

## ***Procesos tecnológicos para la obtención de $\beta$ -caroteno y glicerol a partir de *Dunaliella* sp. en la Salina “Las Cumaraguas”***

*Technological processes for obtaining  $\beta$ -carotene and glycerol from *Dunaliella* sp. at “Las Cumaraguas” Saltworks*

*MSc. Noel José Acacio-Chirino<sup>I</sup>; Dra.C. Lourdes Margarita Zumalacárregui-de Cárdenas<sup>II</sup>*

*noel\_acacio@hotmail.com o lourdes@quimica.cujae.edu.cu*

*<sup>I</sup>Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda U.N.E.F.M., Venezuela.*

*<sup>II</sup>Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría, CUJAE, Cuba.*

Recibido: 24 de julio de 2016

Aprobado: 17 de febrero de 2017

### **Resumen**

Se desarrollaron los procesos tecnológicos para la extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol a partir de *Dunaliella* sp. en la Salina “Las Cumaraguas”. Se caracterizó fisicoquímicamente esta microalga. Se estableció el flujo tecnológico del proceso partiendo de datos de laboratorio. Se realizó el balance de materiales y los cálculos energéticos necesarios. Para poder dimensionar los equipos donde se lleva a cabo la separación a escala piloto que permita la producción de una tonelada de  $\beta$ -caroteno. Se evaluaron dos alternativas: extracción con solventes orgánicos y extracción con fluido supercrítico. El procedimiento permitió establecer que es posible la extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol mediante los esquemas tecnológicos presentados con un rendimiento de  $\beta$ -caroteno de biomasa: 15, 4 % y rendimiento de glicerol de la biomasa: 5 % para la extracción convencional y un rendimiento de  $\beta$ -caroteno de los pigmentos: 70 % y rendimiento de glicerol de la biomasa: 5 % para fluido supercrítico.

**Palabras clave:** extracción,  $\beta$ -caroteno, glicerol, *Dunaliella* sp.

### **Abstract**

Technological processes were developed for  $\beta$ -carotene and glycerol extraction from *Dunaliella* sp. at “Las Cumaraguas” Saltworks. *Dunaliella* sp. microalgae was characterize. It was established the technological flow of the process from laboratory data; energy balances and necessary energetic calculations were done, in order to select and size the required equipment for a pilot plant scale to produce one ton of  $\beta$ -carotene. Two possibilities were evaluated: extraction with organic solvents and extraction with supercritical fluids. The procedure showed that  $\beta$ -carotene and glycerol extractions are possible by means of the presented technological diagram, with 15, 4 % of biomass  $\beta$ -carotene yield and 5 % of biomass glycerol yield, for a conventional extraction and a yield of 70 % for  $\beta$ -carotene from pigments and 5 % of biomass glycerol yield, for extraction with supercritical fluid.

**Keywords:** extraction,  $\beta$ -carotene, glycerol, *Dunaliella* sp.

## Introducción

Se han ensayado diversas estrategias de cultivo de *Dunaliella salina* para maximizar la producción de  $\beta$ -caroteno, no se han logrado éxitos debido a que las altas tasas de crecimiento no se corresponden con una mayor acumulación intracelular de  $\beta$ -caroteno. Sin embargo, se ha observado que una mayor producción de biomasa incrementa el contenido de  $\beta$ -caroteno por volumen de cultivo [1].

Actualmente se considera que existen diferentes alternativas, ya sea partiendo de fuentes de origen natural vía fermentación, o productos naturales unidos a procesos de extracción con el empleo de solventes y condiciones de reacción menos complejas, que de cierta forma pudieran ser factibles. Está demostrado que los carotenoides y demás componentes derivados, específicamente el  $\beta$ -caroteno, pueden obtenerse a partir de diferentes fuentes naturales, vegetales, algas, hongos, entre otros, buscando precisamente métodos de extracción seguros y eficientes de los que se obtengan carotenoides con la necesaria pureza [2].

Por otra parte, se han incorporado en los estudios de extracción nuevos métodos como: la extracción asistida con ultrasonido, la extracción asistida con microondas, la extracción con solvente acelerado y la extracción con fluidos supercríticos. Estos procesos acortan el tiempo de extracción, disminuyen el consumo de solvente, aumentan el rendimiento de la extracción y en general, mejoran la calidad del extracto [3].

El objetivo de la presente investigación es desarrollar procesos tecnológicos para la extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol a partir de *Dunaliella sp.* en la Salina “Las Cumaraguas”, a partir de datos para la extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol a partir de microalgas obtenidos en ensayos de laboratorio.

## Fundamentación teórica

Las microalgas se consideran hoy en día como un gran recurso natural y se estudian cada vez más para su explotación industrial con diversos fines [4, 5]. Una de las características que hace tan atractivas a las microalgas es la rapidez con la que se desarrollan, requiriendo esencialmente de la aportación de nutrientes y de la luz solar.

Una de las aplicaciones más interesantes de las microalgas es la relacionada con las sustancias de interés químico-farmacéutico, debida a la utilidad práctica que estas encuentran en biomedicina, farmacología, fitocosmética y en la industria alimentaria.

A partir de diferentes especies de microalgas se extraen sustancias como vitaminas, pigmentos, alcoholes, aminoácidos, polisacáridos sulfatados, glicerol, ácidos grasos polinsaturados, enzimas, extractos acuosos reguladores del crecimiento, ceras, biosurfactantes, fosfolípidos, lecitinas, betaínas y precursores de prostaglandinas, dependiendo de las que sean capaces de sintetizar, así como sustancias con efectos terapéuticos como: cicatrizantes, inmunorreguladores, anticancerígenos, tensorreguladores, antiinflamatorios, hipocolesterolémicos, entre otros.

Diversos carotenoides presentan propiedades beneficiosas para la salud humana, lo que les sitúa como potenciales ingredientes alimentarios funcionales. Por ejemplo, se han descrito propiedades preventivas de la luteína sobre el cáncer [6] así como sobre los daños retinales relacionados con el envejecimiento [7, 8].

Diversos estudios epidemiológicos muestran evidencias de que la actividad antioxidante asociada al  $\beta$ -caroteno puede prevenir el cáncer en diversos órganos como pulmones, estómago, cérvix, páncreas, colon, recto, próstata y ovarios [9, 10].

