

**EVALUACIÓN DE UN ALMIDÓN CATIONICO COMO FLOCULANTE PARA EL
PROCESO DE SEPARACIÓN DE BIOMASA MICROALGAL**

DANIELA ANDREA CORTÉS GUTIÉRREZ

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMERICA
FACULTAD DE INGENIERIAS
PROGRAMA DE INGENIERIA QUÍMICA
BOGOTA D.C
2016**

**EVALUACIÓN DE UN ALMIDON CATIONICO COMO FLOCULANTE PARA EL
PROCESO DE SEPARACIÓN DE BIOMASA MICROALGAL**

DANIELA ANDREA CORTES GUTIERREZ

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

**Director.
DIEGO RUBIO
Biólogo**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMERICA
FACULTAD DE INGENIERIAS
PROGRAMA DE INGENIERIA QUIMICA
BOGOTA D.C
2016**

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado 1

Jurado 2

Bogotá, D.C., Septiembre 2016

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.

Dra. Ana Josefa Herrera Vargas

Secretario General.

Dr. Juan Carlos Posada García-Peña

Decano Facultad de Ingenierías.

Ing. Julio Cesar Fuentes Arismendi

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez

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

DEDICATORIA

Este proyecto de grado se lo dedico a mis padres, Beatriz y Alejandro, porque sin ellos no hubiera sido posible cumplir el sueño de ser Ingeniera química, por el apoyo incondicional y la confianza que siempre depositan en mí. No hay páginas ni hojas, ni libros que llenen todo lo que ellos hacen por mí, por eso, este logro es el fruto de todo el esfuerzo de ellos, para que yo terminara mi carrera.

A mi familia, por siempre estar conmigo en las buenas y en las malas.

A mis amigos, colegas y compañeros que siempre estuvieron acompañándome en este viaje de conocimiento, de aventura y por la ayuda que siempre me ofrecieron.

Por último y no menos importante mi hermano David, que a pesar de su personalidad, su inteligencia racional y su forma poco cariñosa de demostrar amor, ha conseguido ser un soporte y un motor en mi vida.

Daniela Andrea Cortés Gutiérrez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis padres, por toda la ayuda que me brindaron en el transcurso del proyecto y por animarme siempre a seguir adelante y nunca desfallecer a pesar de las adversidades.

A mi hermano por colaborarme con las ayudas tecnológicas que facilitaron mi investigación.

A la Universidad de América por formarme de conocimiento para ser Ingeniera Química.

A todos los profesores que de una u otra manera fueron parte del eslabón para formarme como una profesional.

A todas las personas que me colaboraron durante todo el proyecto y en especial a la empresa RC MÁS QUIMICOS S.A de México quien me facilito y colaboro con él envío del producto ya que sin ellos el proyecto no se hubiera puesto en marcha.

Solo me queda decir, que VIVA LA INGENIERIA QUIMICA!!

CONTENIDO

	pág
RESUMEN	16
INTRODUCCIÓN	17
OBJETIVOS	18
1. GENERALIDADES	19
1.1 TECNICAS DE SEPARACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL	19
1.1.1 Centrifugación	20
1.1.2 Sedimentación	20
1.1.3 Flotación	20
1.1.4 Electroforesis	20
1.1.5 Filtración	20
1.1.6 Aspersión	21
1.1.7 Floculación	21
1.2 APLICACIONES DE LAS MICROALGAS	23
1.2.1 Microalgas	23
1.2.2 Aplicaciones	25
1.3 ALMIDONES CATIONICOS	28
2. METODOLOGÍA	30
2.1 SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ALMIDON	31
2.1.1 Obtención del almidón catiónico	33
2.2 PROCESO DE FLOCULACIÓN	34
2.3. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL ALMIDÓN EN EL PROCESO	40
2.3.1 Proceso de floculación cambiando el pH en la suspensión microalgal	40
2.3.2 Proceso de floculación con diferentes concentraciones celulares iniciales	41
3. ANALISIS DE RESULTADOS	42
3.1. SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ALMIDON	42
3.1.1 Características del almidón utilizado	47
3.2. PROCESO DE FLOCULACIÓN	47
3.2.1 Curva de calibración	47

3.2.2 Proceso de floculación	49
3.3. EVALUACIÓN DEL ALMIDON EN EL PROCESO DE FLOCULACIÓN	52
3.3.1 Desempeño del floculante cambiando el pH en la suspensión microalgal	52
3.3.2 Desempeño del floculante con diferentes concentraciones celulares iniciales	54
4. CONCLUSIONES	57
5. RECOMENDACIONES	58
BIBLIOGRAFIA	59
ANEXOS	62

LISTA DE CUADROS

	pág
Cuadro1. Contenido lipídico y productividad de diferentes especies de microalgas	24
Cuadro 2. Microalgas empleadas en la degradación de diversos contaminantes	26
Cuadro 3. Posibles aplicaciones de algunas especies de microalgas	28
Cuadro 4. Temas de búsqueda empleadas para la investigación	31
Cuadro 5. Empresas Contactadas	33
Cuadro 6. Análisis de concentración inicial no constantes	43
Cuadro 7. Análisis para la selección de la concentración a utilizar	45
Cuadro 8. Propiedades físicas y químicas	47

LISTA DE TABLAS

	pág
Tabla 1. Datos de curva de calibración	48
Tabla 2. Resultados obtenidos con concentraciones empleadas en la literatura	49
Tabla 3. Porcentaje de eficiencia a partir de los datos experimentales	51
Tabla 4. Resultados comparativos	52
Tabla 5. Lectura del pH al final de proceso	52
Tabla 6. Datos de control	53
Tabla 7. Resultados obtenidos para realizar el ANOVA	53
Tabla 8. Analisis de varianza	53
Tabla 9. Resultados primer ensayo	54

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura1. Esquema de las fases de producción de la biomasa de las algas y sus posibles usos	19
Figura 2. Adsorción de moléculas catiónicas en la célula del alga	23
Figura 3. Esquema de la metodología realizada	30
Figura 4. Esquema del Sistema de crecimiento de la microalga	35
Figura 5. Esquema del proceso de floculación en el laboratorio	38

LISTA DE ILUSTRACIONES

	pág
Ilustración 1. Inoculación de la microalga	36
Ilustración 2. Instrumentos para el proceso de floculación	37
Ilustración 3. Resultados de las pruebas a concentraciones de 20mg/l, 40mg/l, 60mg/L	49
Ilustración 4. Resultado final de flocular a diferentes concentraciones	50

LISTA DE GRAFICOS

	pág
Gráfico 1. Número de publicaciones por autor	32
Gráfico 2. Número de citas por autor	32
Gráfico 3. Regresión lineal de la curva de calibración	48
Gráfico 4. Porcentaje de Eficiencia vs Concentración de almidón catiónico	51
Gráfico 5. Eficiencia vs Concentración de almidón con dos concentraciones celulares iniciales diferentes	55
Gráfico 6. Porcentaje de eficiencia vs Concentración celular inicial	55

GLOSARIO

ABSORBANCIA: es la intensidad de luz a una determinada longitud de onda que pasa por una muestra.

BIOMASA MICROALGAL: es el resultado de cultivar las microalgas por medio de la fotosíntesis, para el posterior tratamiento, por la cual, el medio de cultivo tiene acumulación de nutrientes, CO₂ y la concentración de materia orgánica microalgal.

CÁMARA DE NEUBAUER: herramienta empleada para realizar conteos celulares.

COPROCESOS: son procesos alternos donde emplean las condiciones externas (Ambientales) para el crecimiento de la especie.

DENSIDAD OPTICA: es una magnitud física, donde mide la absorción de un elemento óptico a una determinada distancia.

ESPECTROFOTÓMETRO: es un instrumento que tiene la capacidad de manejar el haz de luz para facilitar la cuantificación de absorción de energía de una muestra.

FLOCULANTE: es una sustancia química que aglutina los sólidos en suspensión, los precipita facilitando la extracción por medio de la formación de flocs.

INSTRUMENTO DE TEST DE JARRAS: instrumento donde se permite realizar agitaciones programables, puede poseer de 4 a 6 puestos.

LONGITUD DE ONDA: es la distancia entre una cresta a otra cresta, entendiéndose como cresta como el pico alto de una onda.

SOBRENADANTE: es la fase líquida que se produce en un sistema de separación.

SUSPENSION MICROALGAL: término empleado para referenciar el cultivo de microalgas preparado, para ser utilizado en las pruebas del laboratorio.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación evaluó un almidón catiónico como floculante en la separación de la biomasa microalgal utilizando como microalga *Chlorella vulgaris*, en que se determinó la eficiencia del almidón trabajado, teniendo como base la información de los almidones empleados en la literatura, logrando así a partir de las concentraciones 0.33, 0.66, 1, 1.33, 1.86, 2.33 y 2.5 g/L obtener un porcentaje del 81% de eficiencia del proceso de floculación. Se inició con la revisión bibliográfica para saber cuáles fueron las concentraciones de almidón utilizadas en las investigaciones, variables que influyeron en la eficiencia del proceso de floculación tales como el pH, concentración inicial de biomasa y como la clasificación del almidón catiónico puede influenciar en los resultados de la eficiencia. Finalmente se analizaron los resultados y se determinó que el almidón trabajado generó un porcentaje de eficiencia del proceso del 81%, pero este porcentaje se consigue aumentar si se desarrolla en cultivos con concentraciones celulares iniciales de 1.74×10^6 Cel/ml a una concentración de almidón de 1.33 g/L y obtener así un 99% de eficiencia de floculación.

PALABRAS CLAVES: absorbancia, almidón catiónico, biomasa microalgal, *Chlorella vulgaris*, concentración celular, floculación, floculante, grado de sustitución.

INTRODUCCIÓN

Debido al aumento de la demanda energética, se han desarrollado nuevas técnicas para la producción de biocombustible. En la actualidad algunos países emplean aceites de origen vegetal para obtener biodiesel, pero la implementación ha sido lenta, por el alto costo energético de la producción de biodiesel.

Las microalgas producen alto contenido de lípidos y proteínas, obteniendo provecho especialmente en la extracción de lípidos para la fabricación de biocombustible u otros productos para la industria alimentaria (por ejemplo, suplementos alimenticios con el fin de mejorar el desempeño del cerebro); además, las microalgas son una materia prima económica y a la vez son potencial fuente de energía¹. En general, un sistema de producción de biomasa de microalgas consiste primero en cultivarlas y posteriormente recuperar la biomasa²; debido al tamaño de las células de las microalgas (2-20µm), dicho proceso requiere de tiempo o una elevada inversión económica.

Actualmente existen varios métodos que pueden facilitar la extracción de la biomasa microalgal como lo son la centrifugación, sedimentación, filtración y floculación. La mayoría de estos procesos presentan ventajas y desventajas, pero recientes estudios realizados por las Universidades de Jinan y Wageningen dan favorabilidad a la floculación como proceso a seguir para la recuperación de biomasa, ya que se emplean sustancias orgánicas e inorgánicas. Recientemente se han utilizado sustancias orgánicas favorables (quitosano y almidones catiónicos) en el cultivo de microalgas porque son económicas de adquirir y favorecen el tiempo de extracción de la biomasa microalgal, lo que se ve reflejado en el bajo costo del método de floculación con respecto a los otros métodos de separación.

Por lo tanto, el proyecto pretende utilizar un almidón catiónico como agente floculante en el cultivo de microalgas, favoreciendo la recuperación de la biomasa, permitiendo empezar una línea de investigación con sustancias orgánicas, como floculantes y estudios relacionados a este proceso, para ser empleadas a gran escala y aplicarlas en Ingeniería química.

¹Jinheng Wu, Jiexia Liu, Lifang Lin, Chengwu Zhang, Aifen Li, Yi Zhu, Yuanming Zhang (2015). Evaluation of several flocculants for flocculating microalgae. *Bioresource Technology.*, 495-501

² Ibid., p.495

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar un almidón catiónico como floculante para el proceso de separación de biomasa microalgal, a nivel laboratorio.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

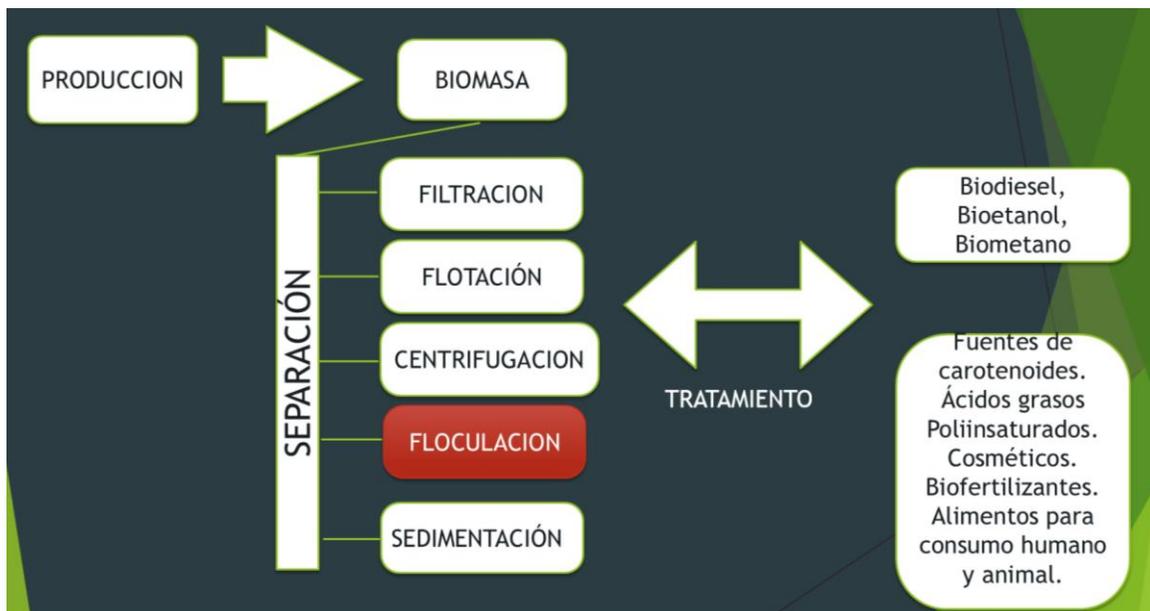
- Seleccionar la concentración del almidón catiónico a utilizar.
- Realizar el proceso de floculación a nivel laboratorio a partir del almidón como floculante.
- Evaluar la eficiencia del almidón en el proceso de floculación

1. GENERALIDADES

1.1 TECNICAS DE SEPARACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL

La obtención de la biomasa microalgal, consiste en implementar dos etapas, la primera etapa concentrar la biomasa y la segunda etapa separarla de su cultivo, la cual se conocen siete métodos principales llamados: Centrifugación, sedimentación gravitacional, flotación, electroforesis, filtración, floculación y aspersion.

Figura 1. Esquema de las fases de producción de la biomasa de las algas y sus posibles usos.



Cultivar las microalgas no genera un gran reto, cosecharlo y obtener una gran cantidad de biomasa microalgal desde el medio es un problema mayor, ya que aporta entre el 20% y el 30% de los costos globales del proceso de producción de biocombustible³.

