

EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS APARTIR DE CULTIVO IN VITRO DE MICROALGAS: ALTERNATIVA A LA SÍNTESIS QUÍMICA DE COLORANTES

Andrés Arias¹⁻², Isabel Monsalve¹⁻², Willington Ochoa¹⁻², Isaac Ramirez¹⁻², Jose Torres¹⁻², Dallany Urrego³.

¹Aprendiz Tecnoacademia Medellín. Centro para el Desarrollo de Hábitat y la Construcción-SENA. ²I. E Colegio Loyola para la ciencia y la innovación. ³Facilitador Tecnoacademia Medellín. Línea de Biotecnología. Centro para el Desarrollo de Hábitat y la Construcción-SENA.

Resumen

Algunas reacciones y residuos tóxicos de la síntesis química de colorantes textiles; generan afectaciones al entorno que rodea a estas industrias, causando contaminación hídrica, del suelo y atmosférica, que conllevan a múltiples inconvenientes en la salud humana y de los ecosistemas. Para ello, la presente investigación propone una alternativa que disminuya estos efectos, con ayuda de un cultivo a nivel de laboratorio con microalgas *Chlorella* spp y *Scenedesmus* spp, se extrajeron pigmentos a partir de la biomasa de estos organismos, con condiciones óptimas de medio de cultivo F/2 para asegurar la reproducción de las microalgas, 12 (luz) y 12 (oscuridad), temperatura ambiente, pH neutro, fuente de carbono por bicarbonato, técnicas de ultra sonido con una frecuencia de 20 kHz, centrifugación a 7000 RPM y secado en estufa a 60 grados para la extracción. Se estableció que para 1L de cultivo se extraerán 5,6 g de pigmento, para treinta días de cultivar las microalgas.

Palabras clave: Síntesis química de colorantes, pigmentos, microalgas, In vitro.

Summary

Given some reactions and toxic residues from the chemical synthesis of textile dyes, it generates effects on the environment that surrounds these industries, causing water, soil and atmospheric pollution, which lead to multiple effects on human health and ecosystems. For this, the present research proposes an alternative that reduces these effects, with the help of a laboratory culture with microalgae *Chlorella* spp and *Scenedesmus* spp, pigments were extracted from the biomass of these organisms, with optimal conditions of culture medium F / 2 to ensure the reproduction of microalgae, 12 (light) and 12 (dark), room temperature, neutral pH, bicarbonate carbon source, ultrasound techniques with a frequency of 20 kHz, centrifugation at 7000 RPM and drying in 60 degree stove for extraction. It was established that for 1L of culture, 5.6 g of pigment would be extracted, for thirty days of culturing the microalgae.

Key words: Chemical synthesis of dyes, pigments, microalgae, In vitro.

Introducción

La síntesis química de colorantes del sector textil genera algunos residuos que, según el decreto 1076 de 2015, son catalogados como peligrosos, los cuales afectan el entorno que rodea a estas industrias, causando contaminación hídrica, del suelo y atmosférica, con múltiples inconvenientes en la salud humana y de los ecosistemas. (Cerrón D y Miriam M., 2018)

En el Área Metropolitana, (Arrios Ziolo F., et al,

2016) estudios demostraron el impacto que, por toxicidad, tiene la industria textil en el río Medellín; afecta su apariencia y la sobrevivencia de organismos fotosintéticos y las cadenas tróficas. Además, estos materiales pasan al suelo por escorrentía y afectan su fertilidad. En la atmósfera (Cortázar Martínez A., et al, 2015) existen emisiones y olores que por exposición continua de colorantes tóxicos afectan la salud de comunidades aledañas y empleados encargados del proceso de tinción. En cambio, los pigmentos naturales están calificados por estudios como aptos

para tinción, no tóxicos y sus extracciones eco-amigables, hacen que sea una estrategia rentable.

Las microalgas *Chlorella spp* y *Scenedesmus spp* como grandes organismos foto autótrofos, comunes en el ambiente y gracias a la biomasa que producen, se extraen pigmentos (clorofila) que pueden ser aplicados como colorantes, solo con condiciones naturales como luz, agua, aireación y nutrientes esenciales para vivir, y un beneficio agregado es por sus altas tasas fotosintéticas es que son excelentes captadores de CO₂. (Santo A., et al, 2014)

Materiales y métodos

Toma de muestra y caracterización de las microalgas *Chlorella spp* y *Scenedesmus spp*

Se recolectan muestras en recipientes esterilizados, de un lago de agua dulce (Lago del Jardín Botánico, Medellín). Luego, se llevan al laboratorio para realizar una revisión microscópica con un lente de 40x, que permita identificar si efectivamente están presentes las microalgas: *Scenedesmus* con forma elipsoide, pared celular delgada, puede contener pirenoide, se encuentra en colonias agrupadas entre 5-7 células, y *Chlorella* con forma esférica, con o sin piranoides, se encuentra en colonias mayores y con cierta distancia (Guamán M y Gonzáles N, 2016)

Preparación del Medio de Cultivo F/2 (Guillard, 1975)

Se acondiciona el medio de cultivo F/2 que contenga las siguientes sustancias: 7,5 g de Na₂SiO₃ · 9H₂O, 1,25 g de NaH₂PO₄ · 2H₂O, 18,75 g de NaNO₃, 0,25 mL de Solución Metales Traza, que se diluyen en agua ionizada para completar 1 litro de cada solución, para su posterior ingreso a la autoclave (esterilizador). Luego, se prepara la solución de vitaminas agregando 0.5 mL de biotina y tiamina en 499 mL de agua ionizada. Es importante aclarar que, la solución de vitaminas no se esteriliza y es la última solución en agregarse al cultivo luego de esterilizarlo.