En condiciones de crecimiento de alto estrés, *Dunaliella sp.* es capaz de almacenar gran cantidad de carotenoides, principalmente  $\beta$ -caroteno, llegando a suponer hasta un 14 % de su peso seco [11]. Esta microalga es una de las fuentes naturales más importantes de este compuesto, incluyendo grandes cantidades del isómero 9-cis [12] de mayor actividad antioxidante.

Una de las características de *Dunaliella sp.*, que resulta ventajosa al extraer compuestos de su citoplasma, es la ausencia de una pared celular rígida de polisacáridos como otras muchas microalgas. La célula posee una membrana plasmática flexible cubierta por un recubrimiento mucoso [11]. Esto permite que la célula se adapte a rápidos cambios en la salinidad del medio, pudiendo variar su volumen en gran medida sin sufrir daños. La ausencia de pared celular facilita el intercambio de masa durante los procesos de extracción [12].

### **Nuevos procesos de extracción**

Los métodos tradicionales de extracción sólido-líquido requieren altos tiempos de residencia y grandes cantidades de solvente. Estos métodos se basan en la selección del solvente apropiado para una separación, utilizando calor y agitación. El uso de los solventes es un aspecto a investigar, entre otras razones por la toxicidad. La extracción con disolventes siempre deja un residuo en el aceite, particularmente cuando la

extracción se realiza con hexano, que es el disolvente más comúnmente usado, pero la legislación internacional restringe la cantidad de hexano que deben contener los productos extraídos y cada vez será más restrictiva, previéndose que en un futuro se limite su uso y se sustituya por otros disolventes [3].

Actualmente se han desarrollado otros métodos de extracción como: la extracción asistida con ultrasonido, la extracción asistida con microondas, la extracción con solvente acelerado y la extracción con fluidos supercríticos. Estos procesos acortan el tiempo de extracción, disminuyen el consumo de solvente, aumentan el rendimiento de la extracción y, en general, mejoran la calidad del extracto.

Un fluido supercrítico (FSC) es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas y de disolver los materiales como un líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción.

Algunas ventajas de los FSC son: poseen alto coeficiente de difusión y viscosidad más baja que los líquidos; despreciable tensión superficial, lo cual facilita la operación de extracción dada la rápida penetración al interior de los poros de la matriz heterogénea; la selectividad durante la extracción puede ser manipulada con la variación de las condiciones de operación temperatura y presión afectando la solubilidad de varios componentes en el fluido supercrítico; no deja residuos químicos; la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico permite su fácil recuperación por procesos de reciclaje.

El CO<sub>2</sub> es el fluido supercrítico más utilizado debido a que es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, incoloro, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar y se consigue con diferentes grados de pureza; se puede trabajar a baja temperatura y por tanto, se pueden separar compuestos termolábiles; se puede obtener a partir de procesos de fermentación alcohólica y ayuda a prevenir la degradación térmica de ciertos componentes químicos del alimento cuando son extraídos[13-15]. Sus aplicaciones han estado dirigidas a la obtención de aceites vegetales a partir de oleaginosas, desacidificación de aceites con alto contenido de ácidos grasos, eliminación de colesterol, aprovechamiento de residuos de la refinación y obtención de compuestos minoritarios de alto valor agregado como son el escualeno, los tocoferoles y los fitosteroles [14].

Se han realizado estudios para extraer antioxidantes con la tecnología de FSC como los reportados para la cáscara de pistacho (*Pistachia vera*) a 35–60 °C y 10,1–35,5 MPa [16]; el romero (*Rosmarinus officinalis L.*) 40–60 °C y 10–40 MPa [17]; semillas de cilantro (*Coriander sativum*) 58–85 °C y 11,6–2,8 MPa [18] y la yerba buena (*Hierochloe odorata*) 40 °C y 25–35 MPa [19].

Otro estudio muestra la obtención de oleorresina de paprika por FSC utilizando dióxido de carbono en condiciones supercríticas, y compara los resultados con la obtención por extracción con hexano, solvente orgánico más empleado en la industria alimentaria y para el que no se permiten cantidades residuales de más de 25 mg/kg de producto. Se señala que por el carácter lipofílico de los carotenoides presentes en la paprika, estos se solubilizan fácilmente en el CO<sub>2</sub> supercrítico, permitiendo su extracción a bajas temperaturas y evitando la pérdida de compuestos termolábiles causada por degradación térmica. Otra de las ventajas es que el CO<sub>2</sub>, después de la etapa de despresurización y aislamiento de la oleorresina, puede ser recogido y reciclado. La extracción se realizó a 70 °C y 35 MPa [20].

Mendiola [21] llevó a cabo estudios para la obtención de extractos de *Spirulina platensis* empleando fluidos sub y supercríticos. Los mejores resultados, en términos de rendimiento de los extractos, los obtuvo con CO<sub>2</sub> y etanol a 7,8 MPa y 55 °C, alcanzando 8 % de rendimiento. Cuando se empleó únicamente CO<sub>2</sub> puro, los rendimientos alcanzados fueron inferiores.

Finalmente se tiene que entre los factores de estrés ambiental para inducir la producción de  $\beta$ -caroteno se tienen: salinidad alta, temperatura elevada, calidad e intensidad de luz y baja concentración de nutrientes. Entre los compuestos de gran interés comercial a partir de *Dunaliella sp.* los carotenoides sobresalen precisamente y de estos es el  $\beta$ -caroteno, el que en mayor cantidad se presenta en las cepas de *Dunaliella sp.* [22].

## **Materiales y métodos**

### *Caracterización fisicoquímica de la microalga Dunaliella sp.*

Los métodos para la realización de las determinaciones están dispuestos por la American Public Health Asociation (APHA) [23] y se resumen en la tabla 1.

