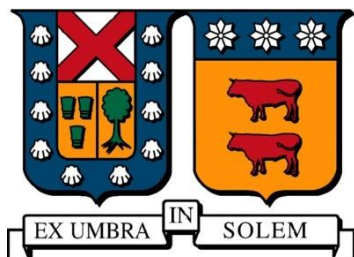


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y  
AMBIENTAL  
SANTIAGO-CHILE



# EVALUACIÓN DE SOLVENTES PARA DETERMINAR LA CANTIDAD DE MATERIA GRASA CONTENIDA EN MICROALGAS MEDIANTE EXTRACCIÓN SOXHLET

NICOLE CONSTANZA PAVEZ RAMÍREZ

MEMORIA COMO REQUISITO PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE

**INGENIERA CIVIL QUÍMICA**

PROFESOR GUÍA: **GONZALO NÚÑEZ MONTOYA**

PROFESOR CORREFERENTE: **RODRIGO BENAVIDES VALENZUELA**

**AGOSTO 2023**

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradezco el apoyo incondicional de mi familia, de haber estado siempre conmigo, de brindarme palabras de aliento cuando quería rendirme, de apoyarme económicamente durante toda mi carrera, de creer siempre en mí, en mis capacidades y de alentarme a estudiar para ser alguien en la vida. Gracias a mis padres Marcela y Jorge, mis tíos Alejandra y Jorge, mis tatas Elsa y Eliecer y a mi hermana Vaitiare. Los amo mucho a quienes siguen aquí y a quien me cuida desde otro plano en estos momentos.

Gracias a mis amigas de siempre, de mi enseñanza escolar. A mis mejores amigas Natalia, Victoria y Débora por alentarme a seguir adelante, por ser parte de mis distracciones necesarias en el proceso universitario, por celebrar mis logros y estar allí en mis caídas. También a las grandes amigas, amigos y el amor que me dejó la universidad, buenas y verdaderas amistades. Gracias Nikold, Camila y Danitza por brindarme unos primeros años de universidad llenos de aventuras, llantos, carretes y experiencias que quería vivir en mi época universitaria. Gracias Belén, Felipe, Isidora y Catalina por haber sido los mejores compañeros académicos y excelentes amigos conmigo, por ser tan constantes, responsables y un excelente equipo de trabajo en cualquier evaluación que se nos presentara. Me alegro mucho de terminar mi proceso universitario junto a ustedes. También quiero agradecer a Gonzalo, mi gran compañero, amigo y amor, por ayudarme a estudiar, por enseñarme sus conocimientos y gastar de su tiempo en ello, por ayudarme a tener personalidad para apelar cuando era necesario y así lograr pasar varios ramos, por creer siempre en mis capacidades y desearme siempre lo mejor.

Agradecer a los profesores que confiaron en mí y marcaron mi paso por la universidad, profesor Gonzalo Núñez, que fue el primer profesor en brindarme su confianza para llevar a cabo una de sus ayudantías. Me ayudó a ganar confianza, a creer en mí y en mis conocimientos y al profesor Rodrigo Benavides, por confiar plenamente en mis capacidades para llevar a cabo su curso y darme la posibilidad de seguir desarrollando habilidades como ayudante.

También agradezco a los apoyos académicos que me ayudaron a desarrollar mi memoria, principalmente María Victoria Riquelme y Marcelo Moreno por siempre responder mis mails, prestarme equipamiento necesario y por capacitarme para desarrollar mis experimentos.

## Resumen

El uso de combustibles fósiles contribuye a la producción de gases de efecto invernadero que han producido alteración del clima y de la vida. Por ello una solución es utilizar energías renovables como los biocombustibles, donde las microalgas son un potencial candidato para su producción debido a que su contenido lipídico es alto, variando entre 30- 60% y que su cultivo es sustentable. La presente investigación se refiere a la cantidad de lípidos que se puede extraer de una microalga mediante extracción Soxhlet, donde se utilizó *n*-hexano como solvente control y etanol, agua y mezclas de etanol-agua para buscar un reemplazo más compatible con la vida y el medio ambiente que el *n*-hexano, debido a su toxicidad. El objetivo principal fue determinar la cantidad de lípidos que contienen las microalgas mediante extracción Soxhlet. El método utilizado se basó en la ISO 13944-2012. Los solventes utilizados fueron *n*-hexano, etanol anhidro, agua pura y mezclas de etanol-agua de 10-90% etanol. Se masaron muestras en triplicado de microalga *Nannochloropsis gaditana* de 10 g aproximadamente cada una y se realizó extracción durante 8 h. Luego se separó los lípidos de microalga de cada extracción para obtener la cantidad de lípidos y así también el rendimiento de extracción junto al gasto energético de cada separación. El rendimiento de extracción con *n*-hexano fue de 9,9%, con etanol de 27,2% y con agua de 7,0%. Del *n*-hexano se esperaba un rendimiento cercano al 30% debido a su afinidad con los lípidos, no obteniéndose el resultado esperado. El rendimiento del etanol concordó con la teoría y del agua se determinó que no se extrajeron lípidos por su polaridad. Las mezclas EtOH:Agua entre 90:10 y 70:30 (%v/v) obtuvieron mayores rendimientos de extracción de 29,4% y 30,1%, respectivamente, mientras que las mezclas EtOH:Agua entre 60:40 y 10:90, mostraron menores rendimientos de extracción, entre 2,7% y 11%, respectivamente. También se notó que las mezclas con mayor porcentaje de etanol y *n*-hexano extrajeron mayor cantidad de clorofila. Respecto al gasto energético, las mezclas EtOH:Agua desde 10:90 a 50:50 (%v/v) obtuvieron mayor gasto energético de 19 kWh, las extracciones con mezclas EtOH:Agua 60:40 a 90:10 un gasto de 10 kWh y finalmente el etanol puro y el *n*-hexano obtuvieron gastos cercanos a 2 kWh. Se logró determinar la cantidad de lípidos contenidos en la microalga *N. gaditana*, el rendimiento de extracción de lípidos y gasto energético, determinándose que las mezclas EtOH:Agua entre 70:30 a 90:10 (%v/v) tienen un mayor rendimiento de extracción y al ser más amigables con el medio ambiente son ideales para reemplazar el *n*-hexano, pero debido a su gasto energético, se debe evaluar, en otra investigación, si un mayor gasto energético es más amigable que usar hexano.

## Índice General

Agradecimientos .....	2
Resumen .....	3
1 Introducción .....	8
2 Objetivos .....	10
<b>2.1 Objetivo general</b> .....	10
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	10
3 Marco teórico .....	11
<b>3.1 Biocombustibles</b> .....	11
<b>3.2 Microalgas</b> .....	12
3.2.1 Microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> .....	14
<b>3.3 Tipos de extracción de lípidos de microalgas para producción de biodiésel</b> .....	16
3.3.1 Métodos clásicos de extracción de lípidos .....	17
3.3.2 Métodos innovadores de extracción de lípidos.....	18
<b>3.4 Extracción Soxhlet: extracción por solventes</b> .....	19
3.4.1 Polaridad: tipos de solventes y sus características.....	22
<b>3.5 Métodos de recuperación de lípidos de la microalga</b> .....	26
3.5.1 Decantación .....	26
3.5.2 Destilación .....	27
3.5.3 Rotaevaporación.....	27
3.5.4 Evaporación .....	28
4 Materiales y métodos .....	29
<b>4.1 Materiales</b> .....	29
<b>4.2 Procedimiento experimental de extracción Soxhlet</b> .....	30
<b>4.3 Separación de lípidos de microalga del solvente</b> .....	31

<b>4.4</b>	<b>Determinación de rendimiento de extracción de lípidos, gasto energético y costos</b>	<b>32</b>
<b>4.5</b>	<b>Diseño experimental</b>	<b>34</b>
5.	Resultados y discusión	36
6.	Conclusiones y recomendaciones	46
7.	Referencias	49
8.	Anexos	54
	<b>Anexo A: Tabla de materiales y equipos</b>	<b>54</b>
	<b>Anexo B: Descripción del rotavapor utilizado para la separación de lípidos y solventes</b>	<b>56</b>
	<b>Anexo C: Cálculo de mezclas etanol-agua realizadas para cada experimento</b>	<b>58</b>
	<b>Anexo D: Cálculo de rendimiento de extracción para el hexano</b>	<b>60</b>
	<b>Anexo E: Cálculo de rendimiento de extracción para mezclas etanol-agua</b>	<b>61</b>
	<b>Anexo F: Cálculo del gasto energético y costo para cada experimento</b>	<b>64</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 3-1.</b> Composición general de la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> (Hu et al., 2015) ...	14
<b>Tabla 3-2.</b> Perfil lipídico de la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> (Hu et al., 2015). .....	15
<b>Tabla 3-3.</b> Temperatura de ebullición de mezclas etanol-agua en distintas proporciones (Dortmund Data Bank, 2023). .....	25
<b>Tabla 4-1.</b> Tarifa eléctrica tipo BT1(Enel, 2023). .....	33
<b>Tabla 4-2.</b> Precio de los solventes. ....	33
<b>Tabla 4-3.</b> Diseño experimental.....	35
<b>Tabla 5-1.</b> Masa de lípidos de microalga recuperados de la extracción con hexano.....	36
<b>Tabla 5-2.</b> Rendimiento de extracción de lípidos de microalga recuperado de la extracción con n- hexano.....	36
<b>Tabla 5-3.</b> Rendimiento de extracción de lípidos de microalga recuperado de la extracción de mezclas etanol-agua.....	37
<b>Tabla 5-4.</b> Gasto energético de cada experimento en función del tiempo de uso de cada equipo eléctrico. ....	43
<b>Tabla 5-5.</b> Costo total de cada extracción.....	44
<b>Tabla A-1.</b> Lista de sustrato, solventes y equipos utilizados para la experimentación.....	54
<b>Tabla A-2.</b> Instrumentos y materiales utilizados en la experimentación.....	55
<b>Tabla B-1.</b> Descripción de las partes del Rotavapor R-3 (Büchi, 2023). .....	57
<b>Tabla C-1.</b> Disoluciones etanol-agua para cada experimento.....	59
<b>Tabla D-1.</b> Masa microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> seca para extracción con hexano.....	60
<b>Tabla E-1.</b> Masa de lípidos de microalga recuperado de la extracción con agua, etanol y mezclas de estos.....	61
<b>Tabla E-2.</b> Masa microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> seca para extracciones con mezclas etanol-agua.....	62
<b>Tabla F-1.</b> Equipos eléctricos utilizados y sus respectivas potencias eléctricas.....	64
<b>Tabla F-2.</b> Tiempo de uso de cada equipo eléctrico para cada experimento.....	65
<b>Tabla F-3.</b> Detalle del costo de extracción de cada experimento. ....	66

## Índice de Figuras

<b>Figura 3-1.</b> Estructura química de la clorofila $\alpha$ (Nelson, 2009).....	16
<b>Figura 3-2.</b> Esquema de explicación fenómenos y funcionamiento del extractor Soxhlet. ....	21
<b>Figura 3-3.</b> Sistema de extracción Soxhlet (Viresa, 2021).....	22
<b>Figura 3-4.</b> Isómeros del hexano (Malone, 2006). ....	23
<b>Figura 3-5.</b> Estructura química del etanol (Laboratoriumdiscounter, 2023).....	24
<b>Figura 3-6.</b> Gráfico temperatura versus composición de etanol-agua a presión constante (Dortmund Data Bank, 2023). ....	25
<b>Figura 4-1.</b> Montaje experimental de extracción la Soxhlet en triplicado.....	31
<b>Figura 5-1.</b> Rendimiento de extracción obtenido para cada solvente utilizado.....	38
<b>Figura 5-2.</b> Montajes experimentales para mezclas EtOH:Agua (%v/v): <b>(a)</b> 0:100 <b>(b)</b> 30:70 <b>(c)</b> 70:30 <b>(d)</b> 100:0 <b>(e)</b> extracción con n-hexano. ....	40
<b>Figura 5-3.</b> Matraz con lípidos de microalga extraídos mediante n-hexano. ....	41
<b>Figura 5-4.</b> Extractos de <i>N. gaditana</i> : (a) Matraz con etanol puro-lípidos de microalga (izquierda); Matraz con lípidos de microalga extraído con etanol puro (derecha). (b) Matraz con mezcla EtOH:Agua 10:90 (%v/v) y lípidos de microalga (izquierda); Matraz con lípidos de microalga extraído (derecha). ....	42
<b>Figura B-1.</b> Rotavapor R-3 Büchi (Büchi, 2023).....	56

## 1 Introducción

El cambio climático se refiere a cambios a largo plazo de los patrones climáticos. Sus causas pueden ser naturales, como las variaciones del ciclo solar, pero desde el siglo XIX se le atribuye el daño causado a actividades humanas, debido a la quema de combustibles fósiles como petróleo, carbón y gas. Una alternativa es utilizar energías renovables, término común utilizado para describir un espectro de fuentes que se van renovando por sí mismas constantemente. Una de las fuentes de energía renovable más reciente es la bioenergía. Esta se obtiene de la biomasa proveniente de material orgánico de animales y de las plantas. Existen distintos tipos de tecnologías para convertir esta materia en biocombustibles, que son combustibles capaces de reemplazar los combustibles fósiles ayudando a reducir la huella de carbono (Kamran, 2023). La producción de biocombustibles va en alza puesto que podría sustituir la demanda de petróleo para autos, camiones, transportes, sistemas de calefacción y electricidad. Se producen a partir de aceite vegetal o grasa animal, generalmente se utilizan semillas de maravilla o soja debido a su alto contenido lipídico, aproximadamente del 22%. A ello se ha sumado el estudio de las microalgas como potencial candidato para extracción de aceite debido a su alto contenido lipídico y a que su cultivo es ambientalmente sustentable (Pacheco Vila & García Guerrero, 2017).

La presente investigación se refiere a la cantidad de lípidos que se puede extraer de una microalga mediante extracción Soxhlet utilizando diferentes solventes. Los lípidos de la microalga se extraen principalmente para la elaboración de biocombustibles. Esto se realiza mediante diferentes tipos de extracción, como el prensado, la maceración o extracción mediante solventes. La extracción más tradicional es mediante solventes, esto debido a que se tiene como elemento a favor la polaridad de los solventes que permiten extraer ciertos componentes de las microalgas como son los lípidos.

El solvente más común que se utiliza es el *n*-hexano, debido a varias razones, entre ellas, es que es fácil de recuperar debido a su bajo punto de ebullición, es decir, cuando se realiza una extracción con este solvente, al realizar la separación del solvente no se requiere una gran cantidad de energía para que ebulle y se separe de los lípidos. También, debido a que las grasas son solubles en solventes orgánicos. La solubilidad de los lípidos se relaciona con su estructura química, las

grasas se conforman por cadenas de hidrocarburos apolares, el *n*-hexano por su parte posee una polaridad casi nula y los compuestos apolares se disuelven mejor en compuestos apolares, por lo que se utiliza este compuesto como solvente de lípidos (Zhou et al., 2022).

Los principales problemas de utilizar hexano como solvente para extracciones, es que se considera un líquido inflamable de vapores inflamables. Está categorizado según la NCh1411/4 en su rombo de seguridad con nivel 2 como peligroso para la salud humana, nivel 3 en representación de riesgo de incendio (entra en ignición bajo los 37 °C) y nivel 2 para representar un riesgo reactivo donde existe posibilidad de reaccionar violentamente al aumentar la temperatura y presión. También es considerado tóxico para la salud humana, provoca irritación cutánea, irrita vías respiratorias, daña los órganos tras exposiciones largas o repetidas y puede ser mortal en caso de ingestión o penetración en las vías respiratorias. Además, se debe evitar su liberación al medio ambiente y eliminación o vertido al alcantarillado (Instituto Nacional de Normalización, 1998).

Esta es una de las principales razones de interés en realizar este trabajo, puesto que el uso de biocombustibles va en alza, se necesita extraer su materia prima, en este caso los lípidos de la microalga y por ende se requiere estudiar un solvente que no sea tóxico para la salud de los seres vivos, que sea compatible con la vida humana y que sea más amigable con el medio ambiente.

La metodología a utilizar para el estudio de distintos solventes en la extracción será mediante extracción Soxhlet, que es un tipo de extracción por solventes. Como solventes se quiere estudiar el rendimiento de extracción del *n*-hexano como muestra control y punto de comparación que se desea eliminar o reemplazar en el futuro, el rendimiento de extracción del etanol debido a que es más compatible con la salud humana al ser manipulado, del agua y de mezclas etanol-agua porque son solventes más amigables con la salud humana y el medio ambiente, para luego hacer una comparación entre ellos y lograr verificar si es posible reemplazar el *n*-hexano por un nuevo solvente que obtenga un rendimiento igual o mayor al que este ya posee. Como muestra se utilizará una microalga y el equipo principal de extracción será un extractor Soxhlet.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar distintos tipos de solventes para recuperar lípidos que contiene una microalga mediante extracción Soxhlet para producción de biodiésel.

