_2O$	9.00 g/50 mL agua destilada
(8) $Na_2MoO_4.2H_2O$	0,31 g/50 mL agua destilada
(9) Na_2EDTA	4,36 g
(9) $FeCl_3.6H_2O$	3,15 g
(9) Agua destilada	hasta 800 mL.

Dilución: 1mL de (4), (5), (6), (7) y (8) en la disolución (9) y completar hasta 1 litro de agua destilada.

Disolución de vitaminas:

(10) Biotina (Vit. H)	1,09 mg/10,5 mL agua destilada
(11) Cianocobalamina (B12)	1,18 mg/10,5 mL agua destilada

Dilución: 1 mL (10) ,1 mL (11), 20,00 mg tiamina (B1) hasta 100 mL de agua destilada.

Medio de cultivo: 1 mL de (1), 1 mL de (2), 1 mL de (3), 1 mL de la dilución traza de metales y 0,5 mL de la disolución de vitaminas en 1 litro de agua de mar filtrada y esterilizada.

3. Matraz de 2 litros:
   - Preparar agua a 17 psu (artificial)
   - Pasar agua por filtros mecánicos de 10, 5, 1 y 0,45 micras.
   - Luego se agregan los nutrientes, en cantidades normales correspondientes.
   - Esterilizado: todo es autoclavado, a 15 libras de presión, 121°C por 15 minutos.
   - Luego se deja enfriar hasta el día siguiente.
   - Del resultante de la transferencia de cepas, pasa a la etapa de producción a 17 psu, siete días.
   - A 24 °C ± 1 de temperatura promedio, para prepararla para su adaptación al área piloto.
   - Con luz artificial las 24 horas, para acelerar su desarrollo celular (tres tubos fluorescentes de 40 Watts por cultivo).

- Con aireación permanente para homogeneizar la repartición de los micronutrientes y para inyectarles CO_2.

4. Botellón de 20 litros:
   - Preparar agua a 17 psu (artificial)
   - Pasar agua por filtros mecánicos de 10, 5, 1 y 0,45 micras.
   - Esterilizado: pasar por filtro UV.
   - Esterilizado: se coloca 0,5 mL de hipoclorito de sodio al 5% por litro de agua, por 24 horas
   - Al día siguiente se neutraliza el hipoclorito de sodio con tiosulfato de sodio al 5%, se deja con fuerte aireación por media hora, para luego recibir el inóculo (cepa).
   - Todos los procedimientos de traspasos de inóculos se realizan en una cámara de transferencias, que se compone de un espacio cerrado, un mechero, y luz UV. Para crear un ambiente estéril, libre de bacterias patógenas.
   - Siete días de cultivo.

5. Siembra en FBR.
   - Preparar agua a 17 psu (artificial)
   - Pasar agua por filtros mecánicos de 10, 5, 1 y 0,45 micras.
   - Esterilizado: pasar por filtro UV.
   - Esterilizado: se coloca 0,5 mL de hipoclorito de sodio al 5% por litro de agua, por 24 horas
   - Al día siguiente se neutraliza el hipoclorito de sodio con tiosulfato de sodio al 5%, se deja con fuerte aireación por media hora, para luego recibir el inóculo (cepa).
   - Inóculo: dos botellones de 20 litros, para 500 litros de agua preparada con medio de cultivo.
   - Después de todos los procesos por los que pasa el agua, se le denomina, agua tratada.

6. Cosechar con la temperatura de cultivo más baja, por medio de una centrifuga. Velocidad del flujo de cosecha: 80 litros por hora.

7. Se cosecha al día seis, para que no aumente su densidad celular (producto de esto se logra un incremento en el porcentaje de lípidos). Claro está que en esto hay que buscar un equilibrio.

8. Adaptada a temperaturas que van desde los 19,5 °C a 35 °C, variaciones que por lo demás tienen incidencia en la obtención de lípidos.

Anexo G

Imágenes desarrollo experimental de la tesis

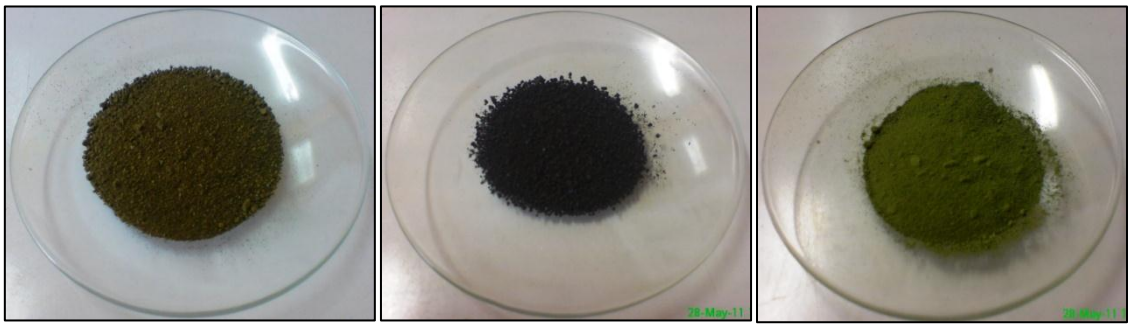

Fig.G.1. Biomasa de microalga seca pulverizadas (*Dunaliella tertiolecta, Chaetoceros calcitrans y Nannochloropsis sp.*)

