

**EVALUACIÓN DE UN SOLVENTE VERDE PARA LA EXTRACCIÓN DE
LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE MICROALGAS A ESCALA
LABORATORIO**

ÁNGELA MARÍA MOTTA SOLER

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C
2019**

**EVALUACIÓN DE UN SOLVENTE VERDE PARA LA EXTRACCIÓN DE
LÍPIDOS A PARTIR DE BIOMASA DE MICROALGAS A ESCALA
LABORATORIO**

ÁNGELA MARÍA MOTTA SOLER

Proyecto integral de grado para optar por el título de
INGENIERO QUÍMICO

**Director
DIEGO RUBIO FERNÁNDEZ
Biólogo**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C
2019**

Nota de aceptación (Subdirector Operativo de Investigaciones)

Firma Docente Investigador

Firma Docente Jurado 1

Firma Docente Jurado 2

Bogotá, D.C., Febrero 2019

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DÍAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dr. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director General de Investigación y Proyección Social

Ing. MANUEL CANCELADO JIMÉNEZ

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

Este trabajo de grado se lo dedico:

A Dios y a la Virgen María, por permitirme llegar a donde estoy.

A mi padre Oscar Orlando Motta Garavito, quien ya no se encuentra presente para verme terminar esta etapa de mi vida, pero que el tiempo que Dios me permitió compartir con él, me enseñó del valor de la paciencia, el esfuerzo y que las cosas son posibles siempre que uno se las proponga.

A mi madre Hilda Marina Soler Ibáñez, por tu apoyo incondicional, por darme fortaleza en los momentos en que más débil me sentí y por ser el gran ejemplo de motivación para mi formación profesional y personal.

A mi hermana María Alejandra Motta Soler y demás familiares, por acompañarme siempre y darme alientos para culminar cada etapa de mi vida.

A mi novio Andrés Villabona por ayudarme en cada momento, por ser un apoyo absoluto, y acompañarme a recorrer este camino.

A mis amigos, compañeros y demás colegas por compartieron conmigo durante esta etapa de mi vida, de quienes aprendí muchas cosas a nivel personal y académico.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento a:

Dios, por ser el apoyo, la fortaleza y la sabiduría que guía mis acciones, haciendo este logro posible.

A mis padres, por apoyarme siempre en mi formación profesional, por cada palabra de aliento llena de sabiduría, por su confianza y soporte en cada momento.

A Diego Rubio, biólogo investigador de la Universidad de América, por sus aportes en conocimiento, acompañamiento y dirección en el desarrollo de esta investigación.

A la Fundación Universidad de América, quienes me formaron a nivel profesional como Ingeniera Química y dieron las bases para el desarrollo de esta investigación.

A Juan Andrés Sandoval Herrera, docente de la Universidad de América, por estar involucrado en el desarrollo de este proyecto.

A Ginna Paola Trujillo Pérez, docente de la Universidad de América, por aportar con sus conocimientos a resolver las dudas que se presentaron en el desarrollo de este proyecto.

A Julian Contreras, asesor del Departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana por su colaboración para la realización de los análisis necesarios en este proyecto.

A mis profesores, compañeros y demás personas que de una u otra forma aportaron al desarrollo de este proyecto.

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	18
INTRODUCCIÓN	19
OBJETIVOS	20
1. MARCO TEÓRICO	21
1.1 LÍPIDOS	21
1.1.1 Triglicéridos	22
1.1.2 Diglicéridos	22
1.1.3 Monoglicéridos	22
1.2 MICROALGAS COMO FUENTE DE LÍPIDOS	23
1.3 Scenedesmus dimorphus	26
1.4 Chlorella vulgaris	26
1.5 CONDICIONES DE CULTIVO	28
1.5.1 Luz	28
1.5.2 Temperatura	29
1.5.3 Agitación	29
1.5.4 Nutrientes	29
1.5.5 Rango de pH	30
1.6 CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA	30
1.6.1 Conteo celular	32
1.6.2 Fase estacionaria	33
1.7 SOLVENTE VERDE	34
2. METODOLOGÍA	39
2.1 PRIMERA ETAPA	42
2.1.1 Parámetros para la selección de la cepa microalgal	42
2.1.2 Parámetros para la selección de solvente verde	43
2.2 SEGUNDA ETAPA	44
2.2.1 Cultivos	45
2.2.2 Concentración celular	48
2.2.3 Relaciones de solvente-biomasa	49
2.2.4 Análisis estadístico	49
2.3 TERCERA ETAPA	50

2.3.1	Índice de saponificación (NTC 335)	51
2.4	CUARTA ETAPA	54
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	55
3.1	PRIMERA ETAPA	55
3.1.1	Revisión bibliográfica de las cepas microalgales	55
3.1.2	Selección de la cepa microalgal	60
3.1.3	Revisión bibliográfica de los solventes verdes	60
3.1.4	Selección del solvente verde y el respectivo protocolo	64
3.2	SEGUNDA ETAPA	66
3.2.1	Concentración celular del pre-experimento	67
3.2.2	Relaciones de solvente-biomasa	69
3.2.3	Extracción de lípidos en el pre-experimento	70
3.2.4	Análisis estadístico del pre-experimento	72
3.3	TERCERA ETAPA	73
3.3.1	Concentración celular del experimento	73
3.3.2	Extracción de lípidos del experimento	75
3.3.3	Índice de saponificación del experimento	78
3.3.4	Análisis químico del experimento 3	81
3.4	CUARTA ETAPA	90
4.	CONCLUSIONES	96
5.	RECOMENDACIONES	97
	BIBLIOGRAFIA	98
	ANEXOS	105

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Rendimientos de algunas fuentes de aceite.	24
Tabla 2. Porcentaje lipídico de varias especies de microalgas	25
Tabla 3. Productividad de biomasa y lípidos de diferentes tipos de <i>Chlorella</i>	28
Tabla 4. Tolerancia máxima de concentración de CO ₂ para diferentes especies de microalgas	30
Tabla 5. Valores de la matriz de cepa microalgal	43
Tabla 6. Valores de la matriz de solvente.	44
Tabla 7. Volumen de cultivos iniciales	47
Tabla 8. Estructura de tabla ANOVA	50
Tabla 9. Recopilación bibliográfica de las cepas microalgales	56
Tabla 10. Matriz de selección de la cepa microalgal	60
Tabla 11. Matriz de selección de solvente	64
Tabla 12. Concentración celular del cultivo No. 1	68
Tabla 13. Datos recolectados de la extracción de lípidos en el pre-experimento	70
Tabla 14. Diseño experimental factorial analizado estadísticamente con ANOVA	73
Tabla 15. Concentración celular del cultivo No. 2	74
Tabla 16. Concentración celular del día del experimento	75
Tabla 17. Resultados de la extracción de lípidos del experimento	75
Tabla 18. Resultados del índice de saponificación del experimento	79
Tabla 19. Composición química de la muestra concentrada analizada correspondiente al experimento 3	81
Tabla 20. Porcentaje de lípidos obtenidos en el análisis GC-MS	85
Tabla 21. Costos generales para la producción de biomasa	91
Tabla 22. Costos de medio de cultivo para los cultivos No.1 y No.2	91
Tabla 23. Costos operativos para el proceso de extracción con solvente verde y proceso de extracción con método de Bligh y Dyer	92
Tabla 24. Costos fijos proceso de extracción con solvente verde y proceso de extracción con método de Bligh y Dyer	93
Tabla 25. Costo variable proceso de extracción con solvente verde y proceso de extracción con método Bligh y Dyer	94

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Caracterización de solventes	61
Cuadro 2. Revisión bibliográfica de fase estacionaria de la cepa microalgal	67
Cuadro 3. Revisión bibliográfica de relaciones solvente-biomasa	69
Cuadro 4. Rendimiento de extracción de otros estudios	88

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Concentración celular del cultivo No. 1	68
Gráfica 2. Concentración celular del cultivo No. 2	74
Gráfica 3. Perfil lipídico basado en esteroides y los ácidos que derivan a los ésteres de ácidos grasos	86
Gráfica 4. Clasificación de perfil lipídico en SAFAS, MUFAS y Esteroides	87

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Estructura general de los ácidos grasos saturados	21
Ecuación 2. Concentración celular	48
Ecuación 3. Biomasa húmeda	49
Ecuación 4. Peso seco en 100 mL de biomasa húmeda	49
Ecuación 5. Volumen de solvente	49
Ecuación 6. Porcentaje de pérdidas del proceso de extracción	50
Ecuación 7. Determinación de índice de saponificación	53
Ecuación 8. Peso molecular	54

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Ejemplo molécula de triglicérido	22
Figura 2. Ejemplo molécula de diglicerido	22
Figura 3. Ejemplo molécula de monoglicérido	23
Figura 4. <i>Scenedesmus dimorphus</i>	26
Figura 5. <i>Chlorella vulgaris</i>	27
Figura 6. Métodos directos de determinación de biomasa	32
Figura 7. Conteo de 5 cuadros en la rejilla central de la cámara de Neubauer	33
Figura 8. Curva de crecimiento	34
Figura 9. Diagrama de metodología	40
Figura 10. Esquema de fotobiorreactor adaptado	46
Figura 11. Montaje de los cultivos	47
Figura 12. Elementos usados para el conteo celular	48
Figura 13. Reacción de saponificación	51
Figura 14. Procedimiento para determinación de índice de saponificación	52
Figura 15. Montaje para determinación de índice de saponificación	53
Figura 16. Procedimiento para la extracción de lípidos con biomasa húmeda	66
Figura 17. Formación de burbujas en el proceso de extracción de lípidos	72
Figura 18. Antes y después de la extracción de lípidos de los experimentos 1, 2 y 3	77
Figura 19. Fotografías de cambio de color observado en el índice de saponificación	80
Figura 20. Propiedades del D-Limoneno	108
Figura 21. Estructura D-Limoneno	108
Figura 22. Protocolo Bligh y Dyer para la extracción de lípidos	109

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Composición fertilizante agrícola foliagro	106
Anexo B. Técnica aséptica	107
Anexo C. Estructura y propiedades físicas y químicas del d-limoneno	108
Anexo D. Proceso de extracción de lípidos método bligh y dyer	109
Anexo E. Resultados de gc-ms de la fase orgánica del experimento 3	110
Anexo F. Resultados de gc-ms de la fase orgánica concentrada del experimento 3	111

ABREVIATURAS

CO ₂ :	Dióxido de carbono
L:	Litros
ha:	Hectarea
TG:	Triglicéridos
nm:	Nanómetro
µm:	Micrómetro
°C:	Grados centígrados
µL:	Microlitro
g:	Gramo
mg:	Miligramo
N.E:	No especificado
rpm:	Revoluciones por minuto
V/V:	Proporción volumen/volumen
h:	Hora
min:	Minutos
cel:	Células
mL:	Mililitro
GC-MS:	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
cm:	Centímetro
KOH:	Hidróxido de potasio
HCl:	Ácido clorhídrico
ω:	Omega
SAFAS:	Ácidos grasos saturados
MUFAS:	Ácidos grasos mono insaturados
PUFAS:	Ácidos grasos poliinsaturados

GLOSARIO

BIOMASA: es todo material orgánico (contenido energético), originado de un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente en energía.

CEPA: corresponde a una variante fenotípica de una especie, en donde las células son homogéneas.

CULTIVO: conjunto de microorganismos que crecen en un recipiente adaptado en presencia de nutrientes, con el fin de producir biomasa o un metabolito de interés.

D-LIMONENO: sustancia natural extraída de los cítricos, es amigable con el medio ambiente y un sustituto de sustancias tóxicas.

EXTRACCIÓN: técnica de separación que permite extraer un compuesto de interés a partir de la biomasa, utilizando disolventes.

MICROALGA: microorganismos fotosintéticos, capaces de convertir la energía solar en biomasa y productos aprovechables.

SOLVENTE VERDE: sustancia eco-amigable que disuelve y extrae los lípidos de las microalgas.

TERPENOS: compuesto orgánico isoprenoide, asociado a un grupo de hidrocarburos cíclicos, presentes en varios aceites esenciales de origen vegetal.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación evaluó un solvente verde para la extracción de lípidos a partir de biomasa de microalgas a escala laboratorio. Inicialmente, se seleccionó la microalga *Chlorella vulgaris*, la cual se cultivó en fotobiorreactores adaptados utilizando como medio de cultivo fertilizante foliagro, con fotoperiodos de 12 horas luz/12 horas oscuridad y aireación constante por medio de bombas de acuario de caudal de 4L/min. Se realizaron dos cultivos y se determinó que al cabo de 11 días de inoculados, los cultivos alcanzan una fase estacionaria; durante esta fase se realiza el proceso de extracción de lípidos. Posteriormente, se seleccionó el solvente verde D-Limoneno con un protocolo de extracción en biomasa húmeda ya que este solvente se encuentra a bajo costo, está disponible a nivel comercial y el protocolo de extracción de lípidos es aplicable en la Fundación Universidad de América.

Se determinó la proporción adecuada de solvente-biomasa, concerniente a 30:100 V/V por medio de un pre-experimento. Seguidamente, se realizó el proceso de extracción de lípidos con los parámetros seleccionados utilizando un volumen de biomasa húmeda de 300 mL y de solvente verde de 90 mL, y se determinó el índice de saponificación de la fase orgánica (solvente verde D-Limoneno y compuestos liposolubles) correspondiente a 57.91 mg KOH/g grasa. Luego, se realizó un análisis químico de GC-MS en la Pontificia Universidad Javeriana a la fase orgánica concentrada encontrando que esta era rica en ésteres de ácidos grasos y esteroides; obteniéndose en mayor proporción Decanoato de Fitilo, derivado del ácido cáprico con un porcentaje de 24.59%, seguido de los esteroides con un 14.74%, y un 15.8% de otros ésteres de ácidos grasos.

Finalmente, se evaluaron los costos del proceso de extracción de lípidos con el solvente verde D-Limoneno obteniendo un costo fijo de \$119,500 COP y un costo variable de \$5,746 COP por cada proceso de extracción correspondiente a 90 mL de solvente verde, que comparado con el protocolo Bligh y Dyer resulta ser económico y eco-amigable.

PALABRAS CLAVE: Biomasa, extracción lípidos, microalga, solvente verde.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, las microalgas han tomado un papel muy importante en el sector industrial y académico en cuanto a su capacidad de secuestrar dióxido de carbono, su alta productividad lipídica y su facilidad de cultivo¹; adicionalmente se han utilizado en los últimos años para la generación de metabolitos de interés comercial como los lípidos, los cuales han ganado popularidad en la industria oleoquímica y en el sector de investigación por el gran potencial de aplicación que tienen.

Sin embargo, los procesos de extracción de lípidos a partir de biomasa de microalgas llamados protocolo Bligh & Dyer y método Folch, requieren el uso de solventes tóxicos como el metanol y el cloroformo, además de que precisa que la biomasa se encuentre seca previa a la extracción causando que el proceso downstream sea costoso y por lo tanto los lípidos extraídos tengan una viabilidad comercial baja². Es por ello, que como alternativa a los solventes convencionales, han surgido los solventes verdes, considerados eco-amigables, eficientes y económicos³.

En los últimos años se han desarrollado varios proyectos en el semillero de investigación de BIOTECFUA, con el fin de obtener productos de alto valor agregado a partir de microalgas; así mismo estos proyectos han estudiado la evaluación de factores externos tales como temperatura, pH, concentración del medio, entre otros, para la producción de lípidos, en donde, se hizo necesario el uso de los protocolos mencionados anteriormente para su extracción, no obstante, surge la necesidad de evaluar solventes verdes como alternativa a los solventes tóxicos dentro de la universidad, de manera que contribuya a la sostenibilidad ambiental, y en consecuencia a la reducción del impacto ambiental en los procesos de extracción de lípidos.

Por lo anterior, esta investigación pretende encontrar una alternativa de extracción de lípidos a partir de biomasa de microalgas utilizando un solvente verde, buscando la aplicabilidad en la Fundación Universidad de América y esperando que sea un proceso económico.

¹ KUMAR, Jeevan. Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. Algal Research No 21, 2017. p. 138

² Ibid., p. 138

³ Ibid., p. 139

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar un solvente verde para la extracción de lípidos a partir de cultivos de una microalga a nivel de laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar un solvente verde y su respectivo protocolo para la extracción mediante una revisión teórica.
- Establecer la proporción adecuada de solvente-biomasa.
- Desarrollar experimentalmente el proceso de extracción de lípidos según parámetros seleccionados en mayores volúmenes de cultivo.
- Evaluar los costos del proceso.

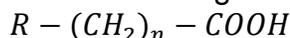
1. MARCO TEÓRICO

1.1 LÍPIDOS

Son componentes biológicos solubles en solventes no polares y prácticamente insolubles en agua de manera que puede ser apolar o anfipático; en consecuencia hace que estas moléculas sean muy variadas en estructura y función biológica. Las estructuras de estas biomoléculas abarcan largas cadenas hidrocarbonadas, unidades de isopreno y grupos funcionales diversos (oxigenados principalmente).⁴

Varios lípidos contienen en su estructura derivados de los ácidos grasos. Estos ácidos grasos se pueden clasificar como insaturados y saturados, en el caso de contener o no dobles enlaces respectivamente. La estructura general de los ácidos grasos saturados se describe en la ecuación 1⁵, en donde el grupo funcional es el carboxilo COOH.

Ecuación 1. Estructura general de los ácidos grasos saturados



Fuente: PARDO, Luz. Talleres de bioquímica. Universidad de América, 2016. p, 21.

Así mismo se clasifican en grasa y aceite, referente al estado físico a temperatura ambiente donde la grasa generalmente se encuentra en estado sólido y el aceite en estado líquido. De esta manera entre más tienda a la solidificación a temperatura ambiente, así mismo tendrá mayor cantidad de ácidos grasos saturados (SAFAS). Por otro lado, se encuentran los ácidos grasos insaturados, que a temperatura ambiente tienden a ser líquidos y se dividen en monoinsaturados (MUFAS) cuando presentan un doble enlace carbono-carbono y poliinsaturados (PUFAS) cuando tienen más de dos dobles enlaces carbono-carbono, igualmente dependiendo de la posición del doble enlace reciben el nombre de omega (ω) y el número del carbono de doble enlace⁶.

Generalmente los ácidos grasos se encuentran formando ésteres con el glicerol u otros alcoholes, a estas moléculas se les conoce como acilglicéridos; los cuales se clasifican en: Triglicéridos, Diglicéridos y Monoglicéridos. A pesar de esto, a veces los ácidos grasos no forman ésteres con el glicerol u otro alcohol y en estos casos se les denomina ácidos grasos libres.

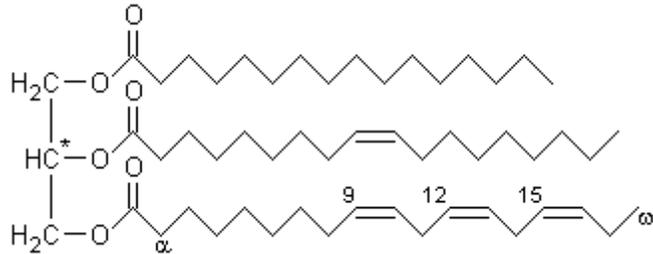
⁴ CHAPARRO, Gina. Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala laboratorio. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías. Bogotá. 2017. p. 36.

⁵ PARDO, Luz. Talleres de bioquímica. Universidad de América, 2016. p, 21.

⁶ Ibid., p. 23.

1.1.1 Triglicéridos. Son lípidos formados por una molécula de alcohol con tres grupos hidroxilos, denominada propan 1,2,3-triol (glicerol) unida a tres ácidos grasos. Tienen una alta aplicación en la industria oleoquímica como la de alimentos, biodiesel, entre otras.

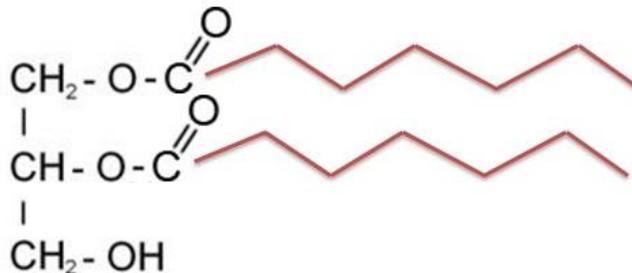
Figura 1. Ejemplo molécula de triglicérido



Fuente: Wikipedia. Triglicérido. [En línea] <<https://an.wikipedia.org/wiki/Trigliceridos>>. [Citado en 10 de Enero de 2018].

1.1.2 Diglicéridos. Son lípidos formados por una molécula de glicerol unida a dos ácidos grasos. Utilizados en la industria de alimentos como agentes emulsionantes y en la industria de comida para mascotas.

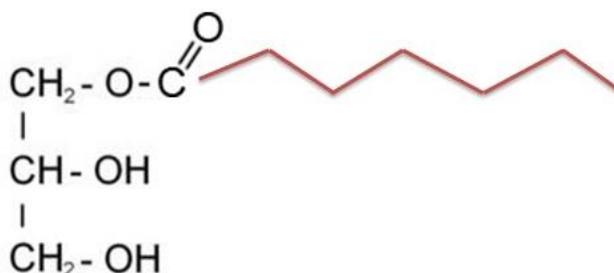
Figura 2. Ejemplo molécula de diglicerido



Fuente: VOGLAR, Gabriel. Aceites y grasas comestibles. Diglicéridos. [En línea]. <http://procesosaceitesygrasas.blogspot.com/2014/11/qu-e-son-los-aceites-y-las-grasas_6.html>. [Citado en 10 de Enero de 2018].

1.1.3 Monoglicéridos. Son lípidos formados por una molécula de glicerol unida a un ácido graso. Utilizado en la industria de alimentos como emulsionante.

Figura 3. Ejemplo molécula de monoglicérido



Fuente: VOGLAR, Gabriel. Aceites y grasas comestibles. Monoglicéridos. [En línea]. <http://procesosaceitesygrasas.blogspot.com/2014/11/que-son-los-aceites-y-las-grasas_6.html>. [Citado en 10 de Enero de 2018]

1.2 MICROALGAS COMO FUENTE DE LÍPIDOS

Las microalgas son microorganismos unicelulares eucariotas fotosintéticos de un tamaño entre 2 y 200 μm . Tienen la facilidad de crecer de manera autotrófica o heterotrófica. Son altamente eficientes en la captura y almacenaje de CO_2 , y en el uso de la energía solar para la producción de biomasa; teniendo eficiencias de captura de CO_2 de hasta cuatro veces superior a la de las plantas. Adicionalmente, hay un gran número de especies con diferentes características versátiles lo que permite que estos microorganismos tengan una alta aplicación industrial. Se clasifican de acuerdo a su fuente de energía y de carbono en⁷:

- Fotoautótrofa: la fuente de energía obtenida a partir del sol y la fuente de carbono obtenida a partir de los compuestos inorgánicos.
- Fotoheterótrofa: la fuente de energía obtenida a partir del sol y la fuente de carbono obtenida a partir de los compuestos orgánicos.
- Mixotrófica: la fuente de energía proviene de la luz y de materia orgánica y la fuente de carbono proviene de los compuestos orgánicos y del CO_2 .
- Heterótrofa: microalgas que se desarrollan en ausencia de luz.

Por otro lado, se pueden desarrollar en gran diversidad de medios como agua, lagos, mares, ríos, suelos terrestres incluso en ambientes extremos por lo que se pueden hallar distribuidas en toda la biosfera adaptadas a diferentes condiciones.⁸

⁷ DONCEL, Jennifer y MORENO, Heidy. Evaluación de la influencia de la agitación para la producción de biomasa microalgal en un FBR panel plano a escala laboratorio. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías. Bogotá. 2017. p. 24.

⁸ CAJAMAR. ¿Qué son las microalgas? Interés y uso. 2015. p. 1-2. En línea. <<https://www.grupocooperativocajamar.es/recursos-entidades/pdf/bd/agroalimentario/innovacion/formacion/materiales-y-documentos/microalgas-1444391623.pdf>>. [Citado en 29 de Marzo de 2018].

Adicionalmente, las microalgas se han convertido en objeto de estudio de varias industrias para la producción de metabolitos de interés comercial. Se han considerado como alternativas a las fuentes de aceites convencionales tales como palma y la soya, entre otras, ya que posee una alta producción lipídica con buenos rendimientos como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Rendimientos de algunas fuentes de aceite.

ORGANISMO	RENDIMIENTO DE ACEITE (L / ha)
Palma	2400
Jatropha	1300
Colza	1100
Girasol	690
Soja	400
Microalga	18750-58760

Fuente: LINARES, Luis. Producción de biocombustibles a partir de microalgas. Revista Ra Ximhai, 2012. p. 105. En línea. <<http://www.redalyc.org/pdf/461/46125177011.pdf>>. [Citado en 29 de Marzo de 2018].

Las microalgas contienen como componentes principales de la fracción lipídica triacilglicerol, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos (abundantes en membranas cloroplásticas), fosfolípidos y pigmentos (carotenoides, clorofilas, ficobilinas, entre otros)⁹.

Por lo anterior, estos microorganismos han ganado un gran interés por parte de la comunidad científica tanto por el alto contenido lipídico de algunas especies y por la capacidad de manipulación que tiene este metabolito por los cambios de las condiciones de cultivo que influyen en la síntesis de estos, en particular de triglicéridos (TG) no polares¹⁰. Por otro lado, en varios estudios se ha determinado que posterior a la extracción de lípidos, la biomasa residual se puede utilizar en la industria alimentaria, agropecuaria, farmacéutica, en la producción de alcoholes combustibles y en la generación de energía¹¹.

Las microalgas contienen lípidos como componentes estructurales y energéticos, haciendo parte de la membrana y la pared celular; este contenido es generalmente de un 20%¹² aproximadamente bajo condiciones normales, es decir, en

⁹ CHAPARRO, op.cit, p. 36.

¹⁰ ARIAS, Martha. Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México. 2013. p. 46. En línea. <<http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v18n1/v18n1a4.pdf>>. [Citado en 15 de Junio de 2018].

¹¹ Ibid., p. 47

¹² PÉREZ, Alexis. Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología Marina y Oceanografía. Chile. Vol. 49, N°2. p. 160. En línea. < <https://scielo.conicyt.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf>>. [Citado en 15 de Junio de 2018].

condiciones de cultivo donde no se han realizado factores de estrés que favorezcan a la producción lipídica.

A continuación, se muestra en la tabla 2 el contenido lipídico en peso seco de varias especies de microalgas.

