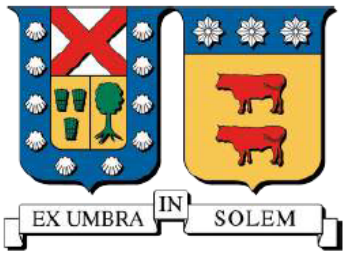
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA MECÁNICA
VALPARAÍSO - CHILE




# DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO OPTIMIZADO PARA LA EXTRACCIÓN DE BIOACEITE A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL

SEBASTIÁN SÁEZ CATALÁN

MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
INGENIERO CIVIL MECÁNICO, MENCIÓN PRODUCCIÓN

| | |
|---|---|
| PROFESOR GUÍA | Dr. Ing. Germán Amador D. |
| PROFESOR CORREFERENTE | Dr. Ing. Alex Flores M. |
| PROFESOR CORREFERENTE | Msc. Ing. Rodrigo Benavides |

ABRIL 2019

## Agradecimientos

En este momento tan especial, no me queda más que agradecer a todos quienes estuvieron durante este proceso educativo y de formación.

No sólo crecí académicamente, sino también como persona, y sin ustedes no lo hubiese conseguido.

En primer lugar gracias a mis más cercanos, a mi familia, por ser un vivo ejemplo del placer del trabajo y el esfuerzo. A mis padres, por darme todo lo que siempre necesité, en especial amor.

A Camila, mi hermosa, que sin su apoyo nada hubiese terminado ni empezado.

A mis amigos por siempre poner el hombro conmigo en cada batalla y desafío, incluso cuando flaqueaba el mío.

A mis profesores, en especial a Don Germán, por su preocupación y diligencia.

Gracias muchas...

## Resumen

En este estudio se busca obtener un procedimiento optimizado para la extracción de bioaceite a partir de biomasa microalgal, bajo las condiciones operativas existentes en el departamento de ingeniería mecánica. El método Soxhlet no es el más óptimo por su baja posibilidad de escalamiento, sin embargo es el que mejor control da sobre las variables operativas. Las variables más influyentes son la cantidad de biomasa agregada al equipo, la temperatura de graduación en la manta térmica y el tiempo de operación. También es significativa la inclusión del pre-tratamiento a la biomasa antes de la extracción.

Los valores óptimos coinciden con los máximos valores operacionales, alcanzando los 45[g] de biomasa por extracción, con una graduación térmica de la manta ubicada en 11 y un tiempo de 8 horas, presentando una mejora del 259 % en la cantidad de aceite extraída respecto a las extracciones precedentes.

Por otro lado el pre-tratamiento, en forma de sonificado, entregando 800[J] cada 10[ml] de disolución, aumenta el aceite extraído en un 41,8 %.

Finalmente el perfil lipídico de ácidos grasos extraídos corresponde en un 61 % a ácido palmítico y en un 25 % a ácido linoleico, proyectando un biodiésel de buena calidad y volatilidad, estable ante la oxidación, con buenas características de flujo frío.

## Abstract

The objetive of this work is look for obtain an optimized procedure for the extraction of bio-oil from microalgal biomass, with the operative condition of the department of mechanical engineering. The Soxhlet is not the more optimal method because it has low possibilities of scaling, However it is the better one controlling the operative variables. The most influent variables are the amount of biomass added to the equipment, the temperature of the heating mantle and the operation time. Also the inclusion of pre-treatment of the biomass before the extraction is an important factor.

The optimal values coincide with the maximum values of operation reaching 45[g] of biomass per extraction, with the temperature graduation of the heating mantle in 11 and a time of 8 hours. The result allows an improvement of 259 % in the amount of extracted bio-oil over the previous extractions.

On the other hand the pre-treatment, the sonified, allow 800[J] every 10 [ml]of dissolution, increase the bio-oil obtained in a 41,8 %

Finally the lipid profile of the fatty acids extracted corresponds to a 61 % of palmitic acid and a 25 % of linoleic acid, projecting a biodiesel of good quality and volatility, stable in oxidation and with good cold flows characteristics.

# Glosario

**TJ:** Tera-Joules, unidad de energía.

**TCal:** Tera-Calorias, unidad de energía.

**KTon:** Kilo-toneladas, unidad de masa.

**FO2:** *Fuel oil 2*, referido a una alternativa al petróleo diésel convencional.

**FO6:***Fuel oil 6*, referido a una alternativa al diésel apta por su composición para usos navieros.

**ENAP:** Empresa nacional del petróleo

**NREL:** *National renewable energy laboratory*, laboratorio nacional de energías renovables, de Estados Unidos

**HPLC:** *high performance liquid chromatography*, Cromatografía líquida de alta eficacia.

**ANOVA:** Análisis de varianza.

**Bioaceite:** Conjunto de lípidos obtenidos a partir de fuentes renovables.

**Rendimiento lipídico:** Referido al cociente entre la cantidad de bioaceite obtenido y la cantidad de biomasa posicionada por cada experiencia, en términos porcentuales.

**MSR:** Método superficie de respuesta.

**FAME:** *Fatty acid methil esther*, esteres metílicos de ácidos grasos.

# Índice

**1. Introducción y objetivos** **1**

1.1. Introducción . . . 1

1.1.1. Matriz primaria . . . 2

1.1.2. Matriz secundaria . . . 3

1.1.3. El diésel . . . 4

1.1.4. Biodiésel . . . 5

1.2. Objetivos . . . 6

1.2.1. Objetivo general . . . 6

1.2.2. Objetivos específicos . . . 6

**2. Marco Teórico** **7**

2.1. Biodiésel . . . 7

2.2. Microalgas . . . 8

2.2.1. Definición . . . 10

2.2.2. Biología y composición lipídica . . . 10

2.3. Producción . . . 12

2.3.1. Historia . . . 12

2.3.2. Selección . . . 13

2.3.3. Cultivo . . . 14

2.3.4. Cosecha . . . 18

2.3.5. Pre-tratamiento . . . 18

2.4. Bioaceite microalgal . . . 19

2.4.1. Pre-extracción . . . 19

2.4.2. Extracción . . . 20

2.4.3. Transesterificación . . . 24

**3. Metodología** **25**

3.1. Tipo de extracción, parámetros y variables . . . 25

3.2. Equipo e insumos . . . 30

3.2.1. Equipo principal . . . 30

3.2.2. Equipo secundario . . . 38

3.2.3. Insumos . . . 40

3.2.4. Microalga . . . . . 43
3.3. Procedimiento . . . . . 47
3.3.1. Pre-tratamiento . . . . . 47
3.3.2. Protocolo de extracción . . . . . 50
3.4. Determinación de la importancia del tiempo en la extracción . . . . . 53
3.5. Máximización de la extracción . . . . . 54
3.6. Sonificado . . . . . 57
3.7. Perfil lipídico . . . . . 58

**4. Resultados y análisis** **59**
4.1. Resultados de control . . . . . 60
4.2. Determinación de la importancia del tiempo en la extracción . . . . . 60
4.3. Maximización de la extracción . . . . . 61
4.3.1. Cantidad de bioaceite . . . . . 63
4.3.2. Rendimiento lipídico de la extracción . . . . . 65
4.3.3. Costo por extracción (gramos por unidad monetaria) . . . . . 66
4.3.4. Camino de máximo ascenso . . . . . 67
4.3.5. Validación influencia del tiempo . . . . . 69
4.4. Sonificado . . . . . 70
4.5. Perfil lipídico . . . . . 70

**5. Procedimiento maximizado** **71**

**6. Conclusiones** **73**

**7. Trabajos futuros** **74**

**Referencias** **75**

**A. Anexo I: Procedimiento maximizado** **79**

**B. Anexo II: Perfil lipídico** **85**

# Índice de figuras

1. Evolución de la matriz energética primaria [1]. . . . . 2
2. Descomposición de la matriz energética primaria [1]. . . . . 3
3. Evolución de la matriz energética secundaria [1]. . . . . 3
4. Descomposición de la matriz energética secundaria [1]. . . . . 4
5. Evolución de precios para el diésel grado b y F.O.6 [1]. . . . . 5
6. Esquema *Raceway Pond* [17]. . . . . 15
7. Vista aérea planta de producción en gran escala de *Arthrospira maxima* , equipada con raceway pond [18]. . . . . 15
8. Fotobiorreactor tubular circular concéntrico [19]. . . . . 16
9. Fotobiorreactor tubular [20]. . . . . 16
10. Diagrama del proceso de extracción por solventes [4]. . . . . 21
11. Diagrama de extracción supercrítica [4]. . . . . 22
12. Diagrama de equipo Soxhlet [33]. . . . . 23
13. Arreglo Soxhlet con rotavapor, incluyendo conexiones hídricas. . . . . 24
14. Imágenes de equipo Soxhlet y manta térmica, más accesorios de sujeción. . 31
15. Imágenes de manta térmica y sus componentes. . . . . 32
16. Rotavapor y baño de agua. . . . . 34
17. Imágenes sonificador. . . . . 36
18. Balanza analítica [23]. . . . . 37
19. Equipo secundario. . . . . 39
20. Solvente Hexano. . . . . 41
21. Empaquetadura porosa. . . . . 42
22. Sistema de producción Spirulina matter [18]. . . . . 45
23. Proceso sin pre-tratamiento. . . . . 48
24. Proceso de sonificado. . . . . 49
25. Imágenes de los sub-procesos más relevantes. . . . . 51
26. Imágenes de los sub-procesos más relevantes (continuación). . . . . 52
27. Esquema método superficie de respuesta [24]. . . . . 55
28. Esquema experimento para una primera aproximación lineal. . . . . 56
29. Esquema del experimento para una aproximación cuadrática. . . . . 57
30. Relación gráfica obtención bioaceite y tiempo. . . . . 61

31. Resultados ajuste cuadrático para cantidad de aceite. . . . . 63
32. Resultados ajuste cuadrático para cantidad de aceite (continuación). . . . . 64
33. Resultados ajuste cuadrático para el rendimiento lipídico extractivo. . . . . 65
34. Resultados ajuste cuadrático para cantidad de aceite. . . . . 66
35. Resultados ajuste cuadrático para cantidad de aceite (continuación). . . . . 67
36. Extrapolación con puntos al máximizar las variables operacionalmente. . . . 68
37. Interacción tiempo versus temperatura con miras al aceite obtenido. . . . . 69

# Índice de tablas

1. Características de biodiésel definidas en el decreto N°11 [32]. . . . . 8
2. Comparación de microalgas con otros nichos de biodiesel [13]. . . . . 9
3. Contenido lipídico y productividad lipídica para diferentes especies microalgales [13]. . . . . 12
4. Comparación métodos de cultivo [7]. . . . . 17
5. Resumen cualidades de interés para las experiencias . . . . . 27
6. Especificaciones manta térmica. . . . . 31
7. Especificaciones baño de agua. . . . . 33
8. Especificaciones rotavapor. . . . . 33
9. Especificaciones sonificador. . . . . 35
10. Especificaciones balanza analítica [23]. . . . . 37
11. Especificaciones hexano [34]. . . . . 40
12. Información nutricional *Arthrospira maxima* [18]. . . . . 46
13. Información nutricional *Arthrospira maxima* (continuación) [18]. . . . . 47
14. Planificación experimental para observar la influencia del tiempo en el aceite obtenido. . . . . 53
15. Diseño factorial $2^2$ con 3 puntos centrales. . . . . 56
16. Diseño factorial compuesto central $2^2$ con 3 puntos centrales. . . . . 57
17. Resultado de la fase experimental para determinar la influencia del tiempo. 60
18. Resultados experimentales para la primera aproximación lineal. . . . . 62
19. Resultados ANOVA, primera aproximación lineal. . . . . 62
20. Resultado de diseño compuesto para ajuste de segundo orden. . . . . 63
21. Resultados del máximo ascenso permitido operacionalmente. . . . . 68
22. Validación de resultados a ocho horas. . . . . 69
23. Resultado influencia pre-tratamiento. . . . . 70
24. Resultado perfil lipídico . . . . . 71
25. Comparación protocolo inicial, respecto al optimizado, sin pre-tratamiento . 72

# 1. Introducción y objetivos

## 1.1. Introducción

El manejo y uso de las energías disponibles en el entorno ha sido la fuerza pujante que moldea el desarrollo humano, desde el dominio del fuego en los tiempos pre-históricos hasta el uso de fuentes renovables en la actualidad.

La evolución del aprovechamiento energético a nivel mundial se puede relatar de manera simplificada observando el desarrollo de Chile. En épocas pre-coloniales, la principal fuente de energía era la biomasa, a través del proceso de combustión, usando el fuego directamente. Más tarde, durante la colonia, se adquiere el dominio del uso directo de la energía eólica (velas, molinos de viento, etc.), e hidráulica (molinos de agua, canales hidráulicos, etc.).

Posteriormente, durante el siglo XVIII y principios del XIX, se privilegia el uso del carbón, por la utilización de maquinaria a vapor, novedad que transforma integralmente la industria y el trasporte durante la revolución industrial, en una escala global.

El surgimiento del motor a combustión interna a principios del siglo XIX, además del nacimiento de la electricidad, comienza a cambiar el panorama energético a nivel mundial y nacional. El carbón ya no era de utilidad directa en estas tecnologías, y se planteaba el desafío de la generación de electricidad, y en consecuencia, el uso indirecto de energéticos.

Llegado el siglo XX, la fuerza transformadora vino con la popularización del uso de combustibles fósiles, proveniente de derivados del petróleo, que reestructuró los medios de transporte, moldeando incluso la estructura urbana. Anexo a lo anterior, se produjo una masificación del uso de la electricidad, como instrumento de generación de trabajo (motores), así como para la iluminación.

El desarrollo expuesto no vino sin consecuencias. Desde una perspectiva positiva, fue pieza clave en el progreso económico del país y el mundo, permitiendo un crecimiento en la capacidad productiva, eficiencia y eficacia para toda industria existente, además de ser motivación para el surgimiento de nuevos rubros. Desde una mirada más oscura, este desarrollo sin riendas, trajo profundas transformaciones sociales, culturales y ambientales.

Este último punto es sin duda uno de los más preocupantes, puesto que la conciencia medioambiental, y el concepto de contaminación, es reciente. En el año 1980 se incluyó por primera vez en la constitución, instituyendo jurisprudencia, sin embargo ni siquiera se definió, por lo que, tristemente, la regulación viene décadas más tarde que la producción.

Ante todo lo expuesto, se vuelve tema la sostenibilidad y sustentabilidad del rubro energético. La naturaleza no renovable de los combustibles fósiles, y su amplia capacidad contaminante, presentan los desafíos de la ingeniería del hoy y mañana.

### 1.1.1. Matriz primaria

La mejor manera de visualizar el panorama energético nacional es mediante la matriz primaria de energía, que representa la cuantificación de la oferta energética a nivel país, contemplando la producción a partir de recursos propios, así como también los flujos de importación y exportación. Durante el año 2016, el aprovisionamiento energético de Chile alcanzó las 334.763 [TCal] ó $1,4 * 10^6$ [TJ], representando un aumento del 7 % respecto al año anterior y un 13 % respecto al 2013 [1].

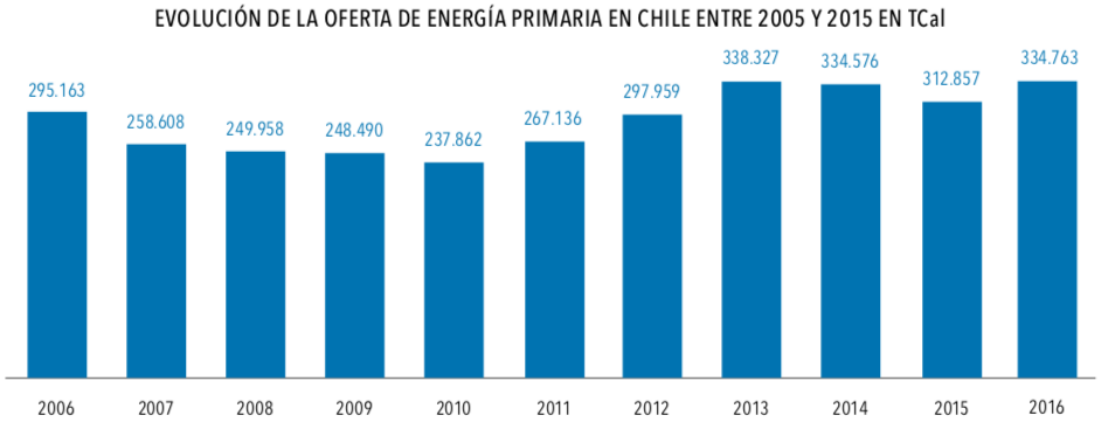



Figura 1: Evolución de la matriz energética primaria [1].

Durante el año 2016, esta oferta energética, se compone en un 27 % de petróleo (representando una disminución del 2,8 % respecto al 2015), siendo el energético primario, seguido por el carbón con un 26 % (aumentando en un 11 % respecto al 2015) [1]. La descomposición detallada, considerando la evolución, se muestra en la figura 2.

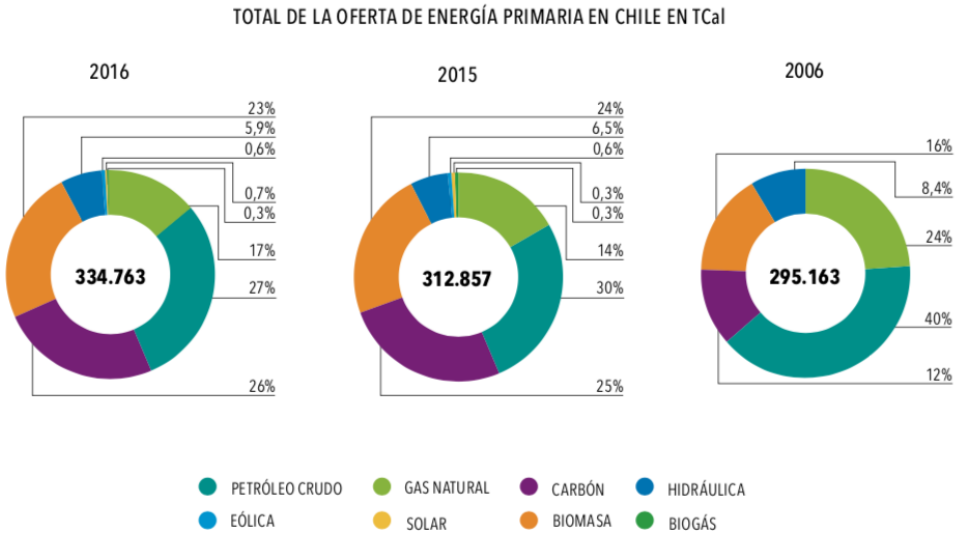



Figura 2: Descomposición de la matriz energética primaria [1].

Se observa en la información anterior la dependencia hacia los combustibles fósiles, abarcando mas del 70 % del aprovisionamiento energético.

### 1.1.2. Matriz secundaria

La matriz secundaría de energía, o de consumo final, expone como se utilizan estos recursos. Revelará entonces cuanto ocupó efectivamente el país, así como también, que energéticos son los más consumidos. En la figura 3 se muestra la evolución de la demanda energética, mientras que en la figura 4, se exhibe como esta demanda se divide, entre los principales energéticos secundarios, ó usos finales de energía.




Figura 3: Evolución de la matriz energética secundaria [1].

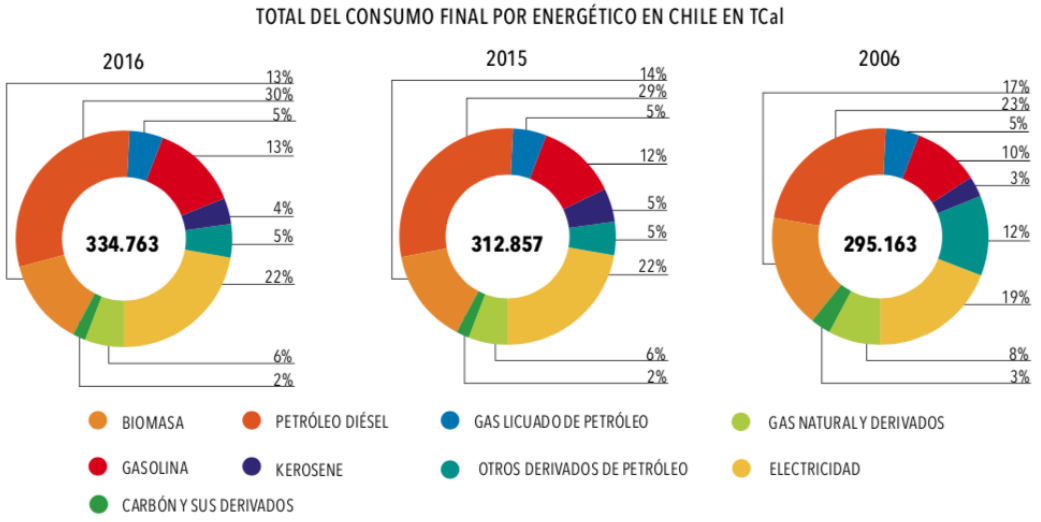



Figura 4: Descomposición de la matriz energética secundaria [1].

Se observa de la información recopilada el crecimiento de la demanda energética, y la predominancia de los combustibles fósiles como uso final de energía. El principal ítem es el diésel, abarcando un 30 % de la matriz de consumo, con un aumento del 6,4 % respecto al periodo anterior [1].

### 1.1.3. El diésel

Este energético es utilizado por la industria de manera transversal, además de abarcar gran parte del sector trasporte, alimentando maquinaria, camiones, e incluso fuentes generadoras de electricidad. Esta dependencia genera problemas serios para el país, por un lado, desde una perspectiva medioambiental, pese a la normativa vigente que regula su composición, como por ejemplo, su contenido de azufre, es uno de los principales agentes contaminantes, razón por la cuál hoy en día se intenta desincentivar su uso en vehículos particulares [2].

Por otro lado, Chile obtiene este energético casi exclusivamente desde la importación y posterior refinación del crudo en E.N.A.P., importando durante 2017 8.828[KTon] desde Brasil y Ecuador principalmente. También se importa diésel directamente, alcanzando las 4.833[KTon], desde E.E.U.U. en su mayoría [1].

