

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES**

**FACULTAD DE INGENIERIA**

**CARRERA DE INGENIERIA PETROLERA**



**PROYECTO DE GRADO**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PRODUCTIVA DE BIODIÉSEL A  
PARTIR DE MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS COMO  
ALTERNATIVA ECOLÓGICA A LOS COMBUSTIBLES FÓSILES  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN PETROLEO, GAS Y PROCESOS**

**POSTULANTE:** JOSE WILMER GONZALES HUANTO

**TUTOR:** M. Sc. Reynaldo Marín Domínguez

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2024**



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE INGENIERIA**



**LA FACULTAD DE INGENIERIA DE LA UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS AUTORIZA EL USO DE LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO SI LOS PROPÓSITOS SON ESTRICTAMENTE ACADÉMICOS.**

**LICENCIA DE USO**

El usuario está autorizado a:

- a) Visualizar el documento mediante el uso de un ordenador o dispositivo móvil.
- b) Copiar, almacenar o imprimir si ha de ser de uso exclusivamente personal y privado.
- c) Copiar textualmente parte(s) de su contenido mencionando la fuente y/o haciendo la cita o referencia correspondiente en apego a las normas de redacción e investigación.

El usuario no puede publicar, distribuir o realizar emisión o exhibición alguna de este material, sin la autorización correspondiente.

**TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS. EL USO NO AUTORIZADO DE LOS CONTENIDOS PUBLICADOS EN ESTE SITIO DERIVARA EN EL INICIO DE ACCIONES LEGALES CONTEMPLADAS EN LA LEY DE DERECHOS DE AUTOR.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Dios, quien siempre ha guiado mis pasos y ha sido mi fuente de inspiración y fortaleza.

Agradezco a la Universidad Mayor de San Andrés, en particular a la Facultad de Ingeniería y a la Carrera de Ingeniería Petrolera, por brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente. Agradezco a todos los docentes que han compartido sus conocimientos conmigo y han contribuido a mi desarrollo académico.

Mi especial reconocimiento y agradecimiento al MSc. Ing. Reynaldo Marín Domínguez, mi tutor, por su valiosa orientación y apoyo en la elaboración de este proyecto.

Quiero expresar mi gratitud a mis amigos y amigas, quienes han sido parte importante de este proceso y han compartido conmigo momentos de aprendizaje y crecimiento.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Carrera de Gas y Petroquímica de la Universidad Pública de El Alto por su invaluable colaboración al permitirme utilizar sus instalaciones de laboratorio. Su apoyo ha sido fundamental para el desarrollo de mi proyecto y ha contribuido significativamente a mi crecimiento académico.

Al Curso Básico le agradezco por colaborar en la obtención de Biodiesel, lo cual fue fundamental para el desarrollo de este proyecto.

Finalmente, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis padres, quienes han sido mis mayores impulsores y han brindado su apoyo incondicional en todo momento. A mis hermanos, les agradezco por ser mi principal motivación y por alentarme a seguir adelante cada día. Sin ustedes, este logro no habría sido posible.

¡Gracias!

## **DEDICATORIA**

El presente proyecto está dedicado a Dios, quien ha sido mi fuente de inspiración y fortaleza durante todo este proceso de alcanzar uno de mis mayores anhelos.

Agradezco de todo corazón a mis padres, Félix Gonzales Alba y Gloria Viviana Huanto Kahua, por su amor, trabajo y sacrificio a lo largo de todos estos años. Gracias a ustedes he llegado hasta aquí y me he convertido en la persona que soy. Ser su hija ha sido un orgullo y un privilegio, ustedes son los mejores padres que alguien podría desear.

A mis queridos hermanos, Jhonny y Ruddy, gracias por estar siempre presentes, por acompañarme y por el constante apoyo moral que me han brindado a lo largo de esta etapa de mi vida.

También quiero expresar mi gratitud a todas las personas que me han apoyado y han contribuido al éxito de este trabajo, en especial a aquellos que me han brindado su ayuda y compartido sus conocimientos, abriéndome las puertas para alcanzar mis metas. Su colaboración ha sido fundamental para lograr los objetivos planteados.

## ÍNDICE GENERAL

|  |           |
|--|-----------|
| AGRADECIMIENTOS .....  | I         |
| DEDICATORIA .....  | II        |
| ÍNDICE GENERAL .....   | II        |
| ÍNDICE DE TABLAS .....   | VIII      |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   | X         |
| INDICE DE ANEXOS.....  | XII       |
| RESUMEN EJECUTIVO .....  | XIII      |
| <b>CAPÍTULO 1. GENERALIDADES .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 INTRODUCCIÓN.....  | 1         |
| 1.2 ANTECEDENTES .....   | 2         |
| 1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....  | 4         |
| 1.3.1 Identificación del problema .....  | 4         |
| 1.3.2 Formulación del problema .....   | 5         |
| 1.4 OBJETIVOS .....  | 5         |
| 1.4.1 Objetivo General .....   | 5         |
| 1.4.2 Objetivos Específicos.....   | 5         |
| 1.5 JUSTIFICACIÓN .....  | 5         |
| 1.5.1 Justificación técnica.....   | 6         |
| 1.5.2 Justificación económica .....  | 7         |
| 1.5.3 Justificación social.....  | 7         |
| 1.5.4 Justificación Ambiental.....   | 8         |
| 1.6 ALCANCE.....   | 8         |
| 1.6.1 ALCANCE TEMATICO.....  | 8         |
| 1.6.2 ALCANCE TEMPORAL .....   | 8         |
| <b>CAPÍTULO 2. BIODIÉSEL Y ESPECIES DE MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL</b><br>..... | <b>10</b> |
| 2.1 BIODIÉSEL .....  | 10        |
| 2.1.1 Características y propiedades del biodiésel: .....                                       | 10        |
| 2.1.2 Ventajas del biodiésel .....   | 11        |
| 2.1.3 Biodiésel en Bolivia.....  | 12        |
| 2.2 MICROALGAS .....   | 13        |
| 2.2.1 Especies de microalgas para la producción de biodiésel.....                              | 14        |
| 2.2.1.1 Microalga oleaginosa.....  | 16        |
| 2.2.2 Microalga Chlorrella Vulgaris .....  | 16        |
| 2.2.2.1 Propiedades y composición de la Chlorella Vulgaris .....                               | 17        |

|   |   |           |
|---|---|-----------|
| 2.2.2.2   | Composición química .....   | 18        |
| 2.2.2.3   | Aplicaciones de la Chlorella Vulgaris.....  | 18        |
| 2.2.2.4   | Ventajas de la microalga Chlorrella Vulgaris.....   | 19        |
| <b>CAPÍTULO 3. ESTUDIO DEL PROCESO DE CULTIVO DE LA MICROALGA CHLORRELLA VULGARIS PARA LA PRODUCCIÓN EFICIENTE DE LÍPIDOS CON FINES DE OBTENCIÓN DE BIODIÉSEL .....</b> |   | <b>21</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>MICROALGAS .....</b>   | <b>21</b> |
| 3.1.1   | Esquema de una biorrefinería integrada para la utilización de biomasa de microalgas.....                      | 21        |
| 3.1.2   | Recolección y selección de microalgas .....   | 23        |
| 3.1.2.1   | Muestreo .....  | 23        |
| 3.1.2.2   | Filtración y concentración.....   | 24        |
| 3.1.2.3   | Identificación y cuantificación .....   | 25        |
| 3.1.2.4   | Aislamiento y selección.....  | 25        |
| 3.1.2.5   | Cultivo y mantenimiento.....  | 25        |
| 3.1.2.6   | Cómo identificar Chlorella Vulgaris: Observación microscópica y características morfológicas específicas..... | 26        |
| 3.1.2.6.1   | Preparación de la muestra. ....   | 26        |
| 3.1.2.6.2   | Observación al microscopio .....  | 26        |
| 3.1.2.6.3   | Características morfológicas .....  | 26        |
| 3.1.3   | Biomasa microalgal.....   | 27        |
| 3.1.4   | Floculación.....  | 27        |
| 3.1.4.1   | Floculación natural .....   | 27        |
| 3.1.4.2   | Floculación química.....  | 28        |
| 3.1.4.3   | Floculación por flotación.....  | 28        |
| 3.1.5   | Deshidratación de la biomasa microalgal .....   | 28        |
| 3.1.5.1   | Secado al sol .....   | 29        |
| 3.1.5.2   | Secado por aire caliente .....  | 29        |
| 3.1.5.3   | Secado por liofilización .....  | 29        |
| 3.1.5.4   | Secado por pulverización.....   | 29        |
| 3.1.6   | Productos únicos a partir de biomasa microalgal .....   | 29        |
| 3.1.6.1   | Extracción.....   | 29        |
| 3.1.6.1.1   | Lípidos .....   | 30        |
| 3.1.6.1.1.1   | Extracción con solventes orgánicos.....   | 30        |
| 3.1.6.1.1.2   | Extracción por prensado .....   | 30        |
| 3.1.6.1.1.3   | Extracción con fluidos supercríticos .....  | 30        |
| 3.1.6.1.1.4   | Eficiencia .....  | 30        |

|   |   |           |
|---|---|-----------|
| 3.1.6.1.2   | Proteínas, carbohidratos, etanol y pigmentos de microalgas .....  | 31        |
| 3.1.6.1.2.1   | Extracción de proteínas .....   | 31        |
| 3.1.6.1.2.2   | Extracción de carbohidratos.....  | 31        |
| 3.1.6.1.2.3   | Extracción de etanol.....   | 32        |
| 3.1.6.1.2.4   | Extracción de pigmentos .....   | 32        |
| 3.1.6.2   | Conversión .....  | 32        |
| 3.1.6.2.1   | Fermentación .....  | 32        |
| 3.1.6.2.1.1   | Fermentación anaerobia.....   | 32        |
| 3.1.6.2.1.2   | Fermentación aerobia.....   | 33        |
| 3.1.6.2.1.3   | Fermentación en estado sólido .....   | 33        |
| 3.1.6.2.1.4   | Fermentación en estado líquido .....  | 33        |
| 3.1.6.2.2   | Transesterificación .....   | 33        |
| 3.1.6.2.2.1   | Transesterificación homogénea .....   | 33        |
| 3.1.6.2.2.2   | Transesterificación heterogénea .....   | 34        |
| 3.1.6.2.2.3   | Transesterificación enzimática.....   | 34        |
| 3.1.6.2.3   | Hidrólisis enzimática y pirólisis.....  | 34        |
| 3.1.6.2.3.1   | La hidrólisis enzimática.....   | 34        |
| 3.1.6.2.3.2   | Pirólisis .....   | 35        |
| 3.2   | FOTOSÍNTESIS .....  | 35        |
| 3.2.1   | Pigmentos fotosintéticos .....  | 35        |
| 3.2.2   | Luz y temperatura .....   | 35        |
| 3.2.3   | Fotoinhibición .....  | 36        |
| 3.2.4   | CO <sub>2</sub> y nutrientes .....  | 36        |
| 3.2.4.1   | CO <sub>2</sub> .....   | 36        |
| 3.2.4.2   | Nutrientes .....  | 37        |
| 3.2.5   | Producción de biomasa .....   | 37        |
| 3.3   | BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS.....   | 38        |
| 3.4   | INSUMOS PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS: EFECTOS EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE ALTA CALIDAD..... | 38        |
| 3.5   | CULTIVO DE BIOMASA DE LAS MICROALGAS.....   | 40        |
| 3.5.1   | Sistemas de cultivo de microalgas .....   | 41        |
| 3.5.2   | Sistemas de cultivo adecuados para la producción de biodiésel a partir de microalgas.....                     | 42        |
| 3.5.2.1   | Sistemas abiertos.....  | 42        |
| 3.5.2.2   | Sistemas cerrados .....   | 43        |
| <b>CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE CHLORELLA VULGARIS A TRAVÉS DE LA OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN LABORATORIO .....</b> |   | <b>45</b> |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| <b>4.1</b>  | <b>MATERIALES Y REACTIVOS</b> .....  | <b>45</b> |
| 4.1.1       | Cultivo de microalgas.....   | 45        |
| 4.1.2       | Extracción Soxhlet de microalgas.....                                      | 45        |
| 4.1.3       | Recuperación de solvente .....   | 46        |
| 4.1.4       | Transesterificación y biorefinación.....                                   | 46        |
| <b>4.2</b>  | <b>MÉTODOS</b> .....   | <b>46</b> |
| <b>4.3</b>  | <b>CONFIGURACIÓN DEL FOTOBIORREACTOR</b> .....                             | <b>47</b> |
| <b>4.4</b>  | <b>DESARROLLO DE MICROALGAS EN MEDIOS SINTÉTICOS</b> .....                 | <b>47</b> |
| 4.4.1       | Desarrollo de microalgas a una escala mediana .....                        | 48        |
| 4.4.2       | Desarrollo del cultivo de microalgas en aguas lacustres .....              | 49        |
| 4.4.3       | Planificación del tamaño del fotobiorreactor .....                         | 50        |
| 4.4.4       | Cultivo de microalgas en medio de cultivo sintetizado.....                 | 53        |
| <b>4.5</b>  | <b>REGIÓN DE ANÁLISIS</b> .....  | <b>53</b> |
| <b>4.6</b>  | <b>RECOLECCIÓN DE MUESTRAS</b> .....                                       | <b>53</b> |
| 4.6.1       | Análisis de las muestras .....   | 54        |
| 4.6.2       | Aislamiento de microalgas .....  | 54        |
| <b>4.7</b>  | <b>AISLAMIENTO EN MEDIO SINTÉTICO SOLIDO</b> .....                         | <b>55</b> |
| <b>4.8</b>  | <b>INOCULACIÓN DEL MEDIO SÓLIDO AL MEDIO LÍQUIDO</b> .....                 | <b>59</b> |
| <b>4.9</b>  | <b>IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS DE MICROALGAS AISLADAS</b> ..... | <b>61</b> |
| 4.9.1       | Caracterización morfológica para identificación .....                      | 61        |
| 4.9.2       | Conservación .....   | 61        |
| <b>4.10</b> | <b>PREPARACIÓN DEL INOCULO</b> .....                                       | <b>61</b> |
| <b>4.11</b> | <b>ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS ALGAL</b> .....               | <b>63</b> |
| 4.11.1      | Método de Recuento en cámara Neubauer .....                                | 63        |
| 4.11.2      | Ajuste de curva de calibración.....  | 64        |
| 4.11.2.1    | Evolución de la curva de crecimiento referencial .....                     | 65        |
| <b>4.12</b> | <b>MEDIO DE CULTIVO MASIVO</b> .....                                       | <b>66</b> |
| 4.12.1      | Selección de medio de cultivo masivo .....                                 | 66        |
| <b>4.13</b> | <b>FLOCULACIÓN</b> .....   | <b>66</b> |
| 4.13.1      | Optimización de condiciones de floculación:.....                           | 67        |
| <b>4.14</b> | <b>CENTRIFUGACIÓN DE MICROALGAS</b> .....                                  | <b>67</b> |
| <b>4.15</b> | <b>SECADO EN HORNO</b> .....   | <b>67</b> |
| 4.15.1      | Secado en horno a 55 grados Celsius:.....                                  | 67        |
| 4.15.2      | Principios del secado en horno: .....                                      | 68        |
| 4.15.3      | Impacto en la calidad de las microalgas: .....                             | 68        |
| 4.15.4      | Consideraciones adicionales: .....   | 68        |
| <b>4.16</b> | <b>EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES</b> .....                                 | <b>68</b> |

|   |  |           |
|---|--|-----------|
| 4.16.1  | Principios de la extracción de lípidos: .....  | 68        |
| 4.16.2  | Solventes apolares:.....   | 69        |
| 4.16.3  | Proceso de extracción: .....   | 69        |
| 4.16.4  | Consideraciones adicionales: .....   | 69        |
| 4.17  | RECUPERACIÓN DE BIOMASA .....  | 69        |
| 4.17.1  | Sostenibilidad y ciclo cerrado:.....   | 69        |
| 4.18  | TRANSESTERIFICACIÓN.....   | 70        |
| 4.19  | CARACTERIZACIÓN DEL FAME .....   | 72        |
| 4.19.1  | Detección y cuantificación: .....  | 72        |
| 4.19.2  | Identificación de ácidos grasos: .....   | 72        |
| 4.19.3  | Interpretación de resultados: .....  | 72        |
| <b>CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b> |  | <b>73</b> |
| 5.1   | <b>CONFIGURACIÓN DEL FOTOBIOREACTOR.....</b>   | <b>73</b> |
| 5.2   | <b>CULTIVO DE MICROALGAS EN MEDIO SINTÉTICO .....</b>                                      | <b>76</b> |
| 5.2.1.1.1                                       | Recolección de muestras.....   | 76        |
| 5.2.1.1.2                                       | Análisis de las muestras .....   | 78        |
| 5.2.2   | Aislamiento .....  | 78        |
| 5.2.2.1   | Aislamiento en medio sintético solido .....  | 78        |
| 5.2.2.2   | Inoculación del medio sólido al medio líquido .....  | 81        |
| 5.2.3   | Preparación del inóculo .....  | 83        |
| 5.2.4   | Identificación.....  | 85        |
| 5.2.4.1   | Caracterización Morfológica para identificación.....                                       | 85        |
| 5.2.5   | Estimación de la densidad celular algal .....  | 87        |
| 5.2.5.1   | Curva de crecimiento de referencia.....  | 89        |
| 5.3   | <b>MEDIO VOLUMINOSO PARA CULTIVO DE MICROALGAS .....</b>                                   | <b>93</b> |
| 5.3.1   | Selección de medio de cultivo voluminoso.....  | 93        |
| 5.3.2   | Optimización del método de cultivo.....  | 94        |
| 5.3.3   | Influencia de bicarbonato de sodio $\text{NaHCO}_3$ y cloruro de sodio $\text{NaCl}$ ..... | 97        |
| 5.3.4   | Influencia del flujo de aire .....   | 99        |
| 5.3.5   | Influencia de la temperatura .....   | 100       |
| 5.3.6   | Influencia de la iluminancia .....   | 102       |
| 5.3.7   | Resultados óptimos para el cultivo.....  | 103       |
| 5.3.8   | Escalamiento.....  | 107       |
| 5.3.9   | Floculación y centrifugado .....   | 107       |
| 5.3.10  | Secado.....  | 109       |
| 5.3.11  | Extracción de lípidos .....  | 110       |
| 5.3.12  | Recuperación de biomasa .....  | 114       |

|   |  |            |
|---|--|------------|
| 5.4   | TRANSESTERIFICACIÓN .....  | 114        |
| 5.4.1   | Refinado y lavado de Biodiesel .....   | 115        |
| 5.4.2   | Caracterización del Biodiesel .....  | 117        |
| <b>CAPITULO 6. ANÁLISIS ECONÓMICO Y ANÁLISIS AMBIENTAL.....</b> |  | <b>120</b> |
| 6.1   | ANÁLISIS ECONÓMICO CUALITATIVO .....   | 120        |
| 6.1.1   | La importancia de la Materia Prima.....  | 120        |
| 6.1.1.1   | Aceite de microalgas Chlorella Vulgaris .....                                  | 120        |
| 6.1.1.2   | Etanol. ....   | 120        |
| 6.1.1.3   | Fosfato di-amónico, urea, cloruro de sodio y bicarbonato de sodio.....         | 121        |
| 6.1.2   | El rol del Estado.....   | 122        |
| 6.1.3   | Oportunidades para el Biodiesel a partir de Microalgas Chlorella Vulgaris..... | 122        |
| 6.1.4   | Generación de nuevas inversiones.....  | 123        |
| 6.1.4.1   | Mercados de Exportación para el Biodiésel .....                                | 124        |
| 6.1.4.1.1   | Europa.....  | 124        |
| 6.1.4.1.2   | Sudamérica.....  | 125        |
| 6.1.4.2   | Mercado interno .....  | 125        |
| 6.1.5   | Viabilidad Cualitativa.....  | 126        |
| 6.2   | ANÁLISIS AMBIENTAL.....  | 129        |
| 6.2.1   | Consumo de Agua y Manejo de residuos.....                                      | 129        |
| 6.2.2   | Impacto en la biodiversidad: .....   | 131        |
| 6.2.3   | Emisiones de gases de efecto invernadero: .....                                | 132        |
| 6.2.3.1   | Absorción de CO2 durante el cultivo .....                                      | 132        |
| 6.2.3.2   | Reducción de emisiones .....   | 133        |
| 6.2.4   | Uso de tierra:.....  | 133        |
| 6.2.5   | Sostenibilidad .....   | 134        |
| <b>CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>         |  | <b>135</b> |
| 7.1   | CONCLUSIONES.....  | 135        |
| 7.2   | RECOMENDACIONES .....  | 138        |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>                                       |  | <b>139</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| TABLA 1.  | PROPIEDADES DEL BIODIÉSEL .....  | 12 |
| TABLA 2.  | ESPECIES REPRESENTATIVAS DE MICROALGAS Y SUS PORCENTAJES EN MATERIA SECA DE LÍPIDOS, PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS ..... | 15 |
| TABLA 3.  | DATOS REFERENCIALES PARA OBTENER MEJOR EFICIENCIA DE LA PRODUCCIÓN DE MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS .....            | 40 |
| TABLA 4.  | MEDIOS DE CULTIVO CONVENCIONALES PARA ALGAS PROVENIENTES DE AGUAS DULCES.....  | 55 |
| TABLA 5.  | DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE UTILIZACIÓN. ....  | 59 |
| TABLA 6.  | CONTENIDO DE LÍPIDOS EN GR. DE CHLORELLA VULGARIS PARA OBTENER 30 ML DE ACEITE CRUDO. ....                           | 73 |
| TABLA 7.  | VOLUMEN REAL DEL FOTOBIOREACTOR PARA GENERAR. ....   | 74 |
| TABLA 8.  | FOTOBIOREACTORES PARA CULTIVO .....  | 75 |
| TABLA 9.  | DATOS IN- SITU DE MUESTREO DE LAGO TITICACA.....   | 76 |
| TABLA 10. | PARÁMETROS PARA EL AISLAMIENTO EN MEDIO SOLIDO.....  | 79 |
| TABLA 11. | CARACTERÍSTICAS Y PARÁMETROS DEL CULTIVO EN MEDIO SINTÉTICO. ....  | 81 |
| TABLA 12. | CARACTERÍSTICAS Y PARÁMETROS DEL CULTIVO.....  | 84 |
| TABLA 13. | IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS.....  | 86 |
| TABLA 14. | DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR ALGAL DE 6 MUESTRAS. ....   | 88 |
| TABLA 15. | SEGUIMIENTO DE CRECIMIENTO CELULAR.....  | 89 |
| TABLA 16. | TASA CINÉTICA DE CRECIMIENTO. ....   | 92 |
| TABLA 17. | COMPOSICIÓN DE METALES EN AGUA.....  | 94 |
| TABLA 18. | RESUMEN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL. ....  | 95 |
| TABLA 19. | COMBINACIONES DE OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO .....  | 95 |
| TABLA 20. | RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....   | 96 |
| TABLA 21. | MATRIZ EXPERIMENTAL PARA ANÁLISIS Y ESTABLECIMIENTO DE COMBINACIÓN .....   | 98 |
| TABLA 22. | RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO CON CLORURO DE SODIO Y BICARBONATO DE SODIO.....   | 98 |