Aislamiento de las microalgas

Para la obtención de las cepas individuales, se tiene que enriquecer las microalgas con medio F/2 durante

4 semanas, se inoculan 15% de la solución base de microalgas con medio de cultivo F/2 (0,25mL de cada sustancia para 250 mL de volumen final), y se someten a fotoperiodos 12/12 (220 lm), fuente de carbono con bicarbonato, temperatura ambiente y pH neutro entre 7-8, para asegurar la reproducción de las microalgas. Posteriormente, se realizan los sembrados en placas de Petri y pasando al Erlenmeyer intercambiando las veces que sean necesarias para separar otros organismos de *Chlorella spp* y *Scenedesmus spp*, cuando se evidencia el cultivo netamente axénico (cultivo de solo un organismo específico), aproximadamente durante 5 días, se pasan las microalgas a otro medio líquido escalado a 1L para continuar con su proceso de reproducción celular y producción de biomasa, con medio F/2 y mismas condiciones de cultivo [3].

Cinética de crecimiento

Se hace necesario saber en qué momento las microalgas están en su fase exponencial de reproducción para cuantificar su biomasa y extraer los pigmentos. Para ello, se evalúa por medio de espectrofotometría a través de una curva de crecimiento de microalgas, que indiquen sus fases de establecimiento, exponencial, latencia y muerte, para determinar la productividad poblacional y la etapa de mayor reproducción con las condiciones dadas anteriormente (García Romeral J., et al, 2017). Luego de estandarizar el cultivo *In vitro* por un tiempo de 8 días; con medición de longitud de onda de 600 nm en el espectrofotómetro tomando muestras día por medio de 4 mL, durante 3 semanas logrando la curva de crecimiento.

Obtención y purificación de pigmentos

Luego de establecer el cultivo y controlar sus condiciones, se procede a extraer la biomasa de las microalgas por medio de la técnica de ultrasonido que comprende ciclos alternos de alta y baja presión, lo que contribuye a la disrupción celular. Después de aplicar la técnica de ultra sonido, el siguiente paso consiste en centrifugar la muestra para separar el material algal del sobrenadante, y obtener el pigmento (clorofila). Por último, secar, esto reduce el agua acumulada y obtener el pigmento seco, para proceder a pruebas con el producto (Bermúdez Sierra J., et al, 2013).

Resultados y discusión

Toma de muestra y caracterización de las microalgas *Chlorella spp* y *Scenedesmus spp*

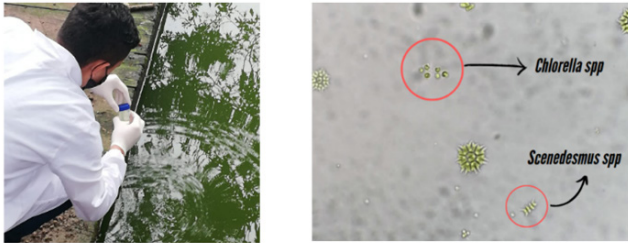


Imagen 1 y 2. Aislamiento y caracterización microscópica de microalgas.

Se recolectaron tres muestras en recipientes esterilizados (Imagen 1.) dos de 33 mL y uno de 20 mL, de un lago de agua dulce (Lago del Jardín Botánico, Medellín). En el microscopio se prepara la muestra en lente de 40x para observar la presencia de las microalgas *Chlorella spp* y *Scenedesmus spp*. Se identificó la presencia de las microalgas en las muestras con sus características morfológicas, también se encontró otra microalga llamada *pedrastrum* y otras bacterias. (Imagen 2.)

Establecer condiciones óptimas para el cultivo de microalgas con medio F/2:

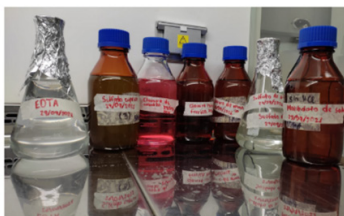


Imagen 3. Soluciones de medio F/2



Imagen 4. Cultivo de *Chlorella* y *Scenedesmus* a escala de 1 L y 1/2 L

Imagen 3 y 4. Medio de cultivo F/2.

