

# Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas

## Development of methods of extraction of oil in the production line of biodiesel from microalgae

Ing. Angel D. González<sup>1</sup>, Dr. Viatcheslav Kafarov<sup>2</sup>, Dr. Alexander Guzmán Monsalve<sup>3</sup>

*1,2. Centro de Investigaciones para el Desarrollo sostenible en Industria y Energía.*

*Universidad Industrial de Santander, Carrera 27 con calle 9, Bucaramanga, Colombia. \*E-mail de correspondencia: adgonzal@uis.edu.co*

*3. Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL, Kilómetro 7 vía Piedecuesta, Piedecuesta, Colombia.*

*Recibido 2/08/09, Aceptado 10/11/09,*

### RESUMEN

Los combustibles de tercera generación se producen con biomasa diferente a la utilizada para los biocombustibles de primera y segunda generación, su obtención está basada en tecnologías emergentes que prometen una gran cantidad de combustible por unidad de área y menores costos de producción. El aceite proveniente de las microalgas ha aparecido en los últimos años como una potencial fuente de biodiesel debido a que el contenido de aceite de muchas especies de microalgas supera al contenido de aceite de todas las fuentes vegetales cultivadas actualmente, varios métodos de extracción de lípidos han sido evaluados en microalgas con el fin de hacer fácil, eficiente, económico y amigable con el ambiente el proceso de extracción.

En este estudio, se presenta una revisión de los métodos de extracción de aceite que se han utilizado en la obtención de lípidos provenientes de microalgas a nivel de laboratorio (métodos de extracción con solventes químicos, shock osmótico, extracción con fluidos supercríticos, autoclavado, extracción con ultrasonido, extracción asistida con microondas, extracción mediante destrucción mecánica, extracción enzimática), así como una metodología de extracción con solventes químicos elaborada por los autores en el marco de proyectos apoyados por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, la Corporación Instituto de Morrosquillo, el Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL, la Universidad Industrial de Santander y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED.

**Palabras clave:** Biocombustibles, Extracción, microalgas

### ABSTRACT

Third generation biofuels are produced from different sources of biomass than the biomass sources used for first and second generation biofuels production, third generation biofuels production are based in emerging technologies that ensures high fuel production per area unit and lower production costs. Microalgae oil appears as a promising biodiesel source due to their oil content is bigger than oil content of other vegetal sources currently used. Several extraction methods has been evaluated on microalgae biomass for make easy, efficient, cheap and environmentally friendly the oil extraction process.

In this review, some microalgae oil extraction techniques are discussed (chemical solvent extraction methods, osmotic shock, supercritical fluid extraction, autoclaving, ultrasound extraction, microwave assisted extraction, mechanical cell destruction, enzymatic extraction), such as a chemical solvent extraction methodology proposed by the authors in the developing of projects supported by the Colombian Agriculture & rural development ministry, the Instituto de Morrosquillo Corporation, the Colombian Petroleum Institute ICP-ECOPETROL, the Industrial University of Santander, and the Latinamerican Science & Technology Development Programme CYTED.

**Key words:** biodiesel, extraction, microalgae, solvents.

## Introducción

En los últimos años, la investigación acerca de la producción de combustibles a partir de fuentes renovables, ha aumentado considerablemente. Los biocombustibles de tercera generación son llamados también biocombustibles avanzados debido a las materias primas y a los procesos tecnológicos utilizados para su producción, la materia prima de los combustibles de tercera generación son las microalgas, estas prometen una gran producción de biodiesel por unidad de área debido a su alto contenido de lípidos, el cual supera a todas las fuentes de biodiesel utilizadas en la actualidad (tabla 1). Adicionalmente, las microalgas son cultivadas en fotobiorreactores, los cuales solo necesitan un medio líquido de cultivo, algunos nutrientes y luz solar para estimular el crecimiento de la biomasa de microalgas, esto hace factible la utilización de terrenos no aptos para cultivo de productos de alimentación humana y animal, para el montaje de fotobiorreactores.