### **2.2 Objetivos específicos**

(1) Determinar el rendimiento de extracción de lípidos de microalga usando como solvente *n*-hexano.

(2) Determinar el rendimiento de extracción de lípidos de microalga usando etanol, agua y mezclas de ellos en diferentes proporciones.

(3) Comparar cualitativamente los extractos obtenidos y el rendimiento de extracción de los solventes obtenidos en (1) y (2)

(4) Determinar y comparar el gasto energético necesario para la separación del solvente de los lípidos de todas las extracciones.

### **3 Marco teórico**

#### **3.1 Biocombustibles**

Los biocombustibles se producen a partir de biomasa, que se categoriza en aceites vegetales, azúcares, harinas, materiales lignocelulósicos y biomasa húmeda. De estas materias primas, el aceite vegetal se puede convertir en biodiésel mediante transesterificación. Del azúcar, harina y material lignocelulósico mediante un proceso de hidrólisis, fermentación y destilación se puede obtener bioetanol y también se pueden obtener hidrocarburos mediante un proceso de pirólisis e hidrogenación de material lignocelulósico (Kamran, 2023).

El principal beneficio del uso de biocombustibles es el bajo impacto ambiental, su uso puede reducir en un 50% las emisiones de gases de efecto invernadero (Pydimalla et al., 2023). Estos combustibles son calificados como buena alternativa para el reemplazo de los combustibles convencionales, debido a que son compatibles con los motores de combustión existentes; además se han producido a partir de fuentes de energías renovables, por lo que su producción es sustentable en el tiempo y durante su combustión las emisiones de CO<sub>2</sub> son nulas (Santamaría & Azqueta, 2015).

Un biocombustible que se puede obtener de aceites vegetales es el biodiésel. El biodiésel es un combustible líquido que se obtiene a partir de aceite vegetal de palma, de soya, de microalga y hasta de aceite usado. Puede ser mezclado con diésel convencional o usarlo puro en un motor sin tener que aplicar alguna modificación (Santamaría & Azqueta, 2015). Este biocombustible tiene propiedades físicas similares al diésel de petróleo, es considerado carbono neutral, es el combustible con menor contenido aromático y posee 10% más de oxígeno que el diésel tradicional, lo que facilita y completa mejor su combustión (Sreeharsha et al., 2023).

El biodiésel se obtiene a través de un proceso llamado transesterificación, que es definido como una reacción química entre dos reactantes; un éster y un alcohol para formar ésteres diferentes. El alcohol con un catalizador, que suele ser hidróxido de sodio o de potasio, se mezcla con grasas y aceites para que se realice la transesterificación. El aceite o grasas se obtienen de aceites reciclados, aceite vegetal, entre otras materias que contengan triglicéridos. Estas materias

primas no son puras, puesto que contienen contaminantes o impurezas, por lo que no sirven para producir directamente biodiésel, estas pueden ser ácidos grasos libres, olores, vapor de agua, esteroides y fósforo, entonces es necesario realizar un pretratamiento a las grasas que se utilizarán, es decir se debe realizar puramente desde lípidos triacilglicéridos. Luego de la transesterificación el biodiésel es lavado y secado. Además, se obtiene un subproducto de la reacción que corresponde a glicerina (Kamran, 2023).

La principal ventaja de las microalgas es que no son una fuente de alimento poblacional, por lo que se minimiza una posible escasez de alimentos debido a que estas se pueden cultivar en agua dulce o agua de mar, es decir, no necesitan tierra fértil para su producción por lo que no compiten con cultivos alimentarios. También poseen alto contenido de lípidos, que es materia prima del biodiésel. Estas son algunas razones por lo que las microalgas tienen un buen potencial como materia prima de calidad para producir biocombustible (Kumar & Pal, 2023).

### **3.2 Microalgas**

Las microalgas se definen como microorganismos eucariontes unicelulares que realizan fotosíntesis y tienen un estilo de vida acuático (Thoré et al., 2023). En general, las microalgas contienen grandes cantidades de proteína, aminoácidos, alto contenido en lípidos y bajo contenido de celulosa. Los lípidos de la microalga se dividen en lípidos de membrana y de almacenamiento, los cuales pueden alcanzar el 50% en peso. Los más abundantes son los triacilglicéridos y el resto son ácidos grasos poliinsaturados. Las microalgas suelen crecer en distintos ambientes y poseen una tasa de crecimiento alta, mayor que la tasa de crecimiento de cultivos agrícolas y de otras plantas acuáticas (Cancela et al., 2019).

Estas se han estudiado con el fin de cultivarlas y obtener cantidades masivas de esta biomasa para así procesarlas y convertirlas en diferentes productos de interés para la industria, por lo que su producción es netamente con un interés económico. Existen diferentes tipos de cepas de microalgas. A continuación, se describen las especies más comunes y de mayor interés económico:

- *Chlorella*: El cultivo de esta microalga está más extendido en el continente asiático. Las especies más utilizadas son la *pyrenoidosa* y la *ellipsoidea*. El producto de esta microalga se vende como polvo o píldoras para aumentar el crecimiento de las bacterias lácticas en el tracto digestivo, también como productora de almidón o como colorante debido a su elevada producción de luteína (Hanan et al., 2022).
- *Spirulina*: Su producción comercial se expande por América del Norte y Asia. Se utiliza principalmente como complemento alimenticio debido a su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales (Lucas et al., 2023). Se utiliza como alimento de peces para acentuar sus colores, también como suplemento alimenticio para niños y adultos, otra aplicación es como medicamento para tratamiento y protección contra cáncer por su contenido de betacaroteno (Lu et al., 2023).
- *Dunaliella*: De estas especies se extrae  $\beta$ -caroteno, glicerol y proteínas. También existe interés comercial bioquímico que incluye enzimas, vitaminas y ácidos grasos (Félix-Castro et al., 2023). Además, esta microalga produce grandes cantidades de glicerol, acumulando hasta un 40% de su peso en base seca (Monte et al., 2020).
- *Scenedesmus*: Actualmente, esta microalga se estudia con fines de biorremediación de aguas. Es capaz de remover metales pesados como el cromo de aguas residuales por lo que es estudiada para uso de biorremediación de aguas industriales y también debido a su alto contenido lipídico se estudia para la producción de biodiésel (Kafil et al., 2022).
- *Phaeodactylum*: Capaz de acumular altos niveles de lípidos, aproximadamente un 34% de su peso en base seca, contiene oleína de palma, ácidos polienólicos y ácido linolénico por lo que se estudia para producción de fórmula infantil (Bhowmick et al., 2023). También se estudian sus efectos antiinflamatorios, antimicrobianos y de control de infecciones bacterianas estomacales, además de estimular el crecimiento probiótico (Zhou et al., 2023).
- *Eustigmatophyceae*: A través de los años esta cepa, en específico la *Nannochloropsis gaditana*, ha ganado interés en forma creciente por su posible explotación para producción de biodiésel debido a que su tasa de crecimiento es rápida y además es una especie que tiende a acumular una gran cantidad de lípidos (Basso et al., 2014). Además, no es una fuente de alimento poblacional, por lo que se minimiza una posible escasez de alimentos debido a que estas se pueden cultivar en agua dulce o agua de mar, es decir, no necesitan tierra fértil para su producción por lo que no compiten con cultivos alimentarios (Kumar & Pal, 2023).

### 3.2.1 Microalga *Nannochloropsis gaditana*

La microalga *Nannochloropsis gaditana* proviene de la cepa *Eustigmatophyceae*, es hermana de la *Nannochloropsis oculata* y de la *Nannochloropsis salina*, pero se diferencia en que, cultivada en las mismas condiciones, la *N. gaditana* es capaz de producir  $\alpha$ -caroteno. La clase algal de la *N. oculata* y la *N. salina* fue establecida por Hibberd y Leedale en 1970. En 1974 se comenzó a cultivar en el Instituto de Investigaciones Pesqueras de Cádiz un organismo aislado de la bahía de Cádiz denominada como cepa B-3, en sus inicios se clasificó como *Nannochloris*, pero después de estudios de su estructura respecto a las *N. oculata* y la *N. salina*, una vez comprobada su cepa como *Eustigmatophyceae*, se propuso designarle como *Nannochloropsis gaditana*, debido a su cuna en Cádiz, España en 1982 (Lubian, 1982).

La *Nannochloropsis gaditana* es una de las especies de alga más utilizada para la producción de biodiésel. Esta microalga posee altos índices de productividad de biomasa, de 300 mg L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> e importante contenido lipídico de hasta un 60% en peso. Esta microalga contiene además importantes cantidades de clorofila, zeaxantina y ácidos grasos (Cancela et al., 2019).

Los criterios clave de la selección de una microalga para la producción de biodiésel es su contenido lipídico, productividad de lípidos, contenido de triacilglicerol en lípidos totales y tener una adecuada composición de ácidos grasos. De estos lípidos, solo el triacilglicerol se puede transesterificar fácilmente en biodiésel. La diferencia de calidad y propiedades del biodiésel se explican en gran medida por su perfil de ácidos grasos, variando las propiedades como viscosidad cinemática, gravedad específica, poder calorífico, entre otras. Por esta razón es importante analizar la composición de la microalga en estudio. A continuación, en la Tabla 3-1, se encuentra la composición general de la microalga *Nannochloropsis gaditana* (Hu et al., 2015):

**Tabla 3-1.** Composición general de la microalga *Nannochloropsis gaditana* (Hu et al., 2015)

Macronutriente	Composición (%p/p)
Lípidos	32,9 - 61,2
Proteínas	13,8 - 33,9
Carbohidratos	14,1 - 18,6

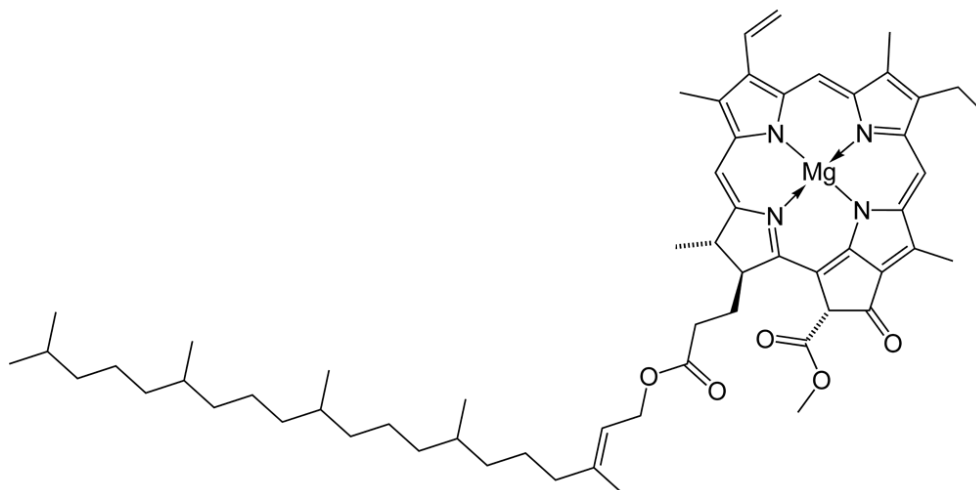
Del componente lipídico, solo el triacilglicerol comprende una parte importante de la proporción de lípidos totales en lípidos neutros y como este tipo de lípidos es el que puede transesterificarse con mayor facilidad, la cantidad de este puede influir en la eficiencia del biodiésel a producir. Los lípidos que se encuentran almacenados en la *N. gaditana*, se dividen principalmente en lípidos neutros, fosfolípidos y glicolípidos, donde los lípidos neutros corresponden a lípidos saponificables neutros, los fosfolípidos corresponden a lípidos saponificables neutros que contienen ácidos grasos y glicerol y los glicolípidos son lípidos saponificables polares del tipo esfingolípidos.

Ahora, dependiendo de la polaridad de los lípidos a extraer es que se debe definir después un solvente adecuado por lo que se define a continuación el perfil lipídico de la *N. gaditana* (Tabla 3-2).

**Tabla 3-2.** Perfil lipídico de la microalga *Nannochloropsis gaditana* (Hu et al., 2015).

Lípido	Rango (%p/p)
Lípidos neutros	50,2 - 83,5
Glicolípidos	11,1 - 19,7
Fosfolípidos	14,3 - 30,2

También es importante, dentro de las características de la microalga *N. gaditana* su contenido de clorofila. Esta microalga contiene solo un tipo de clorofila, llamada clorofila  $\alpha$  (Espinoza-Gallardo et al., 2017). Este componente de la *N. gaditana* es de importancia al momento de realizar extracción de lípidos mediante solventes, debido a la polaridad de esta molécula y al color que posee. Como se puede apreciar en la Figura 3-1, por la izquierda la clorofila  $\alpha$  posee una cola hidrofóbica, también llamada cola de fitol, que va unida a los tilacoides de los cloroplastos, lo que la convierte en una molécula apolar. Por la derecha posee un anillo donde tiene fijado por el medio un ión de magnesio, este anillo se denomina porfirina y es por donde la clorofila absorbe la luz. Por otra parte, clorofila  $\alpha$  tiene un color característico, que corresponde al verde, este debido a que las longitudes de onda que logra reflejar o transmitir varían entre 500 y 600 nm (Nelson, 2009).



**Figura 3-1.** Estructura química de la clorofila  $\alpha$  (Nelson, 2009).

Otro aspecto importante sobre la clorofila contenida en la microalga es su sensibilidad hacia cambios de temperatura. Estudios demuestran que, al someter la clorofila a tratamientos térmicos, esta se degrada, cambiando de color verde brillante a pardo oliva. La clorofilasa es la enzima que cataliza la degradación de la clorofila, cataliza la división del fitol (cola hidrofóbica) de la porfirina (anillo con magnesio), de esta manera, el anillo pierde el ión magnesio, formándose la feofitina que corresponde a un clorofílico. La formación de clorofílicos se produce cuando la enzima se activa por el calor, donde la temperatura óptima para que se active la clorofilasa fluctúa entre 60 °C y 80 °C, de esta manera, cuando la porfirina se convierte en feofitina, es decir, cuando el anillo pierde el ión magnesio y es reemplazado por átomos de hidrógeno, la muestra que contiene clorofila toma un color pardo (Zambrano, 2007).

### 3.3 Tipos de extracción de lípidos de microalgas para producción de biodiésel

Similar a los métodos de extracción de lípidos de otras especies vegetales, los lípidos de las microalgas se pueden extraer de forma química o mecánica. Debido a la rigidez de la pared celular estructural de las microalgas es que se deben aplicar métodos de pretratamiento y extracción apropiados para lograr liberar y obtener los lípidos de las microalgas. Existen diversos tipos de extracción, los más clásicos que se han utilizado por mucho tiempo son la extracción Soxhlet, Folch y Blich-Dyer. Estos tipos de extracción se realizan mediante solventes, son de operación simple y

de bajo presupuesto. Su gran desventaja es el gran consumo de solventes orgánicos que aportan a la contaminación ambiental y que los tiempos de extracción son largos. A medida que ha avanzado el tiempo se han estudiado nuevos tipos de extracción como la extracción de fluidos supercríticos, extracción asistida por ultrasonido y la extracción asistida por microondas. A continuación, se describen los procesos de extracción de lípidos clásicos y nuevos.

### **3.3.1 Métodos clásicos de extracción de lípidos**

#### **Extracción Soxhlet**

Este método de extracción fue propuesto en 1879 por Franz von Soxhlet, químico alemán dedicado a investigación de alimentos. Fue usado originalmente para determinar la cantidad total de lípidos que contenía la leche. Este tipo de extracción es por solventes, donde se coloca en contacto la muestra con el solvente a alta temperatura, repetidas veces y por tiempos prolongados para aumentar el rendimiento de extracción. Los solventes utilizados para este tipo de extracción dependen de la polaridad de lo que se quiere extraer, por lo que esta característica es un factor determinante. Tradicionalmente se utiliza *n*-hexano para extraer compuestos apolares, pero también otros solventes como cloroformo, etanol, acetona y metanol (Zhou et al., 2022).