Los precios de el diésel han aumentado en un 23 % respecto al año 2015, llegando a los $458,4[USD/M3] [1] y su variación se observa en el siguiente gráfico:

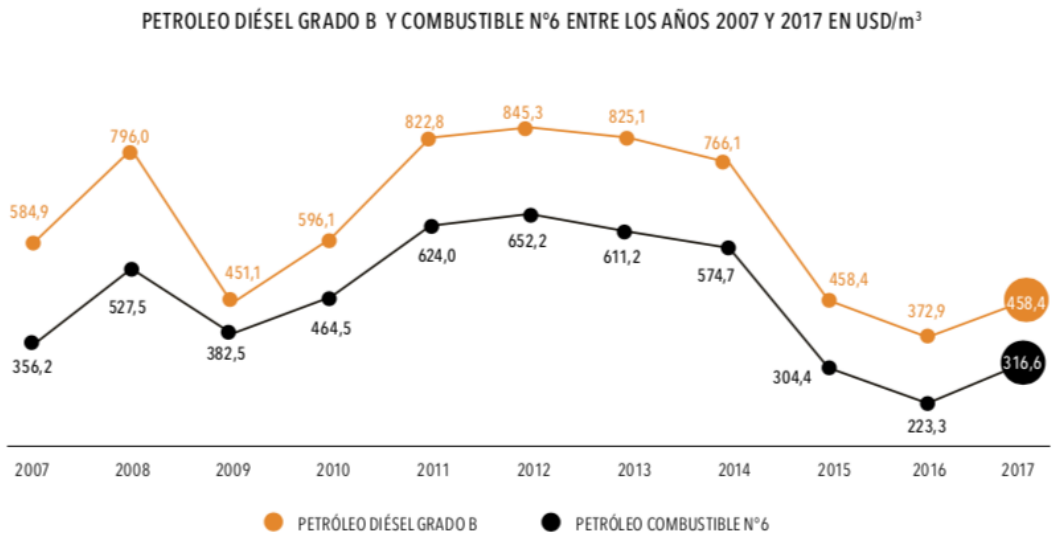



Figura 5: Evolución de precios para el diésel grado b y F.O.6 [1].

### 1.1.4. Biodiésel

Ante las problemáticas anteriormente descritas nace el concepto de biodiésel, quien presenta una tasa de reemplazo total versus el diésel importado, con emisiones reducidas [3] y con la principal ventaja de ser renovable.

El biodiésel comercializado actualmente es una mezcla de hidrocarburos conocidos como F.A.M.E, por sus siglas en ingles (fatty acid metyl esther) [4], producido principalmente a partir de triglicéridos, encontrados en cosechas oleaginosas como lo son la canola y la soja, cuya producción no es sostenible a gran escala, debido a la competencia por el espacio y recursos con otras áreas de agricultura. Es por esto que una nueva fuente de lípidos se hace necesaria, presentando a las microalgas como una alternativa prometedora, llegando a ser incluso 10 veces más productiva por unidad de área versus los cultivos tradicionales y pudiéndose alimentar directamente de flujos de escape ó contaminantes [5]. Las ventajas son considerables, y en el contexto actual, son motivantes para que se realice una investigación y desarrollo exhaustivo, de la cual, este estudio forma parte.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo general

Establecer un procedimiento que maximice la extracción de bioaceite a partir de biomasa microalgal.

### 1.2.2. Objetivos específicos

1. Revisar y analizar el estado del arte de las técnicas para producir biodiésel a partir de biomasa microalgal, con énfasis en la fase extractiva del bioaceite.

2. Estudiar las variables sensibles para la extracción, para luego, mediante técnicas de diseño experimental, determinar los valores óptimos de las mismas.

3. Desarrollar un procedimiento que garantice maximizar la obtención de bioaceite a escala de laboratorio.

4. Caracterizar químicamente el aceite obtenido, con énfasis en su convertibilidad a biodiésel y su calidad esperada.

# 2. Marco Teórico

Dada la actual condición energética y el aumento de precio de los combustibles fósiles, por su condición no renovable, es importante buscar una fuente sostenible y sustentable de combustible que pueda reemplazar total ó parcialmente a las alternativas actualmente presentes en el mercado. Como se observó durante el análisis de la matriz energética secundaria, la porción mayoritaria la posee el diésel, razón por la cual, en esta sección, se tratarán los temas afines a las alternativas de reemplazo de este energético

## 2.1. Biodiésel

El biodiésel se presenta como la alternativa renovable y con ventajas comparativas (emisiones y rendimiento [3] [6]) versus su contra parte fósil. Los F.A.M.E. ó biodiésel involucran la transesterificación de triglicéridos encontrados en cosechas terrestres oleaginosas con metanol, catalizada alcalinamente [4]. Su calidad esta normada por el decreto N°11: "*Aprueba definiciones y especificaciones de calidad para la producción, importación, transporte, almacenamiento, distribución y comercialización de bioetanol y biodiésel*", en donde especifica los rangos para sus propiedades físico-químicas, visualizadas en la tabla 1. También define la tasa de mezcla, fijándola en apenas un 2 % a 5 % del volumen resultante [32].

En el presente predomina el uso de canola, soja, caña de azúcar, dando origen a los biocombustibles de primera generación, sin embargo, no demuestran ser sostenibles, debido a que consumen gran cantidad de recursos y área, otrora dedicada a cultivos alimenticios. Este tipo de biodiésel y sus derivados han conseguido escalas de producción en masa, alcanzando una tasa de reemplazo en el sector transportes de apenas el 1 %, necesitando al menos el 1 % del total de tierra agrícola a nivel global [7]. Este conflicto por el uso de tierras representa la fuerza que motiva la búsqueda de otras opciones, ó biocombustibles de segunda generación, dentro de los cuales destaca por su proyección, el biodiésel proveniente de biomasa microalgal.

Tabla 1: Características de biodiésel definidas en el decreto N°11 [32].

| **Propiedad** | **Unidad** | **Valor** |
|---|---|---|
| Densidad a 15°C | g/cm3 | mín. 0,86-máx. 0,90 |
| Viscosidad a 40°C | mm2/s | mín. 3,5-máx. 5,0 |
| Punto de inflamación | ºC | mín. 120 |
| Punto de escurrimiento | ºC | máx. -1 |
| Azufre total | % masa | máx. 0,005 |
| Residuos de Carbono | % masa | máx. 0,05 |
| Conradson (CCR) | % masa | máx. 0,02 |
| Agua y sedimentos | % volumen | máx. 0,05 |
| Corrosión de la lámina de cobre (3 horas, 50°C) | grado de corrosión | máx. Nº 2 |
| Valor de neutralización(valor de acido mg KOH/g) | mg KOH/g | máx. 0,5 |
| Contenido de éster | % masa | mín. 96,5 |
| Contenido de Metanol | % masa | máx. 0,20 |
| Glicerina Libre | % masa | máx. 0,02 |
| Glicerina total | % masa | máx. 0,25 |
| Fósforo | mg/kg | máx. 10 |
| Contenido de alcalinos (Na+K) | mg/kg | máx. 5 |
| Contenido de Metales | mg/kg | máx. 5 |
| Estabilidad a la oxidación a 110ºC | Horas | mín. 6 |

## 2.2. Microalgas

Las microalgas son una alternativa a las fuentes de primera generación, debido a que no compiten por terreno, ni recursos, con otras industrias, así como la agrícola. Son de más rápida producción, llegando a crecer 100 veces más rápido que plantas terrestres y doblar su masa en un día [8]. Se caracterizan por un gran potencial para acumular lípidos de utilidad en la industria de los biocombustibles.

Una cuantificación realista de la productividad microalgal, referido al contenido lipídico, en contraste con especies vegetales terrestres, se refleja en el tabla 2:

Tabla 2: Comparación de microalgas con otros nichos de biodiesel [13].

| **Fuente** | **Contenido lipídico** [%] | **Rendimiento de aceite** [L/ha/año] | **Superficie utilizada** [$m^2$año/kg] | **Productividad biodiesel** [kg/ha/año] |
|---|---|---|---|---|
| Maiz | 44 | 172 | 66 | 152 |
| Cañamo | 33 | 363 | 31 | 321 |
| Soya | 18 | 636 | 18 | 562 |
| Jatropha | 28 | 741 | 15 | 656 |
| Canola | 41 | 974 | 12 | 862 |
| Girasol | 40 | 1.070 | 11 | 946 |
| Palma | 36 | 5.366 | 2 | 4.747 |
| Microalga (Bajo cont. lipídico) | 30 | 58.700 | 0,2 | 51.927 |
| Microalga (Medio cont. lipídico) | 50 | 97.800 | 0,1 | 86.515 |
| Microalga (Alto cont. lipídico) | 70 | 136.900 | 0,1 | 121.104 |

Otra ventaja es la disminución en los agentes contaminantes, provenientes de la combustión en motores, puesto que el biodiésel microalgal no contiene sulfuros. Además genera emisiones menores de material particulado, monóxido de carbono, hidrocarburos y $SO_x$ [9]. Otros beneficios se en listan a continuación:

- Remoción de $CO_2$ desde la gases de escape industriales, por la fijación de carbono, reduciendo las emisiones, mientras se produce biodiésel [10].
- Tratamiento de aguas servidas removiendo $NH_4^+, NO_3^-, PO_4^{3-}$, que forman parte de la nutrición microalgal [11].
- Luego de la extracción, la biomasa restante puede servir para su uso en la producción de etanol, metano, alimento para ganado, fertilizante agrícola, etc.
- Potencial para la extracción de otros componentes con valor agregado, como la industria cosmética, nutrición, etc.

### 2.2.1. Definición

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, procariotas ó eucariotas, de crecimiento rápido y de estructura unicelular o pluricelular simple. Son consideradas como una de las formas de vida más antiguas de la tierra, presentes en todos sus ecosistemas, acuáticos (dulce y salado) y terrestres. Se estima que existen aproximadamente 50.000 especies.

### 2.2.2. Biología y composición lipídica

Para un análisis detallado, es necesario separar brevemente las microalgas en dos grupos mayoritarios, procariotas y eucariotas. Las microalgas eucariotas son aquellas cuyo material genético esta separado del citoplasma por una membrana nuclear, ademas de presentar oganelos que controlan las funciones celulares. Destacan los cloroplastos, que acumulan los pigmentos fotosintéticos, los ribosomas 70S y 80S, además de gránulos de reserva, compuestos de lípidos y almidón. Contienen en su mayoría vacuolas para el control osmótico así como también pared celular.
La contra parte procariota ó cianobacteria son mucho más simples, su material genético existe dentro del citoplasma, y su estructura externa principalmente se establece por membrana plasmática y pared celular. Esta pared celular, presentará desafíos a la hora de extraer cualquier componente desde el interior de la célula [12].
El contenido lipídico dentro de la célula microalgal es fundamental, puesto que dictará la cantidad y calidad del biodiésel generado al final del proceso.
Un lípido puede ser definido como cualquier molécula biológica que pueda ser disuelta en un solvente orgánico. El bloque fundamental en la mayoría de los lípidos es un ácido graso, que consiste en un grupo carboxilo hidrofílico anexado al fin de una cadena de hidrocarbonos hidrofóbicos. Estos son designados según el numero de carbonos en dicha cadena y el número de enlaces múltiples presentes. Esta última característica da origen a su clasificación entre saturados (sin enlaces dobles ni triples) e insaturados (con al menos un enlace doble y/ó triple).
Cuando el grupo carboxilo esta unido a un grupo con carga neutral, por ejemplo el glicerol, da origen a un lípido apolar (como los triglicéridos). Por otro lado, al unirse con un grupo cargado eléctricamente, como un complejo glicerol y fosfato, se forma un lípido polar (fosfolípidos).

Los lípidos apolares incluyen por un lado a los glicéridos (ácido graso unido a un grupo glicerol, se hallan como monoglicéridos, biglicéridos y triglicéridos) así como también ácidos grasos libres, mientras que por otro, s encuentran hidrocarbonos, esteroles, ketones y pigmentos, que pese a ser solubles, no están compuestos por ácidos grasos y por tanto no tienen utilidad para la conversión en biodiésel. Estos son usados por la célula principalmente como reserva energética.

Los lípidos polares son representados por fosfolípidos y glucolípidos, con función estructural (pieza clave de la membrana celular) [4].

El contenido lipídico microalgal varía entre el 1 % al 70 % (porcentaje peso, biomasa seca) solo considerando las diferentes especies, ya que bajo ciertas condiciones de cultivo puede llegar al 90 % [13]. Es importante destacar la diferencia entre contenido lipídico y productividad lipídica, puesto que, en la búsqueda de producir una microalga con alto contenido lipídico, su tasa de producción puede ser mucho menor, por lo que sería mas sostenible producir una con menor contenido lipídico, pero con superior producción. Es relevante entonces el indicador productividad lipídica, que contempla no solo el contenido por cada célula, sino la cantidad de células que puedan producirse en determinado tiempo, y por tanto, con determinados recursos.

A continuación se muestran algunas especies de microalgas, con su contenido lipídico y productividad lipídica:

Tabla 3: Contenido lipídico y productividad lipídica para diferentes especies microalgales [13].

| **Especie microalgal** | **Contenido lipídico [% peso biomasa seco]** | **Productividad [mg/L/día]** |
|---|---|---|
| Ankistrodesmus sp. | 24,0-31,0 | - |
| Botryacaccus braunii | 25,0-75,0 | - |
| Chaetoceros calcitrans | 14,6-16,4/39,8 | 17,6 |
| Chiorella vulgaris | 5,0-58,0 | 11,2-40,0 |
| Chlorococcum sp. | 19,3 | 53,7 |
| Crypthecodinium cohnii | 20,0-51,1 | - |
| Dunaliella salina | 6,0-25,0 | 116,0 |
| Ellipsoidion sp. | 27,4 | 47,3 |
| Monallanthus salina | 20,0-22,0 | - |
| Nannochiorapsis sp | 12,0-53,0 | 37,6-90,0 |
| Phaeodactylum tricornutum | 18,0-57,0 | 44,8 |
| Porphyridium cruentum | 9,0-18,8/60,7 | 34,8 |
| Scenedesmus sp. | 19,6-21,1 | 40,8-53,9 |
| Skeletanema sp. | 13,3-31,8 | 27,3 |
| Arthrospira máxima | 4,0-9,0 | - |
| Tetraselmis suecica | 8,5-23,0 | 27,0-36,4 |

## 2.3. Producción

### 2.3.1. Historia

Los inicios históricos de la producción de microalgas se dieron bajo la necesidad de buscar nuevas fuentes de alimentación en culturas antiguas. Por ejemplo, existen registros que en China hace más de 2.000 años se cultivaba y comía una microalga con nombre *nostoc*, para poder perdurar en épocas de hambruna.

En América, la cultura azteca cultivaba y recolectaba una novedosa fuente de alimento para los conquistadores, conocida como *techuitlatl*, actualmente conocida como *arthrospira* ó espirulina.

La investigación hacia estos microorganismos a aumentado dentro de los últimos 50 años, en orden de conocer sus cualidades, además de las maneras más eficientes de llevar a cabo

su cultivo. En la década de 1960, Nihon Chorela llevó a cabo el primer cultivo a gran escala, de la microalga con el mismo nombre [14]. Con la primera crisis del petróleo, apoyado por el laboratorio nacional de energías renovables de Estados Unidos (NREL por sus siglas en ingles), se potencio la investigación, financiando estudios en cuanto a la producción y extracción de aceite microalgal con fines energéticos. Pese a la cancelación del plan de dicha institución, la investigación continua, puesto que si bien la producción de biocombustibles de origen microalgal es realizable, aún queda mucho por desarrollar y mejorar [13].

### 2.3.2. Selección

La primera tarea para llegar a una producción efectiva de microalgas consistirá en la elección tanto del sitio de cultivo como también de la especie de microalga. Ambas dictaran la viabilidad económica, y por tanto la sostenibilidad del proceso en el tiempo. Por esta razón se hace pertinente crear un estudio que considere y juzgue por las siguientes variables principales:

- Provisión de agua, es decir que tan fácil acceso se tendrá al recurso hídrico pertinente (con especificaciones químicas y físicas) y los costos asociados.
- El espacio físico, geología, referido a las características del relieve, altura, ubicación, bienes raíces, etc.
- Las condiciones climáticas del lugar, como la temperatura, humedad, lluvias, etc.
- Accesibilidad a los recursos de nutrición y otros insumos.

Las categorías anteriores, centradas en la selección de sitio, determinarán algunas características básicas que darán los primeros lineamientos para la selección de la especie microalgal. Al momento de elegir la cepa también se debe tener en cuenta:

- Tasa de crecimiento, referido a la cantidad de biomasa obtenible por unidad de tiempo.
- Contenido lipídico, referido a la cantidad de lípidos disponibles por unidad de masa. También ha de considerarse el tipo de lípidos presentes, estudiado, por ejemplo, a través de un un perfil lipídico.
- Resiliencia y resistencia frente a cambios en el ambiente, como el clima, luz, nutrición y ataque de otros organismos.

- Tipo de nutrición, puesto que el énfasis se puede dar en la nutrición autótrofa (exclusivamente fotosintética), heterótrofa (con alimentación de sustratos externos, como aguas residuales, [11]) ó una mezcla de ambas.
- Capacidad para formar agregados que facilitarán la etapas posteriores del proceso.
- Posibilidad de obtener otros compuestos que brinden valor agregado al proceso.

### 2.3.3. Cultivo

El método de cultivo presenta un rol fundamental en el proceso, puesto que una selección eficiente del mismo, permitirá obtener la máxima cantidad y calidad de biomasa, bajo las mismas condiciones operacionales. La decisión es compleja, siendo importante definir el producto y su valor agregado, junto con la disponibilidad de recursos, de manera previa a esta etapa. Las criterios que se deben cumplir son los siguientes [15]:

- Iluminación efectiva en el área de cosecha.
- Intercambio óptimo entre las fases liquida y gaseosa.
- Operación simple.
- Bajos niveles de contaminación.
- Bajo capital y costos de producción.
- Mínima área requerida

Actualmente existen dos métodos de amplia utilización a mediana y gran escala, con énfasis en la producción de organismos autótrofos fotosintéticos: los cultivos abiertos (*raceway pond*), donde la biomasa esta en contacto directo y libre con el medio ambiente; y cerrados ó fotobiorreactores con poco ó ningún contacto externo.
El cultivo abierto corresponde a la modalidad más común, principalmente por si simplicidad [16]. Estos pueden corresponder a medios naturales como lagunas y estanques, como también a diseños artificiales, dentro del cual destacan los estanques circulares u ovalados agitados, también conocidos como *raceway pond*. Consiste en un estanque de no más de 50 [cm] de profundidad divido por un muro central, en donde el movimiento necesario para una correcta transferencia de energía y masa, además de evitar la sedimentación, viene dado por la agitación de una fuente mecánica externa, en la forma de paletas agitadoras. Los cultivos abiertos son más económicos que los fotobiorreactores, pudiendo incluso

implementar suplementación nutricional externa para el cultivo, en forma de tratamiento de aguas residuales, reduciendo costos. La concentración de biomasa puede llegar hasta 0,7[g/l] [16], cantidad reducida en comparación con cultivos cerrados, principalmente por la limitada accesibilidad a la luz de las células, la continua evaporación de agua, la necesidad de terreno y la exposición a contaminación de organismos externos depredadores. Se estima que los sistemas abiertos, utilizados desde la década del 50, han llegado a su límite de desarrollo, debiendo entregarse el enfoque investigativo a otras opciones [16].

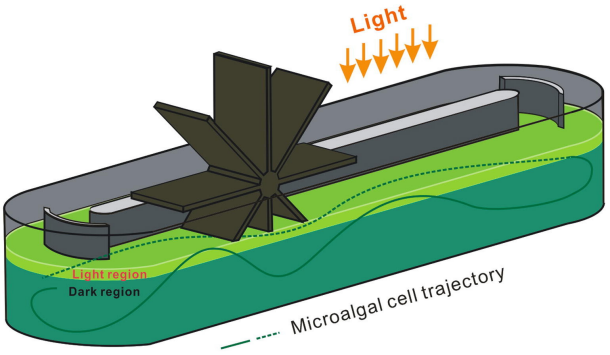



Figura 6: Esquema *Raceway Pond* [17].




Figura 7: Vista aérea planta de producción en gran escala de *Arthrospira maxima* , equipada con raceway pond [18].

Ante la necesidad de controlar rigurosamente las variables del cultivo, surgen los fotobiorreactores, quienes mediante su construcción cerrada, permite evitar gran parte de los problemas asociados con la exposición ambiental directa de los cultivos abiertos. Con esta metodología se puede regular la nutrición con notable precisión, así como también mejorar el acceso a la luz solar obteniendo cultivos hiper-concentrados, de hasta 80[g/l] [7]. En general, los fotobiorreactores consisten en arreglos planos ó tubulares de diferente disposición, donde se captura la luz solar directamente, pudiendo alinearse horizontal, vertical ó inclinadamente. También existen formatos de hélice y espirales, pero con dificultades de escalamiento. Los cultivos re circulan mediante la inclusión de un sistema de bombeo, como también por levantamiento aéreo, que permite el intercambio gaseoso necesario para la correcta nutrición del cultivo.



Figura 8: Fotobiorreactor tubular circular concéntrico [19].



Figura 9: Fotobiorreactor tubular [20].

La ventajas y desventajas de cada uno de los métodos de cultivo se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 4: Comparación métodos de cultivo [7].

| Sistema de producción | Ventajas | Desventajas |
|---|---|---|
| **Cultivo abierto *raceway*** | Económico, fácil limpieza, no compite por tierra agrícola, bajo consumo energético, rápido mantenimiento | Poca productividad, gran área requerida, cepas limitadas, pobre capacidad de mezclado y aprovechamiento solar, fácil contaminación. |
| **Fotobiorreactor tubular** | Amplia iluminación superficial, Apto para cultivos exteriores, Poco costoso, buena productividad. | Pequeño grado de crecimiento en pared, amplio espacio, gradientes de ph, oxigeno y dióxido de carbono disuelto. |
| **Fotobiorreactor de columna** | Compacto, alta transferencia másica , bajo consumo energético, buena capacidad de mezcla, fácil control de contaminantes. | Poca área de iluminación, caro, construcción complicada. |

El cultivo tendrá repercusiones importantes en indicadores globales del proceso, como lo son la productividad y el contenido lipídico, principalmente por la existencia de factores como la intensidad lumínica, duración ciclo noche/día, temperatura, salinidad,$CO_2$ y control nutricional [29], que se pueden manipular, usando la naturaleza irritable de la microalga, para obtener mejores resultados.

