

Evaluación de rutas de obtención de lípidos y monosacáridos de biomasa de microalgas bajo el concepto de biorefinería

Evaluation of lipid and monosaccharide obtaining routes of microalgae biomass under the biorefinery concept

Laura Antonia Peñaranda Rincón; Karen Johanna Sepúlveda Ortiz;
Yury Elena Álvarez Pacheco; Ángel Darío González-Delgado; Viatcheslav Kafarov*

Centro de Investigaciones para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES)
Universidad Industrial de Santander (UIS), Cra. 27 Calle 9, Bucaramanga, Colombia.
*cisyc@uis.edu.co

Fecha Recepción: 7 de marzo de 2011
Fecha Aceptación: 25 de agosto de 2011

Resumen

Al igual que una refinería de petróleo, una biorefinería utiliza todos los componentes de la biomasa para obtener productos aprovechables. Además de los lípidos, la biomasa de microalgas contiene cantidades importantes de proteínas, carbohidratos y otros productos metabólicos. En el presente estudio los autores definieron y evaluaron las rutas de obtención de lípidos y monosacáridos de biomasa de las microalgas *Amphiprora* sp. y *Navicula* sp., por medio de la implementación de procedimientos como disrupción celular ácida, extracción Soxhlet, Organosolv, transesterificación *in situ* y el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). Las rutas fueron definidas y comparadas con base en las eficiencias de extracción de lípidos y porcentajes de azúcares reductores obtenidos. Para la ruta de hidrólisis ácida – extracción Soxhlet se evaluaron diferentes tiempos, los mejores resultados se obtuvieron mediante los tiempos de 120 y 960 min, respectivamente. Mediante la ruta Organosolv – extracción Soxhlet la mayor eficiencia lipídica obtenida fue 48% y en transesterificación *in situ* el mayor porcentaje de azúcares reductores totales fue 1,67%p. Además, se determinaron los parámetros cinéticos relacionados con el sistema de lisis celular y transesterificación *in situ* para *Navicula* sp., obteniendo constantes de $K=0,0003 \text{ min}^{-1}$ para azúcares reductores y $K=0,02 \text{ min}^{-1}$ para productos de degradación. Por medio de espectroscopía infrarroja se comparó el pico de absorción del grupo carbonilo característico del biodiésel a través del tiempo. Entre las rutas evaluadas, Organosolv – extracción Soxhlet y transesterificación *in situ* presentaron mayor obtención de lípidos y monosacáridos, respectivamente.

Palabras clave: *pretratamiento, extracción, integración de procesos, azúcares reductores.*

Abstract

As an oil refinery, a biorefinery uses all biomass components for obtaining high value usable products. Besides lipids, microalgae biomass contains significant amounts of proteins, carbohydrates and other metabolic products. In the present study, the authors defines routes to obtain monosaccharides and lipids from microalgae biomass of *Amphiprora* sp. and *Navicula* sp., through the implementation of acidic cellular disruption procedures, Soxhlet extraction, Organosolv pretreatment, *in situ* transesterification and the dinitrosalicylic acid method (DNS). The routes were defined and compared based on the percentage of lipids and monosaccharides obtained. For acid hydrolysis – Soxhlet extraction route several times of acid hydrolysis and extraction were evaluated, the best results for this route were obtained using times of 120 and 960 min, respectively. By Organosolv - extraction Soxhlet route, the best lipid efficiency obtained was 48% and *in situ* transesterification the highest percentage of total reducing sugars was 1.67%wt. Furthermore, kinetic parameters were determined related to the system of cell lysis and *in situ* transesterification for *Navicula* sp., getting constants $K=0.0003 \text{ min}^{-1}$ for reducing sugars and $K=0.02 \text{ min}^{-1}$ for degradation products. Using infrared spectroscopy compared the absorption peak of carbonyl group characteristic of biodiesel over time. Among Organosolv - Soxhlet extraction routes and *in situ* transesterification - Soxhlet extraction showed higher production of lipids and monosaccharides, respectively.

Keywords: *pretreatment, extraction, process integration, reducing sugars.*

Introducción

El uso continuo de combustibles derivados del petróleo se reconoce como insostenible debido al agotamiento de los suministros y la contribución de éstos a la contaminación del medio ambiente. Al igual que una refinería de petróleo, una biorefinería utiliza todos los componentes del material de la biomasa para obtener productos aprovechables [1]. Los biocombustibles de tercera generación provenientes de microalgas ofrecen una excelente alternativa para desplazar a los combustibles fósiles [2].

La producción de biodiésel a partir de aceite de microalgas implica la extracción de los lípidos de la biomasa, seguido por su conversión a alquil ésteres y glicerol [3]. Los polisacáridos, pueden ser hidrolizados para obtener azúcares reductores a los que se les aplica el proceso de fermentación para producir bioetanol [4]. En el presente estudio se definen y evalúan las rutas

de obtención de lípidos, monosacáridos y ésteres de ácidos grasos de biomasa de las microalgas *Amphiprora* sp. y *Navicula* sp., por medio de la implementación de los métodos de disrupción celular ácida, extracción Soxhlet, Organosolv, y transesterificación *in situ*.