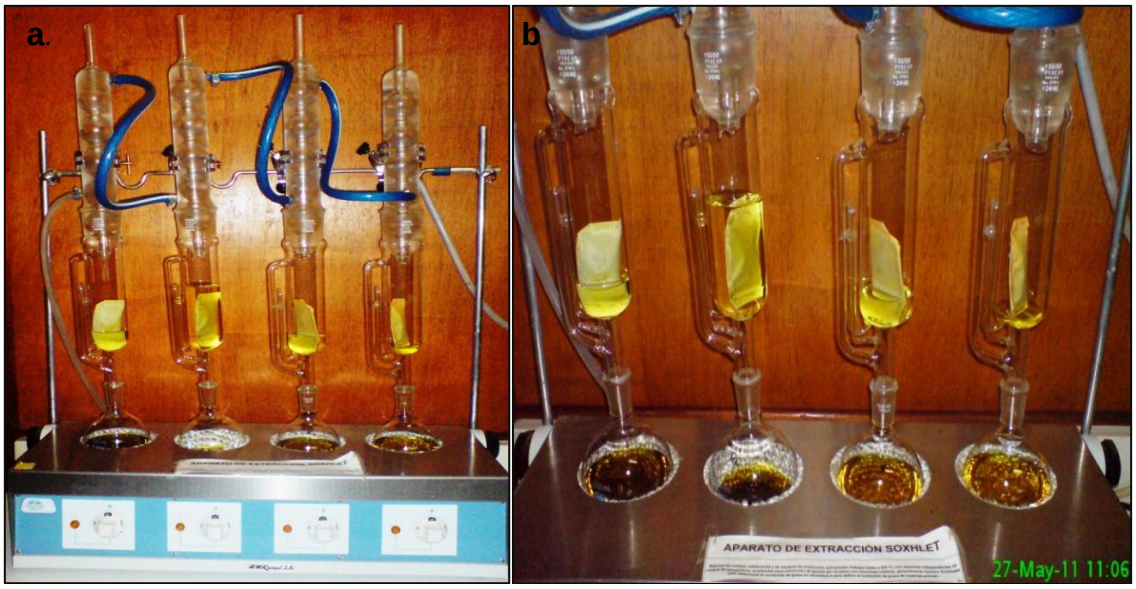

Fig. G.2 a y b. Aparato de extracción Soxhlet

Fig. G.3. Extractos obtenidos por el método Ramos 2010

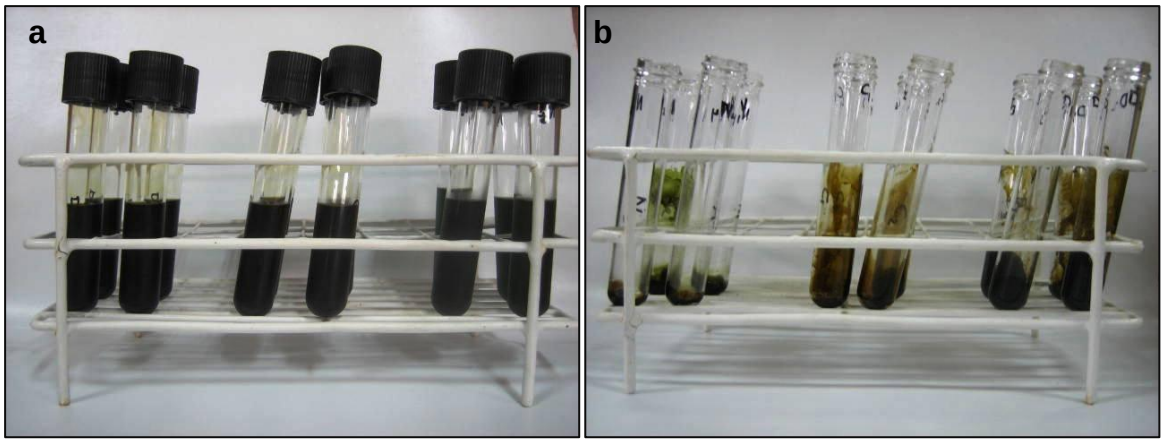

Fig. G.4. a. Extractos obtenidos por el método Ramos 2010 modificado
b. Lípidos obtenidos por el método Ramos 2010 modificado

Fig. G.5 a. Extractos obtenidos por el método Folch et al. modificado I con solución salina
b. Extractos obtenidos por el método Folch et al. modificado I tras centrifugación
c. Lavado fase clorofórmica en el método Folch et al. modificado I
d. Lípidos obtenidos por el método Folch et al. modificado I