Tabla 2. Porcentaje lipídico de varias especies de microalgas

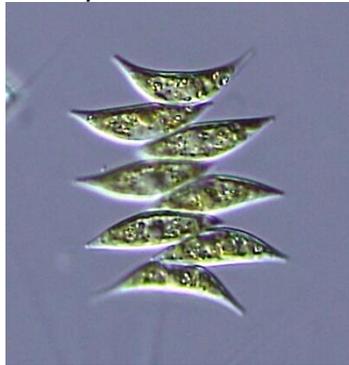
Agua dulce / marina	Microalga	Lípidos (% peso seco)	Referencia
Agua dulce	<i>Chlorella emersonii</i>	63	Illman, <i>et al.</i> , 2000
	<i>Chlorella protothecoides</i>	11-59	Illman, <i>et al.</i> , 2000; Miao y Wu, 2006; Shen <i>et al.</i> , 2009, Shen <i>et al.</i> , 2010; Sforza <i>et al.</i> , 2012
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	27	Tang <i>et al.</i> , 2011a
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	13-23	Illman, <i>et al.</i> , 2000; Zheng <i>et al.</i> , 2012
	<i>Chlorella saccharophila</i>	18 - 54	Isleten <i>et al.</i> , 2012; Zheng <i>et al.</i> , 2012
	<i>Chlorella</i> sp.	19 - 43	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009; Praveenkumar <i>et al.</i> , 2012
	<i>Chlorella vulgaris</i>	15 -58	Illman <i>et al.</i> , 2000; Converti <i>et al.</i> , 2009; Widjaja <i>et al.</i> , 2009; Yeh, <i>et al.</i> , 2012
	<i>Chlorella zofingiensis</i>	51	Liu <i>et al.</i> , 2011
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	35	Damiani <i>et al.</i> , 2010
	<i>Neochloris oleoabundans</i>	26-38	Li <i>et al.</i> , 2008; Pruvost <i>et al.</i> , 2009; Popovich <i>et al.</i> , 2012; Santos <i>et al.</i> , 2012
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	31	Shen <i>et al.</i> , 2009
	<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	8- 12	Hernández <i>et al.</i> , 2009; Arias <i>et al.</i> 2011b; Castillo Ramírez <i>et al.</i> , 2011
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-43	Mandal y Mallick, 2009; Ho <i>et al.</i> , 2010; Tang <i>et al.</i> , 2011a
	<i>Scenedesmus rubescens</i>	27-43	Lin y Lin, 2011; Tan y Lin, 2011; Lin <i>et al.</i> , 2012
<i>Scenedesmus</i> sp.	7 - 53	Hernández <i>et al.</i> , 2009; Rodolfi <i>et al.</i> , 2009; Xin <i>et al.</i> , 2010a; Xin <i>et al.</i> , 2010c	
Marina	<i>Chlorella minutissima</i>	57	Illman, <i>et al.</i> , 2000
	<i>Chlorella</i> sp.	35- 52	Chiu <i>et al.</i> , 2008; Hsieh y Wu, 2009
	<i>Chlorella vulgaris</i>	57	Liu <i>et al.</i> , 2008
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	24	Tang <i>et al.</i> , 2011b
	<i>Nannochloris</i> sp.	40	Takagi <i>et al.</i> , 2000
	<i>Nannochloropsis oculata</i>	8 -54	Chiu <i>et al.</i> , 2009; Converti <i>et al.</i> , 2009
	<i>Nannochloropsis</i> sp.	24-60	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009; Pal <i>et al.</i> , 2011; Moazami <i>et al.</i> , 2012
	<i>Tetraselmis suecica</i>	20 - 54	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009; Azma <i>et al.</i> , 2011

Fuente: ARIAS, Martha. Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México. 2013. p. 48. En línea. <<http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v18n1/v18n1a4.pdf>>. [Citado en 15 de Junio de 2018].

1.3 *Scenedesmus dimorphus*

Es una microalga verde unicelular, con forma de ovalo puntiagudo con un tamaño de 10 µm aproximadamente. Se caracteriza por ser un alga pesada, es decir, un alga con una pared celular celulósica rígida, lo cual favorece su sedimentación.¹³ Por otro lado, esta microalga tiene un contenido lipídico de 31%¹⁴ aproximadamente, por lo que es ampliamente utilizada para la obtención de lípidos; sin embargo, la facilidad que presenta de formar sedimentos gruesos requiere de una constante agitación¹⁵. La temperatura óptima para el crecimiento de la cepa está entre 30°C y 35°C¹⁶.

Figura 4. *Scenedesmus dimorphus*



Fuente: Wikipedia.
Scenedesmus dimorphus.
[En línea]
<https://en.wikipedia.org/wiki/Scenedesmus_dimorphus>.
[Citado en 4 de Marzo de 2018].

1.4 *Chlorella vulgaris*

Es una microalga unicelular de color verde de agua dulce con forma esférica. Sus ciclos de vida y necesidades nutricionales son simples; además tiene una alta capacidad de fijación de CO₂, por lo que se le facilita el crecimiento en medios con altas concentraciones de gas¹⁷. Por otro lado, esta microalga tiene facilidad de

¹³ FONSECA, Laura y GUARÍN, María. Evaluación de la remoción de cromo con cultivos de microalgas en un fotobiorreactor de panel plano. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías. Bogotá. 2018. p. 21.

¹⁴ ARIAS, op.cit, p. 48.

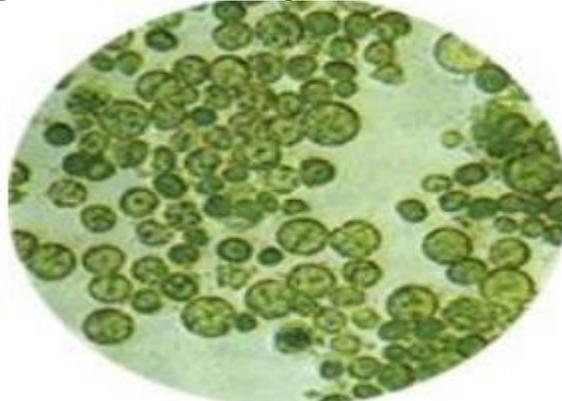
¹⁵ FONSECA, op.cit, p. 21.

¹⁶ TUPIÑO, Estefanía. Cultivo de microalga *Scenedesmus Obliquus var Dimorphus* (TURPIN) para la obtención de biomasa y lípidos. Universidad Ricardo Palma. Escuela de posgrado. Lima, Perú. 2016. p. 1.

¹⁷ CHAPARRO, op.cit, p. 25.

adaptación a diferentes condiciones de cultivo y es de rápido crecimiento; adicionalmente es rica en ácidos grasos, proteínas y vitaminas¹⁸. La temperatura óptima para el crecimiento de la cepa es 25°C¹⁹.

Figura 5. *Chlorella vulgaris*



Fuente: FLEMING. Sun chlorella. *Chlorella vulgaris*. Salud Chlorella España. [En línea]. <<http://www.chlorella.es/que-es-chlorella/>>. [Citado en 4 de Marzo de 2018].

A continuación se muestra en la tabla 3 la productividad de biomasa junto con el contenido lipídico de diferentes tipos de *Chlorella*:

¹⁸ SOSA, Jose y VÁSQUEZ, Paula. Evaluación del potencial de un residuo proveniente de la industria panelera como fuente de carbono para la producción de biomasa microalgal. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías. Bogotá. 2017. p.27

¹⁹ FAO. Cultivo de microalgas. Tabla 7. [En línea]. [Citado en 1 de Agosto de 2018]. <<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S02.htm>>

Tabla 3. Productividad de biomasa y lípidos de diferentes tipos de *Chlorella*

Microalga	Productividad de biomasa (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	Contenido de lípidos (%)	Productividad de lípidos (mg L ⁻¹ día ⁻¹)
<i>Chlorella</i> sp.	98.61	40.23	39.67
<i>Chlorella vulgaris</i>	170	19.2	32.6
<i>Chlorella vulgaris</i>	200	18.4	36.9
<i>Chlorella vulgaris</i> fototrófica	10	33-38	4
<i>Chlorella vulgaris</i> heterotrófica	80	23-36	27-35
<i>Chlorella vulgaris</i> mixotrófica	90	21-34	22-54
<i>Chlorella</i> sp. mixotrófica	363	N. D.	N. D.
<i>Chlorella</i> sp.	129	31.12	53.96
<i>Chlorella</i> sp.	58.4	32	17.99

Fuente: TEJEDA, Lesly. Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. Revista Facultad de Ingeniería. Vol 24. No. 39. 2015. p. 49. [En línea]. <<http://www.scielo.org.co/pdf/rfing/v24n39/v24n39a05.pdf>>. [Citado en 10 de Abril de 2018].

1.5 CONDICIONES DE CULTIVO

Se considera importante tener en cuenta las condiciones de cultivo que favorezcan el crecimiento de las microalgas y en consecuencia la productividad de biomasa.

1.5.1 Luz. Las microalgas utilizan longitudes de onda entre 350 y 700 nm, que corresponden al espectro de la luz solar, siendo estos microorganismos fotosintéticos. Este factor depende de la calidad espectral, el fotoperiodo establecido y la intensidad lumínica que puede afectar la actividad fotosintética, el contenido de pigmentos y la composición química de la microalga²⁰. Así mismo, la luz incide notablemente en el crecimiento de las microalgas, el cual puede llegar a un rango máximo, en donde afecta negativamente a la microalga, causando la inhibición del crecimiento²¹. La regulación lumínica en el fotobiorreactor se establece por la relación superficie (área) -volumen.²²

²⁰ ARIAS, op.cit, p. 57.

²¹ CHAPARRO, op.cit, p. 31

²² FONSECA, op.cit, p. 22.

1.5.2 Temperatura. La temperatura óptima para las microalgas varía entre los 15°C y los 20°C, aunque existen algunas microalgas capaces de tolerar mayores temperaturas. Este factor puede afectar la composición, la respiración celular, los ciclos de fotosíntesis dependientes de las reacciones enzimáticas y biológicas del proceso²³, y la composición de lípidos en la microalga.

1.5.3 Agitación. Este factor es importante ya que favorece la transferencia de masa de nutrientes en el cultivo, la exposición uniforme a la luz y la homogenización del pH, además de que ayuda al intercambio de gases entre el medio externo y el cultivo microalgal, e impide la sedimentación y los gradientes de concentración de temperatura, nutrientes y luz²⁴. Sin embargo, una agitación inadecuada puede reducir la productividad de biomasa y puede causar la muerte celular y fermentación del cultivo²⁵. Esta agitación se puede realizar por medio de aireación.

1.5.4 Nutrientes. Las microalgas requieren nutrientes en disolución, los cuales deben contener fuente de carbono, nitrógeno y fósforo principalmente, además de sodio y silicatos. La principal fuente de carbono utilizada en los cultivos de microalgas es el CO₂, a continuación se muestra en la tabla 4 la concentración máxima tolerable de esta fuente de carbono para diferentes especies de microalgas.

²³ Ibid., p. 22.

²⁴ BENAVENTE, J.R. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. Universidad Autónoma de Coahuila. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Coahuila, México. Ene-Jun 2012. Año 4, N°. 7. [En línea]. <<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/4.html>>. [Citado en 15 de Junio de 2018].

²⁵ ARIAS, op.cit, p. 58.

Tabla 4. Tolerancia máxima de concentración de CO₂ para diferentes especies de microalgas

Especie	Tolerancia máxima de concentración de CO ₂
<i>Cyanidium caldarium</i>	100%
<i>Scenedesmus sp.</i>	80%
<i>Chlorococcum littorale</i>	60%
<i>Synechococcus elongatus</i>	60%
<i>Euglena gracilis</i>	45%
<i>Chlorella sp.</i>	40%
<i>Eudorina sp.</i>	20%
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	15%
<i>Nannochloris sp.</i>	15%
<i>Chlamydomonas sp.</i>	15%
<i>Tetraselmis sp.</i>	14%

Fuente: BENAVENTE, J.R. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. Universidad Autónoma de Coahuila. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Coahuila, México. Ene-Jun 2012. Año 4, N°. 7. [En línea]. <<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/4.html>>. [Citado en 15 de Junio de 2018].

1.5.5 Rango de pH. El rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9.9. Algunas investigaciones han concluido que con un pH neutro de 7.5 las microalgas tienen un óptimo crecimiento. Además, mediante una aireación con aire rico en CO₂ se puede acidificar el medio, aunque el pH se incrementa a medida que la edad del cultivo es mayor ocasionado por la acumulación de minerales y nutrientes oxidados; por esta razón algunos autores recomiendan un pH inicial de 6.5 del medio de cultivo previo a la inoculación²⁶. Este factor define la solubilidad de los minerales y del dióxido de carbono en el cultivo²⁷.

1.6 CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA

La determinación de la biomasa es una de las variables con mayor importancia de un bioproceso, debido a que permite la comprensión de la eficiencia del mismo y

²⁶ BENAVENTE, op.cit. N° 3.4.

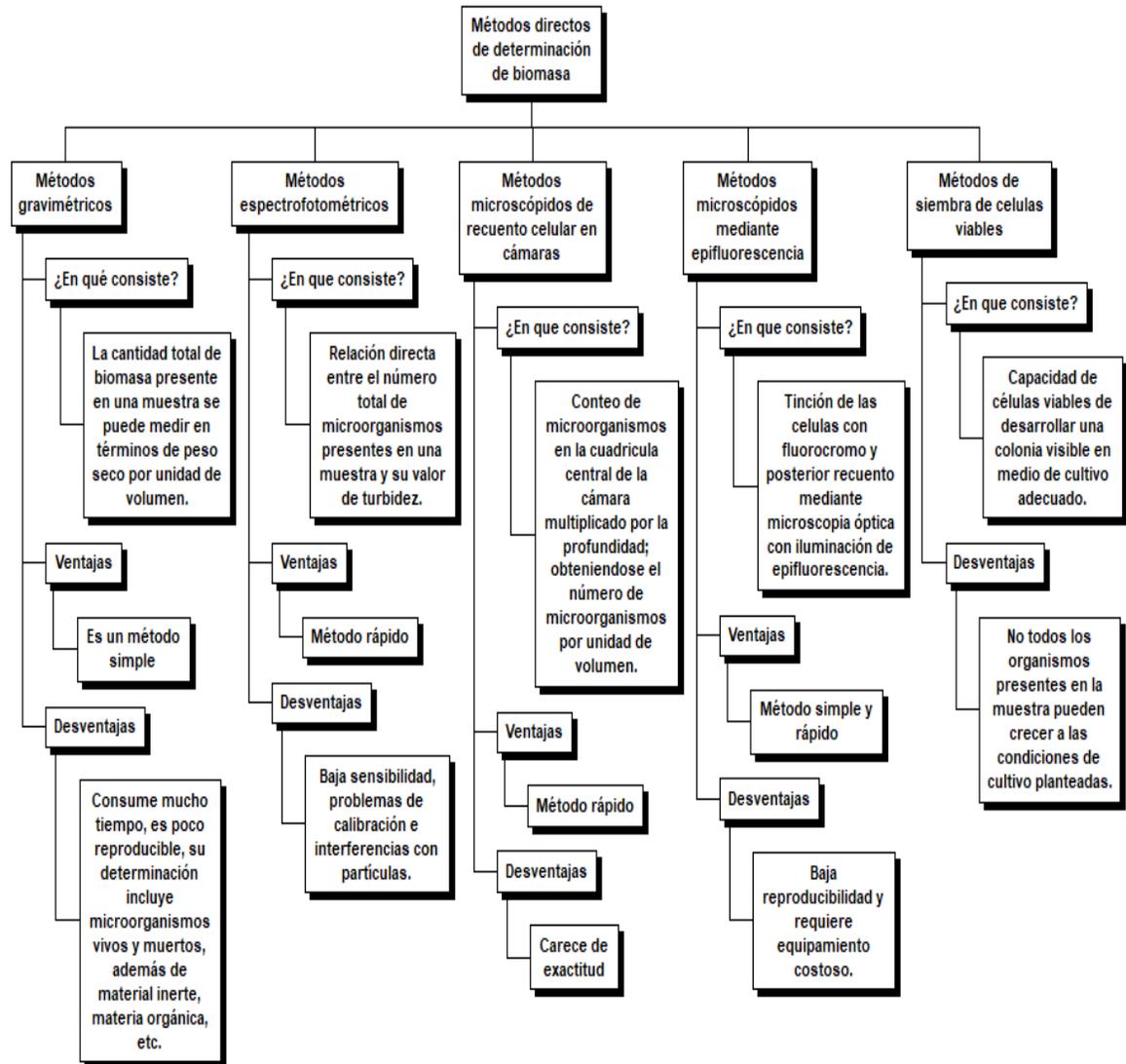
²⁷ FONSECA, op.cit, p. 23.

el establecimiento de tasas de producción, de consumo de nutrientes y cálculos de balances de masa²⁸.

Dentro de los principales métodos directos de cuantificación de la producción de biomasa se encuentran los métodos gravimétricos, espectrofotométricos, microscópicos de recuento celular en cámaras, microscópicos mediante epifluorescencia y siembra de células viables. En la figura 6 se muestra un cuadro conceptual con los diferentes métodos.

²⁸ ARNÁIZ, Carmen. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Universidad de Sevilla. Grupo de tratamiento de aguas residuales. Sevilla. 2000. p. 45. [En línea] <http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/tvolke/00_Determin-BM.pdf>. [Citado en 10 de Mayo de 2018].

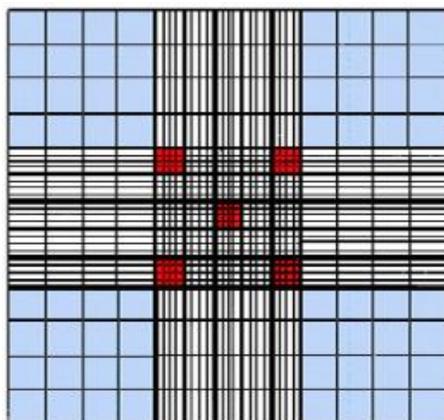
Figura 6. Métodos directos de determinación de biomasa



Fuente: Elaboración propia basada en: ARNÁIZ, Carmen. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Universidad de Sevilla. Grupo de tratamiento de aguas residuales. Sevilla. 2000. p. 45. [En línea] <http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/tvolke/00_Determin-BM.pdf>. [Citado en 10 de Mayo de 2018].

1.6.1 Conteo celular. Este método utiliza una cámara (Neubauer, Thoma, Burker, etc.) que posee una cuadrícula (ver figura 7) permitiendo el conteo celular a través de un microscopio, obteniendo el número de células por unidad de volumen.

Figura 7. Conteo de 5 cuadros en la rejilla central de la cámara de Neubauer



Fuente: URIEL. Cámara de Neubauer. [en línea] <<http://uriel-93.over-blog.com/article-29526447.html>>. [Citado en 10 de Junio de 2018].

En la cámara de Neubauer, la cantidad de muestra que se debe agregar es 10 μL . Por otro lado, este es un método rápido, más sin embargo puede presentar inexactitud y posibles errores ya que la muestra es poco representativa²⁹.

1.6.2 Fase estacionaria. El conteo celular permite conocer el incremento y caída de una población de microorganismos, ilustrando la concentración celular en función del tiempo³⁰. La curva de crecimiento se compone de cuatro fases: adaptación, exponencial, estacionaria y muerte (ver figura 8) que dependen de varios factores según las condiciones de cultivo.

La fase estacionaria corresponde al periodo de tiempo en donde no hay aumento neto de microorganismos³¹, también conocido como crecimiento críptico en donde la aparición de nuevos microorganismos se compensa por la muerte de otros. En esta fase se producen metabolitos de tipo secundario como antibióticos, acumulación de lípidos mediante factores de estrés, etc.

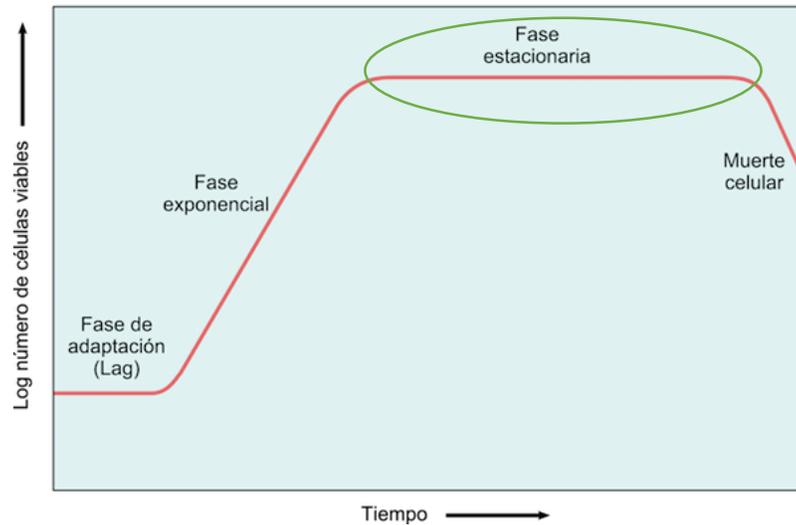
Es por ello, que para la producción de lípidos es importante establecer la fase estacionaria, ya que es la fase en la cual se lleva a cabo la extracción.

²⁹ FONSECA, op.cit, p. 25.

³⁰ SOSA, op.cit, p. 39.

³¹ CHAPARRO, op.cit, p. 35.

Figura 8. Curva de crecimiento
Curva de crecimiento bacteriano



Fuente: Lifeder. ¿Qué es la curva de crecimiento? Características principales. [En línea]. <<https://www.lifeder.com/curva-crecimiento-bacteriano/>>. [Citado en 11 de Junio de 2018]. Modificado por autor.

1.7 SOLVENTE VERDE

Se define solvente como líquido que se disuelve y extrae la sustancia de interés. Tiene propiedades que permiten arrastrar el soluto y que este se disuelva correctamente, además de ser inmisible o parcialmente inmisible con los otros componentes de la mezcla a la cual se le está realizando la extracción. Por otro lado, el termino verde se define como el uso de sustancias, técnicas y métodos para “diseñar productos y procedimientos químicos que permitan reducir o eliminar la utilización y la síntesis de sustancias peligrosas.”³² Por lo tanto un solvente verde es una sustancia eco-amigable, es decir, respetuoso y no perjudicial para el medio ambiente, que disuelve y extrae los lípidos de las microalgas.

Para la extracción de estos lípidos se han propuesto solventes y técnicas verdes de extracción como alternativas a los protocolos convencionales: bligh & dyer y folch; dentro de estas alternativas³³ se encuentra la siguiente clasificación de solventes verdes tomada del artículo “Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review” de Jeevan y otros autores, en donde se resaltan características importantes de los diferentes solventes y técnicas verdes:

³² UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO. Disolventes verdes. En línea <<http://www.dcne.ugto.mx/Contenido/MaterialDidactico/amezquita/Analitica3/Disolventes%20verdes.pdf>>. [Citado en 1 de Abril de 2018].

³³ KUMAR, Jeevan, et al. Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. *Algal Research*, No 21. 2017. p. 139-141.

- Solventes bio-derivados: en este grupo se encuentran terpenos, FAME de origen vegetal y lactato de etilo. Son disolventes de base biológica eficientes, ecológicos y rentables económicamente. Los terpenos son compuestos orgánicos obtenidos a partir de plantas y especies de cítricos como el D-limoneno, p-cimeno, entre otros. Por un lado, se ha estudiado la aplicación del D-limoneno para la extracción de lípidos de *Chlorella vulgaris* y se determinó que obtenía rendimientos similares al hexano realizando extracción Soxhlet y una recuperación del solvente con destilación Celvenger, además de considerarse como un solvente con buenas propiedades químicas y técnicas y ser de bajo costo. Así mismo, han surgido nuevos solventes verdes derivados de materias primas agrícolas y biológicas como el lactato de etilo y metil soyato, de manera que han resultado biodegradables, renovables y de baja toxicidad³⁴.
- Tecnología de fluidos supercríticos (SCF): es una tecnología prometedora de aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria. Tiene mayor selectividad, menor tiempo de extracción y carece de toxicidad comparado con disolventes orgánicos. Esta tecnología no requiere una etapa de separación debido a que los fluidos como el CO₂ se encuentran en estado gaseoso a presión ambiente lo que facilita su recuperación y reutilización evitando de esta manera el efecto invernadero³⁵. La eficiencia de extracción depende de la temperatura, la presión, las características de la muestra y la interacción entre los compuestos y los fluidos supercríticos. Además, se ha determinado que esta tecnología es adecuada para la extracción de lípidos neutros como los triglicéridos. No obstante, esta tecnología a pesar de ser simple en su proceso requiere de un alto costo de equipos.
- Líquidos iónicos: son soluciones salinas no acuosas, formando una solución orgánica de cationes y aniones. Son ecológicos en su naturaleza, no son inflamables y permanecen en estado líquido en un amplio rango de temperaturas. Adicionalmente, debido a sus características fisicoquímicas permiten un adecuado diseño del solvente en cuanto a hidrofobicidad, polaridad y solubilidad de acuerdo al soluto de interés. Cabe resaltar que los estudios disponibles con estos solventes son pocos, encontrando en uno de estos estudios el uso de 1-butil-3-metilimidazolio donde el mismo solvente rompe la pared celular formando dos fases, una hidrófoba y otra hidrófila³⁶. Actualmente, existe una carencia de conocimiento de las propiedades de las sales iónicas lo que ha impedido su viabilidad comercial a pesar de ser solventes muy potenciales para mejorar la eficiencia en la extracción de lípidos.

³⁴ Ibid., p. 139

³⁵ Ibid., p. 140

³⁶ Ibid., p. 141

- Solventes intercambiables (SHS): se constituyen de amidinas y aminas secundarias. Tienen la capacidad de cambiar su polaridad y su miscibilidad de pobre a excelente. Así mismo, por su facilidad de eliminación son adecuados para la extracción de lípidos de algas en la producción de biodiesel, ya que se requiere de una eliminación total del solvente para la etapa de transesterificación. Por otro lado, se ha reportado una buena eficiencia de extracción de lípidos utilizando N, N-dimetilciclohexilamina en la alga *Botryococcus braunii*, por lo que además de tener buena eficiencia de extracción lipídica también promete mejores resultados a los solventes orgánicos tradicionales³⁷. Son eco-amigables, con una alta selectividad de componente deseado (lípidos) y permite reducir los tiempos de extracción; adicionalmente, pueden ser reutilizados en biorefinerías.
- Polímeros líquidos: en este grupo se encuentran polímeros de bajo peso molecular como etilenglicoles (PEGs) y propilenglicoles (PPGs) caracterizados por ser no volátiles. Los PEG son económicos y estables a condiciones ambientales, y forman agregados moleculares de gran tamaño que tienden a decantar. Se espera que los avances científicos en la extracción de lípidos de las microalgas utilizando estos disolventes sean significativos en los siguientes años³⁸.
- Solventes eutécticos profundos (DES): son fluidos compuestos de dos o más componentes de solventes eutécticos naturales como sal de amonio cuaternario + cloruro de metal y sal de amonio cuaternario + hidrato de cloruro de metal. Estos solventes son seguros, económicos y han sido reconocidos como una nueva clase de solventes renovables alternativos a los solventes orgánicos. Se caracterizan por ser líquidos a temperatura ambiente, ser biodegradables, no tóxicos, con una baja volatilidad, síntesis económica, versátiles y con capacidad de solubilizar compuestos en un amplio rango de polaridad³⁹.
- Solventes eutécticos profundos naturales (NADES): son metabolitos primarios de origen natural como aminoácidos, ácidos orgánicos (lácticos, málicos, ácidos cítricos), azúcares (glucosa, sacarosa, fructosa), urea y derivados de colina, con iguales funciones de solubilizar compuestos polares y no polares. Tienen varias ventajas con respecto a los DES en cuanto a la toxicidad, biodegradabilidad, estabilización de solutos, sostenibilidad y costo de síntesis⁴⁰. Se han estudiado los NADES para la extracción de fenoles y flavonoides, aumentando la eficiencia cuando estos son de origen biológico, natural y renovable.

