

**Determinación espectrofotométrica, de carbohidratos aprovechables en las algas *Ulva sp* y *Chaetomorpha sp* para la producción de etanol que funcione como biocombustible, por el método de la antrona**

Spectrophotometric determination the quantity of profitable carbohydrates in *Ulva sp* and *sp Chaetomorpha* algae for the production of ethanol that works as biocombustible by the method anthrone

**Reynaldo Chang** <sup>(1)</sup>

predicadorenhongkong@gmail.com

**Liliana Murillo** <sup>(2)</sup>

Lilianac28@gmail.com

(1) Universidad Católica Andrés Bello – Instituto de Teología para Religiosos.

(2) Universidad Pedagógica Experimental Libertador. Instituto Pedagógico de Caracas, Laboratorio de Química Analítica, Caracas, Venezuela

Artículo recibido en junio 2016 y publicado en enero 2017

**RESUMEN**

*Se realizó una determinación espectrofotométrica por el método de la antrona para la cuantificación de carbohidratos aprovechables en las especies algales *Ulva sp* y *Chaetomorpha sp* con el fin de proponer un método alternativo y menos contaminante que sirva de combustible. Los resultados obtenidos de la determinación fueron: (a) porcentaje de humedad: 90,28 11 y 87,4239 % para la *Ulva sp* y la *Chaetomorpha sp* respectivamente. (b) el índice de correlación lineal de las curvas fue de 0,99 (c) las concentraciones de carbohidratos aprovechables de las algas estudiadas fueron: para las *Ulvas sp* de 35375,33 + 3,3139 ppm y para las *Chaetomorphas sp* 48176,31 + 2,7193 ppm cantidades considerables siendo esta últimas las más ricas en carbohidratos y las que podrían dar el mayor aporte de azúcares a la producción de biocombustibles.*

**Palabras clave:** *Espectroscopia; antrona; carbohidratos; algas; *Ulva sp*; *Chaetomorpha sp*; hidrólisis; biocombustibles*

## ABSTRACT

*It was realized a spectrophotometrical determination, by the antrona method for the quantification of profitable carbohydrates in the species algae *Ulva sp* and *Chaetomorpha sp* with the purpose of proposing an alternative and less polluting method that serves as fuel. The obtained results of the determination were: (a) percentage of humidity: 90,28 11 and 87,4239% for the *Ulva sp* and the *Chaetomorpha sp* respectively. (b) the index of lineal correlation of both curves was of 0,99 (c) the concentrations of profitable carbohydrates of the studied algae were: for the *Ulvas sp* of 35375,33 + 3,3139 ppm and for the *Chaetomorphas sp* 48176,31 + 2,7193 ppm considerable quantities being this last the carbohydrates richest and those that could give the biggest contribution of sugars to the biocombustibles production.*

**Key words:** *Spectroscopy; antrona; carbohydrates; algae; *Ulva sp*; *Chaetomorpha sp*; hidrólisis; biocombustibles*

## INTRODUCCIÓN

Según Corral (2008), el biocombustible es el término con el cual se denomina a cualquier tipo de combustible que derive de la biomasa - organismos vivos o sus desechos metabólicos, tales como el estiércol de la vaca. Los combustibles de origen biológico pueden sustituir parte del consumo en combustibles fósiles tradicionales, como son el petróleo o el carbón.

Las algas son la biomasa más abundante en el planeta y según Menéndez y Fernández (2005) son quizás las grandes desconocidas del mar para la mayoría de las personas, ya que pasan desapercibidas en un mar, en el que los peces y en general todos los animales son los que más llaman la atención a los bañistas y submarinistas. Sin embargo, las algas son un grupo de organismos que por su importancia merece la pena conocer su biología. Por ello, para este proyecto de investigación interesa su posible función como materia prima, biomasa, para la producción de combustibles alternativos Según Graham y Wilcox (2000) las algas son organismos fotosintetizadores de organización sencilla que viven en el agua o en ambientes muy húmedos.

