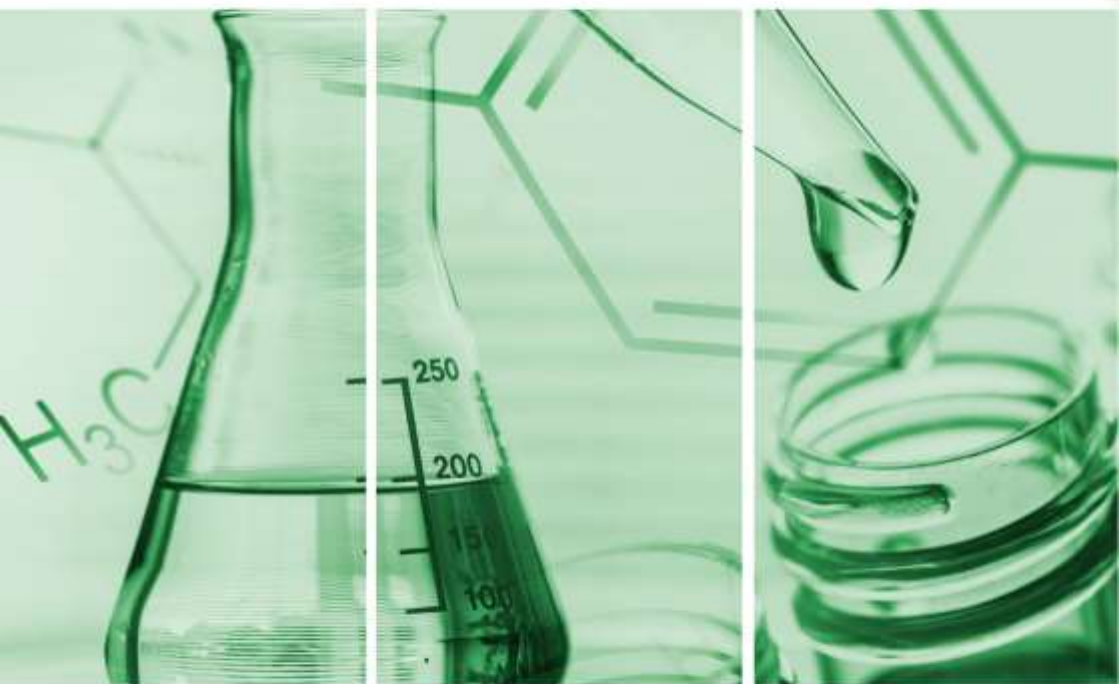




## Tomo II: Análisis bromatológico de biomasa



**FORTALECIMIENTO DE LA FORMACIÓN CIENTÍFICA DEL PROGRAMA INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL Y EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN GIADAI A TRAVÉS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE RADIACIÓN UV-C**

Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ

Editorial: Instituto Universitario de la Paz – UNIPAZ

Representante Legal: Oscar Orlando Porras Atencia Página web:

[www.unipaz.edu.co](http://www.unipaz.edu.co)

ISBN:

Ing. Esp. Ana Milena Salazar Beleño

**Directora Escuela de Ingeniería Agroindustrial**

PhD. Oscar Orlando Porras Atencia

Mba. Janice Ballesteros Bandera

Ing. Esp. Ana Milena Salazar Beleño

Ing. Esp. Luisa Fernanda Medina Caballero

Ing. Daniel Augusto Buitrago Ibañez

Ing. Dally Esperanza Gafaro

**Autores**

Ing. Esp. Luisa Fernanda Medina Caballero

Ing. Daniel Augusto Buitrago Ibañez

**Diseño**

Dayanna Medina Muñoz

**Fotografía**

Grupo de Investigación en Innovación, Desarrollo Tecnológico y  
Competitividad en Sistemas de Producción Agroindustrial

GIADAI

**Grupo de Investigación**



## PRÓLOGO

Desde el Instituto Universitario de la Paz, como parte de sus funciones de formación académica de alto nivel a nivel territorial con proyección nacional, genera estrategias para fomentar la innovación en los procesos de investigación y proyección social. Para esto, se generan espacios en la formulación e implementación de proyectos como los liderados desde el programa de Ingeniería Agroindustrial, el cual busca divulgar mediante este documento, los procedimientos empleados para la medición bromatológica de la biomasa generada por *Arthrospira platensis*.