|                  |  |            |
|------------------|--|------------|
| <b>TABLA 23.</b> | <b>CRECIMIENTO CELULAR RESPECTO AL FLUJO DE AIRE .....</b>   | <b>100</b> |
| <b>TABLA 24.</b> | <b>CRECIMIENTO CELULAR RESPECTO A LA TEMPERATURA .....</b>   | <b>101</b> |
| <b>TABLA 25.</b> | <b>DENSIDAD CELULAR RESPECTO A LA ILUMINANCIA. ....</b>  | <b>102</b> |
| <b>TABLA 26.</b> | <b>CARACTERÍSTICAS Y PARÁMETROS DE CULTIVO VOLUMINOSO .....</b>                                    | <b>103</b> |
| <b>TABLA 27.</b> | <b>CULTIVOS EN MEDIO DE FERTILIZANTES AGRÍCOLAS.....</b>   | <b>104</b> |
| <b>TABLA 28.</b> | <b>DATOS REFERENCIALES PARA PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA .....</b>                                     | <b>105</b> |
| <b>TABLA 29.</b> | <b>ANÁLISIS DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO EN LOS MEDIOS DE CULTIVO A GRAN ESCALA.</b>             | <b>106</b> |
| <b>TABLA 30.</b> | <b>PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA.....</b>  | <b>106</b> |
| <b>TABLA 31.</b> | <b>ESCALAMIENTO DEL CULTIVO DE MICROALGAS PARA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS.....</b>                      | <b>107</b> |
| <b>TABLA 32.</b> | <b>PARÁMETROS Y RESULTADOS DE LA FLOCULACIÓN Y CENTRIFUGACIÓN DE LOS DIFERENTES CULTIVOS .....</b> | <b>108</b> |
| <b>TABLA 33.</b> | <b>PARÁMETROS UTILIZADOS EN EL SECADO DE BIOMASA HUMEDA .....</b>                                  | <b>109</b> |
| <b>TABLA 34.</b> | <b>COMPARACIÓN DE RESULTADOS INICIAL Y FINAL DE BIOMASA HÚMEDA Y SECA.....</b>                     | <b>110</b> |
| <b>TABLA 35.</b> | <b>RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN DE LÍPIDOS MEDIANTE EXTRACCIÓN CON HEXANO .....</b>                  | <b>111</b> |
| <b>TABLA 36.</b> | <b>VOLUMEN DE LÍPIDOS OBTENIDO A PARTIR DE MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS.....</b>                  | <b>112</b> |
| <b>TABLA 37.</b> | <b>CANTIDAD DE BIODIESEL OBTENIDO EN EL PROCESO DE TRANSESTERIFICACIÓN .....</b>                   | <b>115</b> |
| <b>TABLA 38.</b> | <b>ÁREA DE LOS PICOS MOSTRADOS EN LA CROMATOGRAFÍA. ....</b>                                       | <b>118</b> |
| <b>TABLA 39.</b> | <b>CANTIDAD DE BIOMASA SECA Y NUTRIENTES NECESARIOS.....</b>                                       | <b>127</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| FIGURA 1.  | MICROALGA CHLORELLA VULGARIS.....   | 16 |
| FIGURA 2.  | ESQUEMA GENERAL DE UNA BIORREFINERÍA PARA PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE MICROALGAS.....               | 21 |
| FIGURA 3.  | ESQUEMA GENERAL DE LA BIORREFINERÍA PARA LA UTILIZACION DE BIOMASA ALGAL. ....                              | 23 |
| FIGURA 4.  | MASAS DE AGUA ACCESIBLES Y NO ACCESIBLES POCO PROFUNDAS. ....   | 24 |
| FIGURA 5.  | CULTIVO DE MICROALGAS EN MEDIO SINTÉTICO.....   | 48 |
| FIGURA 6.  | CULTIVO DE MICROALGAS A MEDIANA ESCALA.....   | 49 |
| FIGURA 7.  | CULTIVO DE MICROALGAS.....  | 50 |
| FIGURA 8.  | FLUJOGRAMA PARA EL DIMENSIONAMIENTO DEL FOTOBIOREACTOR EN EL CULTIVO DE MICROALGAS.....                     | 52 |
| FIGURA 9.  | ESPECTROFOTOMETRÍA UTILIZADA EN EL ANÁLISIS DE MUESTRAS.....  | 54 |
| FIGURA 10. | ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES PARA AISLAMIENTO MEDIO SINTÉTICO SÓLIDO.....                                   | 55 |
| FIGURA 11. | SIEMBRA POR ESTRÍA.....   | 56 |
| FIGURA 12. | AISLAMIENTO EN MEDIO SÓLIDO.....  | 57 |
| FIGURA 13. | UBICACIÓN DEL PLANO ILUMINADO.....  | 58 |
| FIGURA 14. | TRANSFERENCIA DE COLONIAS ALGALES A TUBOS DE ENSAYOS.....   | 60 |
| FIGURA 15. | AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROALGAS POR EL MÉTODO DE DILUCIONES SUCESIVAS Y SUBCULTIVOS REPETIDOS..... | 62 |
| FIGURA 16. | DILUCIÓN SERIADA PARA ESTIMACIÓN DE DCA MÁX.....  | 64 |
| FIGURA 17. | DISTRIBUCIÓN DE LA LUZ DENTRO DE UN FOTOBIOREACTOR. ....  | 75 |
| FIGURA 18. | SECTOR GEOGRÁFICO DONDE SE TOMARON LAS MUESTRAS.....  | 77 |
| FIGURA 19. | ABSORBANCIA VS LONGITUD DE ONDA ASOCIADA A LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DEL LAGO TITICACA .....                   | 78 |
| FIGURA 20. | ESPECIFICACIONES DE LA INCUBADORA PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS.....  | 79 |
| FIGURA 21. | SE EMPLEARON INCUBADORAS PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS .....  | 80 |
| FIGURA 22. | CULTIVO DE MICROALGAS NATIVAS DEL LAGO TITICACA EN MEDIO SINTÉTICO SÓLIDO.....                              | 81 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| FIGURA 23. | MICROALGAS PRESENTES EN CULTIVOS EN MEDIO LÍQUIDO.....   | 82  |
| FIGURA 24. | ESPECIES DE MICROALGAS ASILADAS DEL LAGO TITICACA. ....  | 82  |
| FIGURA 25. | CULTIVOS DE REFERENCIA PARA EL CRECIMIENTO (INÓCULOS).....   | 84  |
| FIGURA 26. | SE REALIZÓ LA IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE MICROALGAS (SCENEDESMUS SP., SPIRULINA PLATENSIS, CHLORELLA VUGARIS) .....   | 85  |
| FIGURA 27. | COMPARACIÓN DE LOS CULTIVOS EN EL DÍA DE INOCULACIÓN Y AL FINAL DEL CULTIVO. ....  | 93  |
| FIGURA 28. | CRECIMIENTO MÁXIMO DE CÉLULAS RESPECTO A UREA Y FDA .....  | 97  |
| FIGURA 29. | CRECIMIENTO CELULAR MÁXIMO CON RELACIÓN A NA <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....  | 99  |
| FIGURA 30. | VERIFICACIÓN GRAFICA DEL CRECIMIENTO CELULAR .....   | 101 |
| FIGURA 31. | CRECIMIENTO CELULAR RESPECTO A LA ILUMINANCIA. ....  | 103 |
| FIGURA 32. | CRECIMIENTO DE MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS EN MEDIO DE FERTILIZANTES AGRÍCOLAS. ....   | 104 |
| FIGURA 33. | CROMATOGRAMA DE UNA MUESTRA DE FAME PROCEDENTE DE MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS. ....  | 117 |
| FIGURA 34. | PRODUCTIVIDAD MICROALGAL EXPRESADA EN BIOMASA DE C. VULGARIS Y S. OBLIQUUS. DOSIFICACIONES DE CO <sub>2</sub> D1, D2 Y D3. ILUMINACIÓN ARTIFICIAL (4400 LM), FOTOPERIODO 24:24 H, RANGO DE TEMPERATURA 26 °C – 31 °C ..... | 132 |

## INDICE DE ANEXOS

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| ANEXO A | Sistema cerrado para fotobiorreactores de 100 ml, para visualización de crecimiento referencial de microalgas, comparando iluminación, aireación, temperatura, y nutrientes..... | 148 |
| ANEXO B | Armado de sistema cerrado para fotobiorreactores de 500 ml .....   | 148 |
| ANEXO C | Inoculación de microalgas para ver crecimiento referencial .....   | 149 |
| ANEXO D | Nutrientes utilizados para el crecimiento de microalgas Chlorella Vulgaris .....   | 150 |
| ANEXO E | Pesando los nutrientes para su inoculación.....  | 151 |
| ANEXO F | Crecimiento de microalgas después de 2 días.....   | 151 |
| ANEXO G | Crecimiento algal después de 20 días.....  | 152 |
| ANEXO H | Muestras pequeñas para conteo de microalgas en laboratorio.....  | 152 |
| ANEXO I | Escalamiento a 5 litros de cultivo .....   | 153 |
| ANEXO J | Escalamiento a cultivos de 20 litros .....   | 154 |
| ANEXO K | Centrifugación de los cultivos, para obtención de biomasa .....  | 155 |
| ANEXO L | Obtención de la biomasa seca.....  | 156 |
| ANEXO M | Preparación del equipo de extracción Soxhlet, para extracción de lípidos .....   | 157 |
| ANEXO N | Extracción de lípidos, método Soxhlet .....  | 158 |
| ANEXO O | Recuperación de n-hexano .....   | 158 |
| ANEXO P | Evaporación de n-hexano en horno.....  | 159 |
| ANEXO Q | Proceso de transesterificación. ....   | 160 |
| ANEXO R | Decantación y centrifugación de biodiesel .....  | 161 |
| ANEXO S | Refinado y lavado de Biodiesel .....   | 162 |
| ANEXO T | Cálculos para determinar la viabilidad del proyecto .....  | 163 |
| ANEXO U | Cálculo de la cantidad de dióxido de carbono que el cultivo puede absorber .....   | 164 |
| ANEXO V | INFORME DE EPSAS .....   | 165 |

## RESUMEN EJECUTIVO

Este estudio se concentra en examinar la posibilidad de producir biodiésel utilizando microalgas *Chlorella Vulgaris* como una opción amigable con el medio ambiente y sustentable en lugar de los combustibles fósiles. Se exploran varios aspectos clave de este proceso, como la selección y caracterización de las cepas de microalgas, la evaluación de los diferentes sistemas de cultivo, los métodos de extracción de los lípidos, la producción de biodiésel y una evaluación exhaustiva de todo el proceso.

Después de seleccionar cuidadosamente cepas específicas de *Chlorella Vulgaris* con base en su contenido de lípidos y su velocidad de crecimiento, se identificaron aquellas que ofrecen un alto rendimiento de lípidos y un crecimiento óptimo. Esto las convierte en opciones ideales para la producción de biodiésel, destacando además su capacidad para adaptarse a distintos ambientes y condiciones climáticas, lo que garantiza una producción estable. Los sistemas cerrados, como los fotobiorreactores, demostraron ser más eficientes al proporcionar un control preciso del entorno, lo que se traduce en una mayor producción de lípidos en comparación con los sistemas abiertos. Sin embargo, los sistemas abiertos son más económicos, aunque están más expuestos a las fluctuaciones ambientales, lo que puede afectar la producción de lípidos.

Se encontró que el método de extracción con solventes orgánicos, especialmente el método Soxhlet, fue el más efectivo y económico, ofreciendo un rendimiento superior al 50% en la extracción de lípidos. Esto proporciona una alternativa práctica y eficiente para la extracción de biodiésel. El rendimiento de la producción de biodiésel a partir de *Chlorella Vulgaris* fue del 65%, lo que es muy prometedor para la producción a gran escala o industrial. Esto confirma la viabilidad y rentabilidad del proceso como una alternativa viable a los combustibles fósiles. Se realizó una evaluación integral considerando aspectos técnicos, económicos y ambientales, y se determinó que la producción de biodiésel a partir de *Chlorella Vulgaris* es una opción viable y sostenible. Este estudio resalta la importancia y el potencial de utilizar microalgas para la producción de energía renovable, lo que contribuye a un futuro más limpio y sostenible.

## **CAPÍTULO 1. GENERALIDADES**

### **1.1 Introducción**

Actualmente, hay una tendencia global hacia la búsqueda de fuentes de energía más limpias y con bajas emisiones de carbono, como la energía solar, térmica, fotovoltaica, hidroeléctrica, geotérmica, eólica y biocombustibles. Estas fuentes están siendo evaluadas y se encuentran en diferentes etapas de estudio y aplicación, cada una con sus propias ventajas y desafíos. En este contexto, se espera que los biocombustibles líquidos, como el biodiésel y el bioetanol, puedan reemplazar al gasóleo y la gasolina respectivamente, fomentar nuevas oportunidades de empleo en áreas rurales, reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y aumentar la seguridad energética. El biodiésel se produce mediante la transesterificación de aceites vegetales, grasas animales, aceites usados o lípidos de microalgas para formar una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos (FAME) de cadena larga, y se considera un sustituto del diésel de petróleo.

El biodiésel es una alternativa atractiva como fuente de energía debido a que se origina de una fuente renovable que puede ser suministrada de forma sostenible, lo que disminuye la dependencia del petróleo y presenta varias ventajas sobre el diésel convencional. En particular, el biodiésel es biodegradable, menos tóxico y no contiene compuestos aromáticos. Además de azufre, tiene un perfil de emisiones de gases de combustión más favorable, con una baja emisión de monóxido de carbono, partículas en suspensión e hidrocarburos sin quemar. El biodiésel tiene un punto de ignición relativamente alto (150 °C), lo que lo hace menos volátil y más seguro de transportar y manejar. También tiene un mayor número de cetano que el diésel convencional, lo que mejora su proceso de combustión, y posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste del motor y prolongan su vida útil.

Bolivia tiene una necesidad creciente de buscar alternativas a los combustibles fósiles debido a su dependencia del petróleo importado y a su compromiso con la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero. El biodiésel es una opción atractiva para el país, ya que puede ser producido localmente a partir de fuentes renovables como

aceites vegetales y grasas animales, lo que podría reducir su dependencia del petróleo importado y promover el desarrollo de una industria nacional de biocombustibles.

Varios estudios han demostrado que las microalgas pueden utilizarse para purificar las emisiones de CO<sub>2</sub> generadas por las plantas de gas. Para lograrlo, se cultivan las microalgas en sistemas cerrados, como los fotobiorreactores, en los cuales las emisiones de CO<sub>2</sub> se direccionan hacia el cultivo de microalgas.

Mediante la fotosíntesis, las microalgas absorben el CO<sub>2</sub> y lo utilizan para su propio crecimiento, al mismo tiempo que generan oxígeno, lo cual contribuye a reducir la contaminación del aire en las zonas cercanas a las plantas de gas.

Una vez que las microalgas han absorbido el CO<sub>2</sub>, pueden ser cosechadas y convertidas en biocombustibles o productos químicos, lo que supone una fuente sostenible de energía y materiales.

## **1.2 Antecedentes**

La Ley N° 1098 de Bolivia, promulgada el 15 de septiembre de 2018 y firmada por el presidente Evo Morales Ayma, se refiere a la regulación de la producción, almacenaje, transporte, comercialización y mezcla de aditivos de origen vegetal. El objetivo de esta ley es establecer un marco normativo que permita sustituir gradualmente la importación de insumos y aditivos, así como diésel oil, con el fin de precautelar la seguridad alimentaria y energética con soberanía en el país. (Ley N° 1098 de Bolivia, promulgada el 15 de septiembre de 2018)

El Decreto Supremo N° 27972 de Bolivia, promulgado el 11 de enero de 2005 por el entonces presidente Carlos D. Mesa Gisbert, tiene como objetivo incrementar la oferta nacional de diésel oil al incorporar componentes de origen vegetal y cumplir con las especificaciones de calidad vigentes.

Este decreto se estableció considerando que la producción nacional de diésel oil era insuficiente para satisfacer la demanda interna y que Bolivia se encuentra alejada de los mercados internacionales de aprovisionamiento de diésel oil, lo que generaba inseguridad en el abastecimiento. Además, se consideró el potencial de producción de aceites de origen vegetal en el país y la política del Gobierno Nacional de fomentar el

desarrollo del sector agroindustrial, generar empleo y sustituir las importaciones de diésel oíl.

El decreto también establece que la obtención del componente de origen vegetal, su mezcla con diésel oíl de origen mineral y la construcción y operación de las plantas e instalaciones necesarias están sujetas a las normas técnicas específicas dictadas por el Ministerio de Minería e Hidrocarburos y las normas operativas dictadas por el Servicio de Impuestos Nacionales. (Decreto Supremo N° 27972 de Bolivia, promulgado el 11 de enero de 2005)

La Ley N° 3207 de 30 de septiembre de 2005, efectivamente establece la incorporación progresiva de biodiésel al diésel de petróleo en Bolivia, comenzando con un mínimo del 2,5% y llegando a un máximo del 20%.

El objetivo de esta ley es promover la producción y uso de biocombustibles en Bolivia, con el fin de reducir la dependencia del país de los combustibles fósiles importados y fomentar la producción nacional de biocombustibles.

La implementación de esta ley ha sido gradual, y en la actualidad, el biodiésel se utiliza en un 5% de la mezcla con el Diesel de petróleo en Bolivia. Se espera que en los próximos años se siga avanzando en la incorporación del biodiésel para lograr el objetivo del 20% establecido por la ley. (Los Tiempos, publicado el 22/06/2008)

El presidente Luis Arce, el Gobierno invertirá Bs1.660 millones para la construcción de tres plantas de extracción de aceite de palma, una planta de extracción de aceites de Macororó y Jatropha, y cuatro centros de acopio y procesamiento de aceites y grasas usadas, para proveer la materia prima para la producción de diésel ecológico.

Además, se ha iniciado la construcción de la Planta Biodiésel 1 en Santa Cruz de la Sierra, con una capacidad para producir 1.500 barriles por día (bpd) de biodiésel. También se tiene previsto implementar una segunda planta de biodiésel de 1.500 bpd y una de diésel renovable de 9.000 bpd.

Estos proyectos se enmarcan en la política de industrialización con sustitución de importaciones del Gobierno boliviano y se espera que contribuyan a la seguridad

energética del país, al reducir la dependencia de los combustibles fósiles importados y fomentar la producción nacional de biocombustibles. (mhe.gob.bo/2023/01/22)

El Ministerio de Hidrocarburos y Energías de Bolivia también está explorando otras opciones para la producción de biocombustibles. Las microalgas son una fuente poco conocida de biomasa que pueden utilizarse para la generación de biocombustibles y es importante que se realicen estudios más amplios y detallados sobre el uso de microalgas como una fuente potencial de biomasa para la producción de biocombustibles en Bolivia.

En resumen, aunque la producción de biocombustibles en Bolivia se ha expandido en los últimos años, todavía es relativamente incipiente y enfrenta varios desafíos, incluyendo la falta de inversiones y tecnología adecuada, y la competencia con los combustibles fósiles.

### **1.3 Planteamiento del problema**

#### **1.3.1 Identificación del problema**

En Bolivia, El diésel en Bolivia está altamente subvencionado por el gobierno debido a la gran cantidad que se importa y al agotamiento de las reservas de hidrocarburos del país, esto significa que el precio al que se vende el diésel al consumidor final es inferior al costo de producción y distribución. Esta política de subvención del diésel tiene como objetivo reducir los costos de transporte y energía para la población boliviana.

La subvención al diésel en Bolivia ha sido objeto de críticas por parte de algunos sectores debido a su alto costo fiscal y por promover el uso de combustibles fósiles en lugar de fuentes de energía renovable como el biodiésel. Sin embargo, el gobierno boliviano ha mantenido la política de subvención del diésel como una forma de apoyar a los sectores más vulnerables de la población y para mantener bajos los precios de los bienes de consumo básico en el país.

El biodiésel es una opción para Bolivia porque el país cuenta con una gran cantidad de tierras aptas para el cultivo de materias primas para la producción de biocombustibles como la soja y la palma aceitera e incluso microalgas, también puede

reducir la dependencia del país de los combustibles fósiles importados, mejorar la seguridad energética del país, reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y generar empleo y desarrollo económico en diferentes lugares de Bolivia.

### **1.3.2 Formulación del problema**

El biodiésel de microalgas de *Chlorella Vulgaris* es una alternativa prometedora a los combustibles fósiles y a otros biocombustibles convencionales. ¿Su producción puede contribuir a reducir la dependencia de los combustibles fósiles y a mitigar los impactos ambientales asociados a su uso?

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

Evaluar la capacidad productiva de biodiésel a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris* como alternativa ecológica a los combustibles fósiles.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Seleccionar y caracterizar cepas de *Chlorella Vulgaris* con alto contenido de lípidos y tasas de crecimiento óptimas para la producción de biodiésel.
- Evaluar diferentes sistemas de cultivo, tanto abiertos como cerrados, y determinar cuál es el más adecuado para el crecimiento y producción de lípidos de *Chlorella Vulgaris*.
- Comparar diferentes métodos de extracción de lípidos de la biomasa de *Chlorella Vulgaris* y seleccionar el más eficiente y económico.
- Evaluar la producción de biodiésel a partir de *Chlorella Vulgaris* para determinar si el rendimiento es viable.
- Realizar una evaluación integral de la producción de biodiésel a partir de microalgas, considerando aspectos técnicos, económicos y ambientales para determinar su viabilidad y sostenibilidad como fuente alternativa de energía.