**Tabla 1.** Rendimientos de algunas fuentes de aceite para producción de biodiesel.

Especie	Aceite producido (gal/Ha.año)
Microalgas	2000-8000
Palma de aceite	256
Coco	116
Jatropha	83
Canola	51
Maní	45
Girasol	41
Cárcamo	33
Soya	19
Maíz	7

Recientemente empezaron los estudios de la etapa de extracción del aceite de las microalgas para su posterior transformación en biodiesel [1,2] debido a la importancia de esta etapa en la eficiencia y los costos globales del proceso. Los investigadores de varios países empezaron a evaluar los diferentes métodos en función de la composición de la pared celular de la microalga que se va a someter a extracción.

## Métodos de extracción

### Extracción con solvente químico

La extracción de lípidos con solventes químicos ha sido utilizada tradicionalmente para obtener lípidos de fuentes animales y vegetales, para el caso de las microalgas, el sol-

vente 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 [3], sin embargo, al ser el etanol un buen solvente de extracción, su selectividad hacia los lípidos es relativamente baja comparada con otros solventes, por lo que 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. [4], la cual extrae lípidos tanto polares, como no polares, esto se logra debido a 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 metanol/cloroformo, seguido de una purificación de los extractos con una solución de KCl. Luego, en 1959, Bligh & Dyer [5], modificaron el método de Folch, y obtuvieron un método rápido de extracción de lípidos que es usado en la actualidad y se ha probado con éxito en la extracción de aceite de microalgas [6].

El método de Bligh & Dyer consiste en la homogenización a alta velocidad de la biomasa con una mezcla metanol-cloroformo en una proporción de 2 a 1, seguidamente se agrega una parte de cloroformo y se deja homogenizar por 30 segundos, después se agrega una parte de agua y se deja homogenizar por otros 30 segundos. Luego de esto se realiza una filtración y una centrifugación, después se la cual quedan separadas las fases de metanol y cloroformo, se realiza una evaporación del cloroformo y se obtiene el aceite extraído.

Este método ha obtenido muy buenos resultados en la extracción de aceite de microalgas y se utiliza con frecuencia como complemento de métodos de destrucción mecánica o de autoclavado, aunque posee la desventaja de ser poco amigable 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 [7,8], este sistema, se compone de un balón donde se encuentra un solvente orgánico que es calentado hasta ebullición, un tubo de extracción soxhlet, donde es colocada la muestra, la cual va contenida en un cartucho de celulosa, y un condensador, después de evaporarse, el solvente orgánico es

condensado y cae al tubo Soxhlet, en el cual extrae el aceite contenido en la biomasa hasta que el tubo se llena, cuando el tubo está lleno de solvente, este es sifonado hasta el balón que contiene el resto de solvente y se repite el proceso (Figura 1).

Una gran cantidad de solventes se han utilizados como solventes de extracción en el método soxhlet, el uso de petróleo se recomienda por ser este un solvente no polar que será selectivo al extraer lípidos no polares de las microalgas como los triglicéridos, los cuales con lípidos ideales para la producción de biodiesel, el éter etílico también posee esta propiedad y ya ha sido utilizado para la microalga *Neochloris oleobundans* [8], el inconveniente que presentan los éteres, es su alta volatilidad, lo que conlleva a una significativa pérdida de solvente durante el proceso de extracción.

El solvente hexano también ha sido evaluado como solvente de extracción para microalgas en el sistema soxhlet con resultados interesantes [9], el hexano es relativamente económico, fácil de recuperar después de la extracción y posee selectividad hacia los 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. La mezcla diclorometano/hexano, permite aumentar la cantidad de lípidos totales extraídos, si el objetivo es una gran eficiencia y la selectividad no es prioritaria. 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 neutrales.

**Figura 1.** Sistema de extracción Soxhlet.



### *Extracción asistida por microondas*

La extracción asistida por microondas aprovecha la polaridad de las moléculas que componen la estructura de la microalga como los lípidos y las proteínas para crear fricción y por consiguiente calor, o cual hace que el agua contenida en la célula escape debilitando la pared celular. La extracción de lípidos asistida por microondas se caracteriza por ser una técnica que disminuye el tiempo y aumenta la eficiencia del proceso.

Este método fue comparado con otros procedimientos de destrucción celular como autoclave, molino de bolas, resonancia inducida y shock osmótico, seguidos todos por una extracción con la mezcla metanol-cloroformo para las especies *clorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. y *Botryococcus* sp. [10], obteniendo de esta última especie mediante la combinación microondas/solventes, el doble de la cantidad de aceite que se extrajo con las otras técnicas evaluadas.

