

# Metodología para extracción de aceite de la microalga *Nannochloropsis oculata* usando ultrasonido

METHODOLOGY FOR OIL EXTRACTION FROM THE MICROALGAE *NANNOCHLOROPSIS OCLATA* WITH ULTRASOUND

María E. Fuentes Campos<sup>1</sup>, Marleny D. Aranda Saldaña<sup>2</sup>

RECIBIDO: 14/10/2013 – APROBADO: 20/12/2013

## RESUMEN

Muchas metodologías han sido reportadas para la extracción de aceites de microalgas, ya sea con fines alimentarios, medicinales y recientemente como materia prima para producir biocombustibles. Para la producción de biocombustibles como biodiesel generalmente se usan semillas oleaginosas las cuales han mostrado tener muchas limitaciones debido a la disponibilidad de terrenos y agua para su cultivo, bajos rendimientos de cosechas y más aún que se usan semillas cuyo destino es la alimentación. Por tal motivo en los últimos años se han ido estudiando la factibilidad del uso de microalgas para la producción de biodiesel las cuales pueden superar las limitaciones antes mencionadas. Diversos autores han mostrado metodologías para la extracción de aceite de diferentes microalgas cuyos rangos de extracción están en el orden de 11.2 % a 22.9 %.

En el presente trabajo se muestra un método modificado (mejorado) para la extracción de aceite de la microalga *Nannochloropsis oculata* previamente liofilizada tratado con ultrasonido y mezclas de solventes orgánicos tales como ciclohexano-isopropanol y cloroformo-metanol. El mayor rendimiento fue alcanzado al usar la mezcla cloroformo-metanol (35.55%±2.05), pero se considera que tiene un efecto negativo en el medio ambiente y a la salud, por ello la mezcla ciclohexano-isopropanol mostró un rendimiento aceptable (31.49%±0.11) siendo menos contaminante para el ambiente. Cuando se trabaja con la mezcla ciclohexano-isopropanol se mostró que no hubo cambios significativos en el tiempo de sonicación resultando ser 10 minutos el adecuado y la temperatura ideal 56°C. La mezcla cloroformo-metanol mostró una ligera variación resultando ser también el tiempo adecuado 10 minutos y temperatura 48°C.

**Palabras clave:** Microalga, extracción, ultrasonido, toxicidad, medio ambiente.

## ABSTRACT

Many methods have been reported for the extraction of oils from microalgae, either for food, medicinal purposes and recently as feedstock to produce biofuels. For the production of biofuels such as biodiesel generally are used oilseeds which have shown to have many limitations due to the availability of land and water for cultivation, low crop yields and more so that seeds are used to food. For this reason in recent years have been studying the feasibility of the use of microalgae to produce biodiesel which can overcome the above limitations. Several authors have methodologies for extracting of different microalgae oil whose ranges of extraction are on the order of 11.2% to 22.9%.

This work presents a modified (improved) oil extraction method from the microalgae *Nannochloropsis oculata* previously lyophilized using ultrasound treatment in a mix of organic solvents cyclohexane-isopropanol and chloroform-methanol. The highest yield was achieved with chloroform- methanol (35.55% ± 2.05) mixture, but are considered to have a negative effect on the environment and health, so the cyclohexane- isopropanol mixture showed acceptable performance (31.49% ± 0.11) being less polluting to the environment. The sonication time of the samples of the *Nannochloropsis oculata* microalgae showed no significant effect in the yield of oil, and 10 minutes proved to be adequate and the optimum temperature when working for a period of 10 minutes for both cyclohexane-isopropanol mixture and chloroform-methanol mixture resulting time. Only to the extraction temperature had variations being the ideal 56 °C for cyclohexane-isopropanol mixture and 48°C for chloroform-methanol.