Las especies de interés son la *Ulva sp* y la *Chaetomorpha sp*. La primera de estas es conocida comúnmente como lechuga de mar y Menéndez (2004) la describe como un tallo verde laminar, foliáceo, lobulado, formado por 2 capas de células, que se fija al sustrato por rizoides y que crecen como expansiones de las células basales del tallo. Puede llegar a medir un metro de longitud, de contorno más o menos redondeado a veces dividido.

En cuanto a la *Chaetomorpha*, Rudman (2005) señala que es un alga verde de filamentos no ramificados que consiste de grandes células dispuestas en fila de extremo a extremo. Los filamentos suelen ser rígido y gruesos y su forma varía entre rectos, torcidos y en grupos se parece a un trozo de césped o a una enmarañada alfombra para los efectos de esta investigación, es considerado como el tipo de biocombustible sobre el cual se hará mayor énfasis ya que se desea obtener bioetanol, pero con la utilización de algas como biomasa.

A primera vista, el uso de combustibles como el biodiesel y el bioetanol parece ser una buena opción, sin embargo, Michel (2008) sostiene en su trabajo titulado *Estudio del balance energético y de las emisiones de dióxido de carbono a partir de la quema de combustibles fósiles y biocombustibles* que desde el punto de vista energético, la fuente de energía última es la luz solar, que a través de la fotosíntesis permite obtener sustancias orgánicas. Por tanto, se trata de una energía abundante y disponible para todos. Además, desde el punto de vista de las emisiones de CO<sub>2</sub>, la cantidad emitida al quemar estos biocombustibles se compensaría con el CO<sub>2</sub> fijado por las plantas durante su crecimiento. Dicho de otro modo, al dejar de quemar combustibles fósiles (que no dejan de ser restos vegetales, principalmente, que fijaron CO<sub>2</sub> y almacenaron energía química hace millones de años) para quemar sólo restos vegetales actuales, que se renovarían año tras año, se podría mantener tanto el ciclo energético como el del CO<sub>2</sub> y alcanzar la sostenibilidad.

Como se planteó anteriormente, todos estos factores, señalan la importancia de realizar la presente investigación que permitió estudiar las algas, considerando que son la biomasa más abundante en el planeta, lo

cual evitaría la destrucción de los espacios verdes terrestres y el uso de fertilizantes, siendo la mayor parte de ellos nitrogenados y que al ocurrir la combustión del biocombustible liberan a la atmósfera tanta cantidad de óxidos de nitrógeno como los combustibles de origen fósil; al igual que el uso de agua dulce para el riego de los cultivos destinados a la producción de biocombustibles.

En la investigación se usó como método de estudio la espectroscopia en UV – Visible, para determinar la concentración de glucosa aprovechable para generar etanol a partir de este carbohidrato que funcione como combustible. Luego del tratamiento de las alga, *Ulva sp* y *Chaetomorpha sp* con hidrólisis ácida para la obtención a partir del biopolímero celulosa unidades de carbohidrato glucosa, con base en el método propuesto por Ferrer y otros (2002) en su trabajo sobre la *cinética de la hidrólisis ácida del bagacillo de caña de azúcar*.

## MÉTODO

### Recolección y preservación de la muestras

La ejecución experimental de esta investigación comienza en el mismo momento en el cual se decide la especie de alga con la cual se va a desarrollar el biocombustible, lo cual implica la selección de los lugares de muestreo y de recolección. Las muestras fueron recolectadas en Naiguatá, edo. Vargas, mediante un muestreo al azar. Una vez en el campo se extrajo el alga de su hábitat natural, y lavó con abundante agua destilada para eliminar el exceso de agua de mar, y almacenar en bolsas con cierre hermético. Las muestras se transportaron refrigeradas, hasta el momento de su utilización para el estudio.