³⁷ Ibid., p. 141

³⁸ Ibid., p. 144

³⁹ Ibid., p. 145

⁴⁰ Ibid., p. 145

- Solventes fluorescentes (FS): son solventes compuestos de un sistema bifásico de fases acuosas y no acuosas como el perfluorociclohexano. Este sistema depende de las características de los solventes y la temperatura. Tienen la capacidad de penetrar sustancias a pesar de que son muy sensibles. Su aplicabilidad aún no ha sido determinada en la extracción lipídica de microalgas, aunque se ha utilizado en el fraccionamiento de aceites esenciales, extracción de trazas de metales en mezclas orgánicas y extracción de residuos sólidos y líquidos fotodegradados de bifenilos policlorados contaminados⁴¹.
- Solventes supramoleculares (SUPRAS): son líquidos nanoestructurados con características derivadas de los anfífilos, se producen mediante procesos de autoensamblaje a escala molecular y nanoescala. La polaridad de estos solventes se puede alterar variando el grupo hidrófilo o hidrófobo en el compuesto anfifílico⁴², haciéndolos muy buenos solventes para la extracción de compuesto polares y no polares. Se han utilizado en química analítica para procesos de extracción como surfactantes catiónicos y compuestos orgánicos, y han sido atractivos por su no volatilidad y no inflamabilidad.

Algunos de los solventes mencionados anteriormente no requieren de una etapa de disrupción celular, según algunas investigaciones. Sin embargo, cabe resaltar las alternativas de disrupción celular que pueden intensificar el proceso de extracción de lípidos. Es por ello, que se han planteado las siguientes técnicas⁴³ tomadas igualmente del artículo de “Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review” de Jeevan y otros autores:

- Extracción asistida por microondas (MAE): se pueden obtener mejores rendimientos y calidad en menores tiempos de extracción. Ofrece energía a partir de materiales que generan calor facilitando la formación de vapor de agua que causa disrupción en la membrana celular haciendo eficiente la extracción de metabolitos intracelulares como los lípidos. A temperaturas de 120°C se han encontrado incrementos en la eficiencia de extracción de hasta 115.5%⁴⁴ de aceite comparado con extracción Soxhlet.
- Extracción asistida por ultrasonido (UAE): es sencilla, económica y ecológica. Enriquece la pureza del producto final. Requiere menor uso de solvente y la extracción se puede realizar en pocos minutos. Induce a la disrupción celular por medio de fenómenos de cavitación (burbujas microscópicas).

⁴¹ Ibid., p. 145

⁴² Ibid., p. 145

⁴³ Ibid., p. 142-144

⁴⁴ Ibid., p. 142

- Extracción asistida por enzimas (EAE): es una estrategia novedosa para la disrupción de la membrana celular y liberar compuestos intracelulares. El método trabaja sobre la acción selectiva de las enzimas⁴⁵. Es una técnica suave, específica y amigable con el ambiente.
- Extracción asistida por tensoactivos (SAE): es menos tóxica, utiliza productos químicos biodegradables y tiene gran potencial para la extracción de lípidos sin la necesidad de equipos. Se caracterizan por una composición anfipática (hidrófilos e hidrófobos)⁴⁶.
- Extracción lipídica de biomasa microalgal húmeda: la biomasa húmeda tiene más contenido de agua, lo que podría inhibir la penetración de productos químicos y disolventes. El proceso de secado hace que la extracción se vuelva más costosa. Se pueden desarrollar técnicas combinadas con las anteriores alternativas mencionadas en la disrupción celular y de solventes verdes.

⁴⁵ Ibid., p. 143

⁴⁶ Ibid., p. 143

2. METODOLOGÍA

El trabajo de grado se desarrolla en cuatro etapas; en la primera etapa se realiza una revisión bibliográfica de las características más relevantes que tienen las cepas que posee la universidad (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*) adjuntándolas en una matriz de selección, así mismo en esta etapa se realiza una caracterización de solventes mediante revisión teórica basada en diferentes fuentes de información, e igualmente adjuntándolo a una matriz de selección.

Para la segunda etapa previamente se obtiene biomasa de la microalga escogida bajo parámetros de cultivo establecidos en la universidad, se realizan dos cultivos, el primero correspondiente al pre-experimento, y el segundo cultivo correspondiente al experimento. Se realiza una revisión teórica en diferentes fuentes de información del crecimiento de la microalga y se determina el día que alcanza la fase estacionaria, luego se realiza la verificación de la fase estacionaria de los cultivos a partir de la concentración celular en el volumen alcanzado. Se inicia el pre experimento, en donde se realiza una revisión teórica de las relaciones solvente-biomasa utilizadas y/o estudiadas por otros autores; una vez conocidas, se eligen tres relaciones representativas, se procede a aplicar el protocolo de extracción respectivo en el periodo de fase estacionaria y se determina el volumen extraído. Posteriormente los datos recolectados se analizan en un diseño experimental factorial analizado estadísticamente con ANOVA con un factor y tres niveles. Con los resultados del diseño experimental se elige una relación de solvente-biomasa.

En la tercera etapa, se lleva a cabo el protocolo de extracción de lípidos en el periodo de fase estacionaria con el segundo cultivo, teniendo en cuenta la relación solvente-biomasa escogida, con un aumento de solvente proporcional al aumento de volumen de biomasa. Se aplica protocolo de índice de saponificación con el fin de caracterizar la muestra. Finalmente, se realiza nuevamente la extracción de lípidos y se le realiza al extracto una rotaevaporación y posteriormente se analiza la muestra por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para la caracterización y cuantificación porcentual de lípidos.

En la cuarta etapa se recolecta información de los costos del proceso y se hace un análisis de la viabilidad económica del proyecto.

En la figura 9 se muestra la metodología aplicada.

Figura 9. Diagrama de metodología

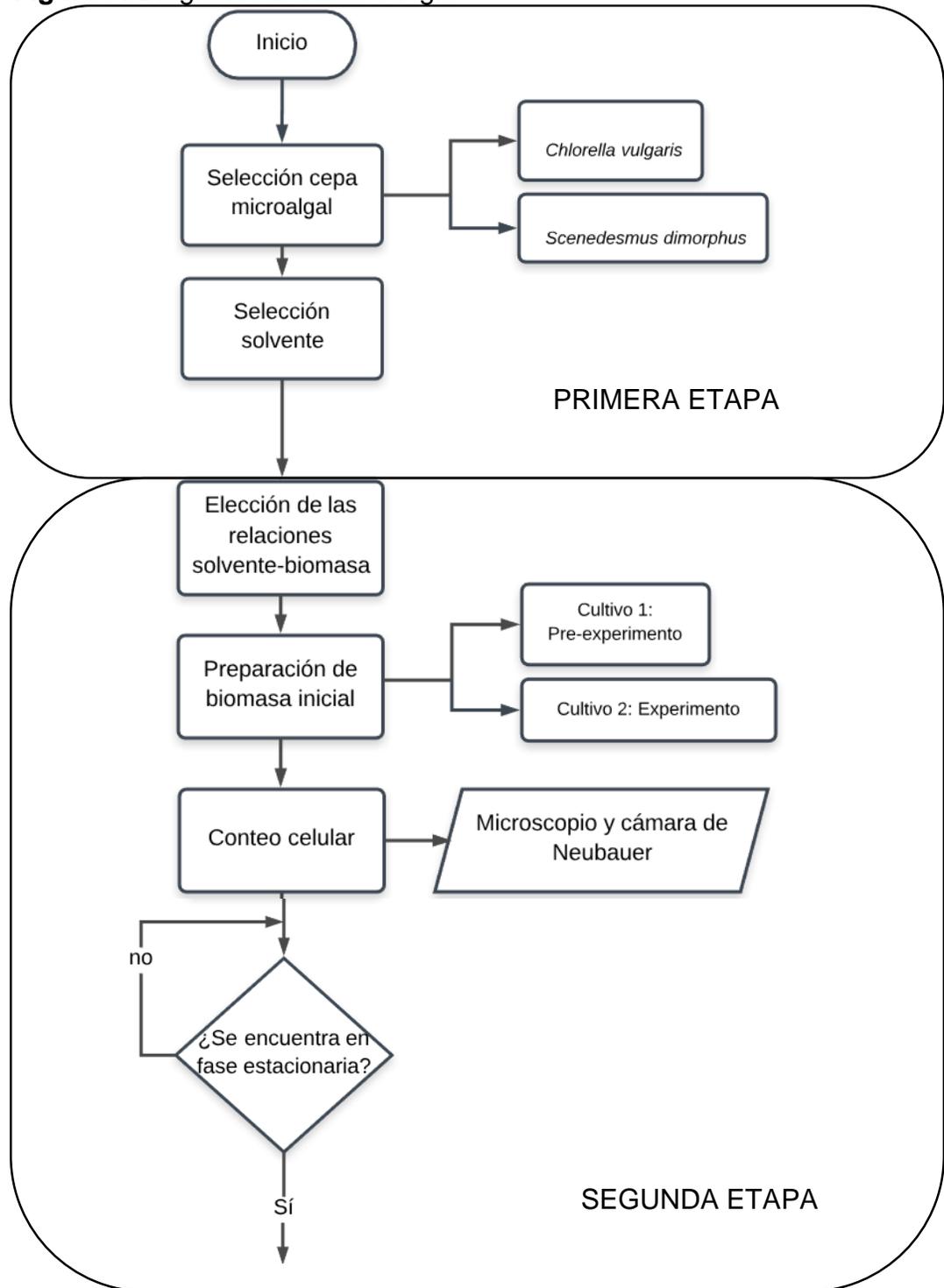


Figura 9. (Continuación)

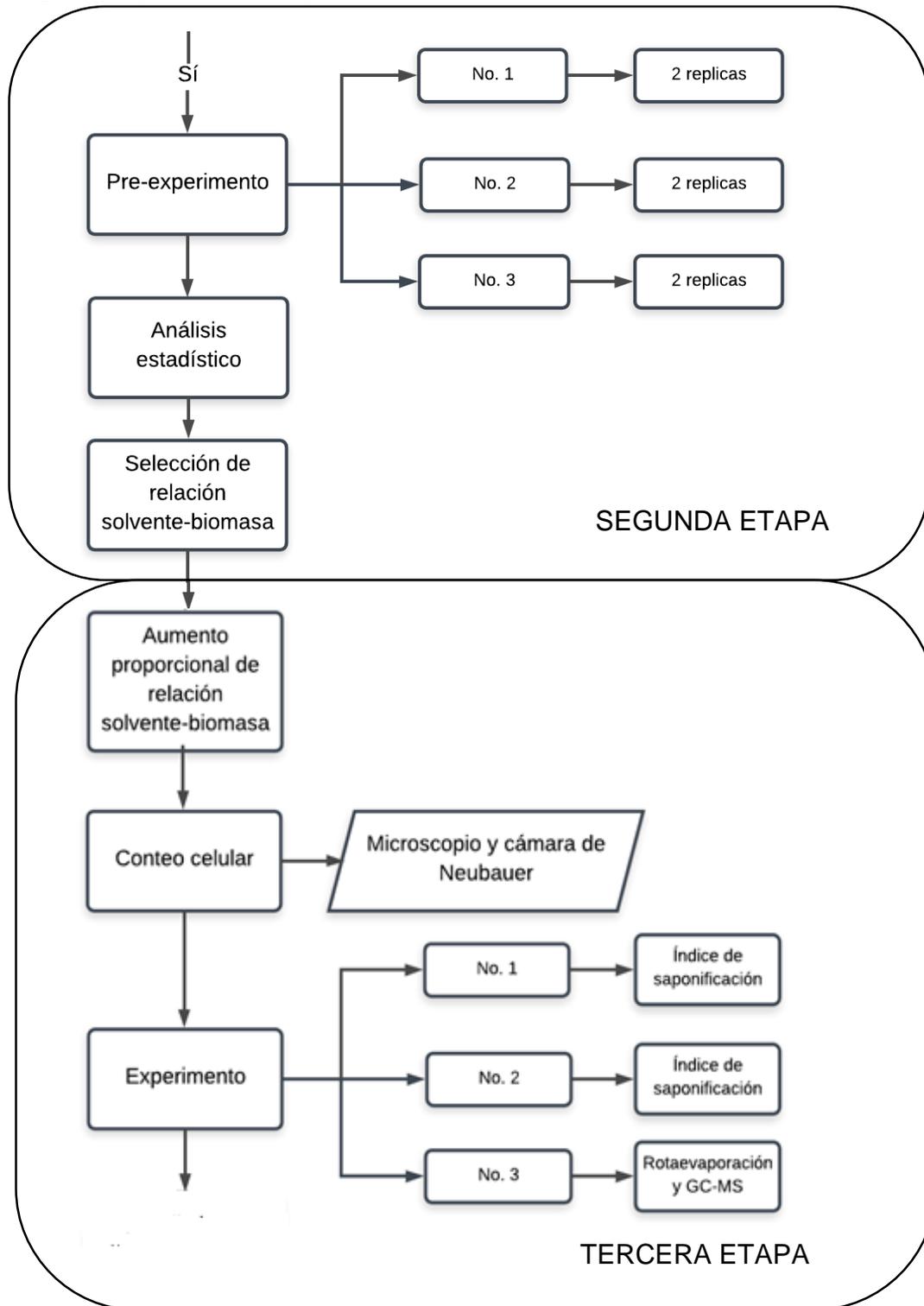
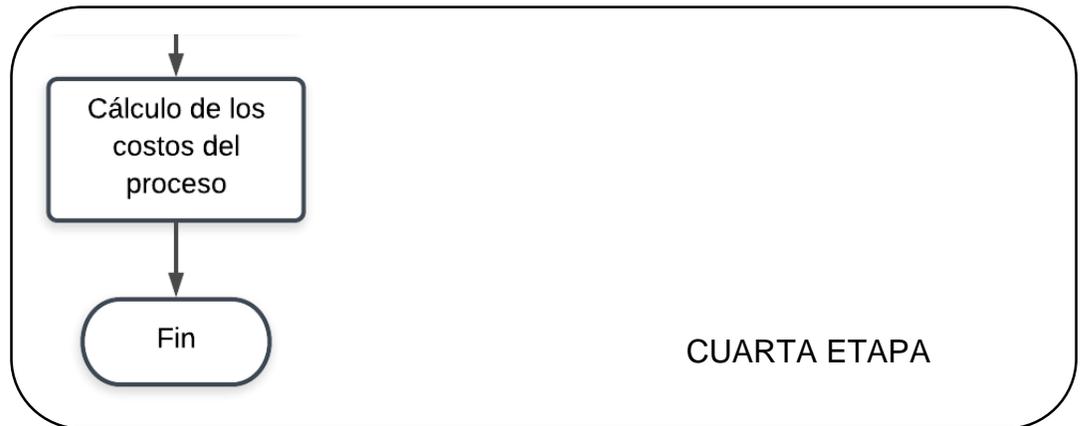


Figura 9. (Continuación)



Fuente: Elaboración propia.

2.1 PRIMERA ETAPA

En esta primera etapa se realiza la revisión teórica de las cepas microalgales teniendo en cuenta la productividad de biomasa, la composición lipídica y los factores de cultivo y crecimiento para la posterior selección mediante una matriz, así mismo se recopila la información de solventes verdes considerando aspectos importantes como el costo, la disponibilidad y la facilidad de aplicar el protocolo de extracción en la Fundación Universidad de América, que se utiliza para realizar la respectiva matriz de selección de solvente verde. A continuación se muestran los parámetros utilizados en la selección de cada uno.

2.1.1 Parámetros para la selección de la cepa microalgal. Para el desarrollo de la matriz de selección de la cepa microalgal, se plantean tres criterios: Composición lipídica con un 35% de valor, facilidad de factores de crecimiento con 25% de valor, y productividad de biomasa con un 40% de valor. Para cada cepa y cada parámetro se le dará un valor de 0 a 5, siendo 5 el mejor (ver tabla 5).

Tabla 5. Valores de la matriz de cepa microalgal

Valor/Factor	Composición lipídica (%)	Facilidad de factores de crecimiento	Productividad volumétrica de biomasa (g/L/día)
0	5% - 10%	Aireación (Caudal de 4L/min), pH, luz y nutrientes (Foliagro) a condiciones de laboratorio. Variación de temperatura.	0.01 – 0.03
1	10.01% - 15 %	Aireación (Caudal de 4L/min), temperatura, luz y nutrientes (Foliagro) a condiciones de laboratorio. Variación de pH.	0.031 – 0.05
2	15.01% - 20%	Temperatura, pH y nutrientes (Foliagro) a condiciones de laboratorio. Agitación adicional a la aireación.	0.051 – 0.09
3	20.01% - 30%	Aireación (Caudal de 4L/min), temperatura, pH y nutrientes (Foliagro) a condiciones de laboratorio. Variación de Luz y/o fotoperiodos.	0.091 – 0.15
4	30.01% - 45 %	Aireación (Caudal de 4L/min), temperatura, pH y luz a condiciones de laboratorio. Variación de nutrientes.	0.151 – 0.20
5	45.01% - 58%	Aireación (Caudal de 4L/min), temperatura, pH, luz y nutrientes (Foliagro) a condiciones de laboratorio.	0.21 – 0.26

Fuente: Elaboración propia.

2.1.2 Parámetros para la selección de solvente verde. La matriz de selección del solvente verde se realiza bajo tres criterios: Costo de solvente con un 30% de valor, disponibilidad de solvente con un 30% de valor y la factibilidad de emplear el respectivo protocolo de extracción en la universidad con un 40% de valor. Para cada solvente y cada parámetro se le dará un valor de 0 a 5, siendo 5 el mejor (ver tabla 6).

Tabla 6. Valores de la matriz de solvente.

Valor / Factor	Costo (COP por litro)	Disponibilidad	Facilidad de emplear el respectivo protocolo de extracción en la universidad
0	400,000 o más	No hay información de disponibilidad.	No se encuentra el laboratorio, ni los equipos, ni los reactivos en la universidad.
1	300,000-399,999	Hay disponibilidad en China.	Se encuentra el laboratorio, no se encuentran los equipos ni los reactivos en la universidad.
2	200,000-299,999	Hay disponibilidad en Europa.	Se encuentra el laboratorio y los equipos, no se encuentran los reactivos en la universidad.
3	100,000-199,999	Hay disponibilidad en Estados Unidos.	Se encuentra el laboratorio, los equipos, los reactivos en la universidad. El protocolo requiere el uso de laboratorio por 8 horas o más.
4	50,000-99,999	Hay disponibilidad en Colombia (otras ciudades diferentes a Bogotá).	Se encuentra el laboratorio, los equipos, los reactivos en la universidad. El protocolo requiere el uso de laboratorio entre 4 y 7 horas.
5	49,999 o menos	Hay disponibilidad en Bogotá.	Se encuentra el laboratorio, los equipos, los reactivos en la universidad. El protocolo requiere el uso de laboratorio por 2 horas o menos.

Fuente: Elaboración propia.

2.2 SEGUNDA ETAPA

En esta etapa se realiza una revisión teórica del crecimiento de la microalga seleccionada, para establecer el tiempo en donde la microalga alcanza la fase estacionaria, esta revisión tiene en cuenta el tiempo y los factores de medio de cultivo utilizados. Luego, se realiza la inoculación de los dos medios de cultivo y posteriormente se realiza la verificación de la fase estacionaria con la concentración celular. Esta etapa consiste en un pre-experimento, en el cual se utiliza un volumen de biomasa húmeda de 100 mL. Inicialmente se plantean 3 relaciones de solvente-biomasa basadas en referencias bibliográficas donde

trabajan específicamente con el solvente seleccionado previamente.; se procede a aplicar el protocolo de extracción respectivo en el periodo de fase estacionaria y se determina el volumen extraído. Finalmente, para establecer la proporción adecuada de solvente-biomasa se lleva a cabo un diseño experimental factorial analizado estadísticamente con ANOVA.

2.2.1 Cultivos. Se preparan dos cultivos compuestos de microalga y medio de cultivo con base en foliagro y agua destilada. Cada cultivo se lleva a un volumen de 3,6 L, en donde el No. 1 se utiliza para el pre-experimento y el No.2 se utiliza para el experimento.

2.2.1.1 Microalga. La microalga seleccionada es suministrada por el grupo de investigación de biotecnología con microalgas de la Fundación Universidad de América (BIOTECFUA)⁴⁷.

2.2.1.2 Medio de cultivo. Cada medio de cultivo se prepara de la siguiente manera: siguiendo la técnica aséptica descrita en el anexo B. se procede a preparar los medios de cultivo utilizando fertilizante comercial Foliagro cuya composición se encuentra descrita en el anexo A, con una concentración de 0.2% V/V. De esta manera en cada recipiente de vidrio se agregan 2 mL de fertilizante y 1000 mL de agua destilada. Lo anterior se repite para 7 recipientes de vidrio.

2.2.1.3 Condiciones de cultivo. Tomando como referencia investigaciones previas, se establecen las siguientes condiciones de cultivo necesarias para el crecimiento de la microalga:

- Temperatura: los cultivos se disponen en una incubadora de poliestireno a una temperatura ambiente que puede oscilar entre los 16 y los 27 °C⁴⁸.
- Agitación: se realiza mediante bombas de pecera marca Shark RS-610, las cuales tienen dos salidas, cada una con un caudal de 4L/min, 220V/210V y con una potencia de 5 W. La entrada de aire al cultivo se da por medio de manguera de silicona de 4 mm de diámetro.
- Fuente de luz: se emplea una luz roja suministrada a través de cinta led. Se establece un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad controlado por medio de un temporizador análogo marca Completel (T 100)⁴⁹.
- Nutrientes: los nutrientes son aportados por el medio de cultivo compuesto de fertilizante Foliagro con 0.2% V/V con agua destilada.

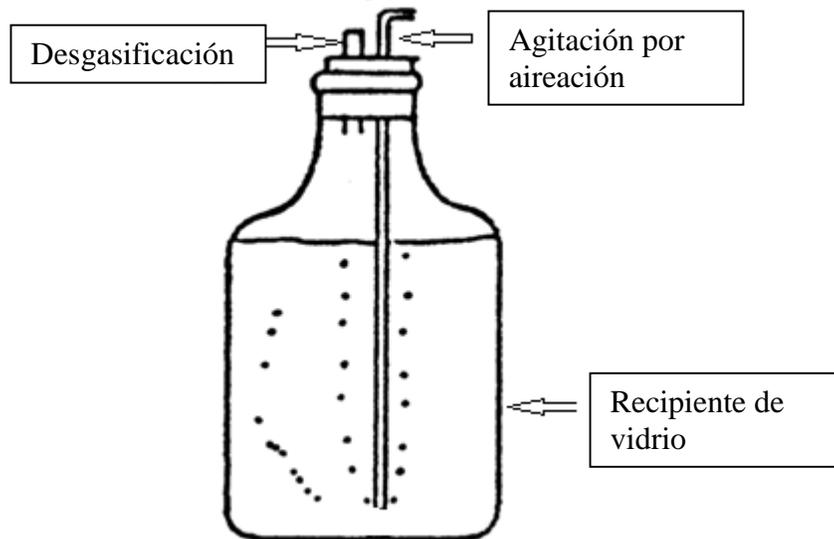
⁴⁷ SOSA, op.cit, p. 44.

⁴⁸ Ibid., p. 44.

⁴⁹ CHAPARRO, op.cit, p. 40.

2.2.1.4 Preparación de cultivos. Se utilizan fotobiorreactores adaptados (ver figura 10) con una capacidad de 4 L, y empleando la técnica aséptica del anexo B, se inoculó microalga activa junto con el medio de cultivo.

Figura 10. Esquema de fotobiorreactor adaptado



Fuente: FAO. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. [En línea]. <<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S02.htm>>. [Citado el 20 de Julio del 2018]. Modificado por autor.

Teniendo en cuenta que la capacidad máxima de cada fotobiorreactor adaptado es de 4L, al llenarse completamente no permite desgasificar, por esta razón se establece un volumen final de 3.6 L de los cultivos permitiendo la desgasificación. Adicionalmente, las condiciones de microalga-medio de cultivo se establecen empíricamente de acuerdo al color del cultivo, tomando en consideración que la inoculación es progresiva hasta llegar al volumen deseado.

El cultivo No. 1 inicialmente se inocula con 300 mL de microalga y 1.7 L de medio de cultivo, al cabo de 6 días se agrega nuevamente 200 mL de microalga y 900 mL de medio de cultivo, finalmente 3 días después se agregan 500 mL de medio de cultivo. A partir de ese momento se llega al volumen deseado y se toma como día cero. El cultivo No. 1 en conclusión se inocula a partir de 500 mL de microalga y 3.1 L de medio de cultivo. El volumen total es de 3.6 L.

El cultivo No. 2 inicialmente se inocula con 300 mL de microalga y 1 L de medio de cultivo, al cabo de 3 días se agrega 600 mL de medio de cultivo, luego de 6 días se agrega nuevamente 1 L de medio de cultivo y finalmente 3 días después se agregan 700 mL de medio de cultivo. A partir de ese momento se llega al volumen deseado y se toma como día cero. El cultivo No. 2 en conclusión se inocula a

partir de 300 mL de microalga y 3.3 L de medio de cultivo. El volumen total es de 3.6 L. Lo anterior se resume en la tabla 7.

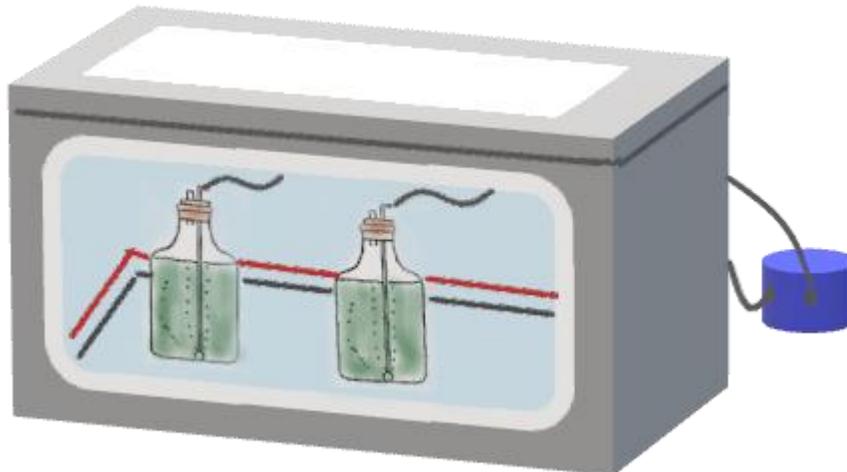
Tabla 7. Volumen de cultivos iniciales

Cultivo	Microalga [mL]	Medio de cultivo [mL]	Volumen total [mL]
No. 1	500	3100	3600
No. 2	300	3300	3600

Fuente: Elaboración propia.

Cada cultivo se realiza en un fotobiorreactor adaptado dispuesto en la incubadora de poliestireno expandido, con dos aberturas, una en la cara frontal y otra en la tapa superior en donde se encuentran dos láminas de vidrio, como se muestra en la figura 11.

Figura 11. Montaje de los cultivos



Fuente: Elaboración propia.

2.2.1.5 Fase estacionaria de la microalga. Para establecer la fase estacionaria de la microalga se procede a realizar una revisión bibliográfica, para ello se tomarán aspectos importantes de medio de cultivo y de días en los que la microalga llega a esta fase; una vez establecido el tiempo se realiza la verificación de la fase estacionaria de los cultivos por medio de conteo celular.