## **1.5 JUSTIFICACIÓN**

La búsqueda de fuentes alternativas de biocombustibles, como el biodiésel de microalgas de *Chlorella*, puede contribuir a la reducción de emisiones de gases de

efecto invernadero y a la conservación de recursos naturales y la biodiversidad. Además, el desarrollo de tecnologías para la producción de biodiésel de microalgas puede generar oportunidades económicas y de desarrollo para comunidades locales y países en desarrollo.

Aunque Bolivia aún no ha desarrollado una industria de producción de microalgas a gran escala, esto representa una gran oportunidad para el país para invertir en investigación y desarrollo de tecnologías más sostenibles y económicas en el campo del biodiésel de microalgas. Además, existe la posibilidad de implementar políticas públicas y estrategias de financiamiento que promuevan la producción y el consumo de biocombustibles, como el biodiésel de microalgas, en Bolivia. De esta manera, el país puede tomar la iniciativa de liderar la producción y el uso de biocombustibles sostenibles, reducir la dependencia de los combustibles fósiles y mejorar el medio ambiente y la economía en el proceso

El biodiésel de microalgas es relevante e importante debido a su potencial para contribuir a la transición hacia una economía más sostenible y resiliente, y para hacer frente a los desafíos ambientales y socioeconómicos del siglo XXI.

#### **1.5.1 Justificación técnica**

Bolivia cuenta con una gran cantidad de recursos naturales, como agua y luz solar, que son esenciales para el cultivo de microalgas.

Con el fin de facilitar la producción de biodiésel a partir de microalgas en Bolivia, es necesario invertir en la investigación y el desarrollo de tecnologías y procesos de producción más eficientes y económicos. Asimismo, es importante promover políticas públicas y estrategias de financiamiento que incentiven la inversión en esta tecnología en el país. Aunque aún hay desafíos a enfrentar, la facilidad de hacer biodiésel a partir de microalgas en Bolivia está en desarrollo y es una oportunidad para el país de fomentar la innovación y el desarrollo de tecnologías más sostenibles y eficientes en el campo de los biocombustibles.

### **1.5.2 Justificación económica**

En primer lugar, puede reducir la dependencia del país de los combustibles fósiles importados, lo que puede reducir los costos y los riesgos asociados con la importación de combustibles.

Además, la producción de biodiésel de microalgas puede generar empleo y oportunidades de inversión en el país. La producción de microalgas a gran escala puede requerir la construcción de nuevas plantas y la contratación de trabajadores para su operación y mantenimiento, lo que puede generar empleo en el país.

La producción de biodiésel a partir de microalgas en Bolivia puede tener importantes justificaciones económicas, incluyendo la reducción de la dependencia de los combustibles fósiles importados, la generación de empleo y oportunidades de inversión en el país, y la posibilidad de generar ingresos a través de la exportación de biocombustibles.

### **1.5.3 Justificación social**

El uso de combustibles fósiles como el petróleo y el gas natural, tiene un impacto ambiental significativo en el cambio climático y la calidad del aire que afecta la calidad de vida de las personas. Además, la extracción y refinación de estos combustibles son procesos costosos y que requieren mucha energía.

El biodiésel producido a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris* es una alternativa ecológica y sostenible a los combustibles fósiles. Las microalgas pueden cultivarse en pequeñas áreas de tierra y en ambientes controlados, y su producción no depende de la extracción de recursos naturales finitos, como el petróleo y el gas.

Además, el cultivo de microalgas para la producción de biodiésel también puede tener un impacto positivo en las comunidades locales al crear oportunidades de empleo y contribuir al desarrollo económico sostenible. La producción de biodiésel a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris* puede ayudar a reducir la dependencia de los combustibles fósiles, disminuir la emisión de gases de efecto invernadero y mejorar la calidad del aire.

#### **1.5.4 Justificación Ambiental**

La necesidad de reducir la dependencia de los combustibles fósiles y disminuir la huella de carbono asociada a la producción y consumo de los mismos.

La producción y uso de combustibles fósiles es una de las principales fuentes de emisiones de gases de efecto invernadero, lo que contribuye significativamente al cambio climático y sus impactos en el medio ambiente y la sociedad.

Además, la extracción, transporte y refinación de combustibles fósiles también puede tener impactos negativos en la calidad del aire, el agua y el suelo.

La producción de biodiésel a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris* ofrece una alternativa ecológica a los combustibles fósiles, ya que las microalgas son capaces de absorber grandes cantidades de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) de la atmósfera durante la fotosíntesis y producir biomasa y lípidos que pueden ser convertidos en biodiésel.

Además, la producción de biodiésel a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris* también tiene el potencial de reducir la huella de carbono en comparación con los combustibles fósiles, ya que la producción de biodiésel no emite gases de efecto invernadero en la medida en que lo hacen los combustibles fósiles.

### **1.6 ALCANCE**

#### **1.6.1 ALCANCE TEMÁTICO**

El alcance temático propuesto abarca aspectos biológicos, biotecnología de microalgas, ingeniería y tecnología de procesos, evaluación técnica y económica, sostenibilidad y medio ambiente. Estas áreas abordan aspectos como selección y optimización de cepas, desarrollo de protocolos de cosecha y extracción de lípidos, impacto ambiental y ciclo de vida, para promover la producción y uso de biodiésel a base de microalgas.

#### **1.6.2 ALCANCE TEMPORAL**

El alcance temporal para este tema será Durante el año 2023 y parte de 2024, ya que es posible llevar a cabo el diseño experimental y la implementación del cultivo de

microalgas, así como la extracción de lípidos y la producción de biodiésel a partir de *Chlorella Vulgaris*. También se pueden realizar análisis económicos y ambientales.

Y así llevar a cabo la evaluación de la capacidad productiva de biodiésel a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris*.



## **CAPÍTULO 2. BIODIÉSEL Y ESPECIES DE MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL**

### **2.1 Biodiésel**

El biodiésel es un combustible renovable producido a partir de materias primas como aceites vegetales, grasas animales y aceites usados. El proceso de producción implica la transesterificación de los lípidos en los aceites con un alcohol (generalmente metanol o etanol) y un catalizador (generalmente hidróxido de sodio o potasio), lo que produce ésteres metílicos o etílicos de ácidos grasos (biodiésel) y glicerina. (Peñuela Moreno, 2011)

#### **2.1.1 Características y propiedades del biodiésel:**

A continuación, se detallan algunas de las características y propiedades del biodiésel:

- ✓ Características físicas: El biodiésel es un líquido claro, amarillo o marrón claro, con una densidad similar a la del diésel convencional. El punto de inflamación del biodiésel es significativamente más alto que el del diésel convencional, lo que lo hace más seguro de manejar y almacenar.
- ✓ Características químicas: El biodiésel es un éster metílico o etílico de ácidos grasos, que se caracteriza por tener una baja toxicidad y una biodegradabilidad alta. El contenido de oxígeno en el biodiésel es significativamente más alto que en el diésel convencional, lo que puede resultar en una combustión más completa y reducir las emisiones de partículas.
- ✓ Propiedades de combustión: El biodiésel tiene propiedades de combustión similares a las del diésel convencional, incluyendo una alta eficiencia energética y un bajo contenido de azufre. El biodiésel también tiene un índice de Cetano más alto que el diésel convencional, lo que significa que tiene una mejor capacidad de encendido y puede mejorar la eficiencia del motor.
- ✓ Impacto ambiental: El biodiésel es una alternativa más sostenible y renovable que los combustibles fósiles, ya que reduce las emisiones de gases de efecto invernadero y otros contaminantes atmosféricos. El uso de biodiésel puede

ayudar a reducir la dependencia de los combustibles fósiles y mitigar el cambio climático.

- ✓ Aplicaciones: El biodiésel se puede utilizar en motores diésel sin modificarlos y se puede mezclar con diésel convencional en diferentes proporciones. El biodiésel también se puede utilizar como un aditivo para mejorar las propiedades de lubricación y limpieza del combustible diésel.

El biodiésel es una alternativa sostenible y renovable a los combustibles fósiles, que se produce a partir de materias primas renovables y tiene propiedades de combustión similares a las del diésel convencional. El uso de biodiésel puede ayudar a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y otros contaminantes atmosféricos, así como a mitigar el cambio climático. (Gerhard Knothe, 2005)

### **2.1.2 Ventajas del biodiésel**

El biodiésel presenta diversas ventajas sobre el diésel convencional, algunas de las cuales son:

- ✓ El biodiésel se deriva de fuentes renovables, como aceites vegetales, grasas animales, aceites usados y lípidos de microalgas, lo que lo hace más sostenible y disminuye la dependencia del petróleo.
- ✓ El biodiésel es menos tóxico que el diésel convencional y es biodegradable, lo que significa que tiene un menor impacto ambiental en caso de derrames o fugas.
- ✓ El biodiésel no contiene compuestos aromáticos, lo que lo hace menos contaminante y reduce la formación de smog.
- ✓ El biodiésel tiene un perfil de emisiones de gases de combustión más favorable, con una baja emisión de monóxido de carbono, azufre, partículas en suspensión e hidrocarburos sin quemar.
- ✓ El biodiésel tiene un punto de ignición relativamente alto (150 °C), lo que lo hace menos volátil y más seguro de transportar y manejar.

- ✓ El biodiésel tiene un mayor número de cetano que el diésel convencional, lo que mejora su proceso de combustión.
- ✓ El biodiésel posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste del motor y prolongan su vida útil.

El biodiésel es una alternativa más limpia, renovable y sostenible al diésel convencional, con varias ventajas en términos de impacto ambiental, seguridad y eficiencia del motor. (Morrison, 2023)

### 2.1.3 Biodiésel en Bolivia

En Bolivia, el biodiésel se produce principalmente a partir de aceite vegetal, como aceite de soja o aceite de palma. La calidad del aceite de origen y su preparación pueden afectar la calidad del biodiésel final. Además, el proceso de producción del biodiésel debe cumplir con los estándares técnicos y de calidad adecuados para asegurar un producto final de calidad.

Es importante mencionar que existen normas internacionales de calidad para el biodiésel, como la norma EN 14214 de la Unión Europea o la ASTM D6751 de los Estados Unidos. Estas normas establecen requisitos técnicos y de calidad para el biodiésel, incluyendo especificaciones para la composición química, el contenido de agua y sedimentos, y el punto de inflamación, entre otros.

La norma EN 14214 de la Unión Europea establece las especificaciones técnicas para el biodiésel que se utiliza como combustible para motores diésel. Entre las principales especificaciones de calidad para el biodiésel según esta norma se encuentran:

**Tabla 1. Propiedades del biodiésel**

| Propiedad                      | Unidad | Límite |
|--------------------------------|--------|--------|
| Contenido de ésteres           | % m/m  | ≥ 96,5 |
| Contenido de metanol           | % m/m  | ≤ 0,2  |
| Contenido de glicerina         | % m/m  | ≤ 0,2  |
| Contenido de agua y sedimentos | % m/m  | ≤ 0,05 |

|                              |                    |           |
|------------------------------|--------------------|-----------|
| Contenido de cenizas         | % m/m              | ≤ 0,02    |
| Contenido de azufre          | mg/kg              | ≤ 10      |
| Viscosidad cinemática a 40°C | mm <sup>2</sup> /s | 3,5 - 5,0 |
| Punto de inflamación         | °C                 | ≥ 101     |
| Ceniza sulfatada             | % m/m              | ≤ 0,02    |
| Contenido de fósforo         | mg/kg              | ≤ 10      |
| Contenido de cloro           | mg/kg              | ≤ 10      |
| Oxidación potencial          | mg/kg              | ≤ 0,8     |

Fuente: Norma EN 14214 de la Unión Europea

Estas especificaciones establecidas en la norma EN 14214 garantizan que el biodiésel producido cumpla con ciertos estándares de calidad que aseguran su compatibilidad con los motores diésel y su uso seguro y efectivo como combustible. Es importante mencionar que en algunos países pueden existir regulaciones y normas específicas para el biodiésel, que pueden variar de la norma EN 14214 de la Unión Europea. (UNE-EN 14214, 2018)

## 2.2 Microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares que se encuentran en una gran variedad de ambientes acuáticos, desde los océanos hasta los lagos y ríos, e incluso en aguas residuales. Estos organismos son muy importantes en los ecosistemas acuáticos, ya que son la base de la cadena alimentaria y proporcionan oxígeno a través de la fotosíntesis.

Además de su importancia ecológica, las microalgas tienen un gran potencial para aplicaciones industriales y biotecnológicas. Algunas de las aplicaciones más comunes de las microalgas son:

- Producción de biocombustibles: Las microalgas contienen altas cantidades de lípidos que pueden ser convertidos en biocombustibles como el biodiésel.

- Alimentación animal y acuicultura: Las microalgas son una fuente rica de nutrientes como proteínas, carbohidratos, lípidos y vitaminas, lo que las convierte en un alimento valioso para animales y peces en la acuicultura.
- Suplementos dietéticos: Algunas especies de microalgas contienen compuestos bioactivos como antioxidantes, ácidos grasos omega-3 y pigmentos naturales como la clorofila y la astaxantina, que pueden tener beneficios para la salud humana.
- Tratamiento de aguas residuales: Las microalgas pueden ser utilizadas para eliminar nutrientes como el nitrógeno y el fósforo de las aguas residuales, lo que las convierte en una herramienta valiosa para el tratamiento de aguas.
- Producción de cosméticos: Los pigmentos y compuestos bioactivos presentes en algunas especies de microalgas pueden ser utilizados en la producción de cosméticos y productos para el cuidado de la piel.

Las microalgas son un grupo diverso de organismos que incluye miles de especies diferentes. Algunas de las especies más conocidas son la espirulina, la Chlorella, la Dunaliella y la Haematococcus. Estas especies se caracterizan por su capacidad para crecer rápidamente en condiciones de luz y nutrientes adecuados. (Céspedes, 2015)

### **2.2.1 Especies de microalgas para la producción de biodiésel**

El contenido de lípidos de las microalgas depende de su especie y de las condiciones de cultivo, aunque el contenido de lípidos puede variar entre un 5 % y un 80 % en peso de masa seca, dependiendo de condiciones como, por ejemplo, el estrés, ya que las microalgas tienen capacidad para sobrevivir en condiciones diversas y extremas que se reflejan, muchas veces, en un inusual patrón de lípidos celulares que puede llegar a aumentar hasta en un 90 % en ambientes estresados. En estos se realiza un control biosintético de la composición química por estrés nutricional por deficiencia de nitrógeno, fósforo, azufre y silicio o estrés ambiental por cambios ambientales tales como la salinidad y el Ph del medio de cultivo, la temperatura y la intensidad luminosa. La deficiencia de nitrógeno es, con respecto a los nutrientes, el factor que más afecta el metabolismo de los lípidos.

Las microalgas también contienen proteínas y carbohidratos que se extraen para la producción de etanol, otro biocombustible. En la tabla 2 se muestran algunas de las especies de microalgas que mayor número de estudios reportan junto con los porcentajes en materia seca de lípidos, proteínas y carbohidratos; además estas microalgas tienen la capacidad de crecer de manera rápida y acumular largas cadenas de lípidos naturales en el interior de sus células.

**Tabla 2. Especies representativas de microalgas y sus porcentajes en materia seca de lípidos, proteínas y carbohidratos**

| <b>MICROALGAS</b>         | <b>LÍPIDOS (%)</b> | <b>PROTEÍNA (%)</b> | <b>CARBOHIDRATOS (%)</b> |
|---------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| Anabaena cylindrica       | 4-7                | 43-56               | 25-30                    |
| Aphanizomenon fl os-aquae | 3                  | 62                  | 23                       |
| Arthrospira maxima        | 6-7                | 60-71               | 13-16                    |
| Botryococcus braunii      | 15-80              | 4                   | 20                       |
| Chlamydomonas reinhardii  | 21                 | 48                  | 17                       |
| Chlorella ellipsoidea     | 84                 | 5                   | 16                       |
| Chlorella pyrenoidosa     | 2                  | 57                  | 26                       |
| Chlorella sorokiniana     | 20-36              | 21-53               | 5-25                     |
| Chlorella Vulgaris        | 5-58               | 51-58               | 12-17                    |
| Dunaliella salina         | 6                  | 57                  | 32                       |
| Dunaliella bioculata      | 8                  | 49                  | 4                        |
| Euglena gracilis          | 14-20              | 39-61               | 14-18                    |
| Prymnesium parvum         | 22-38              | 30-45               | 25-33                    |
| Porphyridium cruentum     | 9-14               | 28-39               | 40-57                    |
| Scenedesmus obliquus      | 12-14              | 50-56               | 10-17                    |
| Scenedesmus quadricauda   | 1,9                | 47                  | -                        |
| Scenedesmus dimorphus     | 16-40              | 6-18                | 21-52                    |
| Spirulina maxima          | 6-7                | 60-71               | 13-16                    |
| Spirogyra sp.             | 11-21              | 6-20                | 33-64                    |
| Spirulina platensis       | 4-9                | 46-63               | 8-14                     |
| Synechococcus sp.         | 11                 | 63                  | 15                       |
| Tetraselmis maculata      | 3                  | 52                  | 15                       |

Fuente. Adaptada al (Milano, 2016).

La especie *Botryococcus braunii*, posee el mayor porcentaje de lípidos. Esta especie cuenta con un contenido de hidrocarburos que varía entre 15-80 % (Milano et al., 2016). Los lípidos éter e hidrocarburos de cadena larga se acumulan en la matriz extracelular, sin embargo, la gran capacidad de esta especie de absorber CO<sub>2</sub> en grandes cantidades, lo que acelera su crecimiento poblacional (Villarreal & Kafarov, 2015)

### **2.2.1.1 Microalga oleaginosa**

Las microalgas oleaginosas requieren para su desarrollo factores ambientales tales como luz, pH, salinidad, temperatura y concentración de nitrógeno. Este tipo de algas poseen capacidad de almacenamiento de triglicéridos gracias a sus características fotobiosintéticas. Son capaces de fijar CO<sub>2</sub> con el fin de producir diversas sustancias de valor industrial. De igual modo, frente a los cambios de condiciones ambientales responden con cambios al metabolismo de los lípidos. Así, por ejemplo, producciones de microalgas sin nitrógeno disponible resultan en mayores tasas de producción de lípidos por producción de mayor biomasa seca. (Kiran, Pathak, Kumar, & Deshmukh, 2016); (Praveenkumar, Shameera, Mahalakshmi, Akbarsha, & Thajuddin, 2012)

### **2.2.2 Microalga Chlorrella Vulgaris**

La microalga *Chlorella Vulgaris* es un organismo unicelular fotosintético que se encuentra en ambientes acuáticos dulces y salados. Es un alga verde que se caracteriza por su alta capacidad de crecimiento y reproducción, así como por su capacidad de acumular grandes cantidades de proteínas, lípidos y otros compuestos beneficiosos.

**Figura 1. Microalga Chlorella Vulgaris**



Fuente: Wikipedia

La *Chlorella Vulgaris* es una fuente valiosa de nutrientes y puede ser utilizada en una amplia variedad de aplicaciones, desde la producción de alimentos hasta la medicina. En este ensayo, exploraremos algunas de las propiedades y aplicaciones de la *Chlorella Vulgaris*, así como los beneficios y desafíos asociados con su uso. (Gómez Luna, Cedeño Tormos, & Díaz Ortega, 2012)

### **2.2.2.1 Propiedades y composición de la *Chlorella Vulgaris***

Las propiedades físicas de la microalga *Chlorella Vulgaris* pueden variar según las condiciones de cultivo, pero en general, se pueden mencionar las siguientes:

1. **Tamaño y forma:** *Chlorella Vulgaris* es una microalga unicelular que tiene forma elipsoidal o esférica. Su tamaño promedio es de 2 a 10 micrómetros de diámetro. (Richmond A. , 2004)
2. **Color:** *Chlorella Vulgaris* es de color verde oscuro debido a la presencia de clorofila en su estructura celular. (Barsanti & Gualtieri, 2007)
3. **Densidad:** La densidad de *Chlorella Vulgaris* puede variar según las condiciones de cultivo, pero se estima que su densidad es de alrededor de 1 g/cm<sup>3</sup>. (Becker, 1994)
4. **Composición química:** *Chlorella Vulgaris* contiene una variedad de compuestos químicos, incluyendo proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales y pigmentos fotosintéticos como clorofila y carotenoides. (Gouveia & Oliveira, 2009)
5. **Superficie celular:** La superficie celular de *Chlorella Vulgaris* es lisa y está cubierta por una pared celular rígida compuesta principalmente por celulosa y quitina. (Becker, 1994)

Estas propiedades físicas pueden influir en el rendimiento y la calidad de la microalga en aplicaciones como la producción de biocombustibles o como suplemento alimenticio. Además, el conocimiento de estas propiedades es esencial para su cultivo y manipulación en el laboratorio.