**TABLA 1. TÉCNICAS DE ANÁLISIS QUÍMICO EMPLEADAS EN EL LABORATORIO**

Determinación	Símbolo	Método utilizado
pH	pH	Método electrométrico (N° 4 500-H+B, APHA, AWWA, WPCF)
Oxígeno disuelto mg/L	OD	Método Winkler Modificado (N° 4 500-0 APHA, WPCF, AWWA)
Fósforo total ppm	PT	Método del cloruro estañoso (N° 4 500-P B y 4 500-P E, APHA, WPCF, AWWA)
Salinidad μS/cm		Método electrométrico (N°2 520 A, APHA, AWWA, WPCF)
Turbidez UNT		Método nefelométrico (N° 2 130 B, APHA, WEF, AWWA)
Humedad	H	Método gravimétrico (N° 2 540 B, APHA, WEF, AWWA)

***Procedimiento para la obtención de β-caroteno y glicerol a partir de la microalga Dunaliella sp. a escala de laboratorio***

Araujo *et al.*, propusieron el procedimiento para la obtención de β-caroteno a escala de laboratorio [24]. Es válido aclarar que como es un procedimiento establecido, no se aplica diseño de experimentos. Además, se determina la concentración de carotenos totales y las fracciones de β-caroteno [25].

A partir de los índices de extracción obtenidos a escala de laboratorio se realizó el balance de materiales y los cálculos energéticos necesarios, para poder dimensionar los equipos para llevar a cabo la separación a escala piloto que permita la producción de una tonelada de β-caroteno.

***Metodología para estimar la cantidad de glicerol a escala de laboratorio***

De acuerdo a lo reportado por Hernández [26] la biomasa resultante del cultivo de *Dunaliella salina* se debe acondicionar en condiciones de agitación, se filtra al vacío, se extrae el β-caroteno para finalmente extraer el glicerol con isopropanol. Este procedimiento es relativamente sencillo, no necesita reactivos ni equipos especiales y garantizó un rendimiento del 4 al 5 %.

## Resultados y discusión

### *Condiciones fisicoquímicas de desarrollo de la microalga Dunaliella sp.*

Una vez realizado el muestreo de cinco puntos (estaciones experimentales) en la salina “Las Cumaraguas”, se realizaron los análisis de laboratorio de los siguientes parámetros: pH, turbidez, salinidad, oxígeno disuelto y fósforo total (ver tabla 2).

**TABLA 2. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS OBTENIDOS DE *Dunaliella sp.*, EN LA SALINA “LAS CUMARAGUAS”**

Parámetro	pH	Turbidez (UNT)	Salinidad ( $\mu$ S/cm)	Oxígeno disuelto (OD) (mg/L)	Fósforo total (ppm)
Estación 1	8,68	36	253 746	0,06	Cantidad menor al valor mínimo indicado por el método
Estación 2	8,67	44	234 950	0,06	
Estación 3	8,65	40	253 746	0,06	
Estación 4	8,62	40	234 950	0,06	
Estación 5	8,62	40	244 348	0,06	
Valor promedio	8,65	40	242 348		
Desv. Estándar	0,03	2,83	10 407,8		
Coef. Variación (%)	0,32	7,07	4,29		
Sesgo estandarizado	-0,008	0,000	0,553		
Curtosis estandarizada	-1,234	0,913	-1,519		

Al realizar el análisis estadístico se evidencia que las muestras cumplen con una distribución normal de acuerdo a los valores de sesgo y curtosis estandarizadas y que los coeficientes de variación alrededor del valor medio son pequeños.

El pH obtenido es cercano a los reportados en la bibliografía consultada. Se han reportado valores de pH superiores a 8,3 [27]. Se plantea que el pH óptimo para el crecimiento de *Dunaliella sp.*, se encuentra entre 7 y 9 en medios de cultivo [28]. Por lo anterior, se trabajará al pH medio obtenido.

El valor de OD encontrado en este estudio permite clasificar el tipo de ambiente analizado en un medio hipóxico (OD 1-5 mg.L<sup>-1</sup>) propicio para la generación de un estrés ambiental, el cual caracteriza la formación de una forma evolutiva de cisto por parte de la microalga *Dunaliella sp.* A este bajo nivel de oxígeno se hace casi exclusivo el crecimiento de esta microalga ya que, en este ambiente, las especies piscícolas, e incluso gran parte de muchas microalgas del plancton marino no sobreviven, lo que



hace a *Dunaliella sp.* un microorganismo “extremo” por su capacidad para desarrollarse en ambientes con poco oxígeno [29].

Una vez establecidos los parámetros fisicoquímicos donde se desarrolla la microalga, se tiene que el tiempo de crecimiento en la fase exponencial son 21 días, con lo cual se logra una densidad celular de  $10^{30}$  cel/L.

Se debe determinar el contenido de humedad de la biomasa producida según el método gravimétrico a fin de conocer la cantidad de biomasa húmeda que entra realmente al proceso de obtención (ver tabla 3).

**TABLA 3. CONTENIDO DE HUMEDAD EN LA BIOMASA**

Biomasa	% Humedad	Valor promedio	Desviación estándar	Coeficiente de Variación
	% H <sub>1</sub> =83,72 %			
	% H <sub>2</sub> =80,44 %			
	% H <sub>3</sub> =78,84 %			

***Descripción del proceso tecnológico para la obtención de β-caroteno y glicerol***

La demanda mundial de β-caroteno está alrededor de las 500 toneladas [30]. Por otra parte, en la dieta diaria se recomienda la ingestión de aproximadamente 100 mg de β-caroteno sin efectos secundarios tóxicos. De los 28 946 101 habitantes que tiene Venezuela, el 9 % son adultos mayores, 40,9 % son menores de 15 años y el 50,7 % restante está entre 16 y 60 años, de donde, para cubrir la ingesta diaria de β-caroteno para cada uno de los grupos que lo requieren para potenciar el sistema inmunológico y demás beneficios, se requerirían las cantidades que se reportan en la tabla 4.

**TABLA 4. REQUERIMIENTOS DE β-CAROTENO POR GRUPOS DE EDADES**

	Número	T/año de β-caroteno
Adultos mayores	2 605 149	95,1
Menores de 15 años	11 838 855	432,1
Entre 16 y 60 años	14 501 997	529,3
Total	28 946 101	1 056,5

De este cálculo queda demostrada la demanda del producto en Venezuela, aunque se limitara su uso a los adultos mayores. Como quiera que el estudio solamente se ha realizado a escala de laboratorio, se seleccionó una base de cálculo de producción de una tonelada de β-caroteno al año para dimensionar una planta que pudiera considerarse



piloto y que, de la experiencia en ella, se pudiera extraer la información para realizar el escalado, de resultar ventajosa la propuesta.