#### **Extracción Folch**

Esta extracción fue propuesta por Jordi Folch i Pi en 1957, médico y docente español dedicado a investigación de neurociencia. Originalmente, se realizó para extraer lípidos de grasa animal. Este tipo de extracción es por solventes, donde se realiza una maceración con agitación, colocando el solvente en contacto con la muestra a temperatura ambiente, inicialmente se utiliza como solvente una mezcla de cloroformo y metanol para la extracción de lípidos y luego se agrega agua para separar las fases. Este método se puede utilizar para extraer lípidos de muchos tipos de muestras, pero al utilizar solventes tóxicos se vuelve perjudicial para la salud y el medio ambiente (Zhou et al., 2022).

## **Extracción Bligh-Dyer**

Considerada como una variante del método de extracción Folch, la extracción Bligh & Dyer fue propuesta en 1959 para estudiar la descomposición de lípidos del pescado congelado. Al igual que el método Folch, la primera parte de esta extracción es una maceración con agitación de la muestra con una mezcla de cloroformo y metanol, pero en menor cantidad. En una segunda etapa se agrega nuevamente cloroformo y en una tercera fase se agrega agua. Luego, para la separación de fases se realiza filtración y centrifugación, después de separadas las fases de metanol y cloroformo se evapora el cloroformo para extraer los lípidos (Zhou et al., 2022).

### **3.3.2 Métodos innovadores de extracción de lípidos**

#### **Extracción con fluidos supercríticos**

Debido a la toxicidad y daño medioambiental que causan los solventes utilizados en los métodos de extracción tradicionales es que se propuso el método de extracción con fluidos supercríticos. Se llama fluido supercrítico a los fluidos forzados a estar en condiciones de temperatura y presión mayores a sus temperaturas y presiones críticas. En estas condiciones, el fluido adquiere características de líquido y gas lo que lo hace disminuir su viscosidad y aumentar su difusividad relativa, por lo que puede impregnar con mayor facilidad en sólidos y así extraer sus componentes con mayor rapidez. El fluido supercrítico más utilizado es el dióxido de carbono, debido a su bajo punto crítico, su baja toxicidad, su fácil manejo de eliminación luego de la extracción, debido a que no se necesitan métodos de separación como evaporación del solvente, y su bajo costo (Zhou et al., 2022).

#### **Extracción asistida con microondas**

La extracción asistida con microondas se realiza mediante radiación electromagnética, es decir, sin contacto físico y luego mediante una extracción por solventes. En este proceso, las microondas hacen que el calor se transfiera desde el interior hacia el exterior de las células, lo que produce un aumento de la presión, luego de que las células absorban la energía, hasta destruir la

pared celular, de esta manera se pueden extraer los compuestos bioactivos mediante solventes. Como los solventes poseen diferentes polaridades, se debe seleccionar uno en función de lo que se desee extraer de la muestra. Su única desventaja es que no es apto para extracción de compuestos sensibles al calor, debido a que las microondas elevan la temperatura de la muestra (Zhou et al., 2022).

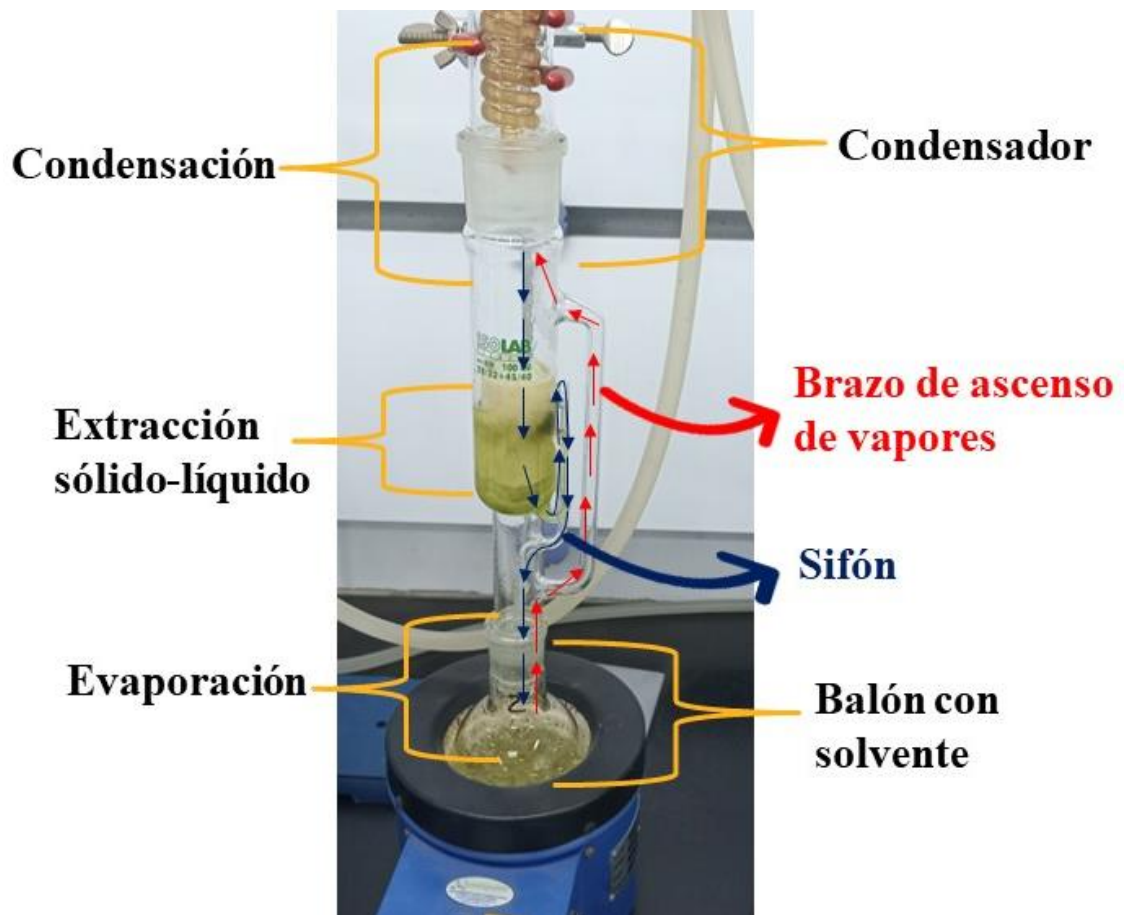
### **Extracción asistida con ultrasonido**

El ultrasonido son ondas mecánicas longitudinales que se propagan a través de un medio, donde su frecuencia no logra ser percibida por la audición humana. El ultrasonido logra penetrar las células de la muestra a través de la cavitación acústica, por lo que se generan burbujas en el solvente y estas estallan al entrar en contacto con las células, lo que provoca una ruptura de la pared celular y así se logra la extracción de los compuestos de interés. Aunque el costo de un equipo ultrasónico no es bajo, esta técnica es ideal para obtener compuestos bioactivos de las muestras debido a que realiza extracciones casi completas obteniéndose rendimientos de extracción altos y además los tiempos de extracción suelen ser cortos (Zhou et al., 2022).

### **3.4 Extracción Soxhlet: extracción por solventes**

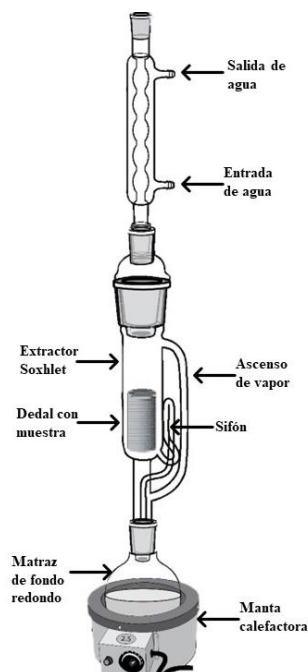
Debido a que se busca probar solventes más amigables con el medio ambiente, además de realizar la extracción de lípidos de las microalgas, es que se prefiere utilizar esta técnica. Este método de extracción surge por primera vez en 1879 y es una técnica que se sigue usando hasta hoy para ser comparada con métodos más recientes debido a su idoneidad. Se utiliza actualmente para varias técnicas de análisis reglamentarias oficiales incluyéndose en normativas de extracción de la *International Organization for Standardization*. Este tipo de extracción funciona mejor para muestras sólidas como polvos secos, pero también se utiliza en compuestos objetivos que posean alta solubilidad y matrices de baja solubilidad en el solvente de extracción, compuestos objetivos con baja presión de vapor respecto al solvente de extracción y para extracción de solventes de baja viscosidad. El principio Soxhlet se basa una extracción de tipo sólido-líquido, donde el sólido corresponde a la muestra que se le quiere retirar lípidos y el líquido corresponde al solvente con el cuál se realizará la extracción de lípidos (López-Bascón-Bascon & Luque de Castro, 2020).

Los fenómenos que ocurren en este proceso se pueden apreciar en la Figura 3-2, evaporación, extracción sólido-líquido y condensación. Primero, el balón con solvente aumenta su temperatura por la acción de una manta calefactora debajo de él. El solvente alcanza su punto de ebullición, por lo que se produce su evaporación. Así, los vapores del solvente ascienden por el brazo, como se indica en la figura con flechas rojas. Estos vapores, al estar en contacto con el condensador que contiene agua como agente refrigerante, se condensan para caer sobre el dedal con muestra como lo indican las flechas azules. Este solvente condensado realiza la extracción de lípidos de la muestra sólida contenida en el dedal mediante transferencia de materia desde la fase sólida a la fase líquida, esto sucede principalmente porque los lípidos que se quieren extraer de la muestra sólida son solubles en el solvente empleado. Entonces, el solvente se carga de lípidos y comienza a aumentar su volumen dentro del extractor debido a la evaporación continua del solvente, donde, por acción de la presión que ejerce el solvente dentro del extractor, cuando el solvente cargado de lípidos dentro del extractor alcanza la altura del sifón se produce una sifonada, haciendo que el solvente baje por el sifón como se muestra con flechas azules en la figura abandonando por completo el extractor. De esta manera se finaliza un ciclo de extracción, retornando todo el solvente con lípidos de vuelta al balón. Se vuelve a calentar el solvente y evaporarse sucesivamente, pero dejando en el balón los lípidos ya extraídos, porque estos poseen un punto de ebullición más alto que el solvente, haciendo que solo se evapore solvente puro y se repita el ciclo. Así, después de cada sifonada se van acumulando los lípidos de la muestra en el balón de fondo agotándola. El solvente carece de color, pero al extraer lípidos se torna levemente de color amarillo, entonces se realizan los ciclos necesarios hasta notar que el solvente dentro del extractor sea incoloro, de esta manera se especula que la muestra ya se agotó de lípidos disponibles para extraer (López-Bascón-Bascon & Luque de Castro, 2020).



**Figura 3-2.** Esquema de explicación fenómenos y funcionamiento del extractor Soxhlet.

Ahora, en la Figura 3-3 muestra el montaje de un sistema de extracción Soxhlet y su funcionamiento. El dedal con muestra sólida se introduce en el extractor. El solvente se introduce en el matraz de fondo redondo, se enciende la manta calefactora ajustándola a la temperatura de ebullición del solvente a utilizar. Los vapores ascienden y se condensan en el tope, así el solvente caliente cae sobre la muestra sólida infiltrándose a través de ella. Cuando la altura de solvente dentro del extractor alcanza la altura del sifón, se produce una sifonada, devolviendo el contenido de solvente del extractor hacia el matraz de fondo redondo nuevamente. Típicamente se utilizan muestras de 10 g en 50-200 mL de solvente, durante largos tiempos de extracción, de 1 a 6 h o durante toda la noche, realizando múltiples ciclos de extracción.



**Figura 3-3.** Sistema de extracción Soxhlet (Viresa, 2021).

### 3.4.1 Polaridad: tipos de solventes y sus características

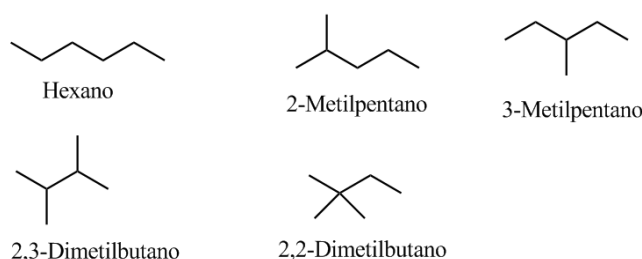
La polaridad es una propiedad que adquieren las moléculas cuando presentan un desbalance de cargas eléctricas. Para determinar la polaridad de una molécula se debe prestar atención a los enlaces polares y su estructura. Esta propiedad la determina el momento dipolar eléctrico del dipolo eléctrico, que corresponde a una suma vectorial de los elementos dipolares de los enlaces de la molécula. Por ende, una molécula que solo posea enlaces apolares, siempre será apolar, debido a que los momentos dipolares son nulos (McMurry, 2008).

Esta propiedad que tienen los solventes toma importancia al momento de realizar una extracción, debido a que, al realizar una disolución, los solventes polares disolverán sustancias polares y los solventes apolares disolverán sustancias apolares, por lo que, si se requiere disolver lípidos de la microalga, los solventes deberán ser apolares (McMurry, 2008).

A continuación, se describen distintos solventes para extracción de lípidos de microalga, entre ellos el hexano como solvente más común y también aquellos que, puros o en mezcla, poseen potencial para extracción de lípidos, tales como el etanol, el agua y mezclas de etanol-agua.

## Hexano

El hexano es uno de los solventes orgánicos más utilizados para disolver lípidos, debido a su nula polaridad y a que su punto de ebullición es bajo (aproximadamente de 68 °C). Es un alcano, que contiene una cadena de seis carbonos. Este compuesto posee cinco isómeros, que se pueden apreciar en la Figura 3-4, donde el solvente que se comercializa es el *n*-hexano. Es un líquido apolar, incoloro, muy inflamable y tiene olor característico de disolvente. Es uno de los pocos alcanos tóxicos que existen, debido principalmente a que reacciona con células nerviosas por lo que se considera neurotóxico, también es mortal en caso de penetración en vías respiratorias, provoca irritación cutánea, puede causar cáncer y puede provocar daños en los órganos tras exposición prolongada o repetida, además, se considera que a largo plazo provoca efectos negativos en el medioambiente, resultando tóxico para organismos acuáticos y terrestres (Instituto Nacional de Normalización, 1998).

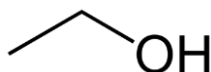


**Figura 3-4.** Isómeros del hexano (Malone, 2006).

## Etanol

El etanol o alcohol etílico es un líquido incoloro, inflamable que posee un punto de ebullición cercano a 78 °C. Es un solvente orgánico, pero no es comúnmente utilizado para la disolución de grasas debido a que su estructura química, que se puede apreciar en la Figura 3-5. Este posee una parte apolar hacia la izquierda, pero es ligeramente polar hacia la derecha en el grupo hidroxilo, puesto que posee un enlace covalente polar entre el oxígeno e hidrógeno (Environmental Protection Agency, 2006). Respecto a información toxicológica, a diferencia del *n*-hexano, la exposición humana al etanol no posee efectos toxicológicos mortales, la mayoría de las pruebas toxicológicas son negativas, excepto la de irritación ocular, que resulta grave. Respecto a información ecológica, resulta tóxico en ciertas concentraciones para la vida acuática, es fácilmente biodegradable y no es bioacumulable, por lo que a la prolongada o repetida exposición no genera daños graves en la vida humana (Millipore, 2021). A pesar de que este solvente posea una parte polar que no atrae lípidos, estudios indican que la parte apolar si es capaz de disolver grasas

(Graziano et al., 2013). Se ha demostrado experimentalmente que el etanol caliente a 90 °C disuelve una mayor cantidad de lípidos en muestras vegetales debido a que aumenta la solubilidad de las grasas (Holser & Akin, 2008).



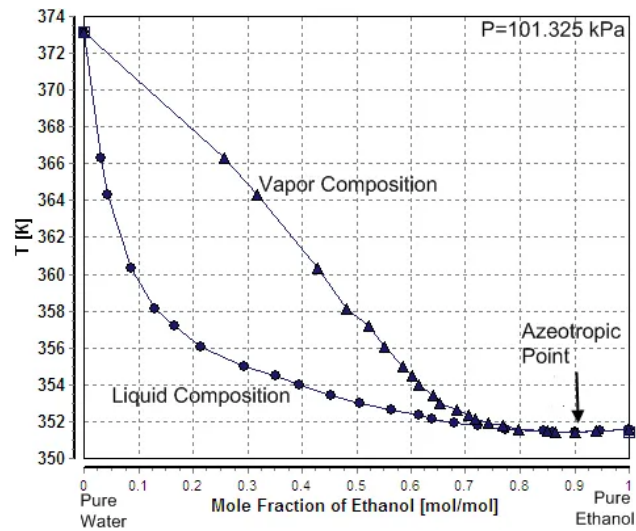
**Figura 3-5.** Estructura química del etanol (Laboratoriumdiscounter, 2023).