³ HANSEL, Philip. RIEFLER, Guy. STUART, Benjamin. Efficient flocculation of microalgae for biomass production using cationic starch. En Algal Research 2014, no. 5, p 133-139

1.1.1 Centrifugación. La centrifugación es un proceso donde se aplican fuerzas centrífugas, para poder liberar la biomasa de su cultivo, debido a estas fuerzas centrífugas ejercidas, es el método más eficiente de todos. Para llevar a cabo las fuerzas es necesario una gran cantidad energética que tiende a ser costoso para el proceso, por tal razón se usa a escala laboratorio, adicionalmente es un método donde ocasiona un daño en la estructura celular en el microorganismo.

1.1.2 Sedimentación. La sedimentación gravitacional se aplica para separar las microalgas del medio en procesos de tratamiento de aguas y se busca que las microalgas incidan en el asentamiento de los sólidos en suspensión. Las tasas de sedimentación de las algas están influenciadas por la velocidad de sedimentación de las microalgas, estas aumentan dependiendo del tamaño de célula⁴, es decir, que a medida que la célula sea más pequeña el tiempo de sedimentación será lento en comparación a las microalgas de tamaño mayor, es así que el método es eficiente en determinados casos. La sedimentación es empleada a escala piloto siempre y cuando al medio del cultivo se le añada un floculante, permitiendo que los *flocs* formados posean un tamaño mayor de partícula, lo cual, sedimenta en cuestión de minutos, es así, que la combinación de los dos procesos se convierte en el método más empleado y eficiente con respecto a la sedimentación gravitacional.

1.1.3 Flotación. La flotación de la biomasa de algas ha probado ser un método prometedor en la recolección de algas unicelulares pequeñas y en ensayos a escala de laboratorio, la técnica consiste en la adición de gases, como el ozono o aire, que interactúan con la carga de las paredes celulares, permitiendo la flotación de las microalgas y subsecuente separación⁵. Flotación por aire disuelto (DAF), la flotación electrolítica, y flotación por aire dispersado son las técnicas de flotación de uso común de acuerdo con el método de producción de burbujas⁶, sin embargo una desventaja es la falta de técnica y el presupuesto para adquirir los instrumentos necesarios.

1.1.4 Electroforesis. La electroforesis es un método de laboratorio que utiliza un campo eléctricamente cargado en una matriz gelatinosa, logrando separar el alga de la solución, conduciéndola hacia la superficie. Esto se debe a la generación de carga en el medio, permitiendo la atracción al alga y así su separación. Presenta varias ventajas al usar métodos electroquímicos, incluida la compatibilidad ambiental, versatilidad, eficiencia energética, la seguridad, la selectividad, y la rentabilidad⁷

1.1.5 Filtración. La filtración es el método, en el cual, las células de la microalga se separan del medio de cultivo empleando un material poroso (membrana) llamado filtro, reteniendo las células en la superficie de la membrana. La filtración es más eficiente en células grandes, pero este método tienden a encarecer el precio, por el cambio de membrana y la gran cantidad de biomasa requerida⁸

1.1.6 Aspersión. La aspersión es un método cuyo principio es la obtención de un producto en polvo a partir de un material líquido concentrado con una corriente de aire caliente que actúa como medidor calefactor y fluido de transporte⁹. Es un método menos empleado que los anteriores ya que es caro y puede deteriorar las células de la microalgas; se emplea en laboratorio en prácticas de secado o liofilización.

1.1.7 Floculación. La floculación es un método eficiente en donde las microalgas utilizan su carga negativa superficial, la que de forma natural poseen las membranas exteriores debido a la presencia de polisacáridos extracelulares¹⁰; para conglomerar aquellas partículas de poca adherencia, con la ayuda de una sustancia catiónica como floculante, este las puede neutralizar.

Es así que en los últimos años emplean la floculación para la separación de la biomasa microalgal, no solo por el bajo costo de producción, sino también por el porcentaje de recuperación celular de la microalga después de separar la biomasa de su cultivo. La floculación es el método más empleado no solo para concentrar la biomasa sino también para tratar la contaminación de aguas, gracias a las ventajas que presentan los floculantes en el medio, se evita contaminar el producto final, en el caso de las microalgas, no interfiera con las aplicaciones finales de la biomasa como en la industria de alimentos o en tratamientos posteriores para la extracción de lípidos.

La floculación se puede lograr de varias maneras y ha sido explorada en diferentes enfoques, para el caso de la floculación de las microalgas, estos enfoques van desde métodos de floculación tradicionales que se utilizan ampliamente en otros campos de la industria (por ejemplo, Floculación química), nuevas ideas basadas en la biología de la microalga (por ejemplo, biofloculación) y el de tecnologías emergentes (por ejemplo, el uso de nanopartículas magnéticas)¹¹. Para el caso de la floculación química se utilizan sales metálicas (aluminio o de hierro), polímeros

⁴ Harvesting of Microalgal Biomass Manjinder Singh, Rekha Shukla, and Keshav Das Biorefining and Carbon Cycling Program College of Engineering The University of Georgia Athens, Georgia BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS of Microalgae

⁵ HERNANDEZ, Alexis. LABBE, José. Microalgas, cultivos, y beneficios. Producción de biocombustibles a partir de microalgas. En: Revista de Biología Marina y Oceanografía Agosto 2014 Vol 49, no. 2, p 157-173

⁶ Manji., Op. Cit., p.81

⁷ JARAMILLO OBANDO, Juan. Evaluación tecno-económica de la producción de biocombustible a partir de Microalgas. Manizales, 2011, 24 p. Tesis (Magister en Ingeniería Química). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Maestría en Ingeniería Química

⁸ Op. Cit., p 29

⁹ Op. Cit., p 30

¹⁰ ESPAÑA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE Op. Cit., p 53

¹¹ VANDAMME, Dries. FOUBERT, Imogen. MUYLAERT, Koenraad. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. En Trends in Biotechnology Abril 2013 Vol 31, no. 4, p 233-239

catiónicos o polímeros aniónicos, entre otros. La autofloculación ocurre espontáneamente en el cultivo de microalgas por encima de un pH de 9, se asocia con la formación de precipitados de calcio o de magnesio¹². Dependiendo de las condiciones, estos precipitados llevan carga superficial positiva y puede inducir floculación mediante neutralización de la carga¹³. La biofloculación se presenta a veces espontáneamente en cultivos de microalgas en lagos o ríos, donde se ocasiona por sustancias poliméricas extracelulares en el medio, usualmente se utiliza en tratamientos de aguas. La co-floculación también se presenta espontáneamente en presencia de otras especies biológicas como bacterias y otras especies microalgales.

El proceso de floculación químicamente hablando, depende de las propiedades de la superficie celular de la microalga y estas propiedades difieren entre especies¹⁴ ya que cada especie puede producir diferentes cantidades de polisacáridos extracelulares y pueden llegar a variar también dependiendo de las condiciones de cultivo. Por lo tanto, influye el tamaño de la especie, la composición bioquímica de la superficie celular, la selección y dosificación del floculante.; además, la carga negativa que posee la pared celular permite ionizar con otros átomos y es medida en términos de potencial Zeta¹⁵, por último, la edad de la célula también perjudica la interacción molecular disminuyendo la acción del floculante.

Como se dijo anteriormente, en la floculación química al agregar una sustancia externa para permitir la formación de “flocs” y debido a la carga superficial negativa que poseen las microalgas, se busca emplear compuestos con carga positiva para facilitar la formación de aglomerados. El uso de compuestos orgánicos tales como quitosano o almidones catiónicos representa una ventaja, ya que, no añaden compuestos tóxicos a la biomasa. En el último año, se ha utilizado como sustancia novedosa los almidones catiónicos como agente floculante en la separación de la biomasa microalgal. Debido a sus cargas, el mecanismo de aglomeración de flocs, consiste en atracción o la presencia de las fuerzas de Van der Waals (Ver figura 2)

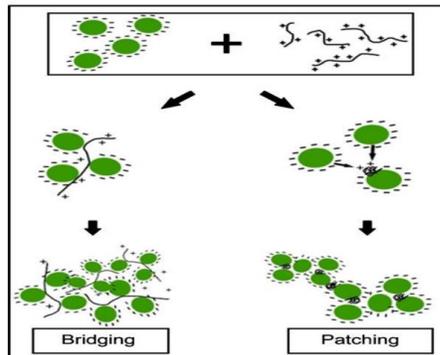
¹² Ibid., p 236

¹³ Ibid., p 236

¹⁴ Ibid., p 237

¹⁵ CHATSUNGNOEN, Tawan. Chisti, Yusuf. Harvesting microalgae by flocculation – sedimentation. En *Algae Research* 2016 Vol 13, p 271 - 286

Figura 2. Adsorción de moléculas catiónicas en la célula del alga.



Fuente: Harvesting of microalgae by cationic-polymer. Dr. Mordechai Tavassi. Recuperado 12 de marzo de 2016 de <http://web2.bgu.ac.il/algal/Presentations/Moti%20Tavasi%20-%20Harvesting%20of%20microalgae%20by%20cationic-polymer.pdf>

1.2 APLICACIONES DE LAS MICROALGAS

1.2.1 Microalgas. Las microalgas son organismos unicelulares microscópicos (2-200 μm), poliféuticos (conjunto de especies descendientes de más de un ancestro común¹⁶), su metabolismo puede ser autótrofo o heterótrofo y suelen ser eucariontes¹⁷. Estos tipos de microorganismos tiene la capacidad de reportar alto contenido de biomasa y contenido lipídico en su estructura celular, por lo tanto, es importante utilizar un método de cultivo que favorezca el crecimiento y desarrollo de las microalgas controlando la luz, temperatura, periodos de exposición a la luz, nutrientes, pH y salinidad.

El género *Chlorella* posee propiedades tales como alta capacidad de degradar CO_2 , puede absorber gran cantidad de nutrientes suministrados en medios donde se encuentren fuentes de carbono, nitrógeno, fosfatos, se adapta a cambios dentro de un fotobioreactor tales como pH, salinidad; posee un ciclo reproductivo rápido ya que su máximo crecimiento puede tardar de 8 a 10 días, tiene alta eficiencia fotosintética, que le permite ser un microorganismo capaz de utilizarse en diversos campos de la industria en general.

¹⁶ SCHNEK, Curtis. MASSARINI, Barnes. Biología. Séptima Edición. Editorial panamericana. 2007 p 108

¹⁷ GREENWELL, H. C., LAURENS, M. L., SHIELDS, R. J., LOVITT, R. W. Y FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. En: J. Roy. Soc. 2009 Vol 10, p 703-726

Las microalgas que son oleaginosas tienen la particularidad de producir ácidos grasos en su membrana celular, permitiendo utilizarse para la producción de biodiesel, algunas especies pueden acumular entre 20-80% (peso seco) de triglicérido, no requieren terrenos cultivables para el crecimiento celular y no compiten por alimento humano¹⁸. A continuación se presenta un resumen del contenido lipídico de diferentes especies de microalgas.

Cuadro 1. Contenido lipídico y productividad de diferentes especies de microalgas.

Cultivo	Especie de microalga	Contenido lipídico (% peso seco)	Productividad lipídica (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
Agua dulce	<i>Botryococcus</i> sp.	25.0 – 75.0	-
	<i>Chlorellaemersoni</i>	25.0 – 63.0	10.3 – 50.0
	<i>Chlorellavulgaris</i>	5.0 – 58.0	11.2 – 40.0
	<i>Chlorellasp.</i>	10.0 – 48.0	42.1
	<i>Chlorococcum</i> sp.	19.3	53.7
	<i>Scenedesmusobliquus</i>	11.0 – 55.0	-
	<i>Scenedesmusquadricauda</i>	1.9 – 18.4	35.1
	<i>Scenedesmus</i> sp.	19.6 – 21.1	40.8 – 53.9
Agua Marina	<i>Dunaliella salina</i>	6.0 – 25.0	116.0
	<i>Dunaliellasp.</i>	17.5 – 67.0	33.5
	<i>Nannochloris</i> sp.	20.0 – 56.0	60.9 – 76.5
	<i>Nannochloropsisoculata</i>	22.7 – 29.7	84.0 – 142.0
	<i>Nannochloropsis</i> sp.	12.0 – 53.0	60.9 – 76.5
	<i>Neochlorisoleoabundans</i>	29.0 – 65.0	90.0 – 134.0
	<i>Paviova salina</i>	30.9	49.4
	<i>Spirulinaplatensis</i>	4.0 – 16.6	-

Fuente: Mata, T. M., Caetano, N. S. y Martins, A. A.. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010 Vol 14, no. 1 p. 220

Aparte de los lípidos, de los compuestos de más interés obtenidos de las microalgas, destacan los carotenoides, ficobiliproteínas, polisacáridos, y compuestos con actividad biológica provenientes de las especies más utilizadas tales como *Dunaliella* y *Porphyridium*.¹⁹

¹⁸Chisti, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. En: Trends in Biotechnology.2011 Vol 26, no. 3, p 126-131.

¹⁹ (s.f). Introducción y antecedentes. [En línea]. Disponible en <<http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/20804/Capitulo1.pdf>>

1.2.2 Aplicaciones. El uso y la producción de las microalgas fue llevado a cabo experimentalmente por primera vez en Alemania durante la II Guerra Mundial y se ha desarrollado desde entonces en el empleo para fuentes de energía, formando parte de coprocesos como la biomitigación del CO₂, el tratamiento de aguas residuales y en la obtención de productos de alto valor añadido con aplicaciones en la alimentación, cosmética, etc.²⁰

- **Biodiesel:** El biodiesel es un líquido compuesto de alquil-ésteres de alcoholes de cadena corta como etanol y metanol, con ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable²¹. La producción de biodiesel se obtiene mayormente por las microalgas debido a que presentan mayor eficiencia fotosintética, asimilación del CO₂, absorben más nutrientes con respecto a otros microorganismos y pueden acumular entre 20% a 80% de triglicéridos²², no se necesitan tierras fértiles y son de fácil crecimiento.

El biodiesel presenta ventajas y desventajas que pueden afectar su producción, entre las ventajas, la más representativa es la disponibilidad de materia aprovechable de la naturaleza para la producción de biocombustible, por tal razón es favorable con el medio ambiente. En las desventajas más significativas se encuentra la contaminación del cultivo en el proceso de recuperación de la biomasa microalgal, disminuyendo la tasa de biomasa a utilizar dificultando la producción de energía necesaria, la utilización de grandes cantidades de agua en los cultivos. Es por tal motivo que se busca recuperar la biomasa con sustancias orgánicas como floculantes evitando contaminar el producto final y reutilizar el medio.