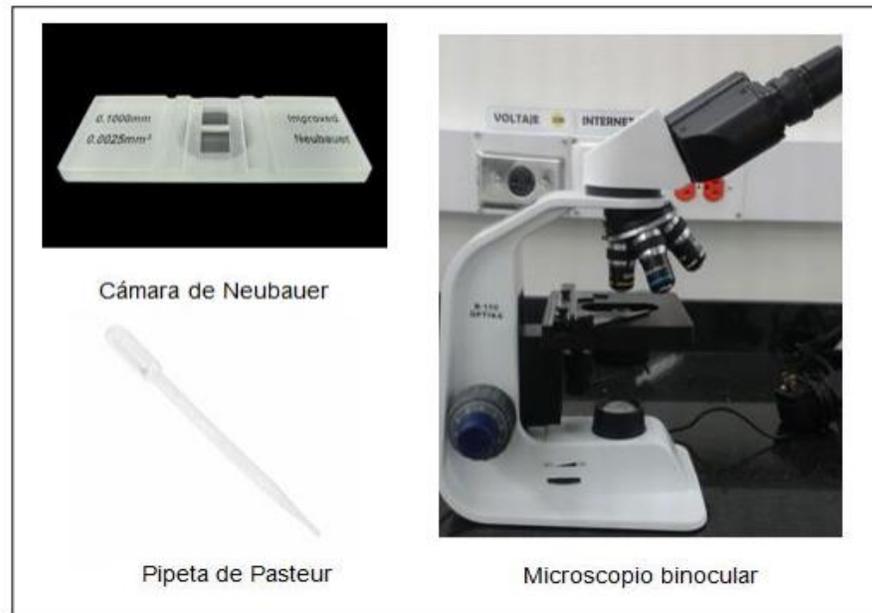
2.2.2 Concentración celular. Los conteos se realizan mediante un microscopio binocular marca Optika Italy B-150 a un objetivo de 40x, una cámara de Neubauer, cubre objetos y una pipeta de Pasteur de polietileno de 1 mL (ver figura 12) llevando a cabo el siguiente procedimiento: Se coloca el cubre objetos sobre la cámara de Neubauer, se toma la muestra del cultivo microalgal con la pipeta de Pasteur y se deposita entre la cámara y el cubre objetos para un volumen estándar 0.1 mm^3 . Luego, se ubica la cámara de Neubauer en la platina del microscopio sujetándola con las pinzas y se procede a enfocar la cuadrícula con ayuda de los anillos macro y micrométrico, asegurando que el foco de luz penetre la muestra. Finalmente se hace el recuento de las células en cinco cuadrantes: el central y los cuatro esquineros, como lo muestra la figura 7⁵⁰. La concentración celular se determina a partir de la siguiente ecuación 2:

Ecuación 2. Concentración celular⁵¹

$$\text{Concentración celular} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{número de células} * 10000}{\text{número de cuadrantes}}$$

Fuente: CHAPARRO, Gina. Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala laboratorio. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías. Bogotá. 2017. p. 45.

Figura 12. Elementos usados para el conteo celular



Fuente: SOSA, Jose; et al. Evaluación del potencial de un residuo proveniente de la industria panelera como fuente de carbono para la producción de biomasa microalgal. Bogotá. 2017. p. 53.

⁵⁰ SOSA, op.cit, p. 52.

⁵¹ CHAPARRO, op.cit, p. 45.

2.2.3 Relaciones de solvente-biomasa. Inicialmente, se realiza una revisión bibliográfica de las relaciones de solvente-biomasa empleada por diferentes autores, cabe aclarar que en algunos estudios como los de Tanzi y otros autores, trabajan con biomasa seca y por lo tanto es necesario calcular la biomasa húmeda a partir de la productividad volumétrica teórica, empleando la ecuación 3; así mismo con la ecuación 4 y 5 se calcula el respectivo volumen de solvente equivalente a 100 mL de biomasa húmeda, volumen que se trabaja en el pre-experimento. Una vez definidos las relaciones de solvente biomasa, se procede a aplicar el protocolo de extracción escogido en la primera etapa.

Ecuación 3. Biomasa húmeda

$$V_b (mL) = \frac{1}{P_b \left(\frac{g}{L * día} \right) * t (días) * \frac{1}{W_s (g)} * \frac{1 L}{1000 mL}}$$

Ecuación 4. Peso seco en 100 mL de biomasa húmeda

$$W_{S-EQ}(g) = \frac{W_s (g) * 100 mL biomasa húmeda}{V_b (mL)(Ec. 3)}$$

Ecuación 5. Volumen de solvente

$$V_{S-EQ} (mL) = W_{S-EQ} (mL)(Ec. 4) * \frac{V_s mL}{W_s (g)}$$

Donde V_b es el volumen de biomasa húmeda, P_b es la productividad volumétrica, t es el tiempo, W_s es el peso seco utilizado, V_s es el volumen de solvente utilizado, W_{S-EQ} y V_{S-EQ} son el peso seco y el volumen de solvente equivalentes a 100 mL de biomasa húmeda respectivamente.

2.2.4 Análisis estadístico. Se utiliza el análisis estadístico para determinar si hay diferencia significativa en la relación de solvente-biomasa por el cambio en la relación de solvente-biomasa, para ello se realiza el diseño experimental factorial analizado estadísticamente con ANOVA (ver tabla 8), teniendo como variable respuesta el volumen extraído y como factor la relación de solvente-biomasa, de igual manera se toma como variable independiente la concentración celular ya que al determinar la fase estacionaria, se estima que no hay un cambio considerable en la concentración celular que pueda afectar el contenido lipídico. Adicionalmente, cada proceso de extracción se realizará por duplicado en cada nivel.

Ho: La hipótesis nula plantea que no hay diferencia significativa en el volumen extraído por el cambio de la relación de solvente-biomasa.

H1: La hipótesis alterna plantea que hay diferencia significativa en el volumen extraído por el cambio de la relación de solvente-biomasa.

Para la determinación de resultados, se hace uso de la opción de Análisis de varianza de un factor en la herramienta de análisis de datos del software EXCEL.

Tabla 8. Estructura de tabla ANOVA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor de F
Entre grupos	SCETR	K - 1	CMETR	
Dentro de grupos	SCDER	N - K	CMDER	F
Total	SCT	N - 1	CMT	

Fuente: Elaboración propia basado en software EXCEL.

2.3 TERCERA ETAPA

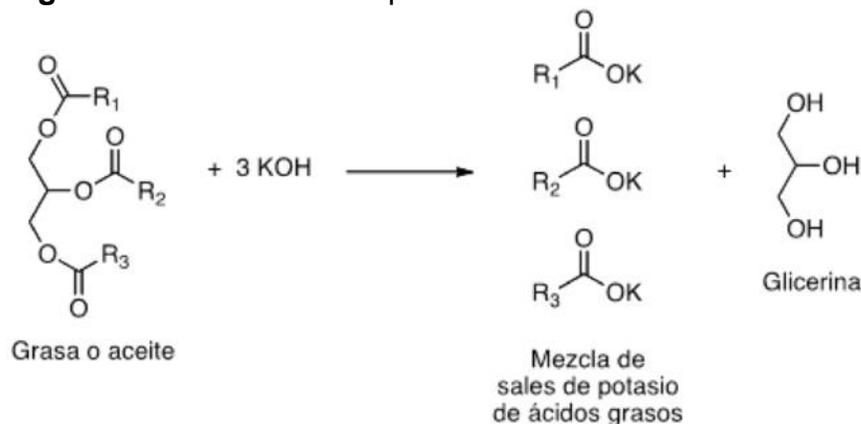
Esta etapa corresponde al experimento y es dependiente de los resultados de las etapas anteriores, de manera que teniendo en cuenta la microalga seleccionada, el solvente escogido y la relación solvente-biomasa obtenida de la segunda etapa, se procede a escalar la relación de solvente-biomasa al triple de una manera proporcional, ya que al utilizar un volumen de biomasa húmeda de 300 mL el proceso de extracción se puede realizar en un tiempo de 3 a 4 horas aproximadamente, que es el tiempo que se dispone del laboratorio; además se utiliza este volumen ya que permite realizar varias repeticiones de acuerdo a lo inoculado inicialmente. Posteriormente se realiza el proceso de extracción y al extracto que corresponde a la fase orgánica, se le determina el porcentaje de pérdidas y el índice de saponificación, lo anterior se realiza con dos replicas. Finalmente, se realiza una tercera réplica del proceso de extracción, en donde al extracto se le realiza una rotaevaporación y un GC-MS en el Departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana. Con los resultados del análisis se obtiene el porcentaje de lípidos. Con la ecuación 6, se calcula el porcentaje de pérdidas expresado como %P, en donde V_i es el volumen inicial de solvente y V_f es el volumen final de la fase orgánica.

Ecuación 6. Porcentaje de pérdidas del proceso de extracción

$$\%P = \frac{V_i - V_f}{V_i} * 100$$

2.3.1 Índice de saponificación (NTC 335⁵²). Se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para saponificar un gramo de aceite o grasa. De manera que este índice permite conocer el “peso molecular o tamaño medio de las cadenas de ácidos grasos constituyentes de un aceite o grasa”⁵³. La reacción de saponificación se muestra en la figura 13.

Figura 13. Reacción de saponificación



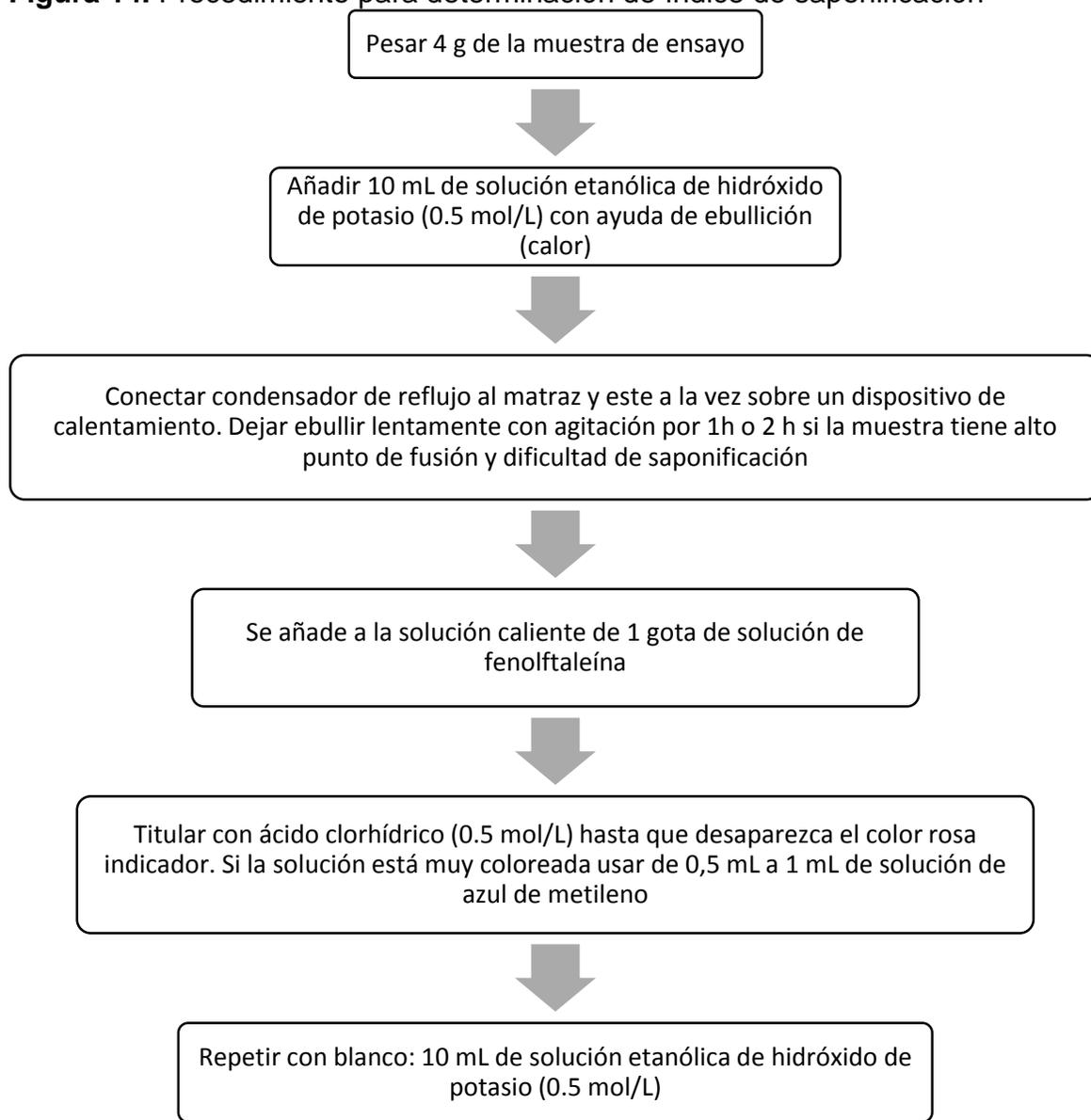
Fuente: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La química del jabón y algunas aplicaciones. [En línea]. <<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num5/art38/>>. [Citado en 29 de Marzo de 2018].

Adicionalmente, el procedimiento tomado de la norma NTC 335 y el montaje para la determinación del índice de saponificación se muestra en la figura 14 y 15 respectivamente. Cabe resaltar que la norma recomienda pesar 2 g de muestra para índices de saponificación entre 170 y 200; si este índice varía se recomienda modificar la masa. Por esta razón, se realiza la modificación teniendo en cuenta que el extracto obtenido está con otros componentes y con gran parte del solvente.

⁵² INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Norma técnica colombiana. Grasas y aceites animales y vegetales. Determinación del índice de saponificación. NTC 335. 1998. En línea < <https://patriciatocorafcca.wikispaces.com/file/view/NTC335.pdf>>. [Citado en 10 de Enero de 2018].

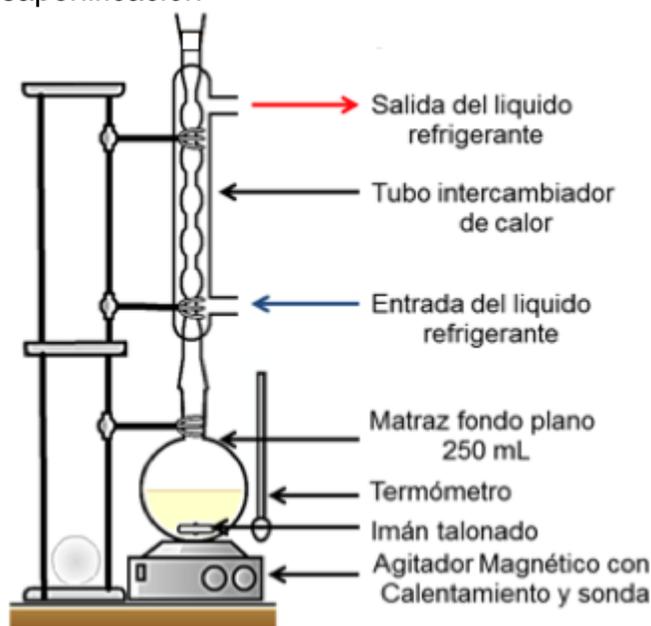
⁵³ HERNÁNDEZ, María. Determinación del índice de saponificación de aceite de maíz usando una lipasa de procedencia nacional. Universidad de los Andes, 2017. p. 30.

Figura 14. Procedimiento para determinación de índice de saponificación



Fuente: Elaboración propia basado en: INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Norma técnica colombiana. Grasas y aceites animales y vegetales. Determinación del índice de saponificación. NTC 335. 1998. En línea <<https://patriciatocorafcca.wikispaces.com/file/view/NTC335.pdf>>. [Citado en 10 de Enero de 2018].

Figura 15. Montaje para determinación de índice de saponificación



Fuente: RAMÓN, Jacipt; et al. Obtención de Biodiésel a partir de aceite y semillas de *Jatropha curcas*, utilizando catalizadores inmovilizados y transesterificación in situ asistida por ultra sonido. Revista Espacios. Vol. 39. p. 24. [En línea] <<http://www.revistaespacios.com/a18v39n16/18391624.html>>. [Citado en 29 de Marzo de 2018]. Modificado por autor.

Para el cálculo del índice de saponificación de una muestra se utiliza la ecuación 7.

Ecuación 7. Determinación de índice de saponificación

$$I_s = (V_0 - V_1) * \frac{c * 56.1}{m}$$

Fuente: INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Norma técnica colombiana. Grasas y aceites animales y vegetales. Determinación del índice de saponificación. NTC 335. 1998. En línea < <https://patriciatocorafcca.wikispaces.com/file/view/NTC335.pdf>>. [Citado en 10 de Enero de 2018].

En donde:

- V_0 = Volumen en mililitros de la solución volumétrica normalizada de ácido clorhídrico usado en el ensayo en blanco.
- V_1 = Volumen en mililitros de la solución volumétrica estándar de ácido clorhídrico usado en la determinación.
- c = Concentración exacta en moles por litro de la solución volumétrica estándar de ácido clorhídrico.

- m = Masa en gramos de la porción de ensayo.
- Is = Índice de saponificación en mg de KOH por g de grasa.

Así mismo, el índice de saponificación permite calcular el peso molecular de los ácidos grasos presentes en la muestra. Ya que en la reacción por cada mol de grasa reacciona con tres moles de KOH, cada mol de grasa consumirá 168000 mg de KOH⁵⁴, de manera que la ecuación 8 describe lo anterior y permite formular que el índice de saponificación es indirectamente proporcional al peso molecular.

Ecuación 8. Peso molecular

$$I_s = \frac{168000 \text{ mg KOH/mol grasa}}{\text{Peso molecular} * 3 \text{ mol}}$$

Fuente: RODRÍGUEZ, Arzave. et al. Índice de saponificación de mayonesas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencia Biológicas. México. 2016. Vol 1. No. 2. p. 839. [En línea] <<http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/10/145.pdf>>. [Citado en 20 de julio de 2018].

2.4 CUARTA ETAPA

En esta última etapa se obtiene los costos para la producción de biomasa y la respectiva extracción, teniendo en cuenta que solo se evalúan costos operativos en la fase de producción y costos operativos, fijos y variables en la fase de extracción. Estos costos de extracción se comparan con el protocolo Bligh & Dyer.

⁵⁴ RODRÍGUEZ, Arzave. et al. Índice de saponificación de mayonesas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencia Biológicas. México. 2016. Vol 1. No. 2. p. 839. Citado en 20 de julio de 2018. [En línea] <<http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/10/145.pdf>>.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 PRIMERA ETAPA

Se realiza la selección de la cepa microalgal y el solvente verde a utilizar teniendo en cuenta la revisión bibliográfica respectiva.

3.1.1 Revisión bibliográfica de las cepas microalgales. La información recopilada se muestra en la tabla 9, en la cual se recopilaron diferentes aspectos relevantes de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus*.

Tabla 9. Recopilación bibliográfica de las cepas microalgales

Especie de microalga	Contenido lipídico (%)	Productividad de lípidos (mg/L/día)	Productividad volumétrica de biomasa (g/L/día)	Tipo/Medio	Condiciones de cultivo	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0 - 58.0	11.2 - 40.0	0.02 – 0.20	N.E	N.E	(MATA, et al. 2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	N.E	N.E	0.08 ± 2	Autotrófica	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración inicial = 50 mg/L • Temperatura = 27 ± 1 °C 	(GONCALVES, et al. 2018)
<i>Chlorella vulgaris</i>	15 – 58	N.E	N.E	N.E	N.E	(ARIAS, et al. 2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	45.44	67.4 ± 2.5	N.E	Mixotrófica (glucosa y CO ₂) Agua dulce	<ul style="list-style-type: none"> • Medio basal • Limitación de nitrógeno 	(YEH, et al. 2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	N.E	N.E	1.1	N.E	<ul style="list-style-type: none"> • pH de 7 • Volumen de trabajo = 1.4 L 	(HERNÁNDEZ. 2016)
<i>Chlorella vulgaris</i>	N.E	N.E	0.35	Medio basal de Bold (BBM)	<ul style="list-style-type: none"> • Volumen de trabajo = 6 L • Temperatura = 25 °C • Agitación = 100 rpm 	(BLAIR, et al. 2014)
<i>Chlorella vulgaris</i>	N.E	N.E	0.05	Foliagro	<ul style="list-style-type: none"> • Volumen de trabajo = 3.8 L 	(SOSA, et al. 2017)

Tabla 9. (Continuación)

Espece de microalga	Contenido lipídico (%)	Productividad de lípidos (mg/L/día)	Productividad volumétrica de biomasa (g/L/día)	Tipo/Medio	Condiciones de cultivo	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	N.E	N.E	0.047	Medio con cromo	<ul style="list-style-type: none"> Volumen de trabajo = 2 L <ul style="list-style-type: none"> Medio agar BBM Temperatura = 24 ± 2 °C Fotoperiodo = 16:8 de luz:oscuridad Agitación = 120 rpm 	(FORERO. 2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	A: 20 H: 16 M: 53		A: 0.8 g/L H: 0.2 g/L M: 3 g/L	Autotótrofa, heterótrofa y mixotrófica respectivamente, de agua dulce	N.E	(LIN, et al. 2015)
<i>Chlorella vulgaris</i>	18.4	36.9	0.2	De agua dulce	<ul style="list-style-type: none"> Volumen de trabajo = 250 mL Temperatura = 25 °C Aireación con aire rico en CO₂ 	(RODOLFI, et al. 2008)

Tabla 9. (Continuación)

Espece de microalga	Contenido lipídico (%)	Productividad de lípidos (mg/L/día)	Productividad volumétrica de biomasa (g/L/día)	Tipo/Medio	Condiciones de cultivo	Referencia
<i>Scenedesmus sp.</i>	19.6	40.8	0.21	De agua dulce	<ul style="list-style-type: none"> Volumen de trabajo = 250 mL Temperatura = 25 °C Aireación con aire rico en CO ₂	(RODOLFI, et al. 2008)
<i>Scenedesmus acutus</i>	N.E	N.E	0.048	Medio con cromo	<ul style="list-style-type: none"> Volumen de trabajo = 2 L Medio agar BBM Temperatura = 24 ± 2 °C Fotoperiodo = 16:8 de luz:oscuridad Agitación = 120 rpm 	(FORERO. 2012)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	Aprox. 14%	N.E	0.17	Limitación de nitrógeno y luz	<ul style="list-style-type: none"> Volumen de trabajo = 600 mL Temperatura = 25 ± 2 °C 	(WANG, et al. 2013)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	31	N.E	N.E	N.E	N.E	(ARIAS, et al. 2013)
<i>Scenedesmus sp.</i>	19.6 – 21.1	40.8 – 53.9	0.03 – 0.26	N.E	N.E	(MATA, et al. 2010)

Tabla 9. (Continuación)

Espece de microalga	Contenido lipídico (%)	Productividad de lípidos (mg/L/día)	Productividad volumétrica de biomasa (g/L/día)	Tipo/Medio	Condiciones de cultivo	Referencia
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	14	N.E	N.E	N.E	<ul style="list-style-type: none"> • Volumen de trabajo = 2 L • Temperatura = 30 °C • Aireación continua de 2.5% (V/V) CO₂ (Aire enriquecido) • Sedimentación natural a las 12h 	(CHNG, et al. 2016)
<i>Scenedesmus sp.</i>	N.E	N.E	0.01	Medio de cultivo planteado por autores (Estandar 1)	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura = 25 ± 3 °C • Fotoperiodo de 12:12 luz:oscuridad • Agitación 200 rpm 	(QUEVEDO, et al. 2008)

Fuente: Elaboración propia.

3.1.2 Selección de la cepa microalgal. Tomando como referencia los datos recolectados de la tabla 9, se desarrolla la matriz de selección bajo los criterios de la tabla 5.

Teniendo en cuenta la diversidad de estudios que se han realizado en el tema, se determina que los datos son muy variables en consecuencia a que cada estudio manejó diferentes medios y condiciones de cultivo. Sin embargo, en el estudio de Rodolfi y otros autores, realizaron una investigación a ambas cepas microalgales bajo las mismas condiciones, cabe resaltar que trabajan con *Scenedesmus sp.*, no obstante es del mismo género que *Scenedesmus dimorphus*. Por lo tanto, se considera que los datos de este estudio son relevantes, y por ello son los que se tienen en cuenta para la matriz. Además, se encontró que *Scenedesmus dimorphus* se sedimenta con mayor facilidad que *Chlorella vulgaris*, esto se debe a que tiene una pared celular rígida y por lo tanto requiere de un sistema de agitación adicional. Por lo anterior, en cuanto a la composición lipídica ambas cepas microalgales presentan un valor similar, obteniendo la misma calificación; de acuerdo a las facilidades de factores de crecimiento, la calificación de *Scenedesmus dimorphus* es de 2 debido a la rigidez de la pared que implica mayor agitación y que además puede ser un obstáculo de la extracción en el momento del contacto de la membrana con el solvente, y por último en cuanto a la productividad volumétrica ambas cepas microalgales tienen un valor similar. Los resultados se resumen en la tabla 10.

Tabla 10. Matriz de selección de la cepa microalgal

Microalga/Factor	Composición lipídica (35%)	Facilidad de factores de crecimiento (25%)	Productividad volumétrica de biomasa (40%)	Total
<i>Chlorella vulgaris</i>	2 → (18.4%)	5 → (Todas las condiciones iguales de laboratorio)	4 → (0.2 g/L/día)	3.55
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	2 → (19.6%)	2 → (Agitación adicional para evitar sedimentación)	5 → (0.21 g/L/día)	3.20

Fuente: Elaboración propia.

Por lo anterior, se determina que la microalga a la cual se le realiza la metodología planteada es *Chlorella vulgaris*, ya que obtiene el mayor promedio ponderado.

3.1.3 Revisión bibliográfica de los solventes verdes. La información recopilada se muestra en el cuadro 1, en donde se realizó una caracterización de los solventes verdes empleados por diferentes investigaciones.

Cuadro 1. Caracterización de solventes

Solvente	Propiedad	Microalga	Extracción	Tiempo	Referencia	Costo	Disponibilidad
Dimetil éter (DME) licuado	No-tóxico No requiere: secado, disrupción celular ni calentamiento de solvente.	<i>Microcystis</i>	Compresión con gas nitrógeno, extracción en una columna Temperatura: 20°C Volumen de DME licuado: 100 cm ³ . Por último, requiere un análisis basado en el método Bligh y Dyer.	N.E	(KANDA, et al. 2011)	1,368 COP por mL	Envío de USA a Colombia, en aproximadamente 14 días.
		<i>Microcystis aeruginosa</i>			(KANDA, et al. 2012)		
N-etil butilamina (EBA)	Alta eficiencia de extracción lipídica y energética. Extracción húmeda sin disrupción celular.	<i>Neochloris oleoabundans</i>	La pasta de microalga se mezcla con agua, y se liofiliza. Uso del método Bligh Y Dyer.	45 min	(BOELO, et al. 2016)	-	-

Cuadro 1. (Continuación).