Metodología

Se utilizó la biomasa de las microalgas *Amphiprora* sp. y *Navicula* sp. proporcionada por la Corporación Instituto de Morrosquillo (Punta Bolívar, Colombia), la cual fue cosechada por floculación y filtración. La caracterización de la biomasa fue realizada por el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), los datos se presentan en la Tabla 1 los cuales son porcentajes en base seca. Cabe resaltar que el alto porcentaje de cenizas se debe al floculante empleado, el cual afecta negativamente el contenido propio de los metabolitos de las microalgas.

Tabla 1. Composición Química de los géneros de microalgas empleados.

Género	Composición Química [%p]				
	Nitrógeno	Proteína	Cenizas	Material Polisacárido de Microalgas	Lípidos
Navicula sp.	3,2	15,1	51,6	5,3	13,2
Amphiprora sp.	2,1	10,0	52,8	10,0	12,0

La biomasa de las microalgas se pretrató mediante hidrólisis ácida y Organosolv [5]. Los azúcares reductores totales presentes en el licor de cada pretratamiento fueron cuantificados mediante el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller [6]. Seguidamente, la biomasa fue sometida a extracción Soxhlet. Además, se llevó a cabo el sistema multifuncional, el cual permitió realizar conjuntamente los tratamientos de disrupción celular, extracción de aceites y transesterificación *in situ* [7].

Hidrólisis - extracción Soxhlet

Se empleó el método de hidrólisis ácida a cada una de las microalgas en estudio, *Amphiprora* sp. y *Navicula* sp., el cual consistió en una solución compuesta por 10 g de biomasa y ácido clorhídrico 0,5 M, de acuerdo con la metodología desarrollada por Kafarov *et al.* [8]. Se sometió a agitación a una

velocidad de 500 rpm durante 30, 60 y 120 min a temperatura ambiente. Se seleccionó este rango de tiempo para no incurrir en gastos energéticos innecesarios, y evitar la degradación de los metabolitos de interés. Una vez transcurrido este tiempo, se filtró al vacío y se lavó la biomasa hasta alcanzar un pH cercano a 7, obteniendo de esta manera biomasa hidrolizada e hidrosoluble. Dicha biomasa hidrosoluble o licor fue tratada según el método DNS para determinar la concentración de azúcares reductores totales (ART). La biomasa hidrolizada se secó a 105°C durante 240 min, para realizar posteriormente extracción lipídica.

Los lípidos presentes en la biomasa hidrolizada de cada una de las microalgas fueron extraídos haciendo uso del solvente orgánico, hexano, en un equipo Soxhlet [9], durante 480, 720 y 960 min de lavado repetitivo. Con la utilización de tiempos mayores a 960 min, se incurriría en pérdidas

significativas de solvente y en mayor ingreso de energía al sistema, poco justificable si el producto a obtener al final de la cadena de producción son biocombustibles. Se emplearon los porcentajes de lípidos reportados en la caracterización para *Amphiprora* sp. y *Navicula* sp. (Tabla 1), y las siguientes ecuaciones para calcular el porcentaje de extracción y la eficiencia lipídica:

$$\% \text{ Extracción} = \frac{\text{Peso de aceite}}{\text{Peso de biomasa}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Eficiencia} = \frac{\% \text{ Extracción experimental de lípidos}}{\% \text{ de lípidos reportado en caracterización}} \times 100 \quad (2)$$

Organosolv - extracción Soxhlet

Esta ruta consiste en una disrupción celular a alta temperatura y a presión controlada, la cual es promovida por un arrastre de vapor y un solvente orgánico, seguida de una extracción Soxhlet con hexano. Para la disrupción celular se utilizaron las condiciones de operación determinadas por Meza y Sepúlveda [10]. Después de la disrupción se realizó un lavado de la biomasa de *Navicula* sp. con el fin de neutralizar el pH, seguido a esto la biomasa pretratada se secó en horno a 105 °C durante 240 min. Al licor obtenido después de la filtración, se le determinó concentración de ART por medio del método DNS. La biomasa seca se homogenizó y fue sometida a extracción Soxhlet, tomando como condiciones de operación aquellas que brindaron las mayores eficiencias durante la evaluación de la ruta hidrólisis ácida – extracción Soxhlet. La cuantificación de los lípidos obtenidos se realizó mediante gravimetría por volatilización y se calculó la eficiencia lipídica de la prueba.