Una vez que las muestras fueron llevadas al laboratorio se secaron en una estufa a 80 °C. Después de ser deshidratadas se molieron las algas y se tamizó el material para dar uniformidad al tamaño del particulado. Es recomendable que, de no continuar trabajando las muestras luego de este procedimiento, se guarden en bolsas con cierre hermético hasta su posterior procesamiento.

## **Determinación de humedad**

Se llevaron capsulas de porcelana a masa constante, luego se colocaron aproximadamente 50,0000 g de algas, se midió la masa, se registró y se sometieron a calentamiento en una estufa por 3 horas a 120 °C, luego se midió la masa de las cápsulas y por diferencia se calculó el porcentaje de humedad de las mismas.

## **Hidrólisis ácida de las algas**

Se armó un aparato de reflujo y en el balón de calentamiento se colocaron en el balón de calentamiento cantidades de muestra de alga y ácido sulfúrico al 4% v/v que cumplan con las proporciones líquido – sólido de 30:1 (es decir por cada 30 cm<sup>3</sup> de solución de ácido sulfúrico 1 gramo de muestra de algas). Se deja reflujar posteriormente durante cuatro (4) horas y una vez transcurrido el tiempo se enfría rápidamente el balón para detener el proceso. Se filtró la mezcla y se descartó el sólido. Al líquido se le agregó solución de hidróxido de sodio 2 mol/dm<sup>3</sup> para ajustar pH y se le agregó carbón activado para evitar interferencias con la coloración del complejo que se forma al momento de la determinación espectrofotométrica.

## **Determinación de carbohidratos por el método de la Antrona**

### ***Curva de calibración***

Para la determinación por espectroscopia en UV – Visible se preparó la curva de calibración que consiste en una batería de cinco (5) soluciones de glucosa a concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 ppm.

En cinco tubos de ensayo se agregaron por separado, 1 cm<sup>3</sup> de cada solución patrón, 1cm<sup>3</sup> de solución de hidróxido de potasio (KOH) al 30% y se calentaron durante 10 minutos a 100° C. Una vez transcurrido el tiempo, se sacaron los tubos del baño y se dejaron enfriar, luego se les agregaron 8 cm<sup>3</sup> se reactivo de Antrona en ácido sulfúrico y se llevaron

nuevamente a un baño a 40° C durante 15 minutos. Luego se dejaron enfriar y se realizaron las respectivas mediciones espectrofotométricas, para lo cual se usó un espectrofotómetro de fase continua marca Agilent, modelo 8453E.

### **Preparación del blanco**

El blanco, para esta determinación, se preparó con 1 cm<sup>3</sup> agua desionizada, 1cm<sup>3</sup> de solución al 30% de KOH y solución de Antrona en ácido sulfúrico.

### **Determinación de la longitud de onda de trabajo**

Se realizó un barrido con la disolución patrón de 150 ppm para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia, en el espectrofotómetro de fase continua marca Agilent modelo 8453E.

### **Medición de las muestras**

Se realizó la determinación de la concentración de glucosa en la fracción hidrolizada colocando 1 cm<sup>3</sup> de esta muestra en un tubo de ensayo y 1 cm<sup>3</sup> de solución de hidróxido de potasio (KOH) al 30%, y se calentó durante 10 minutos a 100° C. Una vez transcurrido el tiempo se sacaron los tubos del baño y se dejaron enfriar, luego se les agregaron 8 cm<sup>3</sup> de reactivo de Antrona en ácido sulfúrico y se llevaron a un baño a 40° C durante 15 minutos. Luego se dejaron enfriar y se realizaron las respectivas mediciones espectrofotométricas, en el espectrofotómetro de fase continua marca Agilent modelo 8453E.

## **RESULTADOS**

En el cuadro 1 se presenta la cantidad de alga de la especie *Ulva sp* utilizada para hacer la determinación de la cantidad de carbohidratos aprovechables para la obtención del biocombustible propuesto. Se tomaron en cuenta los siguientes datos: masa inicial (húmeda) del alga y

masa final (seca), una vez sometida a calentamiento hasta peso constante como se plantea en la metodología propuesta, estableciendo, con ello el porcentaje de humedad contenido en el vegetal objeto de estudio.