### *Extracción mediante ultrasonido*

La técnica de ultrasonido consiste en la exposición de las microalgas a ondas acústicas de una frecuencia determinada, la utilización de ondas acústicas para la destrucción de la pared celular de las microalgas fue estudiada entre otros por Faerman et al. [11], quienes demostraron experimentalmente que la aplicación de ultrasonido a baja frecuencia, causa una fuerte destrucción celular, incluso mayor que cuando se aplican ondas de alta frecuencia. Cravotto et al. [12] desarrollaron una técnica de extracción con ultrasonido y asistida por microondas simultáneamente, trabajando a frecuencias entre 19 y 300 kHz obtuvieron incrementos significativos en la cantidad de aceite de microalgas extraído en comparación con métodos más convencionales.

### *Extracción mediante fluidos supercríticos*

Estos métodos surgieron como una alternativa al empleo tradicional de grandes cantidades de solventes tóxicos para realizar extracciones, de este tipo de 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 [13].

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 (Figura 2), 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 fá-

cilmente 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 [14], 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 [15].

El dióxido de carbono es el solvente más utilizado como fluido supercrítico debido a la facilidad para su eliminación después de la extracción, baja toxicidad y costo, aunque posee la desventaja de tener una baja polaridad, por lo que su eficiencia baja a la hora de extraer componentes polares.

Se ha utilizado la extracción mediante fluidos supercríticos en varias especies de microalgas para obtener diferentes sustancias, [16] utilizó CO<sub>2</sub> supercrítico para obtener ácidos grasos Omega-3 de la alga *Hypnea charoides*, [17], aplicaron esta técnica para extraer b-caroteno de la microalga *Dunaliella salina* y diolefinas de la microalga *Botryococcus braunii*, así como para extraer carotenoides de la microalga *Clorella vulgaris* [18].

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 [19], para mantenerla en estado líquido, a estas condiciones, la constante dieléctrica del agua disminuye considerablemente, comparándola con la misma a temperatura ambiente, y acercándola a la constante dieléctrica del etanol (solvente orgánico tradicional en extracción). Este método de extracción ha sido utilizado en microalgas por [20], quien obtuvo componentes antioxidantes de la microalga *S. platenses*.

### Autoclavado

Un autoclave originalmente es un aparato que se utiliza para esterilizar instrumentos médicos u otros objetos por medio de presión y agua a altas temperaturas, el principio de extracción mediante autoclavado es similar a la extracción mediante agua subcrítica, una ventaja de esta técnica para ser utilizada en la extracción de aceite de microalgas, es que se puede trabajar con la biomasa húmeda, lo cual evade la etapa de secado de la biomasa de microalgas, durante la cual se pueden degradar los lípidos presentes en las algas y aumenta los costos globales de proceso.

La metodología de utilización de esta técnica es variable, Minowa et al. [21] utilizaron una solución salina acuosa como fluido de trabajo y autoclavan a 300°C y 100 MPa con tiempos que oscilan entre 5 y 60 minutos, adicionalmente purgan con nitrógeno el aire residual. Mendes-Pinto et al. [22], utilizan autoclavado para extraer carotenoides de la microalga *Haematococcus pluvialis* a 121°C y 1 atm. durante 30 minutos, obteniendo mayor porcentaje de extracción que con otras técnicas evaluadas.

No obstante, todos los experimentos que utilizan autoclavado para la extracción de aceite de microalgas, incorporan una etapa adicional de extracción con solvente químico, por lo cual podemos decir que el autoclavado es una técnica de pretratamiento para una posterior extracción química, que una técnica de extracción en si misma.