Solvente	Propiedad	Microalga	Extracción	Tiempo	Referencia	Costo	Disponibilidad
D-limoneno	Solvente Verde	<i>Nannochloropsis sp.</i>	Disrupción celular con alta presión (100 y 250 MPa). Extracción húmeda con 10 ± 0.2 mL de cultivos a 1.34 g/L de biomasa hambrientas hambrientas con 5.0 ± 0.2 mL de solvente para obtener una relación de	20 min	(ANGLES, et al. 2017)	30,000 COP medio litro	Bogotá. Químicos el alquimista.
Ciclopentil metil éter (CPME)	Solventes alternativos de la química verde					-	-
Metil tertbutil éter (MTBE)			Volumen solvente y fase acuosa de 0.5. Extracción durante 10 ± 0.02 min con mezclado a 2500 rpm (vortex) a 20 ± 0.4°C. Centrifugación por 10 ± 0.02 min a 3600 g de fuerza. Separación de fase orgánica y acuosa.			-	-
2-Metil tetrahidrofuran (MeTHF)						65 US /kg equivalente a 167,700 COP/L	China. Envío entre 10 y 14 días a USA y envío de USA a Colombia aproximadamente 14 días.

Cuadro 1. (Continuación)

<i>d</i> - Limoneno	Terpenos. Solventes verdes	<i>Chlorella vulgaris</i>	Centrifugación, pasta de microalga a -80°C, liofilización. Extracción Soxhlet usando 300 mL de solvente verde y 10 g de microalga seca.	8 Horas	(TANZI, et al. 2012)	30,000 COP medio litro	Bogotá. Químicos el alquimista.
α - Pineno	Son seguros (No inflamables ni peligrosos)		Destilación Clevenger para la separación del solvente y los lípidos.			150 US/Gal ón equival ente a 118,87 7 COP/L	Estados unidos. Envió entre 10 y 14 días a Colombia.

Fuente: Elaboración propia.

3.1.4 Selección del solvente verde y el respectivo protocolo. Tomando como referencia los datos recolectados de la cuadro 1, se desarrolla la matriz de selección bajo los criterios planteados en la tabla 6. Los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Matriz de selección de solvente

Solvente/Factor	Costo (30%)	Disponibilidad (30%)	Facilidad de emplear el respectivo protocolo de extracción en la universidad (40%)	Total
Dimetil éter (DME) licuado	0 → (1,368,000 COP por litro)	3 → (Hay disponibilidad en Estados Unidos)	1 → (Columna de extracción con gas nitrógeno)	1,3
N-etil butilamina (EBA)	0 → (No hay información)	0 → (No hay información de disponibilidad)	1 → (Liofilización)	0.4
D-Limoneno (Extracción húmeda con centrifugación)	4 → (60,000 COP por litro)	5 → (Hay disponibilidad en Bogotá)	5 → (Centrifugación y mezclado; menos de 2 horas)	4.7
Ciclopentil metil éter (CPME)	0 → (No hay información)	0 → (No hay información de disponibilidad)	5 → (Centrifugación y mezclado; menos de 2 horas)	2
Metil tertbutil éter (MTBE)	0 → (No hay información)	0 → (No hay información de disponibilidad)	5 → (Centrifugación y mezclado; menos de 2 horas)	2
2-Metil tetrahidrofuran (MeTHF)	3 → (167,700 COP por litro)	1 → (Hay disponibilidad en China)	5 → (Centrifugación y mezclado; menos de 2 horas)	3.2
D-Limoneno (Extracción Soxhlet)	4 → (60,000 COP por litro)	5 → (Hay disponibilidad en Bogotá)	3 → (Extracción Soxhlet por 8 horas)	3.9
Pineno	3 → (118,877 COP por litro)	3 → (Hay disponibilidad en Estados Unidos)	3 → (Extracción Soxhlet por 8 horas)	3

Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo con la matriz de selección, los solventes con mayor promedio ponderado son el D-Limoneno con los diferentes protocolos de extracción y el 2-Metil tetrahidrofuran (MeTHF), sin embargo este último tiene el inconveniente de

que no se encuentra disponible en el continente americano y por lo tanto se deben realizar dos envíos que tienen costos adicionales. Por otro lado, entre estos solventes el que tuvo el mayor puntaje fue el D-Limoneno con el protocolo de extracción húmedo en donde los equipos de centrifuga y agitador se encuentran en la universidad y su duración es menor a las 2 horas, comparado con la extracción Soxhlet que dura 8 horas o incluso más dependiendo de la cantidad de solvente utilizado y requiere de una biomasa liofilizada. Por lo tanto, el solvente que se selecciona es el D-Limoneno con el protocolo de extracción en húmedo con centrifuga.

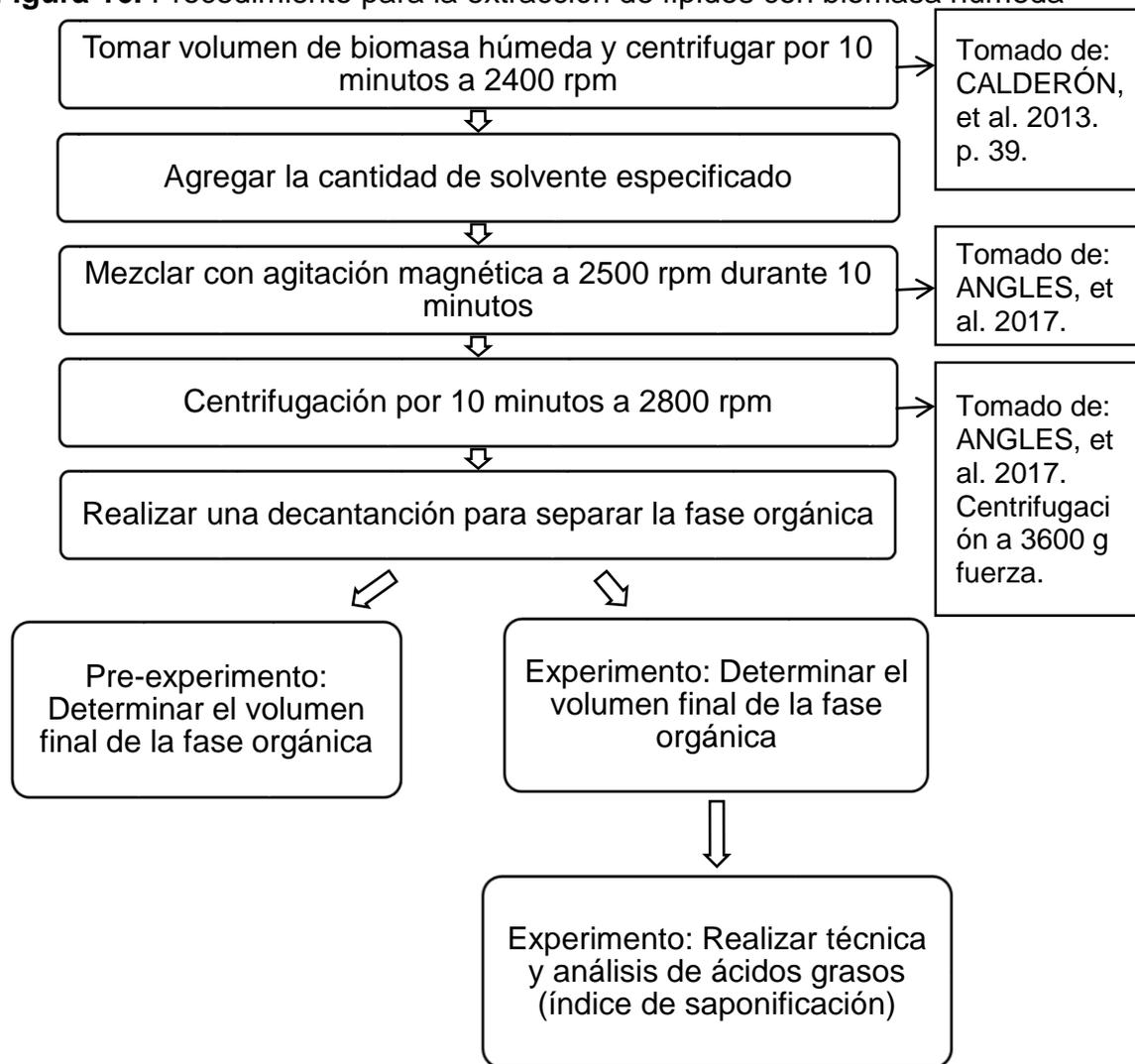
Teniendo en cuenta lo anterior, en la figura 16 se especifica el protocolo de extracción correspondiente al D-Limoneno, el cual se basa en el artículo de Angles y otros autores llamado "Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent screening". Cabe resaltar que en este artículo evalúan la disrupción celular con presión mecánica, que a diferencia de este trabajo no se realizará por la falta de dicho equipo en el laboratorio. No obstante, se realizará una etapa de centrifugación (tomada del protocolo Bligh & Dyer manejado en otros estudios) previa a la extracción con el fin de debilitar la pared celular y producir una lisis celular. Por otro lado, en el mismo estudio, para la centrifugación de solvente-biomasa utilizan 3600 g fuerza, que equivalen a 4000 rpm⁵⁵ para una centrifuga de 20 cm de radio. En el laboratorio se dispone de una centrifuga Baby I Mod. 206, que tiene un radio de 20 cm, dispone de 8 portamuestras con capacidad de máximo 15 mL y velocidades de máximo 3600 rpm⁵⁶, por esta razón también se modifica la velocidad con la se trabaja en la extracción; de manera que se utiliza una velocidad de 2800 rpm con un volumen en cada portamuestra de 10 mL en la centrifuga de laboratorio, con el fin de reducir tiempos en el proceso de extracción, debido a que para llegar a la máxima velocidad se deben trabajar volúmenes por debajo de 5 mL y esto implica un proceso largo de centrifugación. Adicionalmente, se dispone en el laboratorio de una plancha de agitación magnética Thermolyne Barnstead SP46925, que debido al tiempo de uso, se ha desgastado en la zona de lectura de agitación y temperatura. Por esta razón, la agitación se realiza en la plancha hasta conseguir un vórtice. Así mismo esto puede conducir a un error en el proceso; con el objeto de disminuir este error, la muestra se deja en agitación constante mientras parte de la misma se centrifuga, es decir, que el proceso de agitación pasados los 10 minutos, se toma los primeros 80 mL para centrifugar y el volumen restante se continua agitando.

⁵⁵ ROJAS, Alberto. Método: Conversión de las fuerzas g (RCF) a revoluciones por minuto (rpm) y Equilibrio del rotor. Conosagi.org. 2018. Citado en 30 de julio de 2018. [En línea] <<http://conogasi.org/articulos/metodo-conversion-de-las-fuerzas-g-rcf-a-revoluciones-por-minuto-rpm-y-equilibrio-del-rotor/>>.

⁵⁶ TECNAL. Equipamientos científicos. Centrifuga 206-BABY I. Citado en 1 de Agosto de 2018. [En línea] <<http://tecnal.com.br/produtos/centrifuga-baby-i-fanem/>>

Por otro lado, el D-Limoneno se compró en Químicos el alquimista, en la ciudad de Bogotá. Corresponde al LOTE 20165365/1 y tiene una fecha de vencimiento a noviembre de 2018.

Figura 16. Procedimiento para la extracción de lípidos con biomasa húmeda



Fuente: Elaboración propia.

3.2 SEGUNDA ETAPA

En esta etapa se establece la proporción adecuada de solvente-biomasa por medio de un pre-experimento, utilizando un volumen de biomasa húmeda de 100 mL.

3.2.1 Concentración celular del pre-experimento. Inicialmente, se realiza la revisión teórica del crecimiento de la microalga planteada en la metodología. La información recopilada se muestra en el cuadro 2, donde se tiene en cuenta los días en que *Chlorella vulgaris* alcanza la fase estacionaria.

Cuadro 2. Revisión bibliográfica de fase estacionaria de la cepa microalgal

Día en que llega a fase estacionaria	Condiciones de cultivo	Fuente
Día 9	Volumen de 100 mL de microalga, 150 mL de medio de cultivo y 50 mL de suero lácteo.	(CHAPARRO. 2017)
Día 14	Cultivo control: 3.8 L de Medio de cultivo y microalga.	
Día 11	Cultivo control: Microalga y medio de cultivo.	(SOSA, et al. 2017)
Día 10	Volumen de 100 mL de microalga adaptada y 900 mL de agua residual tratada.	(CARTAGENA, et al. 2017)
Día 11	Volumen de 100 mL de microalga no adaptada y 900 mL de agua residual tratada.	
Día 12	Todos los volúmenes de cultivo del experimento.	(EL-KASSAS, et al. 2014)

Fuente: Elaboración propia.

Teniendo en cuenta los datos recolectados, se determinó que la fase estacionaria en condiciones de cultivo a las cuales se encuentra la microalga trabajada y el respectivo medio de cultivo, es de entre 11 y 14 días aproximadamente. Por lo tanto, se procede a realizar un seguimiento de la concentración celular a partir del día 11 para el medio de cultivo 1, utilizado para el pre-experimento; se recolectaron datos de número de células y se calculó la concentración celular con la ecuación 2. Los resultados se muestran en la tabla 12 y la gráfica 1.

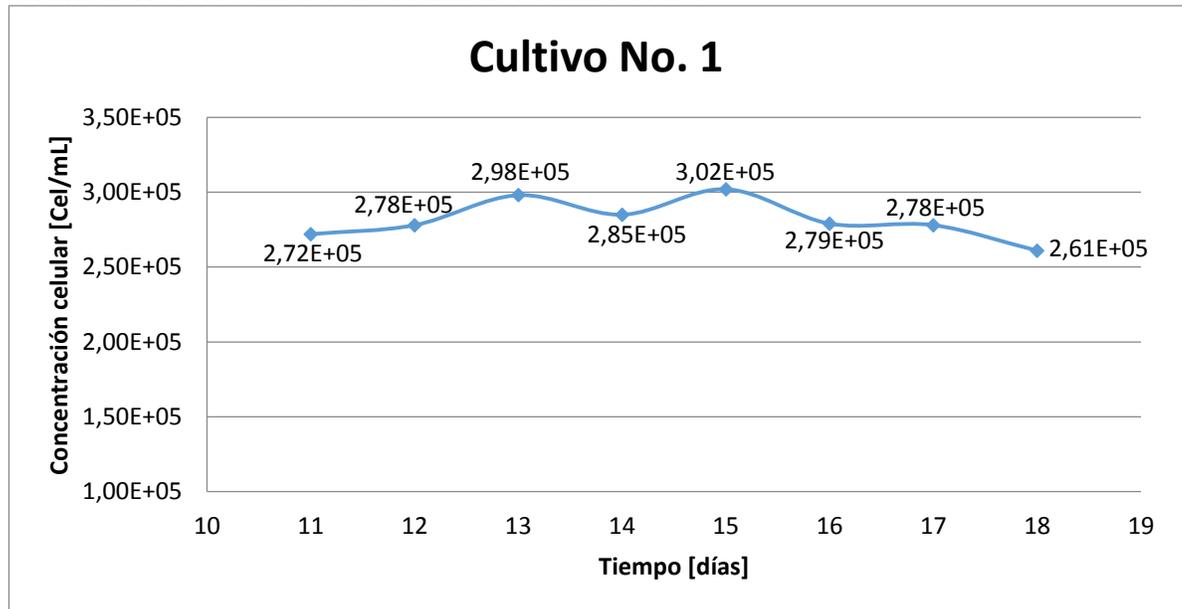
Tabla 12. Concentración celular del cultivo No. 1

Día	Número de células (primer conteo)	Número de células (segundo conteo)	Número de células promedio	Concentración celular [cel/mL]
11	100	172	136.0	2,72E+05
12	134	144	139.0	2,78E+05
13	146	152	149.0	2,98E+05
14	176	109	142.5	2,85E+05
15	150	152	151.0	3,02E+05
16	134	145	139.5	2,79E+05
17	132	146	139.0	2,78E+05
18	120	141	130.5	2,61E+05

Fuente: Elaboración propia.

Obteniendo la siguiente gráfica:

Gráfica 1. Concentración celular del cultivo No. 1



Fuente: Elaboración propia.

Como se puede observar en la gráfica, la concentración celular del cultivo 1, se mantiene ligeramente estable dentro de un rango de 261000 cel/mL a 302000 cel/mL; sin haber un cambio considerable. Por lo tanto, se considera que el cultivo 1 a partir del día 11 cuando se comenzó a realizar el conteo celular hasta el día 18 se encuentra en fase estacionaria. A partir del día 13, se comienza a realizar el pre-experimento.

3.2.2 Relaciones de solvente-biomasa. Se realiza una revisión bibliográfica como se muestra en el cuadro 3 de las relaciones de solvente-biomasa empleada por diferentes autores, en algunos estudios trabajaron con biomasa seca y por lo tanto se calcula la biomasa húmeda y el volumen de solvente respectivo para 100 mL de biomasa con las ecuaciones 3, 4 y 5, a partir de la productividad volumétrica teórica del estudio de Rodolfi y otros autores en la tabla 9 (0.2 g/L*día). Se obtienen los datos del cuadro 3 y bajo estos datos se plantea las proporciones que se realizan en el pre-experimento.

Cuadro 3. Revisión bibliográfica de relaciones solvente-biomasa

Solvente utilizado	Relación solvente-biomasa	Fuente
D-Limoneno	5 mL solvente: 10 mL biomasa húmeda. (50 mL de solvente: 100 mL de biomasa húmeda)	(ANGLES, et al. 2017)
Terpenos	100 mL de solvente : 12 g de biomasa en peso seco (2 mL de solvente: 100 mL de biomasa húmeda)	(TANZI, et al. 2013)
Terpenos	300 mL de solvente : 10 g de biomasa seca (7 mL de solvente : 100 mL de biomasa húmeda)	(TANZI, et al. 2012)

Fuente: Elaboración propia.

Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica, estos datos se toman como base para el planteamiento de las relaciones solvente-biomasa que se proponen a continuación:

- a. Relación de solvente-biomasa 50 mL de solvente: 100 mL de biomasa húmeda. Se toma esta relación con base en el artículo de Angles y otros autores, en donde utilizan el método de extracción que se seleccionó en la primera etapa del proyecto. Por lo tanto, es importante tener en cuenta la relación utilizada con el respectivo procedimiento de extracción de lípidos.
- b. Relación de solvente-biomasa 30 mL de solvente: 100 mL de biomasa húmeda. Esta relación se plantea teniendo en cuenta los artículos de Tanzi y otros autores en los que utilizan la extracción de lípidos con biomasa seca y por lo tanto se hace un cálculo aproximado con la productividad volumétrica de la cepa para obtener la biomasa húmeda, encontrando así mismo un volumen aproximado de solvente, el cual tiende a ser muy bajo (de 2 a 7 mL) con respecto a la biomasa empleada y con respecto al artículo de Angles y otros autores (50 mL) en donde se utilizó biomasa húmeda. Por lo tanto se plantea un volumen de 30 mL de solvente para 100 mL de biomasa húmeda, teniendo en cuenta que el volumen de solvente debe ser menor a la relación anterior.

- c. Relación de solvente-biomasa 80 mL de solvente: 100 mL de biomasa húmeda. Esta relación se plantea teniendo en cuenta que los datos recolectados previamente son de volúmenes de solvente inferiores a 50 mL y por lo tanto se desconoce si la extracción se ha realizado a volúmenes de solvente mayores. De acuerdo con lo anterior, es importante considerar un volumen de solvente mayor al planteado en el artículo de Angles y otros autores para analizarlo en el diseño experimental de la extracción de lípidos con biomasa húmeda.

3.2.3 Extracción de lípidos en el pre-experimento. Se realiza el proceso de extracción de lípidos siguiendo el procedimiento de la figura 16, obteniendo los siguientes datos de volumen en la tabla 13.

Tabla 13. Datos recolectados de la extracción de lípidos en el pre-experimento

Volumen de solvente [mL]	Volumen de microalga [mL]	Experimento	Volumen de fase orgánica [mL]	Volumen extraído [mL]
30	100	1	34	4
		2	35	5
50	100	1	51	1
		2	54	4
80	100	1	82	2
		2	80	0

Fuente: Elaboración propia.

Existen varios factores que pueden afectar el volumen extraído, ya sea la naturaleza química del solvente y su interacción con el soluto correspondiente a compuestos lipídicos, el volumen de solvente utilizado, el coeficiente de reparto que corresponde a la relación de las concentraciones del soluto en el solvente aplicado con respecto al solvente inicial (agua) a un temperatura determinada, de manera que entre mayor sea este coeficiente mayor será la transferencia del producto deseado de la fase acuosa a la fase orgánica, también influye la agitación ya que en esta etapa se aumenta la superficie de contacto entre las fases⁵⁷.

Este volumen extraído corresponde a diferentes componentes liposolubles que en contacto con el terpeno se arrastran a la fase orgánica. Sin embargo, como se puede observar en los resultados a medida que aumenta la cantidad de solvente, el volumen final extraído es menor, esto se debe a que entre mayor volumen se

⁵⁷ ANGURELL, Immaculada. et al. Operaciones básicas en el laboratorio de química. Extracción. Extracción líquido-líquido. Repetición del proceso de extracción. Univerditat de Barcelona. Departamentos de Química inorgánica, orgánica y farmacología y química terapéutica. Citado en 26 de Septiembre de 2018. [En línea]. <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html>

utilice mayor será el uso de materiales y por lo tanto quedan más trazas de pérdida de producto en los elementos utilizados. Así mismo, Angurell y otros autores de la Universitat de Barcelona dentro de sus estudios mencionan que en la extracción líquido-líquido es más eficiente realizar extracciones con el volumen de solvente dividido que una sola extracción con el volumen total de solvente (80 mL), concluyendo que entre menor sea el volumen de disolvente (30mL), mayor será la cantidad de producto extraído⁵⁸.

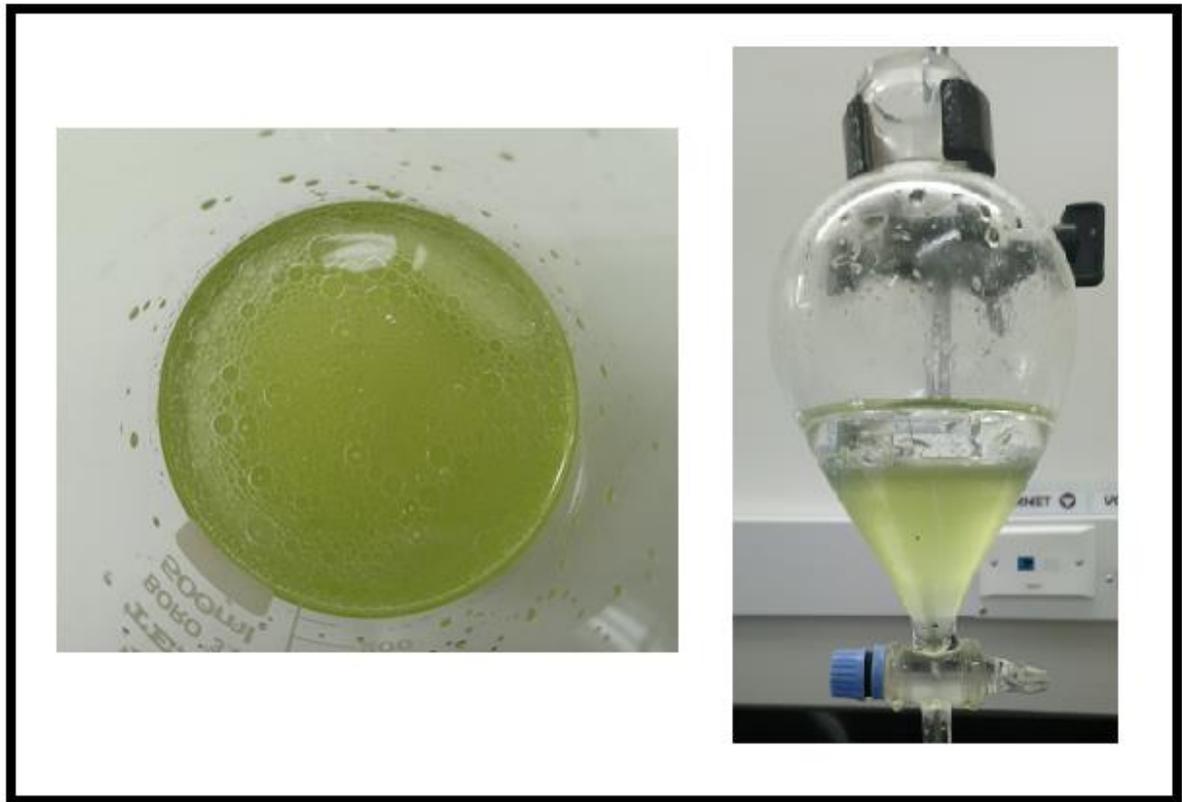
Además, haciendo un análisis más profundo se puede observar que con un volumen de solvente inicial de 30 mL, se obtiene un mayor volumen final de la fase orgánica de 35 mL; de manera que el soluto se encuentra teóricamente más concentrado que al utilizar 80 mL de solvente obteniendo un volumen final de 82 mL, adicionalmente la concentración inicial del soluto en la fase acuosa es la misma en ambos pre-experimentos, por lo que el coeficiente de reparto es directamente proporcional a la concentración del soluto en el solvente aplicado y por lo tanto al utilizar 30 mL de D-Limoneno, este coeficiente es mayor, ocasionando una mayor transferencia del producto deseado a la fase orgánica.

Igualmente, en los pre-experimentos se observó la formación de burbujas al realizar el contacto de solvente-biomasa húmeda, también observado al momento de realizar el proceso de decantación como se muestra en la figura 17. Este fenómeno se atribuye a las diferencias de solubilidad entre las fases orgánica y acuosa.

Por otro lado, se considera que al medir el volumen de la fase orgánica con una probeta puede haber una incertidumbre en la medida ocasionada por una dispersión de valores al momento de observar y tomar la lectura.

⁵⁸ANGURELL, Immaculada. et al. Operaciones básicas en el laboratorio de química. Extracción. Extracción líquido-líquido. Repetición del proceso de extracción. Univerditat de Barcelona. Departamentos de Química inorgánica, orgánica y farmacología y química terapéutica. Citado en 26 de Septiembre de 2018. [En línea]. <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html>

Figura 17. Formación de burbujas en el proceso de extracción de lípidos



Fuente: Elaboración propia.

3.2.4 Análisis estadístico del pre-experimento. Para determinar si hay diferencia significativa en la relación solvente-biomasa, se realiza el diseño experimental factorial analizado estadísticamente con ANOVA de análisis de varianza de un factor, teniendo como variable respuesta el volumen extraído, como factor la relación solvente-biomasa y como variable independiente la concentración celular ya que previamente se determinó que el cultivo se encontraba en fase estacionaria y por lo tanto se considera que no hay un cambio considerable en la concentración celular que pueda afectar el contenido lipídico.

Ho: La hipótesis nula plantea que no hay diferencia significativa en el volumen extraído por el cambio de la relación de solvente-biomasa.

H1: La hipótesis alterna plantea que hay diferencia significativa en el volumen extraído por el cambio de la relación de solvente-biomasa.

En la tabla 14 se muestra el resultado obtenido.

Tabla 14. Diseño experimental factorial analizado estadísticamente con ANOVA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	12.3333	2	6.1666	2.6428	9.55
Dentro de grupos	7	3	2.3333		
Total	19.3333	5			

Fuente: Elaboración propia.