### **Agua**

El agua a temperatura y presión ambiental es un líquido incoloro e inodoro. Posee un punto de ebullición de 100 °C en condiciones normales. Es conocido como el solvente universal debido a su polaridad y su gran capacidad para formar puentes de hidrógeno. Disuelve una amplia variedad de moléculas y es participante de diversas reacciones en medio acuoso. El agua posee una alta polaridad, por lo que no interactúa con los lípidos debido a que no se sienten atracción eléctrica, por este motivo el agua no disuelve las grasas, por el contrario, los lípidos se mantienen separados formando capas o gotas sobre el agua (Martin, 2023).

### **Mezclas etanol-agua**

También se pueden formar mezclas a partir de etanol y agua para formar solvente. El etanol al mezclarse con el agua forma una mezcla azeotrópica como se puede notar en la Figura 3-6, cuando la composición en peso de etanol es 96% p/p. Cuando una mezcla se encuentra en estado azeotrópico y se produce transferencia de masa entre fase líquida y gaseosa en un sistema cerrado, implica que las composiciones de la fase líquida y de la fase gaseosa se mantienen constantes. Un sistema azeotrópico muestra un mínimo en el diagrama de temperatura *versus* composición si las desviaciones de la ley de Raoult son positivas y un máximo en el diagrama temperatura *versus* composición si las desviaciones de la ley de Raoult son negativas (Green & Perry, 2008). Es decir, esta mezcla puede ebullicir a una temperatura mayor, menor o igual a la de los componentes puros, donde el líquido permanece con la misma composición durante la ebullición, al igual que el gas, es decir, el gas contiene ambos componentes, por lo que no es posible separarlos completamente por destilación simple. Entonces para las mezclas etanol-agua, al intentar recuperar el etanol de la mezcla, siempre quedará una fracción de agua en ella. Además, las mezclas de etanol y agua poseen distintos puntos de ebullición que se pueden ver en la Tabla 3-3.



**Figura 3-6.** Gráfico temperatura versus composición de etanol-agua a presión constante (Dortmund Data Bank, 2023).

**Tabla 3-3.** Temperatura de ebullición de mezclas etanol-agua en distintas proporciones (Dortmund Data Bank, 2023).

Etanol (%p/p)	Agua (%p/p)	Temperatura de ebullición, °C
0	100	99,9
10	90	91,2
20	80	86,9
30	70	84,5
40	60	82,9
50	50	81,8
60	40	80,9
70	30	80,0
80	20	79,1
90	10	78,4
100	0	78,4

### **3.5 Métodos de recuperación de lípidos de la microalga**

Para establecer un tipo de recuperación de lípidos de microalga, en primer lugar, se debe tener en cuenta los compuestos que se desean separar. Para los solventes que se desean utilizar, cuando la extracción de lípidos es con *n*-hexano, la mezcla se compone de *n*-hexano y lípidos de microalga. Cuando la extracción es solo con etanol, se obtiene una mezcla de etanol y lípidos de microalga. Si la extracción es con agua, se obtiene una mezcla de agua y lípidos de microalga y cuando la extracción se realiza con mezclas etanol-agua, la mezcla que se obtiene contiene etanol, agua y lípidos de microalga. Por estas razones es que se necesita utilizar distintos tipos de separación para recuperar los lípidos de microalga y también los solventes utilizados.

Existen distintos tipos de separación de mezclas. En este caso, las mezclas obtenidas serán líquidas y heterogéneas, es decir, estas se encontrarán en estado líquido y se podrán distinguir a simple vista sus componentes, con los lípidos sobrenadando en el solvente utilizado. La técnica de separación para mezclas heterogéneas, de líquidos inmiscibles entre sí, se realiza mediante diferencia de densidades también llamada decantación. También es posible aplicar destilación o evaporación, dependiendo de la composición del solvente, lo que se quiera recuperar de él y el comportamiento de la muestra que se desea separar.

#### **3.5.1 Decantación**

La decantación de una mezcla inmiscible se lleva a cabo en un embudo de decantación, el cual posee una llave en el fondo. En una mezcla, dependiendo de la naturaleza de sus componentes, el componente más denso reposará en el fondo del embudo mientras que el menos denso sobrenadará. Así, al vaciar el recipiente desde la parte inferior, el componente más denso cae por gravedad cerrando la llave antes de que la siguiente fase logre escapar. A pesar de que la técnica de decantación es la adecuada, si una de las fases de la mezcla está en menor proporción, es probable que no se note una línea de separación bien marcada entre fases, lo que dificulta realizar la separación. Por esta razón se deben utilizar técnicas de recuperación donde se separe la mezcla por la diferencia de puntos de ebullición. Los solventes a utilizar ebullicen entre 68 °C y los 100 °C, mientras que los lípidos de microalga ebullicen sobre los 200 °C, es decir, es posible separar mediante destilación (Tejeda. et al., 2015).

### 3.5.2 Destilación

Ahora, respecto a la destilación, existen dos métodos de destilación. El primero se describe en dos partes, la primera parte es colocar la mezcla líquida que se desea separar en ebullición para generar vapor y la segunda parte es condensar el vapor producido y lograr que este no retorne a la mezcla en ebullición, es decir, sin reflujo, este tipo de destilación se denomina *destilación flash*. El segundo método, se lleva a cabo de la misma manera que el primero, con la única diferencia en que sí existe un retorno del líquido condensado (reflujo) al equipo de destilación, esta última se denomina como destilación continua con reflujo (McCabe et al., 2007).

### 3.5.3 Rotaevaporación

Cuando la mezcla es lípidos, solvente de bajo punto de ebullición y agua, se puede separar el solvente de bajo punto de ebullición mediante rotaevaporación. Esta es una técnica de destilación/evaporación controlada, donde el equipo está conformado por un balón de ebullición que va rotando junto a un condensador en un medio sellado y una bomba de vacío. El proceso consiste en colocar a ebullición en el balón la mezcla que se quiere separar y usar un medio donde se produzca vacío. Esto permite que la mezcla ebullicione a una menor temperatura cuidando sus propiedades organolépticas y también logra arrastrar el vapor de ebullición hacia el condensador. De esta manera, se separa el solvente que es más volátil dejando en el balón de ebullición la muestra/mezcla con mayor punto de ebullición. Este método se podrá utilizar siempre en el caso que estén los lípidos mezclados con un solvente que tenga punto de ebullición hasta los 85 °C a 80 kPa. Para esto aplica el *n*-hexano y el etanol (Büchi, 2023).

Ahora, cuando la mezcla obtenida después de la rotaevaporación es agua con lípidos, debido a que solo se logró rotaevaporar el solvente de bajo punto de ebullición, se debería aplicar otra técnica para separar el agua de los lípidos que se requieren obtener. Para ello se puede utilizar la evaporación directa del agua de la mezcla.

### **3.5.4 Evaporación**

La evaporación es un proceso donde la materia pasa de un estado líquido a gaseoso mediante aplicación de temperatura. El objetivo de esta operación es concentrar una solución en un soluto no volátil y un solvente volátil. En la mayoría de las evaporaciones el solvente es agua y esta se evapora para obtener un licor espeso. Para este caso, el licor serían los lípidos que se quieren separar del agua y este termina siendo el producto de valor de esta operación, mientras que el vapor se condensa y se desecha (McCabe et al., 2007).

## 4 Materiales y métodos

A continuación, se describe el procedimiento experimental para la obtención de datos, junto a materiales y equipos y el diseño experimental. Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Procesos a Alta Presión, de la Universidad Técnica Federico Santa María, campus Santiago - San Joaquín.

### 4.1 Materiales

Para este trabajo, se utilizó como sustrato la microalga *Nannochloropsis gaditana* suministrada por el Centro de Bioinnovación (CBIA) de la Universidad de Antofagasta (Antofagasta, Chile). Este sustrato fue homogenizado en cada experimento, pero se desconoce su composición inicial, por lo que se asume que su composición de lípidos es semejante a la presentada en el marco teórico, es decir entre 30-60% en peso. Esta microalga no se sometió a un pre-tratamiento, por lo que existe la limitación de que no se logren liberar todos los lípidos disponibles.

Para realizar la extracción Soxhlet se utilizaron como solventes *n*-hexano (grado técnico) y etanol anhidro (99%, grado analítico) comprados a Merck (Darmstadt, Alemania) y agua Tipo II (agua pura reducida de contaminantes orgánicos, inorgánicos y coloides para métodos analíticos) suministrada por el Laboratorio de Procesos de la Universidad Técnica Federico Santa María (Santiago, Chile).

Los equipos utilizados para la extracción Soxhlet fueron: un extractor Soxhlet junto a un condensador y un matraz de fondo redondo, todos suministrados por Isolab (Schweitenkirchen, Alemania), junto a una manta calefactora suministrada por Soviquim (Santiago, Chile), realizado bajo una campana marca Biobase (Shandong, China).

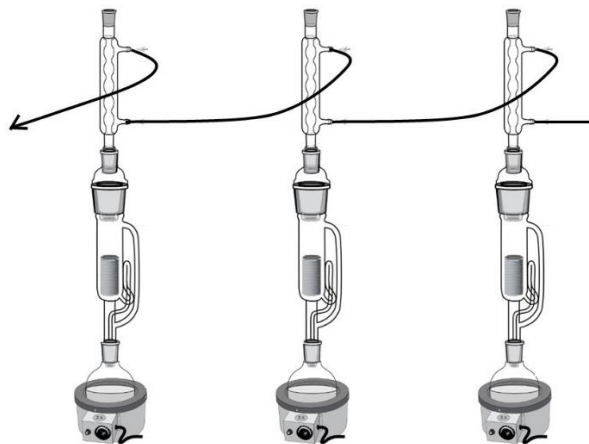
Para realizar la separación de lípidos del solvente el equipo utilizado fue un rotaevaporador tipo R-3 marca Büchi (Flawil, Suiza) junto a una bomba de vacío marca Boeco (Hamburgo, Alemania). El secado de las muestras se llevó a cabo en un horno convectivo de aire forzado modelo ZXFD-A5040 marca Zhicheng Instrument (Shanghái, China).

El detalle del sustrato, solventes, equipos y demás materiales se encuentran en la Tabla A-1 y A-2 del Anexo A.

## **4.2 Procedimiento experimental de extracción Soxhlet**

Primero se masaron un cartucho de celulosa y un matraz de fondo redondo y se reservó cada dato. Se realizaron envoltorios para contener la microalga con papel filtro cortando cuadrados de 10x10 cm y doblándolos en forma de sobre, asegurando las orillas con corchetes. Se masó el envoltorio y se reservó el dato. Luego este envoltorio se colocó dentro del cartucho de celulosa sobre la balanza, se taró y se masó 10 g aproximadamente de microalga. Luego se cerró el envoltorio y se le colocó un tapón de fibra de vidrio para asegurar el envoltorio con microalga dentro del cartucho. Finalmente se masó el conjunto y se reservó el dato.

El sistema de extracción Soxhlet (Figura 4-1) se ensambló sobre un soporte universal usando una pinza de 3 dedos junto con la doble nuez, se ajustó a la pinza el condensador y se unió la entrada y salida del agua del condensador a la red de agua y al alcantarillado respectivamente. Luego se conectó la manta calefactora, se introdujo el matraz de fondo redondo y se encajó el extractor Soxhlet sobre el cuello del matraz. Después se introdujo dentro del extractor Soxhlet el conjunto realizado con el cartucho de celulosa con la microalga contenida en su interior. Se midió 150 mL del solvente a utilizar (*n*-hexano, etanol o mezcla etanol-agua, según experimento) con un vaso precipitado de 250 mL y se agregó dentro del extractor Soxhlet. Se encajó el condensador a la boca superior del extractor Soxhlet. Se abrió sistema de refrigeración del condensador. Luego se encendió la manta calefactora y se ajustó la temperatura a la temperatura de ebullición del solvente utilizado. Se calentó el solvente hasta su punto de ebullición durante 8 h. Cuando finalizó la extracción, se apagó la manta calefactora y se dejó enfriar el sistema. Finalmente se desarmó el equipo extractor Soxhlet, desatornillando la doble nuez para retirar condensador y se reservó cartucho de celulosa en vaso precipitado de 100 mL bajo campana. Luego, se retiró el extractor Soxhlet, el solvente que quedó dentro de él se colocó dentro del matraz de fondo redondo utilizado en la extracción, para así recuperar todo el solvente. Se reservó el matraz de fondo redondo con la muestra.



**Figura 4-1.** Montaje experimental de extracción la Soxhlet en triplicado.

### 4.3 Separación de lípidos de microalga del solvente

Para separar los lípidos del solvente, se aplicó rotaevaporación, utilizando el rotavapor R-3 Büchi (ver Figura B-1, Anexo B). Se llenó el baño calefactor con agua tipo III, luego se ajustó la temperatura de ebullición del solvente para una presión de vacío de 70kPa. Después se ajustó el matraz receptor de solvente. Se montó el matraz de evaporación, (matraz de fondo redondo) que contenía la muestra de lípidos con solvente, al rotavapor sin soltarlo. Se conectó la bomba de vacío y se encendió, luego se cerró la válvula de aislamiento esperando que la bomba de vacío marcara la presión deseada entre 70-80 kPa. Se tomó la palanca, se bajó matraz de evaporación hasta que tocó el baño termorregulado y se encendió el rotor ajustándolo a una velocidad de 3. Cuando terminó de evaporarse y condensarse el solvente, se retiró el matraz del baño termorregulado. Se detuvo el rotor y sujetó el matraz de evaporación por el cuello. Luego se apagó la bomba y se abrió la válvula de aislamiento. Se soltó el matraz de evaporación y se reservó. Se retiró el matraz receptor de solvente y se vació su contenido en un frasco rotulado como solvente recuperado.

Para el solvente *n*-hexano, al final de la extracción y separación del solvente de los lípidos, se realizó un barrido con nitrógeno al matraz con lípidos para eliminar trazas de *n*-hexano que podían contaminar la muestra. Se masó el balón más los lípidos extraídos, luego se le restó la masa del balón seco y se obtuvo la masa de lípidos extraídos. Se reservó el dato.

Para las mezclas de etanol-agua, se realizó una mezcla de 450 mL con el porcentaje requerido de etanol. Para este caso se realizaron 11 mezclas etanol-agua, 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% todas en (% v/v) de etanol. El cálculo de la cantidad de etanol y agua agregado a cada mezcla se encuentra en el Anexo C. Se realizó el procedimiento detallado en el inciso 4.2 *Procedimiento experimental de extracción Soxhlet*, donde el producto obtenido en el matraz de fondo redondo fue una mezcla de etanol, agua y lípidos de microalga. Para el retiro de etanol del matraz de fondo redondo se realizó lo detallado en el inciso 4.3 *Separación de lípidos de microalga del solvente*. Luego, cuando la mezcla tenía agua se debió colocar en horno de convección a 80°C por 24 horas hasta evaporar toda el agua de la mezcla. Luego del retiro de humedad con horno, se dejó enfriar el matraz de fondo redondo que contenía lípidos, se masó y se le restó la masa del balón seco para obtener la masa de lípidos extraídos.

#### **4.4 Determinación de rendimiento de extracción de lípidos, gasto energético y costos**

El extracto obtenido en cada extracción Soxhlet, contenía lípidos de microalga que corresponde a sus lípidos obtenidos y debido a la química de los solventes y a la polaridad de los compuestos de la microalga, se obtuvo clorofila también. Ahora, el rendimiento de extracción corresponde a los componentes solubles que fueron disueltos durante la extracción. Por lo tanto, el rendimiento de la extracción de lípidos de microalga correspondió a lípidos más clorofila y se calculó mediante la Ecuación (4.1) (Pérez Torres & Quishpi Machuca, 2014):

$$\text{Rendimiento de extracción} = \frac{\text{Masa de lípidos + clorofila extraído}}{\text{Masa de microalga seca inicial}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

Ahora, el gasto energético se refiere al consumo de energía que necesita un equipo eléctrico para realizar un proceso determinado en un tiempo determinado. Para cada experimento se utilizó una manta calefactora, rotaevaporador y estufa convectiva, dependiendo de las operaciones necesarias para cada separación de lípidos. Estos se encuentran detallados en la Tabla F-2. Ahora, cada aparato electrónico posee en su placa de fábrica la potencia que consume al ser conectado a una fuente eléctrica. Esta potencia se mide en watts o vatios. El cálculo de consumo energético se determinó multiplicando la potencia del equipo por el tiempo que se utilizó y se expresó en kWh como se muestra en la Ecuación (4.2) (Young & Freedman, 2009):

$$\text{Gasto energético} = \text{potencia} \cdot \text{tiempo} \quad (4.2)$$

Por otra parte, también se determinó una parte del costo de producción de cada experimento con el fin de poder comparar en cierto grado económicamente cada extracción. En este caso en particular se tomaron en cuenta solo los costos de extracción de lípidos de la microalga que están compuestos por el costo del gasto energético y el costo del solvente utilizado en cada experimento. Se excluye el costo de la materia prima, de los equipos y de una posible mano de obra puesto que se tomaron como variables bloqueadas debido a que se consideraron iguales para todos los experimentos. El costo del gasto energético, para facilitar los cálculos, se supuso y asumió una tarifa de baja tensión de tipo 1 (BT1). En la Tabla 4-1 se encuentra el detalle de la tarifa en pesos chilenos según la empresa Enel (Enel, 2023).