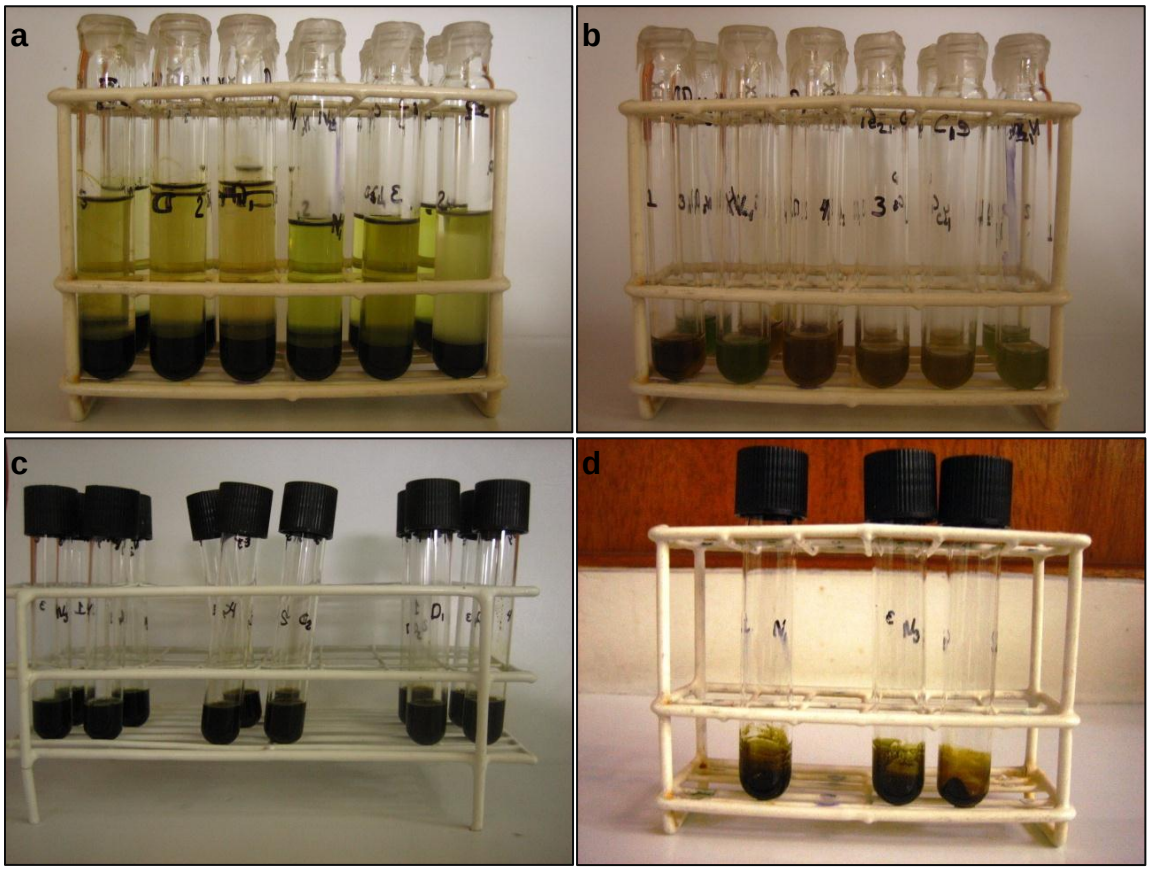

Fig. G.6. a. Extractos obtenidos por método Bligh & Dyer mod. Por Imarpe con sol. salina
b. Lavado fase clorofórmica en el método Bligh & Dyer modificado por Imarpe
c. Fase clorofórmica obtenida en el método Bligh & Dyer modificado por Imarpe
d. Lípidos obtenidos por el método Bligh & Dyer modificado por Imarpe

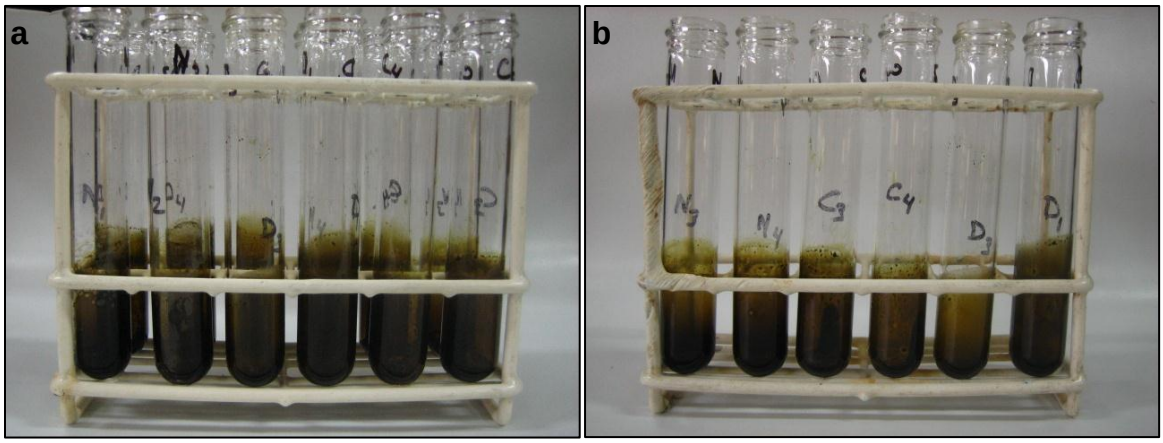

Fig. G.7 a. y b. Lípidos obtenidos por el método Zhu

Anexo H

Hojas de seguridad

Hoja de seguridad
Cloroformo

Fórmula: $CHCl_3$
Peso molecular: 119,39 g /mol
Composición: C: 10,05%; H: 0,84% y Cl: 89,10%.

Generalidades:
El cloroformo es un líquido incoloro con olor dulce característico, muy volátil.
Generalmente contiene pequeños porcentajes (1-5%) de etanol como estabilizador. Es ligeramente soluble en agua y con densidad mayor que ésta. Es no inflamable, pero productos de su oxidación, como el fosgeno, son muy peligrosos. Es peligroso por inhalación e ingestión. Se obtiene por medio de una cloración cuidadosamente controlada de metano, por tratamiento de acetona con polvos blanqueadores ($CaOCl_2$) y ácido sulfúrico. Fue descubierto en 1847 y se utilizó como anestésico por inhalación, como insecticida y en la industria farmacéutica, sin embargo su toxicidad ha provocado que sea reemplazado por otras sustancias. Actualmente, es utilizado como intermediario en síntesis orgánica, especialmente en la obtención de fluorocarbono 22, el cual es utilizado como refrigerante, propelente y en la fabricación de tetrafluoroetileno y su polímero (PTFE).