Se establecieron 270 días de producción al año, y dado que se conoce que el crecimiento máximo del cultivo se logra a los 21 días, sería posible realizar 13 ciclos de producción en el año.

Por otra parte, se conoce que se obtienen 8 toneladas/ha/año de biomasa seca [30] y si se realizan 13 ciclos, se producirán 0,62 toneladas/ha/ciclo de biomasa seca.

Si se desea obtener 1 tonelada de  $\beta$ -caroteno/año, y se produce en 13 ciclos, se requerirán 77,78 kg de  $\beta$ -caroteno /ciclo.

Teniendo en cuenta el volumen de los tanques de crecimiento, seleccionados como de 100 m<sup>2</sup> con 1 cm de profundidad, y el área que se necesita por ciclo, se tienen 81 estanques de 100 m<sup>2</sup> de área destinados al crecimiento de la biomasa, que se ubicarían en el área de la Salina "Las Cumaraguas". Esta localización puede ser efectuada ya que se dispone de 0,96 km<sup>2</sup> de salina.

A partir de los resultados de la revisión bibliográfica y del esquema del flujo del proceso a escala de laboratorio se procedió a proponer un esquema tecnológico para procesar 2 695 kg de biomasa algal por ciclo, manteniendo los rendimientos obtenidos a escala de laboratorio. Con esta información se realizaron los balances de materiales en hojas de cálculo de *Microsoft Excel* y se obtuvieron los flujos másicos de cada una de las corrientes. La secuencia de etapas del proceso se describe a continuación.

### **Cultivo de la microalga *Dunaliella sp.***

El cultivo de la microalga es la primera etapa del proceso de obtención de compuestos a partir de estas. El cultivo se puede realizar en fotobiorreactores, estanques abiertos o en sistemas cerrados diseñados y ubicados de forma tal que la luz solar incida de forma directa sobre la superficie del agua para que sea absorbida completamente y así lograr la mayor concentración de biomasa. Se seleccionó el estanque abierto por la facilidad de su operación, la absorción de luz solar necesaria para el crecimiento sin tener que suministrar luz artificialmente, la facilidad del mantenimiento y el ser mucho más económico que los fotobiorreactores. Sin embargo, se debe prestar atención a las posibles contaminaciones del medio de cultivo, aunque en las condiciones que se desarrolla *Dunaliella sp.* es difícil el crecimiento de microorganismos que puedan

alterar las condiciones de crecimiento. Se diseñan como estanques rectangulares al aire libre, con una paleta que permite la circulación de las algas [31].

Los cultivos iniciales se siembran en estanques de fibra sintética de 3 m<sup>2</sup> de forma alargada dotados de un sistema de agitación mecánica por paletas. Las condiciones de operación son: profundidad de cultivo de 10 cm, densidad inicial del cultivo 10<sup>18</sup> cel.L<sup>-1</sup>.

Cada tres semanas se efectúa la siembra de los 21 estanques de 3 m<sup>2</sup> a partir de los cultivos de inóculo con una densidad inicial de inoculación de 10<sup>18</sup> cél.L<sup>-1</sup>. Esto se realiza con la finalidad de generar la biomasa necesaria para inocular los sistemas de cultivo masivo y la adaptación progresiva de las algas a las condiciones finales de producción. Los tanques permanecen en régimen estanco, asegurando los requerimientos nutritivos y de salinidad que permitan una producción máxima. Es importante resaltar que la concentración de sal se establece de 10 % a 35 % en p/v para que ocurra aumento de la biomasa.

Para llevar a cabo los cultivos en tanques de 100 m<sup>2</sup> se utiliza como inóculo el cultivo procedente de la cosecha final al cabo de los 21 días producido en los tanques de 3 m<sup>2</sup>, con una densidad celular de 10<sup>30</sup> cél.L<sup>-1</sup>. Estos cultivos de gran volumen se desarrollan en régimen estanco.

La producción de pigmentos es de 34,0 % y el rendimiento de β-caroteno es 45,18 % bajo las condiciones controladas [24].

En la figura 1 se muestra un esquema típico de un estanque para el cultivo de microalgas. Se conoce que la microalga *Dunaliella sp.* no requiere de la adición de CO<sub>2</sub> señalada en la figura ya que se logran mayores crecimientos sin la adición de CO<sub>2</sub> [32]. En la figura 2 se presenta una vista de estanques para el cultivo de microalgas.

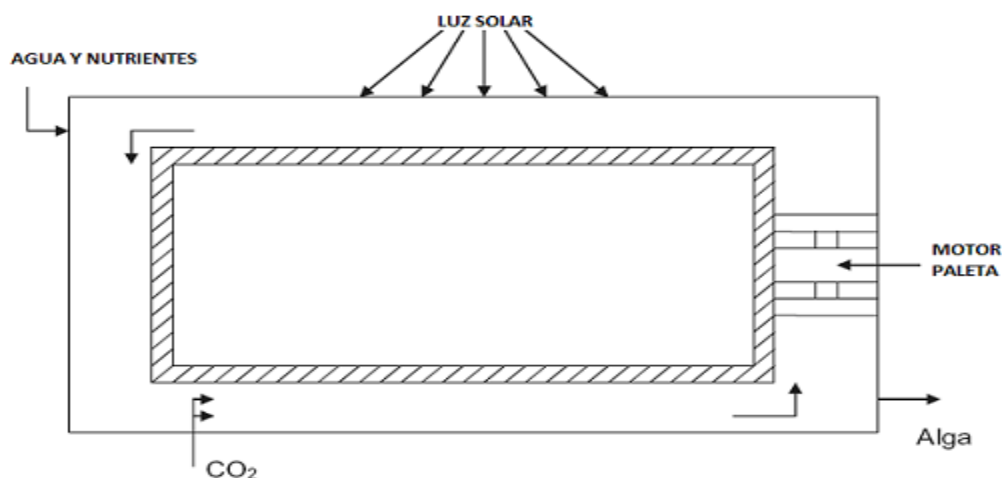


Fig. 1. Esquema de un estanque de cultivo de microalgas



Fig. 2. Cultivo de microalgas en estanques

### Medio de cultivo y factores que influyen en el crecimiento

Para el cultivo de microalgas es necesario tener grandes cantidades de agua, para el crecimiento y la producción de pigmentos. Las fuentes de agua son aguas salinas provenientes del mar. El medio de cultivo utilizado es medio Miguel compuesto por una solución A ( $\text{KNO}_3$  al 20,2 % p/v,  $\text{H}_2\text{O}$ ), una solución B (4 gramos de  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 4 gramos de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HCl}$  (98 %) y  $\text{FeCl}_3$  3 mol/L. Se toman 2 mL de la solución A y se mezclan con 1 mL de la solución B, se agregan a 1 litro de agua de mar y se calienta a  $70^\circ\text{C}$  por 20 min.