Para un nivel de significancia de 0,05; el valor de F es menor que el valor crítico para F, por lo tanto se acepta la hipótesis nula y se puede determinar que no hay diferencias significativas en el volumen extraído por el cambio de la relación de solvente-biomasa. Este resultado se debe al nivel de significancia seleccionado, para el cual hay un nivel de confianza de un 95%, por lo que estadísticamente es alto para un muestra de datos de dos repeticiones por nivel, por esta razón con un nivel de confianza alto y con pocos datos el resultado estadístico es que el volumen extraído no cambia significativamente por la relación solvente-biomasa.

Teniendo en cuenta lo anterior, se establece como relación de solvente-biomasa la proporción de 30:100 V/V debido a que el diseño experimental arrojó el resultado de que el volumen extraído no tiene un cambio significativo con la variación de la relación de solvente-biomasa, y por lo tanto, se puede escoger cualquier proporción; no obstante, la relación de solvente-biomasa de 30:100 V/V es la proporción que utiliza la menor cantidad de solvente y en consecuencia es económica, además tuvo mayor volumen extraído.

3.3 TERCERA ETAPA

En esta etapa se desarrolla experimentalmente el proceso de extracción de lípidos nuevamente según parámetros seleccionados anteriormente (primera y segunda etapa) en mayores volúmenes de cultivo.

3.3.1 Concentración celular del experimento. Teniendo en cuenta que para el experimento se utiliza el cultivo No. 2, se le realiza un seguimiento de la concentración celular al cabo de 11 días de alcanzar el volumen deseado de 3.6 L al igual que el cultivo No. 1 del pre-experimento. Se realizó el conteo del día 11 a 13 para verificar la fase estacionaria. En la tabla 15 se muestran los resultados.

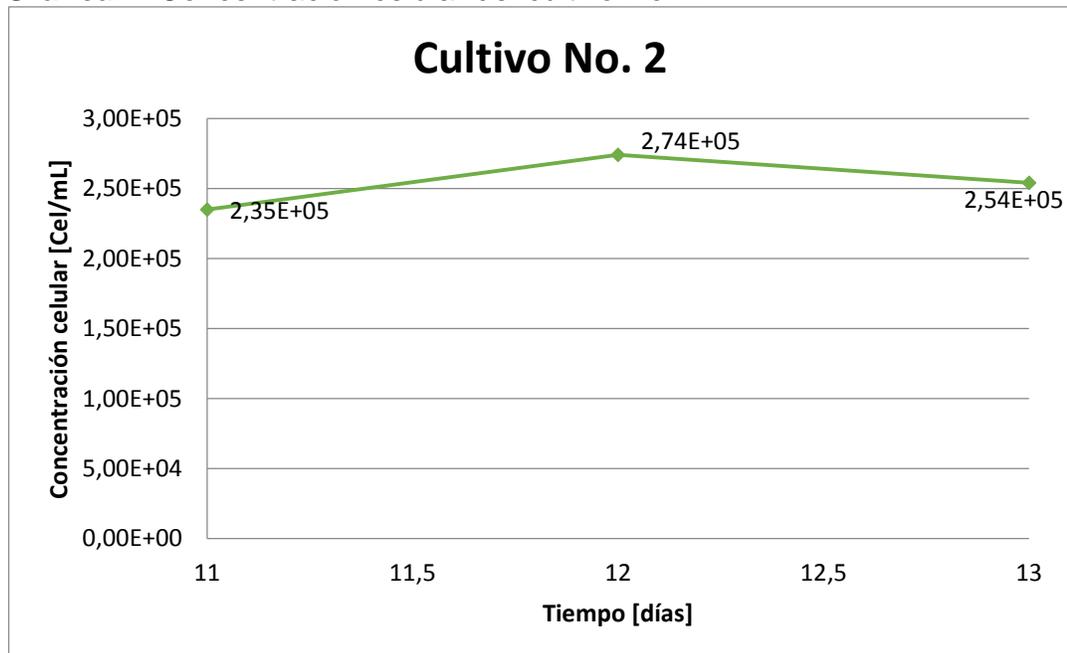
Tabla 15. Concentración celular del cultivo No. 2

Día	Número de células (primer conteo)	Número de células (segundo conteo)	Número de células promedio	Concentración celular [cel/mL]
11	115	120	117,5	2,35E+05
12	126	148	137	2,74E+05
13	127	127	127	2,54E+05

Fuente: Elaboración propia.

A continuación se presenta en la gráfica 2 la concentración celular de los días 11 a 13.

Gráfica 2. Concentración celular del cultivo No. 2



Fuente: Elaboración propia.

Con base en los datos anteriores se puede observar en la gráfica que entre los días 11 a 13 el crecimiento de la microalga es estable sin cambios considerables de la concentración celular y por lo tanto se considera que la microalga se encuentra en fase estacionaria.

3.3.2 Extracción de lípidos del experimento. Se realiza el experimento llevando la proporción de solvente-biomasa escogida al triple, por lo que se utiliza 300 mL de microalga húmeda con 90 mL de solvente. En la tabla 16 se muestra la concentración celular del cultivo No.2 respectiva al día que se realiza el proceso de extracción de lípidos. Cabe resaltar que los experimentos 1 y 2 se realizaron los días 41 y 45 respectivamente, mientras que el experimento 3 se realizó el día 95, debido a que no se encontraba un laboratorio confiable que realizará el análisis químico de la muestra del extracto compuesta de solvente D-limoneno y compuestos liposolubles extraídos de la microalga, ya que en dichos laboratorios nunca habían manejado el solvente D-limoneno, sin embargo, se encontró el laboratorio químico de la Pontificia Universidad Javeriana, en donde se decidió realizar el análisis químico, no obstante se presentaron retrasos en el recibo de pago del análisis, por esta razón hay una gran diferencia en el día que se realizó el experimento 3 con respecto a los experimentos 1 y 2. Así mismo, en la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos en el proceso de experimentación.

Tabla 16. Concentración celular del día del experimento

Experimento	Día	Número de células (primer conteo)	Número de células (segundo conteo)	Número de células promedio	Concentración celular [cel/mL]
1	41	163	169	166	332000
2	45	125	122	123.5	247000
3	95	281	261	271	542000

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 17. Resultados de la extracción de lípidos del experimento

Experimento	Día	Volumen de microalga (mL)	Volumen de solvente (mL)	Volumen final de la fase orgánica (mL)
1	41	300	90	89
2	45	300	90	89
3	95	300	90	89

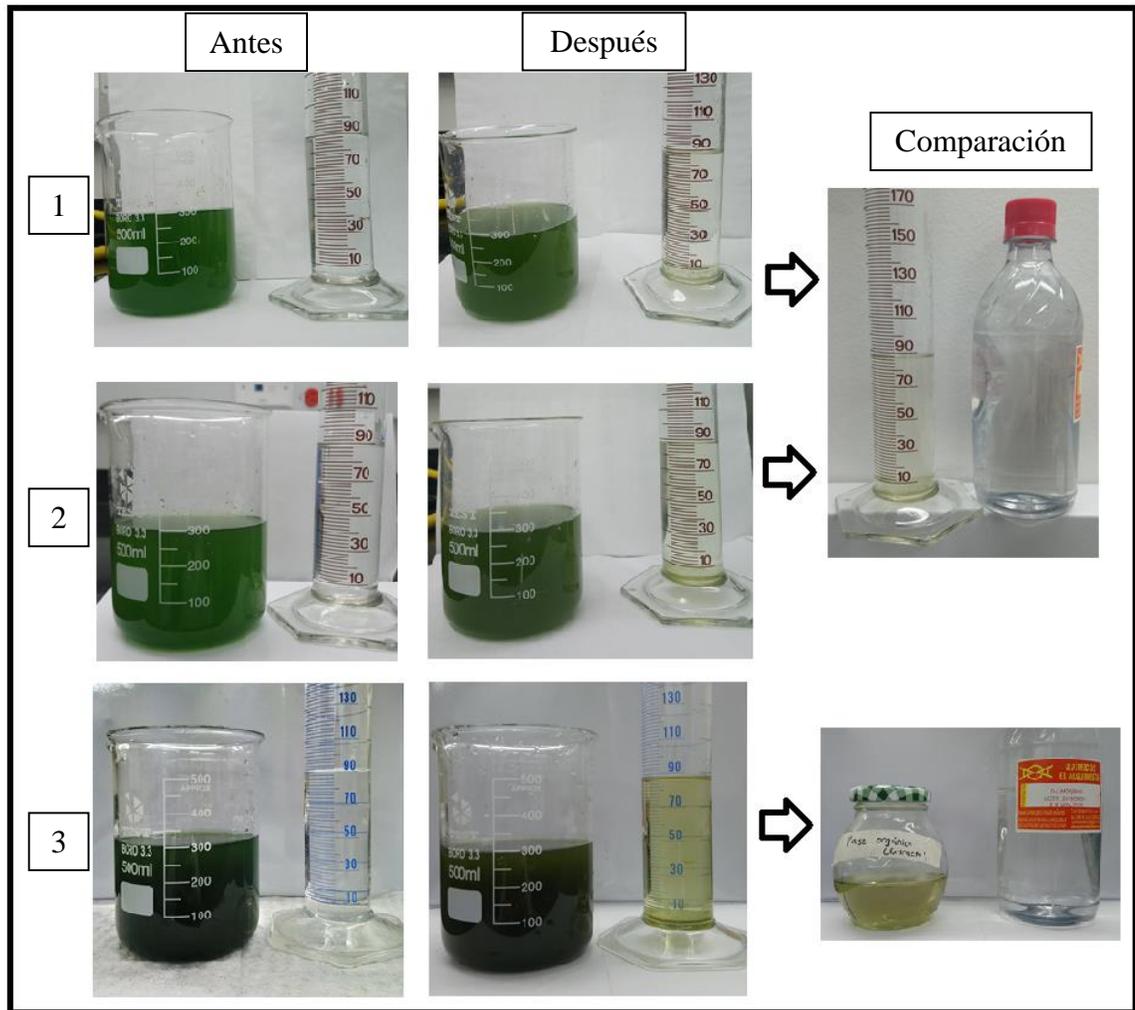
Fuente: Elaboración propia.

Teniendo en cuenta los datos anteriores se puede observar que no hay un cambio del volumen final de la fase orgánica con respecto a la concentración celular del día en el cual se realiza el experimento, ya que en los tres experimentos el volumen final del extracto es de 89 mL a pesar de que la concentración celular cambia. Adicionalmente, cabe mencionar que el cambio de concentración no es de orden exponencial por lo que se considera que durante los experimentos 1, 2 y 3 la microalga está en fase estacionaria como se observa en la gráfica 2. Por otro lado, al realizar la extracción se observó nuevamente formación de burbujas en el contacto de la microalga y el solvente (ver figura 17), de igual manera hubo pérdidas de volumen en la fase acuosa (microalga húmeda), y

también se observó una pérdida de volumen en la fase orgánica (ver tabla 17), ocasionada por el aumento de volumen inicial de solvente, que como se explicó previamente en la extracción líquido-líquido, las pérdidas del extracto se producen por realizar una única extracción utilizando el volumen total⁵⁹ de solvente (90 mL). Así mismo, se observó en los tres experimentos un cambio en la coloración de la fase orgánica de un color transparente característico del D-Limoneno hacia una tonalidad verdosa transparente para los experimentos 1 y 2 y una tonalidad verdosa amarillenta intensa para el experimento 3 como se observa en la figura 18. Por lo tanto, se considera que hay una diferencia en el cambio de color de la fase orgánica antes y después del proceso de extracción de lípidos en los experimentos 1 y 2 con respecto al experimento 3, debido a que en el experimento 3, la microalga se encuentra más concentrada con un color verde más oscuro que en los experimentos 1 y 2, atribuyéndose el cambio de color de la fase orgánica a la concentración del cultivo.

⁵⁹ Ibid., Citado en 26 de Septiembre de 2018. [En línea].
<http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html>

Figura 18. Antes y después de la extracción de lípidos de los experimentos 1, 2 y 3



Fuente: Elaboración propia.

Además se determinó que la centrifugación manejada en el laboratorio no era suficiente para romper la pared celular de las microalgas, esto se evidenció al colocar la fase acuosa después de la extracción en el microscopio del laboratorio, observando que algunas microalgas aún estaban vivas, aunque se considera que al no ocurrir la lisis celular en la mayoría de las células, los lípidos extraídos corresponden a la limitada porción de microalga que logra la disruptura celular, y también al material celular lipídico que ya se encuentra en el cultivo ocasionado por el crecimiento críptico (ver sección 1.6.2) que corresponde a la presencia de

material celular y nutrientes de células muertas⁶⁰ que sirven como fuente de nutrientes para las vivas, característico de la fase estacionaria.

Por otro lado, no es posible realizar balances de masa del proceso de extracción ya que se desconoce la concentración tanto de la fase acuosa, como de la mezcla y de la fase orgánica y además no se dispone de un diagrama de fases. No obstante, se puede observar una pérdida de 1 mL por cada extracción en los 3 experimentos por lo que utilizando la ecuación 6 se determinó un porcentaje de pérdida de 1.11%. Adicionalmente, no es posible calcular el rendimiento de extracción ya que se requiere de la masa del compuesto extraído y de la masa inicial del compuesto considerado⁶¹ datos que por el tiempo y la limitación de este estudio no se obtuvieron, sin embargo, en el estudio de Angles y otros autores, obtienen un rendimiento de extracción de lípidos con de D-limoneno de aproximadamente 14%⁶² y un valor de 2.2 g de solvente D-limoneno por cada mg de lípidos extraídos⁶³.

3.3.3 Índice de saponificación del experimento. Teniendo en cuenta que la fase orgánica se encuentra compuesta de solvente D-limoneno y compuestos liposolubles, en donde el solvente D-Limoneno tiene un alto índice de ebullición como se muestra en el anexo C, y por lo tanto se requiere de una destilación con arrastre de vapor (Destilación Clevenger⁶⁴) para recuperarlo, pero en la universidad no se encuentran los equipos para realizar esta destilación y por lo tanto no se recupera el solvente.

De igual manera, en el anexo C se muestra la estructura del D-Limoneno la cual presenta un doble enlace en el ciclohexano y otro en una de las cadenas externas entre dos carbonos considerándose de la familia de los alquenos, de esta manera una docente de la Facultad de ciencias y humanidades del Departamento de química de la Fundación Universidad de América, menciona que la reacción que puede tener este terpeno es la adición al doble enlace carbono-carbono, y al momento de entrar en contacto con el KOH lo que podría ocurrir es que el KOH se disocia en iones y cada ion se une a uno de los carbonos del doble enlace, sin embargo esto no ocurre ya que el potasio es un elemento metálico y por lo tanto no puede formar enlaces con el carbono, teniendo en cuenta que los únicos metales que forman enlace con carbono son el litio y el magnesio. Por lo tanto,

⁶⁰ TRUEBA, Gabriel. et al. Adaptación de *Leptospira interrogans* (sensu stricto) al agua dulce. Revista cubana med. Vol. 54. 2002. p. 13.

⁶¹ ANGLES, et al. Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent screening. Revista Algal No 21. 2017. p. 29. En línea. [Citado en 10 de Marzo de 2018]. Disponible en Elsevier.

⁶² Ibid., p. 32.

⁶³ Ibid., p. 32.

⁶⁴ TANZI, Celine. Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae. Revista Molecules. 2012. p. 8203 .En línea. [Citado en 10 de Marzo de 2018].

para la reacción de saponificación, en la muestra solo reaccionan los ésteres de ácidos grasos con el KOH, ya que estos poseen grupos funcionales ésteres (ver figura 13).

Se realiza el índice de saponificación para las experimentos 1 y 2, se dejan saponificar durante una hora y media, y se controla constantemente la temperatura entre un rango de 65 a 69°C, para evitar accidentes asociados a la inflamabilidad del terpeno, obteniendo los siguientes resultados en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados del índice de saponificación del experimento

Experimento	1	2
Volumen de fase orgánica [mL]	89.00	89.00
Masa de la muestra [g]	4.020	4.020
Concentración del HCl [mol/L]	0.5000	0.5000
Temperatura promedio [°C]	66.00	69.00
Volumen de HCl en blanco [mL]	10.20	10.20
Volumen de HCl en muestra [mL]	2.000	1.800
Is [mg KOH/g grasa]	57.22	58.61
Peso molecular [g/mol]	978.7	955.4

Fuente: Elaboración propia.

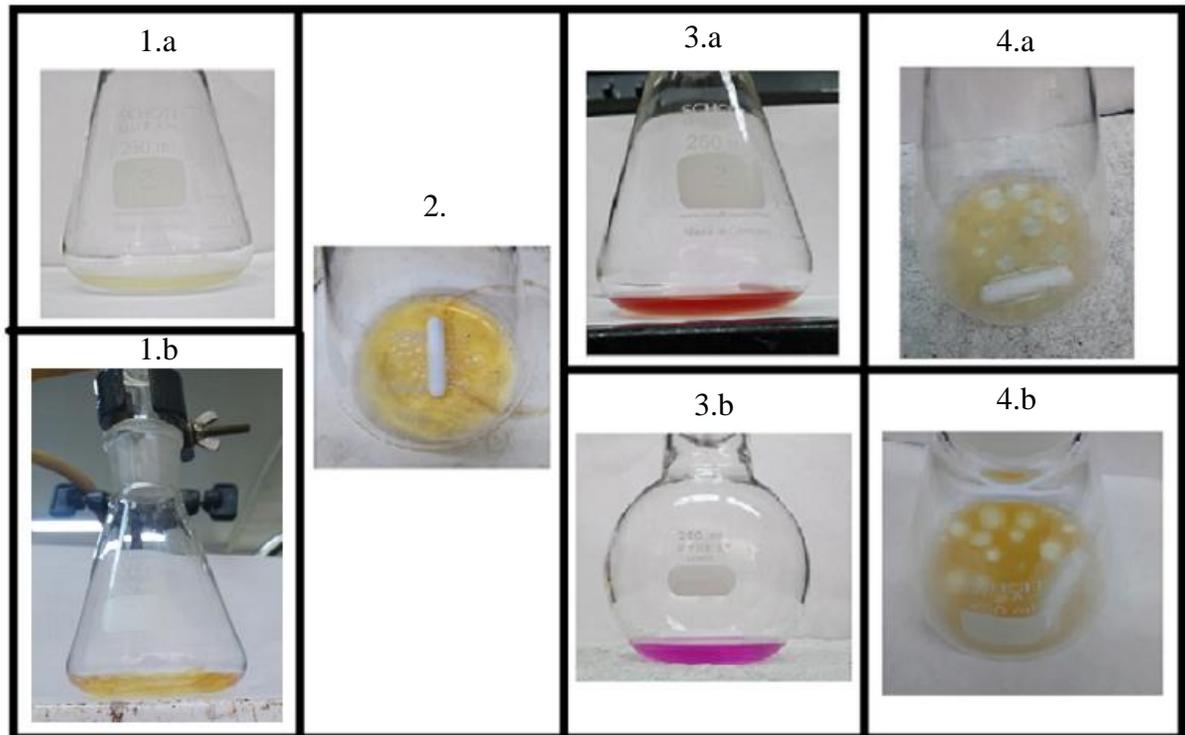
Al realizar el índice de saponificación se observaron varios fenómenos (ver figura 19):

1. La mezcla de la muestra (D-limoneno más lípidos) con el KOH tiende a ser de color transparente verdoso (1.a) (ocasionado por el color de la fase orgánica), una vez se comienza el proceso de calentamiento con agitación conectado al condensador, a los 5 minutos la mezcla toma un color amarillento suave (1.b). El blanco se mantiene con el color transparente original del KOH.
2. Al retirar el Erlenmeyer de la plancha de calentamiento y agitación se observa una producción espontánea de burbujas. Además, el color amarillento tomado en la fase inicial se mantiene.
3. Se agrega una gota de fenolftaleína y la mezcla toma un color rosado oscuro (3.a), a diferencia del blanco que toma un color fucsia (3.b).
4. Al realizar la titulación, se retira el color de la fenolftaleína y nuevamente la mezcla vuelve a tomar color amarillento característico de un aceite. Además, se observa la presencia de otra fase en forma de burbujas transparentes dentro de la fase saponificada (4.a), esto se debe a las diferencias de solubilidad entre la mezcla saponificada y el HCl, fenómeno que no ocurre en

el blanco. Finalmente, al cabo de 5 minutos de reposo la mezcla titulada intensifica el color amarillo (4.b).

Por último, realizando un promedio ponderado de los índices de saponificación encontrados, se determina que el experimento de extracción de lípidos con solvente verde posee en la fase orgánica un índice de saponificación de 57.91 mg KOH/g grasa, y un peso molecular promedio de ácidos grasos de 967.08 g/mol.

Figura 19. Fotografías de cambio de color observado en el índice de saponificación



Fuente: Elaboración propia.

3.3.4 Análisis químico del experimento 3. Se realiza un análisis químico al experimento 3, que consiste en realizar el proceso de extracción de lípidos en el laboratorio de investigación de la Fundación Universidad de América; una vez obtenida la fase orgánica, esta se lleva al Departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana para realizar una rotaevaporación y un GC-MS. La muestra se analizó en un cromatógrafo de gases GC 2010 plus acoplado a un GCMS-TQ8040; inicialmente se examinó la muestra sin rotaevaporar (ver anexo E), posteriormente se procedió a rotaevaporar para concentrar la muestra, cabe resaltar que se desconoce el valor de la concentración al cual se llevó la muestra, y así mismo al ser un análisis externo a la universidad de América no se conoce el volumen de la muestra analizada, por lo que al carecer de datos de masa y volumen no es posible calcular el rendimiento de lípidos, no obstante en el estudio de Angles y otros autores el rendimiento de ácidos grasos totales es de aproximadamente un 14%⁶⁵. Los resultados obtenidos de la muestra concentrada del experimento 3 se muestran a continuación en la tabla 19 fundamentada en el anexo F.

Tabla 19. Composición química de la muestra concentrada analizada correspondiente al experimento 3

No.	Nombre del compuesto	Composición [%]	Porcentaje de similitud [%]
1	Myroxide (E)	0.27	84
2	Linalool	0.71	97
3	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, trans	1.72	92
4	cis(-)-1,2-Epoxy-p-menth-8-ene	5.42	91
5	Limonene oxide, trans	3.24	97
6	2-Isopropenyl-5-methylhex-4-enal	0.73	86
7	Trans-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	0.22	93
8	2-Cyclohexen-1-one, 4-(1-methylethyl)	0.23	87
9	1,3,6-Heptatriene, 2,5,6-trimethyl	1.07	86
10	(-)-cis-Isopiperitenol	1.94	87
11	2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, cis	3.12	96
12/ 20	Carveol	2.98 0.20	96 85
13	(-)-Carvone	1.48	96
14	p-Mentha-1(7),8(10)-dien-9-ol	0.29	88
15	p-Mentha-1,8-dien-7-ol	0.21	90
16	(3S,6R)-3-Hydroperoxy-3-methyl-6-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-ene	1.12	88
17	(3R,6R)-3-Hydroperoxy-3-methyl-6-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-1-ene	0.83	91

⁶⁵ ANGLES, op.cit. p. 32.

Tabla 19. (Continuación)

No.	Nombre del compuesto	Composición [%]	Porcentaje de similitud [%]
18	Cyclopentanone, 3-[3,5-decadienyl]-, (E,E)	0.38	86
19	1,2-Cyclohexanediol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)	0.23	90
21	(2R,4R)-p-Mentha-6,8-diene, 2-hydroperoxide	0.92	89
22	(2S,4R)-p-Mentha-6,8-diene 2-hydroperoxide	0.30	86
23	Neophytadiene	0.31	96
24/ 45	3,7,11,15-Tetramethylhexadec-2-en-1-yl acetate (phytyl acetate; acetic acid 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecenyl Ester)	0.44	90
25	Ethyl tetracosanoate (Tetracosanoic acid, ethyl ester)	0.82	88
26	Hexadecanoic acid, ethyl ester	1.23	84
27	Docosanoic acid, ethyl ester	0.78	83
28/ 50	Cholesta-4,6-dien-3-ol, (3.beta.)	1.90	86
29	Methyl (25rs)-3.beta.-acetoxy-5-cholesten-26-oate	1.15	80
30	Ethyl heneicosanoate (Heneicosanoic acid, ethyl ester)	0.30	79
31/ 44	Dotriacontane (Bicetyl)	0.20	81
32/ 33/ 34/ 42/ 52	Phytyl decanoate (Decanoic acid, 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-yl ester)	0.35	82
35	9-Octadecenethioic acid, 12-hydroxy-, S-t-butyl ester	0.43	93
36	Eicosyl pentafluoropropionate	0.51	91
37	7,8-Epoxy lanostan-11-ol, 3-acetoxy-	2.51	87
38	dl.alpha.-Tocopherol (Vitamina E)	3.83	89
39/ 54	17-Pentatriacontene	11.14	89
40	Hexadecanoic acid, tetradecyl ester (Palmitic acid, tetradecyl ester; Myristyl palmitate)	0.33	87
41	Bis(2-ethylhexyl) phthalate (Phthalic acid, bis(2-ethylhexyl) ester)	6.78	89
		0.7	68
		0.84	58
		0.51	80
		0.33	85
		0.33	85
		2.20	73
		0.38	81
		0.36	96

Tabla 19. (Continuación)

No.	Nombre del compuesto	Composición [%]	Porcentaje de similitud [%]
46	2-Methylhexacosane	0.52	88
47/ 60/ 63	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	0.22 0.58 0.40	84 70 61
48	2-(2-Methyl-propenyl)-cyclohexanone	0.21	53
49	Tricyclo[20.8.0.0(7,16)]triacontane, 1(22),7(16)-diepoxy-	0.28	70
51	Triacontane, 1-bromo	0.82	87
53	Stigmasterol	1.61	92
55	Phytyl palmitate	2.44	87
56	1H-indene-5-carboxylic acid, 3-(4-carboxycyclohexyl)octahydro-1,1,3-trimethyl	1.25	72
57	Eicosyl isopropyl ether	0.71	84
58	Cyclopentanecarboxamide, 3-ethenyl-2-(3-pentenylidene)-N-phenyl-, [1.alpha.,2Z(E),3.alpha.]	0.60	44
59	9-Hexadecenoic acid, eicosyl ester	0.41	70
61	Gamma.-Sitosterol	2.50	88
62	Stigmasta-5,22-dien-3-ol, acetate, (3.beta.,22Z)	3.56	90
64	Z,Z-6,28-Heptatriactontadien-2-one	1.14	79
65	Trisiloxane, 1,1,1,5,5,5-hexamethyl-3,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]	0.33	41
66	Cis-9-Hexadecenoic acid, heptyl ester	1.65	78
67	2-Octadecyl-propane-1,3-diol	1.23	72
68	Cholest-5-en-7-one, 3-(acetyloxy)-, (3.beta.)	1.46	65
69	Phytyl tetradecanoate	2.68	94
70	Hexadecanoic acid, hexadecyl ester	2.16	88
71	Heptasiloxane, hexadecamethyl (1R,2R,8S,8Ar)-8-hydroxy-1-(2-hydroxyethyl)-1,2,5,5-tetramethyl-cis-decalin	0.51	45
72	Undec-10-ynoic acid, heptadecyl ester	0.50	55
73	Stigmasta-3,5-diene	1.12	78
74	Tetrapentacontane	3.96	88
75	Tetrapentacontane	0.28	79
TOTAL		100	

Fuente: Elaboración propia basada en: Análisis GC-MS de la Pontificia Universidad Javeriana. Laboratorio de Química. Anexo F.