Números de identificación:
CAS: 67-66-3
UN: 1888
NIOSH: FS 9100000
RCRA: U044
EHS
NOAA: 2893
STCC: 4940311

RTECS: FS9100000
NFPA: Salud: 2 Reactividad: 0 Fuego: 0
HAZCHEM CODE: 2 Z
El producto está incluido en: CERCLA, 313 y

MARCAJE: líquido venenoso.

Sinónimos:
Cloroformo
Tricloruro de formilo
Triclorometano
Tricloruro de metilo
Tricloruro de metenilo
Tricloroformo
NCI-C02686
R 20 (refrigerante)
FREON 20
TCM

Otros idiomas:
chloroform (inglés)
chloroforme (francés)
cloroformio (italiano)
triclorometano (italiano)
trichloormethaan (holandés)
trichlormethan (checoslovaco)

Propiedades físicas y termodinámicas:
Punto de fusión: -63,5 °C
Punto de ebullición: 61,26 °C (760 mm de Hg)
Densidad: 1,498 g/mL (a 15 °C); 1,484 (a 20 °C)
Densidad de vapor (aire =1): 4,12
Índice de refracción (20 °C): 1,4476

Temperatura de autoignición: mayor de 1000 °C
Viscosidad (cP): 0,855 (a -13 °C), 0,70 (a 0 °C), 0,563 (a 20 °C) y 0,51 (a 30 °C).
Tensión superficial respecto al aire (din/cm): 27,14 (a 20°C) y 21,73 (a 60 °C); respecto al agua: 45,0 (a 20 °C).
Capacidad calorífica (kJ/kg K): 0,979 (a 20 °C)
Temperatura crítica: 263,4 °C.
Presión crítica: 53,79 atm.
Volumen crítico: 0,002 m^3/kg
Conductividad térmica (W/m K): 0,13 (a 20 °C)
Constante dieléctrica: 4,9 (a 20 °C) Momento dipolar (debye): 1,15
Calor de combustión (MJ/kg mol): 373
Calor de formación (MJ/kg mol) a 25 °C: -89,66 (gas) y -120,9 (líquido)
Calor latente de evaporación en el p. de ebullición (kJ/kg): 247
Solubilidad: miscible con etanol, benceno, éter dietílico, éter de petróleo, tetracloruro de carbono, disulfuro de carbono y acetona.
Solubilidad en agua (g/kg de agua): 10,62 (a °C), 8,22 (a 20 °C) y 7,76 (a 30 °C).
Solubilidad de agua en cloroformo (g/kg de cloroformo): 0,806 (a 22 °C).
Presión de vapor (mm de Hg): 0,825 (a -60 °C), 2,03 (a -50 °C), 4,73 (a -40 °C), 9,98 (a -30 °C), 19,58 (a -20 °C), 34,73 (a -10 °C), 60,98 (a 0 °C), 100,5 (a 10 °C), 159,6 (a 20 °C), 246,0 (a 30 °C), 366,38 (a 40 °C) y 525,98 (a 50 °C).
Forma azeótropo con agua de punto de ebullición 56,1 °C y contiene 97,2 % de cloroformo.

Propiedades químicas:
Los productos de descomposición del cloroformo son: fosgeno, cloruro de hidrógeno, cloro y óxidos de carbono y cloro. Todos ellos corrosivos y muy tóxicos.

El cloroformo reacciona violentamente con:

- Acetona en medios muy básicos.
- Flúor, tetróxido de dinitrógeno, metales como aluminio, magnesio, sodio, litio y potasio, sodio en metanol, metóxido de sodio, nitrometano, isopropilfosfina y derivados alquilados de aluminio.

Es oxidado por reactivos como ácido crómico, formando fosgeno y cloro. Se descompone a temperatura ambiente por acción de la luz del sol en ausencia de aire y en la oscuridad en presencia de este último, siendo uno de los productos de esta descomposición el fosgeno, el cual es muy tóxico.

Niveles de toxicidad:
Carcinógeno humano potencial.
RQ: 10
TPQ: 10000
IDLH: 1000 ppm
LD50 (en ratas): 1 g/kg
LDLo (oral en humanos): 140 mg/kg
LCLo(inhalado en humanos): 25000 ppm/5 min
LC50 (inhalado en ratas): 47,7 mg/m^3/4 h
Niveles de irritación a piel de conejos: 10 mg/24 h, suave; 500 mg/ 24 h, suave.
Niveles de irritación a ojos de conejos: 148 mg; 20 mg/24 h, moderada.

México:
CPT: 50 mg/m^3 (5 ppm)
CCT: 225 mg/m^3 (50 ppm)
Cancerígeno potencial para el hombre.
Estados Unidos:
TLV TWA: 50 mg/m^3 (10 ppm)
Posible carcinogénico humano.
Reino Unido:
Periodos largos: 225 mg/m^3 (50 ppm)
Francia:
VME: 250 mg/m^3 (50 ppm)
Alemania:
MAK: 50mg/m^3 (10 ppm)
Posible carcinogénico humano.
Suecia:
Periodos cortos: 10 mg/m^3 (2 ppm)

Manejo:
Equipo de protección personal:
El uso de este producto debe hacerse en un área bien ventilada, evitando respirar los vapores y el contacto con la piel. Por ello deben utilizarse bata, lentes de seguridad y guantes durante su manejo.
No deben usarse lentes de contacto al trabajar con este producto.
Para trasvasar pequeñas cantidades debe usarse propipeta, NUNCA ASPIRAR CON LA BOCA.