- **Depuración de aguas:** Se han utilizado las microalgas para el tratamiento de aguas residuales, las cuales presentan concentraciones elevadas de contaminantes tales como nitrógeno, fósforo y metales pesados, por lo tanto, se busca emplear técnicas de biorremediación.²³

El uso de las microalgas ha sido a pequeña escala ya que el costo de separación de la biomasa generada en el agua depurada, debido al pequeño tamaño de las microalgas y su baja densidad, sobre todo, en un sistema de canales de

²⁰ SANTOS, Ana Maria. GONZALEZ-ARECHAVALA, Yolanda. MARTÍN-SASTRE, Carlos. Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. En: Revista Anales [En Línea]. Disponible en <http://www.revista-anales.es/web/n_24/pdf/seccion_13.pdf>

²¹ FERNÁNDEZ-LINARES, MONTIEL-MONTOYA, & JESÚS. Producción de biocombustibles a partir de microalgas. En: Revista de Sociedad, Cultura, y Desarrollo Sustentable, septiembre-Diciembre 2012 Vol 8, no. 3, p 101-115

²² CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. En: Trends in Biotechnology. 2011 Vol 26, no.3, p 126-131.

²³ ESPAÑA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. Aplicaciones de las Microalgas: Estado de la técnica, 2013. 28p

oxidación o estanques²⁴ es costoso. Además, el potencial de las microalgas se fundamenta en su crecimiento en estos tipos de agua, ya que son fuentes de nitrógeno y fósforo (Compuestos necesarios del medio de cultivo para el crecimiento de la microalga) que permiten eliminar la mayor parte de materia orgánica disuelta y suspendida, para poder ser vertida en condiciones que no perjudiquen al medio ambiente.

Se presentan ventajas en este proceso como la manipulación de la especie en donde se ocasionan cambios en el medio con el fin de presentarse la biorremediación, pero este puede ocasionar una desventaja, ya que en algunas ocasiones el tipo de agua residual presentan características fisicoquímicas que influyen en la inhibición de la microalga.

Cuadro 2. Microalgas empleadas en la degradación de diversos contaminantes.

MICROALGA	TIPOS DE AGUA RESIDUALES.
<i>Prototheca zopfi</i>	Hidrocarburos derivados del petróleo
<i>Chlorella pyrenoidosa.</i>	Tintes azoicos en agua residuales
<i>Chlorella sp.</i>	Residuos de ganadería dirigidos anaeróbicamente.
<i>Ankistrodesmus y Scenedesmus</i>	Aguas residuales de industria del papel y alperujos
<i>Chlorella sokoniana</i>	Agua residual tras tratamiento secundario.
<i>Botryococcus braunii</i>	Agua residual tras tratamiento secundario.

Fuente: ESPAÑA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. Aplicaciones de las Microalgas: Estado de la técnica, 2013. 31 p

El proceso de depuración de agua acompañado de la acción de las microalgas, permite generar un proceso biológico natural como lo es la biofloculación, ya que se busca aprovechar las fuentes de energía presentes en el agua para facilitar el crecimiento de las microalgas y posteriormente retirar la materia orgánica no deseada del agua

- **Biofijación de CO₂.** Las microalgas son los mayores fijadores de CO₂ transformándolo en biomasa y reteniéndolo en su interior. El CO₂ que necesita la obtiene del aire, de carbonatos solubles y de las emisiones industriales.

Las microalgas se revelan como un elemento amortiguador de la acumulación de CO₂ atmosférico ya que son los principales productores primarios de los ecosistemas acuáticos, produciendo alrededor del 50% de la fotosíntesis total²⁵. Los aspectos más importantes a investigar y desarrollar para alcanzar el objetivo

²⁴ Ibid., p 30

²⁵ Ibid., p 40

de mitigar el CO₂ se centran en la selección de las microalgas, el diseño y operación de los FBRs (Reactor reproductor rápido), el uso eficiente de los procesos de combustión y el desarrollo de procesos de aprovechamiento integral de la biomasa (combinación con la obtención de biocombustibles, de otros compuestos de interés novedoso y con el tratamiento de aguas residuales)²⁶. Es así que un sistema de cultivo, donde se combine la fijación de CO₂ por parte de la microalga para transformarla en biomasa y un sistema de separación como lo es la floculación para recuperar esta biomasa microalgal resultante, llega ser aprovechado para obtener productos de interés comercial.

- **Otras aplicaciones.** Se sabe que la biomasa de las microalgas puede contener proteínas, lípidos esenciales, pigmentos, carbohidratos, minerales y vitaminas que son normalmente comercializadas como suplemento alimentario en tabletas o polvo ya sea para los humano o para los animales, pero también se pueden extraer compuestos para cosméticos, antioxidantes y biofertilizantes.

Otra aplicación importante de microalgas es la obtención de betacaroteno y la Astaxantina, dos principales carotenoides empleados comercialmente en colorantes y suplementos de alimentación humano y animal; Para el caso de Astaxantina, su aplicación se realiza en las granjas acuícolas y como suplemento a la dieta o antioxidante.

En las especies de microalgas el contenido lipídico puede variar y puede llegar a almacenar un 85%. Dentro de los lípidos de interés se encuentra a los llamados ácidos Ω -3 y 6 o PUFAs (Ácidos grasos poliinsaturados), a los cuales se les atribuye una importancia terapéutica en enfermedades inflamatorias, cardíacas, reumáticas, entre otras.²⁷

Los beneficios de las microalgas como biofertilizante: capacidad de estimular la germinación, aporta al crecimiento de la planta, aumentado del contenido de clorofila y la capacidad fotosintética, mayor resistencia a la sequía, a la salinidad y al estrés. Sin embargo las microalgas también producen biotoxinas, inhibidores y repelentes (compuestos aromáticos y terpenoides halogenados con actividad anti-fúngico, bacteriano, insectos).

²⁶ SANTOS, Ana Maria. GONZALEZ-ARECHAVALA, Yolanda. MARTÍN-SASTRE, Carlos, Op .Cit., p.26

²⁷ ARRIETA, Esteban. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. En: Revista de Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, [en línea]. Vol 14, No.1 (2008) [Consultado el 30 abr. 2016]. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/266730483_Aplicaciones_biotecnologicas_de_las_microalgas_Biotechnologic_uses_of_microalgae>

A continuación se presenta un resumen de principales aplicaciones de algunas especies de microalgas.

Cuadro 3. Posibles aplicaciones de algunas especies de microalgas.

ESPECIE DE MICROALGA	POSIBLE APLICACIÓN.
<i>Chlorella</i>	Salud
	Aditivo de alimentación
	Nutrición animal.
	Cosméticos
	Biocombustibles
<i>Dunaliella salina</i>	Betacaroteno
	Suplemento alimentario
	Cosmético
<i>Botryococcus braunii</i>	Biodiesel
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina
	Aditivo alimentario
	Farmaceuticos
<i>Artrospira</i>	Carotenos
	Cosméticos
<i>Nannocloropsis</i>	Ácido ecosapentanoico
	Biodiesel

Modificado de: SANTOS, Ana Maria. GONZALEZ-ARECHAVALA, Yolanda. MARTÍN-SASTRE, Carlos. Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. En: Revista Anales [En Línea]. Disponible en <http://www.revista-anales.es/web/n_24/pdf/seccion_13.pdf> .

Para obtener todos estos productos fue necesario cultivarlas ya sean en estanques abiertos o cerrados, suministrarles agua, CO₂, nutrientes y luz, para posteriormente obtener biomasa, separándola del medio de cultivo (por alguno de los métodos explicados en el capítulo 1) y por ultimo secarla²⁸

1.3 ALMIDONES CATIONICOS

Es un almidón modificado producido a partir de la reacción química entre el almidón nativo y compuestos que en su estructura contienen grupos amino o amonios²⁹, por cual, en este almidón se produce una alteración en una o varias propiedades ya

²⁸ SANTOS, Ana Maria. GONZALEZ-ARECHAVALA, Yolanda. MARTÍN-SASTRE, Carlos. Op. Cit., p 22

²⁹ SANCHEZ GONZALEZ, Ismael. Propiedades fisicoquímicas de almidones catiónicos elaborados por extrusión. Mexico D.F. 2007. Tesis (Maestro en tecnología avanzada). Instituto Politécnico Nacional. Programa de Tecnología Avanzada. Área de Alimentos.

sean físicas, químicas o estructurales del almidón³⁰. Así, en la actualidad existen almidones modificados elaborados para usos específicos, entre los que se destacan los almidones catiónicos obtenidos por modificación química (eterificación) cuyo principal cliente es la industria del papel; para la retención y la resistencia del papel. Los almidones son floculantes naturales eficaces para el tratamiento de la materia orgánica e inorgánica en aguas residuales³¹.

En la modificación química por eterificación, los compuestos reactantes tienen en su estructura grupos que son capaces de proporcionar o adicionar una carga eléctrica positiva a la estructura del almidón nativo³². En general el número promedio de grupo hidroxilo por unidad de anhidroglucosa, sobre los cuales algún grupo funcional fue sustituido, se mide en términos de grados de sustitución (DS)³³. Cuando se tienen grados de sustitución de 0.1, esto representa que hay un grupo funcional sustituido en la estructura del almidón por cada 10 unidades de anhidroglucosa³⁴. Para la industria de papel utilizan el DS entre 0.02 a 0.1 y por sus propiedades de atracción o repulsión electromagnéticas, DS entre 0.25 a 1.54 donde se favorece la floculación.

³⁰ CONTRERAS, Karen. SALCEDO, Jairo. ESTRADA, Francisco. Caracterización funcional de almidón catiónico de yuca (*Manihot esculenta*). En Revista Ion Octubre 2013 Vol 26, no.2

³¹ Ibid., p 1

³² SANCHEZ GONZALEZ, Ismael, Op cit., p,14

³³ SANCHEZ GONZALEZ, Ismael, Op cit., p,15

³⁴ SANCHEZ GONZALEZ, Ismael, Op cit., p,25

2. METODOLOGÍA

El proyecto consta de 3 fases, en donde cada fase consiste en cumplir cada uno de los objetivos. La primera fase consistió en seleccionar la concentración de almidón catiónico a utilizar. La segunda fase permite a partir de las concentraciones ya encontradas, realizar las pruebas en el laboratorio para determinar la eficiencia del proceso. En la tercera fase se evaluó el desempeño del almidón como floculante en el cultivo de *Chlorella vulgaris* y cómo puede influir en la eficiencia del proceso.

Figura 3. Esquema de la metodología realizada

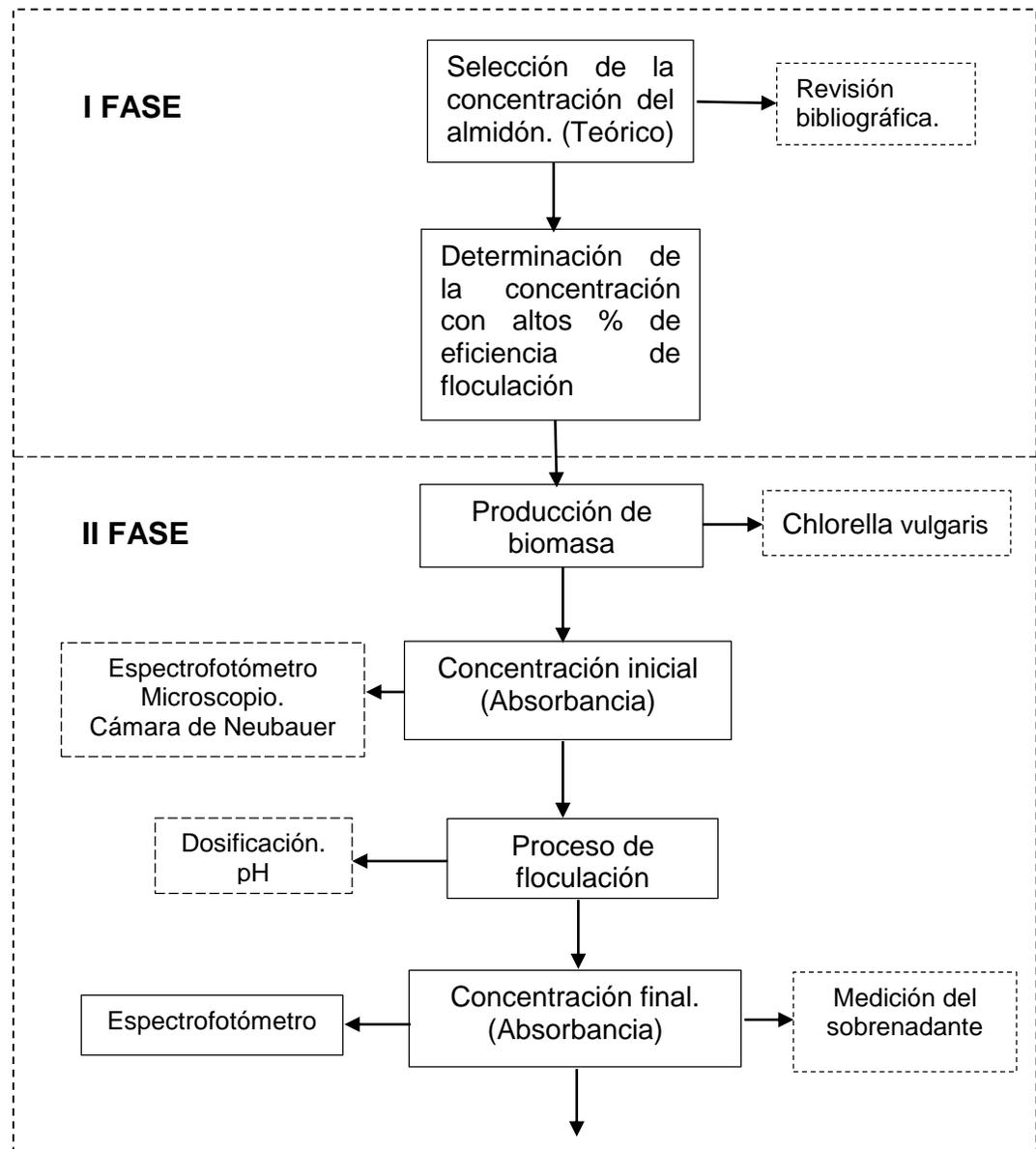
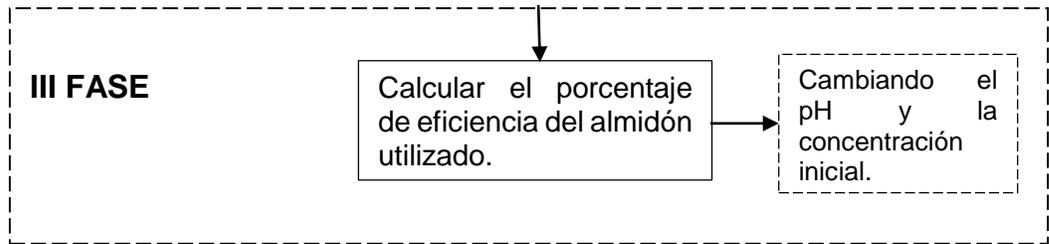


Figura 3. Continuación



2.1 SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ALMIDON

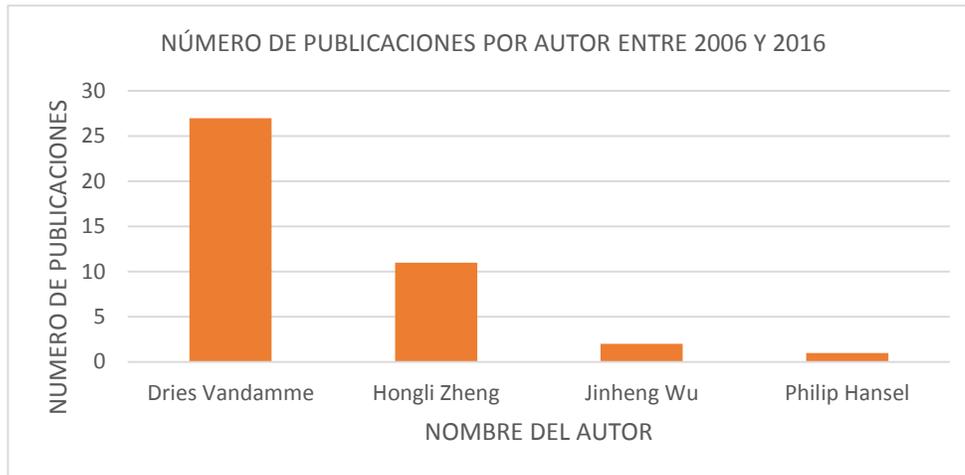
Para realizar el primer objetivo se realizó una revisión bibliográfica empleando la base de datos Elsevier, para los artículos publicados a partir del año 2006 y hasta la fecha, de acuerdo con los temas presentados a continuación en el cuadro 4, de tal manera que se determinaron los artículos que serían utilizados para la investigación.