En relación a lo anterior, el proyecto pretende dar a conocer nuevas formas de generación de alimentos, los cuales no son producidos bajo métodos tradicionales, sin embargo, es necesario validar las mediciones mínimas la cuales debería cumplir un alimento normal, estos procedimientos al ser aplicados a las microalgas los cuales son estructuralmente distintos como matriz en esto radica la importancia de este trabajo.

Es por eso, que el desarrollo de este manual de microalgas tomo II: Análisis bromatológico de la biomasa, recoge, los principales análisis fisicoquímicos realizados en el desarrollo del proyecto a la biomasa extraída de los cultivos algales, la descripción metodológica además compilar y describir los procedimientos ayudará a los estudiantes y personas interesadas en la medición de parámetros de control aplicables a este tipo de matriz

*Daniel Augusto Buitrago Ibañez*



## CONTENIDO

	pág.
1.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA BIOMASA	7
1.2. PORCENTAJE DE HUMEDAD POR GRAVIMETRÍA.	7
1.3. DETERMINACIÓN DEL pH POR DISOLUCIÓN EN AGUA	8
1.4. MATERIAL EXTRAÍBLE.	8
1.5. CENIZAS EN MUFLA	9
2. ANÁLISIS QUÍMICOS EN LA BIOMASA DE MICROALGAS	11
2.1. PROTEÍNA EQUIPO KJELDAHL.	12
2.3. MEDICIÓN DE $\beta$ -CAROTENO	17
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19



## TABLA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
Figura 1. Toma de pH en biorreactor	8
Figura 2. Proceso de extracción de lípidos de la biomasa de spirulina.	9
Figura 3. Equipos para determinación de ceniza	10
Figura 4. Titulación de proteína.	13
Figura 5. Equipo de filtración por vacío, uv – vis y centrifuga	14



# **1. ANÁLISIS FÍSICOS EN LA BIOMASA DE MICROALGAS**

## 1.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA BIOMASA

Para la caracterización de la biomasa es determinante para entender los parámetros mínimos del producto final, es importante, entender que algunas mediciones dependen, de la humedad en la muestra por lo que se aconseja revisar el parámetro de humedad como factor determinante antes de la preparación del analito, del mismo modo el secado de biomasa no puede exceder los 60°C para evitar perder compuestos biológicos importantes para la nutrición, como vitaminas, minerales y oligoelementos.

## 1.2. PORCENTAJE DE HUMEDAD POR GRAVIMETRÍA.

Se pesó una muestra de 5 g de biomasa en un crisol previamente lavado, secado y pesado por una hora a 105°C. la muestra es llevada al horno, transcurrido 1 hora se lleva al desecador por 15 minutos y se procede a registrar el peso, este procedimiento se repite hasta que la masa no varíe en más de 2 a 4 mg, para realizar el cálculo para la obtención del porcentaje de humedad (w) se utilizó la siguiente ecuación: NTC 4888.

$$\%Extracción = \frac{m_{inicial} - m_{final}}{m_{muestra}} * 100\%$$

Donde, %Extracción es el porcentaje de humedad de la muestra,  $m_{inicial}$  es la masa inicial de la biomasa más el crisol,  $m_{final}$  es la masa de la muestra después del secado,  $m_{muestra}$  es la masa de la muestra de la biomasa al inicio.

## 1.3. DETERMINACIÓN DEL pH POR DISOLUCIÓN EN AGUA



Se toman 2 g de la muestra y se introducen en agua, se disuelve por 5 minutos y se toma el pH, esto se repite hasta que el pH sea constante y se reporta el resultado.