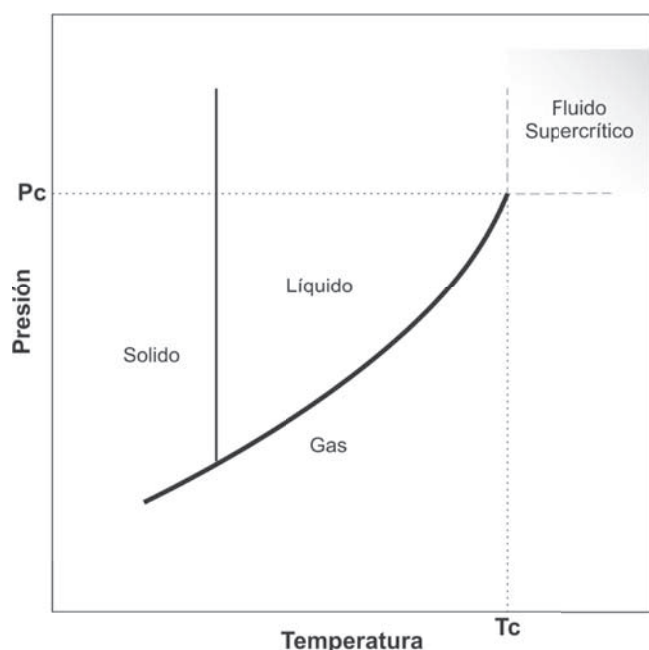
### Shock osmótico

El shock osmótico consiste en una reducción repentina de la presión osmótica, las células están inicialmente equilibradas en un medio de alta presión osmótica, luego, este medio es diluido repentinamente, entonces, por osmosis, el agua ingresa repentinamente a la célula, incrementa la presión interna, y causa ruptura, es un método relativamente fácil de emplear, aunque se recomienda utilizarlo solamente en células debilitadas [23].

### Extracción enzimática

En la extracción enzimática se degrada la pared celular de las microalgas mediante el empleo de enzimas, esto

Figura 2. Diagrama de fases de una sustancia pura.



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 [24], 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 [25].

### **Destrucción mecánica**

La destrucción mecánica como herramienta de extracción de componentes de microalgas, abarca varias clases de dispositivos mecánicos como homogenizadores celulares, molinos de bolas, sistemas de prensado [26], evaluaron varios sistemas de destrucción mecánica para la extracción de lípidos de la microalga *Botryococcus braunii* concluyendo que el mayor porcentaje de extracción de aceite se obtuvo al utilizar un molino de bolas con esferas cristal de 1 mm. Durante un tiempo de un minuto. Los métodos de destrucción mecánica poseen la desventaja de la dificultad para la recuperación del aceite extraído, adicionalmente, al ser una técnica que destruye mediante impactos la pared celular, libera además de los lípidos, otras sustancias presentes dentro de la célula, todo esto hace que esta clase de métodos sean utilizados en combinación con métodos de solvente químico.

### **Desarrollo de métodos de extracción**

En el marco de proyectos apoyados por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, la Corporación Instituto de Morrosquillo, el Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL, la Universidad Industrial de Santander y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED, los autores han desarrollado una metodología de extracción de aceite de diferentes especies de microalgas colombianas, enfocadas hacia la utilización de estos aceites en la producción de biodiesel, consistente en una etapa previa de prensado mecánico, con el fin de debilitar la pared celular de las microalgas, seguida de una extracción con solvente químico, en esta etapa se extraerá la mayor cantidad de lípidos posible mediante el método de Bligh & Dyer, aplicando variaciones en la proporción de solventes con el fin de determinar eficiencias globales y eficiencias de extracción de lípidos neutros, también se probarán diferentes velocidades de homogenización de la mezcla biomasa/solventes con el fin de hallar una velocidad ideal de homogenización y evitar gastos energéticos innecesarios, se harán experimentos a diferentes temperaturas para evaluar su efecto en la eficiencia de la extracción.

Se evaluará también el método soxhlet con diferentes solvente y mezclas de solventes para determinar la mezcla que permita una mayor extracción tanto global, como de lípidos apolares, también se determinará el tiempo óptimo de extracción. El solvente será separado del aceite mediante evaporación rotativa.

Este desarrollo de los métodos de extracción se divide en dos partes, la primera, que es de estandarización, donde se analizarán todas las variables de operación con el fin de obtener las mejores para la extracción en especies promisorias, esto se realizará con una cepa estandarizada con un contenido de aceite definido. La siguiente etapa, consistente en la extracción de aceite en especies promisorias, se realizará con las variables de proceso definidas sobre especies nativas.

### **Etapas 1. Estandarización de los métodos**

#### **Método Bligh & Dyer**

Se probarán seis proporciones diferentes de solventes (metanol, cloroformo y agua), con el fin de hallar la proporción que extraiga la mayor cantidad de lípidos totales, así como la proporción que extraiga más lípidos transesterificables, al realizar pruebas con agua como parte de la mezcla de solventes, se estará evaluando el efecto de utilizar biomasa en base húmeda en la eficiencia de la extracción mediante este método.