Cuadro 4. Temas de búsqueda empleadas para la investigación

Tema	Número de artículos
Floculación en microalgas	1261
Floculación para la recuperación de biomasa	204
Eficiencia de floculación en la biomasa microalgal	25
Floculación empleando almidón catiónico para la recuperación de biomasa	8
TOTAL	1498

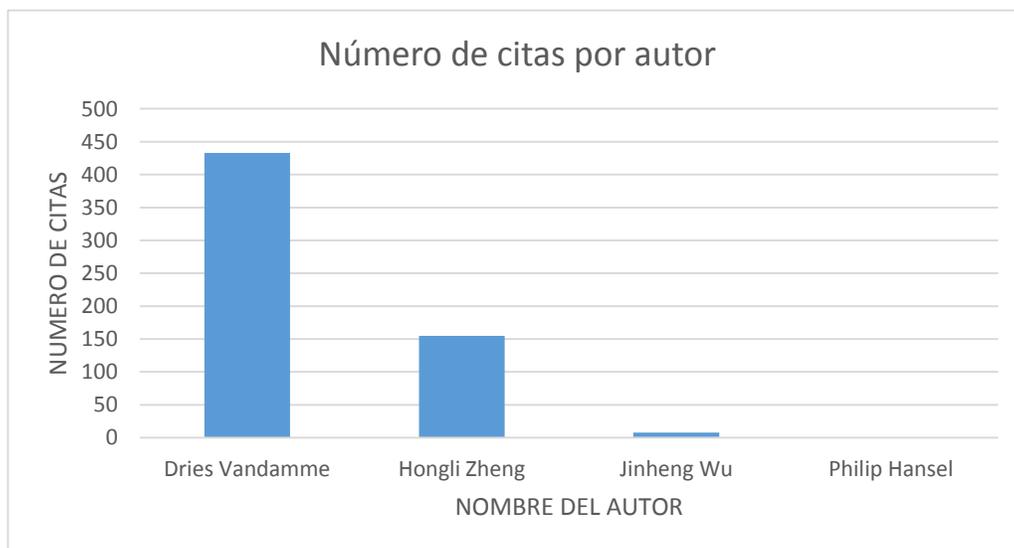
Teniendo en cuenta la información encontrada, así como los diversos filtros aplicados, la cantidad de artículos publicados por cada uno de los autores más representativos, así como el índice de citación de sus artículos, a continuación se presentará un análisis de dicha información, para facilitar la selección de los documentos a tener en cuenta en este proyecto.

Gráfico 1. Número de publicaciones por autor



Como se puede observar en el gráfico 1, de toda la revisión realizada se identificaron los cuatro autores que se destacan en el área de interés de este proyecto. Por otra parte para dichos autores se realizó el análisis del número de citas de sus artículos, como se muestra en el gráfico 2.

Gráfico 2. Número de citas por autor.



Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de la investigación se basó en el producto a evaluar (Almidón) y no se involucró en la investigación, la especie trabajada (*Chlorella sp.*), por lo tanto, en la selección de la concentración de

almidón, las investigaciones presentadas por los autores Dries Vandamme³⁵, Jinheng Wu³⁶ y Philip Hansel³⁷, utilizan almidones catiónicos con DS de 0.11 – 0.15 y en base a los resultados de estas investigaciones se tomaron las concentraciones de almidón donde se obtiene un 90% de eficiencia de floculación, ya que el almidón trabajado en el proyecto presenta un DS de 0.04 muy bajo en comparación con los presentados en la literatura. A continuación se presenta la metodología realizada en la búsqueda del almidón a trabajar en el proyecto.

2.1.1 Obtención del almidón catiónico. En Latinoamérica se encuentran empresas especializadas en fabricar almidón catiónico para la industria papelera. Como se dijo en el capítulo 1.3 (Ver pag 24) estos almidones poseen un grado de sustitución bajo en comparación a los empleados en los tratamientos de aguas residuales. A continuación se presenta una tabla donde se muestran todas las empresas proveedoras del almidón modificado.

Cuadro 5. Empresas Contactadas

Nombre de la empresa.	País	Nombre del producto	Grado de sustitución	Precio/bulto (\$/Kg)
IDAL	Chile	Catiónico 260 MF Catiónico 330 MF Catiónico 420 MF	0,024 – 0,029 0,030 – 0,035 0,036 – 0,041	8.250
Glucovil	Argentina	Catiónico 260 MF Catiónico 330 MF Catiónico 420 MF	0,024 – 0,029 0,030 – 0,035 0,036 – 0,041	10.740
Comercial Líder S.A	Perú	Almidon Industrial wespoly GW	0,030 – 0,035	9.548
Adisa (Almidones y Desarrollos Industriales)	México	NIFRACAT 45 NIFRAGEL CAT. NIFRASTARCH 05 CAT	0,024 – 0,029 0,030 – 0,035 0,036 – 0,041	7.414
RC Más Químicos	México	RC +Fixer	0,035 – 0, 041	9.587
Ingredion	Colombia. México. Brasil. Perú. Argentina.	FOXHEAD 5922. CATO 308 CATO 237. CATO 232 CATO 31	0,027 -0,032 0,040 0,041 0,030 – 0,035 0.029	15.780

³⁵ Flocculation of microalgae using cationic starch. En Appl Phycol 2010 Vol 22 p 525-530

³⁶ Evaluation of several flocculants for flocculating microalgae. En Bioresource Technology. 2015 p 495-501

³⁷ Efficient flocculation of microalgae for biomass production using cationic starch. En Algal Research 2014, no. 5, p 133-139

El almidón catiónico utilizado en el proyecto fue suministrado por la empresa RC Más Químicos cuyo proveedor es Ingredion y el nombre comercial del almidón es CATO 308 (Ver Anexo B).

2.2 PROCESO DE FLOCULACIÓN

2.2.1 Producción de Biomasa. La microalga empleada fue *Chlorella vulgaris*. El sistema de producción de biomasa fue aislado con el fin de evitar la contaminación y controlar el acceso de luz y temperatura.

- **Condiciones y equipos manejados.** Para el sistema de producción de la biomasa y con el fin de favorecer el crecimiento de las células, se utilizó una bombilla de 10kW de luz blanca a una distancia de 15 cm para cada recipiente de vidrio (donde se llevó a cabo el crecimiento de la microalga). Se mantuvo la temperatura alrededor de los 18°C +/- 2°C por medio del sistema aislado que ejercía un envase de material de fibra virgen (Pasta química que contiene celulosa), la temperatura se midió con un termómetro convencional. Además, investigaciones (Probert y Klass, 1999) sugieren que la variación de los ciclos de luz y oscuridad, beneficia la producción de lípidos, por lo cual, se utilizó un fotoperiodo de 12:12 controlado manualmente (Ver figura 4).

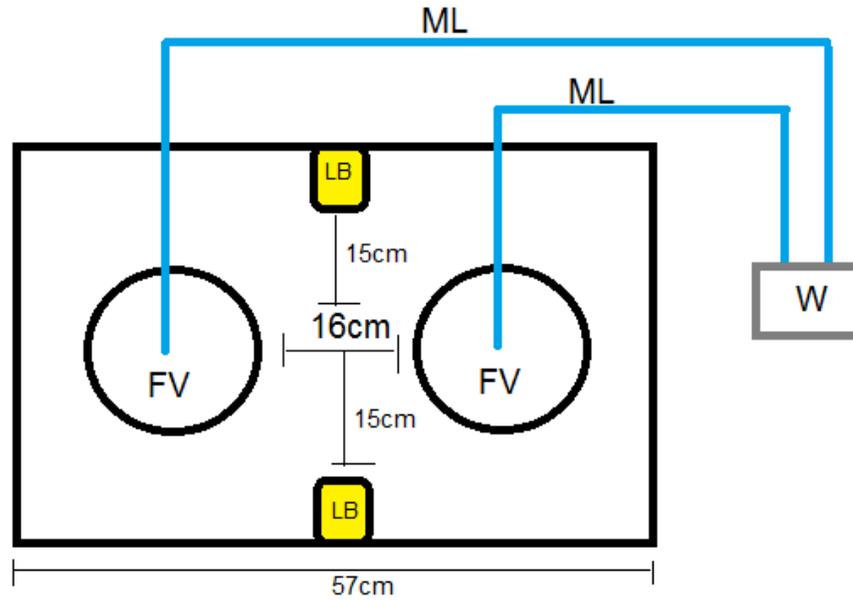
Otro factor a considerar es la agitación del medio, la cual es necesaria para prevenir que las células se sedimenten o se adhieran a las paredes del reactor, además de permitir el intercambio gaseoso³⁸, como el mezclado o rotación de las células permitiendo conseguir los ciclos de luz/oscuridad. Es así, que se utilizó un motor de acuario (Air Pump P-1300) conectado a dos mangueras, una para cada recipiente de vidrio, provocando un burbujeo que permitiera la mezcla dentro de cada recipiente.

Todos los recipientes y elementos utilizados fueron esterilizados a una temperatura de 121°C y 15 psi (Autoclave) y aquellos elementos que no soportaran las altas temperaturas se desinfectaba con un producto industrial (InvarS-318) a una concentración de 5 (%v/v).³⁹

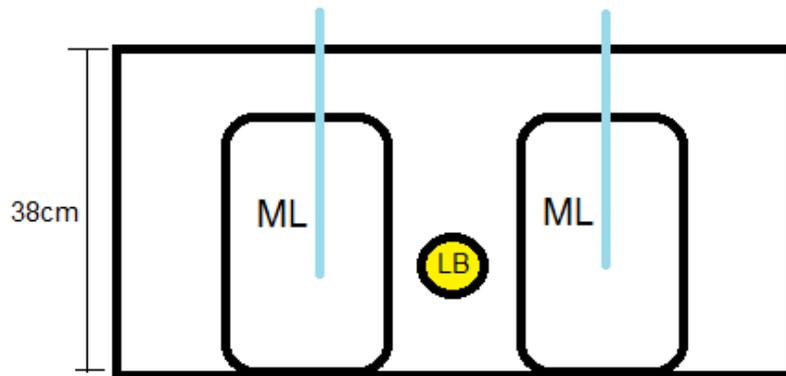
³⁸ BARAJAS, A. GARZON, L. GONZALEZ, A. Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel. En revista VIRTUALPRO 2012, no. 122

³⁹Producto a base de Ácidos Orgánicos que se emplea para desinfectar materiales y superficies. La solución recomendada es 5 ml por cada litro de agua.

Figura 4. Esquema del Sistema de crecimiento de la microalga.



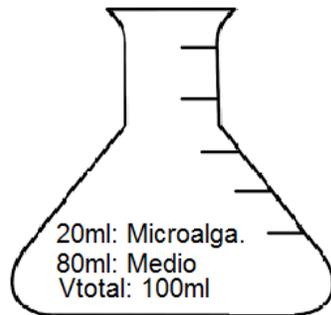
Vista superior: **LB**: Luz Blanca; **FV**: Recipiente de vidrio; **ML**: Mangueras; **W**: Motor de acuario



Vista lateral.

- **Cultivo de la microalga.** Se preparó el medio de cultivo con el fertilizante comercial Foliagro, la cual, proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento de *Chlorella sp.* A una solución de 1,5 ml por 998,5 ml de agua destilada⁴⁰. Se inoculó la microalga en recipientes de vidrio, suministrada por el grupo de BIOTECFUA.

Ilustración 1. Inoculación de la microalga



Con el fin de obtener un total de 6 litros y así poder empezar la evaluación del floculante, se realizaron aumentos de volumen cada semana alternado microalga y medio de cultivo⁴¹

2.2.2 Desarrollo del proceso de floculación En esta fase, el proceso de floculación permite determinar la eficiencia del almidón a diferentes concentraciones manteniendo tres variables constantes como lo son: pH, concentración celular inicial y tiempo de acción del floculante en el proceso.

Se tomaron para todos los ensayos experimentales 150 ml de suspensión microalgal en vasos precipitados de 600 ml, se realizó la lectura de absorbancia en cada uno de los vasos precipitados, por medio de un espectrofotómetro (GENESYS 20 or Helios Epsilon Spectrophotometer) a una longitud de onda de 550 nm⁴² para determinar que en todos los ensayos se utilizara la misma concentración celular.

Para todas las corridas experimentales, se manejó una concentración celular inicial de $4,42 \times 10^6$ Cel/ml ya que fue la concentración máxima alcanzada en la producción

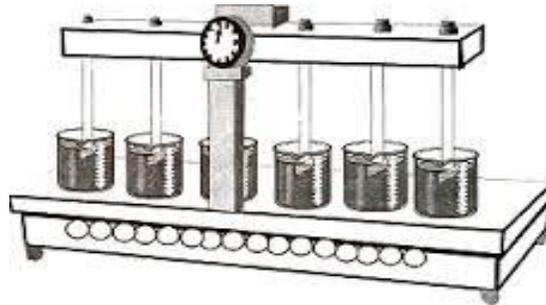
⁴⁰ HERNANDEZ, Gregorio. Evaluación de las incidencias de salinidad y pH sobre la biomasa, productividad y acumulación de lípidos en cultivos de *Chlorella vulgaris* en el fotobioreactor de placa plana. Bogotá, 2014, 32 p. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Fundación Universidad de América. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química.

⁴¹ CASTRO, Katherine. ORTIZ, Elkin. Determinación de la incidencia de la relación carbono: Nitrógeno en la producción de biomasa y ácidos grasos en la microalga *Chlorella Vulgaris* a escala laboratorio. Bogotá, 2013, 29 p. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Fundación Universidad de América. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química.

⁴² Vandamme. Op Cit., p 526

de biomasa y es el resultado de la regresión lineal de la curva de calibración (Ver pag 35) El almidón catiónico empleado se utilizó puro, sin diluirlo en agua destilada, ya que al ser un almidón de bajo grado de sustitución se buscaba obtener resultados parecidos a los artículos referenciados en el capítulo 2.1.