Riesgos:
Riesgos de fuego y explosión:
A pesar de ser un producto no inflamable, los contenedores donde se encuentra almacenado el cloroformo explotan con calor. Además, al calentarse, libera fosgeno, cloruro de hidrógeno, cloro y óxidos de carbono y cloro, los cuales son corrosivos y muy tóxicos. En general, tener precaución con los reactivos mencionados en las propiedades químicas.
Riesgos a la salud:
Está clasificado como moderadamente tóxico, sin embargo está considerado como posible carcinogénico humano. Una probable dosis letal para humanos es de 0,5 a 5 g/kg. Sin embargo, se sospecha que es carcinógeno para humanos. Puede causar una muerte rápida, atribuida a paro cardíaco y una muerte lenta por daño al hígado y riñón. Debe evitarse que personas alcohólicas, con problemas graves nutricionales, de hígado, riñón y sistema nervioso central, utilicen este producto.

Inhalación: Los signos de intoxicación aguda con vapores de cloroformo, en general, son: depresión respiratoria, neumonitis química, edema pulmonar, acidosis metabólica, depresión del sistema nervioso central, dolor de cabeza, fatiga, adormecimiento y pérdida del equilibrio. Se ha informado, también de arritmias y paro cardiacos. Por este medio se tienen riesgos particularmente para hígado y riñones, ya que el cloroformo tiende a alojarse en los tejidos de estos órganos, uniéndose covalentemente a macromoléculas celulares. La ingestión de alcohol, potencializa la toxicidad de los vapores de cloroformo.
Su poder como anestésico se presenta a concentraciones entre 10000 y 15000 ppm, mientras que entre 15000 y 18000 ppm puede ser fatal por paro respiratorio.

Contacto con ojos: Ocasiona conjuntivitis, e, incluso, quemaduras dolorosas, ya sea en forma de vapor o líquido.

Contacto con la piel: No hay una absorción significativa a través de la piel.

Ingestión: Provoca náusea, vómito, salivación, anorexia, irritación gastrointestinal y daño a hígado y riñones.

Carcinogenicidad: Se ha encontrado que es un carcinogénico en ratas y ratones y se sospecha que es un carcinógeno humano a largo plazo y debe ser reemplazado por otros disolventes, cuando sea posible.

Mutagenicidad: Se tienen resultados negativos en algunos estudios realizados con *Salmonella typhimurium*.

Riesgos reproductivos: Es teratogénico para ratas y ratones y altamente tóxico al feto por inhalación en experimentos con estos mismos animales. También ha estado implicado en desordenes similares en humanos, por lo que se recomienda que las mujeres embarazadas no tengan contacto con este producto.

Acciones de emergencia:

Primeros auxilios:

Una exposición aguda al cloroformo requiere descontaminación y soporte de vida básico para la víctima. El personal de emergencia debe usar ropa de protección adecuada, dependiendo del grado de contaminación. Toda la ropa y equipo contaminado debe almacenarse en recipientes especiales, para darles el tratamiento de descontaminación adecuado, más tarde.

De manera general, la víctima debe moverse a una zona ventilada. Evaluar signos vitales como: pulso y velocidad de respiración. Si no hay pulso, proporcionar rehabilitación cardiopulmonar. Si no respira, proporcionar respiración artificial. Si la respiración es dificultosa, proporcionar oxígeno. No existe un antídoto específico y se sabe que no debe darse adrenalina a las personas que sufren envenenamiento por cloroformo.

Ojos y piel: Quitar la ropa contaminada, y lavar según sea el caso, ojos y/o piel con agua corriente en gran cantidad. Los ojos pueden lavarse también con disolución salina neutra asegurándose de abrir bien los párpados.

Ingestión: Mantener a la víctima en reposo y caliente. No inducir el vómito. Puede suministrarse carbón activado, si la víctima está consciente. Usar de 15 a 30 g, para niños, o de 50 a 100 g, para adultos con 1/2 a 1 taza de agua. Provocar excreción con un cartártico salino o sorbitol para víctimas conscientes, los niños requieren de 15 a 30 g y los adultos de 50 a 100 g.

EN TODOS LOS CASOS DE EXPOSICIÓN, EL PACIENTE DEBE SER TRANSPORTADO AL HOSPITAL TAN PRONTO COMO SEA POSIBLE.

Control de fuego:

Use equipo de respiración autónoma y ropa de protección adecuada, dependiendo de la magnitud del incendio. Recordar, que a pesar de que el compuesto es no inflamable, los productos de descomposición por calentamiento (entre ellos fosgeno) son muy peligrosos.

Mover los recipientes fuera del área de fuego cuando sea posible. Atacar el fuego desde una distancia segura. El agua utilizada para controlar el fuego no debe tirarse al drenaje por lo que, si es necesario, debe construirse un dique para contenerla y tratarla posteriormente.

Para incendios pequeños, pueden utilizarse extintores de polvo químico seco, dióxido de carbono, agua, neblina o espuma.

Fugas y derrames:

Utilizar bata, lentes de seguridad y guantes o el equipo de seguridad que sea necesario, dependiendo de la magnitud del siniestro.

Mantenga el material alejado de fuentes de agua y drenajes. Construir diques para almacenar el líquido, en caso necesario. Para ello puede utilizarse tierra, sacos de arena o espuma de poliuretano. El líquido derramado puede absorberse con cemento y para inmovilizar el derrame, se utilizan agentes gelantes universales. Para almacenar el agua de desecho, utilizar recipientes especializados o excavar un foso y absorber con sacos de arena o succionadores. Para el agua contaminada puede utilizarse carbón activado, en regiones de 10 ppm o más, aplicarlo, en una proporción 10:1 carbón activado/derrame.
Desechos:
En pequeñas cantidades puede dejarse evaporar en una campana extractora. En caso de grandes cantidades, debe mezclarse con combustible, como queroseno, e incinerarse en equipo especializado para evitar la generación de fosgeno.