*Figura 1. Toma de pH en biorreactor*



Fuente: Autores

#### **1.4. MATERIAL EXTRAÍBLE.**

Para determinar el porcentaje de extraíbles se realizó una extracción soxhlet utilizando 300 ml de cloroformo-metanol en relación 2:1 y 20 gramos de biomasa, durante 4 horas, suministrando calor por medio de una placa de calentamiento a una temperatura de 80°C. Posterior a la extracción, se retira la muestra (libre de extraíbles) y se deja secar por 48 horas a temperatura ambiente, luego de este tiempo la muestra es secada en un horno de convección interna a 105°C durante 4 horas. Finalmente, la muestra es llevada a un desecador por 15 minutos, se procedió a pesar y registrar la masa. El proceso se realizó por





triplicado y se determinó el porcentaje de extraíbles de acuerdo a la siguiente expresión matemática:

$$\%Extracción = \frac{m_{inicial} - m_{final}}{m_{inicial}} * 100\%$$

Donde, %Extracción es el porcentaje de extraíbles de la muestra en %,  $m_{inicial}$  es la masa inicial de muestra en g,  $m_{final}$  la masa final luego del proceso de extracción y secado en g.

*Figura 2. Proceso de extracción de lípidos de la biomasa de spirulina.*



Fuente: Los autores.

## 1.5. CENIZAS EN MUFLA

Para la determinación de cenizas se utilizó la metodología establecida en la norma TAPPI T 211-om-02 (TAPPI 1999). Se pesaron 2 g de biomasa, y se llevaron a la mufla a una temperatura de 525°C (Figura 3.), por un tiempo de dos horas, luego de esto, la muestra se trasladó al desecador durante 20 minutos,



posteriormente se procedió a registrar su masa para determinar el porcentaje de cenizas. La prueba se realizó por triplicado y se determinó el porcentaje de cenizas mediante la siguiente ecuación:

$$\%Cenizas = \frac{m_f - m_c}{m_i} * 100$$

Donde,  $m_f$  es la masa final de la muestra más el crisol con tapa,  $m_c$  masa del crisol vacío en g, y  $m_i$  es la masa inicial de la muestra en g.

*Figura 3. Equipos para determinación de ceniza*



Fuente: Los autores.



## **2. ANÁLISIS QUÍMICOS EN LA BIOMASA DE MICROALGAS**

## 2.1 PROTEÍNA EQUIPO KJELDAHL.

Para determinar el contenido de proteína se utilizó el equipo Kjeldahl marca Velp Scientifica, añadiendo 1 g de biomasa a los tubos de digestión con 13 ml de ácido sulfúrico concentrado (96-98%), 3,5 g de sulfato de potasio y 3,5 mg de selenio como catalizador. Posteriormente se llevó a digestión durante 60 minutos a 420°C. transcurrido el tiempo se realizó la destilación en la cual los tubos son colocados en el UDK, y se adiciona 50 mililitros de agua destilada, 30 mililitros de ácido bórico (H3BO3), y 50 mililitros de Hidróxido de sodio (NaOH), durante 5 minutos. Para la titulación se utiliza ácido clorhídrico 0,2 N, el factor titulante para el método implementado es de 6,25. La determinación se realiza mediante la ecuación:

$$\%N = \frac{[V1 - VB] * C * 0,014 * 100}{m}$$

Donde, V1 ml de titulante consumidos en la muestra (mL), VB ml de titulante consumidos en el blanco (mL), C es la concentración de titulante (mol / L), m masa de la muestra en g.

Para determinar el porcentaje de proteína se implementa la siguiente ecuación donde Pf es el factor proteico.

$$\%P = \%N * Pf$$



*Figura 4. Titulación de proteína.*



Fuente: Los autores.

## **2.2. MEDICIÓN DE CLOROFILAS**

La clorofila se mide filtrando una cantidad conocida de agua de muestra a través de un filtro, generalmente un filtro de fibra de vidrio.

### **Preparación de la muestra:**

Según el estado trófico y la concentración de algas prevista, homogeneizar 0,05 – 2 L de muestra estabilizada y filtrar sobre un filtro de fibra de vidrio o centrifugar a 1000 x g durante 20 minutos. Tome nota del volumen de muestra utilizado.