Ilustración 2. Instrumentos para el proceso de floculación



Fuente: SENA. Calidad del agua. En Sistemas de biblioteca SENA. [En línea]. [Consultado el 30 de abril 2016]. Disponible en <http://repositorio.sena.edu.co/sitios/calidad_del_agua/#>

En la ilustración 2 se muestra el instrumento llamado test de jarras, el cual contiene unas aspas que permiten mezclar, también tiene una pantalla en la mitad superior que permite controlar las velocidades y el tiempo del proceso. Este instrumento es útil ya que posee 6 puestos facilitando el tiempo de acción en el laboratorio. En ocasiones se emplean agitadores magnéticos, pero estos solo permiten realizar una prueba a la vez, por tal motivo, se utiliza el instrumento de test de jarras.

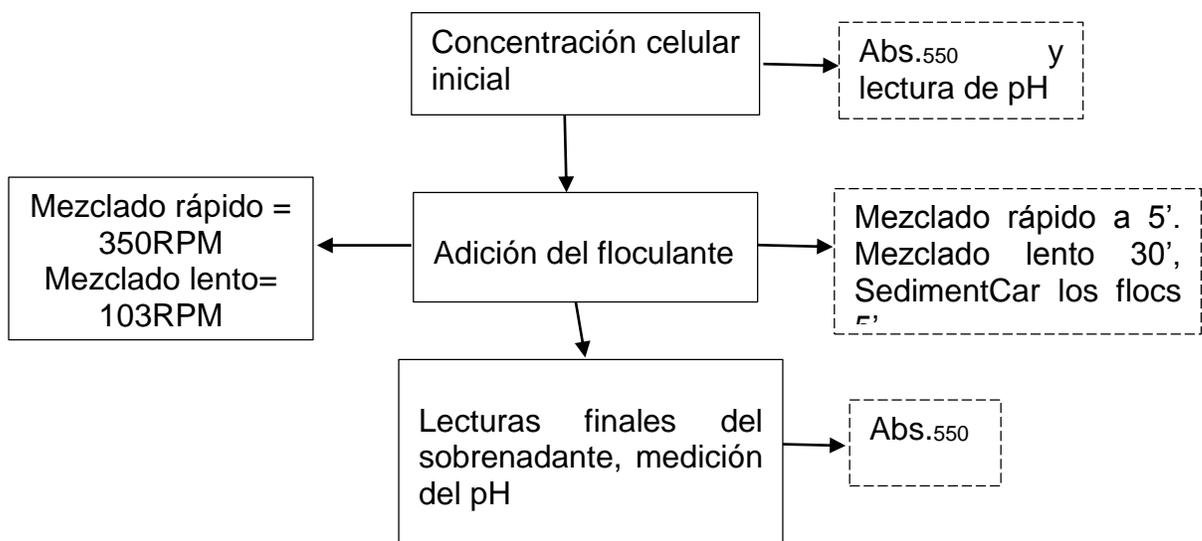
En el laboratorio se hizo una primera prueba donde se tomaron las lecturas iniciales de pH y absorbancia de la suspensión microalgal, posteriormente se utilizó el instrumento de test de jarras para controlar el mezclado y el tiempo de acción del floculante ya que son variables constantes en todo el proceso. Se adicionaron concentraciones de almidón de 20, 40 y 60 mg/L a tres vasos precipitados respectivamente, estas concentraciones seleccionadas es el resultado de la investigación realizada (Ver con más detalle el capítulo 3.1). Se accionó el instrumento de test de jarras a 350 RPM (Revoluciones por minuto) para un mezclado rápido por 5 minutos y se disminuyó a 103 RPM por 30 minutos, tiempo necesario para la acción del almidón en el proceso de floculación,⁴³ para después pasado ese tiempo dejar por 5 minutos que sedimenten las partículas aglomeradas al fondo de los vasos precipitados.

⁴³ VANDAMME, Dries. FOUBERT, Imogen. MUYLAERT, Koenraad. Flocculation of microalgae using cationic starch. En *Appl Phycol* 2010 Vol 22 p 525-530

Después de pasado este tiempo, se volvió a realizar las lecturas de la absorbancia y el pH en el sobrenadante en todos los vasos precipitados para así obtener el porcentaje de eficiencia de floculación. (Ver ec. 1)

Adicionalmente se realizó otra prueba, con la misma concentración celular inicial, adicionando concentraciones de almidón de 0.33, 0.66, 1, 1.33, 1.86, 2.33, 2.5, y 2.6 g/L a ocho vasos precipitados respectivamente y siguiendo los mismos pasos descritos en el párrafo anterior, se realizó el proceso de floculación con el fin de obtener un alto porcentaje de eficiencia de floculación

Figura 5. Esquema del proceso de floculación en el laboratorio.



Ecuación 1. Porcentaje de eficiencia de floculación

$$\% \text{ Eficiencia} = \frac{A_0 - A_1}{A_0}$$

Siendo A_0 la absorbancia de la suspensión microalgal antes de la floculación, A_1 es la absorbancia del sobrenadante de la fase aclarada después de floculación.

- **Curva de calibración.** Como se mencionó anteriormente se realizaron lecturas de absorbancia para todos los vasos precipitados y a cada uno de los ensayos desarrollados, es así que la curva de calibración es el método utilizado para relacionar las absorbancias de la concentración celular, determinando a partir de una muestra desconocida la concentración de la sustancia.

Para la realización de la curva de calibración fue necesario relacionar la absorbancia con el número de células en la muestra, por lo cual, se tomaron diluciones con un volumen total de 10 ml, cada dilución fue preparada con agua

destilada y posteriormente se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm y consecutivamente el conteo en la cámara de neubauer y así para todas las diluciones hasta conseguir la lectura final del cultivo. Cabe resaltar que se utilizó como blanco el medio de cultivo fresco.

El conteo celular en la cámara de neubauer se resume en las siguientes ecuaciones.

Ecuación 2. Concentración celular.⁴⁴

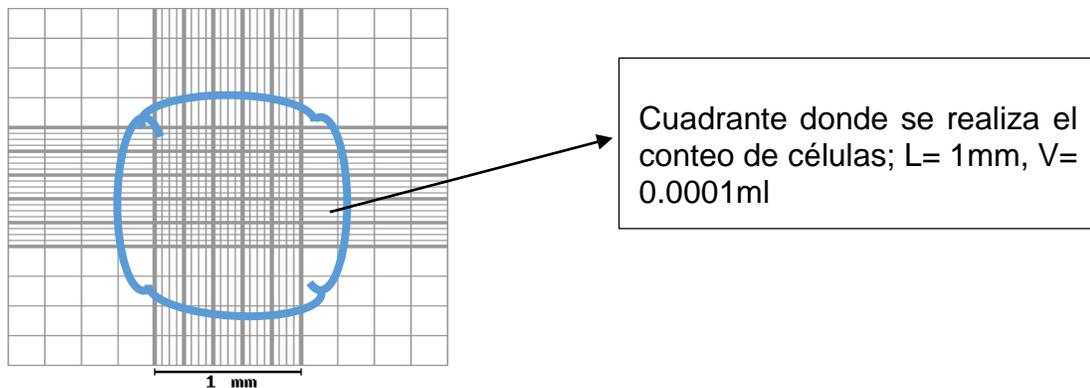
$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{Cel}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Número de células}}{\text{Volumen (ml)}}.$$

Ecuación 3. Concentración celular en cámara de Neubauer⁴⁵

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{Cel}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Número de células} \times 10000}{\text{Número de cuadrantes}}.$$

Se cuentan las células en los 5 cuadrantes que se encuentran en el medio de la cámara, cuyo volumen es el total de todos los cuadrantes donde se realizó el conteo y el volumen de un cuadrante es de 0.0001 ml⁴⁶

Figura 5. Cuadrantes de conteo.



⁴⁴ BASTIDAS, Oscar. Conteo Celular con Hematocitómetro: Uso Elemental del Hematocitómetro. Technical note - Neubauer chamber cell counting. Celeromics. [En línea]. [Consultado el 30 de abril de 2016]. Disponible en : <<http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>>

⁴⁵ Op. Cit., p 5

⁴⁶ S.f. Recursos de microbiología. Mikros testak.org [En línea]. [Consultado el 30 de abril de 2016]. Disponible en : <http://insilico.ehu.es/camara_recuento/>

Obteniendo el número de células y la absorbancia se asume que es un sistema lineal, por lo tanto, se toma una regresión lineal proporcionado por el modelo correspondiente al modelo de la ecuación de la recta.

Ecuación 4. Ecuación de la recta.

$$Y = A + BX$$

Donde la absorbancia toma los valores de Y, la concentración celular (Cel/ml- Células/ml) toma los valores X y despejando la ec. 4 para obtener la interpolación de todos los datos generados en absorbancia se obtiene.

Ecuación 5. Ecuación de concentración celular.

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{Cel}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Absorbancia} - A}{B}$$

2.3 EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL ALMIDÓN EN EL PROCESO

Con el fin de cumplir el tercer y último objetivo de evaluar la eficiencia del almidón trabajado es necesario adicionar elementos como el pH y el cambio de concentración celular inicial y basados en la literatura, cumplen un papel importante en la acción del floculante, por lo tanto, a continuación se explica el sistema empleado para desarrollar la fase III

2.3.1 Proceso de floculación cambiando el pH en la suspensión microalgal.

Con base al proceso explicado en la sección 2.2.2, las lecturas del pH se realizaban antes y después de las pruebas de floculación con el fin de determinar si había un cambio del pH al adicionar el almidón y como podría verse afectado la acción del almidón medida por el porcentaje de eficiencia en el proceso de floculación. Por lo tanto, se realizaron pruebas modificando la suspensión microalgal adicionando una solución de 0.5N de NaOH interviniendo el pH entre valores de 6.9 a 11.9 porque a pH básicos se puede incrementar la eficiencia de floculación del almidón catiónico⁴⁷.

Se hizo una prueba de control, donde se utilizó la concentración celular inicial de 4.44×10^6 Cel/ml y la concentración del almidón de 0.66g/L, teniendo en cuenta que esta última, es un concentración que se tomó aleatoriamente ya que para fines del

⁴⁷ LETELIER-GORDO, Carlos. LØVSTAD HOLDT, Susan. DE FRANCISCI, David. Effective harvesting of the microalgae *Chlorella protothecoides* via bioflocculation with cationic starch. En *Bioresource Technology*. 2014 Vol. 167 p, 214-218

trabajo las variables de concentración celular inicial y concentración de almidón fueron constantes en estos experimentos. En la prueba, primero se tomó la lectura del pH a la suspensión microalgal distribuida en cada uno de los cinco vasos precipitados y después se le adicionó concentraciones de Hidróxido de Sodio de 0, 1, 2.5, 5, 7.5 (%v/v) al mismo tiempo de adicionar el almidón, después de realizado el proceso de floculación se tomaron las lecturas del pH.

Con las lecturas presentadas después de la floculación se determinó cuáles eran las concentraciones de NaOH en donde presentaban pH de 8 y pH de 11, para posteriormente tomar concentraciones aleatorias de almidón, adicionar NaOH, realizar el proceso de floculación, medir la absorbancia del sobrenadante para así determinar la eficiencia del proceso.

El análisis se realizó empleando ANOVA de un solo factor, tomando como valor independiente el pH y la variable dependiente el porcentaje de floculación. La herramienta utilizada para este análisis fue Excel análisis – VBA y se determina si hay diferencia en el porcentaje de floculación cambiando el pH al realizar el proceso.

2.3.2 Proceso de floculación con diferentes concentraciones celulares iniciales. Se evaluó la eficiencia del floculante cambiando las concentraciones iniciales celulares. Por lo tanto, se realizaron dos ensayos; Primero se buscaba conocer la diferencia de eficiencias si se presentaba la mitad de la concentración celular con respecto a la muestra control; Segundo, buscaba emplear diferentes concentraciones menores a la muestra control y determinar la dependencia entre el porcentaje de eficiencia y la concentración inicial.

En el primer ensayo se utilizó concentraciones celulares de 4.44×10^6 Cel/ml (muestra control) y de 2.29×10^6 Cel/ml y para cada concentración celular se evaluó la eficiencia de floculación a concentraciones de almidón de 1, 1.2, 1.6, 2.33, 2.6 g/l

En el segundo ensayo se utilizó concentraciones celulares de 1.52×10^6 ; 1.74×10^6 ; 3.16×10^6 y 4.01×10^6 Cel/ml a una concentración de almidón de 1.33 g/L. A partir de este ensayo, se empleó la regresión lineal para encontrar una relación entre la concentración inicial de biomasa y el porcentaje de eficiencia del almidón, manteniendo constante la concentración del almidón para determinar qué tan eficiente puede ser el floculante. Todo lo anterior con miras a que los resultados servirán para determinar a futuro la posibilidad de emplear almidón de bajo grado de sustitución, buscando una alta eficiencia en el proceso de floculación.

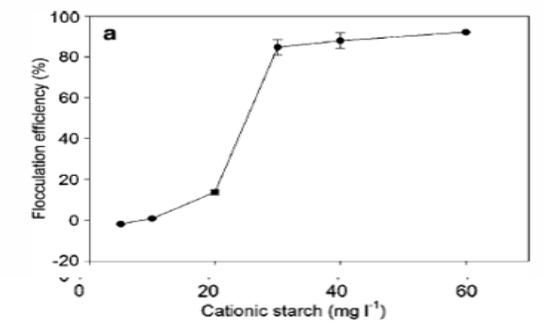
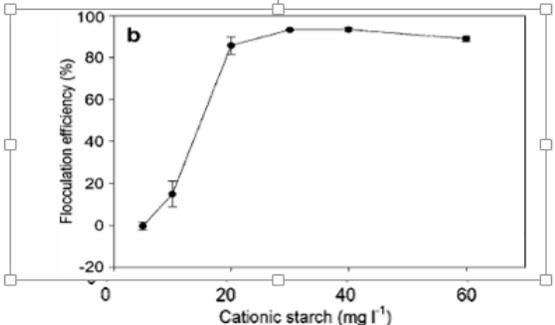
3. ANALISIS DE RESULTADOS

3.1 SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ALMIDON

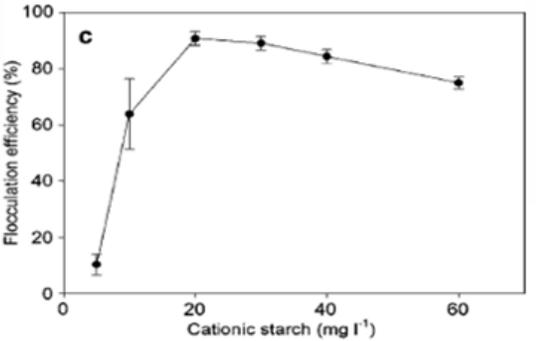
Para cumplir con el primer objetivo, la selección se realiza a partir de la revisión bibliográfica, en donde se realiza un análisis en los cuadros 5 y 6.