Sistema multifuncional

Con base en el contenido teórico de aceite de la microalga *Navicula* sp. se determinó una proporción de 1:6 de biomasa-etanol. Lo anterior se realizó con el propósito de impulsar la reacción en dirección de los ésteres etílicos (Modificado de Ehimen *et al.* [3] y Johnson *et al.*, [11]). Se utilizó ácido sulfúrico (H₂SO₄) como catalizador ácido de la transesterificación, en relación másica de aceite-ácido 1:1 (Modificado de Johnson *et al.*, [11] y Plata *et al.* [12]). Estas reacciones se sometieron a una velocidad de agitación de 500 rpm, a una temperatura de 60°C durante 1440 min, tomándose una muestra a intervalos de tiempo variables. Adicionalmente, se implementó una separación de lípidos neutros con hexano a

cada muestra, con el fin de aislar los componentes lipídicos y etil-ésteres de la biomasa residual y de la fase hidroalcohólica donde quedan contenidos los ART y demás componentes polares. Dichos componentes que migran a la fase hexánica se sometieron a pruebas de infrarrojo. Los espectros se obtuvieron en un equipo Shimadzu FTIR-8400S en el rango de longitud de onda de 400 - 4000 cm⁻¹, se utilizó el Software IRSolution y una celda de 2,5 cm de diámetro. Para cuantificar los lípidos no extraídos ni transesterificados, se realizó extracción de lípidos a la biomasa residual.

Modelamiento cinético

Mediante el software Matlab® y la herramienta Solver en Microsoft Excel® se calcularon los parámetros cinéticos relacionados con el sistema multifuncional. Adicionalmente, se realizó una simulación con base en los parámetros y el modelo encontrado para la obtención de azúcares reductores a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido de la microalga *Navicula* sp.

Resultados y discusión

Influencia del tiempo de disrupción en el porcentaje de extracción

En la Figura 1 se muestra el porcentaje de extracto lipídico obtenido para diferentes tiempos de disrupción celular ácida en *Amphiprora* sp. La biomasa tratada durante 30, 60 y 120 min se sometió a extracción Soxhlet por 960 min. Por medio del pretratamiento de hidrólisis ácida durante 120 min, incrementó la eficiencia de extracción lipídica, obteniendo un mayor resultado, 39%, en comparación con los realizados para 30 y 60 min de pretratamiento. De acuerdo con González *et al.* [7], esta diferencia se puede presentar por el grado de lisis celular, es decir, ruptura a nivel de la pared celular de la microalga en relación con el tiempo de contacto con el agente disruptor, permitiendo que los lípidos estén expuestos en mayor o menor medida al solvente de extracción, lo cual incide en el porcentaje de extracto lipídico obtenido. Se estableció, entonces, como mejor tiempo de disrupción celular, 120 min, el cual se implementó en posteriores experimentos.

Efecto de la variación del tiempo para extracción Soxhlet

Se implementaron diferentes tiempos de extracción Soxhlet con el propósito de establecer el mejor tiempo con base en la eficiencia lipídica obtenida. Durante 960 min de extracción se obtuvo

una eficiencia de 39%, comparativamente mayor respecto a 22,5% para 480 min y 26,3% para 720 min de extracción (Figura 2). Se definió la ruta hidrólisis ácida – extracción

et al. [13], se describe una reacción consecutiva de primer orden con dos pasos irreversibles, donde AR se refiere a azúcares reductores y PD, productos de degradación.

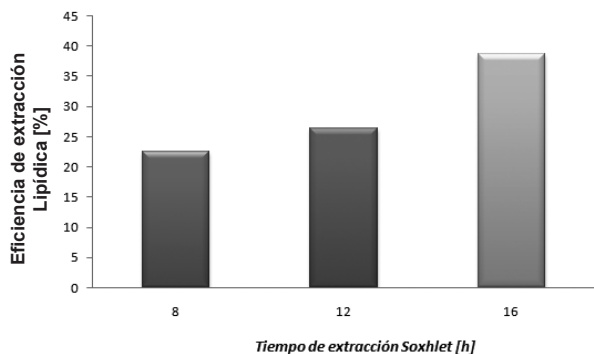


Figura 1. Efecto del tiempo de hidrólisis ácida en la eficiencia de extracción lipídica en *Amphiprora* sp.

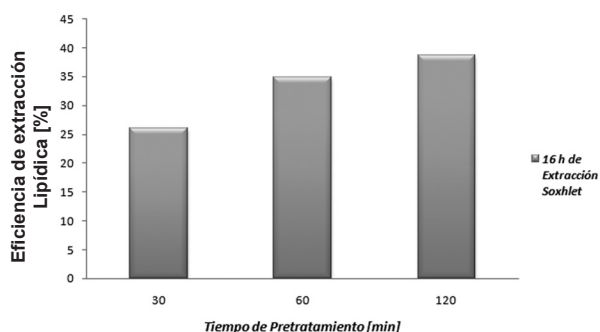


Figura 2. Determinación del tiempo de extracción lipídica para hidrólisis ácida de 120 min en *Amphiprora* sp.

Soxhlet, con tiempos de reacción de 120 y 960 min, respectivamente, donde se obtuvo una eficiencia de extracción lipídica de 39% para *Amphiprora* sp. y 40% para *Navicula* sp. Mediante esta ruta se obtuvieron eficiencias lipídicas similares para las microalgas en estudio.