Reconocido por la literatura, destacándose como el factor más importante, es el control nutricional, sacando provecho a la reacción del microorganismo frente a adversidades del medio, en particular estrés alimenticio, mediante la privación de N, O y P, en donde la célula entra en modo supervivencia, guardando la mayor cantidad de reservas energéticas en forma de lípidos [30]. Ejemplos de tal relación son aumentos desde el 10 % al 20 % de contenido lipídico bajo la limitación de oxigeno [29], aumentos de hasta el 76 % en el contenido lipídico limitando el nitrógeno hasta ser un factor limitante [7], 47.7 % limitando el fósforo [27] y el aumento de contenido lipídico por deficiencia de silicio [29].

### 2.3.4. Cosecha

Los recursos utilizados en la cosecha corresponden entre el 20 % y el 30 % de los costos totales de producción siendo un factor significativo en cualquier estudio de factibilidad [13]. El objetivo de esta etapa es separar las fases de manera eficiente y eficaz, obteniendo tanto la biomasa, como también el medio de cultivo, para una posible re utilización. Para tal tarea se pueden usar recursos físicos, químicos o biológicos.
Las metodologías más comunes incluyen sedimentación, centrifugación, filtración y flocuación, trabajando en dos etapas: una general, con concentraciones del orden del 7 % y un espesado, donde se crea el concentrado [7].

- **Flocuación:** Forma agregados de biomasa mediante uso de químicos y polaridades eléctricas, alterando la carga eléctrica de las microalgas, que tenderán entonces a la aglomeración.
- **Flotación:** Se busca atrapar microalgas usando burbujas de aire dispersas, sin adición de químicos.
- **Sedimentación y centrifugación:** Pretende, de manera natural ó asistida mecánicamente, la separación de las fases por diferencia de densidad. Corresponde a una de las técnicas de cosecha más comunes.
  Si se trata de células de gran dimensión, sobre 70[$\mu m$], se puede realizar sedimentación simple, de lo contrario, deberá centrifugarse la mezcla, proceso más costoso pero con eficiencias altas, sobre el 95 % [7].
- **Filtración:** El más indicado para microalgas de gran proporción, no así para especies pequeñas, menores a 30[$\mu m$], donde deberán establecerse filtraciones consecutivas y micro filtraciones, convirtiendo al proceso en uno poco eficiente [7].

### 2.3.5. Pre-tratamiento

Una vez realizada la cosecha, obteniéndose un concentrado de biomasa húmedo, se debe preparar para mejorar sus condiciones de almacenado y conservación, así evitando pérdidas por descomposición. Es por esto que el principal objetivo, referente a las metodologías convencionales, es eliminar el agua presente, que dañaría procesos consecutivos, como lo son la extracción y conversión a biodiésel.
El concentrado habitualmente ronda el 10 % de contenido biomásico seco, y su duración

esta limitada por su naturaleza perecible.
Los métodos más comunes incluyen secado solar, secado con spray, secado en tambor, en horno, entre otros.
La alternativa solar es la más común, sin embargo es la más lenta, conllevado riesgos de contaminación y pérdidas. La alternativa de secado por spray, por el contrario, es muy veloz, pero de elevado costo [7], puesto han de impulsarse masas de aire sobre calentado a presión sobre el concentrado.

## 2.4. Bioaceite microalgal

Una vez obtenida la biomasa microalgal seca, se esta en condiciones de comenzar la extracción y conversión a biodiésel. Dichos procesos serán relatados en esta sección, describiendo las alternativas más comunes en la actualidad.

### 2.4.1. Pre-extracción

Previo a realizar la extracción de lípidos propiamente tal, se debe promover la salida de los compuestos desde el interior de la célula. Cabe destacar que la presencia de pared y/ó membranas celulares, dificulta dicha operación, convirtiendo al microorganismo en un ambiente aislado. Por esta razón existen procesos que forman parte del pre-tratamiento, con miras a una parcial o completa destrucción celular, permitiendo el paso mas eficaz de lípidos, en extracciones con fines energéticos.
Los métodos más relevantes son los siguientes:

- **Sonificado:** Se usa el ultrasonido (ondas de frecuencia sobre los 20[kHz]) para romper mediante resonancia y transferencia de energía, pared y membranas celulares. Se promueve el uso en ciclos para evitar el calentamiento excesivo de la muestra. Para esta operación, se re hidrata la biomasa, transfiriendo de manera óptima 800[J] por cada 10[ml] de disolución, sin importar su concentración [25].

- **Homogenización a alta presión:** Los homogenizadores de alta presión se utilizan principalmente en la preparación de emulsiones. Mientras que proporcionan tasas excepcionales de cizallamiento y tamaño de glóbulo ultra-fino, estos artefactos tienen altos costes de mantenimiento y operación y requieren gran inversión de capital. Inyectan la biomasa a altas presiones, destruyendo las células en su accionar.

- **Molino de bolas:** Se utiliza un molido de bolas hechas de un material duro, rotando a altas revoluciones por minuto, que aprovechando las aceleraciones dinámicas como coriolis, permite reducir el tamaño de la biomasa, hasta dañar la estructura celular.
- **Microondas:** Utiliza microondas para disrumpir la célula, aumentando la temperatura de la misma en el proceso.
- **Lisis química:** Utiliza ácidos y/ó enzimas para permear las barreras naturales de la célula.
- **Choque osmótico:** Mediante la utilización del mecanismo de ósmosis, se pretende manipular los tamaños celulares hasta producir la falla en las membranas protectoras de la misma. Se procede aumentando o disminuyendo las presiones osmóticas de la célula referente al entrono en el que está sumergida.
- **Prensa mecánica:** Se utiliza presión mecánica, para físicamente romper barreras celulares.

### 2.4.2. Extracción

La extracción propiamente tal de los lípidos en forma de bioaceite, a partir de biomasa microalgal, se convierte en pieza fundamental del desarrollo del proceso, puesto que una correcta elección de la metodología puede incrementar la eficiencia y eficacia, permitiendo al proceso ser rentable, ó convertirlo en algo insostenible.
Las opciones más comunes de extracción de bioaceite, se enuncian a continuación:

- **Extracción con solvente orgánico:** Corresponde al flujo de un solvente orgánico, polar o apolar, también existiendo mezclas de los mismos, que disolverán los lípidos dentro de la célula, para extraerlos de la misma, al fluir. Dependiendo del arreglo en que este método se encuentre, se puede generar una amplia necesidad por solvente, sin embargo es una metodología efectiva.

  Posteriormente el líquido resultante se filtra, para eliminar toda la biomasa sobrante.

  Finalmente, se debe separar el solvente del bioaceite con un proceso de evaporación, quedando sólo el extracto buscado.

  La elección del solvente es clave, puesto que variaciones en el uso de los mismos, pueden llevar a diferencias de hasta 300 %, como es el caso de usar isopropanol sobre hexano, el cual posee una mejor penetración y disolución de una gama más amplia

de lípidos [4].

Esta metodología tiene mediano potencial para el escalamiento, por su conflicto con el uso de solvente, y tiempos de acción.

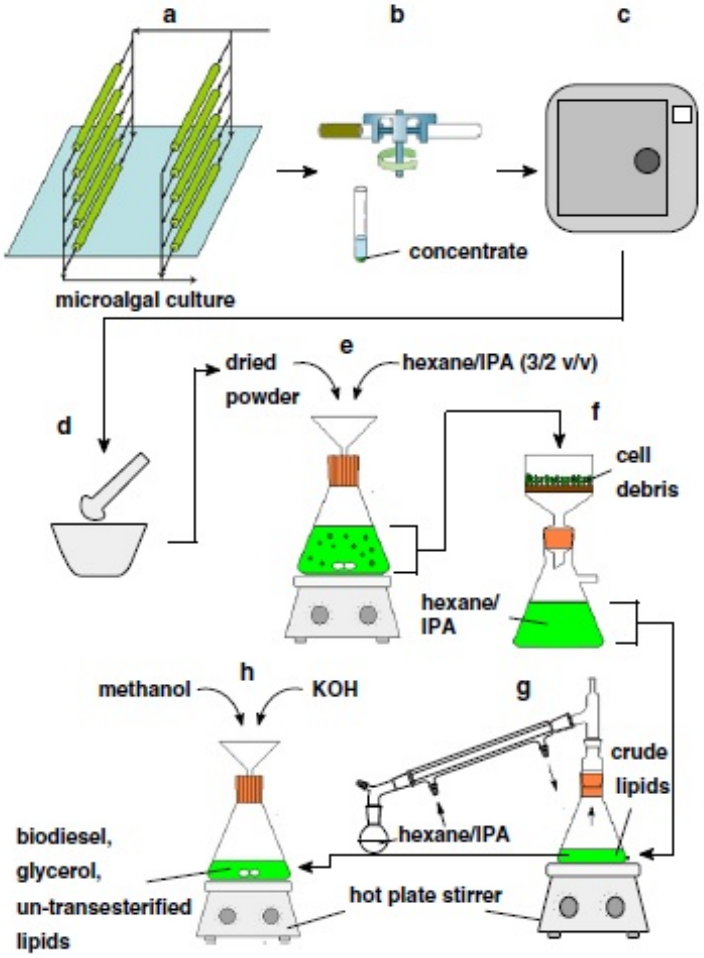



Figura 10: Diagrama del proceso de extracción por solventes [4].

- **Extracción supercrítica:** Se realiza mediante la inyección de dióxido de carbono supercrítico, es decir, con valores de presión y temperatura sobre los 72,9[atm] y 31,1[°C] respectivamente. Esto permite extraer de manera exitosa y segura lípidos termosensibles, así como disminuir riesgos por su nula inflamabilidad, baja toxicidad y poca reactividad. El proceso se realiza bombeando $CO_2$ a una presión mayor a la crítica, hasta un contenedor con temperatura mayor a su respectivo punto crítico. De esta forma, el compuesto, ahora supercrítico, es capaz de extraer lo lípidos, separados luego del $CO_2$ mediante una válvula de descompresión.

Su capacidad de escalamiento es mediana, siendo mucho más costosa que utilizando solventes orgánicos, por la complejidad agregada al equipo y conexiones necesarias.

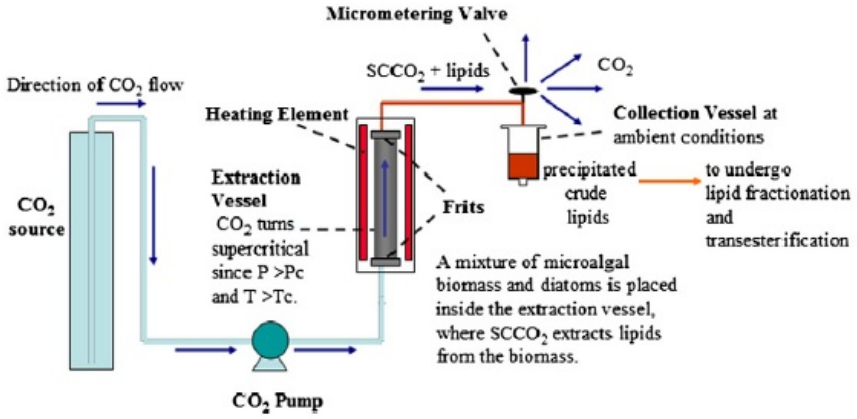



Figura 11: Diagrama de extracción supercrítica [4].

- **Extracción con Soxhlet:** Una variante de la extracción con solvente, es la cual se lleva a cabo con un equipo soxhlet, en donde, se utiliza de igual forma un solvente orgánico, sin embargo, el proceso integró se realiza en un arreglo de equipos, principalmente, un equipo soxhlet y un equipo rotavapor.

  El Soxhlet consiste en un sistema fabricado en vidrio, que permite reflujos sucesivos, con perdidas casi despreciables de solvente si los sellos son bien realizados.

  El solvente es evaporado por la acción de una manta térmica en contacto con el balón inferior del arreglo, quien entrega calor al compuesto, quien una vez en estado gaseoso, sube por la columna de admisión hasta pasar a estado líquido en la columna de condensación, donde ocurre la transferencia de calor entre el solvente y un fluido enfriante, como agua. El solvente condensado cae por goteo sobre la biomasa, hasta llenar la cavidad del tubo extractor, vaciándose la misma, a través de un sifón, iniciándose el ciclo otra vez. Más tarde, se separa el solvente del bioaceite mediante evaporación, que puede llevarse a cabo en un equipo rotavapor, ó otro arreglo para recuperar el solvente.

  Una ventaja del equipo soxhlet es que cada reflujo se hace con solvente sin ningún porcentaje de disolución, permitiendo que el gradiente de concentración desde la biomasa hacia el solvente se mantenga, pese a llevar varias horas de extracción. Otra ventaja es un extenso manejo de las variables operacionales, como lo son la tempe-

ratura de la manta térmica y la cantidad de biomasa agregada, así como también el tiempo dedicado a la extracción.

La principal desventaja de este método es su limitada posibilidad para el escalamiento, puesto que en la búsqueda de la eficacia, pierde eficiencia, encontrando límites por tamaño y tiempo de extracción.

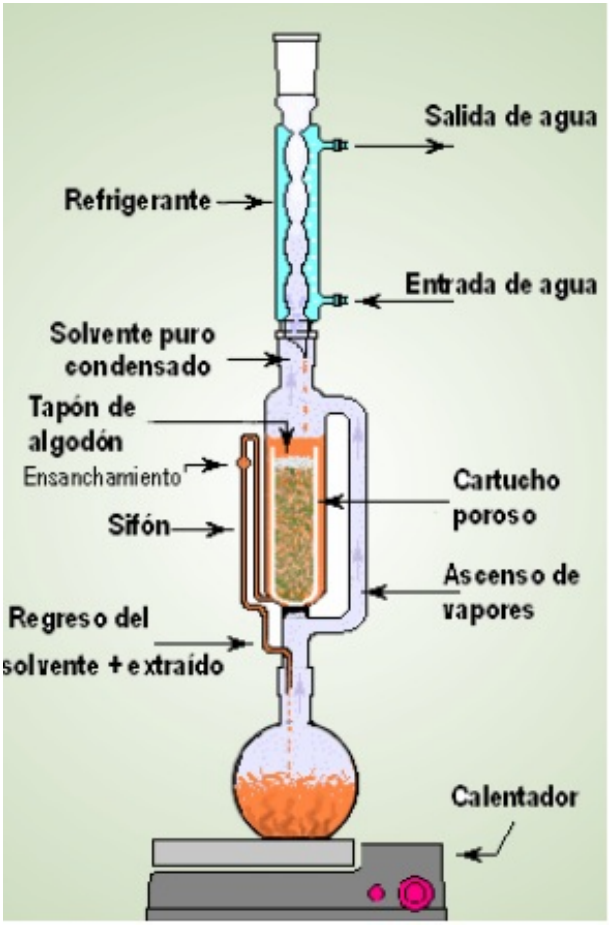



Figura 12: Diagrama de equipo Soxhlet [33].

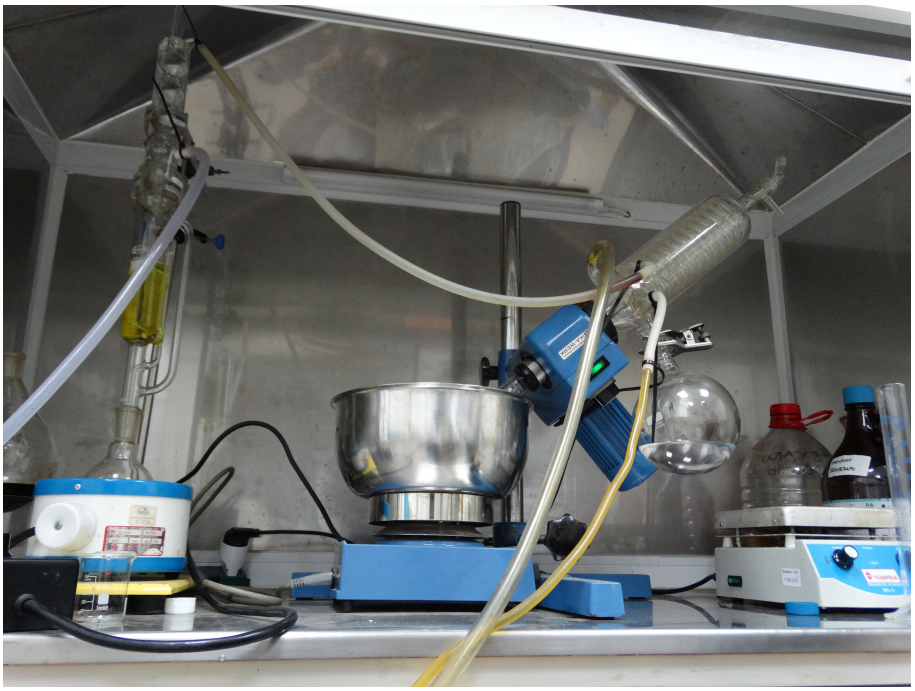


Figura 13: Arreglo Soxhlet con rotavapor, incluyendo conexiones hídricas.

### 2.4.3. Transesterificación

El último proceso para la creación de biodiésel a partir de bioaceite es la transformación de dichos lípidos extraídos, a compuestos útiles para el funcionamiento de un motor a combustión interna, de encendido por compresión. En concreto, metil esteres de ácidos grasos, ó F.A.M.E. por sus siglas en ingles.

Para alcanzar este estado, el bioaceite debe someterse a un procedimiento extra llamado transesterificación, que permite la conversión buscada. El proceso consiste en la adición de un alcohol en forma de metanol, que al unirse con los triglicéridos presentes en el extracto, pasará a formar biodiésel y glicerol. Dicha reacción puede ser catalizada por un ácido ($H_2SO_4$), por ejemplo, ó por una base (como NAOH), siendo estas últimas, no tan sólo más rápidas, sino que más eficaces, siendo escogidas por la industria.

# 3. Metodología

En esta sección se narrará los procesos utilizados en la fase experimental para poder obtener resultados significativos. Se definirán variables, así como métodos experimentales, caracterizando además el equipo utilizado.

## 3.1. Tipo de extracción, parámetros y variables

Las condiciones actuales de operación en la universidad son claras y fijas, lo cual demarca los principales parámetros (es decir aquellas variables que serán fijadas y cuya influencia no será considerada en el estudio) con los que se debe trabajar a la hora de extraer bioaceite a partir de biomasa microalgal. Estas condiciones están dadas puesto que dentro del departamento ya existió una iniciativa, desarrollada por estudiantes de intercambio, donde se gestionó la compra de equipos e insumos. Dicha experiencia, realizada durante el segundo semestre del año 2017, sienta precedente y hereda equipamiento a este estudio. Los resultados, por otro lado no son comparables por el tipo de biomasa utilizado, así como también por la metodología, ítem explicado más adelante.

Por esta razón, el departamento de ingeniería mecánica de la U.T.F.S.M, en su división de energías renovables, cuenta únicamente con un equipo de extracción Soxhlet, lo que limita la variedad de opciones a tan sólo la extracción por reflujos sucesivos con dicho equipo. Es importante destacar que el objetivo de esta técnica de extracción no es la producción, es decir, no existirán destacados índices de productividad extractiva de bioaceite, en comparación con otros procedimientos, principalmente por la larga extensión temporal de cada experiencia. Su objetivo principal es realizar una separación exitosa y eficaz de los agregados buscados (en este caso lípidos), con un extensivo control de las variables del proceso y con un eficiente uso de solvente, puesto que su recuperación es casi total.

El funcionamiento de este arreglo depende como factor principal del uso de solventes, quienes serán los responsables de captar los lípidos presentes en el interior de la célula microalgal. En stock dentro del departamento, sólo existe hexano con calidad para análisis, un solvente orgánico apolar, que si bien no es el óptimo, entregará resultados constantes y fidedignos a lo largo del estudio [21].

Una parte importante en el proceso de reflujo es la condensación del solvente evaporado, realizada en la torre de condensación del mismo equipo. Por ella se hace circular agua que permitirá la transferencia de calor desde el solvente, provocando su condensación y

goteo sobre la biomasa. Por las limitaciones en la instalación de agua potable, se fija un caudal, los más certero posible, realizando correcciones cada media hora para mantener dicho flujo constante. Estas variaciones están dadas por los distintos requerimientos de agua del edificio de ingeniería química, ubicado en la casa central de la universidad, donde se realizaron las experiencias.

Se fija también la cantidad de solvente utilizado por cada extracción, principalmente por las capacidades del equipo y por su naturaleza, es marginal la influencia de una cantidad extra de solvente mientras se alcance un volumen mínimo necesario para rellenar la cavidad donde descansa la biomasa.

Finalmente se elige un lote de biomasa fija, para poder obtener resultados comparables. En particular se elige *Arthrospira maxima* , ó comercialmente conocida como, Espirulina, por su disponibilidad en el mercado y uniformidad muestral, asegurando un proveedor fijo.

Las variables que se manipularán para ver su influencia real en los resultados de la extracción son:

**Temperatura:** Referido a la temperatura de la manta térmica que a su vez entrega calor al equipo soxhlet, en el balón inferior que alberga el solvente. Teóricamente su influencia será directamente proporcional a la cantidad de aceite extraído, puesto que entre más calor es traspasado al solvente, más rápida será su evaporación, por lo tanto más rápido será el goteo del mismo, finalmente traducido en más ciclos por unidad de tiempo. Asumiendo que la muestra de biomasa entrega lípidos continuamente, y por una considerable cantidad de ciclos, este efecto podrá ser determinante en la productividad del proceso.

**Cantidad de biomasa:** Referido a la cantidad de biomasa utilizada en cada experiencia, la cual será posicionada en el tubo de extracción. En primera instancia, parece obvio pensar que entre mayor sea la cantidad de biomasa, mayor será el aceite extraído, sin embargo existe la posibilidad de ir en detrimento de la productividad, es decir, el porcentaje de aceite extraído versus la cantidad de biomasa utilizada en la extracción, al intentar empaquetar demasiada biomasa dentro del cartucho poroso.