Un factor la cual no se tomó en cuenta en la presente investigación, es la especie empleada en las pruebas, ya que, en los artículos de Vandamme, Hongli, Hansel y Wu, concluyen en sus investigaciones que existe una relación entre la biomasa microalgal y el porcentaje de eficiencia de floculación teniendo la base del tamaño celular de la microalga, ya que, partículas largas a menudo requieren bajas dosis del floculante a comparación de las partículas pequeñas y este factor se tiene presente ya que la especie *Scenedesmus* es más larga que *Chlorella sp.* Y posee una forma similar a *Parachlorella*.

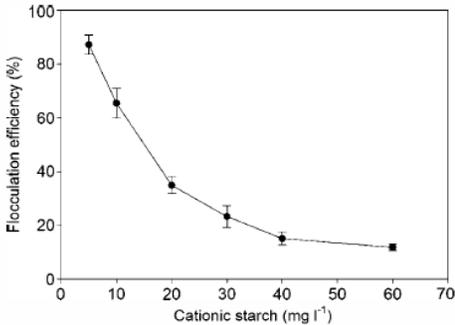
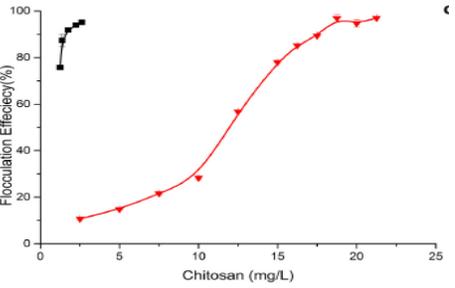
Cuadro 6. Análisis de concentración inicial no constantes.

Concentración inicial (g/L)	Grafico	Especie	Análisis.																
0.3	 <table border="1" data-bbox="478 446 1033 771"> <caption>Data for Graph a</caption> <thead> <tr> <th>Cationic starch (mg l⁻¹)</th> <th>Flocculation efficiency (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>5</td><td>0</td></tr> <tr><td>10</td><td>2</td></tr> <tr><td>20</td><td>15</td></tr> <tr><td>30</td><td>85</td></tr> <tr><td>40</td><td>88</td></tr> <tr><td>60</td><td>92</td></tr> </tbody> </table>	Cationic starch (mg l ⁻¹)	Flocculation efficiency (%)	0	0	5	0	10	2	20	15	30	85	40	88	60	92	<p><i>Parachlorella</i></p>	<p>Las gráficas representan el resultado de realizar el proceso de floculación en la especie <i>Parachlorella</i> utilizando un almidón catiónico con grado de sustitución 0.15 comercialmente llamado GreenFloc 120.</p>
Cationic starch (mg l ⁻¹)	Flocculation efficiency (%)																		
0	0																		
5	0																		
10	2																		
20	15																		
30	85																		
40	88																		
60	92																		
0.15	 <table border="1" data-bbox="478 852 1033 1177"> <caption>Data for Graph b</caption> <thead> <tr> <th>Cationic starch (mg l⁻¹)</th> <th>Flocculation efficiency (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>5</td><td>0</td></tr> <tr><td>10</td><td>15</td></tr> <tr><td>20</td><td>85</td></tr> <tr><td>30</td><td>95</td></tr> <tr><td>40</td><td>92</td></tr> <tr><td>60</td><td>88</td></tr> </tbody> </table>	Cationic starch (mg l ⁻¹)	Flocculation efficiency (%)	0	0	5	0	10	15	20	85	30	95	40	92	60	88		
Cationic starch (mg l ⁻¹)	Flocculation efficiency (%)																		
0	0																		
5	0																		
10	15																		
20	85																		
30	95																		
40	92																		
60	88																		

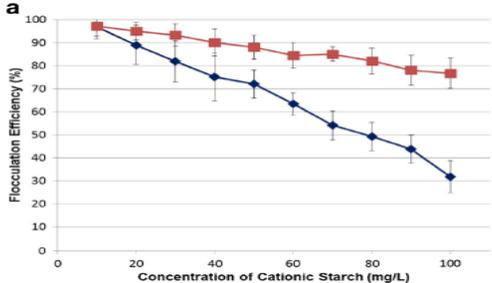
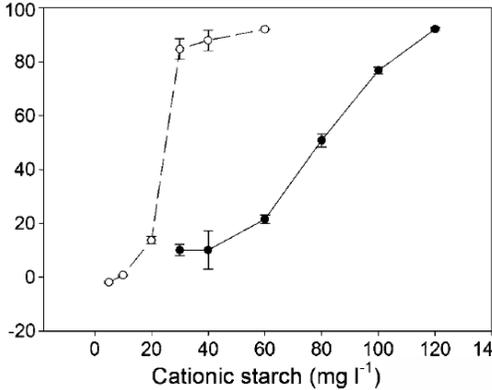
Cuadro 6. (Continuación)

Concentración inicial (g/L)	Grafico	Especie	Análisis.
0.075	 <p>The graph shows the relationship between cationic starch concentration and flocculation efficiency for <i>Parachlorella</i>. The x-axis represents cationic starch concentration in mg l⁻¹, ranging from 0 to 60. The y-axis represents flocculation efficiency in percentage, ranging from 0 to 100. The data points are approximately: (0, 10%), (5, 65%), (20, 90%), (30, 88%), (40, 85%), and (60, 75%). Error bars are present for each data point.</p>	<i>Parachlorella</i>	<p>La concentración inicial de biomasa que se emplea en el artículo para realizar la floculación va cambiando y por tal motivo va a cambiar la concentración del almidón para obtener un 90% de eficiencia en el proceso, es decir, que las gráficas mostradas nos ayuda a entender la importancia de emplear un concentración inicial de biomasa baja, la cual garantiza emplear poco almidón para obtener una alta eficiencia del proceso. Aunque también se puede observar que no presenta una gran diferencia entre ellas y todo debido que la cantidad de células que pueden estar al inicio del experimento.</p> <p>Fuente: D. VANDAMME (2010)</p>

Cuadro 7. Análisis para la selección de la concentración a utilizar.

Grafico	Producto y grado de sustitución	Especie	Concentración inicial (g/L)	Importancia	Fuente																											
 <table border="1" data-bbox="254 467 709 792"> <caption>Data for Scenedesmus Flocculation Efficiency</caption> <thead> <tr> <th>Cationic starch (mg l⁻¹)</th> <th>Flocculation efficiency (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>5</td><td>85</td></tr> <tr><td>10</td><td>65</td></tr> <tr><td>20</td><td>35</td></tr> <tr><td>30</td><td>25</td></tr> <tr><td>40</td><td>15</td></tr> <tr><td>60</td><td>10</td></tr> </tbody> </table>	Cationic starch (mg l ⁻¹)	Flocculation efficiency (%)	5	85	10	65	20	35	30	25	40	15	60	10	<p>ALMIDON CATIONICO (DS: 0,15)</p>	<p><i>Scenedesmus</i></p>	<p>0,15</p>	<p>Los gráficos nos ayuda a determinar cuáles son las concentraciones que se pueden emplear para obtener una alta eficiencia (10 mg/L a 20 mg/L), teniendo en cuenta que emplearon almidones con grado de sustitución 0,13 – 0,15; El quitosano no es un almidón catiónico, pero posee una estructura similar que influye en la acción del floculante en las células de la microalga.</p>	<p>Vandamme(2010)</p>													
Cationic starch (mg l ⁻¹)	Flocculation efficiency (%)																															
5	85																															
10	65																															
20	35																															
30	25																															
40	15																															
60	10																															
 <table border="1" data-bbox="254 894 709 1182"> <caption>Data for Scenedesmus Flocculation Efficiency</caption> <thead> <tr> <th>Chitosan (mg/L)</th> <th>Flocculation Efficiency (%)</th> <th>Species</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>80</td><td><i>Scenedesmus sp.</i> (■)</td></tr> <tr><td>1</td><td>90</td><td><i>Scenedesmus sp.</i> (■)</td></tr> <tr><td>2</td><td>95</td><td><i>Scenedesmus sp.</i> (■)</td></tr> <tr><td>3</td><td>95</td><td><i>Scenedesmus sp.</i> (■)</td></tr> <tr><td>5</td><td>10</td><td><i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)</td></tr> <tr><td>10</td><td>25</td><td><i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)</td></tr> <tr><td>15</td><td>75</td><td><i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)</td></tr> <tr><td>20</td><td>95</td><td><i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)</td></tr> </tbody> </table>	Chitosan (mg/L)	Flocculation Efficiency (%)	Species	0	80	<i>Scenedesmus sp.</i> (■)	1	90	<i>Scenedesmus sp.</i> (■)	2	95	<i>Scenedesmus sp.</i> (■)	3	95	<i>Scenedesmus sp.</i> (■)	5	10	<i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)	10	25	<i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)	15	75	<i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)	20	95	<i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)	<p>Quitosina (Estructura similar almidón) del</p>	<p><i>Scenedesmus sp.</i> (■) <i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)</p>	<p>2,20</p>	<p>A demás se encontró en el artículo de Hansel (2014), donde emplearon almidón de la papa y lo modificaron, las concentraciones a la cual llegan a un alto porcentaje de eficiencia como se muestra en la gráfica, de 10 mg/L a 45mg/L.</p>	<p>Jinheng (2015)</p>
Chitosan (mg/L)	Flocculation Efficiency (%)	Species																														
0	80	<i>Scenedesmus sp.</i> (■)																														
1	90	<i>Scenedesmus sp.</i> (■)																														
2	95	<i>Scenedesmus sp.</i> (■)																														
3	95	<i>Scenedesmus sp.</i> (■)																														
5	10	<i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)																														
10	25	<i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)																														
15	75	<i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)																														
20	95	<i>Scenedesmus obliquus</i> (▲)																														

Cuadro 7. (Continuación)

GRAFICO	Producto o grado de sustitución	Especie	Concentración inicial (g/l)	Importancia	Fuente
 <p data-bbox="785 565 940 652">ALMIDON CATIONICO (DS: 0,14)</p>	ALMIDON CATIONICO (DS: 0,14)	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	0,12	La grafica inferior nos ayuda a entender el cambio de los porcentajes de eficiencia de floculación con respecto a los diferentes grados de sustitución empleados en la investigación. Además se tiene en cuenta el empleo de la especie <i>Parachlorella</i> , lo cual, tiene la estructura celular similar a la <i>Chlorella vulgaris</i> .	Hansel (2014)
 <p data-bbox="785 815 940 873">ALMIDON CATIONICO:</p> <p data-bbox="785 912 940 1003">Puntos blancos (DS: 0,15)</p> <p data-bbox="785 1042 940 1133">Puntos negros (DS: 0,11)</p>	ALMIDON CATIONICO: Puntos blancos (DS: 0,15) Puntos negros (DS: 0,11)	<i>Parachlorella</i>	0,3	Por consiguiente las concentraciones a emplear en el laboratorio y en base a las anteriores graficas se empezarán con 20mg/L hasta encontrar una concentración que satisfaga entre el 80% - 90% de eficiencia, teniendo en cuenta que el almidón a emplear tiene un grado de sustitución de 0,040, muy bajo en comparación a los utilizados en la literatura.	Vandamme (2010)

3.1.1 Características del almidón utilizado. A continuación se muestra las propiedades físicas y químicas del almidón utilizado en las pruebas y un análisis para explicar el ¿por qué? este almidón y no otro.

Cuadro 8. Propiedades físicas y químicas.

NOMBRE QUIMICO	Almidón modificado industrial.
FAMILIA QUIMICA	Almidón modificado de tapioca
NOMBRE COMERCIAL	Cato™ 237
APARENCIA	Polvo
ESTADO FISICO	Sólido
COLOR	Blanco
pH	6.5
GRADO DE SUSTITUCIÓN.	0.040
PESO MOLECULAR	>10000
DENSIDAD (lb/ft³)	28 - 34

El almidón puede proceder de la papa, la yuca, el maíz, los cereales y uno que otro vegetal, pero al momento de modificarlo para volverlo catiónico, en la revisión bibliográfica y en las investigaciones previas realizadas, no presentan un factor importante para el proyecto, ya que, el tipo de almidón no influye en el proceso de floculación sino todo depende del grado de sustitución que posea la molécula como se puede observar en los cuadros 5 y 6.

En Colombia no hay ninguna empresa que realice este tipo de modificaciones y en Latinoamérica si se encuentran empresas, pero desafortunadamente no fabrican los almidones con un grado de sustitución que favorezca la floculación, por tal motivo, el proyecto busca evaluar el almidón con bajo DS en las condiciones presentadas en las gráficas mostradas anteriormente porque con los resultados presentados en los artículos, son datos de referencia o puntos de partida que permita desarrollar el proceso de floculación con almidones catiónicos que se puedan adquirir en Latinoamérica.

3.2 PROCESO DE FLOCULACIÓN

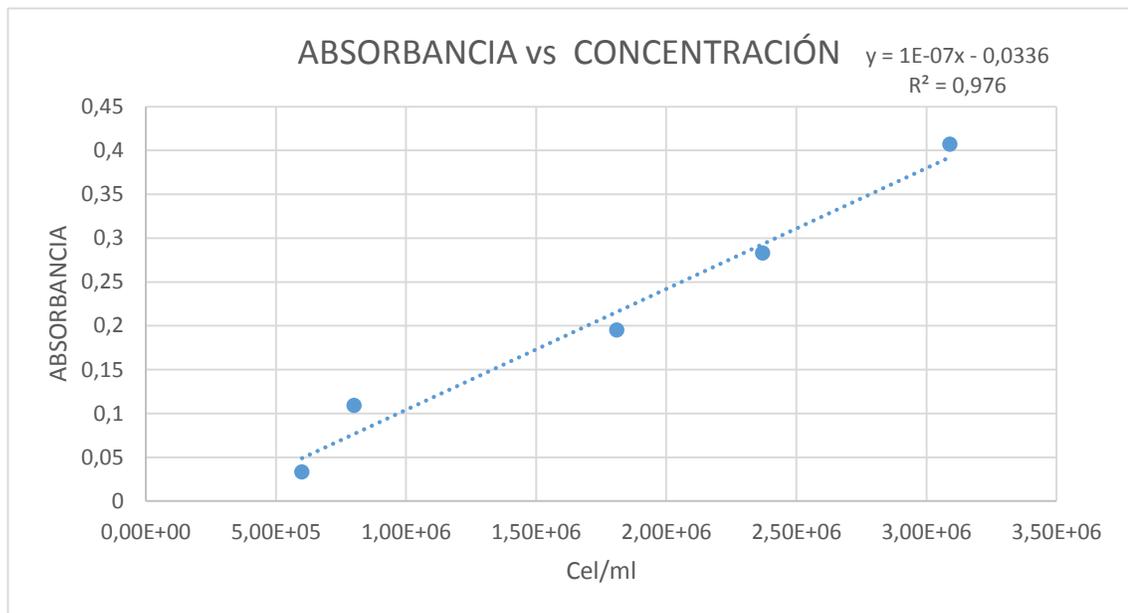
- **Curva de calibración.** En el laboratorio se realiza primero una curva de calibración para poder relacionar las absorbancias con la concentración celular de la microalga, por lo tanto, se realizaron diluciones 1:9; 3:7; 5:5; 7:3; 10:0 (microalga: agua destilada). En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos del espectrofotómetro y el conteo celular realizado en la cámara de Neubauer, teniendo en cuenta la absorbancia del blanco (medio de cultivo) fue de 0.033

Tabla 1. Datos de curva de calibración.