### Obtención de $\beta$ -caroteno

#### *Filtración*

La biomasa húmeda se debe adecuar a las condiciones que permitan realizar la extracción de los pigmentos en la etapa posterior, por lo que se debe realizar una filtración a fin de reducir el contenido de agua. Para ello es necesario un filtro tipo Nutsche, un tipo simple de filtro "batch" que consiste en un tanque con una base perforada, que soporta el medio filtrante; de este modo queda retenida la biomasa en el medio filtrante.

### *Centrifugación*

La biomasa se necesita separarla del medio de cultivo mediante la centrifugación. En esta etapa se rompen las membranas plasmáticas de las microalgas y se liberan las clorofilas, carotenos y glicerol presentes. El equipo utilizado es un hidrociclón para realizar la separación por filtración tangencial. Este es un equipo centrífugo con una pared estática, donde la fuerza centrífuga se genera por el movimiento del líquido. Para separaciones de biomasa, es el conveniente ya que se usa para tamaños de partículas desde 4 hasta 500  $\mu\text{m}$ , por lo que la separación se da de forma eficiente y sin necesidad de añadir compuestos químicos. Para procesar la alimentación de biomasa algal, se debe disponer de un hidrociclón de 30 cm de sección cilíndrica, operando con un 90 % de eficiencia [33].

### *Separación (extracción de carotenoides)*

Las etapas de separación y extracción de los compuestos de interés son de vital importancia. Para ello, las microalgas deben separarse primero del medio de cultivo en el que se encuentran diluidas y después extraerse los componentes buscados (carotenoides) de las células. Una vez que se haya separado la biomasa del medio de cultivo, se necesita extraer todo el contenido de pigmentos presentes en la fase orgánica. Para ello se debe adicionar algún solvente y así disolver todo el contenido de lípido en el mismo. En esta etapa se realiza una primera extracción, agregando como agentes extractores para la obtención de los carotenoides totales, acetona y hexano en proporciones 1:1 para la acetona y 3:1 para el hexano. Esto se realiza en un tanque con agitador de paletas de 1  $\text{m}^3$ , equipo usado para la mezcla de fluidos con viscosidades del orden de 50 Pa.s, [33].

Es importante destacar que se requiere que los solventes se recuperen para reducir costos de operación y proteger el medio ambiente. De acuerdo a la bibliografía, esta sección estará integrada por una unidad de destilación atmosférica, con enfriadores después de los condensadores para evitar las pérdidas de solvente.

### *Extracción de $\beta$ -caroteno*

Para la extracción de  $\beta$ -caroteno, la masa de carotenoides separada se trata con hexano como agente extractor líquido. Se seleccionó el hexano por ser el solvente de uso alimentario comúnmente utilizado con el cual se obtienen mejores rendimientos, sin embargo, se debe poner atención desde el punto de vista toxicológico y ecológico. Esto ocurre en el mismo tanque agitador. Hay unidades de recuperación de solventes recomendadas para separar hexano, acetona e isopropanol del agua [34].

### ***Evaporación***

Una vez separado el  $\beta$ -caroteno del resto de los pigmentos, se realiza una evaporación para extraer el agua de la fase acuosa y obtener solamente el pigmento seco. Para esto es necesario un evaporador tipo marmita ("kettle"), con tiempo de retención de 6,48 h, de capacidad de evaporación de 0,15 a 1,0 kg/h.m<sup>2</sup> de área de calor transferido, por lo que se requiere una unidad de 111 m<sup>2</sup> área de transferencia [35].

### ***Obtención de glicerol***

Para la extracción de glicerol a partir de la microalga, la corriente proveniente del separador de las líneas principales debe ser sometida a un acondicionamiento para obtener el producto deseado.

### ***Acondicionamiento de la mezcla***

Para la obtención de glicerol, la fase resultante de la extracción de carotenoides pasa hacia un tanque de chaqueta con agitadores de paleta; la capacidad del tanque es de 10 m<sup>3</sup>. Para acondicionar la mezcla se agrega hidróxido de calcio (0,3 kg/kg de biomasa). La mezcla se enfría desde 100 °C a 50 °C, utilizando agua como medio de enfriamiento.

### ***Filtración***

La mezcla acondicionada pasa a un filtro tipo Nutsche de modo que las impurezas queden en el medio filtrante y el líquido viscoso pasa a la neutralización.

### ***Neutralización***

La mezcla resultante pasa al tanque de chaqueta con agitadores de paleta, de 1 m<sup>3</sup> para ajustar el pH de 6-7 con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50 % (1,5 L/kg de Ca(OH)<sub>2</sub>).

### ***Evaporación al vacío***

La disolución obtenida pasa a una unidad de evaporación para concentrar la mezcla a extraer. En esta etapa se utiliza un evaporador tipo cazoleta, con una capacidad de 1,5–15 kg/h.m<sup>2</sup> de área de calor transferido, tiempo de retención de 3 h y de transferencia de 25,06 m<sup>2</sup> [33]. Esta operación se realiza a una presión de 97 kPa, o sea, ligeramente menor que la atmosférica.

### ***Extracción***

La mezcla resultante de la evaporación pasa a la unidad de extracción, añadiendo isopropanol (relación molar isopropanol/mezcla 3:1) y se espera 3 h. En esta etapa, se reporta un rendimiento del 5 % de glicerol en relación con la biomasa húmeda.