1 Facultad de Ciencias, Dpto. Académico de Química, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. Correspondencia: elifuentesc@lamolina.edu.pe)  
2 Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada. (marleny.saldana@ales.ualberta.ca)

When working with the cyclohexane-isopropanol mixture, changes in the sonication times showed no significant effect, and 10 minutes proved to be adequate and the optimum temperature, 56°C. For the chloroform-methanol mixture, although there were some slight variations, it was found that 10 min sonication may also be appropriate at 48°C ideal temperature.

**Keywords:** Microalgae, extraction, ultrasound, toxicity, environment.

## I. INTRODUCCIÓN

Microalgas son organismos unicelulares que se han venido investigando desde hace mucho tiempo por su gran valor en industrias alimentarias, farmacias y recientemente como materia prima para la generación de energía (Mata, 2009).

En los últimos años a raíz del auge de los biocombustibles producidos a partir de semillas y maíz se suscitaban controversias por el uso de ellas, como que compiten con los alimentos, disputa por el uso de suelos para el cultivo de éstos, uso desmedido de fertilizantes y consumo de agua. Estas controversias llevaron a crear conflictos sociales y la necesidad de buscar otras alternativas. Para ello se ha enfocado en el uso de microalgas las cuales presentan un alto potencial ya que su cultivo es mucho más factible y su rendimiento en aceite mucho más alto que los aceites de origen vegetal. Su rendimiento por hectárea suele ser tres a cuatro veces más (Chisti, 2007).

Cualquier error en el cultivo de las microalgas puede solucionarse rápidamente lo que no sucede en un sistema de cultivo convencional de semillas en el cual se corre el riesgo de perderse en su totalidad. Por lo tanto es posible que las microalgas y el aceite que contienen éstas puedan ser una alternativa para solucionar el problema de los biocombustibles.

El biodiesel es un líquido renovable formulado exclusivamente para los motores diesel. Es producido comúnmente por aceites vegetales y también de aceites y grasas animales, producen gases de combustión que se cree son menos contaminantes (ya que no presentan azufre en su composición), el cual contribuye a la reducción de los gases de efecto invernadero los cuales también afectan a la salud humana. Este biocombustible fue aprobado como combustible alternativo por la Agencia de Protección medioambiental de Estados Unidos.

El biodiesel se obtiene a través de un proceso químico usando como materia prima el aceite, para hacer la reacción con alcohol metílico (podría usarse etanol pero es menos eficiente) y catalizador (bases como KOH o NaOH).

La materia prima que es el aceite de microalga puede obtenerse a través de métodos químicos como la extracción con Soxhlet utilizando solventes químicos el cual presenta un mejor rendimiento que los métodos mecánicos. La selección de los solventes adecuados para la extracción de aceite juega un papel muy importante ya que se tiene que definir la selectividad de ellos para poder extraer la sustancia que nos interesa y no extraer sustancias desconocidas, además estos deben ser permitidos para su uso, por lo tanto serán elegibles aquellos de baja toxicidad los cuales no atentarán contra la salud humana y el medio ambiente, por ejemplo la Unión Europea tiene una lista de ellas que son usadas y son parte de las buenas prácticas de fabricación (Ver Tabla N.º 1).