Diluciones	Cel/ml	Absorbancia
1:9	6,00E+05	0,033
3:7	8,00E+05	0,109
5:5	1,81E+06	0,195
7:3	2,37E+06	0,283
10:0	3,09E+06	0,407

Con base a la anterior tabla 1. Se procede a graficar los datos

Gráfico 3. Regresión lineal de la curva de calibración



Ecuación 6. Concentración celular a partir de la curva de calibración.

$$\text{Concentración celular} \left(\frac{\text{Cel}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Absorbancia} + 0.0336}{1 \times 10^{-7}}$$

Con la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación de 0.976 se determina el principio de linealidad, es así, que se puede obtener una concentración celular a partir de una absorbancia.

Con la ecuación de la recta, se despeja X y como se muestra en la ec. 6, corresponde a la ecuación de concentración celular.

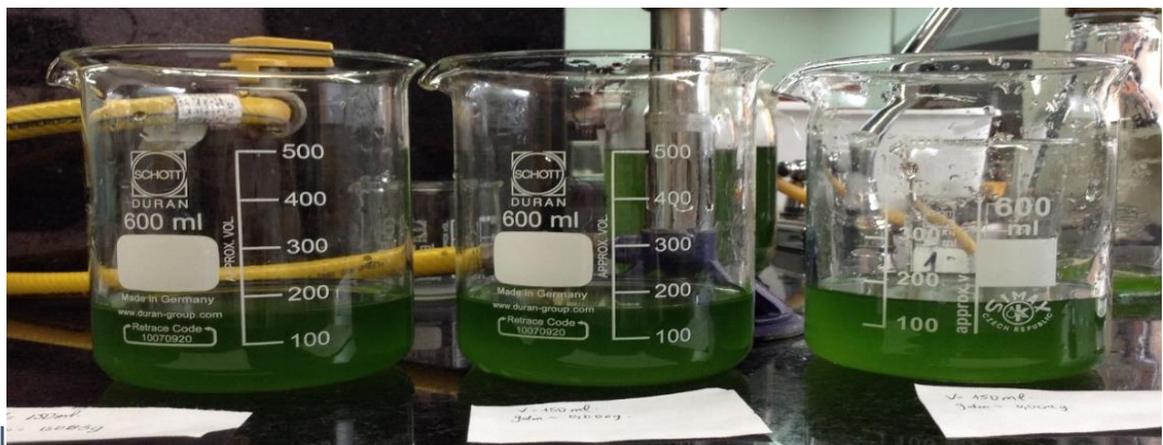
3.2.2 Proceso de floculación. Con el fin de cumplir el segundo objetivo y teniendo las concentraciones escogidas con base al primer objetivo, se empezó a realizar el proceso con las concentraciones de 20 mg/L, 40 mg/L y 60 mg/L. Como se planteó en la metodología, se utilizó un volumen de 150ml, por lo tanto se necesitó 0,003g, 0.006g, 0.009g, para cumplir las concentraciones propuestas.

A continuación se muestran los resultados de las concentraciones del primer objetivo. La concentración celular inicial fue de 4.44×10^6 Cel/mL

Tabla 2. Resultados obtenidos con concentraciones empleadas en la literatura

Concentración floculante(mg/L)	% Eficiencia
20	4
40	7
60	9

Ilustración 3. Resultados de las pruebas a concentraciones de 20mg/l, 40mg/l, 60mg/L



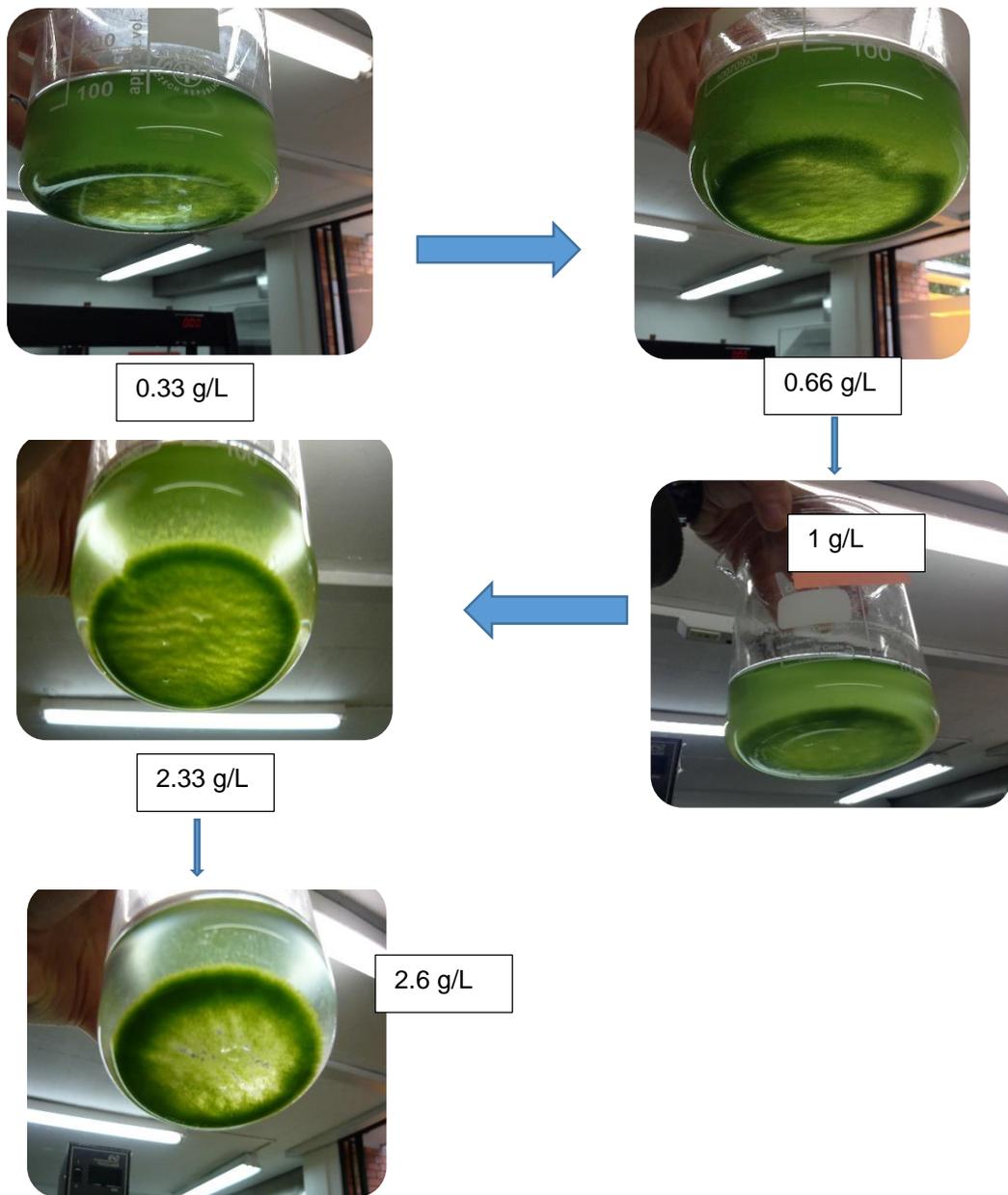
Como se observa la tabla 2 la baja eficiencia se ve reflejada en la ilustración 3 donde no presenta ninguna aglomeración de partículas a simple vista, también se muestra que no hay disminución del color en el medio y no hay formación de sobrenadante.

Seguido de esta prueba se decide utilizar concentraciones más altas a las referenciadas, ya que los resultados de la tabla 3, son concentraciones de partida para poder determinar cuáles son las concentraciones futuras para alcanzar una alta eficiencia de floculación y poder saber si el almidón catiónico empleado funciona como floculante.

Por tal razón se realiza una segunda prueba utilizando concentraciones de 0.33, 0.66, 1, 1.33, 1.86, 2.33, 2.5 y 2.6 g/L. A continuación se presenta una serie de

imágenes donde se muestra el cambio de la concentración del almidón y como favorece la formación de aglomerados con el aumento de esas concentraciones en el proceso.

Ilustración 4. Resultado final de flocular a diferentes concentraciones.



En la ilustración 4 se puede observar la degradación gradual de color del cultivo, generando así dos fases, la cual, la parte mas clara es llamada sobrenadante y lo que se observa al final del vaso precipitado, son todos los flocs o el producto de la

biomasa que se ha conseguido separar. Las primeras evidencias del efecto del almidon en el cultivo de microalgas se basa en el color del sobrenadante después del proceso, por tal razón, es normal el cambio; esto significa que el almidon busca aglomerar las células de la microalga por medio de la atracción que existe con las células de la microalga, obteniendo así la separación del medio de cultivo.

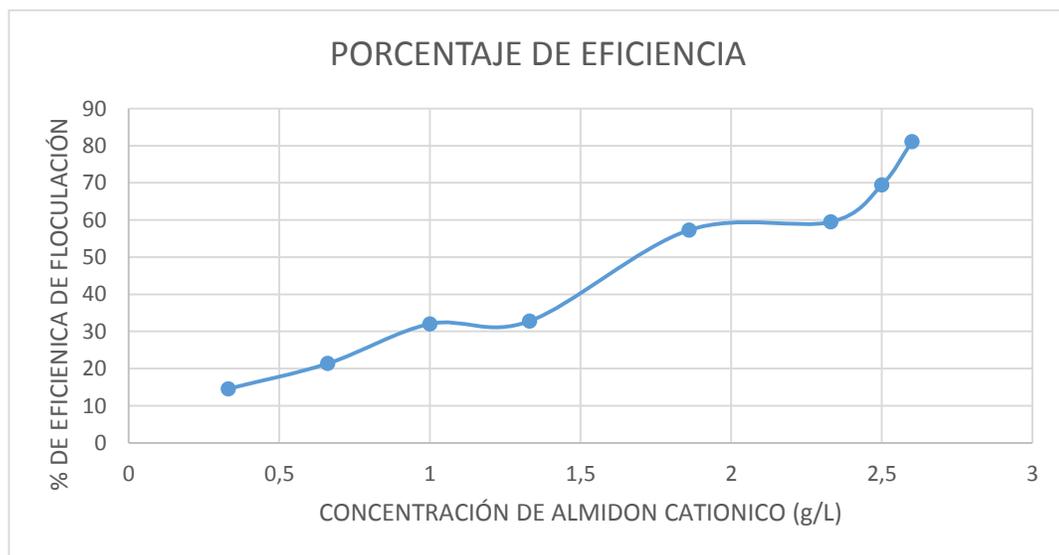
La concentración celular inicial: 4.44×10^6 Cel/ml

Tabla 3. Porcentaje de eficiencia a partir de los datos experimentales

Concentración de floculante (g/l)	% Eficiencia	Absorbancia
0,33	15	0,352
0,66	21	0,324
1	32	0,28
1,33	33	0,277
1,86	57	0,176
2,33	59	0,167
2,5	69	0,126
2,6	81	0,078

Con base a las lecturas realizadas en las pruebas mostradas en la ilustración 4, se obtuvieron los siguientes datos.

Gráfico 4. Porcentaje de Eficiencia vs Concentración de almidón catiónico.



Es así, como se puede observar que la máxima eficiencia de 81% logró a una concentración de 2.6 g/L, además al adicionar pequeñas concentraciones para aumentar la eficiencia, es necesario adicionar 8 a 10g mas del almidon, por

consiguiente se consideran concentraciones altas en comparación a las presentadas en los cuadros 5 y 6

Para continuar con el análisis del segundo objetivo se realizó la comparación con los resultados de la literatura (una de las referencias utilizadas en la sección 5.1), en donde utilizaron la especie *Parachlorella* y emplearon dos almidones con DS de 0.15 y 0.11. Para el presente proyecto se utilizó un almidon cationico de DS 0.040 y la especie *Chlorella* (como se dijo anteriormente tiene una estructura similar)

Tabla 4. Resultados comparativos.

DS: 0.15		DS: 0.11		DS: 0.040	
CC (mg/L)	%F	CC (mg/L)	%F	CC (mg/L)	%F
10	0	30	10	330	15
20	10	60	20	660	21
30	85	80	50	2330	59
40	90	120	90	2600	81

Siendo CC: Concentración y %F: Porcentaje de eficiencia de floculación.

Con base en la tabla 4, existe una tendencia al aumento de las concentraciones del almidón para obtener eficiencias alrededor de 90%, aunque no se alcanzó en las pruebas experimentales, posiblemente debido al grado de sustitución del almidón.

3.3 EVALUACIÓN DEL ALMIDON EN EL PROCESO DE FLOCULACIÓN

Con base al análisis de la anterior sección, los resultados del almidón como floculante, tomando dos factores influyentes en el porcentaje de floculación como son: El cambio del pH y la concentración inicial se analizan a continuación.

3.3.1 Desempeño del floculante cambiando el pH en la suspensión microalgal.

En el laboratorio, se realizaron las lecturas del pH antes y después del proceso de floculación, la cual, dieron como resultado la siguiente tabla, teniendo en cuenta que el pH inicial del cultivo es de 7.03.

Tabla 5. Lectura del pH al final de proceso.

CONCENTRACIÓN DE FLOCULANTE (g/L)	pH final
0,33	7,07
0,66	7,17
1	7,18
1,33	7,14
1,86	7,22
2,33	7,19

Tabla 5. (Continuación)

CONCENTRACIÓN DE FLOCULANTE (g/L)	pH final
2,5	7,22

Como se puede observar el pH no tiende a variar mucho, pero si hay un pequeño aumento. Lo que se busca en estas pruebas es modificar la suspensión microalgal distribuida en los vasos precipitados, teniendo en cuenta que se realizó una prueba de control, para determinar la concentración necesaria de NaOH para obtener pH de 8 y 11 y con base a estos resultados poder realizar un análisis de varianza de un solo factor, ANOVA planteando como hipótesis nula H_0 : No hay diferencia del porcentaje de floculación con respecto a los cambios de pH y la hipótesis alterna H_1 Si hay diferencia en el porcentaje de eficiencia de floculación.

Tabla 6. Datos de control.

0,5N NaOH (%V/V)	pH inicial	pH final	%EFICIENCIA
0	6,95	6,95	50
1	6,98	8,5	48
2,5	9,95	10,2	43
5	6,95	11,98	13
7,5	6,92	12,32	20

Teniendo en cuenta la tabla 6, se realiza el proceso descrito en la metodología obteniendo los datos de la tabla 7.

Tabla 7. Resultados obtenidos para realizar el ANOVA.

pH=6,9	pH=8,5	pH=11,9
66	99	8
50	61	13
99	47	4
57	39	9

Tabla 8. Analisis de varianza.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor crítico para F
Entre grupos	8522	2	4261	10,7299	4,256494729
Dentro de los grupos	3574	9	397.11		
Total	12096	11			

Con el análisis de varianza se determina que se presentan diferencias en el porcentaje de eficiencia si se cambia el pH del cultivo de microalgas al realizarse el

proceso, debido a que, para el nivel de significancia de 0.05 F es mayor al valor crítico para F.