Almacenamiento:
Los recipientes que contienen este producto deben ser almacenados en lugares alejados de la luz directa del sol, ya que se descompone lentamente a productos como el fosgeno.

Requisitos de transporte y empaque:
Transportación terrestre:
Marcaje: 1888. Sustancia tóxica
Código HAZCHEM: 2 Z
Transportación marítima:
Código IMDG: 6052.1
Marcaje: Venenoso
Clase: 6.1
Transportación aérea:
Código ICAO/IATA: 1888
Clase: 6.1
Máxima cantidad en vuelos comerciales: 5 L
Máxima cantidad en vuelos de carga: 60 L

Hoja de seguridad
Metanol

Fórmula: CH_4O, CH_3OH
Peso molecular: 32,04 g/mol
Composición: C: 37,48%, H: 12,58% y O: 49,93%

Generalidades:
Es un líquido incoloro, venenoso, con olor a etanol y cuando está puro puede tener un olor repulsivo. Arde con flama no luminosa. Es utilizado industrialmente como disolvente y como materia prima en la obtención de formaldehido, metil-ter-butil éter, ésteres metílicos de ácidos orgánicos e inorgánicos. También es utilizado como anticongelante en radiadores automovilísticos; en gasolinas y diesel; en la extracción de aceites de animales y vegetales y agua de combustibles de automóviles y aviones; en la desnaturalización de etanol; como agente suavizante de plásticos de piroxilina y otros polímeros y como disolvente en la síntesis de fármacos, pinturas y plásticos.
Durante mucho tiempo se obtuvo por destilación destructiva de madera a altas temperaturas, en la actualidad se produce por hidrogenación catalítica de monóxido de

carbono a presiones y temperaturas altas, con catalizadores de cobre-óxido de cinc; por oxidación de hidrocarburos y como subproducto en la síntesis de Fischer-Tropsch.

Números de identificación:

CAS: 67-56-1	UN: 1230
NIOSH: PC 1400000	RCRA: U154
NOAA: 3874	STCC: 4909230
RTECS: PC1400000	NFPA: Salud: 1 Reactividad: 0 Fuego:3
HAZCHEM CODE:2 PE	El producto está incluido en: CERCLA, 313

Marcaje: Líquido inflamable, venenoso.

Sinónimos:	**En inglés:**	**Otros idiomas:**
Alcohol metílico	methanol	alcoolmethylique (francés)
Hidrato de metilo	methyl alcohol	methylalkohol (alemán)
Hidróxido de metilo	woodspirit	metylowyalkohol (polaco)
Metilol	bieleski'ssolution	metanolo (italiano)
Carbinol	colonial spirit	alcoolmetilico (italiano)
Alcohol de madera	columbianspirit	
	pyroxylicspirit	
	woodnaphtha	

Propiedades físicas y termodinámicas:

Densidad (g/mL): 0,81 g/mL (0/4 °C), 0,7960 (15/4 °C), 0,7915 (20/4 °C), 0,7866 (25/4 °C)
Punto de fusión: -97,8 °C
Punto de ebullición (°C): 64,7 (760 mm de Hg), 34,8 (400 mm de Hg), 34,8 (200 mm de Hg), 21,2 (100 mm de Hg), 12,2 (60 mm de Hg), 5 (40 mm de Hg), -6 (20 mm de Hg), -16,2 (10 mm de Hg), -25,3 (5 mm de Hg), -44 (1 mm de Hg)
Índice de refracción a 20 °C: 1,3292
Densidad de vapor (aire =1): 1,11
Punto de inflamación en copa cerrada (Flash point): 12 °C
Punto de congelación: -97,68 °C.
Temperatura de ignición: 470 °C
Límites de explosividad (% en volumen en el aire): 6-36,5
Temperatura crítica: 240 °C
Presión crítica: 78,5 atm
Volumen crítico: 118 mL/mol
Calor de formación (kJ/mol): -239,03 (líquido a 25 °C).
Energía libre de formación (kJ/mol): -166,81 (líquido a 25 °C).
Calor de fusión (J/g): 103
Calor de vaporización en el punto de ebullición (J/g): 1129
Calor de combustión (J/g): 22 662 (a 25 °C)
Temperatura de autoignición: 380 °C
Tensión superficial (din/cm): 22,6 Calor específico (J/g K): 1,37 (vapor a 25 °C) y 2,533 (líquido a 25 °C)
Presión de vapor (mm de Hg): 127,2 (a 25 °C)
Viscosidad (cP): 0,541 (líquido a 25 °C)
Momento dipolar: 1,69
Constante dieléctrica: 32,7 (a 25 °C)
Conductividad térmica (W/m K): 0,202 (a 25 °C)

Forma azeótropos con muchos compuestos.
Disuelve una gran variedad de sales inorgánicas por ejemplo 43% de yoduro de sodio, 22% de cloruro de calcio, 4% de nitrato de plata, 3,2% de cloruro de amonio y 1,4% de cloruro de sodio.

Propiedades químicas:
Este producto reacciona violentamente con bromo, hipoclorito de sodio, dietil-cinc, disoluciones de compuestos de alquil-aluminio, trióxido de fósforo, cloruro cianúrico, ácido nítrico, peróxido de hidrógeno, sodio, ter-butóxido de potasio y perclorato de plomo.
En general, es incompatible con ácidos, cloruros de ácido, anhidridos, agentes oxidantes, agentes reductores y metales alcalinos.