Se estudiará también el efecto de la velocidad de agitación en la eficiencia de la extracción, para esto, se realizarán los experimentos a tres velocidades distintas, con el fin de garantizar una velocidad que permita un balance entre eficiencia de homogenización, bajo requerimiento energético y tiempo de homogenización, además de evaluar la aparición de fenómenos relacionados con la agitación (emulsificación, destrucción celular mecánica, otros que dificulten la posterior recuperación del aceite).

Como tercera variable de operación se estudiará el efecto de la temperatura en las otras variables de proceso, con este fin, se programaron experimentos a tres temperaturas diferentes con el fin de seleccionar la más conveniente.

El estudio de todas las variables anteriormente mencionadas arroja un total de 48 experimentos, se harán 5 repeticiones de cada experimento con el fin de obtener resultados estadísticamente significativos. Cada experimento se realizará con 10 gramos de muestra para obtener una cantidad de aceite que sea cuantificable con los equipos disponibles en el laboratorio, se considera un exceso de biomasa del 10% por pérdidas debidas a transporte de materia prima, manipulación y errores experimentales e instrumentales, posible degradación de biomasa y/o de lípidos y presencia de floculante.

Biomasa requerida: 10 gr. de muestra por experimento x 48 experimentos x 5 repeticiones para cada experimento x 10% de exceso.

Total biomasa 2640 gramos.

#### **Método Soxhlet**

Se probarán seis solventes y mezclas diferentes de solventes obtenidos de la literatura (éter de petróleo, éter etílico, hexano, diclorometano, metanol, isopropanol), con el fin de encontrar el solvente o la mezcla de solventes que proporcione la mayor eficiencia con este método.

Se evaluarán tres tiempos de proceso diferentes para hallar aquel tiempo que proporcione una buena eficiencia de extracción, bajo costo energético por calentamiento y menores pérdidas de solvente.

Este método, al estar limitado por el volumen del tubo soxhlet, hace conveniente el estudio de el efecto que tiene la cantidad de biomasa contenida en el tubo, en la cantidad de aceite obtenido, guardando las proporciones debidas, estos experimentos también nos proporcionarán datos acerca de los factores que se deben tener en cuenta para un posible escalamiento del proceso, por este motivo se probarán tres cantidades diferentes de biomasa dentro del tubo (5, 10 y 15 gramos).

El estudio de todas las variables anteriormente mencionadas arroja un total de 54 experimentos, se harán 5 repeticiones de cada experimento con el fin de obtener resultados estadísticamente significativos, se considera un exceso de biomasa del 10% por pérdidas debidas a transporte de materia prima, manipulación y errores experimentales e instrumentales, posible degradación de biomasa y/o de lípidos y presencia de floculante.

Biomasa requerida:

*Nivel bajo:* 10 gramos de muestra x 18 experimentos x 5 repeticiones = 900 gramos.

*Nivel medio:* 15 gramos de muestra x 18 experimentos x 5 repeticiones = 1350 gramos.

*Nivel alto:* 20 gramos de muestra x 18 experimentos x 5 repeticiones = 1800 gramos.

Exceso: 10%

Total biomasa: 4455 gramos.

#### **Extracción con solvente hexano**

Se probará la extracción con solvente hexano ya que este es un solvente selectivo hacia los lípidos apolares, los cua-

les son los buscados en la producción de biodiesel, se harán experimentos de 10 gramos de biomasa cada uno, se evaluarán tres temperaturas de extracción distintas para ver su efecto en la eficiencia de la extracción, y se probarán tres velocidades de agitación distintas, como no se busca una homogenización, sino un contacto selectivo, se evaluarán tres tiempos distintos de agitación, tanto magnética, como mecánica.

El estudio de todas las variables anteriormente mencionadas arroja un total de 54 experimentos, se harán 5 repeticiones de cada experimento con el fin de obtener resultados estadísticamente significativos, se considera un exceso de biomasa del 10% por pérdidas debidas a transporte de materia prima, manipulación y errores experimentales e instrumentales, posible degradación de biomasa y/o de lípidos y presencia de floculante.