**Tabla 4-1.** Tarifa eléctrica tipo BT1(Enel, 2023).

<b>Servicio eléctrico</b>	<b>Precio</b>
Administración del servicio	\$1.047
Transporte de la electricidad	\$4.528
Cargo fondo de estabilización Ley 21.472	\$333
Electricidad consumida (kWh)	\$142

También se tomó en cuenta el precio en pesos chilenos de cada solvente para realizar este cálculo, los cuales se encuentran en la Tabla 4-2. Los valores de etanol (Merck, 2023a) y *n*-hexano (Merck, 2023b) fueron reportados por Merck mientras que el agua Tipo II fue reportado por la empresa Ecompany (Ecompany, 2023), siendo todos los formatos de 1000 mL.

**Tabla 4-2.** Precio de los solventes.

<b>Solvente</b>	<b>Precio por 1000 mL</b>	<b>Precio por mL</b>
Etanol	\$19.360	\$19,36
<i>n</i> -hexano	\$24.320	\$24,32
Agua Tipo II	\$1.400	\$1,4

Así, el costo del gasto energético de cada experimento se determinó mediante la Ecuación (4.3):

$$\text{Costo del gasto energético} = a \cdot b \cdot c \cdot d \cdot \text{gasto energético} \quad (4.3)$$

Donde:

*a*: Precio por administración del servicio, \$ (pesos chilenos)

*b*: Precio del transporte de la electricidad, \$ (pesos chilenos)

*c*: Precio por cargo fondo de estabilización Ley 21.472, \$ (pesos chilenos)

*d*: Precio de la electricidad consumida (kWh), \$ (pesos chilenos)

Mientras que el costo del solvente utilizado se determinó mediante la Ecuación (4.4):

$$\text{Costo del solvente} = (x \cdot \text{mL hexano} + y \cdot \text{mL etanol} + z \cdot \text{mL agua Tipo II}) \quad (4.4)$$

Donde:

*x*: Precio por 1 mL de hexano, \$ (pesos chilenos)

*y*: Precio por 1 mL de etanol, \$ (pesos chilenos)

*z*: Precio por 1 mL de agua Tipo II, \$ (pesos chilenos)

Finalmente, el costo de cada extracción se determinó con la Ecuación (4.5):

$$\text{Costo de la extracción} = \text{costo del gasto energético} + \text{costo del solvente} \quad (4.5)$$

El detalle de todos los costos se encuentra en la Tabla F-3.

#### **4.5 Diseño experimental**

En la Tabla 4-3 se detalla la cantidad de experimentos y solvente que se utilizó para la extracción de lípidos de la *N. gadihana*.

**Tabla 4-3.** Diseño experimental.

<b>Nº experimento</b>	<b>EtOH:Agua (% v/v)</b>
1	0:100
2	10:90
3	20:80
4	30:70
5	40:60
6	50:50
7	60:40
8	70:30
9	80:20
10	90:10
11	100:0
12	<i>n</i> -hexano

## 5. Resultados y discusión

La Tabla 5-1 muestra la cantidad de lípidos recuperado para la extracción con *n*-hexano. En la Tabla 5-2 se presenta el rendimiento de extracción obtenido para cada muestra. Los cálculos realizados para obtener el rendimiento de extracción se encuentran en el Anexo D.

**Tabla 5-1.** Masa de lípidos de microalga recuperados de la extracción con hexano.

Hexano (% v/v)	Lípidos recuperados, g			Promedio, g
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	
100%	1,1030	0,7370	1,1896	1,0099 ± 0,2402

**Tabla 5-2.** Rendimiento de extracción de lípidos de microalga recuperado de la extracción con *n*-hexano.

Hexano (% v/v)	Rendimiento de extracción, %			Promedio, %
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	
100%	11,0	7,2	11,6	9,9 ± 2,4

Respecto a la de extracción de lípidos de microalga utilizando hexano, se logró recuperar  $1,0099 \pm 0,2402$  g en promedio de lípidos de microalga de una muestra de aproximadamente 10 g. El rendimiento de extracción obtenido entre las 3 muestras analizadas fue de  $9,9 \pm 2,4\%$  en promedio. La microalga estudiada contiene al menos un 30% de lípidos, por lo que es el valor de rendimiento de extracción esperado. Teóricamente, el *n*-hexano como solvente completamente apolar, debiese extraer la mayor cantidad de lípidos contenidos en la microalga, pero no se cumplió para ninguna de las 3 extracciones realizadas.

La Tabla 5-3 muestra los rendimientos de extracción de lípidos de microalga con mezclas etanol-agua obtenido para cada muestra. Los cálculos realizados para obtener el rendimiento de extracción de las mezclas etanol-agua se encuentran en el Anexo E.

**Tabla 5-3.** Rendimiento de extracción de lípidos de microalga recuperado de la extracción de mezclas etanol-agua.

EtOH:Agua (% v/v)	Rendimiento de extracción, %			Promedio, %
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	
0:100	7,2	6,3	7,6	7,0 ± 0,7
10:90	2,7	2,6	2,7	2,7 ± 0,1
20:80	2,7	2,9	3,0	2,9 ± 0,2
30:70	3,7	4,0	4,1	3,9 ± 0,2
40:60	5,9	5,8	6,0	5,9 ± 0,1
50:50	8,3	8,2	8,1	8,2 ± 0,1
60:40	10,9	11,0	11,2	11,0 ± 0,2
70:30	29,5	29,7	29,2	29,4 ± 0,3
80:20	29,0	29,1	29,3	29,1 ± 0,1
90:10	29,9	30,2	30,3	30,1 ± 0,2
100:0	27,9	26,4	27,2	27,2 ± 0,7

Como se muestra en la Tabla 5-3, para la mezcla EtOH:Agua 0:100 (%v/v), el rendimiento de extracción de lípidos fue del  $7,0 \pm 0,7\%$  en promedio. De la teoría, se deduce que lo extraído por agua no corresponde a lípidos, debido a que el agua es polar, y por ello no disuelve los lípidos apolares. Se especula que lo extraído son carbohidratos debido a que estas son sustancias hidrofílicas solubles en agua (Hu et al., 2015).

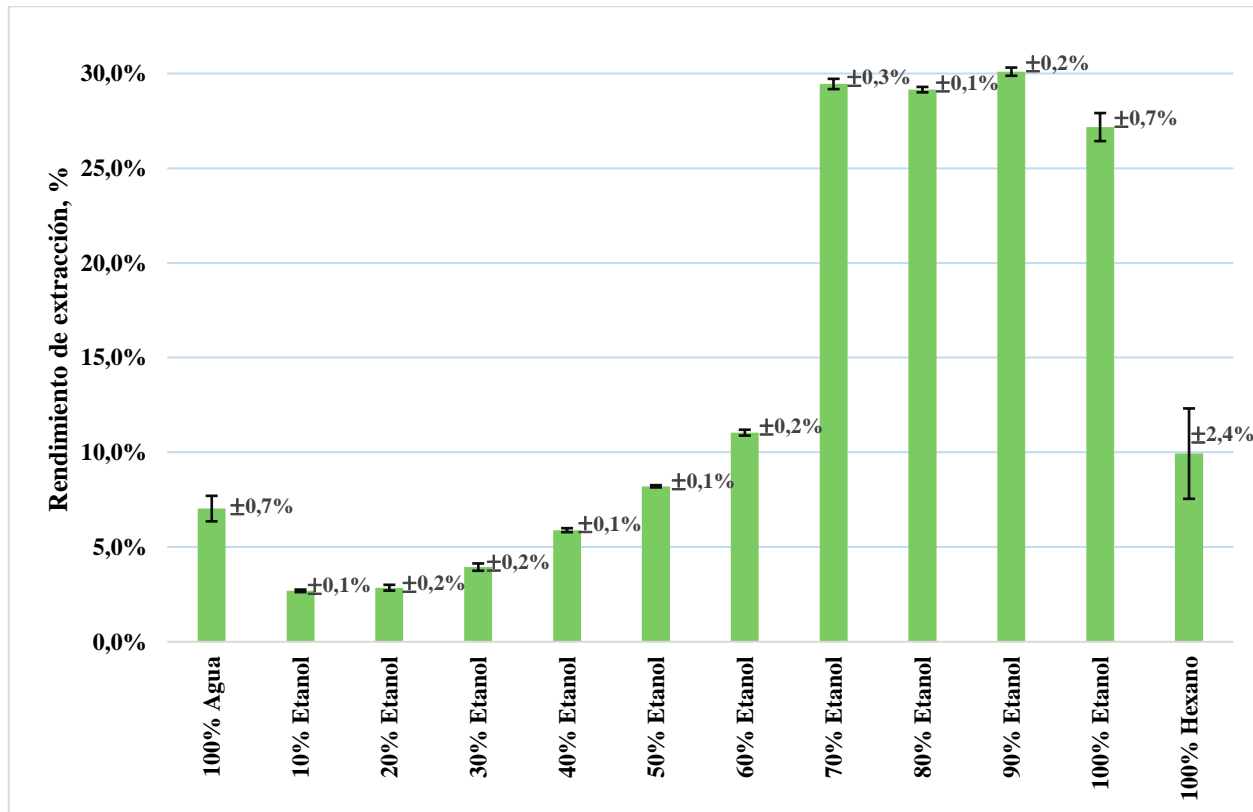
Para el solvente etanol EtOH:Agua 0:100 (%v/v), se obtuvo un rendimiento promedio del  $27,2 \pm 0,7\%$ . Este resultado concuerda con la teoría, puesto que la estructura del etanol es polar y apolar, por lo que se espera que en lo extraído se encuentren lípidos, además, esta cifra concuerda con la cantidad de lípidos que se pueden extraer de la *N. gaditana*.

Para las mezclas EtOH:Agua entre 90:10 y 70:30 (%v/v), se obtuvieron rendimientos de extracción promedio entre  $30,1 \pm 0,2\%$  y  $29,4 \pm 0,3\%$ , respectivamente. Estas mezclas contienen un bajo porcentaje de agua por lo que, teóricamente, deberían tener un rendimiento de extracción

muy parecido al del etanol puro. Efectivamente, su rendimiento de extracción fue muy cercano al del etanol. No se esperaba que estas mezclas triplicaran el rendimiento de extracción del *n*-hexano.

De las mezclas EtOH:Agua entre 60:40 y 10:90 (%v/v), los rendimientos de extracción de lípidos disminuyeron, obteniéndose rendimientos entre  $11,0 \pm 0,2\%$  y  $2,7 \pm 0,1\%$ , respectivamente. Debido a que estas mezclas poseen un mayor porcentaje de agua, se espera que no tengan mayores rendimientos de extracción de lípidos, por la polaridad del solvente.

La Figura 5-1 presenta el detalle de los rendimientos de extracción de lípidos obtenidos, donde cada barra muestra el solvente utilizado y su desviación asociada al promedio.



**Figura 5-1.** Rendimiento de extracción obtenido para cada solvente utilizado.

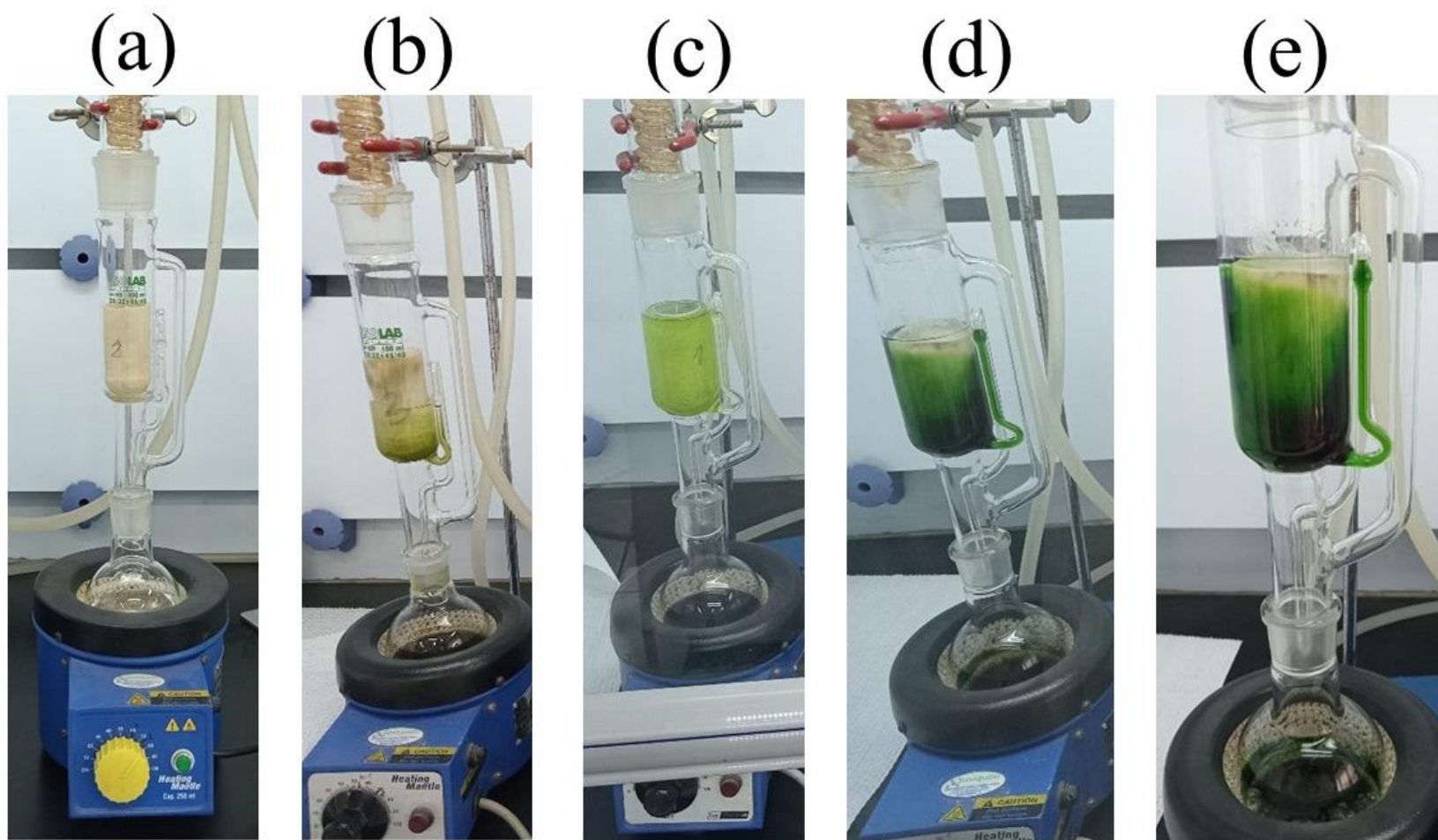
De la Figura 5-1, se puede notar que los rendimientos de extracción de etanol al 100%, 90%, 80% y 70% son mayores a los rendimientos de extracción con menor porcentaje de etanol y mayor que el rendimiento de extracción del *n*-hexano. Las extracciones con mayor porcentaje de

etanol triplicaron el rendimiento de extracción del *n*-hexano. Este resultado no era esperable, sino que se esperaba obtener un mayor rendimiento del *n*-hexano, debido a su momento dipolar neutral y mayor compatibilidad con disolver grasas. Esto también se debe a que se co-extraen compuestos con polaridad no despreciable por la naturaleza de los solventes. Uno de ellos podría ser carbohidratos, debido a su naturaleza hidrofílica.

Ahora, a pesar de que los rendimientos de extracción de lípidos del etanol y mezclas etanol-agua superan el rendimiento de extracción del *n*-hexano, se debe tener en cuenta que, debido a la polaridad de los solventes, es probable que las extracciones con etanol hayan arrastrado más que solo los lípidos de la microalga.