De la misma forma, se fijó 960 min de extracción para la ruta Organosolv – Extracción Soxhlet, obteniéndose una eficiencia lipídica de 48% para *Navicula* sp., valor superior al obtenido mediante la ruta hidrólisis ácida – Extracción Soxhlet, lo cual indica un mejor desempeño del pretratamiento Organosolv frente a la hidrólisis ácida.

Modelamiento cinético de la producción de monosacáridos

El comportamiento del Material Polisacárido de Microalgas (MPM) se muestra en la Ecuación 3. De acuerdo al modelo desarrollado por Téllez-Luis



A continuación se presentan las ecuaciones cinéticas que describen el cambio del MPM y los productos:

$$\frac{dC}{dt} = -K_1[C] \quad (4)$$

$$\frac{dA}{dt} = K_1[C] - K_2[A] \quad (5)$$

$$K_i = C_{acid}^n A_i e^{-E_i/RT} \quad (6)$$

$$C_{ART} = \frac{25,3208K_1}{K_2 - K_1} (e^{-K_1t} - e^{-K_2t}) \quad (7)$$

La Ecuación 4 expresa la velocidad de reacción de monomerización de polisacáridos, la Ecuación 5 describe la velocidad de producción de azúcares reductores, donde C es la concentración de MPM y A es la concentración de azúcares reductores totales. Se presenta también la ecuación de Arrhenius donde se relaciona la constante de velocidad K_i en función de la temperatura (Ec. 6). La Ecuación 7 se obtuvo mediante desarrollo matemático, ésta relaciona la concentración de azúcares reductores totales, con las constantes de velocidad y el tiempo. Los valores numéricos de la Ecuación 7 están basados en el material polisacárido de microalgas reportado por Ververis et al. [14].

Los parámetros cinéticos fueron estimados mediante el software MatLab®. Se encontraron las constantes de velocidad de reacción, K_1 y K_2 , y por medio de la herramienta Solver se obtuvieron los demás parámetros.

Con los parámetros hallados se estableció el modelo cinético. Se simuló el comportamiento de la concentración de azúcares reductores totales a diferentes temperaturas y concentraciones de ácido sulfúrico. La mayor cantidad de ART según el modelo encontrado se obtuvo alrededor de 200 min, estabilizándose hasta los 350 min de reacción. Posteriormente, se presentó una ligera

degradación de los azúcares reductores totales. Este comportamiento se observó debido a la ruptura celular llevada a cabo por el ácido sulfúrico y la degradación de los ART por el tiempo de

contacto con el mismo (Figura 3). Cabe señalar la doble función del ácido en este sistema, hidroliza el material polisacárido formando monómeros y dejando libres los lípidos presentes en la microalga.

Tabla 2. Resultados del modelamiento cinético para biomasa de *Navicula* sp.*

Ácido Sulfúrico T=60 °C						
	n	A [min ⁻¹]	E [kJ/mol]	K [min ⁻¹]	X _{E/M}	Y _{E/M}
Azúcares reductores	0,16	0,05	15,52	0,0003	1,01	0,99
Productos de degradación	0,35	1,13	14,08	0,0200		

* n : Factor exponencial obtenido experimentalmente que potencia la concentración del ácido, A: Factor pre-exponencial, E: Energía de activación de la reacción, K: Constante de velocidad, X_{E/M}: Relación de la concentración experimental de ART respecto a la concentración modelada de ART en el tiempo, Y_{E/M}: Relación del logaritmo de la concentración experimental de ART respecto al logaritmo de la concentración modelada de ART en el tiempo.

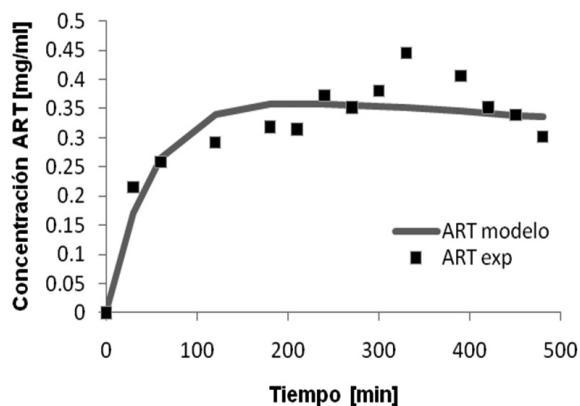


Figura 3. Modelamiento de la concentración de Azúcares Reductores Totales (ART) en el tiempo.

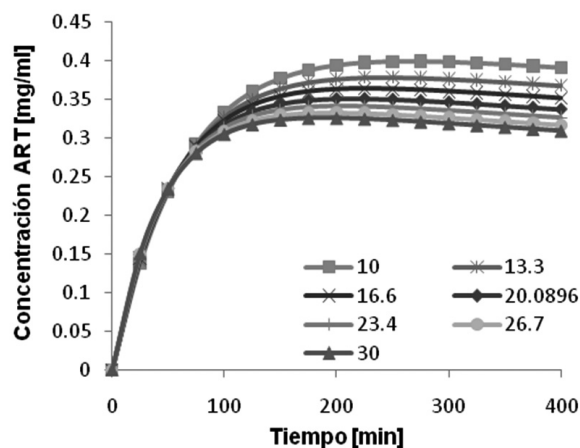


Figura 4. Concentración de Azúcares Reductores Totales (ART) en el tiempo respecto a diferentes concentraciones de ácido (mg/mL).