Niveles de toxicidad:
RQ: 5000
IDLH: 25000 ppm
LDLo (oral en humanos): 4,28 mg/kg
LD50 (oral en ratas): 5628 mg/kg
LC50 (inhalado en ratas): 64000 ppm/4h
LD50 (en piel con conejos): 15800 mg/kg
Niveles de irritación a piel de conejos: 500 mg/24 h, moderada.
Niveles de irritación a ojos de conejos: 40 mg, moderada.
México:
CPT (en piel): 260 mg/m^3 (200 ppm)
CCT (en piel): 310 mg/m^3 (250 ppm)
Estados Unidos:
TLV TWA: 260 mg/m^3 (200 ppm)
TLV STEL: 310 mg/m^3 (250 ppm)
Reino Unido:
Periodos largos: 260 mg/m^3(200 ppm)
Periodos cortos: 310 mg/m^3 (250 ppm)
Francia:
VME: 260 mg/m^3 (200 ppm)
VLE: 1300 mg/m^3 (1000 ppm)
Alemania:
MAK: 260 mg/m^3 (200 ppm)
Suecia:
Periodos cortos: 310 mg/m^3 (250 ppm)
Periodos largos: 269 mg/m^3 (200 ppm)

Manejo:
Equipo de protección personal:
El manejo de este producto debe hacerse en un lugar bien ventilado, utilizando bata, lentes de seguridad y, si el uso es prolongado, guantes. No deben usarse lentes de contacto al utilizar este producto. Al trasvasar pequeñas cantidades con pipeta, utilizar propipetas, NUNCA ASPIRAR CON LA BOCA.

Riesgos:

Riesgos de fuego y explosión:

Es un producto inflamable. Sus vapores pueden explotar si se prenden en un área cerrada y pueden viajar a una fuente de ignición, prenderse y regresar al área donde se produjeron en forma de fuego. Los contenedores pueden explotar.

Riesgos a la salud:

El envenenamiento puede efectuarse por ingestión, inhalación o absorción cutánea. Y se debe, posiblemente, a su oxidación a ácido fórmico o formaldehido, esta oxidación se sabe que puede ser inhibida por etanol, pues el etanol es metabolizado de manera muy específica y desintoxica al organismo de metanol por medio de la respiración. Después de la muerte, el efecto más grave de este producto, es la ceguera permanente.

Inhalación: La exposición a una concentración mayor de 200 ppm produce dolor de cabeza, náusea, vómito e irritación de membranas mucosas. Concentraciones muy altas pueden dañar el sistema nervioso central y causar problemas en la visión. Los metabolitos de este producto (ácido fórmico y formaldehido) son metabolizados lentamente por el organismo, por lo que los efectos del metanol son acumulativos y una exposición constante aún a bajos niveles, puede causar muchos de los efectos mencionados arriba. Estos efectos varían con cada individuo.

Contacto con ojos: Tanto los vapores como el líquido son muy peligrosos, pues se ha observado que el metanol tiene un efecto específico sobre el nervio óptico y la retina.

Contacto con la piel: El contacto directo produce dermatitis y los efectos típicos (mencionados arriba) de los vapores de metanol que se absorben por la piel.

Ingestión: El envenenamiento por este medio se lleva a cabo frecuentemente por etanol adulterado y sus efectos dependen de la cantidad ingerida, pues, como se mencionó arriba, el etanol afecta el metabolismo del metanol. Generalmente una dosis de 25 a 100 mL resulta fatal. Al principio se produce una narcosis similar a la producida por el etanol, pero después de 10 a 15 horas se presentan daños más graves sobre el sistema nervioso central, específicamente sobre el nervio óptico y finalmente, se presentan los efectos agudos ya mencionados.

Carcinogenicidad: No se ha observado un incremento en los casos de cáncer en trabajadores expuestos a metanol, en estudios epidemiológicos.

Mutagenicidad: Resultó ser no mutagénico en estudios con *Salmonella typhimuriumun* y no indujo el intercambio de cromátida hermana.

Peligros reproductivos: En estudios con concentraciones altas de vapor (10000 ppm) se incrementan las malformaciones congénitas las cuales incluyen órganos urinarios y cardiovasculares. A concentraciones de 5000 ppm no se observaron estos efectos.

Acciones de emergencia:

Primeros auxilios:

Inhalación: Mover a la víctima a un área bien ventilada y mantenerla abrigada. Si no respira, dar respiración artificial y oxígeno.

Ojos: Lavarlos con agua o disolución salina neutra en forma abundante, asegurándose de abrir los párpados con los dedos.

Piel: Lavar la zona dañada inmediatamente con agua y jabón. En caso necesario, quitar la ropa contaminada para evitar riesgos de inflamabilidad.

Ingestión: No inducir el vómito. Pueden utilizarse de 5 a 10 g de bicarbonato de sodio para contrarrestar la acidosis provocada por este producto y en algunos casos, se ha informado de hemodiálisis como método efectivo para este tipo de envenenamiento.

EN TODOS LOS CASOS DE EXPOSICION, EL PACIENTE DEBE SER TRANSPORTADO AL HOSPITAL TAN PRONTO COMO SEA POSIBLE.

Control de fuego:

Usar agua en forma de neblina, pues los chorros de agua pueden ser inefectivos. Enfriar todos los contenedores involucrados con agua. El agua debe aplicarse desde distancias seguras.

En caso de fuegos pequeños puede utilizarse extinguidores de espuma, polvo químico seco y dióxido de carbono.

Fugas y derrames:

Utilizar el equipo de seguridad mínimo (bata, lentes de seguridad y guantes) y, dependiendo de la magnitud del siniestro, utilizar equipo de protección completa y de respiración autónoma.