**Tiempo:** Referido al tiempo durante el cual la extracción de aceite se lleva a cabo. Su influencia teóricamente parece ser clara, considerando que entre mayor sea la cantidad de reflujo del solvente, mayor será el porcentaje de remoción de lípidos a partir de la muestra microalgal, sin embargo y pensando en la sustentabilidad del

proceso, tal vez exista un óptimo dentro de los límites operacionales definidos más adelante.

Se condensa y completa la información en la siguiente tabla y lista:

Tabla 5: Resumen cualidades de interés para las experiencias

| **Cualidad de incidencia** | **Tipo** | **Clasificación** | **Motivo** |
|---|---|---|---|
| Cantidad de biomasa | Cuantitativo | Variable | I |
| Temperatura | Cuantitativo | Variable | II |
| Tiempo | Cuantitativo | Variable | III |
| Flujo de agua | Cuantitativo | Parámetro fijo | IV |
| Cantidad de solvente | Cuantitativo | Parámetro fijo | V |
| Tipo de solvente | Cualitativo | Parámetro fijo | VI |
| Tipo de extracción | Cualitativo | Parámetro fijo | VII |
| Tipo de biomasa | Cualitativo | Parámetro fijo | VIII |
| Pre-tratamiento | Cualitativo | Variable | IX |
| Granulado de la biomasa | Cuantitativo | Parámetro fijo | X |
| Empaquetado de la biomasa | Cualitativo | Parámetro fijo | XI |

**I)** La cantidad de biomasa es considerada una variable, puesto que su variación provocará una influencia en la cantidad de aceite obtenido, como se mencionó anteriormente, es hipotética una relación directa, más no se tiene certeza de cuanto, ó la presencia de un óptimo, más aun considerando la interrelación con otras variables. El factor de acumulación dentro del empaquetado, impermeabilizando algunas áreas o dificultando el paso del solvente puede provocar que la relación se deteriore o disminuya su productividad.

**II)** La temperatura de la manta térmica de igual forma es una variable que se podrá modificar a lo largo de las extracciones. Como se menciona, entre mayor sea el traspaso energético entre la manta térmica y el solvente, más rápida será la ebullición del mismo, permitiendo más reflujos en el mismo tiempo. Pese a lo anterior, la temperatura en sí del solvente no debiera sobrepasar la temperatura de ebullición del hexano (68,7[°C]), impidiendo el deterioro de los lípidos en la muestra.

**III)** El tiempo determinará las veces que el solvente puro pasará por la muestra, el prin-

cipal punto de ver como variable este ítem es saber en que punto la extracción es óptima de mantener, no consiguiendo mejores resultados, al permanecer en extracción por más tiempo.

**IV)** El flujo de agua se toma como parámetro, primeramente por la imposibilidad de controlarlo en el laboratorio, dado el set-up de las conexiones de agua potable en dicha facilidad. Se fijó en el rango de 0.0278[l/s]-0.0285[l/s], donde la antigua llave de paso funciona en un rango óptimo.

Se controla efectuando mediciones cada media hora examinando el caudal y registrando tiempos, mediante un cronómetro, así reducir las variaciones efecto de los altos y bajos por consumo de agua en el edificio.

El aumento de dicho caudal solo implicaría una transferencia de calor más acelerada entre el vapor del solvente y el fluido en la columna de condensación, en términos concretos implicaría una columna de vapor en dicha torre de altura menor, sin embargo, el goteo, y por tanto el reflujo y la cantidad de ellos, sería el mismo. La diferencia, pues, es despreciable.

**V)** La cantidad de solvente se fija como parámetro en los 170[ml], 20[ml] más que la capacidad del tubo de extracción asegurando que dicha cavidad se llene sin dejar el balón inferior seco, protegiendo un aumento de temperatura por sobre el punto de ebullición del solvente.

Un aumento de la cantidad de solvente provocará una demora inicial para los primeros signos de evaporación, más una aceleración de las evaporaciones subsecuentes, puesto que existiría mayor cantidad de solvente en el balón inferior a una temperatura más elevada. Dichas diferencias son despreciables en comparación con los efectos de otras variables, sin ejercer una influencia sustancial.

**VI)** El tipo de solvente es una variable vital en la fase extractiva del aceite, puesto que según el tipo y características que este tenga, distinto será el grado de disolución máximo con las sustancias que se desean extraer. En la literatura aparecen alternativas mucho mas eficaces y eficientes que el hexano exclusivo, como lo son mezclas de solventes apolares y polares (cloroformo-metanol), con rendimientos mas de 4 veces superiores al del hexano solo [21]. Pese a lo anterior, por motivos de disponibilidad y economía, se establece y fija el uso exclusivo de este último, para todas las extracciones.

**VII)** La extracción por soxhlet es fijada como parámetro puesto que es la única de fácil disposición en el departamento, además de ser el primer parámetro fijado a la hora de establecer este tema de estudio. Conocidos son otras metodologías, comentadas anteriormente, que permitirían mejores rendimientos, así como también mejores productividades [4].

**VIII)** La biomasa se establece como parámetro, para obtener valores comparables respecto a rendimientos de extracción. Inicialmente se intenta usar una muestra indefinida de varias cepas, para finalmente utilizar *Arthrospira maxima* ó Espirulina.

**IX)** El pre tratamiento es una variable cualitativa que es fijada en función a las posibilidades y equipos disponibles en la universidad, enfocando los esfuerzos mediante la coordinación y uso de un equipo sonificador, puesto que, pese a la existencia de más métodos, ejemplifica el actuar de procedimientos previos a la extracción de bioaceite microalgal [4].

**X)** El granulado de la biomasa fue una variable que se consideró analizar puesto que una mayor molienda de la biomasa permitiría un mejor flujo de solvente, sin embargo, luego de la molienda y sonificado, no es posible lograr, con los instrumentos y equipos disponibles un grado de granulado mayor, siendo entonces el resultado final, el máximo alcanzable operacionalmente.

**XI)** El empaquetado de la biomasa en el equipo soxhlet se ve limitado a dedales ó empaquetaduras porosas en general. Se fija como estándar cartuchos fabricados con papel filtro de tamaño rectangular, con capacidad no mayor a los 25[g] de microalga seca. Exceder dicha capacidad conduce a la posible ruptura del envoltorio.

## 3.2. Equipo e insumos

En esta sección se enuncian los equipos utilizados en esta investigación. Cabe destacar que se priorizo exclusivamente el uso de material disponible tanto en el departamento de mecánica como en el departamento de ingeniería química de la casa central de estudios U.T.F.S.M, por motivos presupuestarios y para mejorar procesos reales repetibles por investigaciones futuras.
El enfoque investigativo fue analizar los procedimientos extractivos actuales existentes y maximizarlos.

### 3.2.1. Equipo principal

- **Equipo Soxhlet:** Principal equipamiento para el desarrollo de esta investigación, puesto que será donde se realice la extracción, separando lípidos solubles existentes dentro de la biomasa en un solvente apolar mediante reflujos sucesivos.
  Consiste en 3 secciones o partes: Primeramente el balón inferior de 250 [ml] de capacidad, donde reside el solvente y ocurre la transferencia de calor entre la manta térmica y el solvente. Posteriormente se encuentra el tubo de extracción, con capacidad para 150[ml] y sifón, donde se posiciona la biomasa empaquetada, y ocurre el escurrimiento de solvente por goteo. Además en esta sección ocurre la transferencia másica de solvente tanto en estado gaseoso (columna de vapor, ascendente) como líquido (sifón, descendente). Finalmente en el extremo superior del equipo se halla la columna de condensación, en donde existe la transferencia de calor entre el vapor de solvente y un fluido refrigerante, en este caso particular, agua potable.
  Esta confeccionado por completo en vidrio, de marca Glassco y es de propiedad del departamento de mecánica.
  A continuación se presentan imágenes del equipo utilizado:



(a) Equipo Soxhlet (b) Equipo Soxhlet en funcionamiento

Figura 14: Imágenes de equipo Soxhlet y manta térmica, más accesorios de sujeción.

- **Manta térmica:** Equipo de vital importancia pues es quien entrega el diferencial de temperatura y por tanto el flujo de calor necesario para la evaporación del solvente desde el balón inferior. Consiste en una estructura cóncava, conformada por una superficie termo-resistente, equipada con una resistencia eléctrica quien elevará la temperatura de dicha superficie. Posee una graduación de calefacción o temperatura, desde el 0 al 11.

  En la siguiente tabla se enuncian características de la manta térmica:

Tabla 6: Especificaciones manta térmica.

| | |
|---|---|
| Modelo | Q-321.A23 |
| Voltaje | 220[V] |
| Frecuencia | 60[Hz] |
| Marca | Quimis |
| Proveedor | Heyn |
| Potencia | 130[W] |
| Número de serie | 802796 |
| Graduación | 0-11 |
| Procedencia | Brasil |




(a) Placa manta térmica.




(b) Controlador manta térmica..




(c) Manta térmica.

Figura 15: Imágenes de manta térmica y sus componentes.

- **Rotavapor:** Equipo utilizado para separar el solvente del extracto con valor agregado buscado, en particular, bioaceite. El equipo, mediante evaporación a baño maría, y posterior condensación, será capaz de disponer el solvente para su re-utilización, así como la muestra de aceite.

  El equipo se puede separar en dos entidades generales. En primer lugar, el baño maría, consistente en una suerte de olla, con regulación térmica, que permite llevar al agua en su interior al punto de ebullición con un rango intermedio.

  En la siguiente tabla se observa información técnica del equipo:

Tabla 7: Especificaciones baño de agua.

| | |
|---|---|
| Temperatura | 50-250[°C] |
| Modelo | HB-250 |
| Voltaje | 220[V] |
| Frecuencia | 50/60[Hz] |
| Potencia | 1000[W] |
| Diámetro olla | 240[mm] |
| Profundidad | 100[mm] |

En segundo lugar se haya el equipo propiamente tal, que incluye un balón rotativo, de dimensión variable (Se utilizaron de 200[ml] y 50[ml]), confeccionado en vidrio. Luego viene el arreglo motor-reductor que es quien entrega la potencia para las rotaciones del balón.
En la siguiente tabla se exhiben distintos detalles del motor del rotavapor.

Tabla 8: Especificaciones rotavapor.

| | |
|---|---|
| Modelo | RB-05 |
| Marca | Junke&Kunkel |
| Voltaje | 240[V] |
| Frecuencia | 50[Hz] |
| RPM | 30/240 |
| Potencia motor | 98[W] |

Finalmente se halla la torre de condensación donde el solvente evaporado transfiere la temperatura a un fluido, en este caso agua potable, conectada en serie con la torre de destilación del soxhlet mismo, de esta forma el circuito se simplifica y optimiza el uso de agua.



(a) Rotavapor desconectado.

(b) Arreglo rotavapor y baño de agua conectado y operando.

Figura 16: Rotavapor y baño de agua.

- **Bomba de vacío:** Equipo capacitado para disminuir la presión en el interior del equipo rotavapor, disminuyendo la temperatura necesaria para la ebullición del solvente, así como permitiendo una mejor y mas completa separación del mismo, respecto del aceite buscado. Su funcionamiento se basa en el uso de un motor eléctrico que a su vez hace funcionar un cilindro que ejercerá el vacío buscado.
  El equipo es de propiedad del laboratorio de RILES, y si bien no estaba instalado al inicio de las extracciones, al obtener datos incongruentes, se observo que gran porcentaje de este error era al no completar la evaporación del hexano, incluyendo masa de solvente en el extracto de bioaceite. Por esta razón se instala el equipo y repiten las extracciones realizadas.

- **Campana de extracción:** La campana consiste en un equipo capacitado para la extracción de gases desde la zona de trabajo habilitada bajo la misma, permitiendo trabajar con sustancia nocivas para el organismo, disminuyendo peligros por inhalación de vapores. En particular para esta investigación, uno de las principales preocupaciones de seguridad era el peligro de inhalación de vapores del solvente evaporado, por la naturaleza cancerígena del hexano.
  Su estructura se conforma por un mesón de confección metálica, sobre el cual existe una estructura en forma de marco con reducción de área ascendente, donde se ubica un extractor diseñado para liberar los gases a la atmósfera, de manera segura para las personas.

Las características requeridas para la campana de extracción, además de la disponibilidad de la misma, tuvo como consecuencia la elección del lugar para realizar las extracciones, específicamente en el laboratorio de RILES del departamento de ingeniería química.

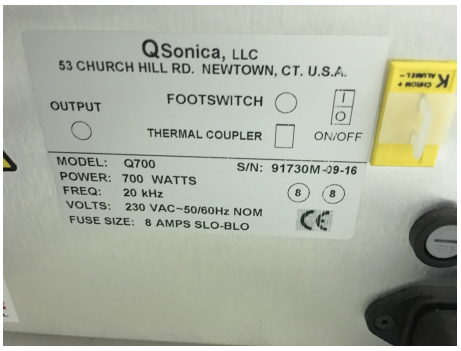
- **Sonificador:** Corresponde a un equipo cuya función será debilitar o de plano romper la dura pared celular y membranas aislantes de las células microalgales, permitiendo el paso al solvente para extraer el bioaceite buscado. Es una de las muchas formas para lograr dicho objetivo, siendo de las más eficaces, y la única no mecánica (molienda) disponible en la universidad.

  Su funcionamiento se basa en la utilización de una punta que mediante un motor vibrante, producirá oscilaciones a una frecuencia ultrasónica, resonando pasado el límite de fractura del las estructuras celulares microalgales. Todo el proceso es gestionado por un computador y software incorporado al equipo, entregando una interfaz simple e intuitiva.

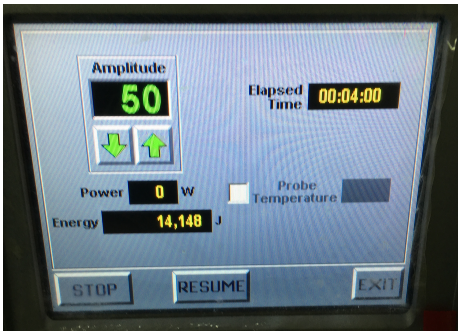
  Las características primarias se muestran a continuación:

Tabla 9: Especificaciones sonificador.

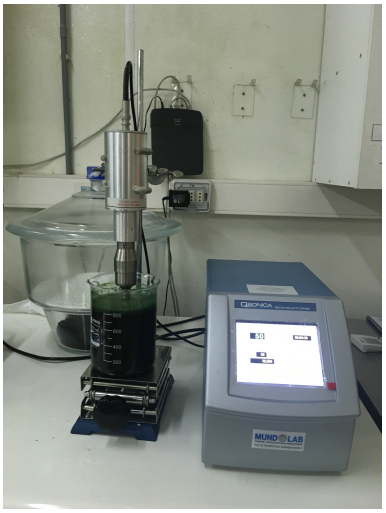
| | |
|---|---|
| Modelo | Q700 |
| Marca | Qsonica |
| Potencia | 700[W] |
| Frecuencia | 20[Khz] |
| Voltaje | 230VAC-50/60[Hz] |
| Tamaño fusible | 8[A] |




(a) Placa sonificador.




(b) Display sonificador.



(c) Equipo sonificador operando.

Figura 17: Imágenes sonificador.

- **Balanza analítica:** Instrumento ampliamente utilizado para cuantificar la masa de un agregado, insumo ó extracto en general. Para la investigación se aprovechó para conseguir mediciones exactas tanto de biomasa a agregar por extracción, así como para medir el resultado obtenido de bioaceite.
  Las especificaciones de la balanza digital son:

Tabla 10: Especificaciones balanza analítica [23].

| | |
|---|---|
| Marca | RADWAG |
| Modelo | AS220.R2 |
| Proveedor | Arquimed |
| Rango | 10[mg]- 220[g] |
| Tara | -220[g] |
| Resolución | 0,1[mg] |




Figura 18: Balanza analítica [23].

- **Equipamiento de seguridad:** Finalmente se mencionan equipos de seguridad varios para la correcta operación dentro del laboratorio, disminuyendo riesgos por manipulación de instrumentación frágil y sustancias nocivas. Se incluyen elementos como cotona blanca, guantes de nitrilo, guantes para manipulación de objetos calientes, mascarilla simple de papel y protección ocular. Lo anterior se utilizó según las circunstancias de trabajo, a excepción de la cotona y los guantes, ya que son parte del protocolo de trabajo en el laboratorio de RILES.

### 3.2.2. Equipo secundario

- **Horno:** Equipo utilizado para secar muestras de biomasa con presencia de humedad, así como para secar accesorios de laboratorio confeccionado con vidrio. Este equipo se mantiene a 105[°C]

- **Tamiz:** Herramienta utilizada para separar y clasificar porciones de la biomasa según su diámetro promedio. Se constituye por una serie de rejillas en anillos concéntricos de metal. Dichas rejillas se encuentran graduadas, con distintos números según el diámetro de poro de las mismas.

- **Licuadora:** Equipo utilizado en la primera molienda de la biomasa, puesto que luego del secado se encuentra en el formato de grandes agregados duros y frágiles, donde es preciso romperlos para poder alcanzar una buena penetración del solvente.

- **Mortero:** Equipo cerámico utilizado para moler agregados solidificados producidos cuando la biomasa se seca. Luego de pasar por la licuadora, se intenta homogeneizar y aumentar el grado de molienda con esta técnica manual.

- **Termómetro:** Instrumento utilizado para controlar las temperaturas en gran parte de los procesos que se llevan a cabo en la extracción, como lo es la temperatura del baño de agua, como también estimativos de la temperatura de la manta térmica, dichas mediciones son sólo referenciales ya que este instrumento no se utilizará a la hora de obtener conclusiones de las variables.
  Su confección es de vidrio, y el fluido es alcohol con tinte rojo. Su resolución es de 1[°C] y su rango es de 5[°C] a 120[°C].

- **Material de vidrio:** Incluye el material de vidrio auxiliar para poder procesar y llevar a cabo las extracciones, esto incluye: Desecador (equipado con silica gel para reducir la humedad ambiental), vasos precipitados (50[ml], 100[ml], 200[ml], 800[ml] y 1000[ml]), probetas (100[ml]), placas de petri, varillas, etc.

- **Equipo de laboratorio:** Incluye el resto de materiales utilizados en el laboratorio de manera auxiliar, como lo son soportes, bolsas plásticas, toalla de papel, envases de plástico, contenedores de plástico, etc.



(a) Horno de secado.



(b) Mortero.




(c) Tamiz graduado.




(d) Licuadora.




(e) Desecador.

Figura 19: Equipo secundario.

### 3.2.3. Insumos

Los principales insumos en la experimentación fueron:

- **Microalga:** Tratada en el siguiente párrafo, formalmente corresponde al genero *Arthrospira maxima* ó espirulina.

- **Solvente:** Corresponde a un solvente orgánico apolar, específicamente hexano con calidad para análisis, garantizando más del 99 % de pureza, disminuyendo la fuente de error por impurezas.
  Se utilizan 170[ml] de hexano por cada extracción, puesto que la capacidad del tubo de extracción asciende a 150[ml], previniendo que el balón inferior del soxhlet quede libre de solvente en algún momento. Este punto es de suma importancia, puesto que si el solvente es completamente evaporado del balón, la temperatura aumentará sobre el punto de fusión del hexano, pudiendo dañar el bioaceite, cambiando su configuración lipídica, disminuyendo su calidad, o de quemarlo.
  Se exhiben a continuación características del solvente:

Tabla 11: Especificaciones hexano [34].

| | |
|---|---|
| Nombre | N-Hexano |
| Calidad | HPLC para cromatografía líquida |
| Marca | Caledon |
| Proveedor | Vimaroni |
| Pureza | 99,5 % |
| Punto de ebullición | 68,7[°C] |
| Punto de fusión | -95[°C] |
| Peso molecular | 86,17 |
| Punto de inflamación | -21[°C] |
| Temperatura de Autoignición | 261[°C] |
| Densidad relativa | 0,66 |
| Densidad de vapor | 3 |
| Solubilidad en agua | Ninguna |

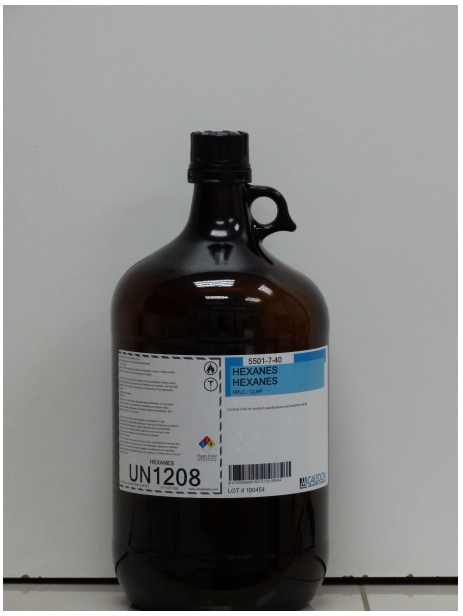


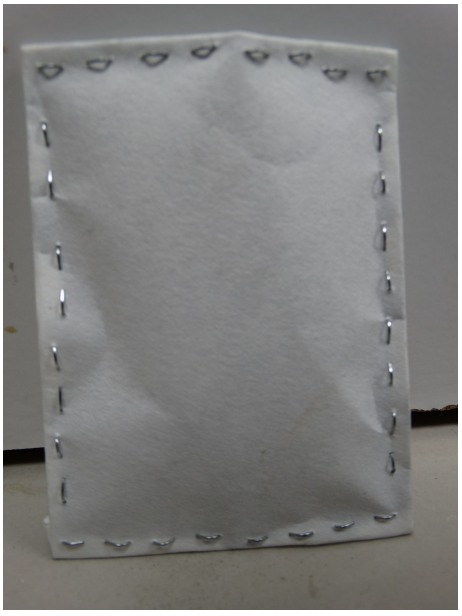

Figura 20: Solvente Hexano.

- **Empaque poroso:** Empaque encargado de almacenar la biomasa en el interior del tubo de extracción del soxhlet, permitiendo ingresar el solvente y dejar salir el mismo más los lípido extraídos, restringiendo el paso de las células microalgales residuales. Se confeccionan a partir de papel filtro marca Filter-Lab, modelo 1250, en un diámetro de 125[mm]. Es un filtro cualitativo, bajo en cenizas, de filtración media. Con 87[g/m2] de gramaje y 0,180[mm] de espesor. El tamaño de poro esta entre los 10[$\mu m$] y los 13[$\mu m$].