Biomasa requerida: 10 gr. de muestra por experimento x 48 experimentos x 5 repeticiones para cada experimento x 10% de exceso.

Total biomasa 2640 gramos.

**Biomasa total requerida para la etapa de estandarización: 9735 gramos**

#### **Etapas 2. Extracción de aceite de 10 especies de microalgas colombianas por métodos estandarizados**

Luego de estandarizar con una cepa patrón los tres métodos de extracción, se procederá a evaluar el contenido de aceite de las especies más promisorias por estos métodos, se harán más repeticiones que el mínimo estadísticamente significativo con el fin de enriquecer la base de datos y realizar un tratamiento estadístico apreciable de los datos.

#### **Método Bligh & Dyer**

10 experimentos x 10 gramos de muestra x 10 especies de microalga x 10% de exceso.

Total biomasa requerida: 1100 gramos (110 gramos por cada especie).

#### **Método Soxhlet**

10 experimentos x 20 gramos de muestra x 10 especies de microalga x 10% de exceso.

Total biomasa requerida: 2200 gramos (220 gramos por cada especie).

#### **Extracción con solvente hexano**

10 experimentos x 10 gramos de muestra x 10 especies de microalga x 10% de exceso.

Total biomasa requerida: 1100 gramos (110 gramos por cada especie).

**Biomasa total requerida para la etapa de extracción de 10 especies: 4400 gramos**

**Biomasa total requerida: 14135 gramos**

**Biomasa y solvente requeridos**

Asumiendo un promedio de 20% de aceite extraído en todas las especies de microalga.

10 litros de aceite  $\times$ (1000 mL aceite/1 L aceite) $\times$ (1 gr biomasa/0.2 mL aceite)=

**Biomasa total: 50000 gramos de biomasa**

Solvente requerido (proporción 1/20).

50000 gramos de biomasa  $\times$ (20 mL de solvente/1 gramo de biomasa) $\times$ (1 L/1000mL)=

**Solvente total: 1000 litros de solvente**

Al desarrollar la extracción asistida con ultrasonido, se hace necesario evaluar la frecuencia vibracional a la cual se produce la ruptura de la pared celular de la microalga, adicionalmente a esto, se evaluarán otras variables como el tiempo al que debe ser sometida la muestra, la temperatura y el porcentaje de humedad de la biomasa.

Para elegir el método ideal de extracción de aceite para microalgas colombianas es necesario tener en cuenta varios aspectos tales como el porcentaje de aceite extraído, la cantidad de lípidos transesterificables obtenidos, los costos generales del proceso de extracción que incluyen los costos de los solventes y los costos energéticos, así como el efecto de la utilización del solvente o la mezcla de solventes de extracción en el medio ambiente y su toxicidad.

### Conclusiones

La selección de un método de extracción de aceite de microalgas se debe hacer teniendo en cuenta las características de la especie que se va a someter al proceso, tales como el tamaño de la célula, la composición de la pared celular, características de los lípidos presentes en la microalga, sustancias presentes aparte de los lípidos, para microalgas con un tamaño relativamente pequeño, los métodos de destrucción mecánica son poco eficientes. Los métodos como el autoclavado y la extracción asistida por microondas se pueden utilizar como un pretratamiento de la biomasa previo a la extracción con solventes químicos,

esto aumenta el porcentaje de aceite extraído y por lo tanto la eficiencia del proceso.

La extracción con fluidos supercríticos se perfila como una de las técnicas más eficientes de extracción, sin embargo, se hace necesario determinar un fluido y unas condiciones de operación que permitan la extracción de lípidos aptos para la producción de biodiesel.

La extracción con solventes químicos es la técnica que presenta mas versatilidad debido a la variedad de solventes orgánicos que se pueden utilizar, lo cual representa una ventaja si se va a trabajar con distintas especies de microalgas, si el objetivo es extraer la mayor cantidad de aceite de una especie de microalga, el método de Bligh & Dyer es altamente recomendable debido a que extrae tanto lípidos neutros, como polares, por lo contrario, si el objetivo es aumentar la selectividad hacia los lípidos neutros, como los triglicéridos, los cuales son los que se desean para la producción de biodiesel, es conveniente elegir un solvente apolar que sea selectivo hacia los lípidos neutros.