Se espera entonces que en una posterior validación de este modelo, concentraciones bajas de ácido permitan menor degradación de azúcares reductores y por tanto obtener mayor concentración de los mismos a lo largo del tiempo (Figura 4).

Se modeló el efecto de la variación de la temperatura sobre la concentración de ART en el tiempo, manteniendo una concentración de ácido sulfúrico de 20 mg/mL. En la Figura 5 se observa que la rapidez en la producción de azúcares reductores totales aumentó notoriamente para una temperatura de 140°C hasta un tiempo de 75 min, obteniendo una concentración máxima de 0,38 mg/mL.

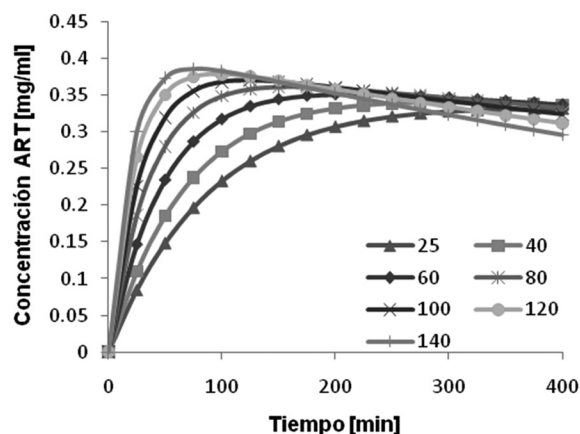


Figura 5. Concentración de Azúcares Reductores Totales (ART) en el tiempo, respecto a la variación de la temperatura (°C).

Así mismo, la degradación de azúcares reductores ocurrió más rápidamente después del tiempo mencionado anteriormente. Al disminuir la temperatura a 25°C, se afectó la rapidez de formación de ART, es decir, la concentración de azúcares reductores fue

menor y la degradación más lenta en comparación con temperaturas superiores. El modelo demuestra también la conveniencia de utilizar tiempos cortos de hidrólisis para evitar así, una posterior degradación de los azúcares reductores.