  Los empaques se realizan doblando dos papeles sobre si mismos, en rectangulos de 6x8[cm] aproximadamente, formando bordes de al menos 1[cm] que se aseguran con corchetes para evitar el escape de biomasa.




(a) Papel filtro.



(b) Empaque.

Figura 21: Empaquetadura porosa.

- **Vaselina selladora:** Corresponde al insumo encargado de sellar las uniones entres los componentes de vidrio del soxhlet previniendo escapes de solvente, disminuyendo las pérdidas del mismo.
- **Otros:** Referido a insumos varios, como agua destilada (utilizada en disoluciones a la hora de sonificar), agua potable (utilizada como fluido de enfriamiento), electricidad, etc.

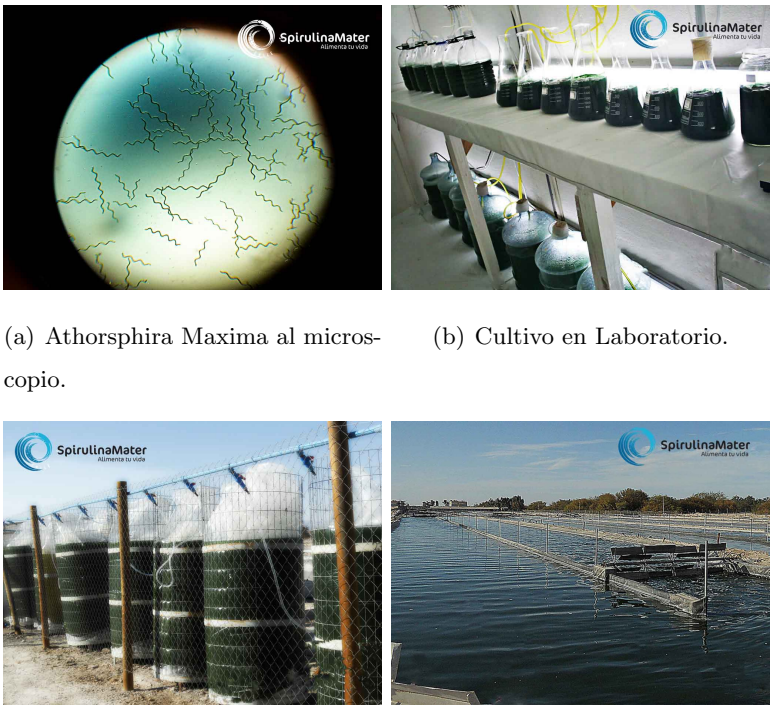
### 3.2.4. Microalga

En orden de obtener la máxima cantidad aceite por extracción, la selección de una correcta cepa microalgal podrá ser una variable de suma importancia, así, una colección de biomasa con un mayor proporción de lípidos cederá mayor cantidad de bioaceite.
La selección de la microalga se presentó inicialmente como un parámetro experimental más, puesto que la biomasa era facilitada por la empresa Clean Energy, ubicada en la central termoeléctrica AES GENER en ventanas, en donde, a partir de flujos de escape, nutren cultivos microalgales en fotobiorreactores. Las cepas que se cultivaron y entregaron a la universidad, en particular al departamento de energías renovables, parte del departamento de ingeniería mecánica, no estaban claramente identificadas, pudiendo existir dos o más especies, incluyendo principalmente *Chorella* y *Chlamydomonas*, en una proporción desconocida. Inmediatamente se agregó una fuente de incertidumbre a la fase experimental, puesto que la biomasa estará limitada a la cantidad entregada por Clean Energy al iniciar las actividades, no pudiendo ser repetible, ni comparable a otro proveedor. Pese a esta informalidad, que imposibilitaría la comparación de la extracción con valores empíricos desde la bibliografía, al no conocer detalladamente a la microalga en cuestión, se prosigue con la fase experimental, bajo el argumento que al maximizar el procedimiento para una especie, se podrán obtener resultados con mejor rendimiento en otras cepas, siempre y cuando se trabaje con tipos similares de microalga.
Aproximadamente en un 25 % de lo que terminó siendo el total de experiencias, la biomasa se acabó, quedando imposibilitado de realizar nuevas extracciones, comparables con las anteriores, por lo que se cotiza y busca una nueva alternativa, fijando una nueva especie y buscando un proveedor que asegure la calidad y pureza de la muestra, por la extensión de la investigación. Se selecciona un proveedor nacional que cultiva sus productos en la I región de Iquique, en pleno corazón del desierto de Atacama. Dicha ubicación se escoge por la privilegiada intensidad lumínica, baja humedad relativa, pocas precipitaciones, alta temperatura. Spirulina Matter, principal cultivador de *Arthrospira maxima* a nivel país se especializa en cultivos abiertos tipo Raceway, de gran superficie y poca profundidad, dotados de un medio de cultivo especifico, con ph neutro y con agua de alta calidad y reducidas impurezas, además de sales minerales y los nutrientes necesarios para el correcto desarrollo de la cepa.

Los pasos en la producción se enumeran a continuación [18]:

- Manutención de cepas puras: Dísese de la conservación de 100 % *Arthrospira maxima*, evitando el ingreso de especies foráneas, mejorando índices de producción sin intervenir genéticamente la especie.
- Cultivo de laboratorio: En las primeras etapas de desarrollo se controla el cultivo con prolijidad bajo los margenes de un laboratorio. Énfasis tiene la observación nutricional y lumínica sobre los cultivos de pequeño volumen (50[ml] a 20[ml]).
- Producción de inócuos: Parte de la producción semi-continua de la planta, en donde se traspasan los cultivos a recipientes de mayor capacidad en función de la multiplicación y concentración de los microorganismos. Dichos volúmenes van desde los 250[ml] hasta los 60$[m^3]$.
- Cultivo en Reactores: Alcanzado el grado de concentración requerido, dichos inócuos son trasladados a los estanques abiertos, con agitación mecánica.
- Cosecha: Operación donde es separada la biomasa del medio de cultivo, reciclado para nuevo uso. Se realiza el proceso de concentración y lavado de la misma, retirando sales restantes del cultivo.
- Secado: La biomasa es sometida a un secado por atomización (spray), resultado en un evaporado casi instantáneo, por el uso de aire a alta temperatura. Luego de esta etapa se da comienzo al empaque.

Imágenes del proceso se visualizan en la figura 22:




(a) Athorsphira Maxima al microscopio.

(b) Cultivo en Laboratorio.

(c) Reactores inócuos.

(d) Estanque Raceway.

Figura 22: Sistema de producción Spirulina matter [18].

La microalga Arthrospira maxima es una alga verde azul o cianobacteria, de naturaleza filamentosa semejante a un espiral. Se caracteriza por hallarse solitaria y de libre movimiento ó flotadora sobre el sustrato. Usualmente se encuentra en aguas alcalinas dentro de ecosistemas sub-tropicales [22]. Su contenido nutricional se presenta en la siguiente tabla 12.

El formato adquirido son paquetes de biomasa seca (en polvo), 100 % Arthrospira maxima, de 500[g]. De esta manera se asegura una calidad constante y repetible de biomasa a lo largo de toda la experimentación.

Es vista del cambio operacional, se deben repetir las extracciones realizadas, aproximadamente 16, de 4 [h] cada una, lo significó un gran contratiempo en la investigación.

Tabla 12: Información nutricional *Arthrospira maxima* [18].

| **Contenido nutricional** | **100[g]** | **1 porción** |
|---|---|---|
| Energía [Kcal] | 380 | 19 |
| Proteínas [g] | 65 | 3,25 |
| Grasa total [g] | 6 | 0,30 |
| Grasa saturada [g] | 0 | 0,0 |
| Ácidos grasos trans [g] | 0 | 0 |
| Grasa monoinsaturados [g] | 0 | 0,0 |
| Grasa poliinsaturados [g] | 6 | 0,3 |
| Ácido grasos esenciales [g] | 1,8 | 0,09 |
| Ácido gamalinilénico [mg] | 1000 | 50 |
| Ácido alfanoléico [mg] | 800 | 40 |
| Colesterol [mg] | 0 | 0 |
| Hidratos de carbono disponibles [g] | 16,4 | 0,82 |
| Azúcares totales[g] | 0 | 0 |
| Sodio [mg] | 900 | 45 |
| Potasio [mg] | 1400 | 70 |
| Zinc [mg] | 3 | 0,15 |
| Hierro [mg] | 150 | 7,5 |
| Magnesio [mg] | 400 | 20 |
| Fósforo [mg] | 800 | 40 |
| Calcio [mg] | 1000 | 50 |
| Betacaroteno [mg] | 210 | 10,5 |
| Vitamina E (Alfa-tocoferol) [mg] | 10 | 0,5 |
| Vitamina B1/Tiamina [mg] | 3,5 | 0,175 |
| Vitmina B2/Riboflavin [mg] | 4 | 0,2 |
| Vitamina B3/Niacina [mg] | 14 | 0,7 |
| Vitamina B5/Ácido Pantoténico [mg] | 0,1 | 0,01 |

Tabla 13: Información nutricional *Arthrospira maxima* (continuación) [18].

| **Contenido nutricional** | **100g** | **1 porción** |
|---|---|---|
| Vitamina B6/Piridoxina [mg] | 0,8 | 0,04 |
| Vitamina B9/Ácido Fólico [mg] | 0,8 | 0,04 |
| Vitamina B12/Cianocobalamina [mg] | 0,25 | 0,0125 |
| Inositol [mg] | 64 | 3,2 |
| Pigmentos antiox azul Ficcocianina [mg] | 3700 | 185 |
| Pigmentos antiox Carotenos [mg] | 360 | 18 |
| Clorofila [mg] | 600 | 30 |

## 3.3. Procedimiento

A continuación se procede a establecer el formato con que se llevan a cabo las extracciones de manera previa a esta investigación. Dicho procedimiento sienta precedente y deberá ser optimizado. Se narra paso a paso el proceso de extracción, señalando los espacios sometidos a variación.

### 3.3.1. Pre-tratamiento

Respecto al pre-tratamiento de la biomasa, antes de realizar este estudio, se elegían dos caminos principales:

- **Sin pre-tratamiento:** No se realiza ninguna preparación previa a la extracción, solo se realiza una molienda en la licuadora y con mortero, intentando alcanzar el máximo granulado de la biomasa (menor a 300[$\mu$m], controlado con tamiz). Es imperativo considerar que en primera instancia las extracciones se realizan sobre la primera biomasa, entregada en agregados de sólidos de diámetro variable, en forma de piedra.



(a) Paso por licuadora.



(b) Molienda con mortero.

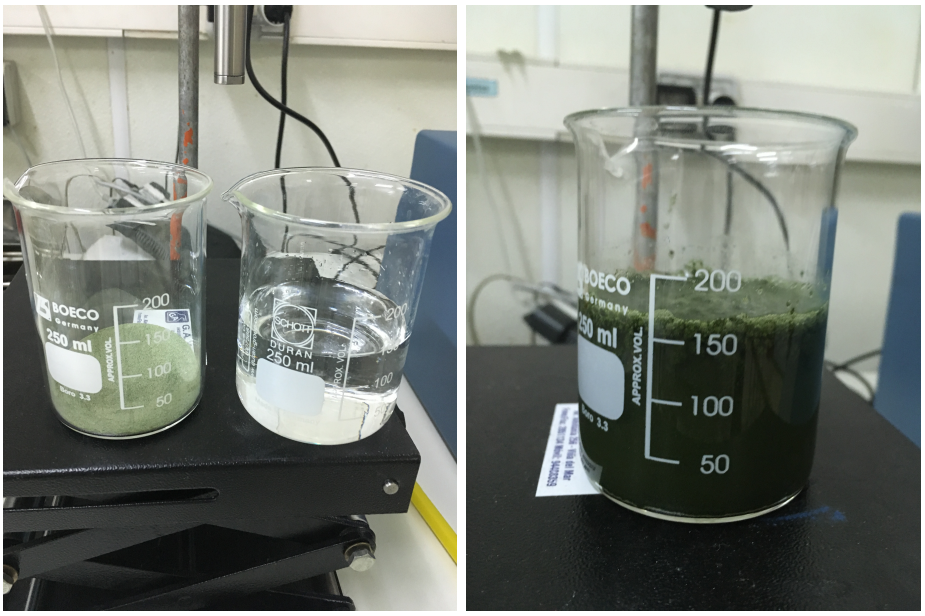


(c) Tamizado.

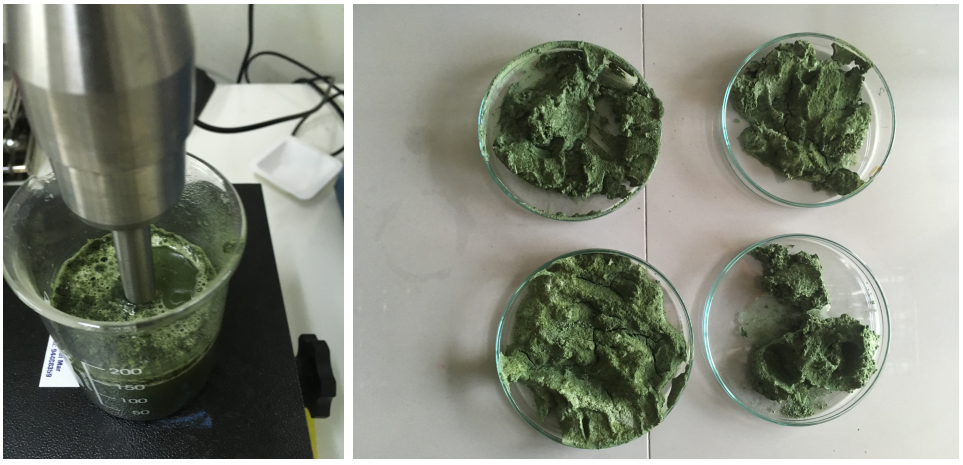
Figura 23: Proceso sin pre-tratamiento.

- **Sonificado:** El método disponible en los laboratorios que se tuvo acceso, y por tanto el método con precedente es el sonificado, realizado mezclando agua destilada con microalga previamente molida como es descrito en el espacio anterior. La proporción de disolución no es detallada, ni tampoco el tiempo de procesamiento. Una vez realizado el proceso de sonificado, se seca la muestra en horno, para luego proceder a ejercer una segunda molienda, obteniendo biomasa granulada lista para la extracción. Es importante destacar que este es un ámbito que ha de ser resuelto y por tanto es

parte de este estudio, analizando la influencia del proceso de sonificado, con valores entregados en literatura y tiempos establecidos.




(a) Preparación disolución. (b) Mezcla de disolución.



(c) Sonificado. (d) Muestras secas.

Figura 24: Proceso de sonificado.

### 3.3.2. Protocolo de extracción

Una vez se realiza el pre-tratamiento se procede con los siguientes pasos (imágenes del proceso se observan a continuación):

I- Se arman empaquetaduras porosas, hechas a partir de papel filtro, tarando las mismas sobre la balanza digital. Posteriormente se agrega biomasa utilizando un dispositivo de vaciado hasta los 10[g] por empaque, para formar 2 empaques por extracción. Este ítem esta sujeto a modificaciones ya que una variable a considerar será la cantidad de biomasa por agregar al equipo soxhlet.

II- Se prepara el equipo soxhlet, equipado con un soporte. Acomodando la manta térmica sobre la base del mismo. Se añaden bolas de ebullición en el balón inferior. También es necesario instalar (primer uso) ó revisar las conexiones hídricas a la torre de destilación. Se prepara el equipo rotavapor, comunicando en serie la fuente hídrica aumentando la eficiencia del proceso.

III- Se agregan las empaquetaduras porosas a la sección de extracción del equipo, vigilando un correcto sello, así como también una correcta posición al final del tubo.

IV- Se agrega vaselina en las uniones de vidrio, para permitir un mejor sello, evitar rupturas del material y conservar el solvente en la extracción.

V- Se miden 170[ml] de solvente hexano con la ayuda de una probeta graduada, este procedimiento ha de realizarse bajo la campana de extracción de gases por la volatilidad de este compuesto.

VI- De los 170[ml] mencionados con anterioridad, se agregan 100[ml] directamente al balón inferior, para luego agregar 70[ml] en el tubo de extracción del equipo, con precaución de evitar conductos y generar pérdidas de solvente.
Esta operación y las restantes se realizan bajo campana.

VII- Se sella el equipo sobre la manta térmica, ajustándolo al soporte, vigilando un correcto sello de las uniones.

VIII- Se enciende la manta térmica, hasta su graduación de 7,5 (notar que el rango se extiende de 1 a 11). Comienza el tiempo de extracción. En este paso, también existirá espacio a la optimización siendo la temperatura una variable a ajustar.

IX- Inmediatamente luego de encender la manta térmica se procede a abrir el flujo de agua por la torre de condensación. El caudal de dicho flujo no es regulado ni fijado.

X- Se deja el equipo funcionar por 2[h], para luego apagar la manta térmica y el flujo de agua. Este paso también tendrá espacio a la mejora.

XI- Se desarma el equipo soxhlet, vaciando el contenido de solvente en un vaso precipitado de 250[ml].

XII- Se vacía el contenido del vaso precipitado en el balón del rotavapor.

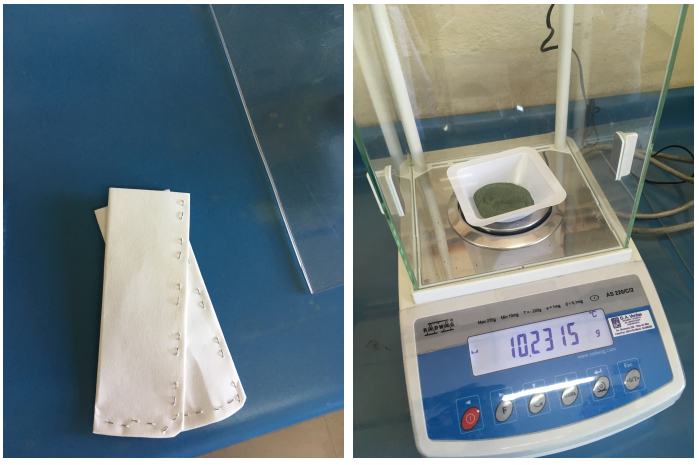
XIII- Se inicia el funcionamiento del rotavapor, encendiendo tanto el baño de agua como también el motor que dará la rotación.

XIV- Mientras actúa el rotavapor se extraen los empaques porosos del interior del tubo de extracción lavando el equipo, y dejando el mismo en secado, ubicándolo en un horno.

XV- Se detiene el rotavapor hasta no observar mas presencia de solvente en el balón, posteriormente trasvalija el contenido del balón (aceite) a un recipiente tarado.

XVI- Se pesa el aceite obtenido.

XVII- Se realiza aseo en todos los instrumentos y accesorios usados para repetir la operación.



(a) Preparación empaque poroso.

(b) Peso de biomasa por cartucho.

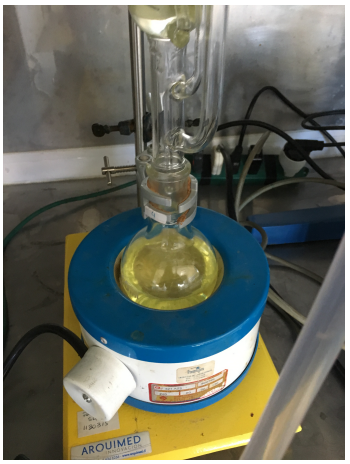
Figura 25: Imágenes de los sub-procesos más relevantes.



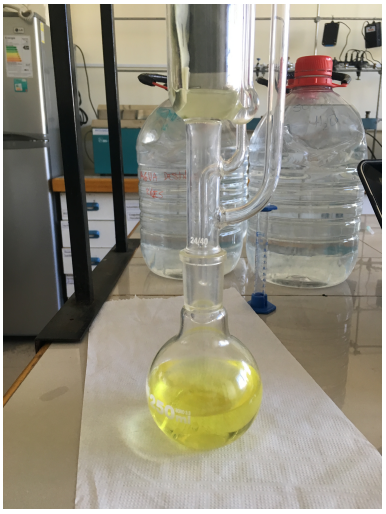
(a) Postura en tubo extractor.



(b) Armado de Soxhlet.




(c) Puesta en marcha de la manta térmica.



(d) Desarme de Soxhlet.



(e) Trasvalije a Rotavapor.



(f) Evaporación en Rotavapor.




(g) Pesaje muestra obtenida.

Figura 26: Imágenes de los sub-procesos más relevantes (continuación).

## 3.4. Determinación de la importancia del tiempo en la extracción

Como se ha mencionado exhaustivamente, el tiempo, traducido en la cantidad de veces que el solvente se voltea sobre la biomasa, es una variable de interés. Conocer la existencia de un punto óptimo genera ahorro tanto en insumos como temporales y es el primer enfoque de este estudio. Para atender esta necesidad, se planean extracciones con la temperatura de la manta térmica, así como también la cantidad de biomasa constantes, aislando el efecto de la variación de aceite según el tiempo. Se excluye el análisis de las interacciones ya que la extensión de la fase experimental sería demasiado para los límites propuestos por el equipo, quedando pendiente para un nuevo estudio.

El esquema experimental es simple, pero demostrativo, permitiendo deslumbrar tendencias existentes, además de entregar información valiosa para decidir un tiempo representativo, para el resto de la investigación, donde solo se variarán la temperatura y la cantidad de biomasa.

Se contempla un intervalo de tiempo desde 1[h] hasta las 8[h], inicialmente espaciados cada 1[h], para luego, posterior a las 4[h], espaciarlas cada 2[h]. De esta manera existe un rango prudente dentro del cual se pueden realizar las extracciones al interior del laboratorio, siendo 8[h] el límite, puesto que crecería en demasiado el periodo de experimentación.

Se asigna aleatoriamente un número a cada medición de tiempo, reduciendo el error y agregando aleatoriedad al desarrollo experimental.