**Tabla N.º 1.** Límites de algunos residuos de solventes en productos farmacéuticos

Solvente	Característica	Concentración límite (ppm)
Ácido acético	Solvente con baja toxicidad	–
Acetona	Solvente con baja toxicidad	–
Acetonitrilo	Solvente a ser limitado	410
Anisol	Solvente con baja toxicidad	–
Benceno	Solvente a ser evitado (cancerígeno)	2
Tetracloruro de carbono	Solvente a ser evitado (tóxico, peligroso para el medioambiente)	4
Cloroformo	Solvente a ser limitado	60
Ciclohexano	Solvente a ser limitado	3880
Cumeno	Solvente con baja toxicidad	–
Diclorometano	Solvente a ser limitado	600
1,2-Dicloroetano	Solvente a ser evitado (tóxico)	5
1,1-Dicloroetano	Solvente a ser evitado (tóxico)	8
1,2-Dimetoxietano	Solvente a ser limitado	100
1,4-Dioxano	Solvente a ser limitado	380
Etanol	Solvente con baja toxicidad	–
Formamida	Solvente a ser limitado	220
Heptano	Solvente con baja toxicidad	–
Hexano	Solvente a ser limitado	290
Metanol	Solvente a ser limitado	3000
Metilbutil cetona	Solvente a ser limitado	50
Nitrometano	Solvente a ser limitado	50
Pentano	Solvente con baja toxicidad	–
1- Propanol	Solvente con baja toxicidad	–
2- Propanol	Solvente con baja toxicidad	–
Piridina	Solvente a ser limitado	200
1,1,1-Tricloroetano	Solvente a ser evitado (peligroso para el medio ambiente)	1500
Tolueno	Solvente a ser limitado	890
1,1,2-Tricloroetano	Solvente a ser limitado	80

Fuente: Adaptado de European Medicines Agency (2009).

También es muy importante resaltar que una buena materia prima para producir biocombustibles debe mostrar un valor agregado de tal manera que permita aprovechar a lo máximo los subproductos tales como por ejemplo la torta después de extraer el aceite de microalgas que contienen un valor adicional que podría utilizarse en alimentación animal, como fertilizante o en la generación de biogás (Gouveia & Oliveira, 2009).

Para extraer aceite de microalgas se han desarrollado nuevas metodologías las cuales están clasificadas como tecnologías verdes de la química que son sostenibles para el medioambiente, técnicas como el uso de fluidos supercríticos para extracción como CO<sub>2</sub> (SFE) (Aresta, 2005), extracción con líquidos presurizados (PLE), uso de microondas y usos de equipos de ultrasonido (Koberg & Cohen, 2011).

Ultrasonido es una técnica ampliamente usada en procesos químicos como en tratamiento de aguas, industria de colorantes, alimentos e industria farmacéutica para extraer compuestos bioactivos tales como aceites esenciales, flavonoides, alcaloides, polisacáridos, ésteres, etc. (Meireles, 2009). El equipo de ultrasonido aplica ondas con frecuencia de 20 kHz, mediante ellas se logra irradiaciones ultrasónicas (en solventes como agua pero en caso del extracto sea hidrofóbico se usan solventes orgánicos) los cuales manifiestan efectos fisicoquímicos a través del fenómeno llamado cavitación, donde se forman burbujas; debido al crecimiento del núcleo de la biomasa (por ejemplo cuando se requiere extraer aceite de la microalga) y a su colapso, generando una variación de presión permitiendo una mayor transferencia de masa y mejora de la extracción.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales que se utilizaron fueron las muestras de microalga *Nannochloropsis oculata* que fueron obtenidas del Instituto del Mar Peruano (IMARPE), solventes Metanol 99.9 % grado HPLC adquirido de Sigma Aldrich, Cloroform ACS 99.8 %, Ciclohexano grado 99.9 % HPLC de Sigma Aldrich, alcohol isopropílico Omnisolv; sistema de ultrasonido "Desmembrator 300 SONIC" y rotavapor Buchi 461.

Se siguió la metodología de extracción de Bligh and Dyer y se usó el equipo de ultrasonido por triplicado para las muestras de microalga *Nannochloropsis oculata*. Muestras de microalgas de 2,0 g liofilizadas (refrigerada con 15 % de humedad y 0.408 mm de tamaño de poro) fueron pesadas para agregárseles 15 ml de metanol o ciclohexano, 5ml de cloroformo o isopropanol y una solución de cloruro de sodio NaCl (1 % p/p). Seguidamente fueron agitadas en un vortex por 30 segundos para posteriormente ser llevadas a un equipo de ultrasonido que trabaja con una amplitud del 70 % y lograr extraer el aceite a diferentes tiempos y midiendo la temperatura de extracción. Para que la temperatura de la muestra no aumente significativamente se colocó un baño de hielo. Luego las muestras fueron centrifugadas y separadas en capas para eliminar el solvente mediante el rotavapor y usando nitrógeno para finalmente pesar y determinar el contenido de aceite de las muestras.