### **Equipamiento y reactivos:**

A continuación, se relacionan los equipos necesarios para el análisis en la figura 5.



Figura 5. Equipo de filtración por vacío, UV – Vis y centrifuga



Fuente: Los autores.

- Sonicador Ultrasónico o Mortero de vidrio.
- Centrífuga de mesada: 3000 rpm.
- Solución saturada de  $\text{MgCO}_3$ : Agregar 1 g de  $\text{MgCO}_3$  a 100 mL de agua reactiva. Filtrar sobre membrana de fibra de vidrio de  $1\mu\text{m}$  de poro.
- Acetona 90%: 90 partes de acetona + 10 partes de solución saturada de  $\text{MgCO}_3$ .

Espectrofotómetro UV - Visible: Ancho de banda 0.5 a 2.0 nm.



- Cubetas.
- Ácido clorhídrico, HCL, 0.1N.
- Patrón de clorofila a: 1 mg de *Anacystis Nodulans* - Sigma.

Concentración del analito: Homogeneizar suavemente la muestra.

- Filtrar la muestra sobre membrana de fibra de vidrio de 0,7 a 1  $\mu\text{m}$  de poro.
- Antes de completar la filtración agregar 20 mL de solución de  $\text{MgCO}_3$ .
- Envolver al resguardo de la luz en papel de aluminio y colocar en freezer no más de 28 días, si no se va procesar inmediatamente.

Extracción: Ruptura Celular con Ultrasonido y Mortero con Solvente Acetona 90% + 10%  $\text{MgCO}_3$ .

- Tiempo y temperatura de extracción 2 a 24 h a 4 °C.
- Colocar la membrana con el contenido de fitoplancton en un tubo de centrífuga con 5 mL de acetona al 90%.
- Romper las células de fitoplancton con disruptor celular en un tubo de centrífuga, o en mortero. Ajustar el volumen total a 10 mL con acetona 90%.
- Dejar 2 a 24 h a 4 °C en oscuridad



Clarificación: Centrifugación: 3000 rpm – 20 min Extraer 5 ml del extracto clarificado con pipeta.

- Filtración: jeringa con filtro 0,45  $\mu\text{m}$  de poro resistente a solventes.

### **Cuantificación.**

- Lectura del extracto en espectrofotómetro.
- Longitudes de onda: 664 y 750 (antes de acidificar 665 y 750 (acidificado con HCL 0,1 N).
- Aplicar la fórmula para determinar concentración de Clorofila a.

Nota aclaratoria. “La clorofila a” puede ser sobreestimada incluyendo a los feopigmentos, que absorben cerca de la misma longitud de onda que “Clorofila a”.

- Clorofila a pura es convertida en feofitina a pura por acidificación, la relación es Clorofila a pura es convertida en feofitina a pura por acidificación, la relación es Significa que no hay feofitina a Estado fisiológico de las células es excelente Feofitina a pura no se produce la reacción al acidificar y la relación es Significa que todo es feofitina a Estado fisiológico de las células es senescente, Las mezclas de clorofila a y feofitina a tienen rangos que van entre 1,0 y 1,7. Usando Acetona 90% como solvente Cálculo y expresión de los resultados.

- Restar las absorbancias leídas a 750 nm sin acidificar y acidificadas a las lecturas a 664 y 665 nm. Con las absorbancias





corregidas, calcular la concentración de Clorofila a (664-750) – (665a-750a).

26,7= Corrección de absorbancia 664 y 665= DO corregidas  $V_1$  es el volumen del extracto en L,  $V_2$  es el volumen de la muestra en  $m^3$ , L es el recorrido de luz de la cubeta en cm Las unidades en  $mg/m^3$  son equivalentes a  $\mu/L$ .

El valor 26,7 es la absorbancia corregida e igual  $A \times K$ .

- A= Coeficiente de absorbancia para clorofila “a” a 664 nm= 11,0.
- K= Corrección por acidificación= 2,43.