**Cuadro 1.** Porcentaje de humedad de la *Ulva sp*

<b>Especie</b>	<b>Muestra húmeda (g)</b>	<b>Muestra Seca (g)</b>	<b>Porcentaje de humedad (%)</b>
Ulva sp	54,4170	5,2887	90,2811

Es importante resaltar, con los datos anteriormente mencionados, que la especie *Ulva sp* contiene en su composición un porcentaje alto de hidratación; esto posiblemente se deba al medio en el cual habita y la turgencia que brinda el agua a las células que forman la estructura de la planta marina. De allí que se considera un porcentaje de humedad de 90, 2811.

El método propuesto establece que se debe moler la muestra seca y hacer reflujo durante cuatro (4) horas para lograr la hidrólisis completa de los carbohidratos contenidos en el alga y este reflujo se debe hacer en una solución de Ácido Sulfúrico al 4% v/v, teniendo en cuenta una relación entre el volumen de solución del ácido y la masa del alga de 30:1; por lo cual, tomando en cuenta el dato establecido en el cuadro 1 con respecto al peso seco de la muestra, es importante, para tratar 5,2887 g de alga, el empleo de 158,7 cm<sup>3</sup> de solución de Ácido Sulfúrico al 4% v/v.

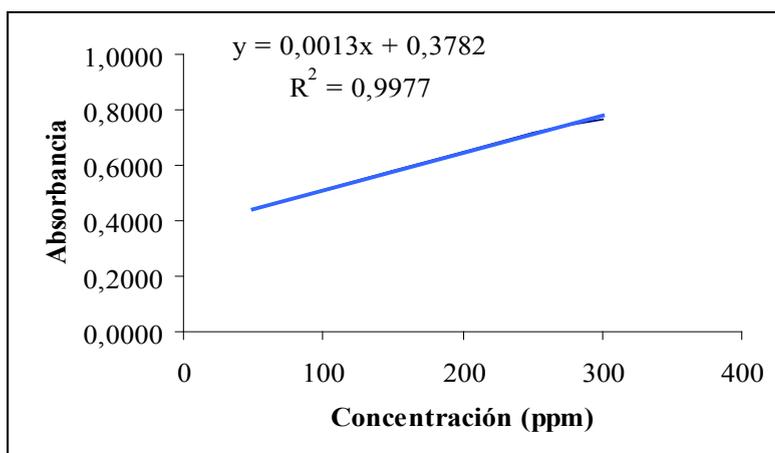
Una vez transcurrido el tiempo de reflujo, se procedió a enfriar la fracción hidrolizada para luego filtrarla por succión, en un crisol de vidrio sinterizado (crisol de membrana porosa), de manera de garantizar una mejor filtración y menor pérdida del material líquido a estudiar y que posteriormente se utilizara en la producción del bioetanol. El líquido se guardó para posterior tratamiento y se desechó el bagacillo.

Una vez filtrada la fracción hidrolizada se presentó una coloración amarilla de mediana intensidad, que pudiera afectar la determinación utilizando métodos espectrofotométricos, por lo que se agregó una

cantidad prudente de carbón activado para lograr la decoloración de la solución, y nuevamente se filtró al vacío para eliminar restos de carbón activado. Este procedimiento se repitió tres (3) veces hasta que se obtuvo la decoloración casi total de la solución y con esto se trató de disminuir el error asociado a la medición. La solución fue guardada en un frasco de vidrio con tapa esmerilada que se llevó a refrigerar en resguardo de la luz y de agentes externos, para evitar que se pudieran contaminar las muestras.

Para poder realizar la cuantificación de carbohidratos presentes en el alga se construyó una curva de calibración con patrones de glucosa en solución acuosa (con agua desionizada) de concentraciones 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ppm partiendo de una solución madre de 300 ppm y luego se realizaron cinco diluciones para obtener las demás soluciones.