Alejar cualquier fuente de ignición del derrame y evitar que llegue a fuentes de agua y drenajes. Para ello construir diques con tierra, bolsas de arena o espuma de poliuretano, o bien, construir una fosa.

Para bajar los vapores generados, utilice agua en forma de rocío y almacene el líquido.

Si el derrame es al agua, airear y evitar el movimiento del agua mediante barreras naturales o bombas para controlar derrames y succionar el material contaminado. El material utilizado para absorber puede quemarse.

El material utilizado para absorber el derrame y el agua contaminada debe de almacenarse en lugares seguros y desecharlo posteriormente de manera adecuada.

En el caso de derrames pequeños, el líquido puede absorberse con papel y llevarse a un área segura para su incineración o evaporación, después lavar el área con agua.

Desechos:

En el caso de cantidades pequeñas, puede dejarse evaporar o incinerarse en áreas seguras.

Para volúmenes grandes, se recomienda la incineración controlada junto con otros materiales inflamables.

Almacenamiento:

El metanol debe almacenarse en recipientes de acero al carbón, rodeado de un dique y con sistema de extintores de fuego a base de polvo químico seco o dióxido de carbono, cuando se trata de cantidades grandes. En el caso de cantidades pequeñas, puede manejarse en recipientes de vidrio. En todos los casos debe mantenerse alejado de fuentes de ignición y protegido de la luz directa del sol.

Requisitos de transporte y empaque:

Transportación terrestre:	Transportación aérea:	
Marcaje: 1230	Código ICAO/IATA: 1230	
Líquido inflamable.	Clase: 3 (6.1)	
Código HAZCHEM: 2 PE	Cantidad máxima en vuelos comerciales:	1 L.
	Cantidad máxima en vuelos de carga:	60 L.

Transportación marítima:

Código IMDG:	3087
Clase:	3.2
Marcaje:	Líquido inflamable, venenoso.

Anexo I

Protocolo determinación de lípidos – IMARPE

1. Objetivo:
   Determinar el contenido lipídico en las microalgas.

2. Campo de aplicación:
   Esta técnica será aplicada a muestras de microalgas previamente liofilizadas.

3. Fundamento:
   El método consiste en una modificación del método de Bligh y Dyer adaptándolo para la extracción de grasa en las microalgas.

4. Referencias:
   Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal, Bertha Olivia Arredondo Vega y Domenico Voltolina, Centro de Investigaciones Biológicas del Noereste, S.C. México 2007

5. Terminología:
   Microalgas:

6. Materiales, insumos y equipos:

6.1 materiales y equipos:

- Balanza analítica de precisión 4 dígitos (preferible semimicrobalanza).
- Micropipeta de 10µL-100µL
- Micropipeta de 0.5 mL-5mL
- Tubos de 15mL con tapa.
- Tubos de 10mL con tapa.
- Ultrasonido.
- Vortex.
- Centrífuga.
- Campana extractora de gases.

6.2 reactivos:

- Cloroformo
- Metanol
- Antioxidante BHT
- Estándar interno C17:0

7. Desarrollo del proceso:

7.1. pesar entre 5 y 50 mg de microalgas liofilizadas en un tubo de vidrio de 15 mL (Tubo1). Adicionar 3 mL de una mezcla de solventes cloroformo:metanol (1:2) sin agua, método Bligh & Dyer modificado para microalgas.

7.2. Agregar una cantidad de antioxidante BHT menor al 1% de los lípidos totales, calcular a partir de una solución de 1mg/mL de BHT disuelto en $CHCl_3$ y 10µL de solución de estándar interno C17:0 (1mg/mL en $CHCl_3$).

7.3. Sonicar por 15 min (3 ciclos) en un baño de agua con hielo.

7.4. Incubar los tubos al menos 24 h a 4ºC y protegidos de la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.
7.5. Sonicar otros 15 min (3 ciclos) en frío antes de centrifugar.
7.6. Centrifugar a 4500 rpm por 20 min. A 5ºC. Recuperar el extracto con una pipeta Pasteur y pasarlo a un tubo de vidrio de 15mL (Tubo 2). Agregar 1.5 mL de $CHCl_3$:CH_3OH (1:2) a la biomasa residual y centrifugar nuevamente a 4500 rpm por 20 min a 5ºC recuperando el extracto (Tubo 2).
7.7. Agregar 2mL de agua destilada al tubo 2, que contiene el extracto y agitar con vortex. Eliminar el exceso de agua de la capa superior y centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 5ºC y separar la fase inferior formada de cloroformo y lípidos.
7.8. Agregar 1mL de cloroformo y separar la fase inferior ($CHCl_3$: lípido), introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur y burbujeando aire hasta el fondo del tubo. Colocar la fase $CHCl_3$: lípido en un tubo seco, pesado y guardado en desecador de 10mL (Tubo 3).
7.9. Lavar la fase acuosa con 1mL de $CHCl_3$, mezclar con vortex y centrifugar nuevamente a 5000 rpm durante 10 min, recuperar la fase inferior (CH_3Cl: lípido) y colocarlo en el tubo 3.
7.10. En la campana de extracción, secar la fase $CHCl_3$:lípido (Tubo 3) con nitrógeno gaseoso.
7.11. Se coloca en desecador a peso constante.

8. <u>Expresión de los resultados:</u>

$$\%G = \left(\frac{T_2 - T_1}{\mathrm{W}}\right) \times 100\%$$

$\%G$ = Porcentaje de grasa en la muestra.
T_2 = Peso del Tubo 3 con la grasa seca (mg).
T_1 = Peso del Tubo 3 vacío (mg).
W = Peso de la muestra (mg)