Además la tabla 7, muestra una disminución del porcentaje de floculación a medida que el pH se vuelve más básico, por tal razón la acción del almidón no se ve favorecida en el cambio de pH como lo mencionan los artículos Letelier- Gordo⁴⁸ y Vandamme⁴⁹. Dicho lo anterior, el almidón utilizado, no es eficiente en un medio con pH de 11.9

3.3.2 Desempeño del floculante con diferentes concentraciones celulares iniciales. Otro factor importante para evaluar la eficiencia del almidón en el proceso consiste en disminuir la concentración celular de las muestras, cuyo fin es obtener un porcentaje alto en comparación al resultante en la sección 4.2.2. Adicionalmente y como se ha dicho en repetitivas ocasiones, la concentración inicial celular es importante ante la acción del floculante, por tal motivo, se desea obtener una alta eficiencia o por lo menos llegar a resultados similares presentados en la literatura.

Se realizaron dos ensayos como se mencionó en el numeral 2.3.2. En el primero se dieron los resultados que se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados primer ensayo

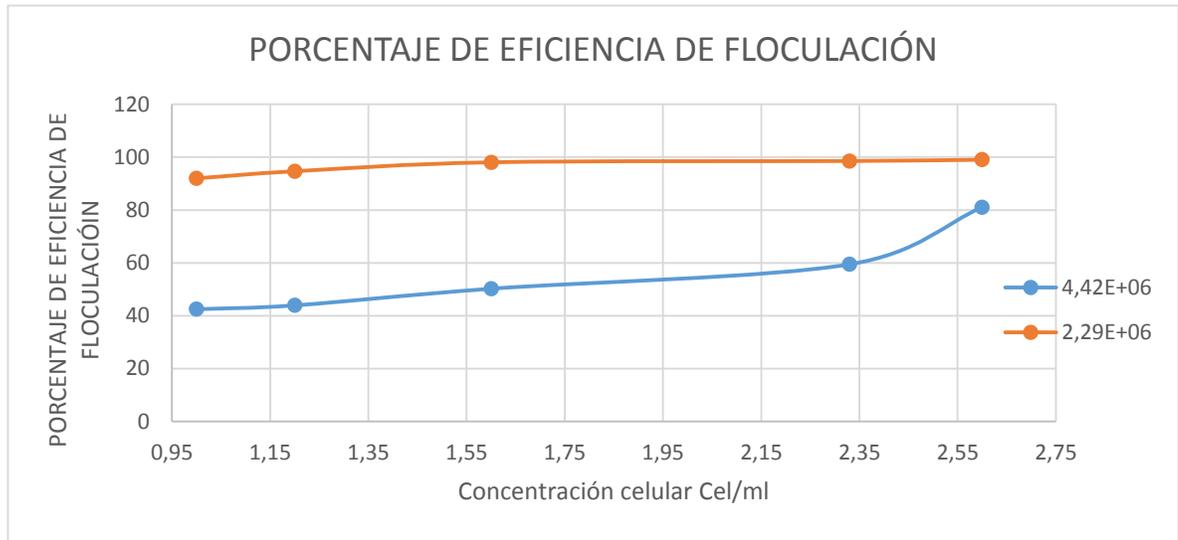
Cel/ml	4.44x10 ⁶	2.29x10 ⁶
CONCENTRACIÓN FLOCULANTE (g/L)	% EFICIENCIA	%EFICIENCIA
1	42	92
1,2	44	95
1,6	50	98
2,33	59	99
2,6	81	99

Con base a la tabla 9. Se realizó el grafico 5.

⁴⁸ LETELIER-GORDO. Op cit., p 36

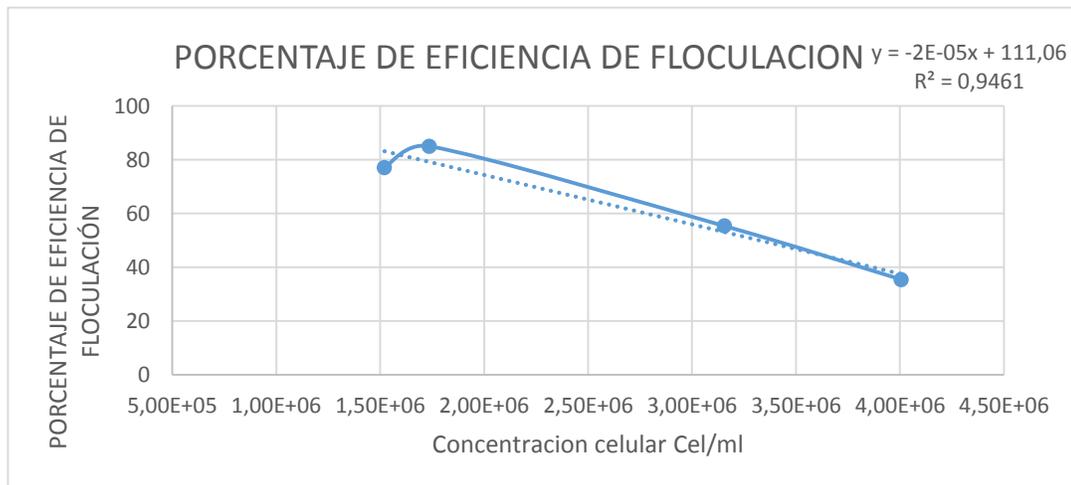
⁴⁹ VANDAMME, Dries. Op cit., p 28

Gráfico 5. Eficiencia vs Concentración de almidón con dos concentraciones celulares iniciales diferentes.



En la gráfica 5 se muestra que presenta mejor eficiencia disminuyendo la concentración celular inicial y obteniendo una eficiencia del 99% a una concentración de 2.15 g/L. Con base a estos datos, se realiza el segundo ensayo para determinar la relación proporcional y encontrar una concentración celular inicial que favorezca una eficiencia alta. En este caso se utilizó una concentración de almidón de 1.33 g/L

Gráfico 6. Porcentaje de eficiencia vs Concentración celular inicial.



Con ayuda de la gráfica 6 se realiza una regresión lineal, el resultado del coeficiente de correlación es 0.95, por lo cual, se puede determinar que existe una relación inversamente proporcional entre la eficiencia de floculación y la concentración

celular inicial. También se puede relacionar los resultados del grafico 5 con el grafico 6, ya que se comprueba la eficiencia del almidón que a pesar de tener un bajo grado de sustitución puede alcanzar porcentajes altos de eficiencia si se disminuye la concentración celular inicial, tal como aparecen en la literatura presentada anteriormente.

4. CONCLUSIONES

- Con la investigación realizada y la revisión bibliográfica se determinó que las concentraciones de almidón para obtener una eficiencia del 90% son valores cercanos a 20mg/l, pero estas concentraciones no generaron un porcentaje de eficiencia mayor al 8% en las pruebas del laboratorio.
- El proceso de floculación con el almidón utilizado, se logró aumentar el porcentaje de eficiencia un 81% a concentraciones de almidón entre 2.5g/L a 2.6 g/L comparado con los resultados del ítem anterior.
- Se determinó que el almidón puede llegar a ser un buen floculante si se tiene baja concentración celular al empezar los ensayos y se ve reflejado en el aumento de un 68% de eficiencia a un 99% manteniendo la misma concentración.
- La acción del almidón se ve perjudicada por los cambios del pH en el medio donde se realiza el proceso de floculación ya que reduce el porcentaje de eficiencia si se aumenta el pH hasta un 11.9.

5. RECOMENDACIONES

- Como investigación complementaria, evaluar las condiciones finales del cultivo y del medio después de adicionado el almidón.
- Evaluar la incidencia del almidón en la microalga después de separada, para la producción ya sea de ácidos grasos, proteínas o carbohidratos.
- Comparar las eficiencias empleando sustancias orgánicas como polielectrolitos y el almidón.
- Encontrar la mejor relación o combinación de concentraciones de sustancias orgánicas con el almidón para obtener un porcentaje de eficiencia alrededor del 90% y comparar los costos del posible proceso.
- Replicar el proyecto a escala banco y determinar los costos totales del proceso de floculación.

BIBLIOGRAFIA.

(s.f). Introducción y antecedentes. [En línea]. [Consultado el 30 abr. 2016]. Disponible en <<http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/20804/Capitulo1.pdf>>

ANDERSON, Robert. Algal Culturing Techniques. Oxford: Elsevier Inc, 2005.

ARRIETA, Esteban. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. En: Revista de Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, [en línea]. Vol 14, No.1 (2008) [Consultado el 30 abr. 2016]. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/266730483_Aplicaciones_biotecnologicas_de_las_microalgas_Biotechnologic_uses_of_microalgae>

BARAJAS, A. GARZON, L. GONZALEZ, A. Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel. En revista VIRTUALPRO 2012, no. 122

BASTIDAS, Oscar. Conteo Celular con Hematocitómetro: Uso Elemental del Hematocitómetro. Technical note - Neubauer chamber cell counting. Celeromics. [En línea]. [Consultado el 30 de abril de 2016]. Disponible en: <<http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles:Conteo-Camara-Neubauer.pdf>>

BP España. Que son los biocombustibles. [En Línea]. [Consultado el 20 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.bp.com/es_es/spain/medio-ambiente-y-sociedad/biocombustibles/que-son-los-biocombustibles.html>

CASTRO, Katherine. ORTIZ, Elkin. Determinación de la incidencia de la relación carbono: Nitrógeno en la producción de biomasa y ácidos grasos en la microalga *Chlorella Vulgaris* a escala laboratorio. Bogotá, 2013, 29 p. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Fundación Universidad de America. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. En: Trends in Biotechnology.2011 Vol 26, no. 3, p 126-131.

COLOMBIA. MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Resolución número 2652: Reglamento técnico sobre requisitos de rotulado o etiquetado. Bogotá : Ministerio de la protección social, 2004. 7 p.

CONTRERAS, Karen. SALCEDO, Jairo. ESTRADA, Francisco. Caracterización funcional de almidón catiónico de yuca (*Manihot esculenta*). En Revista Ion Octubre 2013 Vol 26, no.2

ESPAÑA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. Aplicaciones de las Microalgas: Estado de la técnica, 2013. P30

FERNÁNDEZ-LINARES, MONTIEL-MONTOYA, & JESÚS. Producción de biocombustibles a partir de microalgas. En: Revista de Sociedad, Cultura, y Desarrollo Sustentable, septiembre-Diciembre 2012 Vol 8, no. 3, p 101-115.

GREENWELL, H. C., LAURENS, M. L., SHIELDS, R. J., LOVITT, R. W. Y FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. En: J. Roy. Soc. 2009 Vol 10, p 703-726

HANSEL, Philip. RIEFLER, Guy. STUART, Benjamin. Efficient flocculation of microalgae for biomass production using cationic starch. En Algal Research 2014, no. 5, p 133-139

Harvesting of Microalgal Biomass Manjinder Singh, Rekha Shukla, and Keshav Das Biorefining and Carbon Cycling Program College of Engineering The University of Georgia Athens, Georgia BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS of Microalgae

HYUCKJIN, Kwon; MINGSHOU, Lu; EUN YEOL, Lee y JINWON Lee. Harvesting of Microalgae Using Flocculation Combined with Dissolved Air Flotation. En Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2014. Vol. 19 p, 143-149

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogotá: El Instituto, 2008, p.1

_____. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá: El Instituto, 2008, p.1 – 2

_____. Referencias documentales para fuentes de informaciones electrónicas. NTC 4490. Bogotá: El Instituto, 1998, p.2

JARAMILLO OBANDO, Juan. Evaluación tecno-económica de la producción de biocombustible a partir de Microalgas. Manizales, 2011, 24 p. Tesis (Magister en Ingeniería Química). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Maestría en Ingeniería Química

KLEINEGRIS, Dorinde; VAN DEN BROEK, Ben y BARBOSA Maria. Microalgae flocculation as harvesting process. InteSusAL. [En línea]. [Consultado el 24 de mayo de 2016]. Disponible en <http://intesusal-algae.eu/fileadmin/intesusal_docs/Documents/Industry_Seminars/Presentations/09_FlocculationForHarvesting.pdf>

LETELIER-GORDO, Carlos. LØVSTAD HOLDT, Susan. DE FRANCISCI, David. Effective harvesting of the microalgae *Chlorella protothecoides* via bioflocculation with cationic starch. En *Bioresource Technology*. 2014 Vol. 167 p, 214-218

RICHMOND, Amos. *Handbook of Microalgae Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Edición primera. Oxford: Editorial: Blackwell Science Ltd, 2004.

SANCHEZ GONZALEZ, Ismael. Propiedades fisicoquímicas de almidones catiónicos elaborados por extrusión. Mexico D.F. 2007. Tesis (Maestro en tecnología avanzada). Instituto Politécnico Nacional. Programa de Tecnología Avanzada. Área de Alimentos.

SANTOS, Ana Maria. GONZALEZ-ARECHAVALA, Yolanda. MARTÍN-SASTRE, Carlos. Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. En: *Revista Anales* [En Línea]. Disponible en <http://www.revista-anales.es/web/n_24/pdf/seccion_13.pdf>

ANEXOS

ANEXO A

CALCULOS PARA OBTENER LA SOLUCIÓN 0.5N DE NaOH

¿Cuántos gramos se necesita para preparar 200ml de solución de 0.5N de NaOH al 99.9% de pureza?

$$N = \frac{\text{equivalentes Solute}}{\text{Litro de solución soluto}}$$

$$0.5N = \frac{\text{Equivalentes}}{0.2L}$$

$$\text{Equivalentes} = 0.1$$

$$\text{Peso equivalente} = \frac{\text{Peso molecular de la base}}{\text{número de OH}}$$

$$\text{Peso} = \frac{40g}{1} = \frac{40g}{\text{equivalente NaOH}}$$

$$= \text{equivalentes NaOH} * \text{el Peso equivalente}$$

$$= 0.1 \text{ equi} \times \frac{40g}{\text{equi}} = 4g \text{ de NaOH al } 100\% \text{ Pureza}$$

$$\text{Entonces } 4 \times \left(\frac{100\%}{99.9\%} \right) = 4.004g \text{ de NaOH}$$

ANEXO B

DATOS COMPLEMENTARIOS DEL PROYECTO

Tabla B1. Absorbancias para obtener el porcentaje de floculación de la tabla 3

Absorbancia del Blanco: 0,033

Concentración de floculación (g/l)	Absorbancia
0,33	0,355
0,66	0,327
1	0,283
1,33	0,28
1,86	0,179
2,33	0,17
2,5	0,129
2,6	0,081

Tabla B2. Resumen Estadístico de los datos obtenidos del ANOVA.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación estandar
pH=6,9	4	272	68	470	21,67948339
pH=8,5	4	246	61,5	707,66	26,60187963
pH=11,9	4	34	8,5	8,5	2.9154754

Tabla B3. Resultados obtenidos para el grafico 6

Cel/ml	% EFICIENCIA DE FLOCULACION	ABSORBANCIA
1,52E+06	78	0.026
1,74E+06	83	0.024
3,16E+06	55	0.129
4.01E+06	35	0.240

ANEXO C
FICHA TÉCNICA DEL ALMIDÓN CATIONICO