Tabla 14: Planificación experimental para observar la influencia del tiempo en el aceite obtenido.

| **Tiempo [h]** | **Masa [g]** | **Temperatura [-]** |
|---|---|---|
| 1 | 30 | 7 |
| 2 | 30 | 7 |
| 3 | 30 | 7 |
| 4 | 30 | 7 |
| 6 | 30 | 7 |
| 8 | 30 | 7 |

## 3.5. Máximización de la extracción

Esta parte del desarrollo esta focalizado en la optimización de las dos variables restantes en la investigación. Para dicha actividad si es plausible tener en cuenta las interacciones, dado que el tiempo será fijado desde el resultado del ítem anterior. La metodología utilizada será el método conocido como superficie de respuesta, que representa un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas útiles para realizar modelos y análisis de problemas en los cuales existe una superficie de interés que es influenciada por un numero determinado de variables, con el objetivo de optimizar una variable de respuesta, de esta forma se plantea una la creación de una función de tantas variables como factores influyentes existan de la forma:

$$\eta = f(x_1, x_2, ..., x_n) \tag{1}$$

Dicha superficie será capaz de representar a la función real en determinados dominios de interacción, permitiendo mediante un procedimiento establecido, acercarse al punto óptimo.

Como es obvio, la relación entre los factores que influyen sobre la variable de respuesta es desconocida. Para hallarla se establecen las siguientes relaciones:

- **Acercamiento de primer orden:** Consiste en el primer acercamiento a la relación tácita existente, donde se busca una función de la forma:

  $$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + ... + \beta_k x_k + \epsilon \tag{2}$$

  Dicha relación se puede obtener a partir de un análisis de varianza o ANOVA de un diseño factorial en las cercanías del punto de operación inicial.

  Con la inclusión puntos centrales, además de poder estimar la magnitud del error, también permite tener acceso a la curvatura del sistema en dicho dominio. Si existe curvatura, ha de modificarse el diseño experimental, de no tener curvatura representativa, la aproximación lineal es suficientemente buena.

- **Método del máximo ascenso:** Consiste en una vez calculada la primera aproximación, seguir el camino con máxima pendiente de la superficie, estableciendo mediciones sucesivas, hasta que ya no se perciban aumentos en la variable de respuesta, redefiniendo un nuevo dominio.

- **Segunda aproximación lineal:** Una vez identificado el nuevo dominio de operación, se realiza una nueva aproximación lineal, a través de un diseño experimental

símil al del comienzo. Si existiese curvatura, se procede a expander el diseño experimental, haciéndolo sensible a dichas variaciones, pudiendo obtener una superficie de la forma:

$$y = \beta_0 + \Sigma_{i=1}^{k}\beta_i x_i + \Sigma_{i=1}^{k}\beta_{ii}x_i^2 + \Sigma_{i<j}\Sigma\beta_{ij}x_i x_j + \epsilon \quad (3)$$

De donde el máximo será parte.

A continuación se muestra una imagen que demuestra el funcionamiento del método de superficie de respuesta:

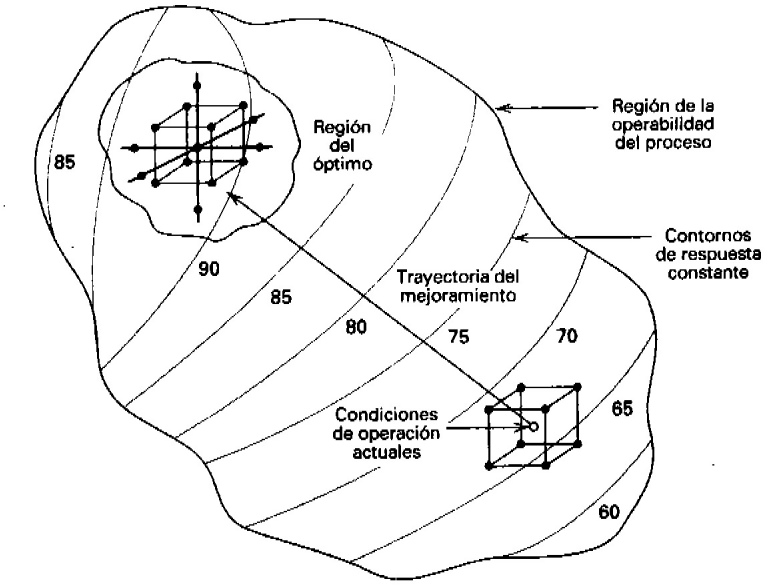



Figura 27: Esquema método superficie de respuesta [24].

En concreto, para esta investigación, se observan 3 variables de respuesta en simultáneo, **la cantidad de aceite producida**, representada por los gramos netos extraídos por procedimiento, **el rendimiento lipídico de extracción**, que contempla (de manera porcentual) el cociente entre los gramos extraídos de bioaceite y los gramos de biomasa utilizada para extraerlos y **el costo por gramo de aceite producido**, que contempla los costos que conlleva producir un gramo de bioaceite en dicha extracción, contemplando gastos fijos (solvente) y gastos variables(agua y gramos de biomasa), variando la temperatura de la manta térmica y la cantidad de biomasa.

Para la primera aproximación lineal se realiza un diseño factorial $2^2$ sin repetición y con 3 puntos centrales. Se justifica la elección considerando lo breve del diseño, ahorrando tiempo y recursos valiosos, como lo son la biomasa y el solvente. Además considerando

un buen manejo de la técnica extractiva , dado por la práctica, se obtienen bajos niveles de variabilidad, haciendo innecesario el uso de repetición. Se elige el punto central en las cercanías de los puntos operacionales usados hasta antes de este estudio, ubicándolos en los 30[g] de biomasa y la manta térmica en el nivel 7, estableciendo variaciones de 10[g] en cada sentido, y 0,5 graduaciones de la manta en cada sentido.
El diseño queda de la forma (considérese que las corridas se eligen aleatoriamente):

Tabla 15: Diseño factorial $2^2$ con 3 puntos centrales.

| **Corrida** | **Masa [g]** | **Temperatura[-]** |
|---|---|---|
| 1 | 20 | 6,5 |
| 4 | 40 | 7,5 |
| 7 | 30 | 7 |
| 2 | 20 | 7,5 |
| 5 | 30 | 7 |
| 3 | 40 | 6,5 |
| 6 | 30 | 7 |

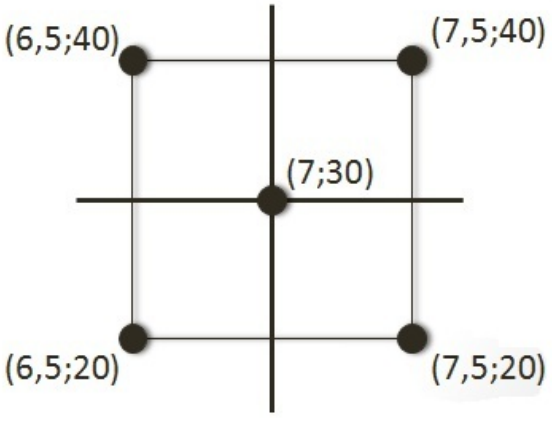



Figura 28: Esquema experimento para una primera aproximación lineal.

En el caso de que el diseño en el dominio escogido presente curvatura, se deberá expander, a un diseño factorial compuesto central de $2^2$, con 3 puntos estrella.
Este modelo se ve esquematizado a continuación:

Tabla 16: Diseño factorial compuesto central $2^2$ con 3 puntos centrales.

| **Corrida** | **Masa [g]** | **Temperatura[-]** |
|---|---|---|
| 1 | 20 | 6,5 |
| 4 | 40 | 7,5 |
| 7 | 30 | 7 |
| 2 | 20 | 7,5 |
| 5 | 30 | 7 |
| 3 | 40 | 6,5 |
| 6 | 30 | 7 |
| 8 | 30 | 7,707 |
| 11 | 15,86 | 7 |
| 10 | 44,14 | 7 |
| 9 | 30 | 6,293 |

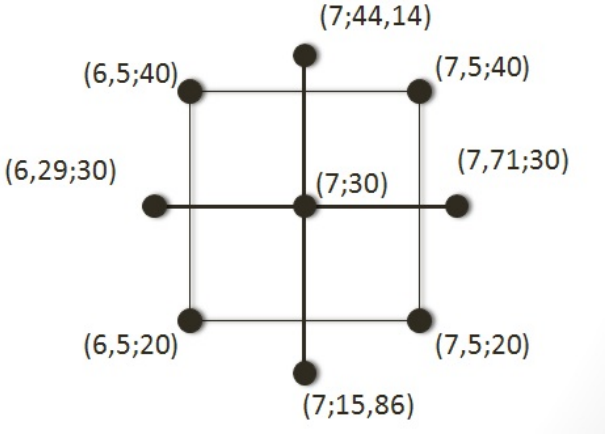



Figura 29: Esquema del experimento para una aproximación cuadrática.

Se usará un software destinado al manejo de datos experimentales, como lo es Statgraphics XVII. Dicha herramienta gestionará los datos agilizando cálculos de efectos, suma de cuadrados, media de cuadrados, influencia, así como graficará superficies de respuesta e indicará caminos de máximo ascenso [26].

## 3.6. Sonificado

Analizar la importancia del pre-tratamiento a la hora de extraer bioaceite a partir de biomasa microalgal es de vital importancia, puesto a la existencia de equipos disponibles,

además de la posibilidad de lograr resultados mucho mejores. Para verificar la influencia del sonificado primero se fijan los parámetros del mismo, utilizando disoluciones de 1:3 en proporción masa/masa entre la biomasa y el agua destilada, en vasos precipitados de 150[ml], es decir 50[g] de biomasa y 150[g] de agua destilada, haciendo aproximadamente un volumen total de 170[ml]. Se postula teóricamente que la cantidad de energía transferida a la mezcla, para maximizar la destrucción celular, bordea los 800[J]/10[ml], sin importar el grado de disolución [25]. Entonces se proponen 13.600[J] por cada vaso precipitado, separados en 4 ciclos de 1 minuto para evitar el sobrecalentamiento de la muestra microalgal.

Queda espacio para futuras investigaciones indagar alguna variación óptima de dichos parámetros para alguna cepa en particular.

La metodología consiste en 3 extracciones con pre-tratamiento y 3 sin la aplicación del mismo, con todas las otras variables fijadas en 2 horas para el tiempo, 15[g] para la cantidad de biomasa y se selecciona el valor 11 (máximo) de calefacción ó temperatura de la manta térmica.

## 3.7. Perfil lipídico

Cabe destacar que el objetivo de la extracción de bioaceite a base de microalgas es el uso de dicha sustancia en la creación de biocombustibles, en particular, biodiésel. Por esta razón es importante obtener indicadores que permitan observar la calidad esperada en un biodiésel obtenido a partir del bioaceite extraído.

Un análisis de ácidos grasos es una excelente herramienta para tal menester, ya que narra de manera completa los bloques conformantes del extracto.

Se contempla un estudio de este tipo, en concreto la construcción de un perfil cromatográfico y un contraste con estándar de metil ésteres de ácidos grasos Supelco 18918-1A. Este desarrollo permitirá obtener la descomposición de ácidos grasos entre C14 y C24, identificándolos por tiempo de retención y clasificándolos por su composición relativa según áreas. Pese a lo anterior, no será capaz de captar cuantitativamente cuantos gramos de cada ácido graso están presentes, pues sólo es una medición comparativa entre las áreas de peaks existentes en la gráfica.

Este estudio, por los equipos y el nivel de especialización requerido, será tercerizado en el departamento de ingeniería química de Casa Central.

# 4. Resultados y análisis

En esta sección se enunciarán los resultados obtenidos en esta investigación, siguiendo el mismo orden presentado en la sección de metodología.
Es importante mencionar que en el trayecto de la investigación se encontraron obstáculos, que llevaron a la repetición de muchas mediciones. Las principales fuentes de error fueron:

- **Agotamiento biomasa original:** Como se mencionó anteriormente, se comienzan las pruebas utilizando una biomasa de un conjunto de razas medianamente conocida, y de proporción desconocida. Una vez finalizadas las pruebas para obtener la influencia del tiempo, y comenzar la optimización de las otras variables, esta biomasa se acabó, teniendo que buscar una nueva fuente de la misma, y por consiguiente, realizar las mediciones nuevamente, puesto que ambas magnitudes no son comparables.

- **Ausencia de bomba de vació:** Inicialmente, las extracciones fueron realizadas con el equipo montado tal y como se realizaban las extracciones anteriormente al desarrollo de este estudio, en donde, una conexión ubicada en la columna de condensación del rotavapor estaba sellada.

  Al avanzar con el desarrollo experimental se hallaron resultados incongruentes, distanciados de las hipótesis y sentido común, como valores de bioaceite mayores para menos tiempo, o menos biomasa. Ante tales resultados se analizaron las posibles fuentes de error, concluyendo que la principal, era que el solvente, pese a estar completamente en estado gaseoso, se posicionaba en el fondo del balón del rotavapor por tener una densidad mayor a la del aire, condensándose luego, y contaminando la muestra de extracto. Para evitar esto, se revisa la instalación del equipo advirtiendo la ausencia de una bomba de vació, que ocupa la conexión, hasta ese punto desocupada. Una vez instalada, se observa un aumento en la velocidad de evaporación del solvente, así como también una completa extracción del mismo, hallándose diferencias con las primeras extracciones contaminadas hasta del 1.400 %. Por este motivo se han de descartar todas las mediciones obtenidas, y proceder a captarlas nuevamente.

## 4.1. Resultados de control

Las primeras extracciones de control, con la primera biomasa y sin la presencia de la bomba de vació tuvieron resultados despreciables en cuanto a cantidad de aceite obtenido. La biomasa fue secada, molida, y procesada con el procedimiento mostrado anteriormente. El solvente no tomo ningún color, lo que indica que no existió extracción significante. Posteriormente, al extraer el solvente, no existe ningún valor medible con precisión por la balanza analítica.

Más tarde se procede a sonificar la primera biomasa, alcanzando un grado de extracción menor, considerando la coloración en el solvente. Aún así la cantidad de aceite es mínima para poder cuantificarla, obteniendo valores sólo al cometer el error de no usar la bomba de vació.

## 4.2. Determinación de la importancia del tiempo en la extracción

Los resultados obtenidos se manifiestan a continuación:

Tabla 17: Resultado de la fase experimental para determinar la influencia del tiempo.

| **Tiempo [h]** | **Masa [g]** | **Temperatura [-]** | **Aceite [g]** | **Rendimiento lipídico[%]** | **Costo por gramo[$/g]** |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 30,0000 | 7 | 0,1377 | 0,4590 | $16.273 |
| 2 | 30,0000 | 7 | 0,1542 | 0,5140 | $14.532 |
| 3 | 30,0000 | 7 | 0,1850 | 0,6167 | $12.658 |
| 4 | 30,0000 | 7 | 0,2267 | 0,7557 | $10.775 |
| 6 | 30,0000 | 7 | 0,2474 | 0,8247 | $10.689 |
| 8 | 30,0000 | 7 | 0,2772 | 0,9240 | $10.268 |

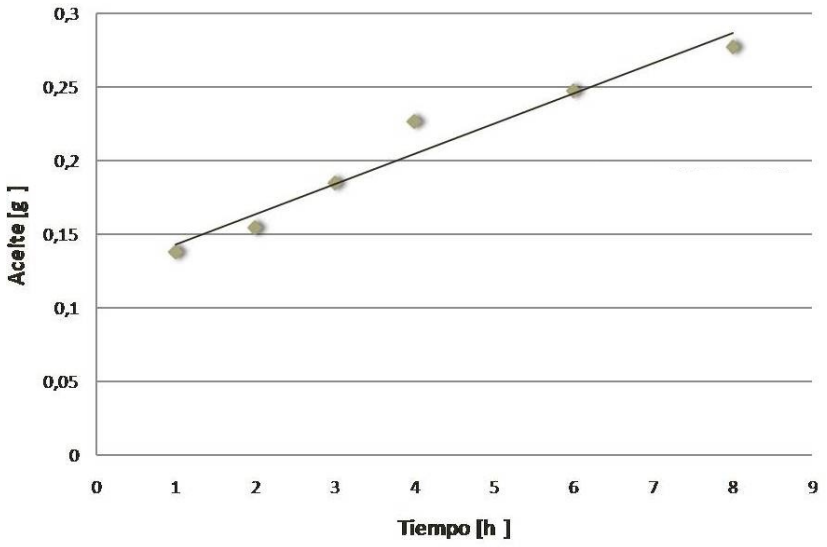



Figura 30: Relación gráfica obtención bioaceite y tiempo.

Se puede observar claramente que la cantidad de bioaceite obtenido por extracción se ajusta con buena cercanía a una relación directa lineal, ya que, entre más tiempo, mayor será la cantidad de lípidos extraída. La relación matemática que mejor la representa sigue como:

$$y = 0,020x + 0,122 \tag{4}$$

El factor de ajuste es de $R^2 = 0,953$ indicando un ajuste bueno, más no perfecto. Otra alternativa es realizar 2 rectas de ajuste, una desde 1 a 3 horas, mientras que la segunda de las 4 a las 8 horas. Se obtiene pendientes de 0,0788[g/h] y 0,0421[g/h], con factores de 0,9704 y 0,9893 respectivamente, denotando una baja en la relación lineal luego de las 4[h]. En base a esta información se decide realizar el resto de las extracciones a 2[h] con miras a una mejor eficiencia diaria de trabajo, al estar limitados por tan sólo un equipo extractor. De esta manera se obtiene información representativa de la influencia de las otras variables, para luego validar los resultados a 8[h], observando los resultados y determinando si fue correcto considerar el tiempo como un parámetro de variación independiente respecto a las otras variables.

## 4.3. Maximización de la extracción

Se procede a realizar la optimización de las dos variables cuantitativas restantes. Para tal tarea se establece, mediante el método de superficie de respuesta, una primera aproxi-

mación lineal cerca del punto de operación entregado previo al estudio, obteniéndose los siguientes resultados, basando el diseño experimental con un modo factorial de $2^2$ con 3 puntos estrella centrales.

Tabla 18: Resultados experimentales para la primera aproximación lineal.

| **Corrida [-]** | **Masa [g]** | **Temperatura [-]** | **Aceite [g]** | **Rendimiento lipídico[%]** | **Costo por gramo [$/g]** |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 20,0000 | 6,5 | 0,1141 | 0,5705 | 17.010 |
| 4 | 40,0000 | 7,5 | 0,2232 | 0,5580 | 11.384 |
| 7 | 30,0000 | 7 | 0,1542 | 0,5140 | 14.532 |
| 2 | 20,0000 | 7,5 | 0,1643 | 0,8215 | 11.813 |
| 5 | 30,0000 | 7 | 0,1466 | 0,4887 | 15.285 |
| 3 | 40,0000 | 6,5 | 0,1602 | 0,4005 | 15.860 |
| 6 | 30,0000 | 7 | 0,1343 | 0,4477 | 16.685 |

De los resultados anteriores se procede a realizar un análisis de varianza o ANOVA por sus siglas en ingles, para así interpretar la información experimental. En el siguiente recuadro se muestra los datos más influyentes, como lo son los efectos y los valores de significancia experimental y teórico para su comparación.

Tabla 19: Resultados ANOVA, primera aproximación lineal.

| | **Efecto** | **Fo.** | **Fo. Tabla** |
|---|---|---|---|
| **Temperatura** | 60,0020 | 18,6161 | 3,509 |
| **Masa** | -0,2168 | 20,9645 | 3,509 |
| **Interrelación** | -0,00047 | 0,9753 | 3,509 |
| **Error** | - | 1 | - |
| **Curvatura** | - | 4,1514 | 3,509 |

Se concluye del análisis anterior que tanto la temperatura como la masa son variables de influencia para la variable de respuesta, en este caso el rendimiento lipídico de aceite. La temperatura presenta una influencia directa con el rendimiento, mientras que la cantidad de biomasa una influencia inversa. Relevante es observar que la interrelación no tiene un efecto significativo, siendo irrelevante ante los otros factores.

Finalmente se observa la existencia de curvatura en el dominio escogido, convirtiendo esta aproximación lineal en un ajuste erróneo. Por este motivo es necesario realizar un ajuste cuadrático a la superficie, expandiendo el diseño experimental, a un diseño factorial compuesto $2^2$ con 3 puntos estrella centrales. Dicha manipulación agregará 4 mediciones

más, capacitando el diseño a producir un acercamiento cuadrático al comportamiento de las variables de interés.

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos en esta fase:

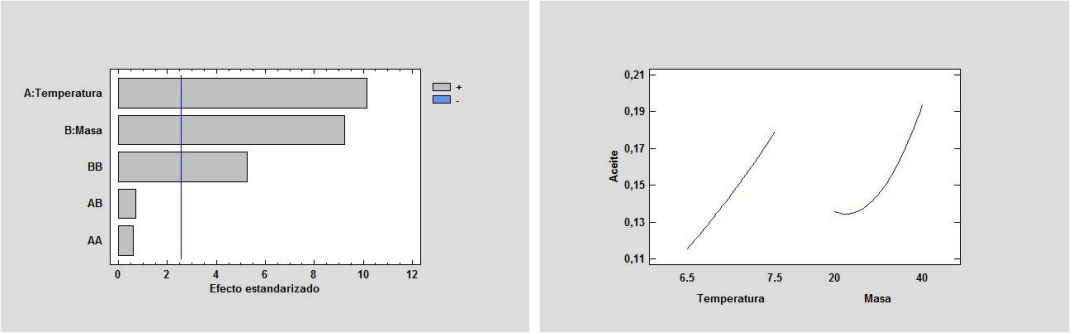
Tabla 20: Resultado de diseño compuesto para ajuste de segundo orden.

| **Corrida [-]** | **Masa [g]** | **Temperatura [-]** | **Aceite [g]** | **Rendimiento lipídico[%]** | **Costo por gramo [$/g]** |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 20,0000 | 6,5 | 0,1141 | 0,5705 | 17.010 |
| 4 | 40,0000 | 7,5 | 0,2232 | 0,5580 | 11.384 |
| 7 | 30,0000 | 7 | 0,1542 | 0,5140 | 14.532 |
| 2 | 20,0000 | 7,5 | 0,1643 | 0,8215 | 11.813 |
| 5 | 30,0000 | 7 | 0,1466 | 0,4887 | 15.285 |
| 3 | 40,0000 | 6,5 | 0,1602 | 0,4005 | 15.860 |
| 6 | 30,0000 | 7 | 0,1343 | 0,4477 | 16.685 |
| 8 | 30,0000 | 7,7 | 0,2017 | 0,6723 | 11.110 |
| 11 | 15,8600 | 7 | 0,1409 | 0,8884 | 12.893 |
| 10 | 44,1400 | 7 | 0,2313 | 0,5240 | 11.522 |
| 9 | 30,0000 | 6,3 | 0,1007 | 0,3357 | 22.252 |

Con esta información se procede a realizar un tratamiento de los datos utilizando el software StatGraphics XVIII Centurion, ingresando el tipo de experimento, así como también los resultados.Se observan detalles según variable de respuesta.