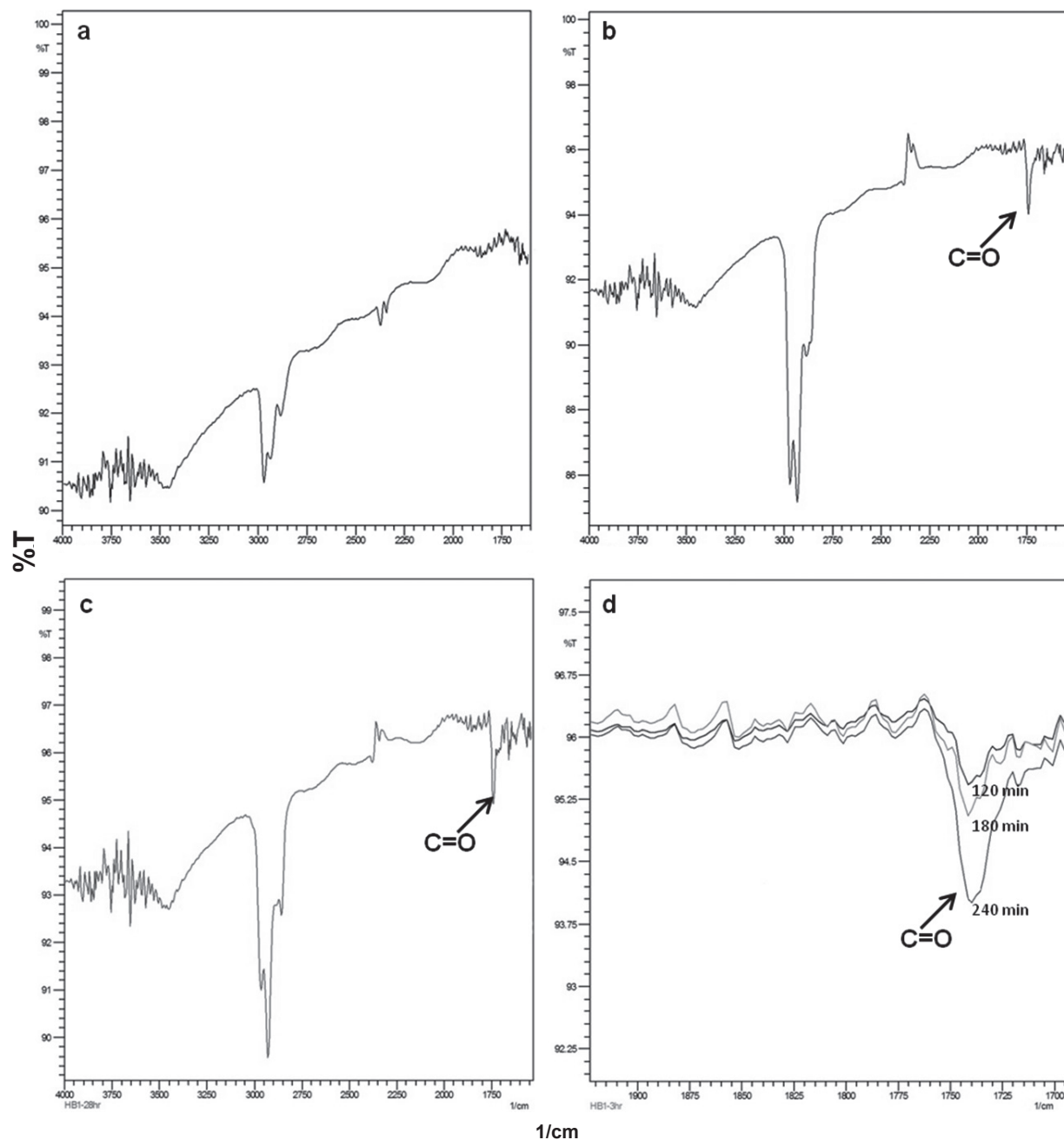


Figura 6. Espectros infrarrojos de la fase hexánica producto de la ruptura celular y transesterificación *in situ* de *Navicula* sp. a) Hexano puro. b) Muestra de 240 min. c) Muestra de 1440 min. d) Comparación de espectros para muestras de 120, 180, 240 min.

Comparación de los picos de absorción del grupo carbonilo en el tiempo

Los espectros obtenidos mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), indicaron un aumento del área de la banda correspondiente al enlace carbonilo (C=O) sobre 1750 cm^{-1} y la banda que constituye las cadenas alifáticas entre los 2800 y 3000 cm^{-1} desde 120 min de reacción. Estas son bandas asociadas a los ésteres, demostrando que en el transcurso del tiempo de reacción se da la formación de esteres etílicos o biodiésel (Figura 6). Durante el proceso multifuncional, la ruptura celular libera los lípidos a través del tiempo, permitiendo el incremento en la formación de ésteres etílicos.

Además, se realizó FTIR para muestras

obtenidas mediante la ruta de hidrólisis ácida - extracción Soxhlet (Figura 7). En los espectros IR de las muestras de extracto lipídico y la fase hexánica de 240 min se identificó la banda de cadenas alifáticas a 2918 cm^{-1} . El enlace éster aparece tanto en lípidos como en biodiésel [15] [16], este enlace carbonilo (C=O) para lípidos se encontró a 1704 cm^{-1} y para ésteres etílicos a 1750 cm^{-1} . En el espectro de la muestra tomada del sistema multifuncional (Figura 7b) apareció un pico a 3400 cm^{-1} , que corresponde al enlace OH, característico en espectros de glicerina [17]. Lo anterior se atribuye al origen del biodiésel, el cual proviene de un sistema multifuncional donde no hubo un proceso de purificación de los productos.

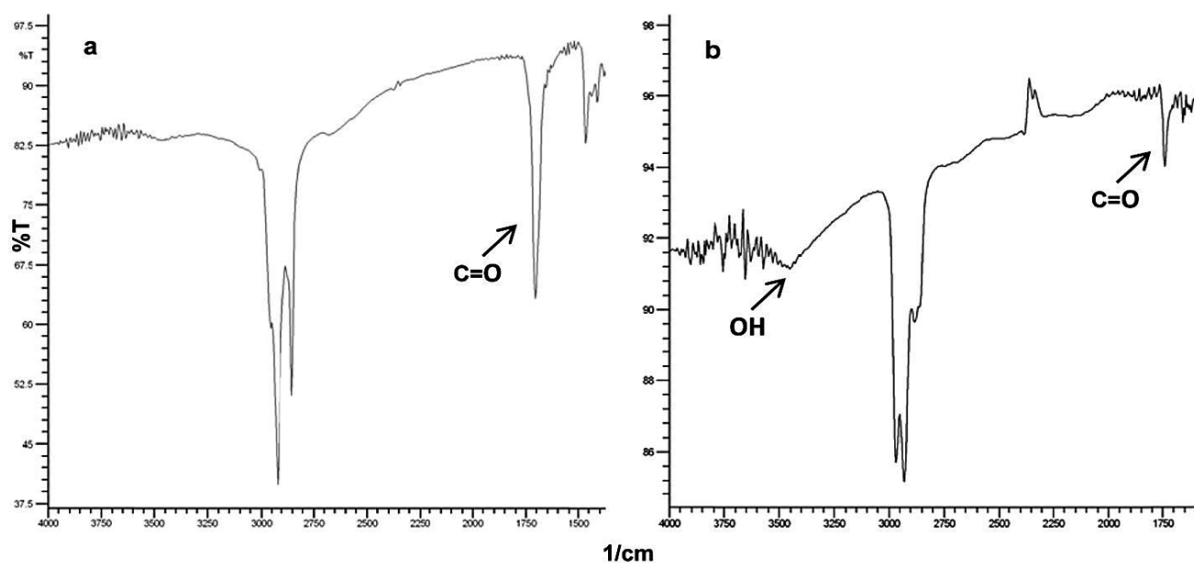


Figura 7. Comparación de espectros infrarrojos de *Navicula* sp. a) Muestra lipídica obtenida por medio de la ruta hidrólisis ácida- extracción Soxhlet. b) Muestra de 240 min de reacción del sistema multifuncional.