Una vez preparada la batería de soluciones se siguió el procedimiento propuesto por Van Handel (1968) para la cuantificación utilizando el reactivo antrona. Se midieron las absorbancias a 620 nm, en el espectrofotómetro de fase continua marca Agilent modelo 8453E. De esta manera se obtuvo un índice de correlación lineal ( $R^2$ ) de 0,9977; los datos se muestran en el gráfico 1.



**Gráfico 1.** Curva de calibración

El procedimiento propuesto por Van Handel (1968) fue aplicado de manera análoga a 0,5 cm<sup>3</sup> del filtrado diluido en 100 cm<sup>3</sup> de agua desionizada, y se repitió el procedimiento por triplicado para luego calcular un promedio de la concentración total de carbohidratos encontrados en el alga. Los datos se muestran en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Absorbancias de la fracción hidrolizada de la especie *Ulva sp*

Muestra	Dilución	Absorbancia
1	0,5 : 100	0,6167
2	0,5 : 100	0,6166
3	0,5 : 100	0,6166

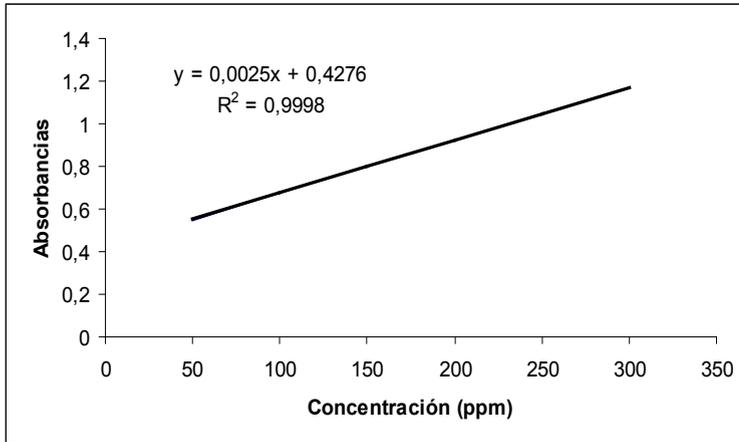
El tratamiento aplicado a la especie *Ulva sp*, fue aplicado de manera análoga a las muestras del alga *Chaetomorpha sp*, para dar respuesta al objetivo de establecer una comparación entre ambas especies y determinar cuál de las dos contiene mayor proporción de carbohidratos aprovechables en la producción de bioetanol.

El primer dato relevante el porcentaje de humedad que se muestra en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Porcentaje de humedad de la *Chaetomorpha sp*

Especie	Muestra húmeda (g)	Muestra Seca (g)	Porcentaje de humedad (%)
<i>Chaetomorpha sp</i>	50,6430	6,3689	87,4239

Para calibrar se construyó una segunda curva de calibración (ver gráfico 2) dado que el tratamiento de cuantificación espectrofotométrica de la segunda especie no se realizó en el mismo momento de la primera y por ende las condiciones del equipo varían, lo cual puede afectar los resultados al utilizar la misma curva anteriormente construida.



**Gráfico 2.** Curva de calibración.

En el caso del alga *Chaetomorpha sp*, el índice de correlación lineal fue de 0,9996 y se procedió de igual manera todo momento, pudiéndose conocer que el valor de absorbancia más aceptable utilizado para la interpolación en la curva de calibración fue el arrojado por la dilución de 0,5 cm<sup>3</sup> del filtrado en 100 cm<sup>3</sup> de agua desionizada. La medición se realizó por triplicado y los datos de mediciones realizadas se presentan en el siguiente cuadro.