Como se puede observar en el anexo E, el compuesto en mayor proporción detectado por el equipo es el D-Limoneno con un 72,90%, así mismo se aprecia la presencia de compuestos mentolados, compuestos alcohólicos, otros terpenos como Linalool, terpenoides como el Carvone y el Carveol y lípidos como el ácido octanoico (ácido caprílico) en un 0.18%.

Es importante mencionar que en la naturaleza los ácidos grasos (lípidos) se encuentran formando ésteres con el glicerol u otros alcoholes, y a estas moléculas se les conoce como acilglicéridos o ester de ácidos grasos, los cuales son los de mayor proporción encontrados en la muestra de la fase orgánica concentrada del experimento 3. Así mismo, se aprecia la presencia de esteroides, otro tipo de lípidos (número 28, 29, 53, 61, 62, 68, 74); y se encontró un porcentaje de 0.33% de vitamina E (d alfa tocoferol), dándole un valor agregado al proyecto.

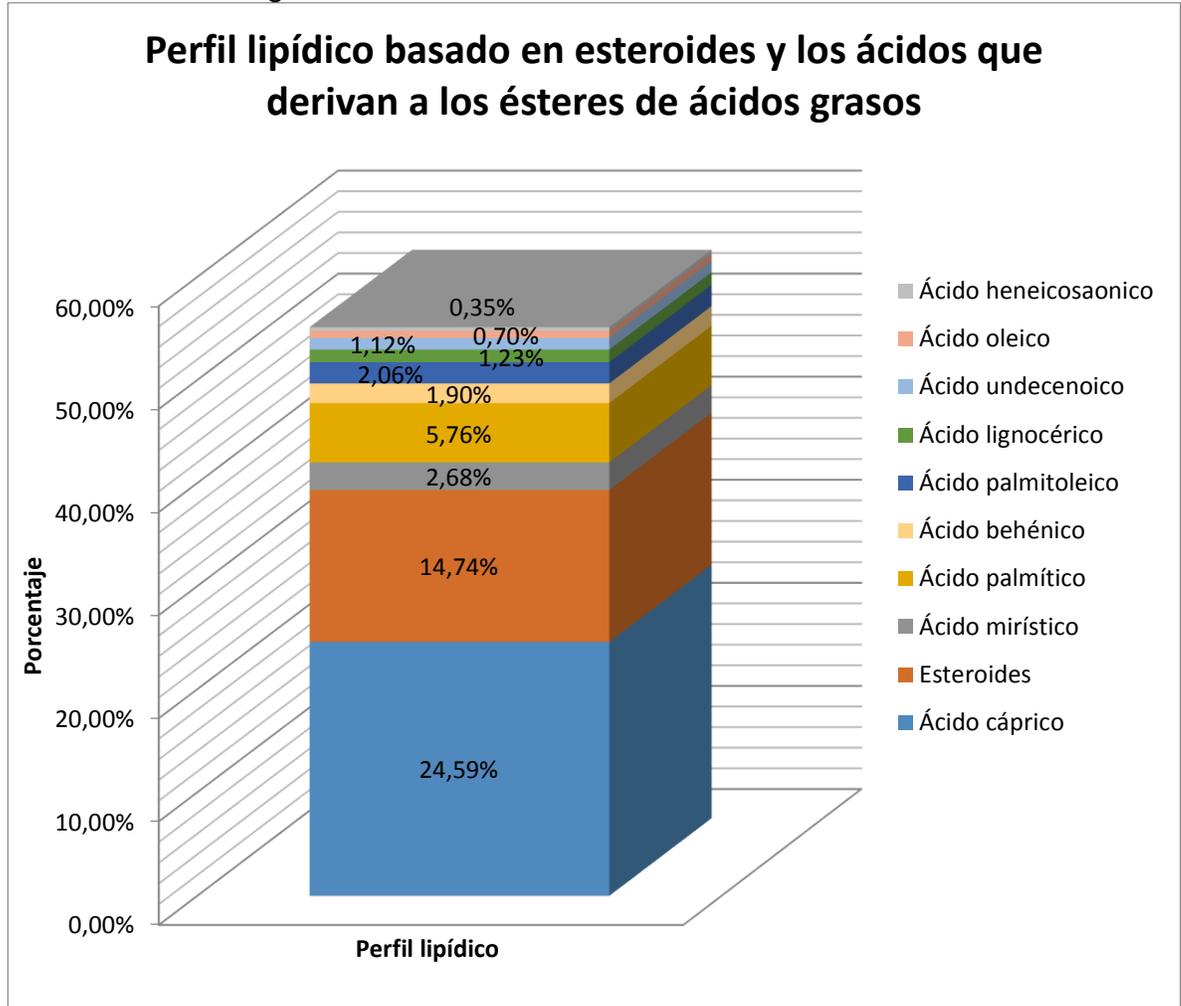
Teniendo en cuenta lo anterior el compuesto lipídico que se encuentra en mayor proporción es el Decanoato de Fitilo (Phytyl decanoate, derivado del ácido cáprico) con un porcentaje total de 24.59%, seguido de los esteroides con un 14.74% en total, y posteriormente seguido de ésteres de ácidos grasos como se muestra en la tabla 20, en donde se obtiene un total de 55.13% de compuestos lipídicos en la muestra de la fase orgánica concentrada. Adicionalmente, en la gráfica 3 se puede observar el porcentaje de lípidos con respecto a los ácidos grasos que derivan los ésteres, tomando en consideración que varios de los ésteres son derivados de ácidos en común; de igual manera en la gráfica 4 se observa la clasificación de los compuesto lipídicos obtenidos en SAFAS, MUFAS y PUFAS (en relación con los ácidos que derivan a los ésteres) y esteroides, con respecto al porcentaje total de lípidos obtenido.

Tabla 20. Porcentaje de lípidos obtenidos en el análisis GC-MS

Nombre	Derivado de	Porcentaje [%]
Decanoato de Fitilo	Ácido cáprico (SAFAS)	24.59
Esteroides	-	14.74
Tetradecanoato de fitilo	Ácido mirístico (SAFAS)	2.680
Palmitato de fitilo	Ácido palmítico (SAFAS)	2.440
Ácido hexadecanoico-éster hexadecílico	Ácido palmítico (SAFAS)	2.160
Ácido docosanoico-éster etílico	Ácido behénico (SAFAS)	1.900
Ácido cis-9-hexadecenoico-éster de heptilo	Ácido palmitoleico (ω -7. MUFAS)	1.650
Tetracosanoato de etilo	Ácido lignocérico (SAFAS)	1.230
Ácido undecenoico 10-éster heptadecílico	Ácido undecenoico (SAFAS)	1.120
Ácido hexadecanoico-éster etílico	Ácido palmítico(SAFAS)	0.7800
Ácido 9-octadecenoico-éster 12-hidroxi-S-t-butílico	Ácido oleico (ω -9. MUFAS)	0.7000
Ácido 9-hexadecenoico-éster eicosílico	Ácido palmitoleico (ω -7. MUFAS)	0.4100
Ácido hexadecanoico-éster tetradecílico	Ácido palmítico (SAFAS)	0.3800
Etil henicosoato	Ácido heneicosanoico (SAFAS)	0.3500
TOTAL		55.13

Fuente: Elaboración propia.

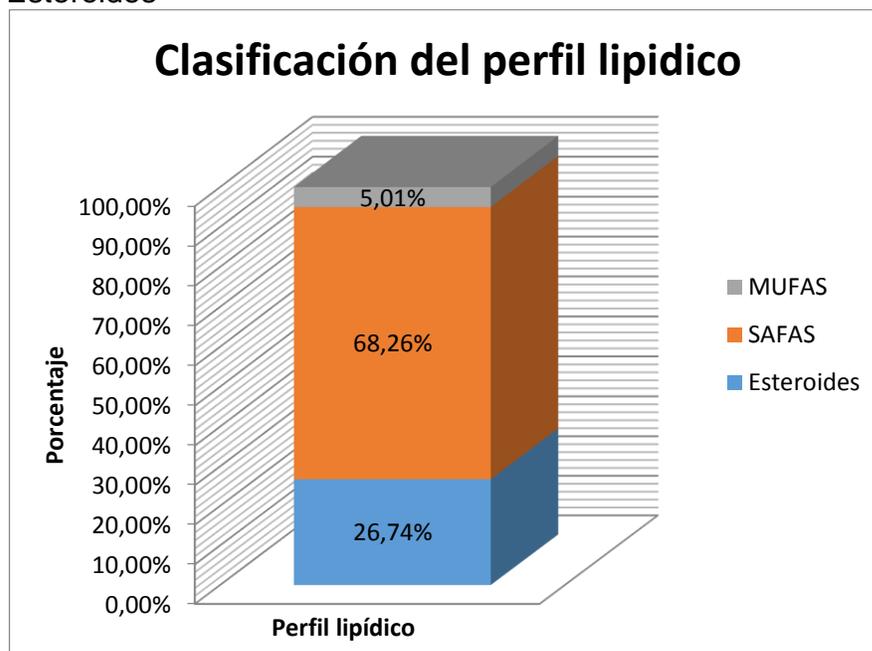
Gráfica 3. Perfil lipídico basado en esteroides y los ácidos que derivan a los ésteres de ácidos grasos



Fuente: Elaboración propia.

En la gráfica 3 se puede observar un alto contenido lipídico de ácido cáprico que forma el éster Decanoato de Fitol de 24.59%, así mismo un porcentaje considerable de esteroides de 14.74%, seguido del ácido palmítico con 5.76%, luego el ácido mirístico con 2.68% y de ácido palmitoleico con 2.06%; teniendo un bajo porcentaje de ácido behénico, ácido lignocérico, ácido undecenoico, ácido oleico y ácido heneicosáonico.

Gráfica 4. Clasificación de perfil lipídico en SAFAS, MUFAS y Esteroides



Fuente: Elaboración propia.

Según la clasificación, los compuestos lipídicos observados en la gráfica 4 fueron un 68,26% derivados de ácidos grasos saturados (SAFAS), un 5,01% derivados de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAS), un 26,74% esteroides y 0% de derivados de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS). Por lo tanto, la fase orgánica concentrada tiene un alto porcentaje de ésteres derivados de SAFAS, seguido de un alto porcentaje de esteroides y por último un bajo porcentaje de ésteres derivados de MUFAS, sin encontrar presencia de ésteres derivados de PUFAS.

Adicionalmente, los ésteres de ácidos orgánicos son ampliamente utilizados para la fabricación de esencias en varias industrias como alimenticia, farmacéutica, entre otras. Así mismo, estos se pueden saponificar y de esta manera recuperar el alcohol y formar jabón. Por otro lado, el ácido cáprico, el cual es el ácido graso que tiene un derivado en mayor proporción, se utiliza en la fabricación de perfumes y sabores frutales, y también como intermedio de aditivos de lubricantes, tintes, entre otros⁶⁶. Los esteroides son ampliamente utilizados por la industria farmacéutica y alimenticia, y los ácidos grasos correspondientes a las MUFAS son potencialmente valorados por la industria de alimentos, ya que contienen ω -7 y ω -9.

⁶⁶ COSMOS. Información técnica y comercial del ácido capríco (ácido decanoico, ácido decílico). En línea. <<https://www.cosmos.com.mx/wiki/acido-caprico-acido-decanoico-acido-decilico-cwsg.html>>. [Citado en 15 de Noviembre de 2018].

Por otro lado, comparando los resultados del análisis químico del experimento 3 con el análisis de índice de saponificación de los experimentos 1 y 2, coincide en que al tener un bajo índice, la muestra posee lípidos con un peso molecular alto, como lo son los esteroides que se observan en gran proporción en los resultados de la tabla 19 y la gráfica 3.

En el cuadro 4 se realiza una comparación de los datos obtenidos con otros autores que han estudiado igualmente el tema de solventes verdes en la extracción de lípidos de microalgas, sin embargo, cabe mencionar que se desconocen los datos de masa, volumen y concentración del análisis químico llevado a cabo en la Pontificia Universidad Javeriana y por lo tanto solo se obtuvieron datos cualitativos de la naturaleza de los lípidos y cuantitativos en términos porcentuales.

Cuadro 4. Rendimiento de extracción de otros estudios

Solvente verde	Método de extracción	Perdidas [%]	Compuestos lipídicos obtenidos	Rendimiento de extracción de lípidos [%]	Rendimiento en masa	Fuente
D-limoneno	Extracción húmeda	1.11	68.26% derivados de SAFAS, 5.01% derivados de MUFAS y 26.74% de esteroides. Un total de lípidos de 55.13%.	-	-	Autora
	Extracción húmeda	-	Ácidos grasos, clorofilas, carotenoides.	14	2.2 g de solvente/ mg de lípidos	ANGL ES, et al. 2017.
	Extracción Soxhlet	-	35.2% de SAFAS, 28.9% de MUFAS y 35.9% de PUFAS. Se encontraron ácido oleico y ácido palmítico.	-	1.29 g lípidos/ 100 g de biomasa seca	TANZI, et al. 2012.
Dimetil éter licuado	Extracción en columna	-	-	13	-	KAND A, et al. 2012.
N-etil butilamina	Liofilización y extracción	-	Ácidos grasos	13	-	BOELO, et al. 2016.

Cuadro 4. (Continuación)

Ciclopentil metil éter	Extracción húmeda	-	Ácidos grasos, clorofilas, carotenoides.	33	0.9 g de solvente/ mg de lípidos	ANGL ES, et al. 2017.
Metil terbutil éter		-		37	0.6 g de solvente/ mg de lípidos	
2-metil tetrahidro furan		-		38	0.7 g de solvente/ mg de lípidos	
α - Pineno	Extracción Soxhlet	-	33.83% de SAFAS, 36.06% de MUFAS y 30.11% de PUFAS. Se encontraron ácido oleico y ácido palmítico.	-	0.91 g lípidos/ 100 g de biomasa seca	TANZI, et al. 2012.

Fuente: Elaboración propia.

La eficiencia teórica del D-limoneno es baja con un valor de 14% comparada con otros solventes como ciclopentil metil éter, metil terbutil éter y 2-metil tetrahidrofuran los cuales tienen rendimientos por encima del 30%, a pesar de ello su rendimiento es similar a solventes como dimetil éter licuado y N-etil butil amina. Adicionalmente, se puede observar que el D-limoneno con extracción húmeda requiere de una mayor cantidad de solvente por cada mg de lípidos extraídos, con respecto a los solventes de alto rendimiento, siendo incluso más del doble que estos solventes. Lo anterior, supone un problema, ya que a pesar de que el D-limoneno muestra ser un solvente verde promisorio para la extracción de lípidos de microalgas, se requiere en una mayor cantidad para extraer 1 mg de lípidos, además de que su recuperación implica una destilación clewenger, lo que deduce a un proceso energéticamente más costoso que los procesos de extracción con ciclopentil metil éter, metil terbutil éter y 2-metil tetrahidrofuran que tienen puntos de ebullición (55°C a 106°C) bajos en comparación con el D-limoneno que tiene un punto de ebullición de 176°C.

Por otro lado, se puede observar diferencias en el perfil lipídico de varios estudios, encontrando que en la mayoría se obtuvieron PUFAS, que a diferencia de esta investigación no se obtuvieron, esto se puede deber a que al utilizar solvente D-limoneno con extracción húmeda su afinidad con compuestos poliinsaturados es baja y por lo tanto su porcentaje al ser tan bajo no es detectado por el método de cromatografía de gases.

Adicionalmente, en este proyecto se determinó que la fase orgánica concentrada es rica en ésteres de ácidos grasos y en esteroides, un resultado diferente a otros estudios en donde únicamente resaltan un perfil de ácidos grasos, aunque, es similar al estudio de Angles y otros autores, en donde además de ácidos grasos, obtienen otros compuestos lipídicos. Lo anterior puede ser el resultado de una extracción húmeda y de posibles trazas iniciales en el solvente comercial, que al entrar en contacto con los lípidos, tiene una mayor afinidad a los esteroides.

Finalmente, teniendo en cuenta la extracción Soxhlet, se puede observar que el D-limoneno tiene una mayor capacidad de extraer lípidos con respecto al terpeno pineno, y tiene un mayor porcentaje de SAFAS, al igual que esta investigación. A pesar de los problemas que tiene este solvente, no deja de ser un buen promisorio alternativo para la extracción de lípidos presentando pérdidas de la fase orgánica de 1.11%, siendo una pérdida admisible en procesos químicos, además teóricamente se requiere de 2.2 g de D-limoneno para extraer 1 mg de lípidos; así mismo, es necesario seguir investigando para mejorar los rendimientos de este solvente y poder potencializar su uso a nivel comercial.

3.4 CUARTA ETAPA

En esta etapa se evalúan los costos del proceso de extracción de lípidos del experimento. Inicialmente, en la tabla 21 se muestran los costos generales para la producción de biomasa tanto para el proceso evaluado como para el proceso convencional (Bligh & Dyer), en ambos procesos de extracción los costos de producción de biomasa son los mismos.

Adicionalmente, en la tabla 22 se exponen los costos asociados al medio de cultivo para el cultivo No.1 y el cultivo No.2 correspondientes a un total de 6.4 L. Por otro lado, en la tabla 23 se muestran los costos operativos de materiales para el proceso de extracción, y en las tablas 24 y 25, se presentan los costos fijos y variables respectivamente relacionados con el proceso de extracción evaluado que comprende los 90 mL de solvente verde, comparados con el proceso de extracción convencional, siendo este último análisis el que compete a la evaluación de esta investigación.

Tabla 21. Costos generales para la producción de biomasa

Elementos utilizados para los cultivos	Costo	Cantidad	Subtotal
Alcohol (350 mL)	\$2,350	1	\$2,350
Algodón	\$4,200	1	\$4,200
Adaptador	\$8,000	1	\$8,000
Bomba	\$12,000	1	\$12,000
Beaker 250 mL	\$14,300	1	\$14,300
Cepa de microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	\$363,000	1	\$363,000
Cinta Led	\$12,000	1	\$12,000
Incubadora de poliestireno	\$21,000	1	\$21,000
Manguera (m)	\$500	3	\$1,500
Mechero	\$17,100	1	\$17,100
Pipeta (10 mL)	\$19,000	1	\$19,000
Pipeteador (25 mL)	\$41,000	1	\$41,000
Recipientes de vidrio (4L)	\$4,000	2	\$8,000
Temporizador	\$18,500	1	\$18,500
Cubreobjetos	\$500	1	\$500
Microscopio	\$2,478,800	1	\$2,478,800
Camara de Neubauer	\$82,000	1	\$82,000
TOTAL			\$3,103,250

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 22. Costos de medio de cultivo para los cultivos No.1 y No.2

Componentes de medio de cultivo	Unidad	Precio unitario	Cantidad	Subtotal
Agua destilada	L	\$5,400	6.3872	\$34,491
Foliagro	mL	\$15	12.80	\$192
Total medio de cultivo para cultivo No.1 y cultivo No. 2				\$34,683

Fuente: Elaboración propia.

Para la producción de biomasa húmeda de 7.2 L el costo total es de \$3,137,933 COP, este costo corresponde a la producción de los cultivos No.1 y No.2, que son empleados para el proceso de extracción ya sea el proceso evaluado, como el proceso convencional de Bligh y Dyer. Por lo tanto para ambos procesos de extracción, este costo operativo es el mismo.

En el anexo D, se muestra el protocolo Bligh Y Dyer, que se tendrá en cuenta para fines de esta investigación en el cálculo de costos operativos. Cabe resaltar que en el protocolo Bligh y Dyer para la recuperación del cloroformo se requiere de un rotaevaporador y por lo tanto en la Fundación Universidad de América no se puede recuperar el solvente ya que el equipo se encuentra deteriorado y fuera de servicio al igual que en el método planteado en esta investigación. Por lo tanto, los

dos métodos son comparables hasta el mismo punto en donde se obtiene una fase orgánica compuesta de solvente y compuestos extraídos.

Por otro lado, el proceso de extracción comprende unos costos operativos correspondientes a materiales empleados, unos costos fijos en donde se tienen en cuenta los equipos utilizados en cada proceso de extracción utilizando costos de alquiler, y para los costos variables se tienen en consideración los costos de reactivos y de servicios como agua y energía. Para los cálculos de agua se utiliza la tarifa estándar comercial de \$3,800.76 COP por metro cubico de agua utilizada más un cargo fijo de \$19,458.82 COP por cada dos meses el cual es constante y por lo tanto no influye en el consumo, y para los cálculos de energía igualmente se utiliza una tarifa estándar comercial en \$/kWh de 566.4278.

Tabla 23. Costos operativos para el proceso de extracción con solvente verde y proceso de extracción con método de Bligh y Dyer

Materiales de laboratorio	Costo	Costos operativos			
		Extracción de lípidos con solvente verde		Extracción de lípidos con método Bligh y Dyer	
		Cantidad	Subtotal	Cantidad	Subtotal
Pipeteador de plastico de 1 mL	\$100	1	\$100		
Jeringa de 10 mL	\$1,000			1	\$1,000
Beaker de 500 mL	\$15,950	2	\$31,900	1	
Matraz redondo de fondo plano de 250 mL	\$11,700			1	\$23,400
Probeta de 250 mL	\$34,000	1	\$34,000	1	\$34,000
Embudo de separación de 500 mL	\$86,900	1	\$86,900		
Embudo de filtración de 100 mL	\$63,700			1	\$63,700
Soporte universal	\$49,650	1	\$49,650	1	\$49,650
Una pinza	\$14,200	1	\$14,200	1	\$14,200
Una nuez	\$16,700	1	\$16,700	1	\$16,700
TOTAL			\$233,450		\$202,650

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar en la tabla 23, los costos operativos del proceso de extracción con D-limoneno son mayores al proceso convencional, esto se debe a que en el proceso se requiere de un embudo de separación que eleva el costo, mientras que en el proceso Bligh y Dyer se requiere un embudo de filtración, que tiene un costo menor. No obstante, la diferencia del costo operativo de materiales es de \$30,800 COP, siendo una diferencia baja.

Es importante mencionar que los datos del costo de alquiler por día en la tabla 24 fueron consultados con “Aceq Laboratorios” en la ciudad de Bogotá.

Tabla 24. Costos fijos proceso de extracción con solvente verde y proceso de extracción con método de Bligh y Dyer

Equipos de laboratorio	Costo de alquiler/día	Costos fijos			
		Extracción de lípidos con solvente verde		Extracción de lípidos con método Bligh y Dyer	
		Tiempo (días)	Subtotal	Tiempo (días)	Subtotal
Centrifuga Baby I Mod. 206	\$125,000	0.5	\$62,500	0.5	\$62,500
Plancha de agitación magnética con íman	\$114,000	0.5	\$57,000	0.5	\$57,000
Balanza analítica	\$130,000			0.5	\$65,000
Horno de secado	\$137,000			1.0	\$137,000
Desecador	\$114,000			0.5	\$57,000
TOTAL			\$119,500		\$378,500

Fuente: Elaboración propia.

Como se puede observar en la tabla anterior, el costo fijo del protocolo Bligh y Dyer es mayor, con un valor de \$259,000 COP por encima del protocolo evaluado en este proyecto. Por lo tanto la extracción evaluada con solvente verde D-Limoneno es más económica, siendo su costo fijo total el 31.57% del costo fijo total de la extracción con el método de Bligh y Dyer.

Los costos variables que se muestran en la tabla 25, se calculan con respecto al proceso de extracción unitario. Es decir, que para cada proceso de extracción de lípidos se gastara el total de costo variable que aparece en la tabla.

Tabla 25. Costo variable proceso de extracción con solvente verde y proceso de extracción con método Bligh y Dyer

Costos variables								
Reactivos y servicios	Unidad	Precio unitario	Extracción de lípidos con solvente verde		Extracción de lípidos con método Bligh y Dyer			
			Cantidad	Subtotal	Cantidad	Subtotal		
D-Limoneno	mL	\$60.00	90	\$5,400				
Metanol	mL	\$17.85			40		\$714	
Cloroformo	mL	\$47.60			40		\$1,904	
Agua desionizada	mL	\$262.40			16		\$4,198.40	
Agua destilada	mL	\$5.40			20		\$108	
Agua de servicio de lavado	L	3.80076	3	\$11.40	3		\$11.40	
		Consumo unitario [kW]	Tiempo [h]	Consumo total [kWh]	Tiempo [h]	Consumo total [kWh]		
Balanza analítica		0.008			0.20	0.0016	\$0.91	
Horno de secado		3.000			18	54	\$30,587.10	
Plancha de agitación magnética		0.075	1.867	0.14	\$79.30	0.05	0.00375	\$2.12
Centrifuga		0.300	1.5	0.45	\$254.89	0.167	0.05	\$28.32
TOTAL				\$5,746			\$37,554.26	

Fuente: Elaboración propia.

Con base en lo anterior, los costos variables son menores en el proceso de extracción de lípidos con el solvente verde, en el cual el mayor costo está representado por el solvente D-Limoneno, el gasto de energía de la agitación es bajo a pesar de estar funcionando por aproximadamente 2 horas mientras todo el volumen de biomasa más solvente verde (390 mL) se centrifuga; en el proceso de extracción de lípidos con el método de Bligh y Dyer se obtiene un costo variable mayor debido al horno de secado, ya que el proceso requiere de biomasa seca y esta es una operación costosa a nivel energético.

Así mismo, es importante resaltar que el costo del solvente verde (\$5,400 COP) es incluso menor que el costo de los solventes metanol y cloroformo (\$6.100 COP); de igual manera el gasto energético es menor en el protocolo con solvente verde que el protocolo con solventes tóxicos. Lo anterior, permite deducir que el protocolo planteado en esta investigación cumple con la necesidad de buscar una alternativa económica.

Finalmente, teniendo en cuenta un costo total compuesto de la suma de los costos fijos y los costos variables, el proceso evaluado en este proyecto de investigación correspondiente al uso del D-Limoneno con biomasa húmeda de microalga tiene un costo total de \$125,246 COP, siendo menor que el costo total del protocolo Bligh y Dyer de \$416,054 COP y por lo tanto el proceso evaluado es económico, además de ser eco-amigable.