### **2.2.2.2 Composición química**

La composición química de la microalga *Chlorella Vulgaris* puede variar según las condiciones de cultivo, pero en general, se puede mencionar la siguiente composición detallada:

1. **Proteínas:** Es una fuente rica en proteínas, que pueden representar hasta el 60-70% del peso seco de la microalga. Las proteínas de *Chlorella Vulgaris* son de alta calidad y contienen todos los aminoácidos esenciales. (Pérez, 2017)
2. **Lípidos:** Contiene lípidos en cantidades variables, que pueden representar del 10 al 20% del peso seco de la microalga. Los lípidos de *Chlorella Vulgaris* son principalmente triglicéridos y ácidos grasos poliinsaturados, como ácido linoleico y ácido  $\alpha$ -linolénico. (Xue, y otros, 2020)
3. **Carbohidratos:** Contiene carbohidratos en cantidades variables, que pueden representar del 10 al 20% del peso seco de la microalga. Los carbohidratos de *Chlorella Vulgaris* son principalmente polisacáridos, como la celulosa y la glucosa. (Xue, y otros, 2020)
4. **Vitaminas:** Es una fuente rica en vitaminas, incluyendo vitamina A, vitamina C, vitamina E, vitamina K y vitaminas del complejo B. (Xue, y otros, 2020)
5. **Minerales:** Contiene una variedad de minerales, incluyendo hierro, calcio, magnesio, zinc y selenio. (Pérez, 2017)
6. **Pigmentos:** Contiene pigmentos fotosintéticos, como clorofila y carotenoides, que pueden tener propiedades antioxidantes y beneficios para la salud. (Pérez, 2017)

### **2.2.2.3 Aplicaciones de la *Chlorella Vulgaris***

La *Chlorella Vulgaris* tiene una amplia variedad de aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y de la biotecnología. (Suarez, 2020)

A continuación, se presentan algunas de las aplicaciones más comunes de esta microalga:

- Suplementos dietéticos: Se utiliza como un suplemento dietético debido a su alto contenido de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales. Estos suplementos pueden estar disponibles en forma de tabletas, cápsulas o polvo.
- Alimentación animal: Se utiliza como alimento para animales de granja, acuicultura y mascotas debido a su alto contenido de nutrientes. Los estudios han demostrado que la Chlorella puede mejorar la salud y el rendimiento de los animales.
- Producción de alimentos: Se utiliza en la producción de alimentos debido a su alto contenido de proteínas y otros nutrientes. Se ha utilizado en la producción de productos alimenticios como sopas, salsas, pan y galletas.
- Biotecnología: Se utiliza en la biotecnología para producir proteínas recombinantes, biofármacos y otros productos de alto valor añadido.

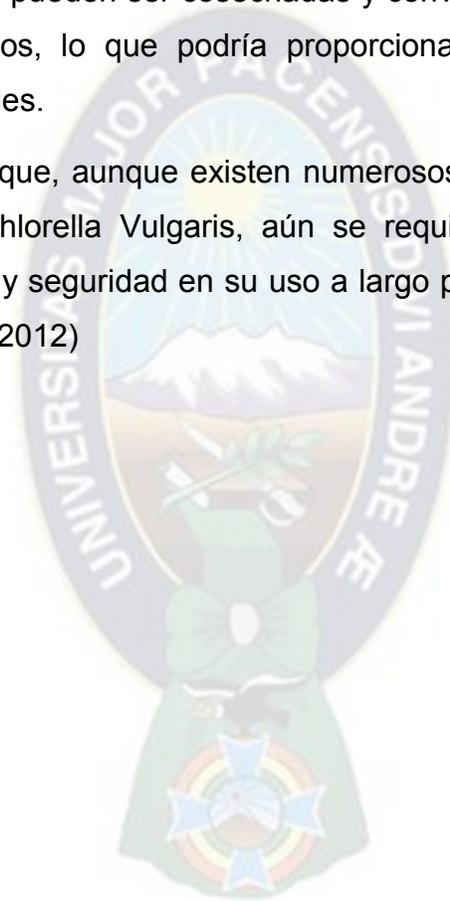
#### **2.2.2.4 Ventajas de la microalga Chlorrella Vulgaris**

La microalga Chlorella Vulgaris tiene varias ventajas potenciales, incluyendo:

1. Fuente de nutrientes: Chlorella Vulgaris es una fuente rica en nutrientes, incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales. Debido a esto, se ha investigado como un posible suplemento alimenticio para mejorar la nutrición.
2. Propiedades antioxidantes: Chlorella Vulgaris contiene compuestos antioxidantes que pueden ayudar a prevenir el daño celular causado por los radicales libres en el cuerpo.
3. Potencial para la producción de biocombustibles: Debido a su capacidad para acumular lípidos, Chlorella Vulgaris es una posible fuente de biocombustibles renovables.
4. Propiedades medicinales: Algunas investigaciones han demostrado que Chlorella Vulgaris puede tener propiedades antiinflamatorias, hipoglucemiantes y antitumorales, lo que la convierte en un posible agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades.

5. Potencial para la eliminación de contaminantes: Debido a su capacidad para acumular metales pesados, *Chlorella Vulgaris* es un posible agente para la eliminación de contaminantes del agua y del suelo.
6. Las microalgas absorben el CO<sub>2</sub> a través de la fotosíntesis, y lo utilizan para su crecimiento y desarrollo. Durante este proceso, las microalgas también producen oxígeno, lo que puede ayudar a reducir la contaminación del aire en las cercanías de las plantas de gas. Además, una vez que las microalgas han absorbido el CO<sub>2</sub>, pueden ser cosechadas y convertidas en biocombustibles o productos químicos, lo que podría proporcionar una fuente sostenible de energía y materiales.

Es importante destacar que, aunque existen numerosos estudios que apoyan estas posibles ventajas de *Chlorella Vulgaris*, aún se requiere más investigación para confirmar su efectividad y seguridad en su uso a largo plazo. (Gómez Luna, Cedeño Tormos, & Díaz Ortega, 2012)



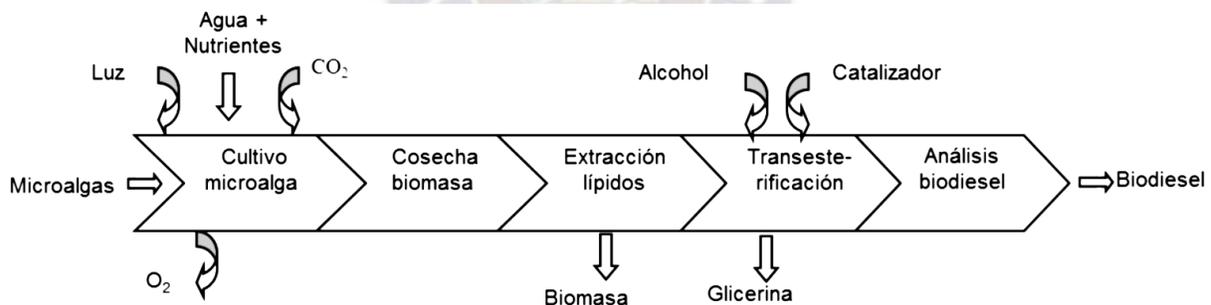
# CAPÍTULO 3. ESTUDIO DEL PROCESO DE CULTIVO DE LA MICROALGA CHLORRELLA VULGARIS PARA LA PRODUCCIÓN EFICIENTE DE LÍPIDOS CON FINES DE OBTENCIÓN DE BIODIÉSEL

## 3.1 MICROALGAS

### 3.1.1 Esquema de una biorrefinería integrada para la utilización de biomasa de microalgas

El término biorrefinería se origina a partir de la idea de una refinería convencional de petróleo crudo que toma material sin procesar y lo somete a un proceso de refinamiento para producir una variedad de combustibles y materiales petroquímicos altamente valorados en el mercado. De manera similar, una biorrefinería de microalgas es un sistema integrado que combina procesos para generar biocombustibles y otros productos de valor agregado mientras se asegura de que los materiales residuales se devuelvan al ciclo productivo o al medio ambiente sin causar impactos negativos.

**Figura 2. Esquema general de una Biorrefinería para producción de biodiésel a partir de microalgas.**



Fuente: Recuperada de (Villanueva, 2013)

En una biorrefinería de microalgas, las microalgas se cultivan y se someten a procesos de extracción y transformación para producir biocombustibles y otros productos de valor agregado. Los residuos y subproductos generados durante el proceso se pueden reciclar y reutilizar en el sistema para minimizar los impactos ambientales y maximizar la eficiencia del proceso.

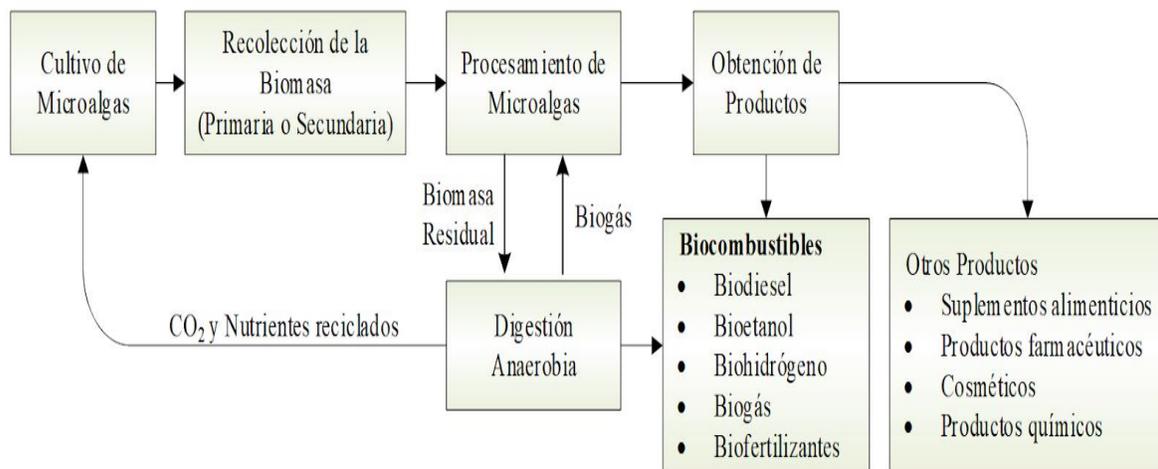
En definitiva, las biorrefinerías de microalgas son sistemas integrados que aprovechan la capacidad de las microalgas para producir biomasa y compuestos de interés con la finalidad de generar productos valiosos y sostenibles, al mismo tiempo que minimizan los impactos ambientales y promueven la economía circular.

Una biorrefinería de *Chlorella Vulgaris* para la obtención de biodiésel implicaría diversos procesos para aprovechar al máximo los componentes de esta microalga. A continuación, se presenta un esquema básico de los pasos involucrados en la producción de biodiésel a partir de *Chlorella Vulgaris*:

1. Cultivo de *Chlorella Vulgaris*: Las microalgas se cultivan en fotobiorreactores o estanques abiertos, utilizando luz solar, CO<sub>2</sub> y nutrientes. El objetivo es optimizar las condiciones de crecimiento para maximizar la producción de biomasa y el contenido de lípidos.
2. Cosecha de biomasa: Una vez que las microalgas alcanzan la densidad óptima, se cosechan utilizando técnicas como la centrifugación, la flotación o la filtración. El objetivo es separar las células de microalgas del medio de cultivo.
3. Secado: La biomasa cosechada se seca para reducir el contenido de humedad. Esto se puede realizar utilizando secadores solares, secadores de spray o secadores convectivos, entre otros métodos.
4. Extracción de lípidos: Los lípidos se extraen de la biomasa seca mediante técnicas como la extracción con solventes, la extracción con ultrasonido, la extracción con fluidos supercríticos o la extracción con enzimas. El objetivo es obtener la mayor cantidad posible de lípidos para la producción de biodiésel.
5. Conversión de lípidos en biodiésel: Los lípidos extraídos se convierten en biodiésel mediante un proceso llamado transesterificación. En este proceso, los lípidos reaccionan con un alcohol (generalmente metanol o etanol) en presencia de un catalizador (ácido, básico o enzimático) para formar ésteres metílicos o etílicos de ácidos grasos, que constituyen el biodiésel.
6. Purificación del biodiésel: El biodiésel se purifica para eliminar subproductos, como el glicerol, y cumplir con las especificaciones de calidad. Esto puede implicar lavado con agua, filtración, destilación o tratamientos con adsorbentes.

7. Aprovechamiento de coproductos: Los subproductos generados en los distintos pasos del proceso, como el glicerol, los restos de biomasa y los nutrientes, pueden ser aprovechados para la producción de otros productos de valor agregado, como piensos, fertilizantes, productos químicos o energía. (Villanueva, 2013)

**Figura 3. Esquema general de la biorrefinería para la utilización de biomasa algal.**



Fuente: Revista ingeniería e investigación (Mamani, 2023).

Este esquema es solo una descripción general de la producción de biodiésel a partir de *Chlorella Vulgaris*. Las condiciones y métodos específicos pueden variar según la tecnología y la escala de la biorrefinería. (Mamani, 2023)

### 3.1.2 Recolección y selección de microalgas

La recolección y selección de microalgas en un lago se realiza generalmente en varias etapas. A continuación, se detallan algunos de los métodos más comunes y efectivos utilizados:

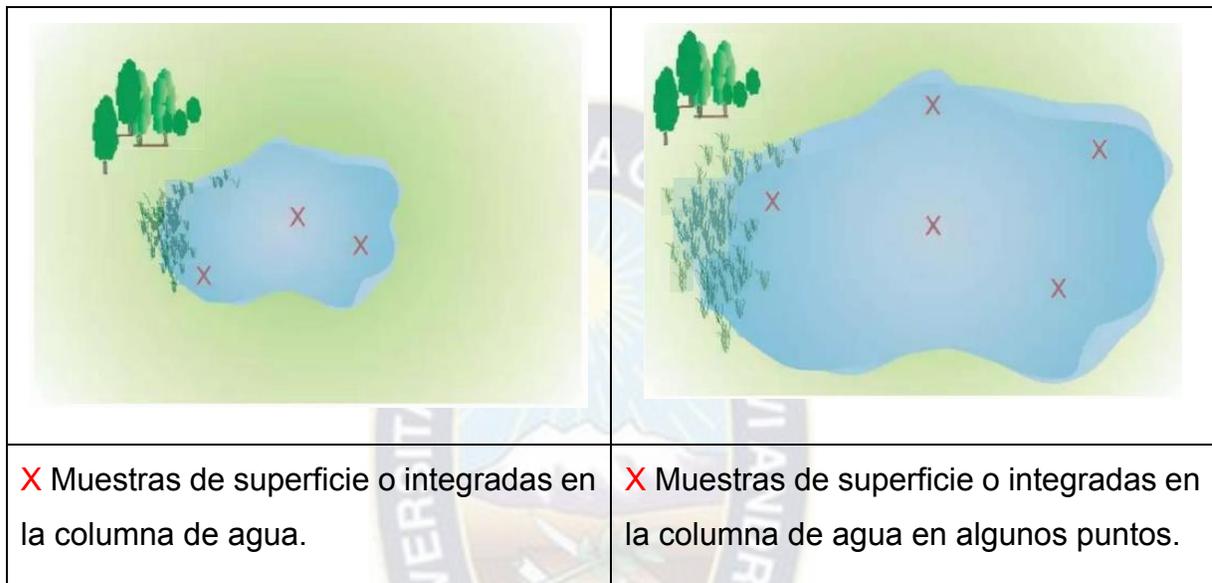
#### 3.1.2.1 Muestreo

El primer paso en la recolección de microalgas es obtener una muestra del agua del lago que contenga la población de interés. Es importante tomar muestras de varias

profundidades y ubicaciones para tener una representación adecuada de las condiciones del lago y la diversidad de microalgas.

**Número de muestras:** Variable según la superficie y morfología de la masa de agua. En general entre 1 - 3 (lagos pequeños, < 50 ha) y 3 - 5 (lagos grandes, > 50 ha).

**Figura 4. Masas de agua accesibles y no accesibles poco profundas.**



Fuente: Adaptada a (Vicente, Hoyos, Sánchez, & Cambra, 2005)

Tomar la muestra integrada mediante un tubo de plástico 20 mm aprox. de diámetro, y de longitud prefijada. Alternativamente, se pueden mezclar volúmenes iguales de muestras tomadas con botella hidrográfica en diferentes niveles (Vicente, Hoyos, Sánchez, & Cambra, 2005).

### 3.1.2.2 Filtración y concentración

Las muestras de agua recolectadas se pasan a través de filtros de malla fina o membranas para retener las microalgas. Los filtros pueden tener poros de diferentes tamaños para recolectar microalgas de distintos tamaños. El filtrado se realiza hasta que se obtiene una concentración adecuada de microalgas para su posterior análisis y selección.

### **3.1.2.3 Identificación y cuantificación**

Una vez filtradas y concentradas, las microalgas se identifican y cuantifican utilizando microscopios ópticos o electrónicos. En algunos casos, se emplean técnicas de tinción para resaltar características específicas de las microalgas, como la clorofila, que facilitan su identificación. También se pueden utilizar técnicas de análisis de imágenes y software especializado para contar y clasificar las células de microalgas presentes en la muestra.

### **3.1.2.4 Aislamiento y selección**

Después de identificar y cuantificar las microalgas presentes en las muestras, se seleccionan las especies de interés para su cultivo o estudio. Algunos métodos de aislamiento incluyen:

1) Aislamiento por dilución:

Se realizan diluciones seriadas de la muestra y se cultivan en placas de Petri con medios de cultivo específicos. Las colonias de microalgas que crecen en las placas se aíslan y se identifican como una única especie.

2) Aislamiento por micro manipulación:

Se utiliza un microscopio y una micropipeta para seleccionar y recoger individualmente las células de una especie específica de microalgas.

### **3.1.2.5 Cultivo y mantenimiento**

Una vez aisladas, las microalgas seleccionadas se cultivan en condiciones controladas (temperatura, luz, pH y nutrientes) en laboratorio o en fotobiorreactores. Se realiza un seguimiento del crecimiento y la salud de las microalgas para asegurar la viabilidad y la pureza del cultivo.

Estos métodos de recolección y selección de microalgas han sido utilizados con éxito en estudios ecológicos, biotecnológicos y acuícolas, entre otros. La elección del método específico dependerá del objetivo del estudio y de los recursos disponibles.

### **3.1.2.6 Cómo identificar Chlorella Vulgaris: Observación microscópica y características morfológicas específicas.**

Chlorella Vulgaris es una microalga verde unicelular que pertenece a la clase Trebouxiophyceae. Para identificar Chlorella Vulgaris en una muestra, se pueden seguir los siguientes pasos y buscar características físicas específicas:

#### **3.1.2.6.1 Preparación de la muestra.**

Concentra las microalgas de la muestra utilizando métodos de filtración, como se mencionó en la respuesta anterior.

#### **3.1.2.6.2 Observación al microscopio**

Utiliza un microscopio óptico con un aumento adecuado (generalmente entre 100x y 400x) para observar las células de microalgas en la muestra.

#### **3.1.2.6.3 Características morfológicas**

Busca las siguientes características físicas típicas de Chlorella Vulgaris:

- a) Tamaño: Las células de Chlorella Vulgaris son generalmente esféricas o elipsoidales, y su tamaño varía entre 2 y 10 micrómetros de diámetro.
- b) Color: Chlorella Vulgaris es una microalga verde debido a la presencia de clorofila a y b en sus cloroplastos.
- c) Cloroplastos: Los cloroplastos en Chlorella Vulgaris son parietalmente dispersos y tienen forma de copa o cinta, aunque pueden ser difíciles de observar en células individuales debido a su pequeño tamaño.
- d) Núcleo: El núcleo está ubicado en el centro de la célula y, a menudo, está rodeado por los cloroplastos.
- e) Reproducción: Chlorella Vulgaris se reproduce asexualmente por división celular, formando 2, 4 u 8 células hijas dentro de la célula madre. Estas células hijas pueden ser observadas en distintas etapas de desarrollo dentro de la célula madre.

### **3.1.3 Biomasa microalgal**

La biomasa microalgal es el resultado de la concentración de células de microalgas después de su recolección. Esta biomasa se utiliza en diversas aplicaciones, como la producción de alimentos, piensos, productos químicos, bioplásticos y bioenergía. Después de recolectar la biomasa microalgal, hay una serie de pasos que se deben seguir para su procesamiento y utilización:

Concentración: Después de la recolección, la biomasa microalgal se concentra para aumentar su contenido de sólidos y reducir el volumen de agua. Esto se puede lograr mediante sedimentación, filtración, centrifugación o flotación por aire disuelto.

### **3.1.4 Floculación**

La floculación de microalgas es un proceso de agrupación de células de microalgas en grupos más grandes, conocidos como flóculos o agregados, que se forman mediante la adhesión entre las células individuales. Este proceso puede ocurrir de manera natural o puede ser inducido mediante la adición de ciertos productos químicos o cambios en las condiciones de cultivo. La floculación de microalgas tiene varios beneficios, como mejorar la eficiencia de la cosecha de microalgas, aumentar la densidad de biomasa y facilitar la separación del agua de cultivo, lo que reduce los costos de procesamiento y mejora la calidad del producto final. La floculación de microalgas también se utiliza en aplicaciones industriales, como la producción de biocombustibles, productos químicos y alimentos para animales (Lujan, 2019).

Existen diferentes métodos para la floculación de microalgas, algunos de ellos son:

#### **3.1.4.1 Floculación natural**

En este método, la floculación ocurre de manera natural en las condiciones de cultivo adecuadas. Algunas especies de microalgas son naturalmente propensas a la floculación, y se pueden cultivar en medios con alta concentración de nutrientes y bajo agitación para favorecer la formación de flóculos (Lujan, 2019).

#### **3.1.4.2 Floculación química**

En este método, se añade un coagulante o floculante químico al medio de cultivo para inducir la floculación de las microalgas. Los coagulantes o floculantes más comunes son sales metálicas como el sulfato de aluminio, cloruro férrico y sulfato ferroso (Lujan, 2019).

#### **3.1.4.3 Floculación por flotación**

En este método, se utiliza aire para inducir la floculación y separación de las microalgas. El aire se inyecta en el fondo del tanque de cultivo, lo que hace que las microalgas suban a la superficie y formen flóculos (Lujan, 2019).

Para mejorar el proceso de floculación, se pueden utilizar aditivos químicos como polímeros orgánicos y surfactantes. Estos aditivos pueden aumentar la eficacia de la floculación al mejorar la formación y estabilidad de los flóculos, y reducir la cantidad de coagulante o floculante necesarios. También se pueden ajustar las condiciones de cultivo, como la temperatura, pH y concentración de nutrientes, para favorecer la floculación de las microalgas. Es importante tener en cuenta que el tipo de aditivo químico y las condiciones de cultivo adecuados para la floculación pueden variar dependiendo de la especie de microalga utilizada y del objetivo del proceso de floculación.

#### **3.1.5 Deshidratación de la biomasa microalgal**

La biomasa concentrada se somete a un proceso de deshidratación para reducir aún más el contenido de agua. Esto puede realizarse mediante filtración a presión, secado por atomización, liofilización o secado solar, entre otros métodos.

El secado de la biomasa microalgal es una etapa crucial en la producción de microalgas, ya que permite la conservación y almacenamiento de la biomasa y reduce el volumen y peso de los productos para su almacenaje y transporte. Existen diferentes métodos de secado de biomasa microalgal, algunos de ellos son (Alibas, 2021):

### **3.1.5.1 Secado al sol**

Este método es uno de los más antiguos y económicos para secar la biomasa microalgal. Consiste en extender la biomasa sobre una superficie plana y expuesta a la luz solar directa hasta que se alcance un contenido de humedad adecuado.