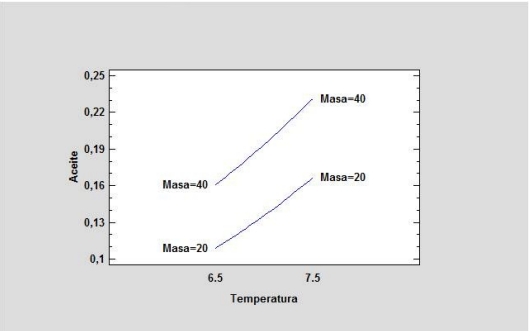
### 4.3.1. Cantidad de bioaceite

A continuación se exhiben los resultados para el ajuste de segundo orden, y como variable de respuesta la cantidad de bioaceite neta obtenida por extracción.

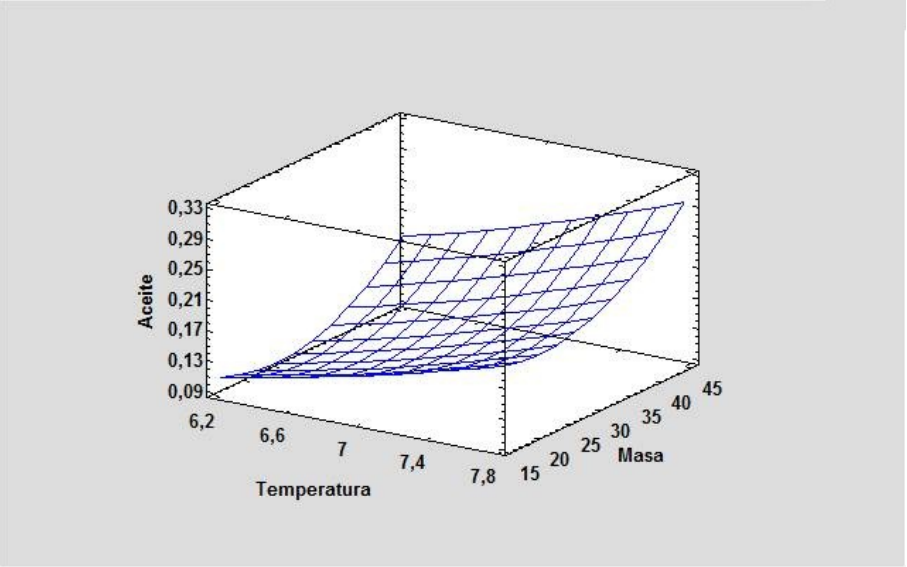



(a) Diagrama de Pareto. (b) Efectos.

Figura 31: Resultados ajuste cuadrático para cantidad de aceite.




(a) Interacción.



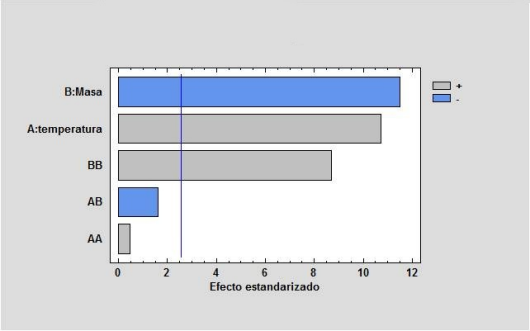

(b) Superficie de respuesta.

Figura 32: Resultados ajuste cuadrático para cantidad de aceite (continuación).

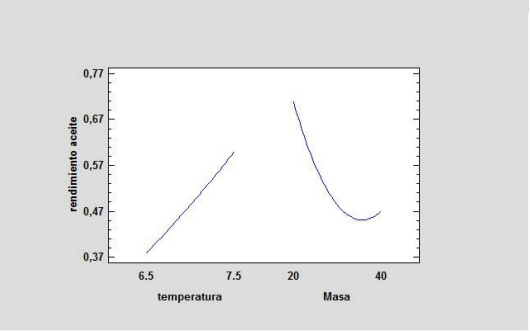
De los resultados anteriores se concluye que ambas variables, tanto la masa como la temperatura son significativos, más no la interacción. Además se observa que la variable masa, posee una influencia cuadrática observable tanto en el diagrama de Pareto como en la gráfica de efectos, donde se observa el comportamiento lineal de la variable temperatura, revelando que entre mayor sea la temperatura, mayor será la extracción, mientras que la relación masa-bioaceite se tiñe por una influencia cuadrática, aunque igualmente directa. Luego en la tercera gráfica de interacción no existe cruce, existiendo casi paralelismo entre las lineas, no existiendo entonces interacción alguna.

Finalmente en la gráfica de la superficie de respuesta para el dominio escogido, se observa que el máximo se presenta al extremo de mayor biomasa y mayor temperatura.

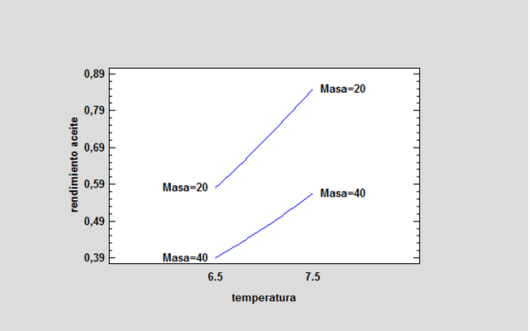
### 4.3.2. Rendimiento lipídico de la extracción



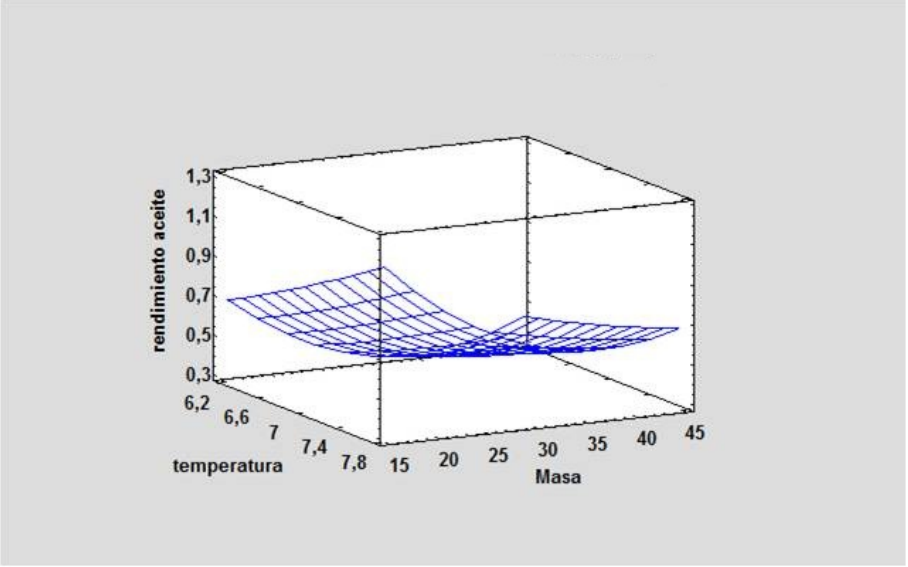

(a) Diagrama de Pareto.




(b) Efectos.




(c) Interacción.



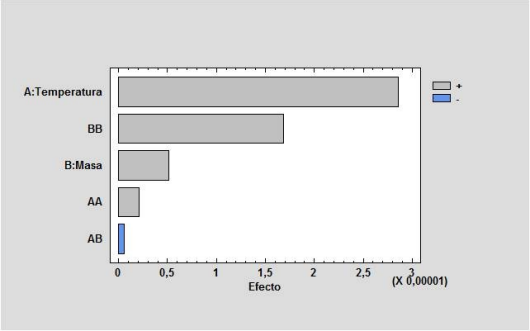

(d) Superficie de respuesta.

Figura 33: Resultados ajuste cuadrático para el rendimiento lipídico extractivo.

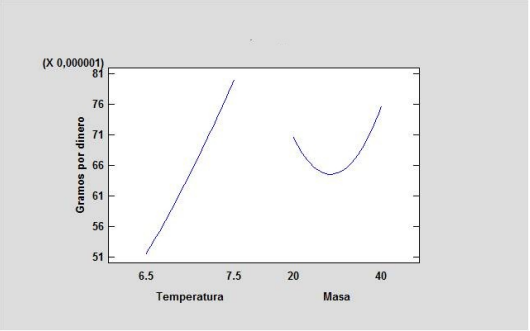
Se observa un comportamiento similar al caso anterior, donde tanto masa como temperatura poseen una influencia significativa, sin embargo la relación de biomasa versus bioaceite es inversamente proporcional, y con influencia cuadrática, por tanto en menor sea la biomasa agregada al soxhlet, mejor será el rendimiento lipídico, justificado por un mejor contacto solvente-biomasa, que se limita al aumentar en exceso la cantidad de gramos por empaquetadura porosa. La interacción no presenta mayor significancia, no existiendo cruce.

Finalmente, como se ve en la superficie ajustada, entre menor sea la cantidad de biomasa, y mayor la temperatura, mejor aún sera el rendimiento extractivo.

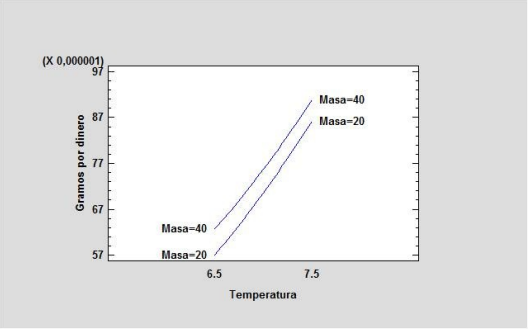
### 4.3.3. Costo por extracción (gramos por unidad monetaria)




(a) Diagrama de Pareto.

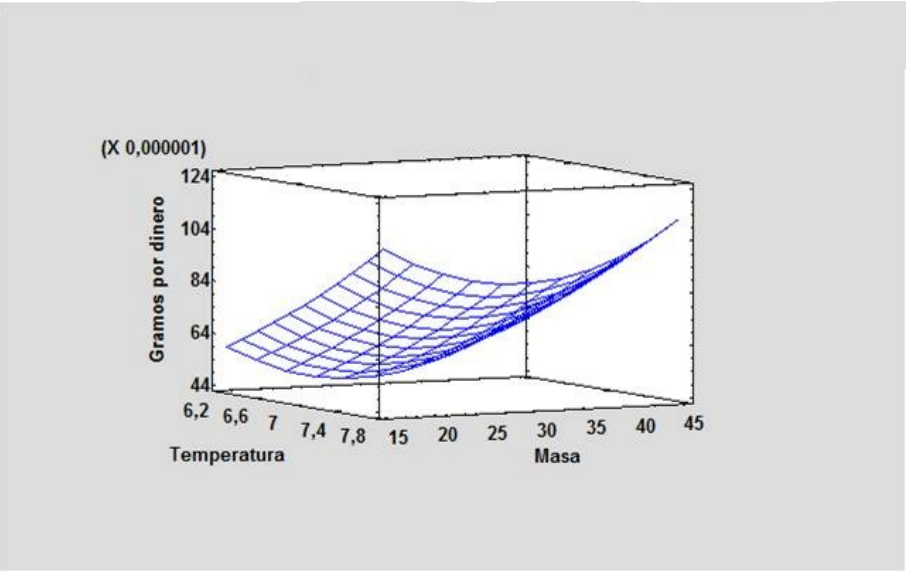



(b) Efectos.




(c) Interacción.

Figura 34: Resultados ajuste cuadrático para cantidad de aceite.




(a) Superficie de respuesta.

Figura 35: Resultados ajuste cuadrático para cantidad de aceite (continuación).

Se puede apreciar, al igual que en los casos anteriores, ambas variables son significativas, mas no la interacción, sin embargo, la variable masa entrega un mínimo de gramos por unidad monetaria.

De acuerdo a la superficie ajustada, se observa que entre más se aumente la biomasa, y más temperatura aporte la manta térmica, más serán los gramos por unidad monetaria, y por tanto, menor será el costo por extracción.

### 4.3.4. Camino de máximo ascenso

Luego de modelar un ajuste cuadrático para 3 distintas variables de respuesta, se escoge la variable más relevante a corto plazo, en consideración de las investigaciones por realizar en el departamento, representada en la cantidad de bioaceite obtenido por extracción. El objetivo será obtener la máxima cantidad de aceite en cada experiencia y de tal forma, generar suficiente bioaceite para emprender nuevos estudios, con biocombustibles y su desempeño propiamente tal.

Tomada dicha decisión, se busca el camino de máximo ascenso para la variable de interés, que busca la máxima pendiente en todo momento. Problemáticamente, se llega a un límite operacional antes de poder tomar esta alternativa, que se corresponde con la cantidad de biomasa por extracción, siendo 45[g] lo máximo permitido sin dañar la empaquetadura porosa y provocar pérdidas de biomasa. Por esta razón se prosigue a aumentar la otra

variable de interés (temperatura de la manta térmica), manteniendo la cantidad de biomasa en su máximo operacional. La siguiente tabla enuncia los resultados obtenidos:

Tabla 21: Resultados del máximo ascenso permitido operacionalmente.

| **Corrida** | **Masa [g]** | **Temperatura [-]** | **Aceite [g]** | **Rendimiento lípidico[%]** | **Costo por gramo[$/g]** |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 45,0000 | 8 | 0,2383 | 0,5296 | 11.292 |
| 2 | 45,0000 | 10 | 0,2946 | 0,6547 | 9.134 |
| 3 | 45,0000 | 11 | 0,3104 | 0,6898 | 8.669 |

De los resultados obtenidos no se observa ningún descenso en los valores de la variable de respuesta, que siguen aumentando, hasta llegar al límite operacional de ambas variables de interés, convirtiéndose en el máximo y óptimo del experimento.
La siguiente gráfica usa datos desde el ajuste cuadrático ligeramente fuera del dominio en el que se construyó, aumentándola con los nuevos puntos ensayados, para 45[g] fijos. Se obtiene:

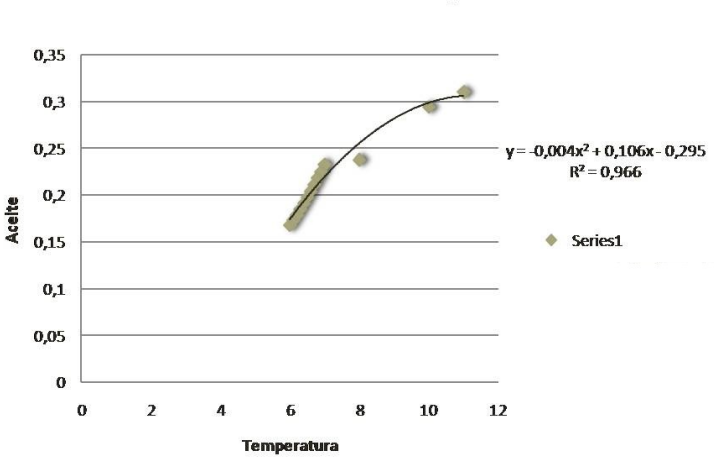



Figura 36: Extrapolación con puntos al máximizar las variables operacionalmente.

Se observa una disminución en la linealidad del efecto de la temperatura, sin embargo es clara aún una tendencia hacia el alza, pese a alcanzar el máximo permitido por la manta térmica.

### 4.3.5. Validación influencia del tiempo

Para finalizar el estudio, se observa la influencia del tiempo, en relación con las otras variables de interés. Para tal objeto, se realizan dos experiencias a máxima capacidad de biomasa y variando la temperatura, ambas a 8[h], obteniéndose los siguientes resultados

Tabla 22: Validación de resultados a ocho horas.

| Tiempo [-] | Masa [g] | Temperatura [-] | Aceite [g] | Rendimiento lipídico[ %] | Costo por gramo [$/g] |
|---|---|---|---|---|---|
| 8 | 45,0000 | 8 | 0,3988 | 0,8862 | 6.243 |
| 8 | 45,0000 | 11 | 0,5897 | 1,3104 | 4.222 |

Como era la hipótesis, el aumento de tiempo presentó un aumento en los valores de aceite, mejoró el rendimiento lipídico y disminuyó los costos por extracción en comparación de las mediciones del cuadro 20.
A modo de ejemplo se gráfica la relación entre tiempo y temperatura de extracción, teniendo como variable de interés el aceite obtenido, observando:

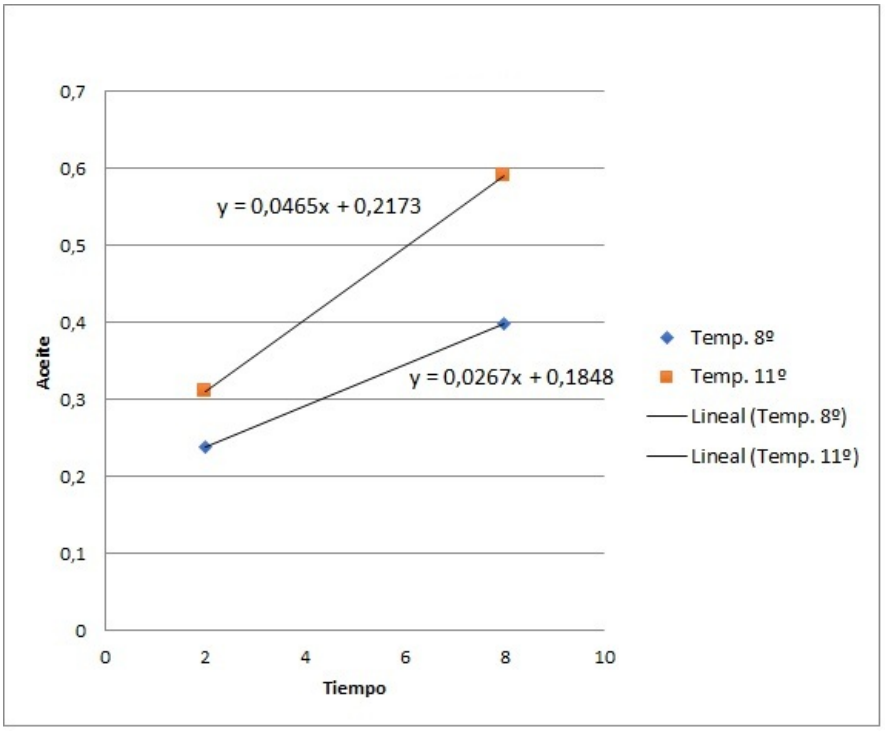



Figura 37: Interacción tiempo versus temperatura con miras al aceite obtenido.

Se visualiza una interacción leve entre el tiempo y la temperatura, quedando de manifiesto la necesidad de un estudio posterior, para descubrir los detalles de la misma, así

como también, la interrelación con la cantidad de biomasa. Pese a lo anterior, es claro que el máximo operacional sin considerar pre-tratamiento, será a la máxima temperatura, con la máxima cantidad de biomasa y por el máximo tiempo, que era la información deseada de este estudio.

## 4.4. Sonificado

En una línea paralela, se investiga la influencia del pre tratamiento de la biomasa microalgal en los resultados de aceite obtenido, se hace de manera posterior, por los tiempos que implica preparar cada muestra, así como los tiempos de secado, que por las grandes cantidades de biomasa requerida, hubiesen prolongado el estudio, fuera de los límites propuestos.
Los resultados obtenidos de 6 pasadas, realizas de manera aleatoria, entre biomasa sonificada y no sonificada, se observan:

Tabla 23: Resultado influencia pre-tratamiento.

| **Pasada** | **Sonificado[g]** | **Control[g]** |
|---|---|---|
| 1 | 0,2585 | 0,1891 |
| 2 | 0,2629 | 0,1883 |
| 3 | 0,2617 | 0,1747 |
| **Promedio** | 0,2610 | 0,1840 |
| **Desviación estándar** | 0,00186 | 0,0066 |

Es claro y prudente concluir con tan solo 3 extracciones por forma de pre-tratamiento, que la influencia de un proceso como el sonificado, puede aumentar la cantidad extraída. En particular, el aumento respecto al control alcanza un 41,8478 %, siendo recomendado para el procedimiento maximizado.

## 4.5. Perfil lipídico

Los resultados de la cromatografía de gases entregan la siguiente composición de principales ácidos grasos presentes en la muestra, entre C14 y C22:

Tabla 24: Resultado perfil lipídico

| **Notación** | **Ácido graso** | **% masa** |
|---|---|---|
| C14:0 | Ácido mirístico | 0,5 |
| C16:0 | Ácido palmítico | 60,8 |
| C16:1 | Ácido palmitoleico | 6,59 |
| C18:0 | Ácido esteárico | 3,6 |
| C18:1 | Ácido oleico | 3,27 |
| C18:2 | Ácido linoleico | 25,2 |

Se observa predominio de ácidos grasos saturados, en forma del ácido palmítico seguido por ácidos poli-insaturados como el ácido linoleico. Esta configuración presentará un biodiésel con características positivas y buena calidad, puesto que los glicéridos, quienes pasan a ser transesterificados y convertidos en biodiésel, tienen un mayor grado de saturación, produciendo un F.A.M.E con mejores índices de estabilidad ante la oxidación.
Por otro lado la proporción insaturada entregará buenas características de flujo en frío, como bajo punto de fluidez y bajo punto de enturbamiento.
Finalmente, la escasa presencia de ácidos grasos poli-insaturados, es deseada para un biodiésel de buena calidad, puesto que, en gran cantidad, provocan una pobre volatilidad y baja estabilidad ante la oxidación [4].
Como se expresó en la sección de metodología, este estudio no permite predecir cuantitativamente la cantidad de biodiésel a producir en base a este aceite, ya que no se obtiene la masa respectiva a cada ácido graso, sino porcentajes comparativos entre los ácidos grasos presentes, obviando otros componentes existentes en la muestra.