## III. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La Tabla N.º 2 muestra el rendimiento en la extracción de aceite de la microalga estudiada usando una mezcla de solventes: ciclohexano-isopropanol, donde el tiempo de sonicación no tiene efecto en el rendimiento de aceite a temperatura constante. Un rendimiento considerable en aceite es debido a la transferencia de masa de las muestras y los solventes a una mayor temperatura debido al incremento de la presión de vapor el cual hace que la viscosidad disminuya.

**Tabla 2.** Rendimientos de extracción de aceites de la microalga *Nannochloropsis oculata* usando la mezcla ciclohexano-alcohol isopropílico.

Muestras de microalga (g)	Tiempo de sonicación (min)	Temperatura de extracción (°C)	Rendimiento de aceite (%)
2	10	56	30.54±0.9629
2.01	20	57	30.54±0.6121
2.01	30	56	30.38±0.7921
2.01	45	51	31.49±0.1050

En la Tabla N.º 3 la mezcla cloroformo-metanol resultó ser mejor para la extracción debido a su naturaleza polar y al tamaño de partícula de la microalga liofilizada de 0.406 mm permitiendo así una mayor transferencia de masa cuando el sonicador fue usado, esto hace más fácil el actuar efecto de la microturbulencia generado en la células donde se extrae el aceite. El máximo rendimiento es obtenido en 45 minutos de sonicación y a 50 °C, esta mezcla es más eficiente debido a que se ha reportado que un extracto con cloroformo puede contener mono, di y triacilglicerol, ácidos grasos libres y feofitinas; en cambio un extracto metanólico contiene fosfolípidos y clorofila. El ciclohexano puede extraer hidrocarburos acíclicos (Tornabene *et al.*, 1982).

**Tabla N.º 3.** Rendimientos de extracción de aceites de la microalga *Nannochloropsis oculata* usando la mezcla cloroformo-metanol.

Muestras de microalgas (g)	Tiempo de sonicación (min)	Temperatura de extracción (°C)	Rendimiento de aceite (%)
2.01	10	48	33.90±2.0114
2.03	20	45	33.59±2.1787
2.03	30	48	34.87±2.7262
2.02	45	50	35.55±2.0464

Pero no solo el rendimiento es importante en los resultados, otros parámetros son considerados como el tiempo de sonicación, el cual no presenta diferencia al trabajar a 10 minutos y a 45 minutos, entonces es posible considerar suficiente 10 minutos para sonicación el cual no solo reduce el tiempo de extracción del aceite sino el costo permitiendo al mismo tiempo menor tiempo de exposición al solvente siendo la temperatura ideal para este proceso de sonicación 56 °C para la mezcla ciclohexano-isopropanol.

#### IV. CONCLUSIONES

El porcentaje de extracción de aceite con los pares de solventes usados en el presente trabajo resultaron ser mejores que los estudiados por otros autores como Mourente & Lubian (1989) quienes obtuvieron 11.2 % y Mata (2009) 22.7 a 22.9 %.

La extracción de los aceites de la microalga *Nannocloropsis oculata* es básicamente una operación de transferencia de masa y depende de parámetros importantes como la elección de los solventes adecuados y el tiempo de sonicación; la selectividad de los solventes es debido principalmente a la polaridad de estos y su afinidad con los componentes lipídicos.

Por otro lado se cree que la prolongada exposición de la muestras al sonicador para la extracción del aceite puede causar la oxidación del mismo (Cañizares, M; García, J & Luque de Castro, M; 2004) por el aumento de la temperatura al usar el ultrasonido (la cual se evitó al utilizar un baño de hielo).