4. CONCLUSIONES

- Se escogió la microalga *Chlorella vulgaris* para el trabajo, debido a que posee una pared celular que facilita la extracción y no requiere de agitación adicional para evitar la sedimentación.
- Se seleccionó el solvente verde D-Limoneno con un protocolo de extracción en biomasa húmeda, debido a que posee un bajo costo de 60,000/L, se encuentra disponible a nivel comercial en la ciudad de Bogotá y el protocolo se puede trabajar en la Fundación Universidad de América.
- La proporción adecuada de solvente verde (D-Limoneno)-biomasa es 30:100 V/V ya que se determinó que no había diferencia significativa en el volumen extraído en la fase orgánica por el cambio de la proporción solvente-biomasa, y por lo tanto esta proporción utiliza la menor cantidad de solvente para la extracción de lípidos con biomasa húmeda, resultando de esta manera económica.
- El proceso de extracción de lípidos se llevó a cabo bajos los parámetros seleccionados (microalga *Chlorella vulgaris*, solvente verde D-limoneno con protocolo de extracción en biomasa húmeda, y una relación de solvente-biomasa de 30:100 V/V) con un volumen de biomasa húmeda de 300 mL y de solvente verde de 90 mL, determinando un índice de saponificación de la fase orgánica (solvente verde D-Limoneno y compuestos liposolubles) de 57.91 mg KOH/g grasa, con un peso molecular promedio de ácidos grasos de 967.08 g/mol; confirmando la presencia de lípidos en la fase orgánica.
- El D-limoneno mostró ser un solvente verde promisorio para la extracción de compuestos lipídicos a partir de biomasa de microalgas húmeda, obteniendo una fase orgánica concentrada rica en ésteres de ácidos grasos y esteroides; encontrándose en mayor proporción Decanoato de Fitilo, derivado del ácido cáprico con un porcentaje de 24.59%, seguido de los esteroides con un 14.74%, y un 15.8% de demás ésteres de ácidos grasos, alcanzando un total de 55.13% de compuestos lipídicos en la fase orgánica concentrada, de los cuales un 68.26% del total corresponde a derivados de SAFAS, un 5.01% a derivados de MUFAS, un 26.74% a esteroides y ningún derivado de PUFAS.
- El proceso de extracción de lípidos con D-Limoneno tiene un costo fijo de \$119,500 COP y un costo variable de \$5,746 COP por cada proceso de extracción, que comparado con el protocolo Bligh y Dyer es económico y eco-amigable.

5. RECOMENDACIONES

- Estudiar la reutilización de la fase acuosa que contiene microalgas vivas resistentes a la centrifugación, colocándolas en un fotobiorreactor adaptado y agregándole nuevamente medio de cultivo.
- Comparar los resultados anteriores empleando otro solvente verde.
- Evaluar un método eficaz de disrupción celular aplicable en la Fundación Universidad de América que no emplee solventes tóxicos.
- Realizar el protocolo de extracción de lípidos con D-Limoneno utilizando *Scenedesmus dimorphus*.
- Se recomienda a la Fundación Universidad de América la adquisición de equipos de laboratorio tales como: Ultrasonido (disrupción celular) y un rotaevaporador (recuperación de solvente).

BIBLIOGRAFÍA

ANGLES, Emilie., et al. Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent screening. *Revista Algal* No 21. 2017. p 27-34. [En línea]. [Citado en 10 de Marzo de 2018]. Disponible en Elsevier.

ANGURELL, Immaculada. et al. Operaciones básicas en el laboratorio de química. Extracción. Extracción líquido-líquido. Repetición del proceso de extracción. Universitat de Barcelona. Departamentos de Química inorgánica, orgánica y farmacología y química terapéutica. [En línea]. <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html>. [Citado en 26 de Septiembre de 2018].

ARIAS, Martha. Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México. 2013. p. 46. En línea. <<http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v18n1/v18n1a4.pdf>>. [Citado en 15 de Junio de 2018].

ARNÁIZ, Carmen. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Universidad de Sevilla. Grupo de tratamiento de aguas residuales. Sevilla. 2000. 45-52 p. [En línea]. <http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/tvolke/00_Determin-BM.pdf>. [Citado en 10 de Mayo de 2018].

BENAVENTE, J.R. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. Universidad Autónoma de Coahuila. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Coahuila, México. Ene-Jun 2012. Año 4, N°. 7. [En línea]. <<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/4.html>>. [Citado en 15 de Junio de 2018].

BOELO, Ying., et al. Microalgae wet extraction using N-ethyl butylamine for fatty acid production. *Green Energy & Environment* 1. 2016. p. 79-83.

CAJAMAR. ¿Qué son las microalgas? Interés y uso. 2017. En línea. <<https://www.grupocooperativocajamar.es/recursos-entidades/pdf/bd/agroalimentario/innovacion/formacion/materiales-y-documentos/microalgas-1444391623.pdf>>. [Citado en 29 de Marzo de 2018].

CALDERÓN, Sara; RAMÍREZ, Diana. Evaluación de la influencia lumínica sobre la producción de biomasa y lípidos a partir de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala banco. Bogotá D.C. 2013. Trabajo de grado: Título de

Ingeniero químico. Universidad de América. Facultad de ingeniería. Departamento de investigación.

CARTAGENA, Julian; MALO, Brian. Evaluación del uso de la microalga *Chlorella vulgaris* en la remoción de materia orgánica de las aguas residuales de la ptar el salitre a nivel laboratorio. Bogotá. 2017. 103p. Trabajo de investigación para optar por el título de Ingeniero Químico. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías.

CHAPARRO, Gina. Evaluación del suero lácteo en la producción de biomasa y lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris* a escala laboratorio. Bogotá. 2017. 87p. Trabajo de investigación para optar por el título de Ingeniero Químico. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías.

CHNG, Lee., et al. Sustainable production of bioethanol using lipid-extracted biomass from *Scenedesmus dimorphus*. *Journal of Cleaner Production*, No 130. 2016. p. 68-73.

COSMOS. Información técnica y comercial del ácido caprico (ácido decanoico, ácido decílico). [En línea]. <<https://www.cosmos.com.mx/wiki/acido-caprico-acido-decanoico-acido-decilico-cwsg.html>>. [Citado en 15 de Noviembre de 2018]

DONCEL, Jennifer; MORENO, Heidy. Evaluación de la influencia de la agitación para la producción de biomasa microalgal en un FBR panel plano a escala laboratorio. Bogotá. 2017. 106p. Trabajo de investigación para optar por el título de Ingeniero Químico. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías.

DU, Ying., et al. Microalgae wet extraction using N-ethyl butylamine for fatty acid production. *Revista KeAi: Green Energy & Environment* 1. 2016. [En línea]. [Citado en 10 de Marzo de 2018]. Disponible en ScienceDirect.

DU, Ying., et al. Secondary amines as switchable solvents for lipid extraction from non-broken microalgae. *Revista Bioresource Technology* No 149. 2013. [En línea]. [Citado en 10 de Marzo de 2018]. Disponible en Elsevier.

EL-KASSAS, Hala; et al. Bioremediation of the textile waste effluent by *Chlorella vulgaris*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. Vol 40. 2014. p. 301-308.

FAO. Cultivo de microalgas. [En línea]. <<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S02.htm>>. [Citado en 1 de Agosto de 2018].

FLEMING. Sun chlorella. *Chlorella vulgaris*. Salud Chlorella España. [En línea]. <<http://www.chlorella.es/que-es-chlorella/>>. [Citado en 4 de Marzo de 2018].

FONSECA, Laura; GUARÍN, María. Evaluación de la remoción de cromo con cultivos de microalgas en un fotobiorreactor de panel plano. Bogotá. 2018. 101p. Trabajo de investigación para optar por el título de Ingeniero Químico. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías. Programa de Ingeniería Química.

FORERO, Liliana. Medición de la capacidad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* para la remoción de cromo de aguas de curtiembre. Bogotá. 2012. 229p. Tesis para optar por el título de Magister en Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental.

GONCALVES, Rebeca., et al. *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. Chemosphere, No 204. 2018. p. 344-350.

GONZÁLEZ, Angel. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. Bucaramanga: Universidad industrial de Santander. Prospect. Vol. 7, No 2. 2009. [En línea]. <https://www.uac.edu.co/images/stories/publicaciones/revistas_cientificas/prospectiva/volumen-7-no-2/articulo6-v7n2.pdf>. [Citado en 1 Marzo de 2018].

GTM. Hoja de datos de seguridad. D-Limoneno. Sección 9. Propiedades físicas y químicas. [En línea]. <<http://www.gtm.net/images/industrial/d/D-LIMONENO.pdf>>. [Citado el 14 de agosto de 2018].

HERNÁNDEZ, Gregorio. Evaluación de las incidencias de salinidad y ph sobre la Biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de placa plana. Bogotá D.C. 2014. Trabajo de grado: Título de Ingeniero químico. Universidad de América. Facultad de ingeniería. Departamento de investigación.

HERNÁNDEZ, María. Determinación del índice de saponificación de aceite de maíz usando una lipasa de procedencia nacional. 2017. 78 p. [En línea]. <https://www.researchgate.net/profile/Cristobal_Larez_Velasquez/publication/3206>

22547_Determinacion_del_indice_de_saponificacion_en_aceite_de_maiz_usando_una_lipasa_de_procedencia_nacional/links/59f1cd97a6fdcc1dc7b92469/Determinacion-del-indice-de-saponificacion-en-aceite-de-maiz-usando-una-lipasa-de-procedencia-nacional.pdf>. [Citado en 15 de Agosto de 2018].

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Norma técnica colombiana. Compendio de normas para trabajos escritos. NTC 1486-6166. Bogotá D.C.: El instituto, 2018. ISBN 9789588585673. 153 p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Norma técnica colombiana. Grasas y aceites animales y vegetales. Determinación del índice de saponificación. NTC 335. 1998. [En línea]. <<https://patriciatocorafcca.wikispaces.com/file/view/NTC335.pdf>>. [Citado en 10 de Enero de 2018].

KANDA, Hideki., et al. Simple extraction method of green crude from natural blue-green microalgae by dimethyl ether. *Fuel*. Vol. 90. 2011. p. 1264-1266.

KANDA, Hideki., et al. Lipids extracted from several species of natural blue-green microalgae by dimethyl ether: Extraction yield and properties. *Revista Fuel* No 95. 2012. p. 88-92. [En línea]. [Citado en 10 de Marzo de 2018]. Disponible en Elsevier.

KUMAR, Jeevan., et al. Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. *Revista Algal Research* No 21. p. 138-147. 2017. [En línea]. [Citado en 27 de Marzo de 2018]. Disponible en Elsevier.

LIN, Tse., et al. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresource Technology*, No 184. 2015. p. 100-107.

LINARES, Luis. Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Revista Ra Ximhai*, 2012. p. 105. En línea. <<http://www.redalyc.org/pdf/461/46125177011.pdf>>. [Citado en 29 de Marzo de 2018].

MARTÍNEZ, Alejandra. Extracción de aceite de microalgas. Santiago de Cali. 2013. Trabajo de grado: Título de Master en ingeniería con énfasis en ingeniería química. Universidad del Valle. Escuela de ingeniería química.

MATA, Teresa., et al. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, No 14. 2010. p. 217-232.

PARDO, Luz. Talleres de bioquímica. Universidad de América, 2016. p, 21.

PÉREZ, Alexis. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Chile. Vol. 49, N°2. p. 160. [En línea]. <<https://scielo.conicyt.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf>>. [Citado en 15 de Junio de 2018].

QUEVEDO, Catalina. Crecimiento de *Scenedesmus sp* en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, Vol. 15 No 1. 2008. p. 25-31.

RAMÓN, Jacipt; et al. Obtención de Biodiésel a partir de aceite y semillas de *Jatropha curcas*, utilizando catalizadores inmovilizados y transesterificación in situ asistida por ultra sonido. *Revista Espacios*. Vol. 39. p. 24. [En línea] <<http://www.revistaespacios.com/a18v39n16/18391624.html>>. [Citado en 29 de Marzo de 2018].

RODOLFI, Liliana., et al. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 102 No 1. 2008. p. 100-112.

RODRÍGUEZ, Arzave. et al. Índice de saponificación de mayonesas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencia Biológicas. México. 2016. Vol 1. No. 2. p. 838-842. [En línea]. <<http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/10/145.pdf>>. [Citado en 20 de julio de 2018].

ROJAS, Alberto. Método: Conversión de las fuerzas g (RCF) a revoluciones por minuto (rpm) y Equilibrio del rotor. *Conosagi.org*. 2018. [En línea] <<http://conogasi.org/articulos/metodo-conversion-de-las-fuerzas-g-rcf-a-revoluciones-por-minuto-rpm-y-equilibrio-del-rotor/>>. [Citado en 30 de julio de 2018].

SOSA, Jose; VÁSQUEZ, Paula. Evaluación del potencial de un residuo proveniente de la industria panelera como fuente de carbono para la producción de biomasa microalgal. Bogotá. 2017. 122p. Trabajo de investigación para optar por el título de Ingeniero Químico. Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías.

TANZI, Celine., et al. Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae. *Revista Molecules*. 2012. p. 8196-8205. [En línea]. [Citado en 10 de Marzo de 2018]. Disponible en: <www.mdpi.com>.

TANZI, Celine; et al. New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. *Bioresource Technology*. Vol 134. p. 271-275. TECNAL. Equipamientos científicos. Centrifuga 206-BABY I. [En línea]. <<http://tecnal.com.br/produtos/centrifuga-baby-i-fanem/>>. [Citado en 1 de Agosto de 2018].

TEJEDA, Lesly. Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. *Revista Facultad de Ingeniería*. Vol 24. No. 39. 2015. p. 49. [En línea]. <<http://www.scielo.org.co/pdf/rfing/v24n39/v24n39a05.pdf>>. [Citado en 10 de Abril de 2018].

TORRES, A. Implementación de la técnica de Folch para la extracción de grasas en frío. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de ciencias naturales. p. 2-3. [En línea]. <<http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2008/2VeranoIntroduccion/1AyalaTorresHernandez%20Zarazua.pdf>>. [Citado en 10 de Abril de 2018].

TRUEBA, Gabriel. et al. Adaptación de *Leptospira interrogans* (sensu stricto) al agua dulce. *Revista cubana med*. Vol. 54. 2002. p. 11-14.

TUPIÑO, Estefanía. Cultivo de microalga *Scenedesmus Obliquus var Dimorphus* (TURPIN) para la obtención de biomasa y lípidos. Lima, Perú. 2016. 123p. Tesis para optar el grado de maestro en ecología y gestión ambiental. Universidad Ricardo Palma. Escuela de posgrado.

UNIVERSIDAD DE GRANADA. Ciclo celular y crecimiento. [En línea]. <<https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm>>. [Citado en 15 de Julio de 2018].

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO. Disolventes verdes. En línea <<http://www.dcne.ugto.mx/Contenido/MaterialDidactico/amezquita/Analitica3/Disolventes%20verdes.pdf>>. [Citado en 1 de Abril de 2018].

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. La química del jabón y algunas aplicaciones. 2014. [En línea]. <<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num5/art38/>>. [Citado en 29 de Marzo de 2018].

URIEL. Cámara de Neubauer. [En línea] <<http://uriel-93.over-blog.com/article-29526447.html>>. [Citado en 10 de Junio de 2018].

VOGLAR, Gabriel. Aceites y grasas comestibles. Diglicéridos. [En línea]. <http://procesosaceitesygrasas.blogspot.com/2014/11/que-son-los-aceites-y-las-grasas_6.html>. [Citado en 10 de Enero de 2018].

WANG, Liang., et al. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *Bioresource Technology*, No 129. 2013. p. 289-295.

YEH, Kuei., et al. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, No 105. 2012. p. 120-127.

ANEXOS

**ANEXO A.
COMPOSICIÓN FERTILIZANTE AGRÍCOLA FOLIAGRO**

Nitrógeno Total (N)	100,00 g/l	Boro (B)	0,20 g/l
Nitrógeno Amoniacal (N)	72,00 g/l	Cobre (Cu)*	0,20 g/l
Nitrógeno Nítrico (N)	3,20 g/l	Hierro (Fe)*	0,40 g/l
Nitrógeno Ureico (N)	24,80 g/l	Manganeso (Mn)*	0,40 g/l
Fósforo Asimilable (P ₂ O ₅)	300,00 g/l	Molibdeno (Mo)	0,03 g/l
Potasio Soluble en Agua (K ₂ O)	100,00 g/l	Zinc (Zn)*	0,50 g/l
Calcio (CaO)*	0,20 g/l	pH en solución al 10%	6,5
Magnesio (MgO)*	0,20 g/l	Densidad a 20 C	1,3 g/ml
Azufre Total (S)	0,80 g/l	*Quelutados con EDTA y ácido cítrico	

Fuente: FONSECA, Laura; et al. Evaluación de la remoción de cromo con cultivos de microalgas en un fotobiorreactor de panel plano. Bogotá. 2018. p. 70.

ANEXO B. TÉCNICA ASÉPTICA

1. Trabajar siempre al lado de una llama. Esta llama crea a su alrededor una atmósfera estéril y además se utiliza para esterilizar o flamear parte del material que se utiliza durante la siembra.
2. Las asas deben esterilizarse antes de ser utilizadas y una vez esterilizadas deben enfriarse antes de tomar la muestra de microorganismos con objeto de no destruirlos con el calor. El asa se enfría sobre el agar o sobre el material de vidrio (en zonas estériles del material de vidrio).
Después de utilizar las asas, se vuelven a esterilizar.
3. Las bocas de los tubos y matraces de vidrio se flamean ligeramente una vez destapados y después de la inoculación.
4. Durante la inoculación, los tapones se mantienen en la mano sujetándolos por la parte que no entra en contacto con tubos y matraces.
5. Siempre que es necesario abrir un tubo debe mantenerse en posición inclinada para que el riesgo de contaminación sea mínimo.

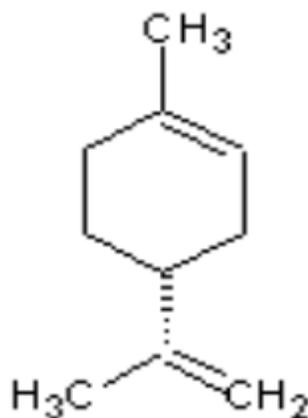
ANEXO C. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL D-LIMONENO

Figura 20. Propiedades del D-Limoneno

SECCION 9: PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS	
Aspecto Y Olor:	Líquido incoloro a amarillo pálido, olor cítrico
Punto de autoignición:	458 ° F (237 ° C)
Punto de Ebullición:	349 ° F (176 ° C)
Velocidad de Evaporación:	
Límites de inflamabilidad (explosivo) (% en volumen en el aire):	Inferior: 0.7 % Superior: 6.1%
Punto de inflamación:	> 110 ° F (43 ° C)
Índice de refracción:	1,471 a 1,474
Óptica de Rotación:	96 ° a 104 °
Punto de fusión:	-140 ° F (-96 ° C), se espesa en -108 ° F (-78 ° C)
SOLUBILIDAD (en agua):	Insoluble
Gravedad Específica:	0,838 a 0,843 a 68 ° F (20 ° C)
Presión de Vapor:	<2 mmHg a 68 ° F (20 ° C)
Tasa de Evaporación (BuAc = 1):	0,2

Fuente: GTM. Hoja de datos de seguridad. D-Limoneno. Sección 9. Propiedades físicas y químicas. [En línea]. <<http://www.gtm.net/images/industrial/d/D-LIMONENO.pdf>>. [Citado el 14 de agosto de 2018].

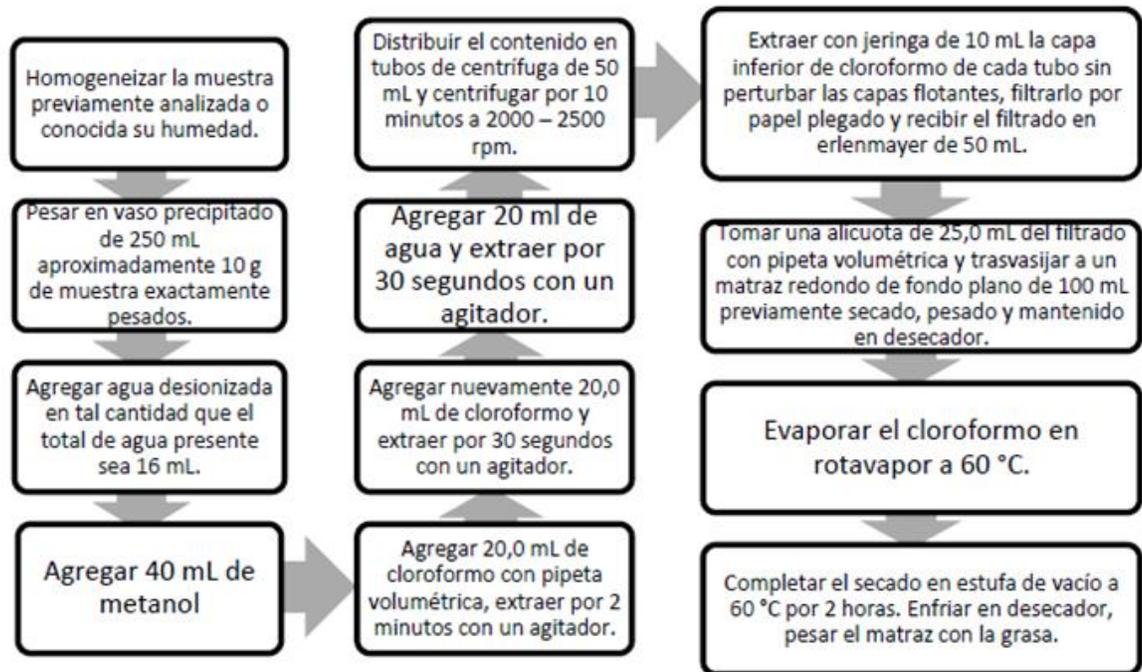
Figura 21. Estructura D-Limoneno



Fuente: TANZI, Celine. et al. Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae. Revista Molecules. 2012. p. 8198.

ANEXO D.
PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS MÉTODO BLIGH Y DYER

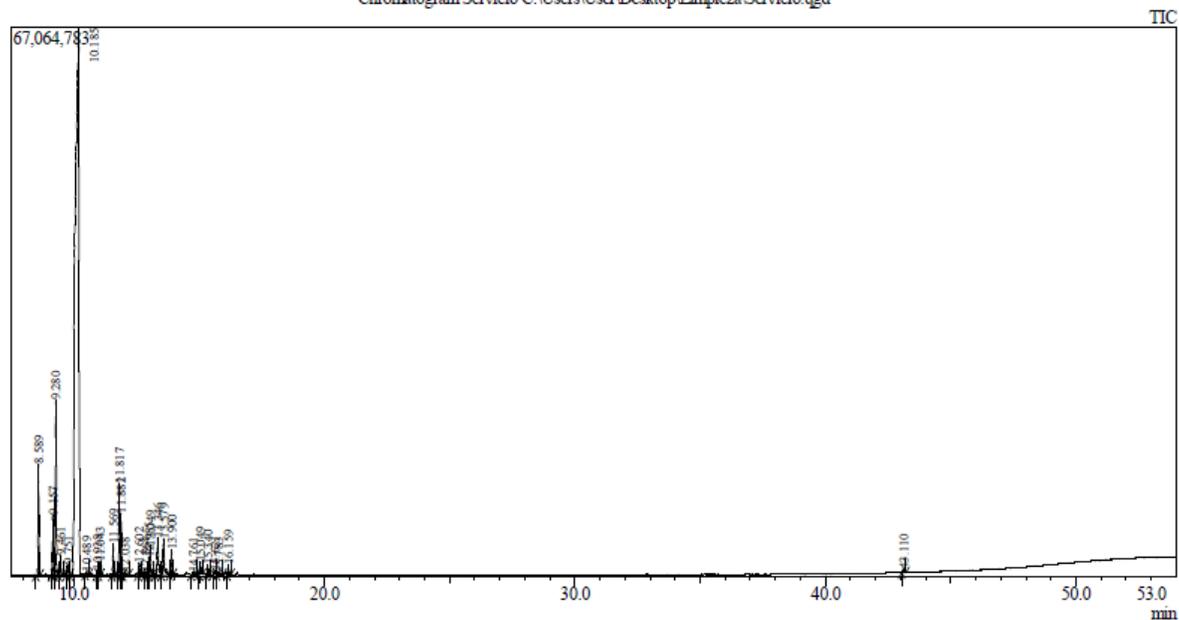
Figura 22. Protocolo Bligh y Dyer para la extracción de lípidos



Fuente: CALDERÓN, Sara; RAMÍREZ, Diana. Evaluación de la influencia lumínica sobre la producción de biomasa y lípidos a partir de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala banco. Bogotá. 2013. p. 39.

ANEXO E. RESULTADOS DE GC-MS DE LA FASE ORGÁNICA DEL EXPERIMENTO 3

Chromatogram Servicio C:\Users\User\Desktop\Limpieza\Servicio.qgd



Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Peak Report TIC			A/H	Mark	Name
				Area	Height	Height%			
1	8.589	8.480	8.655	29820722	3.13	13606809	8.34	V	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]he
2	9.157	9.095	9.215	17707399	1.86	7383641	4.52	2.40	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1
3	9.280	9.215	9.390	63704107	6.68	21367526	13.09	2.98	beta-Myrcene
4	9.461	9.390	9.565	6730820	0.71	2430335	1.49	2.77	Octanal
5	9.751	9.690	9.845	4777255	0.50	1342974	0.82	3.56	3-Carene
6	10.185	9.845	11.720	695671709	72.90	66930367	41.01	10.39	D-Limonene
7	10.489	10.445	10.620	1308473	0.14	353585	0.22	3.70	1-Octanol
8	10.938	10.890	10.980	1391311	0.15	605727	0.37	2.30	Myroxide
9	11.043	10.980	11.080	3653612	0.38	1586178	0.97	2.30	Linalool
10	11.569	11.510	11.655	8720978	0.91	3789975	2.32	2.30	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-m
11	11.817	11.720	11.850	27196304	2.85	11191669	6.86	2.43	cis(-)-1,2-Epoxy-p-menth-8-ene
12	11.882	11.850	11.945	16865690	1.77	7523494	4.61	2.24	Limonene oxide, trans-
13	12.038	11.945	12.200	1752584	0.18	342202	0.21	5.12	Octanoic acid
14	12.602	12.550	12.690	3668018	0.38	1506795	0.92	2.43	Citral
15	12.864	12.825	12.930	1243650	0.13	350043	0.21	3.55	2-Cyclohexen-1-one, 4-(1-methyleth
16	12.985	12.930	13.015	5364746	0.56	2152854	1.32	2.49	Santolina triene
17	13.049	13.015	13.145	9743546	1.02	3548711	2.17	2.75	(-)-cis-Isopipitenol
18	13.346	13.250	13.495	15667297	1.64	4548038	2.79	3.44	2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-m
19	13.579	13.495	13.820	15273512	1.60	4413283	2.70	3.46	Carveol
20	13.900	13.820	13.965	7725562	0.81	3058011	1.87	2.53	(-)-Carvone
21	14.761	14.670	14.900	1317279	0.14	241706	0.15	5.45	p-Mentha-1(7),8(10)-dien-9-ol
22	15.049	14.995	15.145	4417637	0.46	1501385	0.92	2.94	(3S,6R)-3-Hydroperoxy-3-methyl-6-(
23	15.340	15.275	15.430	3354999	0.35	1173197	0.72	2.86	(3R,6R)-3-Hydroperoxy-3-methyl-6-
24	15.621	15.555	15.695	1352887	0.14	466559	0.29	2.90	Cyclopentanone, 3-[3,5-decadienyl]-,
25	15.783	15.695	15.950	1041941	0.11	224329	0.14	4.64	1,2-Cyclohexanediol, 1-methyl-4-(1-
26	16.159	16.110	16.280	3436440	0.36	1149817	0.70	2.99	(2R,4R)-p-Mentha-6,8-diene, 2-hydro
27	43.110	43.040	43.210	1339390	0.14	423573	0.26	3.16	Bis(2-ethylhexyl) phthalate
				954247868	100.00	163212783	100.00		

ANEXO F. RESULTADOS DE GC-MS DE LA FASE ORGÁNICA CONCENTRADA DEL EXPERIMENTO 3