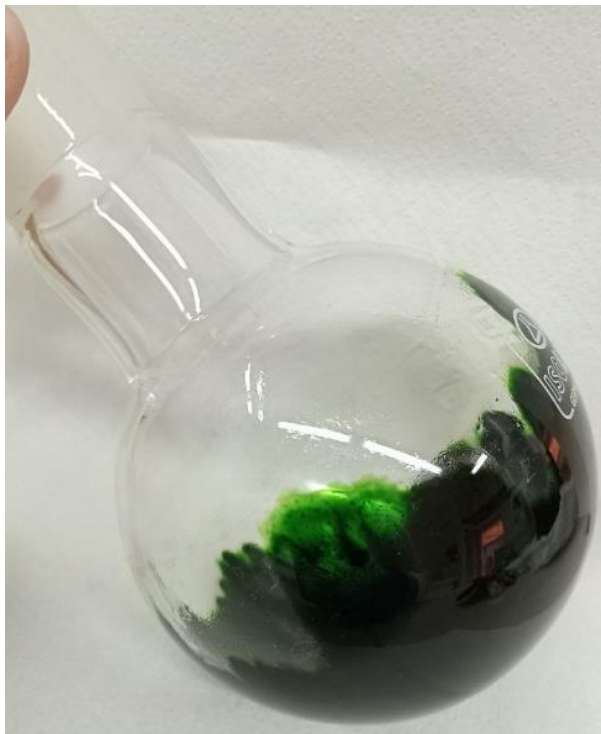
En la Figura 5-2 (a), se muestra el experimento realizado con agua pura, donde se puede notar que el agua pura no extrae clorofila. La ausencia de color verde en el solvente, indica que la clorofila no se disuelve en el agua. Esta situación resulta lógica, puesto que los compuestos clorofílicos son insolubles en agua. La Figura 5-2 (b) corresponde a la extracción de la mezcla EtOH:Agua 30:70 (% v/v), y se puede notar su color verde pardo debido a que esta extracción, al contener etanol, obtuvo clorofila, sin embargo, la temperatura de ebullición de esta mezcla es de 84,5 °C, lo que provoca la activación de la enzima clorofilasa degradando la clorofila y ocasionando que la mezcla se torne de un color pardo.

Por el contrario, de la Figura 5-2 (c), (d) y (e), se tienen las extracciones con mezclas EtOH:Agua 70:30 y 100:0 (% v/v) y *n*-hexano, respectivamente. De ellas, se puede notar que extraen clorofila. La Figura 5-2 (c), muestra un color verde más claro, esto debido a que la mezcla de solvente contiene etanol y agua, con etanol en mayor proporción. Esta mezcla posee un punto de ebullición de 80 °C, esta temperatura es la temperatura máxima de formación de la clorofilasa, pero no logró formarse debido a que la coloración no cambió de verde brillante a verde pardo. La Figura 5-2 (d) y Figura 5-2 (e) muestran extracciones con etanol y *n*-hexano puros, donde se nota la gran cantidad de clorofila que se logró extraer debido a su coloración verde intenso. Se intuye entonces, que los mayores rendimientos de extracción se deben a que además de que los solventes disolvieron lípidos, también arrastraron clorofila.

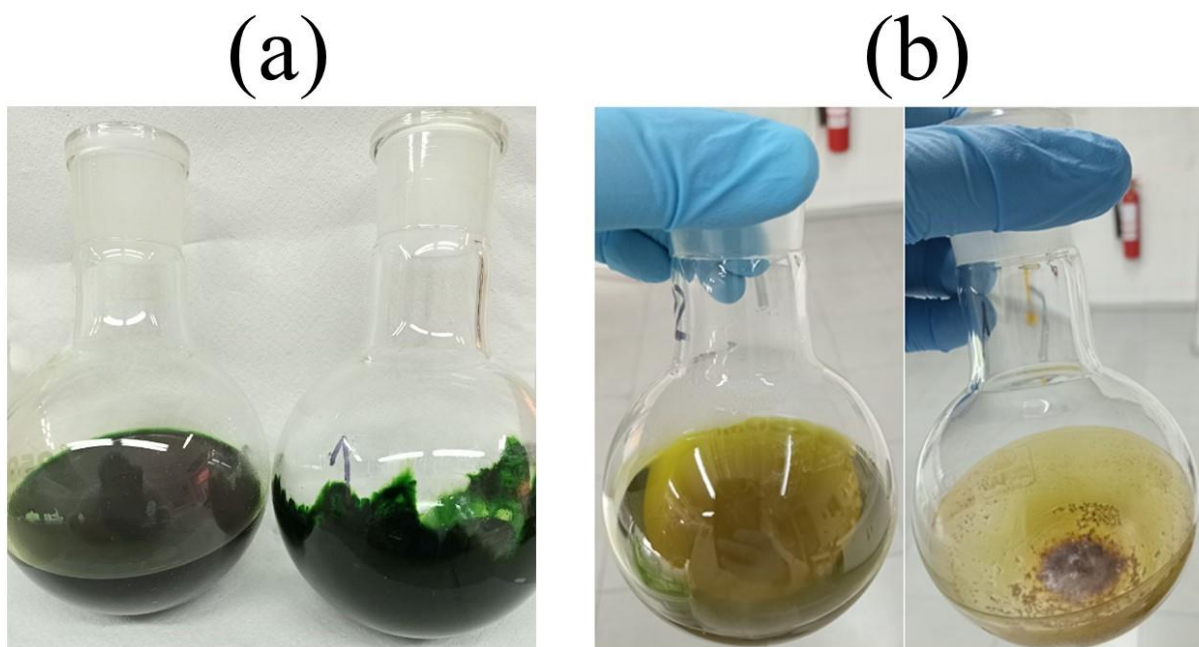


**Figura 5-2.** Montajes experimentales para mezclas EtOH:Agua (%v/v): (a) 0:100 (b) 30:70 (c) 70:30 (d) 100:0 (e) extracción con *n*-hexano.

Respecto a los lípidos obtenidos, como se puede notar en la Figura 5-3, que como solvente utilizó *n*-hexano, se obtuvo una pasta verde oleosa. Esto se atribuye principalmente a que los lípidos extraídos se combinaron con una gran cantidad de clorofila. La Figura 5-4 (a), muestra a la izquierda el matraz con etanol y lípidos de microalga antes de la separación del solvente y a la derecha muestra los lípidos extraídos, que al igual que la extracción con hexano, también tenía consistencia de pasta verde oleosa. En la Figura 5-4 (b), se muestra a la izquierda, el matraz con mezcla EtOH:Agua 10:90 (% v/v) más lípidos de microalga y a la derecha el matraz con lípidos de microalga extraídos. A diferencia de las extracciones con etanol y *n*-hexano, esta muestra no presenta presencia de clorofila, por lo que se deduce que esta no se logró extraer y además tampoco se extrajeron lípidos de microalga, debido a la alta polaridad que posee esta mezcla.



**Figura 5-3.** Matraz con lípidos de microalga extraídos mediante *n*-hexano.



**Figura 5-4.** Extractos de *N. gaditana*: (a) Matraz con etanol puro-lípidos de microalga (izquierda); Matraz con lípidos de microalga extraído con etanol puro (derecha). (b) Matraz con mezcla EtOH:Agua 10:90 (%v/v) y lípidos de microalga (izquierda); Matraz con lípidos de microalga extraído (derecha).

En la Tabla 5-4 se muestra para cada experimento, los equipos eléctricos necesarios para lograr la separación de los solventes de lípidos de microalga. La manta calefactora fue utilizada por 8 h en todos los experimentos, mientras que el uso del rotaevaporador, la bomba de vacío y la estufa convectiva varió entre cada experimento. Los cálculos del consumo energético que se realizó para cada experimento se detallan en el Anexo F.

**Tabla 5-4.** Gasto energético de cada experimento en función del tiempo de uso de cada equipo eléctrico.

N° experimento	Mezcla EtOH:Agua (% v/v)	Gasto energético, kWh
1	0:100	18,0
2	10:90	19,2
3	20:80	19,2
4	30:70	19,2
5	40:60	19,2
6	50:50	19,2
7	60:40	10,8
8	70:30	10,5
9	80:20	10,4
10	90:10	10,4
11	100:0	1,8
12	<i>n</i> -hexano	1,7

Los mayores gastos energéticos fueron obtenidos por las extracciones de mezclas de etanol-agua con menor cantidad de etanol, desde 10:90 a 50:50 (%v/v), resultando un gasto de 19 kWh aproximadamente. Este mayor gasto radica principalmente en que para estos experimentos, además de utilizar la manta calefactora por 8 h, se tuvo que aplicar rotaevaporación para lograr recuperar parte del etanol desde la mezcla con el agua y luego se aplicó calor en una estufa convectiva para eliminar el agua de la muestra y se concentraran solo los lípidos obtenidos.

Las extracciones desde 60:40 a 90:10 (%v/v), que resultaron ser aquellas que presentaron un mayor rendimiento de extracción, tuvieron un gasto energético de 10 kWh aproximadamente. Este resultado es positivo, puesto que además de que estos solventes resultan menos contaminantes que el hexano, también sus usos contemplan un gasto energético medurado.

Respecto al uso de etanol y *n*-hexano puros, su separación de los lípidos son las que utilizan menor cantidad de energía, cercana a 2 kWh. Este resultado se esperaba del *n*-hexano, debido a su bajo punto de ebullición, no se necesita tanta energía para separarlo de los lípidos. De la misma

manera el etanol también posee un punto de ebullición bajo, un poco mayor al del *n*-hexano, lo que favorece su recuperación utilizando menor cantidad de energía. De todas maneras, no se recomienda utilizar *n*-hexano por su alta peligrosidad y tampoco utilizar etanol puro debido a su gran inflamabilidad.

Ahora, en la Tabla 5-5 se presentan los costos de cada solvente, el costo energético y el costo total de cada extracción.

**Tabla 5-5.** Costo total de cada extracción.

N° experimento	EtOH:Agua (% v/v)	Costo solvente	Costo energético	Costo de la extracción
1	0:100	\$ 210	\$ 8.464	\$ 8.674
2	10:90	\$ 479	\$ 8.634	\$ 9.114
3	20:80	\$ 749	\$ 8.634	\$ 9.383
4	30:70	\$ 1.018	\$ 8.634	\$ 9.653
5	40:60	\$ 1.288	\$ 8.634	\$ 9.922
6	50:50	\$ 1.557	\$ 8.634	\$ 10.191
7	60:40	\$ 1.826	\$ 7.442	\$ 9.268
8	70:30	\$ 2.096	\$ 7.399	\$ 9.495
9	80:20	\$ 2.365	\$ 7.385	\$ 9.750
10	90:10	\$ 2.635	\$ 7.385	\$ 10.019
11	100:0	\$ 2.904	\$ 6.164	\$ 9.068
12	<i>n</i> -hexano	\$ 3.648	\$ 6.149	\$ 9.797

El menor costo de extracción se le atribuye al experimento 1 que contiene solo agua. Este a pesar de tener un costo energético alto, el costo del solvente por experimento es el menor. Luego, a medida que aumenta la cantidad de etanol en cada experimento, se va encareciendo el costo del solvente, siendo el hexano el solvente más caro. Por el contrario, el costo energético, a medida que aumenta la cantidad de etanol en las mezclas va disminuyendo, debido a que retirar etanol y hexano tiene un menor gasto energético y por ende un menor costo energético. Ahora, también se calculó el promedio de los costos de extracción, resultando una media de \$9.528 y su desviación estándar

por medio de la función DESVEST.M en Excel resultó \$445, por lo que, no existe una gran dispersión entre cada costo de extracción en los experimentos.

Realizando un resumen de resultados. Se obtuvo 1,01 g de lípidos en promedio para el *n*-hexano, 2,73 g para el etanol y 3,02 g para mezcla EtOH:Agua 90:10 (% v/v). Respecto al rendimiento de extracción de lípidos de la microalga *N. gaditana* mediante *n*-hexano como solvente, este resultó  $9,9 \pm 2,4\%$  en promedio de una muestra de 10 g en triplicado. Para las mezclas EtOH:Agua 100:0, 70:30, 80:20 y 90:10 (%v/v) se obtuvieron rendimientos de extracción de  $27,2 \pm 0,7\%$ ,  $29,4 \pm 20,3\%$ ,  $29,1 \pm 0,1\%$  y  $30,1 \pm 0,2\%$ , respectivamente, siendo estos los mayores rendimientos de extracción obtenidos.

De las mezclas etanol-agua, desde 10% etanol hasta 50% etanol se obtuvieron extractos sin contenido de clorofila ni lípidos debido a la polaridad incompatible con los lípidos. Para las mezclas EtOH:Agua de 60:40 a 90:10 (%v/v) se logra extraer lípidos y clorofila de la microalga. Para las mezclas EtOH:Agua de 70:30 a 90:10 (%v/v) son las mezclas que logran un mayor rendimiento de extracción de lípidos, cercano al 30%, resultando mayor que el rendimiento de extracción del *n*-hexano y el etanol puro.

Sobre el gasto energético necesario para la separación del solvente de cada experimento, resultó 19,2 kWh para las extracciones con mezclas EtOH:Agua de 10:90 a 50:50 (%v/v), el agua pura obtuvo un gasto de 18 kWh, para mezclas EtOH:Agua 60:40 a 90:10 (%v/v) un gasto de 10 kWh aproximadamente y el etanol y *n*-hexano puros un gasto energético aproximado de 2 kWh. De la comparación de los gastos energéticos, las extracciones con mezclas EtOH:Agua 60:40 a 90:10 (%v/v), tienen un gasto energético medido y que además son las mezclas que tienen el mayor rendimiento de extracción.

Respecto a los costos, debido al promedio y la desviación estándar obtenida, no existe una gran dispersión entre cada costo de extracción en los experimentos.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

Se concluye principalmente que, de los solventes evaluados, los mejores son mezclas etanol-agua con más del 50% en peso de etanol. Esto debido a que los mayores rendimientos de extracción se obtienen de estas mezclas. Sin embargo, este resultado no es totalmente concluyente debido a que no fue posible demostrar que lo extraído fuesen 100% lípidos.

Se logró evaluar distintos solventes, como *n*-hexano, etanol anhidro, agua y mezclas de etanol-agua. Mediante estos, se logró la recuperación de lípidos de la microalga *Nannochloropsis gaditana* con extracción Soxhlet, pero se deduce de los datos obtenidos que no se extrajeron todos los lípidos contenidos en ella, esto debido a que se desconoce, en primer lugar, la composición inicial de la microalga tratada como sustrato y se supuso su composición de lípidos desde la literatura. Tampoco se logró determinar exactamente la cantidad de lípidos recuperada, debido a que no se realizó un análisis de composición a las muestras finales, por lo que se puede concluir que se recuperaron lípidos y otros componentes de la microalga.

Respecto al rendimiento de extracción de lípidos con *n*-hexano, se esperaba obtener con este solvente el mayor rendimiento, debido a su ventaja de interacción con los lípidos, pero de este se obtuvo un tercio del rendimiento mínimo esperado. Respecto al rendimiento de extracción del agua, no se esperaba extracción de lípidos y del resultado de ella, con una inspección visual tampoco existe una evidencia concreta de que lo extraído fuesen lípidos. Por el contrario, de las extracciones realizadas con mayores concentraciones de etanol se obtuvieron los mayores rendimientos. De estos resultados se concluye que las extracciones con mayor concentración de etanol poseen un mayor rendimiento de extracción, sin embargo, al igual que con la extracción con *n*-hexano, no es posible concluir exactamente que se extrajeron lípidos y solo lípidos.

De la comparación cualitativa de los extractos obtenidos del *n*-hexano, etanol, agua y las mezclas de etanol-agua, se concluye que la extracción con agua pura no extrae clorofila, debido a que el solvente no se torna color verde brillante y la clorofila es insoluble en agua, además que tampoco extrae lípidos debido a su alta polaridad. El etanol extrae lípidos y también clorofila debido al aspecto grasoso del extracto obtenido. Del *n*-hexano se obtuvo un extracto similar al del

etanol, verde brillante debido a la clorofila que extrajo. De las mezclas etanol-agua, desde 10% etanol hasta 50% etanol se obtuvieron extractos sin contenido de clorofila ni lípidos debido a la polaridad incompatible con los lípidos. Para las mezclas EtOH:Agua de 60:40 a 90:10 (%v/v) se logra extraer lípidos y clorofila de la microalga. Para las mezclas EtOH:Agua de 70:30 a 90:10 (%v/v) son las mezclas que logran un mayor rendimiento de extracción de lípidos, resultando mayor que el rendimiento de extracción del *n*-hexano y el etanol puro.