Los espectros IR obtenidos para esteres etílicos fueron comparados con espectros IR de lípidos de microalgas y aceite y ésteres etílicos de palma (Tabla 3). El enlace éster para lípidos de microalgas comprende la región de 1654 a 1746 cm^{-1} [15], lo cual coincide con la banda encontrada a 1704 cm^{-1} . En el espectro IR para ésteres etílicos a partir de aceite de palma [18] y de la microalga *Navicula* sp., el enlace carbonilo se identificó a la misma longitud de onda, 1750 cm^{-1} .

Comparación de rutas de obtención de lípidos y monosacáridos

Por medio de la ruta Organosolv – extracción Soxhlet se obtuvo un valor de eficiencia lipídica de

48% , para la ruta de hidrólisis ácida – extracción Soxhlet una eficiencia de 40% y finalmente para el sistema multifuncional – extracción Soxhlet una eficiencia de $4,8\%$. Por lo tanto, se escogió la ruta Organosolv – extracción Soxhlet, donde se obtuvo la mayor eficiencia de extracto lipídico. La biomasa separada después del proceso de ruptura celular y transesterificación *in situ* fue sometida a extracción Soxhlet con el fin de determinar y cuantificar la cantidad de aceite remanente, como se muestra en la Figura 8, existe una cantidad de aceite en la biomasa que no fue extraído durante el tiempo de implementación del sistema multifuncional.

Por medio de transesterificación *in situ* se obtuvo la mayor concentración de azúcares reductores totales, 1,67%p, en comparación con hidrólisis ácida y Organosolv (Tabla 4).

Tabla 3. Regiones características de espectros de lípidos y biodiésel.

Espectro	Región[cm ⁻¹]	Vibración	Lípidos	Ésteres etílicos	Referencias
Microalgas	2954-3025	Cadenas alifáticas (CH ₃ y CH ₂)	Presente	Ausente	[15]
	1654-1746	Enlace carbonilo (C=O)	Presente	Ausente	[15]
Palma	1750	Enlace carbonilo (C=O)	Presente	Presente	[18]
	2800-3000	Cadenas alifáticas (CH ₃ y CH ₂)	Presente	Presente	[18]

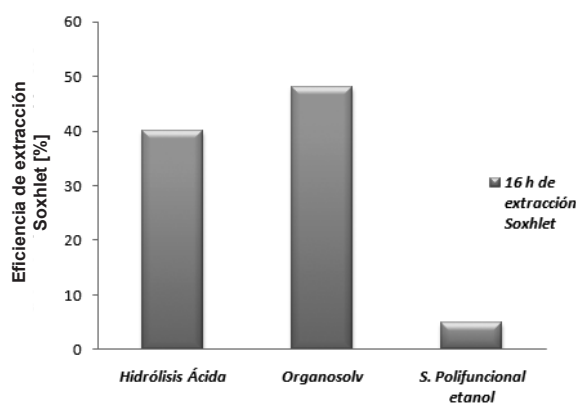


Figura 8. Comparación de la eficiencia de las rutas de obtención de lípidos en *Navicula* sp. mediante extracción Soxhlet.

Tabla 4. Comparación de rutas de obtención de Azúcares Reductores Totales (ART) en *Navicula* sp.

	% de ART obtenido		
	Hidrólisis ácida	Organosolv	Transesterificación <i>in situ</i>
<i>Navicula</i> sp.	0,29	0,98	1,67

La obtención de azúcares reductores totales por medio de los procedimientos señalados estuvo relacionada con el tiempo de contacto con el agente disruptor. Las muestras tomadas a intervalos de tiempo variables en el método de transesterificación *in situ* revelaron mayor concentración de ART debido a la exposición irregular con el ácido sulfúrico.

Conclusiones

Al incrementar el tiempo de operación de los métodos hidrólisis ácida y extracción Soxhlet se

aumenta la obtención de aceite en las microalgas *Amphiprora* sp. y *Navicula* sp. A su vez mediante el modelamiento cinético se comprueba que al emplear tiempos menores a 120 min de hidrólisis se disminuye la posibilidad de degradación de los productos de interés. Mediante la ruta Organosolv – Extracción Soxhlet se obtuvo la eficiencia lipídica más alta respecto a las demás rutas.