### *Evaporación final*

El glicerol cantidad técnica obtenido pasa a un evaporador tipo marmita (“kettle”), con tiempo de retención de 6,48 h, de capacidad de evaporación de 0,15 a 1,0 kg/h.m<sup>2</sup> de área de calor transferido, por lo que se requiere un área de transferencia de 66,33 m<sup>2</sup> área de transferencia [33], obteniéndose un rendimiento de 95 % [35].

En la figura 3 se presenta el esquema del flujo tecnológico propuesto.

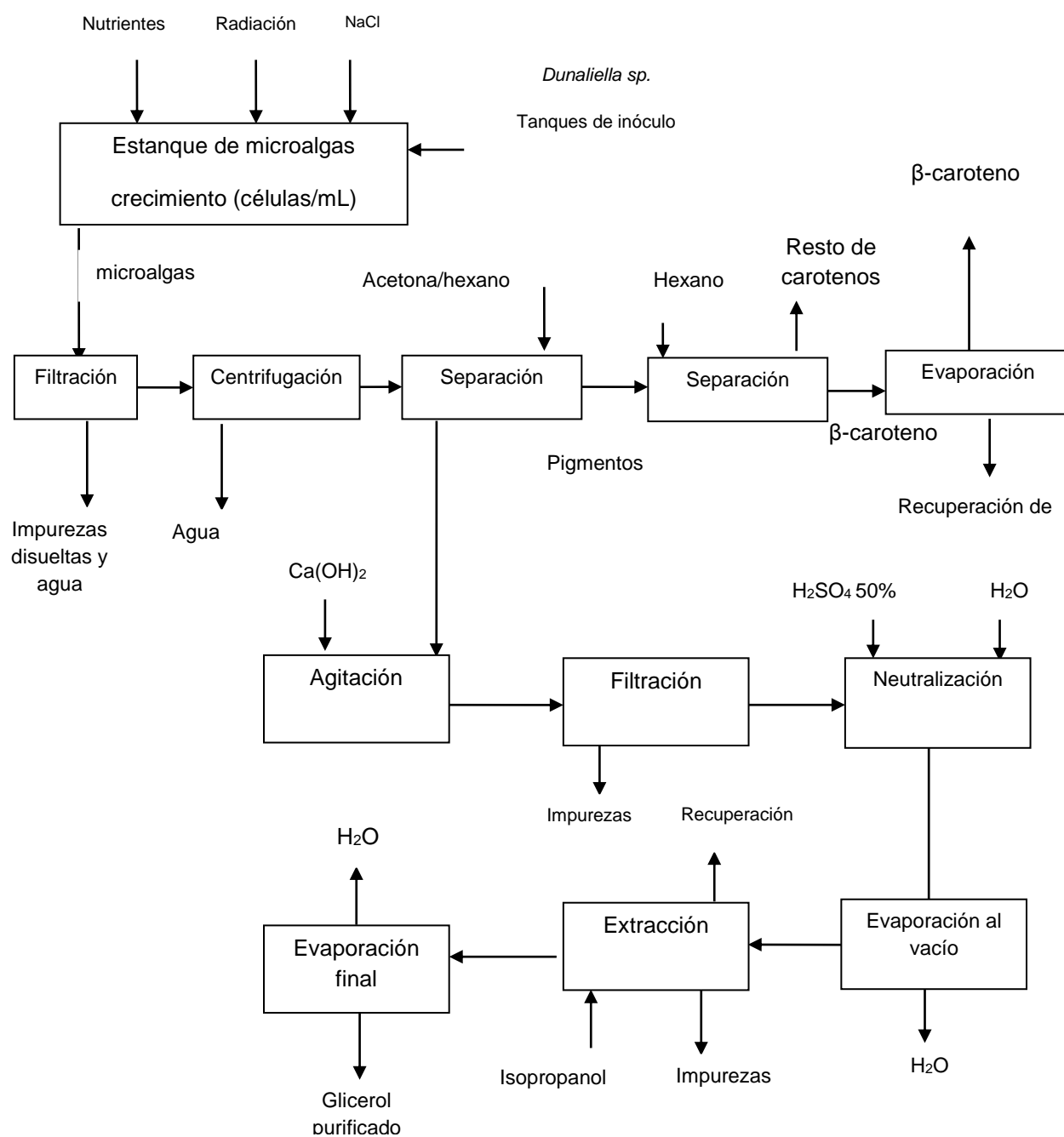


Fig. 3. Proceso de extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol utilizando solventes orgánicos

Un resumen de los resultados principales del balance de materiales se muestra en la tabla 5.

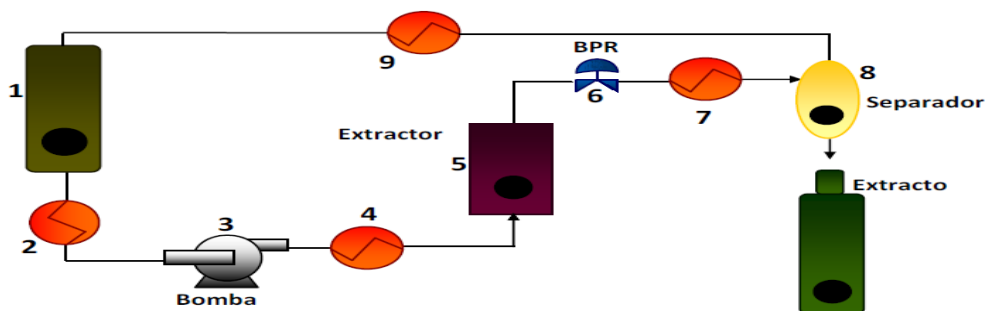


**TABLA 5. RESUMEN DEL BALANCE DE MATERIALES PARA LA OBTENCIÓN DE  $\beta$ -CAROTENO Y GLICEROL PARA UN CICLO DE OPERACIÓN**

Biomasa húmeda que entra (kg)	2 694,74
Pigmentos totales (kg)	183,24
$\beta$ -caroteno obtenido (kg)	77,80
Alimentación a la línea de glicerol (kg)	355,71
Glicerol obtenido (kg)	25,60
Solventes a recuperar (kg)	
Mezcla acetona-hexano-agua	634,71
Mezcla isopropanol-agua	404,21

### Esquema para la extracción de $\beta$ -caroteno por fluido supercrítico

Otra alternativa de extracción de  $\beta$ -caroteno es modificar el esquema propuesto sustituyendo las etapas de extracción y evaporación por la unidad de fluido supercrítico (FSC). Con ello se eliminan los consumos de los solventes hexano y acetona. La unidad de FSC consta de un tanque de CO<sub>2</sub> (1), un extractor gas sólido (5), un separador para la recuperación del CO<sub>2</sub> (8), intercambiadores de calor (2, 4, 7 y 9), una bomba (3) y una válvula reguladora (6). En la figura 4 se presenta el esquema de una unidad FSC [36]. La unidad trabaja a condiciones máximas de 50 MPa y 100 °C en el extractor.