Finalmente, del gasto energético y de los costos, se consideró que las extracciones con mezclas EtOH:Agua 60:40 a 90:10 (%v/v), al tener un gasto energético medido y que además son las mezclas que tienen el mayor rendimiento de extracción, son una buena opción como solventes para extracción. A pesar de que el gasto energético de la separación de etanol y *n*-hexano puro sean menores, no se recomienda el uso de estos debido a su peligrosidad e inflamabilidad. Respecto a los costos, se concluye que las diferencias entre experimentos no son significativas, por lo que no son un factor decisivo al determinar cuál es un mejor solvente debido a su costo económico.

Respecto a las recomendaciones, debido a las limitaciones del método de extracción Soxhlet, se sugiere realizar una caracterización completa de la microalga que se utilizará como sustrato, es decir, determinar su cantidad de lípidos, carbohidratos, proteínas, entre otros, para así determinar al final cuántos de esos lípidos se lograron extraer y si es que quedaron otros que no se lograron liberar. Seguido a ello, si es que no se han liberado los lípidos de la microalga al principio del experimento, se recomienda realizar un pretratamiento de esta para asegurar que esta libere su mayor cantidad de lípidos al momento de la extracción.

Además, si se quiere proseguir con este trabajo, se recomienda guardar y etiquetar los extractos obtenidos en cada experimento y se les apliquen análisis como cromatografía de gases para determinar la cantidad exacta de lípidos que contienen, puesto que se especula que las extracciones se vieron afectadas por la gran cantidad de clorofila, carbohidratos entre otros, que extraen también los solventes utilizados y esto resulta perjudicial para la producción posterior de biodiésel a partir de estos extractos.

También, debido a los gastos energéticos obtenidos, el gasto energético es mayor para las mezclas etanol-agua que resultan ser las ideales debido a su alto rendimiento de extracción y su menor peligrosidad, pero pierden idealidad al utilizar más energía para la separación de sus componentes, puesto que la producción de energía eléctrica también se basa en combustibles no renovables y su huella de carbono es importante. Por ello se recomienda seguir evaluando el uso de mezclas etanol-agua para la extracción de lípidos de microalga, debido a que, a pesar de que el uso de estos solventes sí sea más seguro para la salud humana y el medio ambiente, gastan una mayor cantidad de energía eléctrica para su separación y se desconoce la contaminación al medio ambiente que produce la producción de ese suministro eléctrico.

## 7. Referencias

- Basso, S., Simionato, D., Gerotto, C., Segalla, A., Giacometti, G. M., & Morosinotto, T. (2014). Characterization of the photosynthetic apparatus of the Eustigmatophycean *Nannochloropsis gaditana*: Evidence of convergent evolution in the supramolecular organization of photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1837*(2), 306–314. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2013.11.019>
- Bhowmick, G., Guieysse, B., Everett, D. W., Reis, M. G., & Thum, C. (2023). Novel source of microalgal lipids for infant formula. *Trends in Food Science & Technology*, *135*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2023.03.012>
- Boeco. (2023). *Boeco Bomba de vacío R-300*. Boeco Germany. <https://www.boeco.com/vacuum-pumps/boeco-vacuum-pump-r-300&sk=90>
- Büchi. (2023). *Manual de instrucciones Rotavapor® R-3: Vol. C*. Büchi Labortechnik .
- Cancela, A., Pérez, L., Febrero, A., Sánchez, A., Salgueiro, J. L., & Ortiz, L. (2019). Exploitation of *Nannochloropsis gaditana* biomass for biodiesel and pellet production. *Renewable Energy*, *133*, 725–730. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2018.10.075>
- Dortmund Data Bank. (2023). *Vapor-Liquid Equilibrium Mixture of Ethanol and Water*. Dortmund Data Bank. <http://www.ddbst.com/ddb.html>
- Ecompany. (2023, August). *Agua bidestilada*. <https://ecompany.cl/tienda/agua-bidestilada-bidon-5-lts/>
- Enel. (2023, August). *Tarifa BT1 Enel*. <https://www.enel.cl/es/clientes/tarifas-y-regulacion/tarifas.html>
- Environmental Protection Agency. (2006, April 27). *Inert Reassessment Document for Ethyl Alcohol - CAS No. 64-17-5*. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-04/documents/ethyl.pdf>
- Espinoza-Gallardo, D., Contreras-Porcía, L., & Ehrenfeld, N. (2017).  $\beta$ -glucanos, su producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (Ochrophyta, Eustigmatales). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, *52*(1), 33–49. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572017000100003>
- Félix-Castro, M. B., Arredondo-Vega, B. O., Rojas, M., & Gómez-Anduro, G. A. (2023). Synthesis of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella*: From genome analysis to metabolic engineering. *Algal Research*,

- 72, 103135. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2023.103135>
- Graziano, M. U., Graziano, K. U., Pinto, F. M. G., Bruna, C. Q. de M., Souza, R. Q. de, & Lascala, C. A. (2013). Effectiveness of disinfection with alcohol 70% (w/v) of contaminated surfaces not previously cleaned. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 21(2), 618–623. <https://doi.org/10.1590/S0104-11692013000200020>
- Green, D., & Perry, R. (2008). *Perry's Chemical Engineers Handbook* (McGraw- Hill, Ed.; 8th ed.).
- Gutiérrez-Avella, D. M., & Guardado-Pérez, J. A. (2010). Formas de expresar la composición química en el SI. *Educación Química*, 21(1), 47–52. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(18\)30072-7](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(18)30072-7)
- Hanan, M. Y., Yahya, A., Jaafar, M. Z., & Amatul-Samahah, M. A. (2022). A dataset representing the identification of three microalgae species isolated from freshwater areas at Glami Lemi River, Malaysia. *Data in Brief*, 45, 108761. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2022.108761>
- Holser, R. A., & Akin, D. E. (2008). Extraction of lipids from flax processing waste using hot ethanol. *Industrial Crops and Products*, 27(3), 236–240. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2007.09.002>
- Hu, Q., Xiang, W., Dai, S., Li, T., Yang, F., Jia, Q., Wang, G., & Wu, H. (2015). The influence of cultivation period on growth and biodiesel properties of microalga *Nannochloropsis gaditana* 1049. *Bioresource Technology*, 192, 157–164. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.04.106>
- Instituto Nacional de Normalización. (1998). *Sustancias peligrosas - Terminología y clasificación general* (NCh382.Of98). [https://miros.cl/wp-content/uploads/2020/01/NCh\\_382\\_1998\\_Sustancias\\_Peligrosas\\_Clasificaci%C3%B3n.pdf](https://miros.cl/wp-content/uploads/2020/01/NCh_382_1998_Sustancias_Peligrosas_Clasificaci%C3%B3n.pdf)
- Kafil, M., Berninger, F., Koutra, E., & Kornaros, M. (2022). Utilization of the microalga *Scenedesmus quadricauda* for hexavalent chromium bioremediation and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 346, 126665. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126665>
- Kamran, M. (2023). Energy sources and technologies. *Fundamentals of Smart Grid Systems*, 23–69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99560-3.00010-7>
- Kumar, S., & Pal, A. (2023). Life cycle analysis of biodiesel derived from fresh water microalgae and Karanja. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 56, 103082. <https://doi.org/10.1016/J.SETA.2023.103082>

- Laboratoriumdiscounter. (2023). *Etanol*  $\geq 99,8\%$ , *desnaturalizado*.  
<https://www.laboratoriumdiscounter.nl/es/etanol-998-desnaturalizado-104485077.html>
- López-Bascón-Bascon, M. A., & Luque de Castro, M. D. (2020). Soxhlet Extraction. *Liquid-Phase Extraction*, 327–354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00011-6>
- Lu, Y., Chen, Z., Lin, Q., Xia, X., Lin, Y., Yan, J., Huang, M., & Huang, R. (2023). Anti-colon cancer effects of Spirulina polysaccharide and its mechanism based on 3D models. *International Journal of Biological Macromolecules*, 228, 559–569. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2022.12.244>
- Lubian, L. M. (1982). *Nannochloropsis gaditana sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina*. 287–293. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=905978&orden=1&info=link>
- Lucas, B. F., Alberto Vieira Costa, J., & Brunner, T. A. (2023). Attitudes of consumers toward Spirulina and açai and their use as a food ingredient. *LWT*, 178, 114600. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114600>
- Malone, L. J. (2006). *Introducción a la Química*. Limusa.
- Martin, J. D. (2023). Water under the influence of solutes: On the non-innocence of a universal solvent. *Matter*, 6(5), 1316–1319. <https://doi.org/10.1016/J.MATT.2023.03.020>
- McCabe, W. L., Smith, J. C., & Harriot, P. (2007). *Operaciones unitarias en ingeniería química* (7th ed.). McGraw-Hill.
- McMurry, J. (2008). *Química Orgánica* (S. Cervantes, Ed.; 7th ed.). Cengage Learning. <https://fcen.uncuyo.edu.ar/catedras/john-mcmurry-quimica-organica-2008-cengage-learning.pdf>
- Medilc. (2023). *Manta calefactora 250 ml, modelo 98-IB-250*. <https://www.meldic.cl/area-laboratorio/mantas-calefactoras/microscopio-digital-da1-180m-148-389-400-502-517-521-640-detail.html>
- Merck. (2023a, August). *Etanol absoluto*. [https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Ethanol-absolute,MDA\\_CHEM-107017#anchor\\_orderingcomp](https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/Ethanol-absolute,MDA_CHEM-107017#anchor_orderingcomp)
- Merck. (2023b, August). *n-hexano para análisis*. [https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/n-Hexane,MDA\\_CHEM-107023#anchor\\_orderingcomp](https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/n-Hexane,MDA_CHEM-107023#anchor_orderingcomp)
- Millipore. (2021). *Safety Data Sheet or SDS for Etanol 100983* .

- [https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/msds/MDA\\_CHEM-100983?Origin=PDP](https://www.merckmillipore.com/CL/es/product/msds/MDA_CHEM-100983?Origin=PDP)
- Monte, J., Ribeiro, C., Parreira, C., Costa, L., Brive, L., Casal, S., Brazinha, C., & Crespo, J. G. (2020). Biorefinery of *Dunaliella salina*: Sustainable recovery of carotenoids, polar lipids and glycerol. *Bioresource Technology*, 297, 122509. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.122509>
- Nelson, D. L. (2009). *Lehninger. Principios de la bioquímica* (5th ed., Vol. 1). Omega.
- Pacheco Vila, A. D., & García Guerrero, F. (2017). *Extracción de aceite de biomasa microalgal*. <http://hdl.handle.net/20.500.11777/3431>
- Pérez Torres, M. J., & Quishpi Machuca, J. A. (2014). *Evaluación cuantitativa de la producción de biodiésel de microalgas de lagunas de tratamiento de agua residual* [Tesis]. Universidad de Cuenca.
- Pydimalla, M., Husaini, S., Kadire, A., & Kumar Verma, R. (2023). Sustainable biodiesel: A comprehensive review on feedstock, production methods, applications, challenges and opportunities. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2023.03.593>
- Santamaría, M., & Azqueta, D. (2015). Promoting biofuels use in Spain: A cost-benefit analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 1415–1424. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2015.04.192>
- Sreeharsha, R. V., Dubey, N., & Mohan, S. V. (2023). Orienting biodiesel production towards sustainability and circularity by tailoring the feedstock and processes. *Journal of Cleaner Production*, 414, 137526. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2023.137526>
- Thoré, E. S. J., Muylaert, K., Bertram, M. G., & Brodin, T. (2023). Microalgae. *Current Biology*, 33(3), R91–R95. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2022.12.032>
- Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ingeniería. Centro de Estudios y Educación Continua., L., Henao-Argumedo, D., Alvear-Alayón, M., & Castillo-Saldarriaga, C. R. (2015). Revista FI-UPTC : publicación del Centro de Estudios y Educación Continua de la Facultad de Ingeniería, CEDEC. In *Revista Facultad de Ingeniería* (Vol. 24, Issue 39). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-11292015000200005&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-11292015000200005&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Viresa. (2021, November 1). *Determinación de grasas en alimentos método Soxhlet y Goldfish*. [https://viresa.com.mx/blog\\_determinacion\\_grasas\\_soxhlet\\_goldfish](https://viresa.com.mx/blog_determinacion_grasas_soxhlet_goldfish)

- Young, H. D., & Freedman, R. A. (2009). Física Universitaria. In *Sears- Zemansky* (12th ed., Vol. 1, pp. 199–200). Pearson Educación.
- Zambrano, L. E. (2007). *Incidencia de la temperatura de concentración en la degradación de clorofila en pulpa de kiwi* [Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3401/3/PAL154.pdf>
- Zhicheng. (2023). *Zhicheng ZXFD-A5040 Vertical Airflow Forced-air Drying Ovens*. <http://www.zhichenginstrument.com/zhichenginstrumentcom/products03.htm>
- Zhou, J., Wang, M., Bäuerl, C., Cortés-Macías, E., Calvo-Lerma, J., Carmen Collado, M., & Barba, F. J. (2023). The impact of liquid-pressurized extracts of *Spirulina*, *Chlorella* and *Phaedactylum tricornutum* on in vitro antioxidant, antiinflammatory and bacterial growth effects and gut microbiota modulation. *Food Chemistry*, *401*, 134083. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.134083>
- Zhou, J., Wang, M., Saraiva, J. A., Martins, A. P., Pinto, C. A., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Cao, H., Xiao, J., & Barba, F. J. (2022). Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches. *Food Chemistry*, *384*, 132236. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132236>

## 8. Anexos

### Anexo A: Tabla de materiales y equipos

A continuación, en la Tabla A-1, se describen el sustrato, solventes y equipos utilizados para realizar la experimentación junto a su marca, cantidad y descripción.

**Tabla A-1.** Lista de sustrato, solventes y equipos utilizados para la experimentación.

Ítem	Marca	Cantidad	Descripción
Microalga	-	30 g	<i>Nannochloropsis gaditana</i>
Hexano	Merck Germany	450 mL	<i>n</i> -hexano, hexano técnico
Etanol	Merck Germany	450 mL	Alcohol etílico absoluto, alcohol anhidro
Agua tipo III	-	5 L	-
Agua tipo II	-	500 mL	-
Campana de extracción	Biobase	1 unidad	Fume Hood, FH 1500
Extractor Soxhlet	Isolab Germany	3 unidades	100 mL 29/32+45/40
Condensador	Isolab Germany	3 unidades	250 mm 45/40+none
Rotaevaporador	Büchi	1 unidad	Rotavapor R-3
Bomba de vacío	Boeco Germany	1 unidad	Bomba de vacío R-300, 220v, 50/60 Hz
Estufa	Zhicheng Instrument	1 unidad	Horno convectivo de aire forzado modelo ZXFD-A5040
Desecador	-	1 unidad	-
Balanza analítica	Radwag	1 unidad	AS 82/220.R2 PLUS
Manta calefactora	Soviquim	3 unidades	Capacidad 250 mL

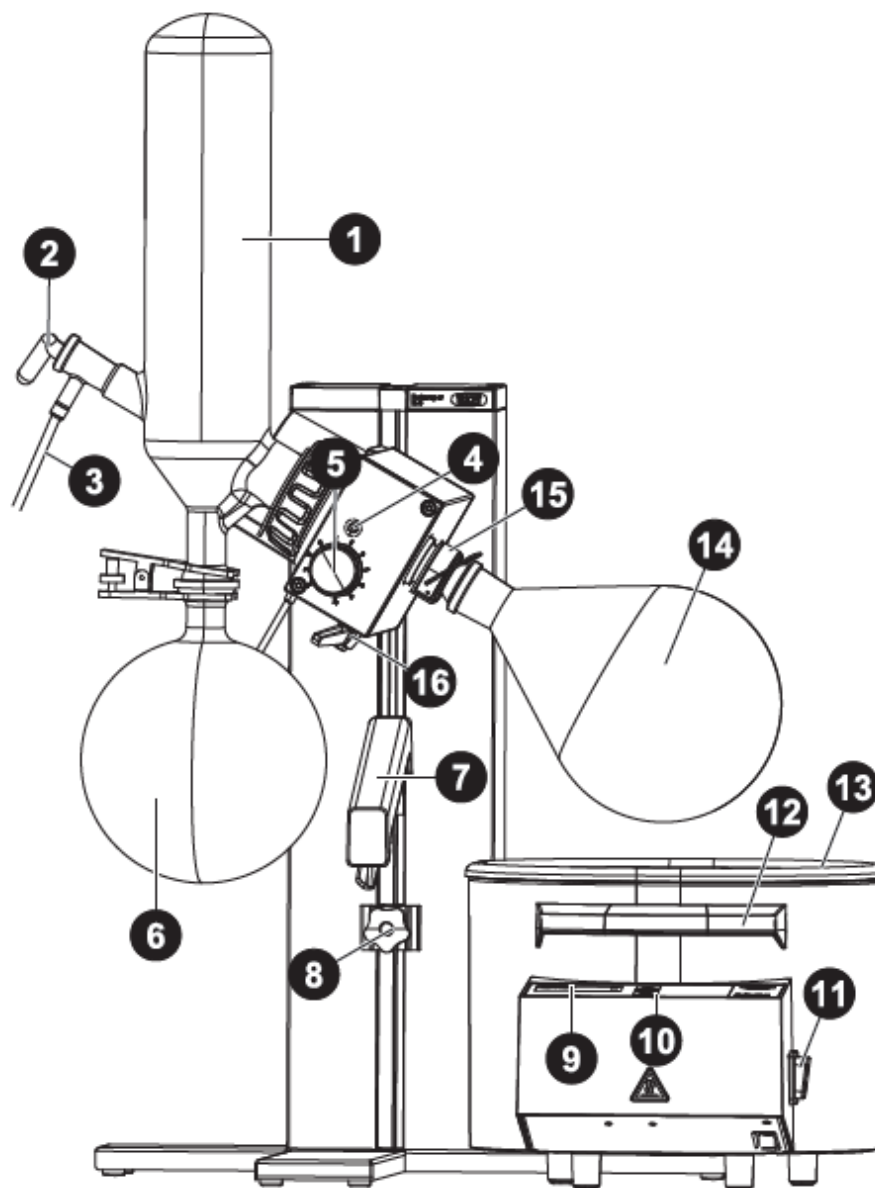
Ahora, en la Tabla A-2, se describen los instrumentos y materiales utilizados en la experimentación con su respectiva marca, cantidad y descripción de cada uno.