### **3.1.5.2 Secado por aire caliente**

Este método utiliza aire caliente para secar la biomasa microalgal. Se puede realizar utilizando secadores de bandeja, secadores rotatorios o secadores de lecho fluidizado. El aire caliente se hace circular a través de la biomasa para evaporar la humedad.

### **3.1.5.3 Secado por liofilización**

Este método utiliza un proceso de sublimación para secar la biomasa microalgal. La biomasa se congela y luego se somete a vacío, lo que hace que la humedad se sublime en forma de vapor.

### **3.1.5.4 Secado por pulverización**

Este método utiliza una boquilla para pulverizar una solución de biomasa microalgal en una corriente de aire caliente. La solución se atomiza en partículas finas, lo que aumenta la superficie de evaporación y reduce el tiempo de secado.

En la producción a gran escala, se utilizan principalmente secadores por aire caliente y secadores por pulverización debido a su eficacia y eficiencia en la producción a gran escala. En cambio, en la producción a pequeña escala, el secado al sol puede ser una opción económica y viable. Cada método tiene ventajas y desventajas en términos de costo, eficiencia energética, calidad del producto, etc. Por lo tanto, la elección del método de secado depende de factores como el volumen de producción, la calidad del producto requerida, los recursos disponibles y la economía.

## **3.1.6 Productos únicos a partir de biomasa microalgal**

### **3.1.6.1 Extracción**

Dependiendo del uso final de la biomasa microalgal, se pueden realizar extracciones específicas para obtener compuestos de interés, como lípidos, proteínas,

carbohidratos, etanol, pigmentos (por ejemplo, clorofila, carotenoides) y compuestos bioactivos (como polisacáridos, esteroides y fenoles) (Mata T. M., 2010).

### **3.1.6.1.1 Lípidos**

La extracción de lípidos de microalgas se realiza mediante diferentes métodos, algunos de los cuales son:

#### **3.1.6.1.1.1 Extracción con solventes orgánicos**

Este método consiste en la disolución de los lípidos de las microalgas mediante el uso de solventes orgánicos, como cloroformo, metanol o hexano. La extracción se realiza mediante agitación mecánica o ultrasonido.

#### **3.1.6.1.1.2 Extracción por prensado**

Este método consiste en la aplicación de presión mecánica a la biomasa de microalgas para exprimir los lípidos. Es un método sencillo y económico, pero puede tener una eficacia de extracción limitada.

#### **3.1.6.1.1.3 Extracción con fluidos supercríticos**

Este método utiliza CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente para extraer los lípidos de la biomasa de microalgas. Es un método más caro y complejo que los anteriores, pero puede ofrecer una mayor eficacia de extracción y una mejor calidad del producto.

#### **3.1.6.1.1.4 Eficiencia**

El contenido de lípidos y la eficiencia de extracción pueden variar según el método utilizado y las condiciones de cultivo. Además, es importante considerar los impactos ambientales y económicos de la extracción de lípidos de microalgas y asegurarse de que los procesos sean sostenibles y eficientes en términos de recursos y energía utilizados.

La elección del método de extracción de lípidos de microalgas para la obtención de biodiésel depende de muchos factores, como el contenido de lípidos en la biomasa, la calidad del producto final deseado, la disponibilidad de recursos y la economía.

Los métodos de extracción con solventes orgánicos como el cloroformo o el hexano son más eficientes para la extracción de lípidos de microalgas. Sin embargo, estos métodos pueden ser más costosos debido al alto costo de los solventes orgánicos y a los riesgos ambientales asociados con su uso (Salunkhe, 1992).

Por otro lado, la extracción por prensado puede ser una opción más económica, ya que no requiere el uso de solventes orgánicos costosos. Sin embargo, este método puede tener una eficiencia de extracción más limitada y puede requerir la utilización de prensas y equipos especializados.

En cuanto a la producción de biodiésel, la extracción de lípidos de microalgas mediante fluidos supercríticos de CO<sub>2</sub> se ha considerado como una opción más prometedora debido a su alta eficiencia de extracción y a su menor impacto ambiental. Sin embargo, este método es el más costoso y requiere una inversión inicial significativa en equipos y tecnología.

#### **3.1.6.1.2 Proteínas, carbohidratos, etanol y pigmentos de microalgas**

La extracción de proteínas, carbohidratos, etanol y pigmentos de microalgas puede ser una alternativa atractiva para la producción de bioproductos. Algunos métodos de extracción de estos compuestos son:

##### **3.1.6.1.2.1 Extracción de proteínas**

La extracción de proteínas se puede realizar mediante diferentes métodos, como la extracción con solventes orgánicos, la precipitación con sales y la extracción por ultrasonido. La elección del método dependerá del tipo de proteína a extraer y de la calidad y cantidad de proteínas que se necesiten.

##### **3.1.6.1.2.2 Extracción de carbohidratos**

La extracción de carbohidratos se puede realizar mediante métodos como la hidrólisis enzimática y la extracción por ultrasonido. La elección del método dependerá del tipo de carbohidrato a extraer y de la calidad y cantidad de carbohidratos que se necesiten.

#### **3.1.6.1.2.3 Extracción de etanol**

La extracción de etanol se puede realizar mediante métodos como la destilación y la fermentación. La elección del método dependerá de la cantidad de etanol que se necesita y de la disponibilidad de recursos.

#### **3.1.6.1.2.4 Extracción de pigmentos**

La extracción de pigmentos se puede realizar mediante diferentes métodos, como la extracción con solventes orgánicos y la extracción por ultrasonido. La elección del método dependerá del tipo de pigmento a extraer y de la calidad y cantidad de pigmentos que se necesiten.

#### **3.1.6.2 Conversión**

La biomasa microalgal se puede convertir en productos útiles mediante diversos procesos, como la fermentación (para la producción de biogás, etanol o ácidos orgánicos), la transesterificación (para la producción de biodiésel), la hidrólisis enzimática (para la producción de azúcares simples y aminoácidos) o la pirólisis (para la producción de bio-aceite y biocarbón).

##### **3.1.6.2.1 Fermentación**

La fermentación de microalgas es un proceso biotecnológico que utiliza microorganismos, como bacterias o levaduras, para descomponer y transformar los compuestos de la biomasa de microalgas en otros productos útiles, como biocombustibles, productos químicos o alimentos para animales (Chisti, 2007).

La fermentación de microalgas puede realizarse mediante diferentes métodos, algunos de los cuales son:

###### **3.1.6.2.1.1 Fermentación anaerobia**

Este método utiliza microorganismos que no requieren oxígeno para su metabolismo. La fermentación anaerobia se utiliza comúnmente para producir biogás a partir de la biomasa de microalgas.

#### **3.1.6.2.1.2 Fermentación aerobia**

Este método utiliza microorganismos que requieren oxígeno para su metabolismo. La fermentación aerobia se utiliza para producir productos como ácido láctico, etanol y otros bioproductos.

#### **3.1.6.2.1.3 Fermentación en estado sólido**

Este método se realiza con la biomasa de microalgas en estado sólido, por ejemplo, después del secado. Se pueden agregar microorganismos y otros nutrientes a la biomasa para producir compuestos de interés.

#### **3.1.6.2.1.4 Fermentación en estado líquido**

Este método utiliza una suspensión líquida de microalgas para la producción de productos fermentados. Se pueden agregar microorganismos y otros nutrientes a la suspensión para producir compuestos de interés.

#### **3.1.6.2.2 Transesterificación**

La transesterificación de microalgas es un proceso químico que se utiliza para convertir los lípidos de las microalgas en biodiésel. La transesterificación implica la reacción de los lípidos con un alcohol, generalmente metanol o etanol, y un catalizador, como hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, para producir ésteres metílicos o etílicos de ácidos grasos, que son los componentes principales del biodiésel (Mata, Martins, & Caetano, 2010).

La transesterificación de microalgas puede realizarse mediante diferentes métodos, algunos de los cuales son:

##### **3.1.6.2.2.1 Transesterificación homogénea**

Este método utiliza un catalizador soluble en el medio de reacción. La reacción se lleva a cabo en una mezcla de lípidos, alcohol y catalizador, que se agita y se calienta a una temperatura adecuada para la reacción. Después de la reacción, se separa el biodiésel del glicerol y el catalizador.

#### **3.1.6.2.2.2 Transesterificación heterogénea**

Este método utiliza un catalizador insoluble en el medio de reacción. Los lípidos se mezclan con el alcohol y el catalizador en un reactor, y la reacción se lleva a cabo en condiciones adecuadas de temperatura y agitación. Después de la reacción, se separa el biodiésel del catalizador y el glicerol.

#### **3.1.6.2.2.3 Transesterificación enzimática**

Este método utiliza enzimas lipasas como catalizadores para la reacción de los lípidos con el alcohol. Las enzimas lipasas son biocatalizadores altamente específicos y pueden trabajar en condiciones suaves, lo que reduce los costos de producción y la generación de subproductos no deseados.

La elección del método de transesterificación dependerá de factores como el costo, la eficiencia y la calidad del producto final deseado. En general, la transesterificación homogénea es la más utilizada a nivel industrial debido a su eficacia y eficiencia en la producción de biodiésel. Sin embargo, los métodos heterogéneos y enzimáticos también son opciones prometedoras debido a sus ventajas ambientales y económicas.

#### **3.1.6.2.3 Hidrólisis enzimática y pirólisis**

La hidrólisis enzimática y el pirólisis son procesos que se pueden utilizar para la conversión de la biomasa de microalgas en productos útiles.

##### **3.1.6.2.3.1 La hidrólisis enzimática**

Es un proceso que utiliza enzimas para descomponer la biomasa de microalgas en sus componentes básicos, como carbohidratos y proteínas. Este proceso puede ser útil para la producción de biocombustibles y productos químicos a partir de los componentes de la biomasa de microalgas. La hidrólisis enzimática puede ser realizada con diferentes tipos de enzimas, como celulasas y hemicelulasas, y se puede llevar a cabo en condiciones suaves y bajo consumo de energía (Harun, Singh, & Forde, 2010).

### **3.1.6.2.3.2 Pirólisis**

Es un proceso que utiliza calor en ausencia de oxígeno para descomponer la biomasa de microalgas en productos útiles, como gases, líquidos y sólidos. El pirólisis puede producir bioaceites, gas y carbón, que se pueden utilizar para la producción de biocombustibles y productos químicos. El pirólisis también puede utilizarse para la eliminación de residuos de la biomasa de microalgas, lo que puede reducir la cantidad de residuos que deben ser eliminados y mejorar la sostenibilidad del proceso de producción (Milne, Evans, & Nagle, 1990).

## **3.2 Fotosíntesis**

La fotosíntesis es un proceso bioquímico en el que las plantas y las microalgas utilizan la energía de la luz solar para convertir el dióxido de carbono y el agua en compuestos orgánicos, como carbohidratos y lípidos, liberando oxígeno como subproducto. La fotosíntesis es un proceso clave en la producción de biomasa en las microalgas, y su tasa y eficiencia están influenciadas por factores como la luz, la temperatura, el dióxido de carbono y los nutrientes. La comprensión de estas características y detalles es importante para la optimización del crecimiento y la producción de microalgas (Blankenship, 2014). La fotosíntesis de las microalgas tiene algunas características y detalles importantes, como se describen a continuación:

### **3.2.1 Pigmentos fotosintéticos**

Las microalgas contienen pigmentos fotosintéticos, como la clorofila, que son los principales responsables de la captación de la energía solar y su conversión en energía química.

### **3.2.2 Luz y temperatura**

La fotosíntesis de las microalgas es influenciada por la intensidad y calidad de la luz, así como por la temperatura. Las microalgas tienen diferentes requerimientos de luz y temperatura según la especie y la fase del crecimiento.

En cuanto a la luz, se ha demostrado que la *Chlorella Vulgaris* crece mejor y realiza una fotosíntesis más eficiente en luz solar directa o luz artificial de alta intensidad. Sin

embargo, la exposición prolongada a la luz intensa puede dañar la microalga, especialmente en condiciones de alta temperatura. Por lo tanto, se recomienda proporcionar una iluminación adecuada y controlada, para evitar un exceso de luz que pueda afectar la eficiencia de la fotosíntesis.

En cuanto a la temperatura, se ha demostrado que la *Chlorella Vulgaris* crece mejor y realiza una fotosíntesis más eficiente a temperaturas moderadas, generalmente entre 25 y 35 grados Celsius. Sin embargo, la temperatura óptima puede variar según las condiciones específicas del cultivo y la cepa de microalga. Por lo tanto, se recomienda controlar cuidadosamente la temperatura del cultivo y mantenerla dentro de los rangos óptimos.

### **3.2.3 Fotoinhibición**

La exposición a altas intensidades de luz puede causar fotoinhibición en las microalgas, lo que reduce su tasa de fotosíntesis y puede dañar sus células.

### **3.2.4 CO<sub>2</sub> y nutrientes**

La fotosíntesis de las microalgas también depende de la disponibilidad de dióxido de carbono y nutrientes, como nitrógeno, fósforo y hierro.

#### **3.2.4.1 CO<sub>2</sub>**

La *Chlorella Vulgaris* utiliza un mecanismo de concentración de carbono, que le permite utilizar el dióxido de carbono presente en el aire de manera más eficiente. La concentración de carbono se produce en un orgánulo llamado pirenoide, donde se acumula el dióxido de carbono y se concentra alrededor de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO), que es responsable de la fijación del carbono.

La fotosíntesis de la *Chlorella Vulgaris* es un proceso esencial para su crecimiento y supervivencia, en el cual se utiliza la energía de la luz solar para producir energía química y sintetizar carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua. La eficiencia de la fotosíntesis en la *Chlorella Vulgaris* es optimizada por un mecanismo de

concentración de carbono, que le permite utilizar el dióxido de carbono de manera más eficiente (Sheng-Yi, 2009).

#### **3.2.4.2 Nutrientes**

Además del dióxido de carbono, la microalga *Chlorella Vulgaris* requiere otros nutrientes esenciales para su crecimiento y una mayor eficiencia en la fotosíntesis. Algunos de estos nutrientes son:

- **Nitrógeno:** El nitrógeno es un nutriente esencial para la síntesis de proteínas y clorofila en la *Chlorella Vulgaris*. Se puede proporcionar en forma de nitrato, amonio o urea.
- **Fósforo:** El fósforo es un nutriente esencial para la síntesis de ácidos nucleicos y ATP en la *Chlorella Vulgaris*. Se puede proporcionar en forma de fosfato.
- **Azufre:** El azufre es un nutriente esencial para la síntesis de proteínas y clorofila en la *Chlorella Vulgaris*. Se puede proporcionar en forma de sulfato.
- **Hierro:** El hierro es un nutriente esencial para la síntesis de clorofila y la actividad de la enzima nitrogenasa en la *Chlorella Vulgaris*. Se puede proporcionar en forma de sales de hierro.

Además de estos nutrientes esenciales, la *Chlorella Vulgaris* también puede requerir otros nutrientes y micronutrientes, como magnesio, calcio, potasio, zinc, manganeso y molibdeno, para su crecimiento y eficiencia en la fotosíntesis (Issa, 1995).

Es importante asegurarse de que los nutrientes se proporcionen en las cantidades adecuadas y en el momento adecuado, para evitar un exceso o una deficiencia de nutrientes que pueda afectar el crecimiento y la eficiencia de la fotosíntesis de la *Chlorella Vulgaris*.

#### **3.2.5 Producción de biomasa**

La fotosíntesis es la fuente principal de producción de biomasa en las microalgas, lo que las convierte en una fuente potencialmente sostenible y renovable de bioproductos.

### **3.3 Biosíntesis de lípidos**

La biosíntesis de lípidos en la microalga *Chlorella Vulgaris* es un proceso en el que la célula produce y acumula lípidos, como ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, que se pueden utilizar para la producción de biodiésel.

La biosíntesis de lípidos en la *Chlorella Vulgaris* se produce como respuesta a una variedad de factores ambientales, como la disponibilidad de luz, nutrientes, temperatura y otros factores de estrés. Cuando la microalga se somete a condiciones de estrés, comienza a almacenar lípidos en forma de gotas de aceite en su interior. Estas gotas de aceite pueden representar hasta el 50% de la biomasa total de la *Chlorella Vulgaris* (Li, Horsman, Wu, Lan, & Dubois-Calero, 2008).

El proceso de biosíntesis de lípidos en la *Chlorella Vulgaris* se produce en dos etapas principales: la formación de precursores de lípidos, como el ácido graso palmitato, y la formación de lípidos complejos, como los triglicéridos y fosfolípidos.

Durante la primera etapa, los precursores de lípidos se forman a partir de la fijación de dióxido de carbono en la fotosíntesis y la conversión de estos precursores en ácidos grasos. Los ácidos grasos se transportan al retículo endoplásmico de la célula, donde se combinan para formar triglicéridos y fosfolípidos durante la segunda etapa.

La biosíntesis de lípidos en la *Chlorella Vulgaris* se puede mejorar mediante técnicas de ingeniería genética, selección de cepas, control de factores ambientales y optimización del proceso de cultivo. Además, la selección de cepas de *Chlorella Vulgaris* ricas en lípidos y la aplicación de tecnologías de extracción de lípidos eficientes pueden aumentar la cantidad y calidad de los lípidos producidos y, por lo tanto, mejorar la eficiencia de la producción de biodiésel a partir de microalgas.

### **3.4 Insumos para el cultivo de microalgas: efectos en el crecimiento y producción de biomasa de alta calidad**

El cultivo de microalgas requiere de diversos insumos que son necesarios para su crecimiento y supervivencia. Algunos de estos insumos son:

- 1) Agua: El agua es un insumo esencial para el cultivo de microalgas, ya que es el medio en el que se desarrollan y se alimentan. Es importante que el agua utilizada para el cultivo sea limpia y libre de contaminantes, y que tenga una composición química adecuada para el crecimiento de la microalga.
- 2) Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>): El dióxido de carbono es un insumo esencial para la fotosíntesis de las microalgas, ya que se utiliza para la producción de energía y la síntesis de carbohidratos. Es importante asegurarse de que haya suficiente CO<sub>2</sub> disponible para el cultivo de las microalgas.
- 3) Nutrientes: Las microalgas requieren una variedad de nutrientes esenciales para su crecimiento y supervivencia, como nitrógeno, fósforo, azufre, hierro y otros micronutrientes. Estos nutrientes se pueden proporcionar en forma de sales y otros compuestos químicos.
- 4) Luz: La luz es esencial para la fotosíntesis de las microalgas, y se requiere una fuente de luz adecuada para su crecimiento. La intensidad y duración de la luz pueden variar según la cepa de microalga y las condiciones específicas del cultivo.
- 5) Temperatura: La temperatura es un factor importante que puede afectar el crecimiento y la supervivencia de las microalgas. Es importante mantener una temperatura adecuada y constante para el cultivo, ya que las fluctuaciones pueden afectar el crecimiento y la producción de biomasa.
- 6) pH: El pH es otro factor importante que puede afectar el crecimiento y la supervivencia de las microalgas. Es importante mantener un pH adecuado y constante para el cultivo, ya que los cambios en el pH pueden afectar la disponibilidad de nutrientes y otros factores importantes para el crecimiento de las microalgas.

El cultivo de microalgas requiere de diversos insumos, como agua, dióxido de carbono, nutrientes, luz, temperatura y pH, que deben ser controlados y proporcionados adecuadamente para asegurar un crecimiento óptimo y la producción de biomasa de alta calidad (González, 1999).

A continuación, se presenta una tabla con los datos referenciales sobre los puntos vistos anteriormente para obtener una mejor eficiencia de producción de la microalga *Chlorella Vulgaris*:

**Tabla 3. Datos referenciales para obtener mejor eficiencia de la producción de Microalgas *Chlorella Vulgaris***

| INSUMO          | RANGO ÓPTIMO   | COMENTARIOS  |
|-----------------|--|--|
| AGUA            | pH 7-8   | Libre de contaminantes                                       |
| CO <sub>2</sub> | 0.04-0.1%  | Suficiente CO <sub>2</sub> disponible                        |
| NUTRIENTES      | Nitrógeno: 15-25 ppm<br>Fósforo: 1-3 ppm<br>Azufre: 10 ppm<br>Hierro: 0.05 ppm | Proporcionados en forma de sales y otros compuestos químicos |
| LUZ             | 200-400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$                                    | Intensidad y duración adecuadas                              |
| TEMPERATURA     | 25-35°C  | Mantener una temperatura adecuada y constante                |
| PH              | 7-8  | Mantener un pH adecuado y constante                          |

Fuente: (González, 1999).

Es importante tener en cuenta que estos rangos son referenciales y pueden variar según la cepa de microalga y las condiciones específicas del cultivo. Por lo tanto, es necesario realizar pruebas y ajustes en el cultivo para determinar los rangos óptimos para la cepa de *Chlorella Vulgaris* y las condiciones específicas del cultivo.

### 3.5 Cultivo de biomasa de las microalgas

El cultivo de biomasa de las microalgas es un proceso técnico que involucra varios pasos y condiciones para lograr una producción eficiente y de alta calidad. Algunos de los aspectos técnicos del cultivo de biomasa de las microalgas son:

- a) Selección de la cepa: La selección de la cepa de microalga es uno de los primeros pasos importantes en el cultivo de biomasa. Se debe seleccionar una cepa que sea adecuada para el objetivo de producción y que tenga requisitos de crecimiento y nutricionales compatibles con las condiciones de cultivo disponibles.
- b) Preparación del medio de cultivo: El medio de cultivo debe ser preparado de manera precisa, con los nutrientes y las condiciones óptimas para el crecimiento

de la microalga. El medio puede ser preparado a partir de soluciones químicas o utilizando residuos orgánicos como fuente de nutrientes.