**Fig. 4. Esquema de una unidad de extracción con fluido supercrítico**

En la figura 5 se presenta el esquema del flujo tecnológico para la extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol utilizando una unidad de fluido supercrítico.

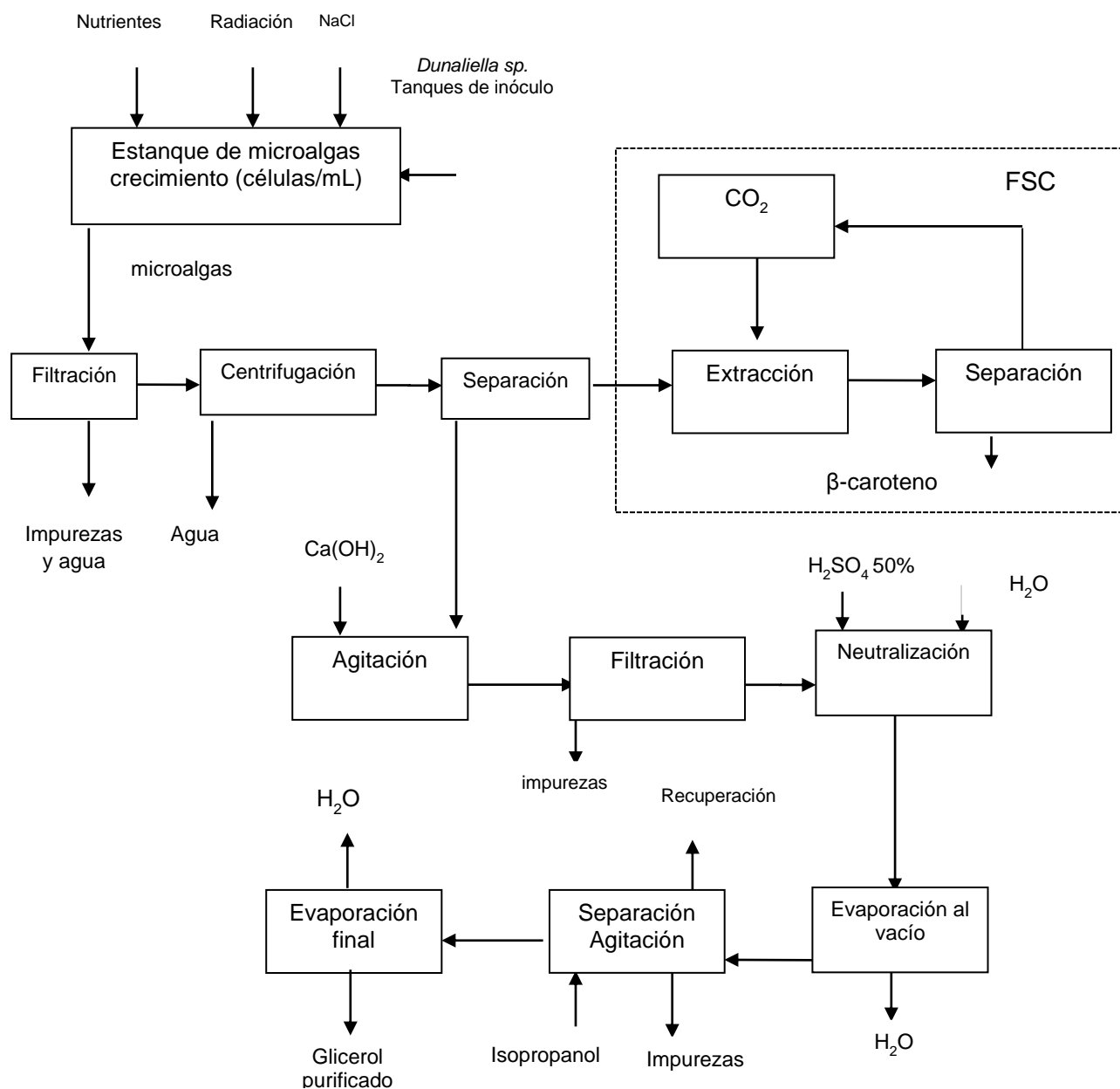


Fig. 5. Proceso de extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico

## Conclusiones

1. Las condiciones fisicoquímicas para *Dunaliella sp.* (pH 8,65; oxígeno disuelto 0,06 mg/L; salinidad 242,348  $\mu$ S/cm; turbidez 40 UNT; fósforo total cantidad mínima detectable), son favorables para la acumulación de  $\beta$ -caroteno y glicerol, lo que confiere a esta microalga una fuente importante de compuestos de alto valor para la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica.

2. *Los resultados de productividad en biomasa como los de carotenos permiten concluir que el cultivo masivo de Dunaliella sp. en tanques abiertos, agitados por paletas permite obtener 15,4 % de  $\beta$ -caroteno respecto a la biomasa.*

3. *El desarrollo del procedimiento permitió dimensionar la extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol mediante los esquemas tecnológicos presentados con un rendimiento de  $\beta$ -caroteno de biomasa: 15,4 % y rendimiento de glicerol de la biomasa: 5 % para la extracción convencional y un rendimiento de  $\beta$ -caroteno de los pigmentos: 70 % y rendimiento de glicerol de la biomasa: 5 % para fluido supercrítico.*