Durante el presente trabajo se observó que no hay un efecto significativo al extraer el aceite cuando se trabaja por más de 10 minutos de sonicación mostrando ser este tiempo el suficiente con el cual se logra extraer el aceite más rápidamente haciendo el proceso más rentable y mostrando rendimientos aceptables.

A pesar que se obtuvieron rendimientos más altos con la mezcla cloroformo-metanol usando el ultrasonido, se eligió la mezcla ciclohexano-isopropanol por su baja toxicidad ya que estos solventes orgánicos son menos dañino para las personas y para el medio ambiente y es posible hacer un mejor tratamiento y disposición de sus residuos (Metherel *et.al.*, 2009).

La mezcla ciclohexano-isopropanol también tiene el menor riesgo para la salud en productos farmacéuticos y en las buenas prácticas de fabricación (BPM), ya que el ciclohexano tiene como concentración límite 3880 partes por millón (ppm) comparada con el cloroformo que tiene 60 ppm y el metanol 3000 ppm, estos son solventes a ser limitado su uso, mientras que el alcohol isopropílico tiene menor riesgo toxicológico (European Medicines Agency, 2009). Cuando se prohibió el uso de solventes clorinados se buscó solventes alternativos para el análisis de organismos marinos siendo recomendado utilizar la mezcla constituida por los solventes ciclohexano-isopropanol (Self, 2005).

El empleo de microalgas para su uso en biocombustibles sigue siendo una gran alternativa, ya que las metodologías para extracción de aceite están avanzando, siendo este trabajo una contribución a ello, demostrándose que el empleo de ultrasonido es una buena opción para extraer aceites de manera rápida y segura a favor del cuidado de la salud humana y el medio ambiente tal como lo señala la química verde.

#### V. AGRADECIMIENTOS

María E. Fuentes Campos agradece de manera especial a ELAP (Emerging Leaders in the Americas Program) por el financiamiento, a la *Agricultural, Food and Environmental Sciences Faculty* de la Universidad de Alberta en Canadá y al Instituto del Mar Peruano (IMARPE) por facilitar las muestras para el presente trabajo.

#### VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Aresta, M. (2005). "Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and thermochemical liquefaction". *Environmental Chemistry Letters*. Vol. 1, pp. 136-139.
2. Cañizares, M; García, J & Luque de Castro, M (2004). "Fast ultrasound-assisted method for the determination of the oxidative stability in virgin olive oil". *Analytica Chimica Acta*, vol. 502, pp. 161-166.
3. Chisti, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae". Institute of Technology and Engineering. Massey University. *Biotechnology Advance*. Vol. 25, pp. 294-306.
4. European Medicines Agency (2009). Science Medicine Health ICH Topic Q3C (R4) Impurities: Guideline for residual solvents.
5. Gouveia, L & Oliveira, A. (2009) "Microalgae as a raw material for biofuels production" *J.Ind Microbiol Biotechnol*. Vol 36, pp. 269-274.
6. Koberg, M & Cohen, M. (2011) "Biodiesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation". *Bioresource Technology*. Vol.102, Issue 5, pp. 4265-4269.
7. Mata, T. (2009) "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review" *Renewable and Sustainable Energy*. Vol.14, pp. 217-234.
8. Meireles, M. (2009). Low Pressure Solvent Extraction (Solid-Liquid Extraction Microwave Assistend, And Ultrasound Assisted) from condimentary plants. *Extracting Bioactive Compounds for Food Products. Theory and Applications*. pp. 154-156.
9. Metherel, A; Taha, A; Izadi, H & Stark, K. (2009). "The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed)". *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 81 (2009). pp. 417, 423.
10. Self, R. (2005). Extraction of organic analytes from Foods. *Royal Society of Chemistry*. Cambridge. pp. 45, 47, 93.
11. Tornabene, T; Ben-Amotz; A. & Hubbard, J. (1982). Isolation, Analysis an Identification of Lipids. *Phycology*. Vol.21, pp. 71-78.