- c) Condiciones de cultivo: Las condiciones de cultivo, como la luz, la temperatura, el pH, el CO<sub>2</sub> y los nutrientes, deben ser monitoreadas y controladas cuidadosamente para lograr un crecimiento óptimo y evitar el estrés de la microalga.
- d) Cultivo en masa: La microalga se cultiva en grandes volúmenes en tanques o estanques para aumentar la producción de biomasa. Es importante mantener las condiciones óptimas de cultivo para maximizar la producción.
- e) Cosecha y extracción de biomasa: La biomasa se cosecha y extrae utilizando técnicas de centrifugación, filtración, sedimentación o flotación. El método de extracción dependerá del objetivo de producción y de la composición química de la biomasa.
- f) Procesamiento de la biomasa: La biomasa puede ser procesada para obtener productos como biocombustibles, productos químicos, alimentos o suplementos. El procesamiento puede incluir técnicas de extracción, separación, purificación y refinación.

En general, el cultivo de biomasa de las microalgas es un proceso técnico que requiere atención a los detalles y el uso de técnicas precisas y avanzadas para lograr una producción eficiente y de alta calidad (Brennan & Owende, 2010).

### **3.5.1 Sistemas de cultivo de microalgas**

Existen varios sistemas de cultivo de microalgas que se utilizan en la producción a gran escala. Algunos de los sistemas más comunes son:

- a) Estanques abiertos: Los estanques abiertos son el sistema de cultivo más simple y económico. Consisten en estanques poco profundos que se exponen directamente a la luz solar. Los nutrientes se agregan al agua para proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento de las microalgas.
- b) Estanques cerrados: Los estanques cerrados son similares a los estanques abiertos, pero están cubiertos para proteger las microalgas de la contaminación y evitar la evaporación del agua. Los estanques cerrados también pueden

controlar las condiciones ambientales, como la temperatura, la luz y la disponibilidad de nutrientes, para optimizar el crecimiento.

- c) Fotobiorreactores: Los fotobiorreactores son sistemas cerrados que controlan la entrada de luz y nutrientes para maximizar el crecimiento de las microalgas. Estos sistemas pueden ser cilíndricos, tubulares, planos o en forma de columna, y pueden ser contruidos en materiales como vidrio, plástico o acero inoxidable.
- d) Sistemas mixtos: Los sistemas mixtos combinan elementos de los estanques abiertos y los fotobiorreactores para optimizar el crecimiento de las microalgas. Por ejemplo, se pueden utilizar estanques abiertos para el crecimiento inicial de la microalga y luego transferirla a fotobiorreactores para una mayor optimización del crecimiento.

Cada sistema de cultivo tiene sus ventajas y desventajas, y la elección del sistema adecuado dependerá del objetivo de producción y de las condiciones específicas de cultivo. Es importante considerar factores como el costo, la eficiencia, la escalabilidad y la disponibilidad de recursos antes de seleccionar un sistema de cultivo de microalgas (Brennan & Owende, 2010).

### **3.5.2 Sistemas de cultivo adecuados para la producción de biodiésel a partir de microalgas**

La producción de biodiésel a partir de microalgas requiere la optimización del cultivo para maximizar la producción de biomasa y el contenido de lípidos. Existen varios sistemas de cultivo adecuados para este propósito, que se pueden dividir en dos categorías principales: sistemas abiertos y sistemas cerrados (Brennan & Owende, 2010).

#### **3.5.2.1 Sistemas abiertos**

- a) Estanques de raza (Raceway Ponds): Son los sistemas más comunes y económicos para el cultivo de microalgas a gran escala. Consisten en canales poco profundos y circulares o en forma de óvalo, donde las microalgas se cultivan bajo condiciones naturales de luz y temperatura. El movimiento del agua y la mezcla se logran mediante paletas o aireación, lo que evita la

sedimentación de las células y mejora la exposición a la luz. Los estanques de raza pueden ser una opción efectiva para la producción de biodiésel si se utilizan cepas de microalgas resistentes y de rápido crecimiento con alto contenido de lípidos.

- b) Fotobiorreactores de láminas delgadas (Thin Layer Photobioreactors): Consisten en láminas delgadas de agua que contienen las microalgas, colocadas sobre una superficie inclinada o plana. Estos sistemas aprovechan la luz solar de manera eficiente y permiten un mejor control de las condiciones de crecimiento. Sin embargo, pueden ser más difíciles de escalar y requieren mayor inversión inicial en comparación con los estanques de raza.

### **3.5.2.2 Sistemas cerrados**

- a) Fotobiorreactores tubulares (Tubular Photobioreactors): Son sistemas cerrados que consisten en tubos de vidrio o plástico transparente donde las microalgas se cultivan en suspensión. Los fotobiorreactores tubulares permiten un mejor control de las condiciones de crecimiento, como la temperatura, el pH, la concentración de CO<sub>2</sub> y la luz. Además, reducen el riesgo de contaminación por otras especies de microorganismos. Sin embargo, estos sistemas tienen mayores costos de inversión y operación en comparación con los sistemas abiertos.
- b) Fotobiorreactores de placa plana (Flat Panel Photobioreactors): Son sistemas cerrados compuestos por paneles transparentes que contienen las microalgas en suspensión. Estos fotobiorreactores también permiten un control preciso de las condiciones de crecimiento y reducen el riesgo de contaminación. Aunque su eficiencia de captación de luz solar es mayor que la de los fotobiorreactores tubulares, también implican mayores costos de inversión y operación.

La elección del sistema de cultivo adecuado para la producción de biodiésel a partir de microalgas dependerá de factores como la cepa de microalga seleccionada, el clima y la ubicación geográfica, así como el presupuesto y las metas de producción. En general, los sistemas abiertos, como los estanques de raza, son más económicos y fáciles de escalar, pero ofrecen un control limitado de las condiciones de crecimiento

y pueden ser más susceptibles a la contaminación. Por otro lado, los sistemas cerrados, como los fotobiorreactores tubulares o de placa plana, ofrecen un control preciso del ambiente y reducen la contaminación, pero tienen mayores costos de inversión y operación.



## CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE CHLORELLA VULGARIS A TRAVÉS DE LA OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN LABORATORIO

### 4.1 Materiales y reactivos

#### 4.1.1 Cultivo de microalgas

##### Materiales

- Frasco ámbar
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Gradillas de tubos de ensayo
- Matraz Erlenmeyer 100 ml
- Matraz Erlenmeyer 500 ml
- Frasco de vidrio de 5 litros
- Botellón de 20 litros
- Mangueras de 3 mm de diámetro
- Bombas de aire de 1, 2, 5, 10 l/min
- Incubadora de plastaforma
- Diferentes tipos de focos
- Mechero bunsen
- Asa circular

- Pipeta y propipeta
- Molienda
- Cámara de Neubauer
- Portaobjetos para microscopio
- Microscopio 10x, 20x, 40x y 100x
- Centrifugadora
- Horno para secado

##### Reactivos, nutrientes y fertilizantes

- Almidón de papa
- Nitrofoska
- Urea
- Fosfato di amónico
- Sulfuro de aluminio
- Cloruro de sodio
- Bicarbonato de sodio
- humus

#### 4.1.2 Extracción Soxhlet de microalgas.

##### Materiales

- Soxhlet extractor con condensador.
- Papel de filtro.
- Embudo de vidrio.
- Probeta Graduada de 250 ml.

- Balanza analítica.
- Placa calefactora.
- Microalgas secas y pulverizadas.

##### Reactivos

- Solvente (n-hexano).

### 4.1.3 Recuperación de solvente

#### Materiales

Rotavapor (Equipo de evaporación rotativa).

Matraz de evaporación.

Baño de agua.

Recipiente de recolección para el solvente recuperado.

Pinzas para matraces.

Bomba de vacío.

Agua para el baño de refrigeración.

Probeta graduada de 10 ml.

### 4.1.4 Transesterificación y biorefinación

#### Materiales y equipos

Agitador magnético con placa calefactora.

Termómetro.

Pipetas y pipeteador.

2 vasos de precipitados 50 ml.

Probeta graduada 50 ml.

Batidor o varilla de vidrio.

Equipo de Decantación.

Carbón activo

#### Reactivos

Aceite de Chlorella Vulgaris

Alcohol (Etanol al 99,9% de pureza 9 ml)

Catalizador NaOH al 1% en peso (p/v) (0.34 g).

### 4.2 Métodos

El enfoque metodológico utilizado para investigar el cultivo de microalgas, la recuperación de su biomasa y la extracción de lípidos totales en diferentes volúmenes de cultivo, que van desde 500 ml hasta 5 l, empleando una variedad de medios sintéticos, se detalla en esta sección.

Además de explorar el cultivo de microalgas en aguas lacustres, el objetivo principal de este trabajo fue contrastar los resultados obtenidos en términos de biomasa y porcentaje de lípidos totales en cultivos realizados tanto en medios sintéticos como en escala media. Se basó en datos bibliográficos como referencia, teniendo en cuenta la posible variabilidad de resultados según la región donde se hayan llevado a cabo las investigaciones.

En este estudio se utilizaron cultivos de especies autóctonas cultivadas en altitudes superiores a los 3000 m.s.n.m. Para validar los resultados obtenidos en un sistema de cultivo a nivel de laboratorio, se realizó el cultivo y la obtención de biomasa en un sistema de cultivo a nivel "Bench", antes de implementar un fotobiorreactor (FBR) que proporcionara suficiente biomasa para las pruebas de extracción de lípidos. Para lograr este propósito, se siguió un procedimiento que incluyó el diseño teórico del fotobiorreactor, seguido de cultivos en medios sintéticos y a mediana escala.

De los dos últimos cultivos se adquirió biomasa con una productividad específica, y mediante extracción se determinó la cantidad de lípidos sintetizados en cada medio, lo que proporciona un parámetro comparativo para evaluar la viabilidad técnica del proyecto.

#### **4.3 Configuración del Fotobiorreactor**

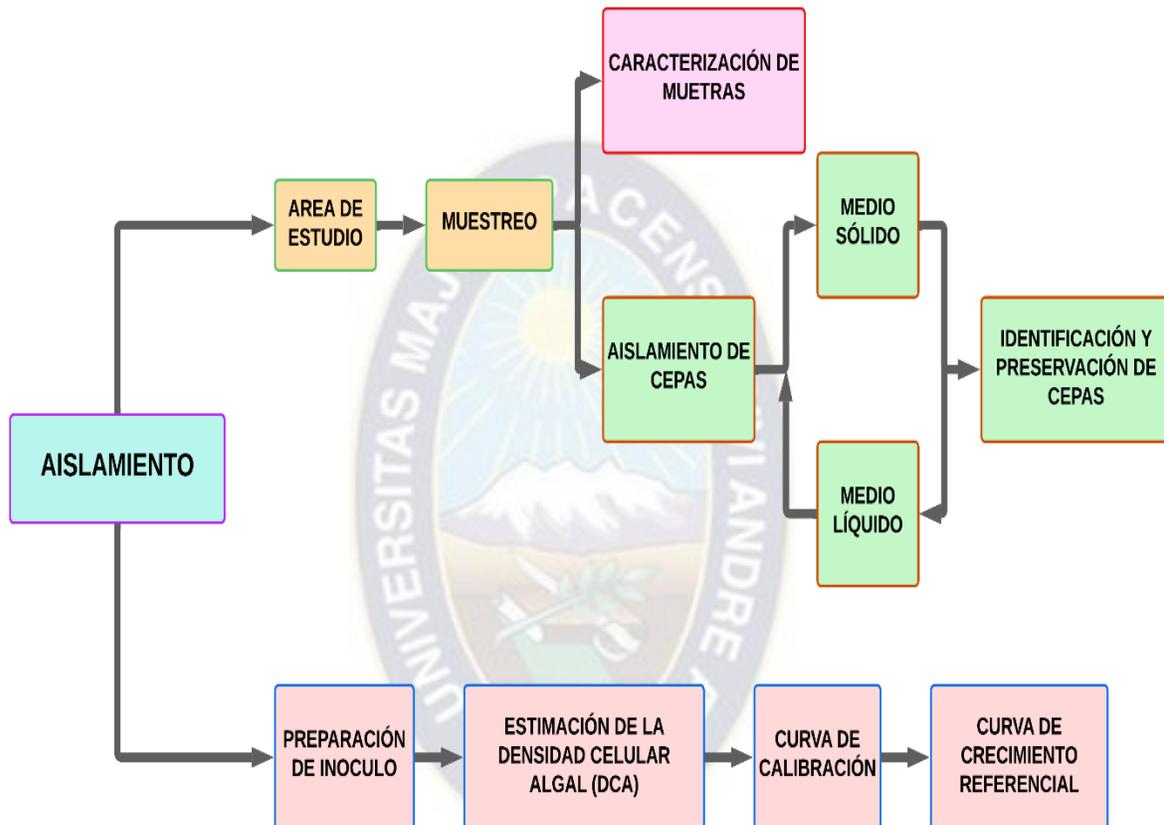
El estudio comenzó con la determinación del tamaño necesario para un fotobiorreactor donde se planeaba realizar el cultivo a pequeña y mediana escala de la especie con alto contenido lipídico. Las estimaciones se basaron en información de fuentes bibliográficas y se calcularon utilizando ecuaciones derivadas de un análisis dimensional.

#### **4.4 Desarrollo de microalgas en medios sintéticos**

Después de completar el cálculo dimensional del FBR, se llevó a cabo la separación de microalgas utilizando medios de cultivo sintéticos. Estos medios consistieron en nutrientes de grado p.a. disueltos en agua destilada. Se mantuvo este medio de cultivo hasta obtener una cantidad suficiente de inóculo para realizar la estimación de la Densidad Celular Algal-DCA, así como para crear una curva de calibración y

referencia. Este proceso permitiría cuantificar y comparar este cultivo en términos de nutrientes y parámetros de crecimiento con otros, lo que revelaría el aumento en la biomasa y la productividad en los cultivos, como se ilustra en la Figura 5.

**Figura 5. Cultivo de microalgas en medio sintético**

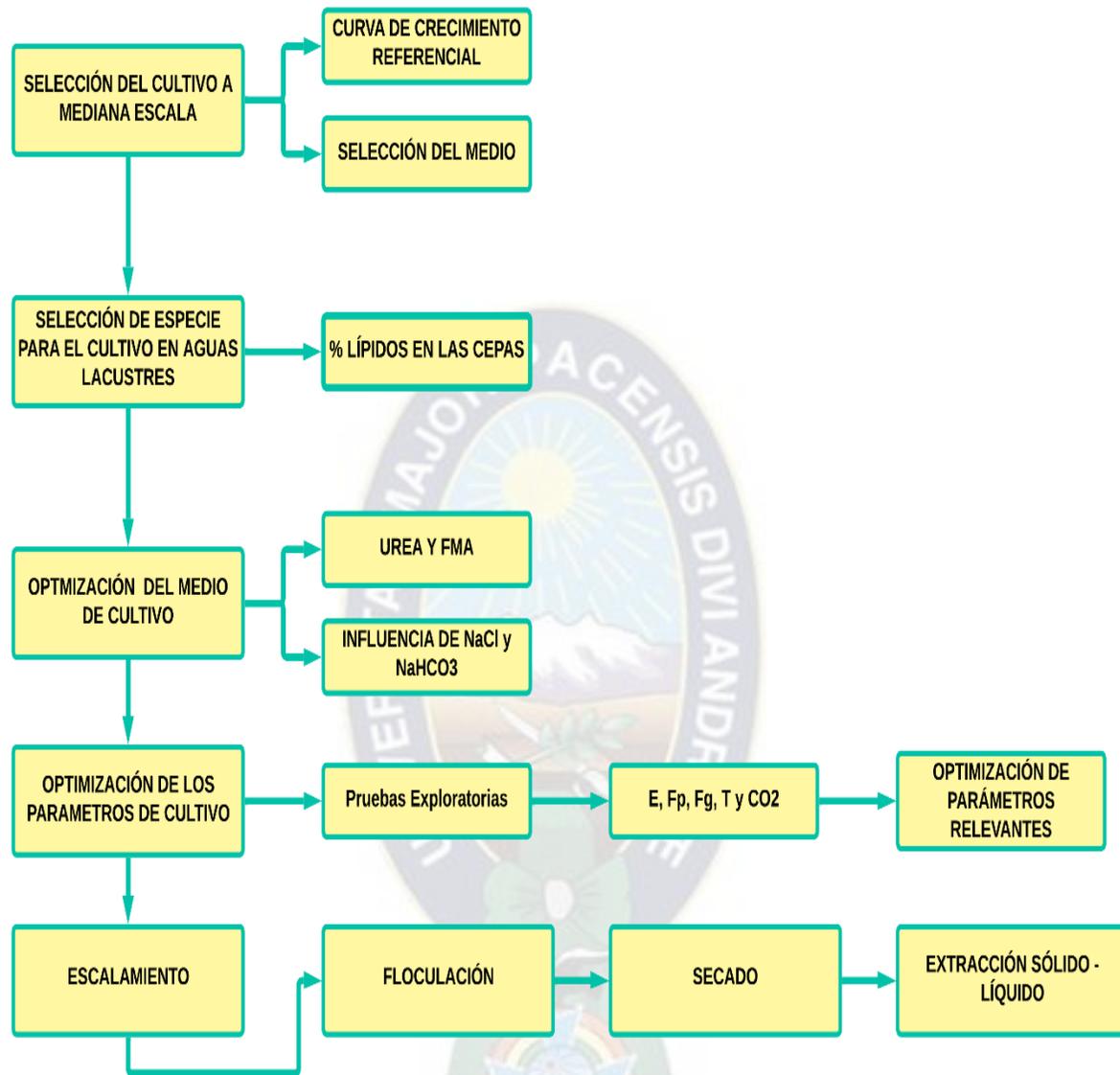


Fuente: Elaboración a partir de (Maydana, 2013)

#### 4.4.1 Desarrollo de microalgas a una escala mediana

Una vez finalizado el cultivo en un medio sintético y recopilados los datos de crecimiento celular, se optó por elegir un medio de cultivo más económico para llevar a cabo el cultivo a mediana escala. Este nuevo medio de cultivo se denominó "Cultivo a Mediana Escala". A continuación, se procedió a optimizar tanto los nutrientes como los parámetros de cultivo utilizando este medio. Se utilizó el método de floculación para obtener biomasa y, a partir de esta, se realizó la extracción de lípidos totales con el fin de obtener valores de referencia (Figura 6).

**Figura 6. Cultivo de microalgas a Mediana Escala**

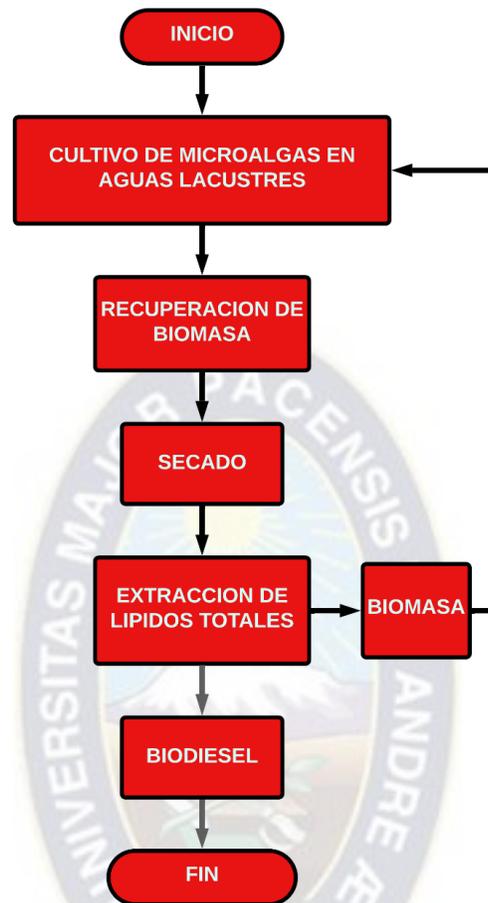


Fuente: Elaboración a partir de (Maydana, 2013)

#### 4.4.2 Desarrollo del cultivo de microalgas en aguas lacustres

Para concluir, se llevaron a cabo cultivos utilizando aguas extraídas del Lago Titicaca, las cuales fueron previamente analizadas. Posteriormente, se procedió a la obtención de biomasa y a la extracción de los lípidos totales, lo que permitió cuantificar y comparar la capacidad de producción de lípidos en estas aguas lacustres utilizando un medio de cultivo de escala intermedia (Figura 7).

Figura 7. Cultivo de microalgas



Fuente: Elaboración a partir de (Maydana, 2013).

En la sección anterior se delineó el panorama general del trabajo llevado a cabo. A continuación, se describen en detalle las metodologías empleadas durante el desarrollo de este proyecto.