**Cuadro 4.** Absorbancias de la fracción hidrolizada de la especie *Chaetomorpha sp*

Muestra	Dilución	Absorbancia
1	0,5 : 100	1,0235
2	0,5 : 100	1,0235
3	0,5 : 100	1,0234

En el cuadro 5 presenta los valores experimentales obtenidos del estudio aplicado a ambas especies algales. Se hallaron los valores de concentración a través de la interpolación de los valores de absorbancia arrojados por la medición de las muestras de las fracciones hidrolizadas y su posterior conversión, utilizando factores de dilución ya que la absorbancia corresponde a una dilución de 0,5 cm<sup>3</sup> del extracto puro en 100 cm<sup>3</sup> de

agua desionizada como se estableció anteriormente. Con el propósito de hacer más cómoda y visual la comparación entre las especies estudiadas, se reporta la concentración promedio calculada, luego de haber realizado el tratamiento y la medición por triplicado.

**Cuadro 5.** Comparación de la cantidad de carbohidratos encontrados en las especies de algas estudiadas

<b>Especie</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Promedio de la Concentración (ppm)</b>
Ulva sp	0,6167	35379,16	35375,33 ± 3,3139
	0,6166	35373,42	
	0,6166	35373,42	
Chaetomorpha sp	1,0235	48177,88	48176,31 ± 2,7193
	1,0235	48177,88	
	1,0234	48173,17	

Como se observa en el cuadro 5, la especie con mayor contenido de carbohidratos, se refiere a *Chaetomorpha sp*, teniendo una concentración promedio de 48176,31 + 2,7193 ppm, con respecto a la especie *Ulva sp*, cuyo aporte de carbohidratos es de 35375,33 + 3,3139 ppm.

En el trabajo realizado por Sumarriva (1985) sobre algunas algas de consumo masivo en el Perú, con miras a la aplicación nutricional, este autor encontró que al analizar muestras de *Ulvas sp*, el contenido de carbohidratos totales en 100 gramos de material seco es de 44 gramos lo que representa un 44% del alga. De acuerdo con este mismo autor, esta cantidad de carbohidratos se encuentra en mayor proporción en las paredes celulares del alga; sin embargo lo estudios con *Chaetomorpha sp*, no son frecuentes, o por lo menos no se han reportado estudios, con esta especie.

Por otra parte, los biocombustibles más conocidos en la actualidad provienen de la caña de azúcar y el maíz; ambos productos son consumidos como alimentos o complementos alimenticios por la población venezolana; si la tecnología de producción de biocombustibles en el país se extiende

y se comienzan a utilizar estas especies vegetales como materia prima, es posible que se afecte de manera significativa la alimentación de la población.

El trabajo realizado por Cárdenas (2007), titulado: *potencialidad del cultivo de caña de azúcar en Argentina como fuente de bioetanol*, establece que si se analizan los constituyentes de esta especie vegetal se encuentra que el tallo contiene principalmente jugo (con contenidos de azúcares que pueden transformarse en etanol por fermentación directa), sales minerales y almidón, entre sus principales constituyentes. De la totalidad de la planta se tiene que el jugo de caña forma el 98% de la misma distribuido en: tallo, hojas y bagacillo; de los cuales se tiene un porcentaje de humedad entre el 68 y 75% localizado principalmente en el tallo de la planta y el contenido de azúcares totales (sacarosa) es un 15 a 16% en el tallo y de 2 a 6% en el bagacillo, siendo una cantidad nula en las hojas de la planta.

Con base en esta determinación consultada y con los datos propios de la investigación realizada, es posible que la producción de biocombustibles, a partir de algas, representa una vía altamente productiva y sustentable. Las amplias costas con las cuales cuenta el país y la explotación racional de los vegetales marinos señalan que es posible desarrollar el mecanismo tecnológico para la producción de bioetanol a partir de algas. Para cual se requiere desarrollar acciones educativas que permitan en la población tomar en consideración alternativas en el uso de combustibles para su vehículo, disminuyendo la emisión excesiva de gases de invernadero y evitar que se afecte la calidad de vida en el planeta.