Se prepararon las soluciones del medio F/2 (Imagen 3) que se escaló de 250 mL a 1L, para el cultivo de 250 mL se añadieron 0.25 mL por cada solución y 1 mL para el cultivo de 1L. Se agregó el 15% del cultivo de microalgas aislado, se concluyeron las condiciones óptimas como fotoperiodos 12 (luz) 12 (oscuridad), pH neutro, temperatura ambiente y fuente de carbono con 1 mL de solución de bicarbonato (Imagen 4). **Crecimiento de las microalgas *Chlorella spp* y *Scenedesmus spp*.**



Gráfico 1. Cinética de Crecimiento

De acuerdo con el Gráfico 1 se observa una fase de exponencial entre las 96 y 144 horas, pero por condiciones como pequeñas variaciones en la temperatura y el burbujeo estaba un poco alto, maltrató a las microalgas lo que hizo que se redujeran considerablemente. Luego, se pasó a aireación con bicarbonato lo cual aumento increíblemente la reproducción de las microalgas y con ellas la biomasa, como se ve en el lapso de la hora 336 y la 936. Así sabríamos cuando iniciar la extracción del pigmento.

Para el número de células se utilizó espectrofotometría Imagen 6. (absorbancia x = número total de células) y conteo por cámara de Neubauer Imagen 5. (número de células en los cuadros x = número total de células).

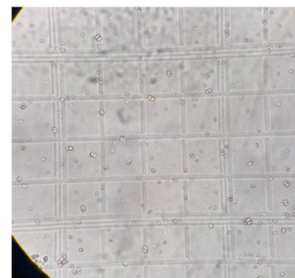


Imagen 5. Ejemplo de una cuadrícula de la cámara de conteo



Imagen 6. Espectrofotómetro

Imagen 5 y 6: Conteo en cámara de Neubauer y Espectrofotometría.

Extracción del pigmento.



Imagen 7. Cultivo en ultrasonido



Imagen 8. Pigmento centrifugado

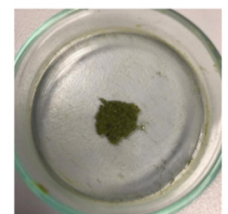


Imagen 9. Pigmento después del secado

Imagen 7, 8 y 9: Ultrasonido, Centrifugado y secado para extracción del pigmento.

Luego de haber tenido a las microalgas de su mayor reproducción, se asiste por técnica de ultrasonido (*Imagen 7.*) que para el volumen de 1 L de cultivo fue colocado en el sistema por aproximadamente 40 minutos. Los ciclos de trabajo fueron de 5s para sonicación y de 2s de pulsado, con amplitud del 40 % y frecuencia de 20 kHz, a 50° C. Posteriormente, se concentró el pigmento por centrifugación y se le hizo un secado en la estufa a 60°. Se obtuvo una cantidad de 5,6 g de pigmento seco (*Imagen 9.*)

Conclusiones

Las microalgas *Chlorella spp* y *Scenedemus spp*, se estandarizaron en condiciones de cultivo tales como fotoperiodos 12 (luz) 12 (oscuridad) con una intensidad de luz 220 lm, temperatura ambiente, medio de cultivo F/2 y fuente de carbono con bicarbonato. Durante 30 días estando al tanto para añadir nutrientes cuando el cultivo lo pida para extraer una biomasa considerable, y aumentar el tiempo de cultivo si se necesita más biomasa o escalar los volúmenes. Por técnica de espectrofotometría se estableció la cinética de crecimiento para establecer la fase de mayor reproducción y arrojó datos buenos para las condiciones dadas.

La extracción del pigmento por ultrasonido resultó exitosa, se rompieron paredes de las microalgas y se dispuso de toda la biomasa, luego por centrifugación se separó el material sólido (clorofila) que con el secado a 60° dio buenos resultados para obtener material seco y libre de humedad.

Referencias

- Bermúdez Sierra J., et al. (2013) Desempeño de dos técnicas de rompimiento celular en la caracterización de ficobiliproteínas en la microalga *Scenedemus spp*.
- Santo A., et al. (2014) Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. Extraído de https://revista-anales.icaei.es/web/n_24/seccion_13.html
- Rodríguez Ramos P., et al. (2015) Obtención de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo. Extraído de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5774160>
- Cortázar Martínez A., et al. (2015). Contaminación generada por colorantes de la industria textil. Extraído de <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/prepa4/n3/e1.html>
- Arrios Ziolo F., et al. (2016). Estudio de la toxicidad asociada al vertimiento de aguas residuales con presencia de colorantes y pigmentos en el área metropolitana del Valle de Aburra. Rev. EIA.Esc.Ing.Antioq no.26. Extraído de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372016000200005 lang=es
- Guamán M y Gonzáles N. (2016) Catalogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador. Corporación para la Investigación Energética. Extraído de https://www.academia.edu/36570470/Catlogo_de_Microalgas_y_Cianobacterias_del_Ecuador
- García Romeral J., et al. (2017) Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. Extraído de Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación.
- Cerrón D y Miriam M. (2018) Síntesis eco amigables de Colorantes. Extraído de la Revista de Química PUCP, vol. 32, no 1.