# 5. Procedimiento maximizado

Este desarrollo experimental entrega como resultado el procedimiento que optimiza la extracción de bioaceite a partir de biomasa microalgal, bajo las condiciones presentes en la actualidad en el departamento de ingeniería mecánica, bajo el alero de la división de energías renovables y su asociación con el laboratorio de RILES del departamento de ingeniería química.
Es importante destacar, que este protocolo, sin considerar pre-tratamiento, produce una cuantitativa mejora respecto al procedimiento previo, enunciado en la sección "Metodo-

logía". El contraste, se puede visualizar en la siguiente tabla:

Tabla 25: Comparación protocolo inicial, respecto al optimizado, sin pre-tratamiento

| | **Protocolo inicial** | **Protocolo maximizado** |
|---|---|---|
| Tiempo[h] | 2 | 8 |
| Cantidad de biomasa[g] | 20 | 45 |
| Temperatura | 7,5 | 11 |
| Aceite extraído[g] | 0,1643 | 0,5897 |
| Rendimiento lipídico[ %] | 0,8215 | 1,3104 |
| Costo por gramo[$/g] | 11.813 | 4.222 |

Se observa un aumento en el aceite extraído del 258,9167 %, junto con un aumento en el rendimiento lipídico y una disminución en el costo por gramo de aceite de $7.590. Pese a lo anterior, el valor máximo de rendimiento extractivo obtenido es de 1,3104 %, siendo el porcentaje lipídico teórico considerando una recuperación total de un 6 % (indicado en la información nutricional de la biomasa). Dicha diferencia se justifica por la ausencia de pre-tretamiento, como también el uso de un solvente limitado a la disolución exclusiva de lípidos apolares. Otra fuente de error es la extensión temporal del método Soxhlet, debiendo terminar su operación antes de una recuperación más completa de lípidos. Otras fuentes de variabilidad se presentan en forma de errores experimentales, de operación y medición, siendo especialmente sensible la etapa de cuantificación de aceite obtenido, debiendo realizar una prolija labor de extracción del solvente previo al pesaje, en orden de no contaminar la muestra.

El protocolo extractivo, en conjunto con el listado de equipos e insumos, es anexado a este documento.

# 6. Conclusiones

Finalizado este estudio se pueden alcanzar las siguiente conclusiones:

- Luego de revisar el estado del arte referido a técnicas extractivas de bioaceite a partir de biomasa microalgal, se concluye que la metodología Soxhlet, utilizada en este estudio, no es la apropiada si el objetivo es conseguir la máxima productividad posible por extracción. Pese a lo anterior, este método es ideal para aislar la influencia de cada variable significativa.

  Se concluye además, que la selección de una cepa adecuada, con un alto contenido lipídico, cultivada con correctos mecanismos de restricción alimentaria, como bajos niveles de nitrógeno, será conducente a mejores valores extractivos por cada experiencia.

- Las variables más significativas en la extracción de bioaceite microalgal mediante el uso de un equipo Soxhlet son: la temperatura de la manta térmica, la masa microalgal agregada al equipo, el tiempo de operación y el pre-tratamiento utilizado.

  Los valores óptimos operacionalmente, corresponden a la graduación numero 11 para la manta térmica, es decir su máximo valor de trabajo. Para la cantidad de biomasa, corresponde a 45[g], límite de la capacidad del tubo extractor sin generar pérdidas. La cantidad de aceite obtenido respecto al tiempo de operación presenta una relación directa, por lo que el valor óptimo estará delimitado por las 8 horas de uso permitido del laboratorio. Finalmente,la incorporación de pre-tratamiento, en forma de sonificado, aumenta la extracción en un 41,82 %, por lo que se recomienda.

- Se desarrolla un procedimiento optimizado (anexado) que aumenta el aceite obtenido por extracción en un 258 %, disminuyendo costos por gramo extraído en $7.590 y que aumenta el rendimiento lipídico del proceso en un 59,8 %.

  Los valores ofrecidos anteriormente no contemplan el uso de pre-tratamiento, que incorporado al protocolo y en vista a los resultados, mejorará los indicadores.

- Se obtiene el perfil lipídico del bioaceite microalgal, encontrando predominancia del ácido palmítico (C16:0) con un 60,8 % y el ácido linoleico (C18:2) con un 25,2 %.

  La predominancia de ácidos grasos saturados se manifiesta en un bioaceite apto para su convertibilidad, con posibilidad de generar biodiésel de buena calidad, estable ante la oxidación, con bajo punto de fluidez y buenos valores de volatilidad.

# 7. Trabajos futuros

A partir de estudio resaltan las siguiente oportunidades para futuros desarrollos:

- Existe espacio para incorporar a la investigación otras etapas del proceso productivo, como lo son el cultivo y cosecha, dando un enfoque global a la maximización extractiva de bioaceite e indagando nuevas variables que podrán influir en las variables de respuesta.

- Se recomienda continuar y ahondar la investigación acerca de la importancia de la variable temporal en la cantidad de bioaceite obtenido. El enfoque debe estar en buscar el punto óptimo de tiempo, en el cual conviene operar el equipo Soxhlet, maximizando el aprovechamiento de recursos y realizando una remoción completa de lípidos. Además es interesante conocer la interrelación de la variable temporal, con respecto a las demás variables de estudio, así como el pre-tratamiento utilizado.

- Se insta a continuar la investigaciones en el área de pre-tratamiento, revisando más métodos ó combinaciones de estos, pues su influencia es relevante para las variables de respuesta extractivas.

- Es importante ahondar el análisis del perfil lipídico del bioaceite obtenido, para cuantificar la cantidad presente de cada especie de ácido graso en la muestra entregada. De esta forma se podrá estimar de manera precisa la calidad y cantidad del biodiésel a formar. También es relevante visualizar la influencia de procesos invasivos, como el pre-tratamiento, sobre el aceite obtenido.

- A partir de este estudio, surge además la necesidad de conocer el valor agregado de la muestra de biomasa sobrante del estudio, buscando aprovechar compuestos existentes, como su uso en otras aplicaciones.

- El valor de producción de 1[g] de bioaceite microalgal bajo este procedimiento Soxhlet sigue siendo poco rentable, alcanzando los $4.222 durante la extracción más eficiente sin pre-tratamiento. Es por esto que se hace necesario la incorporación de otras tecnologías extractivas, como lo es la extracción supercrítica ó nuevas tecnologías que se desarrollan en el mercado, más escalables y que permitan generar la cantidad de bioaceite y por tanto biodiésel necesario para continuar las investigaciones.

# Referencias

[1] **Comisión nacional de energía, 2017** Anuario estadístico de energía CNE 2017, *https://www.cne.cl/nuestros-servicios/reportes/informacion-y-estadisticas/*

[2] **Efraín Moraga. 2018** La contaminación y las prohibiciones mundiales están iniciando la era del ocaso del diésel, *revista Pulso, La Tercera.*

[3] **California evironmental protection agency, 2009** Detailed California-GREET Pathway for Biodiesel Produced in California from Used Cooking Oil *https://www.arb.ca.gov/fuels/lcfs/092309lcfs-uco-bd.pdf*

[4] **Ronald Halim, Michael K. Danquah, Paul A. Webley. 2012.** Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review.
*Biotechnology Advances, Vol. 30, Paginas 709-732*

[5] **Chisti, 2007** Biodiesel from microalgae.
Biotechnology *Advances, Vol. 25, Paginas 294–306*

[6] **S. Imtenan, H.H. Masjuki, M. Varman, 2014** Emission and performance improvement analysis of biodiesel-diesel blends with additives.
*Procedia Engineering, Vol. 90, Paginas 472-477*

[7] **Liam Brennan, Philip Owende. 2009.** Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.
*Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol.14, Paginas 557-577*

[8] **Tredici, 2010** Photobiology of microalgae mass culture: understanding the tools for the next green revolution.
*Biofuels, Vol. 1, Paginas 143-162*

[9] **M.A. Delucchi, 2003** A lifecycle of emission model: lefecycle emissions from transportation fuels.
*www.its.ucdavis.edu/publications.html*

[10] **European environment agency, 2003** Directive 2003/30/EC, use of biofuels and renewable fuels.
*https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex %3A32003L0030*

[11] **Liang Wang, Yecong Li, Paul Chen, Min Min, Yifeng Chen, Jun Zhu, Roger R. Ruan. 2009.** Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae Chlorella sp.
*Bioresource Technology, Vol 101, Paginas 2623-2628*

[12] **M. Villa Carvajal, 2016** Microalgas, ¿Sabías que?, AINIA centro tecnológico, *https://www.ainia.es/insights/microalgas-sabias-que/*

[13] **Teresa M. Mata, António A. Martins, Nidia. S. Caetano. 2009.** Microalgae for biodiesel production and other applications: A review.
*Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol 14, Paginas 217-232*

[14] **Espinoza F., 2017** Revista Ciencia.
*https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/online/ MicroAlgas.pdf*

[15] **Man Kee Lam, Keat Teong Lee. 2011** Microalgae biofuels: A critica review of issues, problems and the way forward.
*Biotechnology Advances, Vol 30, Paginas 673-690*

[16] **Alexis Hernández-Pérez, José I. Labbe. 2014.** Microalgas, cultivo y beneficios.
*Revista de biología marina y oceanografía, Vol.49*

[17] **Chen, Z., Zhang, X., Jiang, Z., Chen, X., He, H., Zhang, X. 2016.** Light/dark Cycle of Microalgae Cells in Raceway Ponds: Effects of Paddlewheel Rotational Speeds and Baffles Installation.
*Bioresource Technology, Vol. 219*

[18] **SpirulinaMater, 2018** Sistema de producción, *https://www.spirulina.cl/sistemade-produccion/*

[19] **E. Montero. 2017** Cultivos de Chlorococcum sp. con un digestato de excretas porcinas en condiciones controladas y no controladas.
*https://www.researchgate.net/publication/319722249*

[20] **AquAlgae. 2018** Sistema de producción.
*http://aqualgae.com/es/productosyservicios/plantas_produccion/*

[21] **A. Palomino, 2013** Extracción de aceite de microalgas.
*http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/9135/1/CB-0486620.pdf*

[22] **AlgaeBase, 2019** Arthrospira maxima,
*http://www.algaebase.org.*

[23] **RAD WAG balanzas electrónicas, 2019**
*http://radwag.com/es/balanza-analitica*

[24] **D.C. Montgomery, 2012** Diseño de experimentos, octava edición.

[25] **Jose A. Gerde, Melissa Montalbo-Lomboy, 2012** Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment.
*Bioresource Technology, Vol. 125, Paginas 175-181*

[26] **STAT GRAPHICS 18 Centurion, 2019** StatGraphics XVIII centurion,
*http://www.statagraphics.com*

[27] **Giorgos Markou, Elias Nerantzis. 2013.** Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions.
*Biotechnology Advances, Vol 31, Paginas 1532-1542*

[28] **Chun-Yen Chen, Kuei-Ling Yeh, Rifka Aisyah, Duu-Jong Lee, Jo-Shu Chang. 2010.** Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review.
*Bioresour Technol, Vol. 102, Paginas 71-81*

[29] **Qiang Hu, Milton Sommerfeld, Eric Jarvis, Maria Ghirardi, Matthew Posewitz, Michael Seibert, Al Darzins. 2008.** Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances.
*Plant Journal, Vol. 54, Paginas 621-39*

[30] **Kalpesh K. Sharma, Holger Schuhmann, Peer M. Schenk. 2012.** High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production.
*Energies, Vol. 5, Pagina 1532*

[31] **Caroline R.P.S. Paes1, Gabrielle R. Faria1, Natália A.B. Tinoco1, Dominique J.F.A. Castro, Elisabete Barbarino, Sergio O. Lourenc. 2016.** Growth, nutrient uptake and chemical composition of Chlorella sp. and Nannochloropsis oculata under nitrogen starvation.
*https://scielo.conicyt.cl/pdf/lajar/v44n2/art09.pdf*

[32] **Ministerio de Economía. 2008** Decreto N°11.
*https://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=271031*

[33] **C. Nuñez, 2007** Extracciones con equipo Soxhlet.
*http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf*

[34] **Caledon laboratory chemicals, 2019**
*http://caledonlabs.com/product.php?productid=645*

# A. Anexo I: Procedimiento maximizado

En este documento se explica el protocolo de extracción de bioaceite a partir de biomasa microalgal optimizado bajo las condiciones presentes en la actualidad en el departamento de ingeniería mecánica, bajo el alero de la división de energías renovables y su asociación con el laboratorio de RILES del departamento de ingeniería química.
En primer lugar se enuncian tanto los insumos como los equipos a utilizar, destacando las características más importantes que son requerimientos para el correcto desarrollo de la extracción.
Mas tarde se expresa el protocolo extractivo paso a paso, en orden de obtener la máxima cantidad de bioaceite por extracción.

## Insumos

A continuación se detallan los insumos requeridos para realizar una extracción optimizada. Se informa solo la información relevante y las características que se deben cumplir. Las cantidades requeridas se narran en el procedimiento.

- **Microalga:** Se trabaja con Arthrospira maxima o espirulina, con un grado de pureza del 100 %, secada por spray, proveída por Spiriluna Matter Ltda.
- **Solvente:** Se utiliza Hexano con calidad para análisis, HPLC ó cromatografía líquida, de 99,5 % de pureza.
- **Empaque poroso:** Se utilizan sobres manufacturados con dos papeles filtro marca Filter-Lab, modelo 1250, plegados en forma de rectángulo, de 6x8[cm] aproximadamente, con un doblez mínimo de 1 [cm], el cual se corchetea cada 1 [cm] evitando así fugas de biomasa.
- **Vaselina selladora:** Corresponde al insumo que sella las uniones en equipos de vidrio, como lo son el rotavapor y fundamentalmente el Soxhlet, evitando pérdidas de solvente.
- **Otros:** Referido a insumos varios, como agua destilada (utilizada en disoluciones a la hora de sonificar), agua potable (utilizada como fluido de enfriamiento), electricidad, etc.

### Equipos

A continuación se enuncian los equipos requeridos para una extracción optimizada. Sólo se mencionan las características más relevantes para obtener resultados replicables. De no mencionar especificaciones, se pueden seleccionar equipos acorde a su función.

- **Equipo Soxhlet:** Equipo donde se realiza la extracción de bioaceite desde la biomasa mediante reflujos de solvente sucesivos. Cuenta con una capacidad de 250[ml] en el balón inferior, mientras que posee 150[ml] de capacidad en el compartimiento extractor.
- **Manta térmica:** Equipo capacitado para transferir calor de manera uniforme sobre el balón inferior del equipo soxhlet de 250[ml]. De marca QUIMIS, con una potencia de 130[W] con graduación del 1 al 11.
- **Rotavapor:** Equipo utilizado para remover el solvente del bioaceite extraído.
- **Bomba de vacío:** Equipo utilizado para reducir la presión al interior del rotavapor, disminuyendo la temperatura requerida de ebullición, así como también mejorar la remoción del solvente.
- **Campana de extracción:** Equipo responsable de extraer y liberar de manera segura los vapores resultantes de la extracción.
- **Sonificador:** Equipo encargado de romper recubrimientos celulares. Marca Qsonica Q700 con una potencia de 700[w] y 20[KHz] de frecuencia.
- **Balanza analítica:** Corresponde al instrumento encargado de realizar las mediciones de masa, tanto de insumos como de resultados. Cuenta con una resolución de 0,1 [mg] y un rango de 10-220[mg].
- **Equipamiento de seguridad:** Se incluyen elementos como cotona blanca, guantes de nitrilo, guantes para manipulación de objetos calientes, mascarilla simple de papel y protección ocular.
  Lo anterior se utilizó según las circunstancias de trabajo, a excepción de la cotona y los guantes, ya que son parte del protocolo de trabajo en el laboratorio de RILES.
- **Horno:** Equipo utilizado para secar muestras de biomasa con presencia de humedad, así como para secar accesorios de laboratorio confeccionado con vidrio. Este equipo se mantiene a 105[°C]

- **Tamiz:** Herramienta utilizada para separar y clasificar porciones de la biomasa según su diámetro promedio.
  Se constituye por una serie de rejillas en anillos concéntricos de metal. Dichas rejillas se encuentran graduadas, con distintos números según el diámetro de poro de las mismas.

- **Licuadora:** Equipo utilizado en la primera molienda de la biomasa, puesto que luego del secado se encuentra en el formato de grandes agregados duros y frágiles, donde es preciso romperlos para poder alcanzar una buena penetración del solvente.

- **Mortero:** Equipo utilizado para moler agregados solidificados producidos cuando la biomasa se seca. Luego de pasar por la licuadora, se intenta homogeneizar y aumentar el grado de molienda con esta técnica manual.
  Su construcción es de cerámica.

- **Termómetro:** Instrumento utilizado para controlar las temperaturas en gran parte de los procesos que se llevan a cabo en la extracción, como lo es la temperatura del baño de agua, como también estimativos de la temperatura de la manta térmica, dichas mediciones son sólo referenciales ya que este instrumento no se utilizará a la hora de obtener conclusiones de las variables.
  Su confección es de vidrio, y el fluido es alcohol con tinte rojo. Su resolución es de 1[°C] y su rango es de 5[°C] a 120[°C].

- **Material de vidrio:** Incluye el material de vidrio auxiliar para poder procesar y llevar a cabo las extracciones, esto incluye: Desecador (equipado con silica gel para reducir la humedad ambiental), vasos precipitados (50[ml], 100[ml], 200[ml], 800[ml] y 1000[ml]), probetas (100[ml]), placas de petri, varillas, etc.

- **Equipo de laboratorio:** Incluye el resto de materiales utilizados en el laboratorio de manera auxiliar, como lo son soportes, bolsas plásticas, toalla de papel, envases de plástico, contenedores de plástico, etc.

## Procedimiento

### Pre-tratamiento

1: Se selecciona la biomasa a utilizar separándola en grupos de 50[g] por vaso precipitado de 250[ml].

2: Se agrega agua destilada hasta formar una proporción de 1:3 masa/masa, alcanzando un volumen de 170[ml] aproximadamente, por cada vaso precipitado.

3: Se procede a sonificar la muestra, ocupando un 50 % de la capacidad del equipo QSonica Q700, en 4 tandas de 1 minuto, hasta aproximadamente los 14.000[j] de energía traspasada. Se han de espaciar las tandas por al menos 2 minutos con el fin de no elevar en demasía la temperatura de la muestra.

4: Se colocan los vasos precipitados con la muestra sonificada en el horno eléctrico a 100[°C] por 24[h], para secar el exceso de agua. Posteriormente el contenido se traspasa a placas de petri por 6[h]-8[h] hasta completar el secado.

5: Las muestras son extraídas de la placa de petri, procediendo a la molienda por mortero de las mismas, por aproximadamente 2 minutos ó hasta alcanzar un acabado uniforme.

### Extracción

6: Se arman empaquetaduras porosas confeccionadas a partir de papel filtro, en forma de sobre rectangular de 6x8[cm] aproximadamente, con un pliegue de al menos 1 cm por arista, corcheteado cada 1[cm] en cada pliegue, evitando así fugas de biomasa. Mas tarde se taran las mismas sobre la balanza digital. Posteriormente se agrega biomasa utilizando un dispositivo de vaciado hasta los 15[g] por empaquetadura, formando 3 paquetes por extracción.

7: Se prepara el equipo soxhlet, equipado con un soporte, acomodando la manta térmica sobre la base del mismo. Se añaden bolas de ebullición en el balón inferior del equipo soxhlet, donde también es necesario instalar (primer uso) ó revisar las conexiones hídricas a la torre de destilación. Se prepara el equipo rotavapor, conectando en serie la fuente hídrica, aumentando la eficiencia del proceso. También se conecta la bomba de vacío al rotavapor.

8: Se agregan las empaquetaduras porosas a la sección de extracción del equipo, vigilando un correcto sellado, así como también una correcta posición al final del tubo.

9: Se agrega vaselina en las uniones de vidrio, para permitir un mejor sello, evitar rupturas del material y conservar el solvente en la extracción.

10: Se miden 170[ml] de solvente hexano con la ayuda de una probeta graduada, este procedimiento ha de realizarse bajo la campana de extracción de gases por la volatilidad de este compuesto.

11: De los 170[ml] mencionados con anterioridad, se agregan 100[ml] directamente al balón inferior, para luego agregar 70[ml] en el tubo de extracción del equipo, con precaución de evitar conductos y generar pérdidas de solvente.
Esta operación y las restantes se realizan bajo campana.

12: Se arma el equipo sobre la manta térmica, ajustándolo al soporte, vigilando un correcto sello de las uniones.

13: Se enciende la manta térmica, hasta su graduación de 11, es decir su máxima potencia de trabajo. En el caso de contar con un equipo diferente al mencionado, debe buscarse la posición de funcionamiento en donde exista la mayor transferencia de calor entre la manta térmica y el solvente en el soxhlet. Comienza el tiempo de extracción.

14: Inmediatamente luego de encender la manta térmica se procede a abrir el flujo de agua por la torre de condensación. El caudal se fija entre los 0,0278[lt/s] y los 0,0285[lt/s], mediante la utilización de un vaso precipitado de gran dimensión y un cronómetro, regulado la llave de paso hasta permitir la acumulación de 400[ml] de agua en 14 segundos aproximadamente. Se ha de controlar este parámetro cada media hora, con el fin de compensar las variaciones existentes por el uso variable de agua potable dentro del laboratorio.

15: Se deja el equipo funcionar por 8[h], para luego apagar la manta térmica y el flujo de agua.

16: Se desarma el equipo soxhlet, vaciando el contenido de solvente tanto del balón inferior como del tubo extractor, en un vaso precipitado de 250[ml].

17: Se vacía el contenido del vaso precipitado en el balón del rotavapor.

18: Se inicia el funcionamiento del rotavapor, encendiendo tanto el baño de agua como también el motor que dará la rotación y la bomba de vacío.

19: Mientras actúa el rotavapor se extraen los empaques porosos del interior del tubo de extracción lavando el equipo, y dejando el mismo en secado, ubicándolo en un horno.

20: Se detiene el rotavapor hasta no observar mas presencia de solvente en el balón, posteriormente trasvalija el contenido del balón (aceite) a un recipiente tarado. Especial **cuidado** se ha de tener en esta etapa, puesto que debe cuidarse la evaporación total de hexano desde la muestra, evitando así resultados erróneos. Se recomienda dejar enfriar la muestra durante 15 a 20 minutos bajo campana, eliminando el posible restante de solvente.

21: Se pesa el aceite obtenido.

22: Se realiza aseo en todos los instrumentos y accesorios usados para repetir la operación.

# B. Anexo II: Perfil lipídico