## Referencias bibliográficas

1. GUEDES, A.; AMARO, H.; MALCATA, F. "Microalgae as Sources of Carotenoids". *Marines Drugs*. 2011, **9** (1), 625-644.
2. ACACIO, N. Desarrollo de un procedimiento para la extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol a partir de *Dunaliella sp.* en la Salina "Las Cumaraguas". Tesis en opción al Título de Máster en Análisis de Procesos de la Industria Química. Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz", Cuba, 2014.
3. VELASCO, R.; VILLADA, H.; CARRERA, J. "Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria". *Información Tecnológica*. 2007, **18** (1), 53-57.
4. OLAIZOLA, M. "Commercial development of microalgal biotechnology. From the test tube to the marketplace". *Biomolecular Engineering*. 2003, **20**, 459-466.
5. SPOLAORE, P. *et al.* "Commercial applications of microalgae". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006, **101** (2), 87-96.
6. ALVES RODRÍGUEZ, A.; SHAO, A. "The science behind lutein". *Toxicology letters*. 2004, **150** (1), 57-83.
7. DESMETTRE, T.; LECERF, J. M. "Nutrition et degenerescences maculaires liées a l'age". *EMC-ophtalmologie*. 2005, **2** (3), 202-217.
8. MURRAY, R. *et al.* *Calidad de tomate cereza cosechado en tres estados de madurez*. Producción vegetal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Disciplinas básicas e investigaciones, 2004.
9. CHIDAMBARA, M. *et al.* "In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*--a green microalga". *Life Sci*. 2005, **76** (12), 1381-1390.
10. TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.; TEW, K. "The role of carotenoids in the prevention of human pathologies". *Biomed Pharmacother*. 2004, **58** (2), 100-110.

11. VORST. *Production of carotene with chemostat cultures of Dunaliella*. Institute of molecular cell biology. Amsterdam: Universiteit van Amsterdam, 1995.
12. OREN, A. "A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005". *Saline Systems*. 2005, **1** (2), 1-14.
13. BRUNNER, G. "Supercritical fluids: technology and application to food processing". *Journal of Food Engineering*. 2005, **67**, 21-33.
14. HURTADO, B. A. M. Estudio del proceso de extracción de componentes minoritarios de aceite de oliva con CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente. Departamento de Ingeniería Química. Madrid, España, Universidad Autónoma de Madrid, 2002.
15. ROSA, P. *et al.* "Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction". *J. Food Eng.* 2005, **67**, 235-240.
16. GOLI, A.; BARZEGAR, M.; SAHARA, M. A. "Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts". *Food Chemistr.* 2005, **92**, 521-525.
17. RAMÍREZ, P. *et al.* "Separation of rosemary antioxidant compounds by supercritical fluid chromatography on coated packed capillary columns". *J. Chromatogr. A*. 2004, **1057**, 241-245.
18. YÉPEZ, B. *et al.* "Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction". *Fluid Phase Equilibria*. 2002, **194**, 879–884.
19. GRIGONIS, D. *et al.* "Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloe odorata*)". *J. Supercrit. Fluids*. 2005, **33**, 224-233.
20. GIRALDO, F. *et al.* "Comparación de métodos de extracción de oleorresina de paprika (*Capsicum annuum L.*) convencionales con una tecnología amigable al medio ambiente". *Producción + Limpia*. 2009, **4** (1), 17-26.
21. MENDIOLA, J. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid, 2008.
22. ACACIO, N. *et al.* Condiciones para la Extracción de  $\beta$ -caroteno y Glicerol a partir de *Dunaliella sp.* en: Memorias de la 17 Convención Científica de Ingeniería y Arquitectura 17 CCIA. III Congreso Internacional de Ingeniería Química,

- Biотecnológica y Alimentaria CIIQBA 2014. CUJAE, E. D. L. La Habana, 2014. pp.1-987.
23. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. APHA, 1989.
24. ARAUJO, J.; CHIRINOS, J.; VEGAS, K. Obtención de  $\beta$ -carotenos con fines industriales a partir de biofactorías fotosintéticas de *Dunaliella* sp. del sector Las Cumaraguas. Venezuela: Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda (UNEFM), 2012.
25. ACACIO, N. *et al.* “Desarrollo de un procedimiento para la extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella* sp. en la salina Las Cumaraguas”. *Revista Cubana de Química*. 2013, **25** (2), 214-228.
26. HERNÁNDEZ, L.; QUINTANA, M.; MORRIS, H. “Obtención de glicerol a partir de la Microalga *Dunaliella salina*”. *Revista Cubana de Farmacia*. 2000, **34** (2), 134-137.
27. BOROWITZKA, L. J.; BOROWITZKA, M. A. “Commercial production of  $\beta$ -carotene by *Dunaliella salina* in open ponds”. *Bull Mar Sci*. 1990, **47**, 244-252.
28. BEN AMOTZ, A.; AVRON, M. “The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae)”. *J. Phycol.* 1989, **25**, 175-178.
29. CISTERNA, J.; SALDÍAS, G.; CÁCERES, C. “Efecto de la hipoxia en la conducta de forrajeo de *Cancer setosus* (Molina, 1782) (Crustacea: Decapoda) alimentado con *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854)”. *Revista de biología marina y oceanografía*. 2008, **43** (2), 419-423.
30. ITC. *Instituto Tecnológico de Canarias. Proyecto Algalimento*. [2014]. Disponible en: <http://www.itccanarias.org/web/itc/proyectos-biотecnologia/Algalimento.jsp?lang=es>
31. EMEKA, U. *et al.* “Constraints to large scale algae biomass production and utilization”. *J. Algal Biomass Utiln*. 2012, **3** (2), 14-32.
32. ABU REZQ, T. *et al.* “Induction and extraction of  $\beta$ -carotene from the locally isolated *Dunaliella salina*”. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 2010, **1** (4), 58-83.
33. SINNOT, R. K. *Chemical Engineering Design*. 4 edition. Elsevier: Coulson & Richardson's Chemical Engineering, 2005.

34. IMPQ. *Máquinas destiladoras*, [2014]. Disponible en:  
<http://www.impq.com.mx/destiladores/>
35. MONTHIEU, C. Estudio técnico económico de la extracción de los lípidos de las microalgas para la producción de biodiesel. Madrid: Universidad Pontificia Comillas, 2010.
36. DOMÍNGUEZ, L.; PARZANENE, M. Alimentos argentinos. Tecnologías para la industria alimentaria. Ficha No 1. [Disponible en: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar>]