**Tabla A-2.** Instrumentos y materiales utilizados en la experimentación.

<b>Ítem</b>	<b>Marca</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Descripción</b>
Matraz de fondo redondo	Isolab Germany	3 unidades	250 mL NS 29/32
Lana de vidrio	Merck Germany	3 tapones	Diámetro fibra 15-25 $\mu\text{m}$
Soporte universal	-	3 unidades	-
Pinza de 3 dedos	-	3 unidades	-
Doble nuez	-	3 unidades	-
Vasos precipitados	Boeco Germany	4 unidades, uno de cada uno	Boro 3.3, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL
Frasco de vidrio con tapa	Boeco Germany	2 unidades	Boro 3.3, 500 mL
Cucharas	-	1 unidad	-
Tijera	-	1 unidad	-
Cartucho de celulosa	Filtres Prat Dumas	3 unidades	33/38x80mm
Probeta	Duran	1 unidad	500 mL

## Anexo B: Descripción del rotavapor utilizado para la separación de lípidos y solventes

A continuación, en la Figura B-1 se muestran las partes del Rotavapor R-3 Büchi (Flawil, Suiza) utilizado en este trabajo.



**Figura B-1.** Rotavapor R-3 Büchi (Büchi, 2023).

En la Tabla B-1, se describen las partes del Rotavapor R-3 Büchi (Flawil, Suiza) presentado en la Figura B-1.

**Tabla B-1.** Descripción de las partes del Rotavapor R-3 (Büchi, 2023).

<b>Número</b>	<b>Descripción</b>
1	Condensador, sistema de refrigeración
2	Llave de vidrio para control de vacío el sistema
3	Tubo de alimentación continuada del matraz de evaporación con disolvente
4	Tecla de bloqueo de unidad de accionamiento de rotación
5	Perilla de velocidad de rotación del matraz de evaporación
6	Receptor de disolvente condensado
7	Elevador para subir y bajar matraz de evaporación
8	Tope de parada vertical
9	Indicador de temperatura baño calefactor
10	Botones de ajuste de temperatura de baño calefactor
11	Conmutador principal
12	Asa del baño calefactor
13	Baño calefactor de acero inoxidable
14	Matraz de evaporación
15	Combi-clip
16	Palanca de fijación para ajuste de ángulo de inmersión

## Anexo C: Cálculo de mezclas etanol-agua realizadas para cada experimento

Las diluciones etanol-agua preparadas para cada experimento se calcularon mediante la Ecuación (C.1). El subíndice 1 se refiere a la solución concentrada que en este caso es el etanol mientras que el subíndice 2 se refiere a la solución diluida (Gutiérrez-Avella & Guardado-Pérez, 2010).

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (C.1)$$

Donde

$C_1$ : Concentración de etanol puro

$V_1$ : Volumen de etanol puro

$C_2$ : Concentración mezcla final etanol-agua

$V_2$ : Volumen final mezcla etanol-agua

Entonces, mediante la Ecuación (C.2), se despeja  $V_1$  correspondiente al volumen de etanol puro que se debe agregar a una probeta:

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} \quad (C.2)$$

Luego, calculado  $V_1$ , se debe enrasar la probeta con agua hasta el volumen  $V_2$ .

Por ejemplo, para una solución de 450 mL de etanol-agua con una concentración 10% etanol, si el etanol es puro su concentración es del 100%, entonces el cálculo se describe en la Ecuación (C.3):

$$V_1 = \frac{10\% \cdot 450 \text{ ml}}{100\%} = 45 \text{ mL} \quad (C.3)$$

Obtenido el volumen de etanol, esta cantidad se agrega en una probeta de 500 mL y se enrasa con agua hasta los 450 mL. Este cálculo se repite para todas las mezclas etanol-agua. En la Tabla C-1, se muestra la concentración final de cada mezcla, el volumen final de cada mezcla, que corresponde a la marca donde se debe enrasar la probeta con agua, la concentración del etanol puro y el volumen de etanol puro a agregar.

**Tabla C-1.** Disoluciones etanol-agua para cada experimento.

<b>Concentración final mezcla etanol-agua, (%v/v) (<math>C_2</math>)</b>	<b>Volumen final mezcla etanol-agua, mL (<math>V_2</math>)</b>	<b>Concentración etanol puro, (%v/v) (<math>C_1</math>)</b>	<b>Volumen etanol puro a agregar, mL (<math>V_1</math>)</b>
0%	450	100%	0
10%	450	100%	45
20%	450	100%	90
30%	450	100%	135
40%	450	100%	180
50%	450	100%	225
60%	450	100%	270
70%	450	100%	315
80%	450	100%	360
90%	450	100%	405
100%	450	100%	450

## Anexo D: Cálculo de rendimiento de extracción para el hexano

El cálculo del rendimiento de extracción del hexano se realizó mediante la Ecuación (4.1), del inciso 4.2 *Procedimiento experimental de extracción Soxhlet*. Este procedimiento se realizó en triplicado para obtener una respuesta más precisa del experimento. La masa de lípidos obtenida mediante extracción con hexano para cada muestra se encuentran en la Tabla 5-1 del inciso 5. *Resultados y discusión* y la masa de microalga seca para cada extracción se muestra a continuación en la Tabla D-1.

**Tabla D-1.** Masa microalga *Nannochloropsis gaditana* seca para extracción con hexano.

Muestra 1, g	Muestra 2, g	Muestra 3, g
10,0231	10,1989	10,2113

Entonces, para la muestra 1, el cálculo del rendimiento de extracción es:

$$\text{Rendimiento de extracción 1} = \frac{1,1030 \text{ g}}{10,0231 \text{ g}} = 11\% \quad (D.1)$$

De la misma manera, se repite para la muestra 2 y 3:

$$\text{Rendimiento de extracción 2} = \frac{0,7370 \text{ g}}{10,1989 \text{ g}} = 7,2\% \quad (D.2)$$

$$\text{Rendimiento de extracción 3} = \frac{1,1896 \text{ g}}{10,2113 \text{ g}} = 11,6\% \quad (D.3)$$

Luego, se determinó un promedio de las 3 muestras:

$$\text{Rendimiento de extracción promedio} = \frac{11\% + 7,2\% + 11,6\%}{3} = 9,9\% \quad (D.4)$$

También se calculó la desviación estándar mediante la función DESVEST.M en Excel de cada experimento, resultando 2,4% para este. Así el dato final se reportó como  $9,9 \pm 2,4\%$ .

## Anexo E: Cálculo de rendimiento de extracción para mezclas etanol-agua

De la misma manera que en el Anexo D, el cálculo del rendimiento de extracción de las mezclas etanol-agua se realizan mediante la Ecuación (4.1), inciso 4.2 *Procedimiento experimental de extracción Soxhlet*. Este procedimiento se realizó en triplicado para obtener una respuesta más precisa de cada experimento. La masa de lípidos obtenida mediante extracción con mezclas etanol-agua para cada muestra se encuentran en la Tabla E-1 y la masa de microalga seca para cada extracción se muestra a continuación en la Tabla E-2. La masa de microalga seca para cada extracción se detalla a continuación.

**Tabla E-1.** Masa de lípidos de microalga recuperado de la extracción con agua, etanol y mezclas de estos.

EtOH:Agua (% v/v)	Lípidos recuperados, g			Promedio, g
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	
0:100	0,7237	0,6330	0,7691	0,7086 ± 0,0693
10:90	0,2719	0,2638	0,2758	0,2705 ± 0,0061
20:80	0,2688	0,2954	0,2977	0,2873 ± 0,0161
30:70	0,3749	0,4009	0,4123	0,3960 ± 0,0192
40:60	0,5959	0,5802	0,5992	0,5918 ± 0,0102
50:50	0,8319	0,8269	0,8216	0,8268 ± 0,0052
60:40	1,0971	1,1082	1,1304	1,1119 ± 0,0170
70:30	2,9618	2,9831	2,9222	2,9557 ± 0,0309
80:20	2,9157	2,9239	2,9374	2,9257 ± 0,0110
90:10	2,9855	3,0365	3,0310	3,0177 ± 0,0280
100:0	2,7994	2,6686	2,7430	2,7370 ± 0,0656

**Tabla E-2.** Masa microalga *Nannochloropsis gaditana* seca para extracciones con mezclas etanol-agua.

<b>Mezcla EtOH:Agua (%v/v)</b>	<b>Masa muestra 1, g</b>	<b>Masa muestra 2, g</b>	<b>Masa muestra 3, g</b>
0:100	10,0789	10,0558	10,0958
10:90	10,0642	10,0824	10,0390
20:80	10,0432	10,0856	10,0805
30:70	10,0556	10,0328	10,0498
40:60	10,0773	10,0442	10,0152
50:50	10,0680	10,0662	10,0877
60:40	10,0610	10,0660	10,0869
70:30	10,0432	10,0462	10,0223
80:20	10,0431	10,0463	10,0225
90:10	10,0009	10,0605	10,0165
100:0	10,0271	10,0940	10,0988

Entonces, por ejemplo, de la mezcla EtOH:Agua 10:90 (%v/v), para la muestra 1, el cálculo del rendimiento de extracción está dado por la Ecuación (E.1):

$$\text{Rendimiento de extracción 1} = \frac{0,2719g}{10,0642g} = 2,7\% \quad (E.1)$$

De la misma manera, se repite para la muestra 2 y 3:

$$\text{Rendimiento de extracción 2} = \frac{0,2638g}{10,0824g} = 2,6\% \quad (E.2)$$

$$\text{Rendimiento de extracción 3} = \frac{0,2758g}{10,0390g} = 2,7\% \quad (E.3)$$

Luego, se determinó un promedio de las 3 muestras:

$$\text{Rendimiento de extracción promedio} = \frac{2,7\% + 2,6\% + 2,7\%}{3} = 2,7\% \quad (E.4)$$

También se calculó la desviación estándar mediante la función DESVEST.M en Excel de cada experimento, resultando 0,1% para este. Así el dato final se reportó como  $2,7 \pm 0,1\%$ .

## Anexo F: Cálculo del gasto energético y costo para cada experimento

Para el cálculo del gasto energético, se utiliza la Ecuación (4.2) presentada en el inciso 4.2 *Procedimiento experimental de extracción Soxhlet*. Para realizar el cálculo, primero se deben conocer las potencias de los equipos utilizados. A continuación, en la Tabla F-1, se describe la potencia eléctrica de la manta calefactora (Medilc, 2023), el rotaevaporador (Büchi, 2023), la bomba de vacío (Boeco, 2023) y la estufa convectiva (Zhicheng, 2023).

**Tabla F-1.** Equipos eléctricos utilizados y sus respectivas potencias eléctricas.

Equipos eléctricos	Potencia eléctrica, W
Manta calefactora	150
Rotaevaporador	1730
Bomba de vacío	93
Estufa convectiva	700

Ahora, el tiempo de uso de cada artefacto para cada experimento fue determinado de manera experimental. En la Tabla F-2, se muestran los tiempos de uso de cada equipo en cada experimento.

Entonces, por ejemplo, el cálculo del gasto energético para experimento n° 2 se realiza de la siguiente manera:

$$Gasto\ energético_{manta\ calefactora} = 150\ W \cdot 8\ h = 1200\ Wh \quad (F.1)$$

$$Gasto\ energético_{rotaevaporador} = 1730\ W \cdot 0,67\ h = 1153\ Wh \quad (F.2)$$

$$Gasto\ energético_{bomba\ de\ vacío} = 93\ W \cdot 0,67\ h = 62\ Wh \quad (F.3)$$

$$Gasto\ energético_{estufa\ convectiva} = 700\ W \cdot 24\ h = 16800\ Wh \quad (F.4)$$

Finalmente, la suma de los gastos energéticos de cada equipo resulta el gasto energético del experimento n° 2:

$$\text{Gasto energético}_{\text{experimento n}^\circ 2} = 19215 \text{ Wh} \cdot \frac{1}{1000} = 19,2 \text{ kWh} \quad (F.5)$$

**Tabla F-2.** Tiempo de uso de cada equipo eléctrico para cada experimento.

N° experimento	EtOH:Agua (%v/v)	Tiempo de uso, h			
		Manta calefactora	Rotaevaporador	Bomba de vacío	Estufa convectiva
1	0:100	8	-	-	24
2	10:90	8	0,67	0,67	24
3	20:80	8	0,67	0,67	24
4	30:70	8	0,67	0,67	24
5	40:60	8	0,67	0,67	24
6	50:50	8	0,67	0,67	24
7	60:40	8	0,67	0,67	12
8	70:30	8	0,50	0,50	12
9	80:20	8	0,42	0,42	12
10	90:10	8	0,42	0,42	12
11	100:0	8	0,33	0,33	-
12	<i>n</i> -hexano	8	0,25	0,25	-

Para el costo de la extracción, se calculó el volumen de cada solvente, teniendo en cuenta que para un experimento el volumen de solvente fueron 150 mL. Para las mezclas de etanol y agua se reportó la cantidad de etanol utilizada y una cantidad aproximada de agua para completar los 150 mL de solvente, esto debido a que el etanol se debe enrasar con agua hasta 150 mL para obtener la mezcla ya que los volúmenes no son aditivos. Así entonces, mediante la Ecuación (4.3) costo energético, Ecuación (4.4) costo del solvente se logró determinar el costo de la extracción con la Ecuación (4.5). Se calculó el promedio de los costos de extracción, resultando una media de \$9.528

y su desviación estándar por medio de la función DESVEST.M en Excel resultó \$445.

**Tabla F-3.** Detalle del costo de extracción de cada experimento.

<b>N° expto</b>	<b>EtOH:Agua (% v/v)</b>	<b>Vol. n-hexano, mL</b>	<b>Vol. aprox. de agua, mL</b>	<b>Vol. etanol, mL</b>	<b>Costo solvente</b>	<b>Gasto energético, kWh</b>	<b>Costo energético</b>	<b>Costo de la extracción</b>
1	0:100	0	150	0	\$210	18	\$8.464	\$8.674
2	10:90	0	135	15	\$479	19,2	\$8.634	\$9.114
3	20:80	0	120	30	\$749	19,2	\$8.634	\$9.383
4	30:70	0	105	45	\$1.018	19,2	\$8.634	\$9.653
5	40:60	0	90	60	\$1.288	19,2	\$8.634	\$9.922
6	50:50	0	75	75	\$1.557	19,2	\$8.634	\$10.191
7	60:40	0	60	90	\$1.826	10,8	\$7.442	\$9.268
8	70:30	0	45	105	\$2.096	10,5	\$7.399	\$9.495
9	80:20	0	30	120	\$2.365	10,4	\$7.385	\$9.750
10	90:10	0	15	135	\$2.635	10,4	\$7.385	\$10.019
11	100:0	0	0	150	\$2.904	1,8	\$6.164	\$9.068
12	<i>n</i> -hexano	150	0	0	\$3.648	1,7	\$6.149	\$9.797