#### 4.4.3 Planificación del tamaño del fotobiorreactor

Para calcular la capacidad de cultivo en términos de volumen del FBR y para facilitar la adquisición del mismo. El volumen teórico fue establecido considerando los requisitos de Productividad volumétrica de biomasa ( $P_y$ ), el tiempo requerido para la cosecha y la cantidad de biomasa necesaria para alcanzar una cantidad específica de lípidos totales. Al definir la especie microalgal, basándose en el porcentaje de contenido de lípidos totales según datos de literatura (Mata T. M., 2010), se logró

determinar la productividad volumétrica de biomasa, el tiempo de cosecha y el porcentaje teórico de contenido de lípidos en base seca para la especie seleccionada. Estos datos preliminares permitieron realizar una estimación del volumen de cultivo requerido para producir una determinada cantidad de biomasa. A partir de la literatura (Mata T. M., 2010), se identificaron especies con diferentes contenidos de lípidos categorizadas como alta, media y baja. Luego, a través de un análisis dimensional, se derivó la ecuación para calcular el volumen del FBR de la siguiente manera:

$$V_{FBR} = \frac{m_{BS}}{P_V * t_c}$$

$$V_{FBR} = \frac{[g \text{ biomasa seca}]}{\left[ \frac{\text{biomasa seca}}{l \text{ cultivo} * d \text{ cultivo}} \right] * [d \text{ cultivo}]} = [l]$$

Donde:

$V_{FBR}$  = Volumen efectivo del fotobioreactor (volumen de cultivo) [l]

$m_{BS}$  = cantidad de biomasa seca [g]

$P_V$  = Productividad volumétrica de biomasa [g/(l \* dias)]

$t_c$  = tiempo de cultivo [dias]

La ecuación 2 muestra que fue necesario, en primer lugar, calcular la biomasa mínima teórica a obtener. Esto se realizó considerando el contenido de lípidos, la densidad de los lípidos y el porcentaje de lípidos en relación con la biomasa seca de la especie específica. Se aplicó la siguiente ecuación para este propósito:

$$m_{BS} = \frac{100 * V_{LT} * \bar{\rho}_{LT}}{\%L_T}$$

$$m_{BS} = \frac{[ml \text{ lípidos}] * \left[ \frac{g \text{ lípidos}}{ml \text{ lípidos}} \right]}{\left[ \frac{g \text{ lípidos}}{g \text{ biomasa seca}} \right]} = [g]$$

Donde:

$m_{BS}$  = Cantidad de biomasa seca [g]

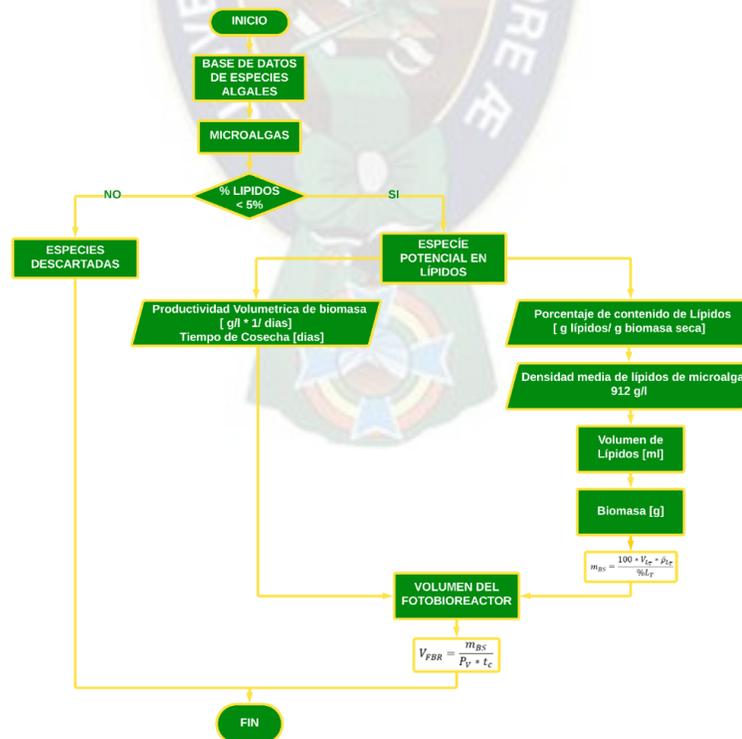
$V_{LT}$  = Volumen de lípidos necesario para la caracterización [ml]

$\bar{\rho}_{LT}$  = Densidad media de lípidos de microalga [g/ml]

$\%L_T$  = Porcentaje de contenido de lípidos en base seca de biomasa,  
[g lípidos/g biomasa seca]

Con el fin de cumplir con el propósito principal del proyecto, se requiere la obtención de 2 ml de aceite procedente de microalgas, el cual será sometido a un proceso de derivatización para su posterior caracterización mediante cromatografía de gases. Para determinar la cantidad de biomasa necesaria, es fundamental contar con el conocimiento de la densidad. Se dispone de datos sobre la densidad del aceite de microalgas, la cual se establece en 912 g/l, y su peso molecular, que se reporta en 933 g/mol según lo indicado por (Peretti, 2007). El diagrama de bloques presentado en la figura 8 ilustra el proceso de cálculo llevado a cabo para el dimensionamiento del FBR.

**Figura 8. Flujograma para el dimensionamiento del fotobiorreactor en el cultivo de microalgas.**



Fuente: Elaboración en base a (Maydana, 2013)

Para los cálculos correspondientes, se utilizó una especie de alga reconocida por su eficiente capacidad para producir lípidos, considerando dos niveles de productividad: uno mínimo y otro máximo, representativos de escenarios desfavorables y favorables, respectivamente. Estos datos permitieron obtener distintos tamaños de Fotobiorreactores (FBR). Luego, se procedió a la adquisición del FBR de mayor capacidad, con un volumen de 500 litros. Se tuvo en cuenta la saturación lumínica máxima, la cual, según la bibliografía referenciada (Cervantes, 2010), no debería exceder los 20 centímetros de profundidad.

#### **4.4.4 Cultivo de microalgas en medio de cultivo sintetizado.**

En mi proyecto, exploré el cultivo de microalgas en medio de cultivo sintetizado a pequeña y mediana escala. Durante mi investigación, me sumergí en el diseño y la implementación de un sistema que permitiera el crecimiento óptimo de las microalgas en un entorno controlado. A través de este enfoque, pude estudiar de cerca el impacto de diferentes variables en el cultivo, como la composición del medio de cultivo, la iluminación y la densidad celular.

#### **4.5 Región de análisis**

Según investigaciones realizadas por (Cadima F., 2005), en las cuales se identificó una amplia gama de microalgas en el Altiplano boliviano, se llevaron a cabo muestreos en los cuerpos de agua del Altiplano paceño, incluidos el Lago Mayor y el Lago Menor del Lago Titicaca. Se detectó la posible presencia de especies como *Chlorella Sp.* y *Scenedesmus sp.*, que, según (Mata T. M., 2010), son conocidas por tener un alto contenido de lípidos en comparación con la biomasa seca.

#### **4.6 Recolección de muestras**

Se implementaron procedimientos específicos para llevar a cabo el muestreo en el lago Titicaca, siguiendo las directrices establecidas por (CONFEDERACIÓN HIDROGRÁFICA DEL EBRO, 2011) para el muestreo de fitoplancton. Se detallan los equipos utilizados y el protocolo de recolección de muestras. Las muestras fueron recogidas en frascos de vidrio de color ámbar, previamente esterilizados. Se consideraron otras variables relevantes, como la estación del año y los momentos de

muestreo adecuados (cuando la actividad fotosintética de las microalgas es mayor), entre otras. Posteriormente, las muestras fueron codificadas de manera inmediata y trasladadas al laboratorio, donde se registraron parámetros fisicoquímicos, la ubicación geográfica y la altitud (utilizando un Sistema de Posicionamiento Global, GPS) del lugar de muestreo, así como la fecha de recolección.

#### **4.6.1 Análisis de las muestras**

Los análisis de parámetros fisicoquímicos en los cuerpos de agua donde habitan las microalgas, los cuales representan su entorno ambiental. Estos análisis abarcaron aspectos como la salinidad, temperatura, oxígeno disuelto, pH (medido con un dispositivo HI 9811-5), conductividad, y presencia de materia inorgánica, empleando un espectrofotómetro (Perkin Elmer Analyst 200, USA). Algunos de los equipos utilizados se visualizan en la figura 9.

**Figura 9. Espectrofotometría utilizada en el análisis de muestras.**



Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de la carrera de Gas y Petroquímica de la UPEA.

#### **4.6.2 Aislamiento de microalgas**

Para llevar a cabo el aislamiento de microalgas, se seleccionaron los medios de cultivo detallados en la Tabla 4, teniendo en cuenta que las especies de interés se encuentran en ambientes de agua dulce. Se priorizó el aislamiento de la especie *Chlorella Vulgaris* debido a su potencial para la producción de lípidos.

**Tabla 4. Medios de cultivo convencionales para algas provenientes de aguas dulces.**

| Medios de Cultivo                                |
|--|
| Gaillard f/2(Richmond, 2004)                     |
| Bold Basal (Richmond, 2004)                      |
| BG-11 (Richmond, 2004)                           |
| M-8 (Chlorella Vulgaris) (Mandalam et al., 1998) |
| Sorokm-Krauss (Mandalam , 1998)                  |

Fuente: Adaptada a (Mandalam, 1998) y (Richmond A. , 2004).

#### **4.7 Aislamiento en medio sintético solido**

Para crecer, los microorganismos necesitan un mínimo de nutrientes: agua, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y algunas sales minerales (Lozano, 2020).

Para la esterilización de las placas Petri se usa agua destilada previamente hervida. Posteriormente, las placas esterilizadas fueron secadas en un horno a una temperatura de 121 grados Celsius durante 10 minutos.

**Figura 10. Esterilización de Materiales para aislamiento medio sintético sólido.**



Fuente: Fotografía tomada en laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA.

El asa circular se esterilizó mediante la técnica de pasaje en la llama de un mechero Bunsen.

Después se mezcla los ingredientes para crear el medio sintético sólido. Los ingredientes principales son almidón de papa El almidón es un hidrato de carbono complejo (polisacárido) y es una fuente de carbono y nitrofóska como fuente de nitrógeno, que es un fertilizante que proporciona nutrientes esenciales para el crecimiento de microorganismos.

La composición típica es:

- Almidón de papa: 30 g/l
- Nitrofóska: 2 g/l

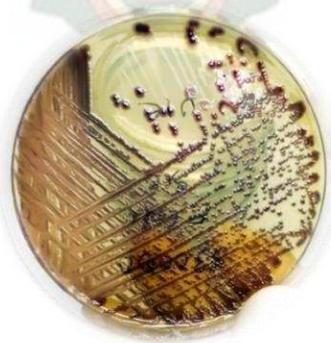
Disuelve el almidón de papa y el nitrofóska en agua destilada caliente y agita hasta obtener una mezcla homogénea.

Ajusta el pH del medio a un valor cercano a la neutralidad (alrededor de pH 7).

Se procedió al llenado del medio solido en las cajas Petri, 2 ml de medio de cultivo. Una vez que el medio esté estéril y enfriado, se inoculan las muestras que contienen las microalgas de interés.

Se utilizo la técnica de siembra por estría para distribuir las muestras uniformemente en la superficie del medio. Empleando un asa circular, que previamente se había sometido a la llama, se procedió a dispersar la muestra inoculada.

**Figura 11. Siembra por estría**

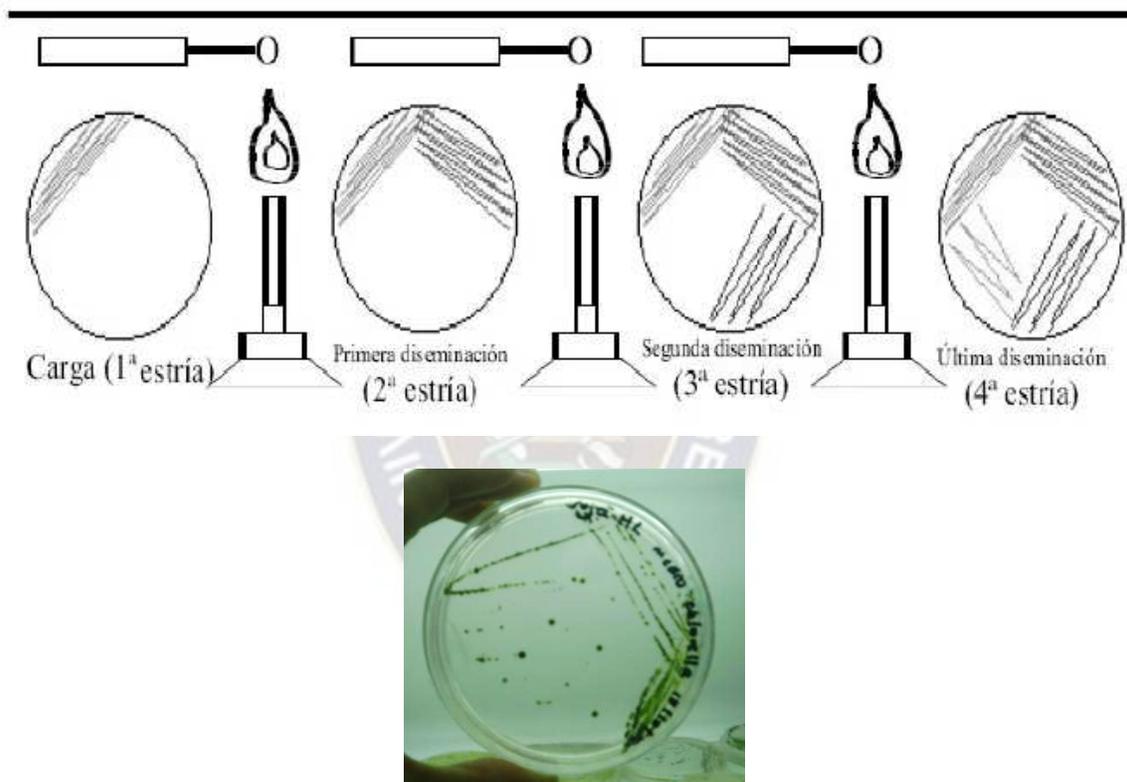


Fuente. (saludconlupa.com)

Se recubrieron con film las cajas Petri para evitar la contaminación con esporas de hongos u otros microorganismos.

Las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 26 °C y una iluminancia de 3000 lux. Después del crecimiento de las colonias en el medio sólido (caja Petri con agar), estas se transfirieron al medio de cultivo líquido (viales con 2 ml de medio de cultivo). La figura 12 resume la metodología de aislamiento.

**Figura 12. Aislamiento en medio sólido.**



Fuente: (Reynoso, 1998) y Fotografía tomada en domicilio, El Alto, distrito 7.

Debido a la falta de un luxómetro, se procedió a determinar la iluminancia del sistema utilizando el método que se desarrolla a continuación. Se diseñaron y construyeron incubadoras para el aislamiento de microalgas en medios sólidos. Para conocer la iluminancia en la base del recipiente se empleó el "método de coeficiente de utilización", basado en el cálculo utilizado para el diseño de iluminación de interiores (Raitelli, 2011).

$$E = \frac{n * \varphi_T * F_u * M}{S}$$

Donde:

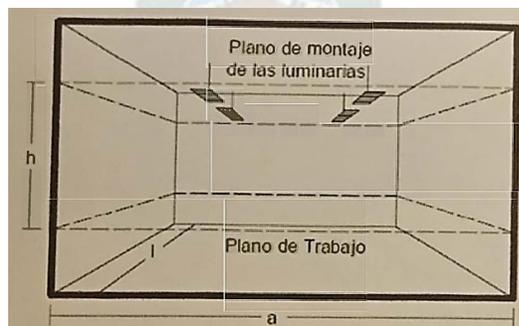
- $n$ : Número de luminarias.
- $E$ : Iluminancia media sobre el plano de trabajo [lux].
- $\varphi_T$ : Flujo de lámparas [lumen].
- $F_u$ : Factor de utilización.
- $M$ : Coeficiente de mantenimiento.
- $S$ : Superficie de local [m<sup>2</sup>].
- $k$ : Índice local.

Se diseñaron y construyeron incubadoras para cultivos en agar empleando lámparas fluorescentes de 14 W de potencia (900 lúmenes). Utilizando el cálculo que se resume en el diagrama anterior, se llegó a determinar la iluminancia. Se considera una limpieza continua y un buen mantenimiento de la fuente lumínica, por lo que  $M=0,95$  (una lámpara por recipiente o incubadora). Los focos fluorescentes emiten 900 lúmenes. Para determinar el Factor de Utilización, primero calculamos el índice local empleando la siguiente ecuación:

$$k = 5 * h * \frac{l + a}{l * a}$$

Donde las dimensiones adoptadas son como se muestra en la Figura 13.

**Figura 13. Ubicación del plano iluminado**



Fuente: (Raitelli, 2011).

Al definir la reflectancia tanto de las paredes como del techo (superficie donde se encuentra la fuente de luz), podemos calcular el Factor de Utilización (Fu) de la luminaria consultando la Tabla 5.

**Tabla 5. Determinación del Factor de utilización.**

| Reflectancia<br>techo [%]   | 80                      |      |      |      | 70   |      |      |      | 50   |      |      |      |
|-----------------------------|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Reflectancia<br>paredes [%] | 70                      | 50   | 30   | 10   | 70   | 50   | 30   | 10   | 70   | 50   | 30   | 10   |
| Indice de local             | Factores de utilización |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 1                           | 0.90                    | 0.86 | 0.83 | 0.80 | 0.88 | 0.85 | 0.81 | 0.78 | 0.81 | 0.78 | 0.75 | 0.77 |
| 2                           | 0.82                    | 0.75 | 0.69 | 0.64 | 0.80 | 0.73 | 0.68 | 0.64 | 0.70 | 0.66 | 0.62 | 0.67 |
| 3                           | 0.74                    | 0.66 | 0.57 | 0.52 | 0.72 | 0.64 | 0.58 | 0.52 | 0.61 | 0.56 | 0.52 | 0.59 |
| 4                           | 0.68                    | 0.58 | 0.50 | 0.45 | 0.66 | 0.56 | 0.50 | 0.44 | 0.54 | 0.48 | 0.43 | 0.52 |
| 5                           | 0.62                    | 0.50 | 0.42 | 0.37 | 0.59 | 0.49 | 0.42 | 0.37 | 0.48 | 0.41 | 0.36 | 0.46 |
| 6                           | 0.57                    | 0.44 | 0.38 | 0.32 | 0.55 | 0.44 | 0.37 | 0.31 | 0.42 | 0.36 | 0.31 | 0.41 |
| 7                           | 0.52                    | 0.40 | 0.33 | 0.27 | 0.50 | 0.39 | 0.32 | 0.27 | 0.38 | 0.31 | 0.26 | 0.36 |
| 8                           | 0.48                    | 0.36 | 0.28 | 0.23 | 0.46 | 0.35 | 0.28 | 0.23 | 0.34 | 0.28 | 0.23 | 0.33 |
| 9                           | 0.44                    | 0.32 | 0.25 | 0.20 | 0.42 | 0.31 | 0.25 | 0.20 | 0.30 | 0.24 | 0.20 | 0.29 |
| 10                          | 0.29                    | 0.22 | 0.18 | 0.19 | 0.28 | 0.22 | 0.18 | 0.28 | 0.21 | 0.17 | 0.26 | 0.21 |

Fuente: (Raitelli, 2011).

La superficie del área estará definida por el área del plano que se encuentra opuesto a la fuente de luz. En esta situación, el área será el resultado de multiplicar la longitud por el ancho (largo x ancho).

#### 4.8 Inoculación del medio sólido al medio líquido

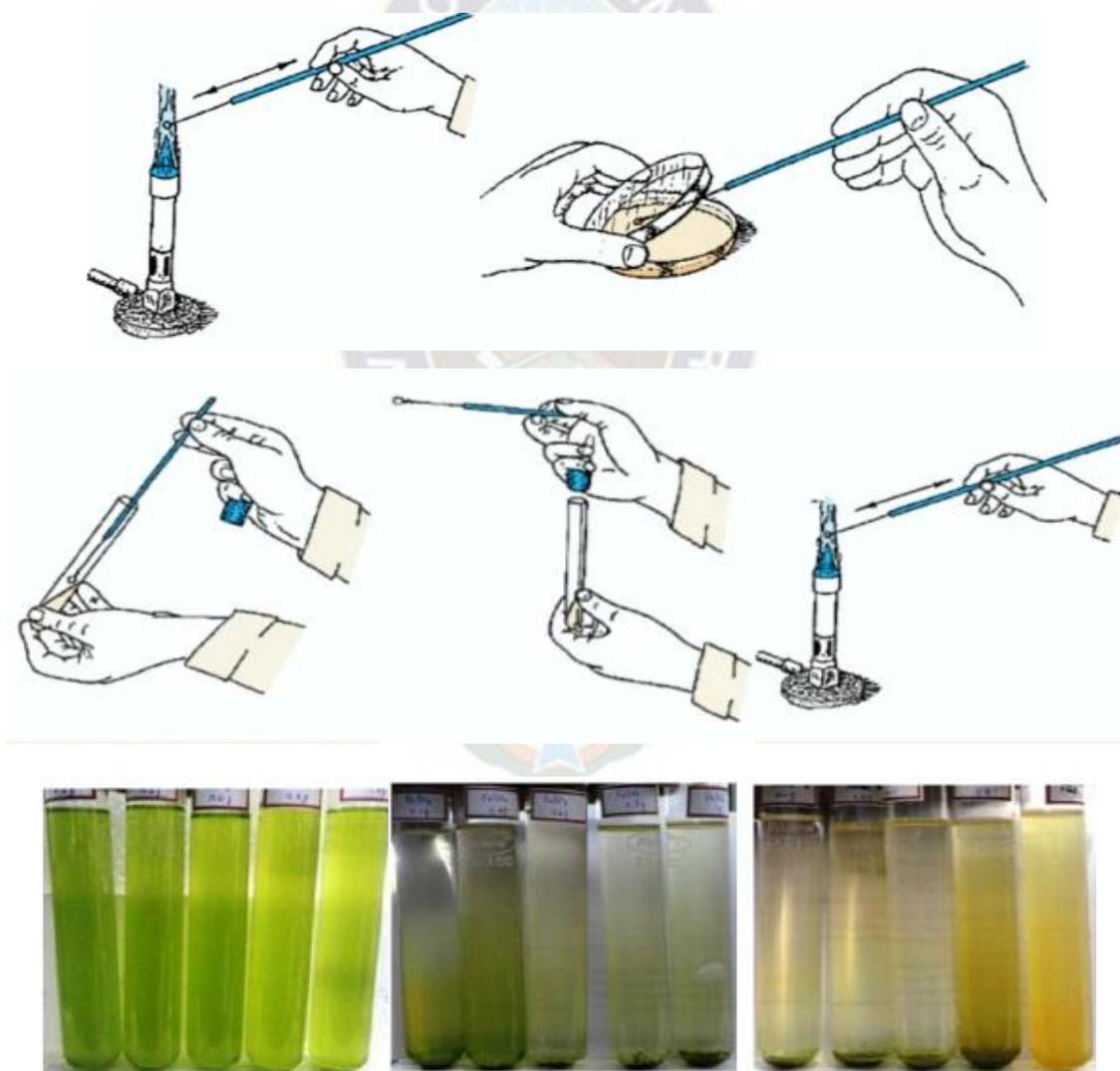
Cuando el cultivo sólido presentó colonias de microalgas, se procedió a preparar los medios de cultivo correspondientes, similares a los empleados en la inoculación en medio sólido, para conservar los nutrientes donde se desarrollaron las microalgas. Posteriormente, se colocaron de 2 ml de medio de cultivo líquido en tubos de ensayo o viales.

Se procedió a la inoculación de colonias de microalgas. Se retiró y se desechó la envoltura (film) de las cajas Petri. Sosteniendo la micropipeta con una mano, se colocó una punta en la micropipeta; con la otra mano, se sostuvo una caja Petri de la cual se quería transferir. Tomando la micropipeta en posición similar a la de un lápiz, se realizó la transferencia de una colonia que estaba en crecimiento. Con cuidado, se dejó la

caja Petri y se tomó un tubo de ensayo (o vial) con medio de cultivo líquido, evitando cualquier roce, y se depositó una punta en cada tubo de ensayo, que se etiquetó con un código correspondiente a la caja Petri de origen y la fecha de inoculación. Se volvieron a recubrir las cajas Petri con film y se incubaron nuevamente para conservar las microalgas que aún estaban en crecimiento.