### 2.3. MEDICIÓN DE $\beta$ -CAROTENO

Dependiendo del nivel de información requerido, los carotenoides se pueden analizar de tres maneras: i) determinación de provitamina A solamente; ii) determinación de provitamina y carotenoides principales no vitamina A; iii) determinación de la composición completa de carotenoides.

Con el fin de simplificar los muestreos, la medición se realiza sobre los carotenos totales de la biomasa de la siguiente manera.

#### Medición

Colocar en un embudo de separación 50 mL de muestra y 50 mL de acetona.



Homogenizar suavemente, dejar de cantar y agregar nuevamente acetona hasta realizar una extracción. El proceso se debe repetir hasta extraer completamente los pigmentos.

Los pigmentos extraídos se deben llevar al roto evaporador para realizar la concentración de la mezcla.

Luego de concentrar se pesa el material extraído.

Para la siguiente parte se agregan 15 mL de hexano grado HPLC para evitar interferencias en la muestra.

Posteriormente, pesar 1 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Aplicar a la solución anterior y dejar reposar 15 min para reducir la humedad, se recomienda agitar suavemente de 2 a 3 veces durante el tiempo de espera.

Pasado el tiempo se trasiega la solución a un balón aforado de 100 mL, se lleva a medida con n-Hexano, se mezcla suavemente, para homogenizar.

Tomar 2 mL de la solución con pipeta y transferir en un tubo de vidrio, se agregan finalmente 8 mL de n- Hexano.

De la solución de anterior se trasfiere a las cubetas de cuarzo, del espectrofotómetro, realizar la medición a 490 nm.

Para el cálculo se lleva al roto evaporador la solución que contiene el hexano, se pesa la muestra para obtener el peso de los carotenos totales.

Para el cálculo de la concentración:



$$\mu\text{lg} = \frac{A_{490\text{nm}} * VF * 10^4}{2592 * PM}$$

Para el cálculo se tiene en cuenta los siguientes valores:

*A 490nm: absorbancia media a 490nm.*

*10<sup>4</sup>: constante de conversión de unidades µg /g.*

*VF: volumen final mL.*

*2592: coeficiente de extinción molar de carotenos en hexano.*

*PM: Peso de la muestra en gramos.*



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acacio-Chirino, Noel J.; Zumalacárregui-de-Cárdenas, Lourdes M.; Almera-Medina, Johemar C.; Barreno-Medina, Dilia M.; Betancourt-Betancourt, Rosa A.; Colina-Luchón, Rafmery L.; Araujo-Blanco, José A. Desarrollo de un procedimiento para la extracción de -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella* sp. en la salina Las Cumaraguas Revista Cubana de Química, vol. XXV, núm. 2, enero-julio, 2013, pp. 214-228

AOAC (Asociación de químicos analíticos oficiales) (1996). Oficial métodos de análisis. AOAC: Arlington, Suplemento de marzo.

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN PESQUERA. Protocolo de microalgas: Protocolo de microalgas para la producción de alimento vivo en las instalaciones del CRIP. Manzanillo, Colima: Tecnología y Planeación para el Desarrollo Sustentable, s.f. p. 21-22.

HERRERA PERALTA, Celic, Cantú Lozano, Denis y Medina Meza, Ilce Gabriela. Determinación de perfil de aminoácidos y fitoquímicos de *Spirulina platensis* usando suero lácteo como fuente de carbono. 2019. <http://repositorios.orizaba.tecnm.mx:8080/xmlui/handle/123456789/331>

PÉREZ HERNÁNDEZ, Teresa Martha Isabel Aldana J, Ligia Inés Rodríguez. Validación de un método para la determinación de beta-caroteno en aceite de palma por HPLC con detector Uv. Fundación Universidad Jorge Tadeo Lozano, p 2- 4



ROJAS TRIVIÑO, Alberto. Concepto y practica de microbiología general. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 2011.

SÁNCHEZ, L. Estudios sobre la utilización de biomasa algal como materia prima alternativa para la producción de bioetanol (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Mar del Plata, 2016, 136p.





**UNIPAZ**  
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE LA PAZ

ESCUELA DE  
**INGENIERIA**  
**AGROINDUSTRIAL**