## CONCLUSIONES

- El trabajo realizado permite señalar el alcance de los objetivos trazados para esta investigación, pues fue posible determinar la cantidad de carbohidratos aprovechables en las especies algales *Ulva sp* y *Chaetomorpha sp* para la producción de bioetanol que funcione como biocombustible: teniendo para las *Ulvas sp* de 35375,33 + 3,3139 ppm y para las *Chaetomorphas sp* 48176,31 + 2,7193 ppm.

- Fue posible comparar cuál de las dos especies de algas ofrece mejores ventajas como accesibilidad, abundancia natural y aporte de glucosa para la producción de biocombustible, lo cual señala a la alga *Chaetomorpha sp*, como la especie que reúne estos requisitos. Además fue posible establecer las ventajas desde el punto de vista de rendimiento y sostenibilidad que trae consigo la utilización de algas como biomasa para la producción de combustible. Considerando a la amplia extensión de costas con la cual cuenta el país.
- Estos resultados permitirán en Venezuela usar otras especies para obtener biocombustible, ya que maíz y la caña de azúcar, que son las biomásas más estudiadas, son elementos ampliamente usados en Venezuela. Se recomienda proseguir el estudio de los posibles usos potenciales que se les puede dar a las algas, en el ámbito de la utilización como materia prima en la producción de biocombustibles.
- Con respecto al método utilizado para la cuantificación de carbohidratos totales, es recomendable ser cuidadoso con el reactivo Antrona ya que es muy corrosivo. En cuanto a la hidrólisis de los carbohidratos estructurales de presentes en las algas se recomienda tratar el bagacillo, que en esta investigación fue desechado, para establecer si es aprovechable como en el caso de la caña de azúcar.
- Desde el punto de vista biológico se recomienda monitorear el número de estas especies algales en las costas de Venezuela, lo cual permitirá delimitar lugares de su ubicación y abundancia, para la recolección de la materia prima que será usada. Así como se desarrollará la tecnología adecuada para la producción del biocombustible.

## REFERENCIAS

- Cárdenas, G. (2007). *Potencialidad del cultivo de caña de azúcar en Argentina como fuente de bioetanol*. [Artículo en línea]. Disponible: [Consulta: 2014, julio, 8]
- Corral, M. (2008). *Biocombustibles: la solución o el problema*. [Artículo en línea]. Disponible: <https://goo.gl/64HwfR> [Consulta: 2014, noviembre, 19]
- Ferrer; Páez y Arenas. (2002). *Cinética de la hidrólisis ácida del bagacillo de caña de azúcar*

- Graham, L., Wilcox, L. (2000). *Algae*. (1era ed.). Upper Saddle River: Printice Hall
- Menéndez, J. (2004). *Ulva lactuca* L. Lechuga de mar. [Página web en línea]. Disponible: <https://goo.gl/bCfEmt> [Consulta: 2014, noviembre, 10]
- Menéndez, J., Fernández R. (2005). *Las algas: los vegetales del mar*. [Página web en línea]. Disponible: <http://www.asturnatura.com/algas/algas.html> [Consulta: 2014, noviembre, 10]
- Michel, H. (2008). *Con los biocombustibles no se ahorran emisiones de CO<sup>2</sup>*. [Artículo en línea]. Disponible: <https://goo.gl/HGRO2c> [Consulta: 2013, noviembre, 19]
- Rudman, W. (2005). *Chaetomorpha* spp. [In] *Sea Slug Forum. Australian Museum, Sydney*. [Artículo en línea]. Disponible: <https://goo.gl/QeWQBc> [Consulta: 2013, enero, 03]
- Sumarriva, L. (1985). *Estudio de la composición Química de algunas Algas de Mayor Consumo en el Perú*. [Artículo en línea]. Disponible: <https://goo.gl/c0AprD> [Consulta: 2014, junio, 03]
- Van Handel, E. (1968). *Direct determination of sucrose*. Analytical biochemistry