Un inconveniente que presentan los métodos de extracción con solvente químico son las grandes cantidades de dichos solventes que se deben utilizar para obtener cantidades significativas de aceite, esto implica mayores costos de operación, una alternativa para la disminución de estos costos es la reutilización de solvente, sin embargo, esto disminuye la eficiencia de la extracción, ya que la pureza del solvente es la fuerza impulsora de la transferencia de masa.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, al Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL, a la Universidad Industrial de Santander y al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED.

### Bibliografía

- [1] Chisti, Y. (2007), Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances* 25, 294–306.
- [2] Chisti Y. (2008), Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol* 126–31.
- [3] Richmond A. (2004), Handbook of microalgal culture: *biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd.
- [4] Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.

- [5] Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- [6] Molina Grima E, Robles Medina A, Giménez Giménez A, Sánchez Pérez JA, García Camacho F and García Sánchez JL, (1994), Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass, *J Am Oil Chem Soc* 71, 955-959.
- [7] Manirakiza, P. Covaci A. and Schepens P. (2001). Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of food composition and analysis.*
- [8] Li Y., Horsman M., Wang B., Wu N. Lan C.Q. (2008) Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleobundans*. *Appl Microbiol Biotechnol.*
- [9] Anderson, Jordan & Sorek, Benjamin (2008). Microalgae: the fuel of tomorrow. *University of Pittsburg.*
- [10] Lee S.J., Yoon B.D. Oh H.M. (1998), Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*, *Biotechnology Techniques* 12, 553-556.
- [11] Faerman, V.; Mukmenev, I.; Shreiber, I. (2002), Sonication of Microalgae and its Precipitation *Acta Acustica united with Acustica*, 88, 4, 592-593(2).
- [12] Cravotto G, Boffa L, Mantegna S, Perego P, Avogadro M, Cintas P. (2008), Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*; 15(5):898-902.
- [13] King, J. W. (2000). Advances in critical fluid technology for food processing. *Food Science and Technology Today*, 14, 186-191.
- [14] Del Valle, J. M., & Aguilera, J. M. (1999). Review: high pressure CO<sub>2</sub> extraction. Fundamentals and applications in the food industry. *Food Science and Technology International*, 5, 1-24.
- [15] Chester T.L. Pinkston J.D. (2004), Supercritical fluid and unified chromatography, *Anal. Chem.* 76 4606-4613.
- [16] Cheung, P. C. K. (1999). Temperature and pressure effects on supercritical carbon dioxide extraction of n<sub>3</sub> fatty acids from red seaweed. *Food Chemistry*, 65, 399-403.
- [17] Mendes, R. L., Nobre, B. P., Cardoso, M. T., Pereira, A. P., & Palabra, A. F. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*, 356, 328-334.
- [18] Mendes, R. L., Fernandes, H. L., Coelho, J. P., Reis, E. C., Cabral, J. M. S., Novais, J. M. (1995). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry*, 53, 99-103.
- [19] Herrero M., Cifuentes A., Ibáñez E. (2006), 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.
- [20] Herrero, M., Ibáñez, E., Señoráns, F. J., & Cifuentes, A. (2003). Accelerated solvent extracts from *Spirulina platensis* Microalgae: determination of their antioxidant activity and analysis by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Journal of Chromatography*, 1047, 195-203.
- [21] Minowa T, Yokoyama S, Kishimoto M, Okakurat T. (1995). Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *J Fuel*; 74(12):1735-8.
- [22] Mendes-Pinto, M. M.; Raposo, M. F. J.; Bowen, J.; Young, A. J.; Morais, R (2001). Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluVialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *J. Appl. Phycol.* 13, 19-24.
- [23] Hughes, D.E., Wimpenny, J.W.T. and Lloyd, D. (1971), *Methods in Microbiology*, (Norris, J.R. and Ribbons, D.W., editors), 5B, Chap. 1, Academic (New York), 1-54. The disintegration of micro-organisms.
- [24] Ward O. P., Singh A (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40, Issue 12, Pages 3627-3652.
- [25] Robles Medina A., Molina Grima E., Giménez Giménez A., Ibáñez González M. J. (1998), Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids *Biotechnology Advances*, 16, 3, Pages 517-580.
- [26] Lee, J.-Y. et al. (2009), Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.*