Bajo las condiciones evaluadas en el sistema multifuncional se obtuvieron tanto ésteres etílicos como azúcares reductores totales, estos últimos con el mayor porcentaje obtenido respecto a las demás rutas definidas. De acuerdo al los modelos propuestos para este sistema, a menor concentración de ácido, aumenta la producción de ART. En contraste, a mayor concentración de ácido sulfúrico la producción de ART disminuye e inicia a menor tiempo la degradación. Siendo esto algo conveniente, pues la menor adición de ácido, es favorable económicamente para el proceso, a su vez, disminuye el riesgo de degradar productos valiosos. Sin embargo, es necesario validar el modelo con datos experimentales a las condiciones más favorables encontradas mediante el modelamiento. La producción de ésteres etílicos bajo este sistema, se detectó con espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, encontrándose la mayor producción en un tiempo cercano al que se da también la mayor producción de ART. Se puede considerar entonces que la obtención conjunta de los metabolitos mediante esta ruta no requiere de largos periodos de tiempo. Bajo un concepto de biorefinería y considerando un posterior escalamiento del proceso, la ruptura celular y transesterificación *in situ* como un sistema multifuncional, se considera

como la mejor ruta para obtención de azúcares reductores totales y ésteres de biodiésel.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por su apoyo mediante el proyecto 2008D32006-6710 “Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiésel”, al Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL, al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS, a la Universidad Industrial de Santander, a la Corporación Instituto de Morrosquillo y al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED.

Referencias

- [1] Khan SA, Rashm R, Hussain Z, Prasad S, Banerjee UC. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renew Sust Energ Rev.* 2009;13:2361–72.
- [2] Beer LL, Boyd ES, Peters JW, Posewitz MC. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Curr Opin Biotechnol.* 2009;20(3):264–71.
- [3] Ehimen EA, Sun ZF, Carrington CG. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel.* 2010;89:677–84.
- [4] Fu ChCh, Hung TCh, Chen JY, Su ChH, Wu WT. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. *Biores. Technol.* 2010;101:8750–4.
- [5] Dias MOS, Ensinas AV, Nebra SA, Maciel R, Rossell CEV, Wolf MR. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. *Chem. Eng. Res. Des.* 2009;87:1206–16.
- [6] Miller GL. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 1959;31:426–8.
- [7] González D, Kafarov V. Design of a multifunctional reactor for third generation biofuels production. *Chem. Eng. Transact.* 2010;21:1297–302.
- [8] Kafarov V, Sarmiento R, Amaya A, González A. Desarrollo de una metodología para la extracción de aceite de microalgas empleando disrupción celular térmica y química. *Memorias del XXIX Congreso Latinoamericano de Química;* 2010 Sep 27- Oct 01; Cartagena, Colombia, p.100.
- [9] Córdoba LS, López LM, González AD, Kafarov V. Obtención de aceite de microalgas nativas a escala de laboratorio mediante la combinación de disrupción celular y método de extracción Soxhlet para la producción de biodiésel. *Memorias del XXIX Congreso Latinoamericano de Química;* 2010 Sep 27- Oct 01; Cartagena, Colombia, p.103.
- [10] Meza Santos AP, Sepúlveda Soto AJ. Estudio del pretratamiento metanol-ácido de la microalga *Chaetoceros gracilis* para la obtención de azúcares reductores totales (trabajo de grado). Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander; 2010.
- [11] Johnson MB, Wen Z. Production of Biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. *Energy Fuels.* 2009;23:5179–83.
- [12] Plata V, Kafarov V, Moreno N. Optimization of third Generation biofuels production: Biodiesel from microalgae oil by homogeneous transesterification. *Chem. Eng. Transact.* 2010;21:1201–6.
- [13] Téllez-Luis SJ, Ramírez JA, Velásquez MV. Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum Straw. *J. Food Eng.* 2002;52:285–91.
- [14] Ververis C, Georghiou K, Danielidis D, Hatzinikolaou DG, Santas P, Santas R, Corleti V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Biores. Technol.* 2007;98:296–301.
- [15] Laurens LM, Wolfrum EJ. Feasibility of spectroscopic characterization of algal lipids: chemometric correlation of NIR and FTIR spectra with exogenous lipids in algal Biomass. *Bioenerg. Res.* 2010, DOI 10.1007/s12155-010-9098-y.
- [16] Aliske MA, Zagonel GF, Costa BJ, Veiga W, Saul CK. Measurement of biodiesel concentration in a diesel oil mixture. *Fuel.* 2007;86:1461–4.
- [17] Ooi TL, Yong KC, Dzulkefly K, Wan Yunus WMZ, Hazimah AH. Crude glycerine recovery from glycerol residue waste from a palm kernel oil methyl ester plant. *J. Oil Palm Res.* 2001;13(12):16–22.
- [18] Martínez ÓM, Sánchez FJ, Suárez ÓY. Producción de ésteres etílicos a partir de aceite de palma RBD. *Ing. e invest.* 2007;27(2):34–43.