Los tubos de ensayo fueron incubados a una temperatura de 26 °C y 3000 lux de iluminancia. Entre el quinto día y decimo día, se deberían observar cambios de color en los medios de cultivo (verde tenue).

**Figura 14. Transferencia de colonias algales a tubos de ensayos.**



Fuente: (Auxiliar de Laboratorista Químico, 2015)

Después de cinco o diez días de crecimiento, se tomaron pequeñas muestras del medio y se observaron al microscopio, realizando un recorrido en cruz sobre diversas secciones del portaobjetos. Una vez confirmada la presencia de una sola especie de microalga (monocultivo), se procedió a preparar el inóculo previo a la identificación y preservación de la cepa.

## **4.9 Identificación y conservación de cepas de microalgas aisladas**

### **4.9.1 Caracterización morfológica para identificación**

La identificación se realizó utilizando un microscopio de la marca Ken a Visten, originario de Alemania, y se tomaron fotografías con el fin de compararlas con imágenes publicadas (Cadima F., 2005). Tras realizar la observación morfológica en las instalaciones del Laboratorio.

### **4.9.2 Conservación**

Las especies de algas aisladas e identificadas se almacenaron en tubos y se mantuvieron refrigeradas a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Otra forma de preservar las cepas fue transfiriéndolas a medio de cultivo sólido con los nutrientes correspondientes al medio de aislamiento. En este medio, las cepas pueden conservarse durante 20 a 30 días, dependiendo de la especie. Luego, se realizó un traslado a un medio de cultivo líquido, donde se mantuvieron hasta los últimos días de crecimiento en la fase exponencial. Esto permitió realizar una masificación o preservarlas sin iluminación bajo refrigeración.

### **4.10 Preparación del inóculo**

Las microalgas aisladas se ampliaron a un volumen de 10 ml después de inoculadas con 1 ml de cultivo de microalgas aisladas. Luego, se incubaron los tubos durante 5 a 10 días, a una temperatura de  $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una iluminación de 2,1 klx. Una vez que se observó un cambio de color en el cultivo, lo que indicaba un aumento en la densidad celular, se procedió a preparar un inóculo de 100 ml.

Las cepas aisladas en matraces de 500 ml que contenían 50 ml de medio de cultivo esterilizado. La preparación del inóculo se realizó a una temperatura de  $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con

un fotoperiodo de 24 horas de luz y 0 horas de oscuridad, una iluminación de 3,4 klx y una aireación de 0,5 vvm (volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto). Se espera que, entre el tercer y el décimo día, las algas mostrarán un aumento significativo en la densidad celular. El proceso se detalla en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

**Figura 15. Aislamiento y purificación de microalgas por el método de diluciones sucesivas y subcultivos repetidos.**



Fuente: Elaboración a partir (Torres, 2011)

Según (Wang, Li, Wu, & Lan, 2008), las microalgas tienen la capacidad de absorber el CO<sub>2</sub> presente en el aire (0,035 %), lo que proporciona una fuente de carbono al sistema. Por lo tanto, se decidió incluir como un nuevo parámetro el flujo de aire suministrado al sistema.

Una bomba de 35 W de potencia es la que proporciona 0,5 vvm (volumen de aire por volumen de cultivo por minuto) (Zhang, Kurano, & Miyachi, 2002), la cual es la relación de aire utilizada en otros estudios. El cálculo del flujo de aire suministrado a un determinado volumen de cultivo se realiza de la siguiente manera:

$$F_v = [vvm]$$

$$F_v = \left[ \frac{l \text{ aire}}{l \text{ cultivo} * \text{min}} \right]$$

$$F_v = \left[ \frac{1}{\text{volumen de cultivo}} * \left( \frac{\text{volumen de aire}}{\text{min}} \right) \right]$$

$$F_v = \left[ \frac{1}{v_c} * (F_g) \right]$$

$$\left[ \frac{l}{min} \right] = [l \text{ cultivo}] \left[ \frac{l \text{ aire}}{l \text{ cultivo} * min} \right]$$

*Donde:*

*Fv: Relación de flujo volumen de aire – volumen de cultivo [vvm]*

*Ve: Volumen de cultivo [l]*

*Fg: Flujo de aire [l/min]*

## **4.11 Estimación de la concentración de células algal**

### **4.11.1 Método de Recuento en cámara Neubauer**

El recuento en cámara Neubauer es un método óptimo para contar microalgas por varias razones (blogceta.zaragoza.unam.mx):

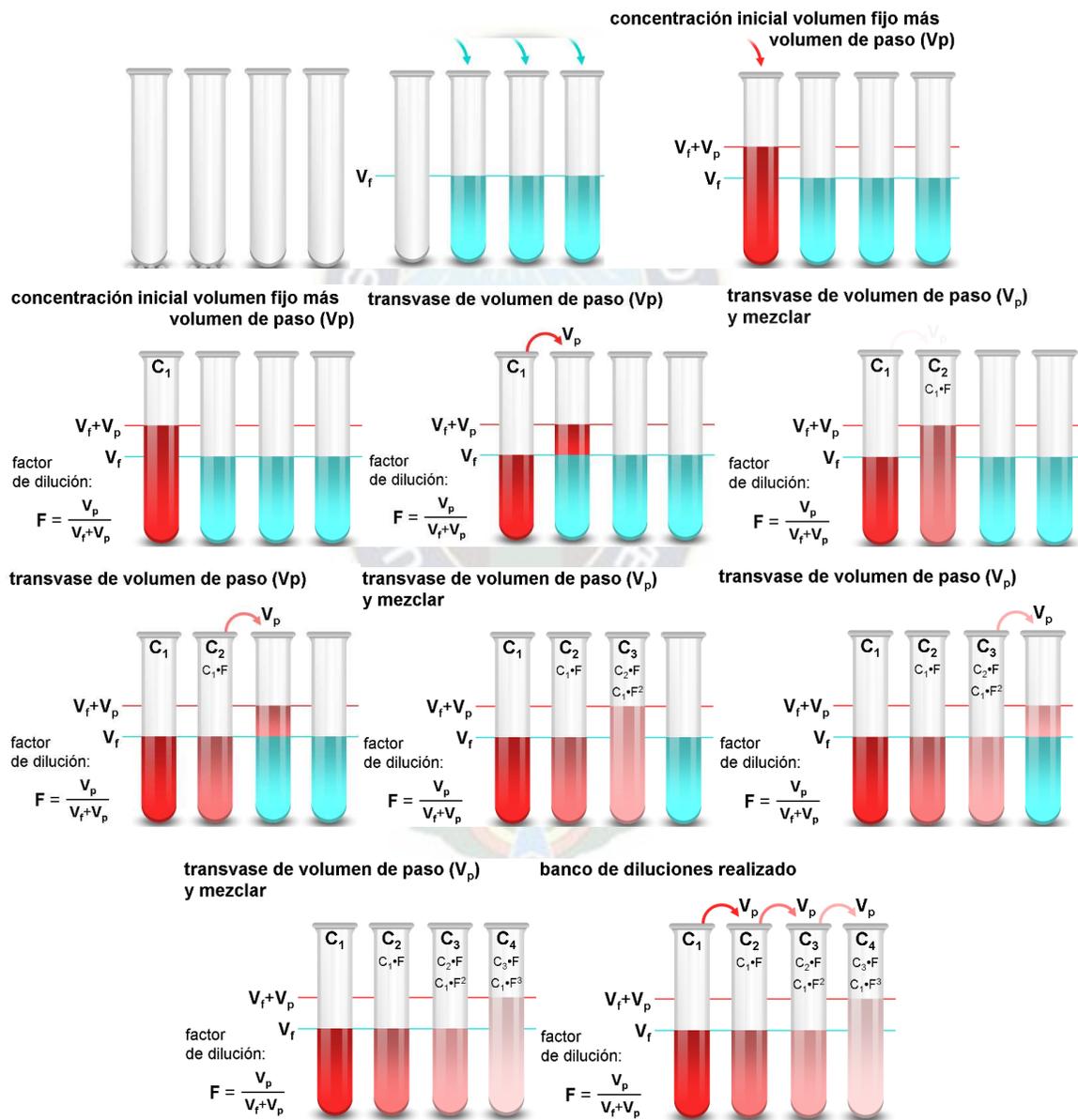
- **Precisión:** La cámara Neubauer proporciona una cuadrícula de dimensiones conocidas, lo que permite contar con precisión el número de microalgas presentes en una muestra.
- **Reproducibilidad:** Al utilizar una cuadrícula estandarizada, es posible reproducir los recuentos de manera consistente y comparar resultados entre diferentes muestras y experimentos.
- **Bajo costo:** Las cámaras Neubauer son relativamente económicas en comparación con otros métodos de recuento de células, lo que las hace accesibles para laboratorios con presupuestos limitados.
- **Versatilidad:** La cámara Neubauer se puede utilizar para contar una amplia variedad de microorganismos, incluidas las microalgas, lo que la convierte en una herramienta versátil para la investigación en biología celular y microbiología.
- **Facilidad de uso:** El proceso de contar las células en una cámara Neubauer es relativamente sencillo y no requiere equipo especializado, lo que facilita su uso incluso para usuarios sin experiencia previa.

### 4.11.2 Ajuste de curva de calibración

Para las diluciones seriadas, se utiliza 10 ml de volumen de cultivo, y un volumen fijo de 9 ml de agua de grifo para realizar una dilución seriada (cuadernolab.web, 2014).

Preparación de diluciones seriada de cepas para la obtención de las Curvas de Calibración (Figura 16).

**Figura 16. Dilución seriada para estimación de DCA máx.**



Fuente: Elaboracion a partir de (cuadernolab.web, 2014)

Extraer alícuotas de 1 ml de cada dilución, lo que se fijan con 100 µl de solución de Lugol y se estima de la concentración celular mediante el método de Recuento en cámara de Neubauer, según las directrices de la (FAO, 2009).

Los valores de Densidad Celular Algal (DCA) están en células por mililitro [cel/ml], para construir las gráficas de DCA vs. tiempo para las seis muestras.

#### **4.11.2.1 Evolución de la curva de crecimiento referencial**

La representación gráfica del crecimiento es para entender cómo se comporta cada cultivo obtenido del aislamiento. La idea es que esta gráfica permita observar los cambios en las variables de interés, como la Densidad Celular Algal (DCA), la biomasa y la productividad del cultivo a lo largo del tiempo. La experimentación se realiza en un Shaker (WiseCube) con dimensiones de 0,57 x 0,46 x 0,48 m, utilizando una fuente de luz de 35 W para obtener una iluminación de 5000 lx, a una temperatura de 26 ± 1 °C y una velocidad de aireación de 0,5 vvm. Se emplea matraces Erlenmeyer de 100 ml, con 100 ml de medio de cultivo según la fuente original y 10 ml de cultivo con la cepa aislada.

Se proporciona una iluminación más alta que la recomendada, alcanzando los 5000 lux sobre la superficie de los matraces.

Durante un período de 20 días, se realizó un seguimiento del crecimiento de las microalgas, controlando su densidad celular mediante el método de recuento por cámara de Neubauer y diluciones seriadas, siguiendo las recomendaciones de (Sheng-Yi, 2009).

Para determinar la velocidad específica de crecimiento celular ( $\mu$ ), se calculó la pendiente de la recta obtenida al graficar el logaritmo natural de la relación ( $N_t/N_0$ ) respecto al tiempo de cultivo, utilizando la ecuación de (Guillard & Ryther, 1962), como se detalla en (Devgoswami, 2011)

$$\mu = \frac{\ln(N_f) - \ln(N_0)}{t_f - t_0}$$

*Donde:*

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento [1/h]

$N_o$  = Número de células al inicio de la fase logarítmica

$N_f$  = Número de células al final de la fase logarítmica

$t_o$  = Día inicial de la fase logarítmica

$t_f$  = Día final de la fase logarítmica

Se determina el tiempo necesario para que el número de células se duplique diariamente ( $t_d$ ) mediante la siguiente ecuación (Devgoswami, 2011).

$$t_d = \frac{0,6931}{\mu} [d]$$

#### **4.12 Medio de cultivo masivo**

##### **4.12.1 Selección de medio de cultivo masivo**

El uso de fertilizantes agrícolas como medio de cultivo para microalgas es una estrategia efectiva debido a la presencia de nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo y otros micronutrientes en estos productos. Estos elementos son fundamentales para el desarrollo celular y la síntesis de biomasa en microalgas. Además, los fertilizantes agrícolas son más económicos y accesibles en comparación con medios de cultivo sintéticos especializados, lo que los convierte en una opción práctica y rentable para la producción a gran escala de microalgas. Esto es especialmente útil para aplicaciones como la producción de biocombustibles, alimentos para acuicultura y productos químicos especializados. Se emplea Urea, fosfato di amónico, nitrofoska, humus, cloruro de sodio y bicarbonato de calcio.

#### **4.13 Floculación**

La floculación es la primera etapa del proceso de cosechado de microalgas para obtención de la biomasa. Este proceso consiste en la unión o agrupación de sustancias que están dispersas en un medio líquido.

#### **4.13.1 Optimización de condiciones de floculación:**

Para lograr una floculación eficiente, es importante optimizar las condiciones de pH, dosificación de sulfato de aluminio, tiempo de floculación y agitación.

El tiempo de floculación y la intensidad de la agitación influyen en la formación y tamaño de los floculados, así como en la velocidad de sedimentación (Lujan, 2019).

#### **4.14 Centrifugación de microalgas**

Un estudio indica que para determinar las condiciones óptimas de centrifugación de un cultivo de microalgas *Chlorella* sp. con el objetivo de separar biomasa de manera eficiente, considerándola como un potencial recurso bioenergético.

Un estudio concluyó que las mejores condiciones de centrifugación se lograron a una velocidad de entre 3000 y 3500 RPM durante 10 minutos, alcanzando un rendimiento de separación del 98%. Estas condiciones optimizadas no solo mejoran la eficiencia del proceso de separación, sino que también son cruciales para la viabilidad económica y energética de la producción de biodiésel a partir de microalgas *Chlorella* (Mera Proaño, 2015).

#### **4.15 Secado en horno**

El secado es un proceso utilizado para eliminar el exceso de agua de las microalgas, convirtiéndolas en una forma seca y estable para su almacenamiento y posterior procesamiento. El secado reduce el contenido de agua de las microalgas, lo que ayuda a prevenir su degradación y permite su conservación a largo plazo.

##### **4.15.1 Secado en horno a 55 grados Celsius:**

La temperatura de secado de 55 grados Celsius es relativamente suave y se utiliza para evitar la degradación de compuestos sensibles presentes en las microalgas, como los lípidos y las proteínas. A esta temperatura, el proceso de secado es lo suficientemente rápido como para evitar la proliferación microbiana, pero lo suficientemente suave como para preservar la calidad de las microalgas (Alibas, 2021).

#### **4.15.2 Principios del secado en horno:**

Durante el secado en horno, el calor aplicado aumenta la energía cinética de las moléculas de agua en las microalgas, lo que facilita su evaporación.

El aire caliente circula alrededor de las microalgas en el horno, transportando la humedad evaporada lejos de la superficie de las células.

A medida que el agua se evapora, las microalgas se secan gradualmente, reduciendo su contenido de agua hasta alcanzar un nivel deseado (Alibas, 2021).

#### **4.15.3 Impacto en la calidad de las microalgas:**

La temperatura y el tiempo de secado son críticos para mantener la calidad de las microalgas. Un secado prolongado o a temperaturas demasiado altas puede provocar la degradación de compuestos sensibles, como los pigmentos, los lípidos y las proteínas, lo que afecta negativamente la calidad de las microalgas (Alibas, 2021).

#### **4.15.4 Consideraciones adicionales:**

Es importante realizar un secado uniforme para evitar la formación de aglomerados o la sobre - secado de algunas áreas.

Se debe monitorear la temperatura y el tiempo de secado de manera cuidadosa para evitar daños en las microalgas.

Se pueden utilizar técnicas adicionales, como el secado por liofilización, para preservar aún más la calidad de las microalgas, aunque este método suele ser más costoso y complejo.

### **4.16 Extracción de lípidos totales**

#### **4.16.1 Principios de la extracción de lípidos:**

La extracción de lípidos es un proceso utilizado para separar y recuperar los lípidos presentes en las células de las microalgas.

Los lípidos son compuestos insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos, lo que permite su extracción mediante solventes apolares.

#### **4.16.2 Solventes apolares:**

Los solventes apolares, como el hexano, el cloroformo o el éter de petróleo, tienen baja polaridad y alta afinidad por los lípidos.

Estos solventes tienen la capacidad de disolver eficientemente los lípidos presentes en las membranas celulares de las microalgas, permitiendo su extracción (Saini, 2021).

#### **4.16.3 Proceso de extracción:**

Las microalgas se mezclan con un solvente apolar, y la mezcla se agita para permitir la transferencia de los lípidos de las células al solvente.

La extracción se realiza en condiciones controladas de temperatura y tiempo para garantizar una eficiente transferencia de los lípidos sin degradación (Saini, 2021).

#### **4.16.4 Consideraciones adicionales:**

Es importante realizar una optimización de las condiciones de extracción, incluyendo la elección del solvente, la relación sólido-líquido, la temperatura y el tiempo de extracción, para maximizar el rendimiento y la calidad de los lípidos.

Se deben seguir las normativas y regulaciones ambientales y de seguridad relacionadas con el manejo y disposición de los solventes utilizados.

La extracción de lípidos por solventes apolares es un método eficiente y ampliamente utilizado para la recuperación de lípidos de las microalgas, ofreciendo varias ventajas significativas en términos de eficiencia, selectividad, costo y versatilidad.

### **4.17 Recuperación de biomasa**

La masa recuperada después de la extracción de lípidos puede reutilizarse en un nuevo cultivo.

#### **4.17.1 Sostenibilidad y ciclo cerrado:**

La reutilización de la biomasa recuperada ofrece múltiples beneficios tanto económicos como ambientales. La biomasa recuperada puede utilizarse para enriquecer o complementar los medios de cultivo frescos, ya que contiene nutrientes valiosos, como nitrógeno, fósforo y oligoelementos, que pueden reciclarse en el nuevo cultivo.

Este proceso reduce los costos asociados con la compra de nuevos medios de cultivo y la preparación de inoculantes, disminuyendo así la dependencia de insumos externos. Esto resulta en una ventaja económica significativa para la producción de microalgas.

La reutilización de la biomasa recuperada promueve la sostenibilidad al cerrar el ciclo de nutrientes y minimizar los residuos generados durante el proceso. Este enfoque contribuye a la conservación de recursos y reduce el impacto ambiental, apoyando un modelo de producción más sostenible y responsable (Markou & Georgakakis, 2011) y (Rawat, Ranjith Kumar, Mutanda, & Bux, 2011).

#### **4.18 Transesterificación**

La transesterificación de lípidos es un proceso químico que convierte los aceites o grasas (triglicéridos) en biodiésel (ésteres metílicos o etílicos de ácidos grasos) y glicerol. Este proceso involucra una reacción entre los triglicéridos y un alcohol (usualmente metanol o etanol) en presencia de un catalizador (como NaOH o KOH). A continuación, se detalla un procedimiento general (Hernández, 2017):

- Preparación del Catalizador

Pesar la cantidad necesaria de NaOH o KOH para preparar una solución al 1% en peso (p/v).

Disolver el NaOH o KOH en el alcohol (metanol o etanol) mediante agitación constante durante unos minutos hasta que el catalizador esté completamente disuelto.

- Preparación de los Reactivos

Medir el volumen requerido de aceite (por ejemplo, aceite de *Chlorella Vulgaris*).

Calcular la cantidad de alcohol necesaria utilizando la relación molar apropiada (usualmente 6:1, es decir, 6 moles de alcohol por cada mol de aceite).

- Mezcla de Reactivos

Agregar el alcohol con el catalizador disuelto al aceite en un balón de reacción.

Colocar el balón de reacción en una placa calefactora con agitador magnético.

- Condiciones de Reacción

Iniciar el agitador magnético a una velocidad moderada para asegurar una mezcla adecuada de los reactivos.

Utilizar un termómetro para controlar la temperatura y ajustar la placa calefactora para mantenerla a una temperatura de alrededor de 55-60 °C.

Mantener la mezcla reaccionando a esta temperatura durante un tiempo específico (usualmente entre 30 y 60 minutos), agitando continuamente.

- Observación de la Reacción

Durante el proceso, observar la formación de las fases de biodiésel y glicerol. Esto puede hacerse observando cambios en la apariencia y viscosidad de la mezcla.

- Finalización de la Reacción

Una vez completado el tiempo de reacción, apagar la placa calefactora y el agitador magnético.

Dejar que la mezcla se enfríe a temperatura ambiente.

Observar la separación de fases: el biodiésel (fase superior) y el glicerol (fase inferior).

- Separación y Purificación

Utilizar un embudo de decantación para separar la fase superior de biodiésel de la fase inferior de glicerol.

Si es necesario, lavar el biodiésel con agua para eliminar impurezas residuales, repitiendo este paso varias veces si es necesario.

- Almacenamiento

Transferir el biodiésel a un recipiente limpio y hermético.

Procedimiento realizado en ANEXO Q, ANEXO R y ANEXO S.

## **4.19 Caracterización del FAME**

### **4.19.1 Detección y cuantificación:**

El detector más comúnmente utilizado en cromatografía de gases, es el detector de ionización de llama (FID), que produce una señal proporcional a la cantidad de compuesto presente en la muestra.

Los picos cromatográficos resultantes se integran para determinar la cantidad de cada ácido graso presente en la muestra. (Hemming & Parsons, 1963)

### **4.19.2 Identificación de ácidos grasos:**

Los ácidos grasos presentes en la muestra se identifican por su tiempo de retención, que es característico de cada compuesto en condiciones específicas de análisis.

Los tiempos de retención se comparan con los de estándares de referencia para confirmar la identidad de cada ácido graso. (Hemming & Parsons, 1963)

### **4.19.3 Interpretación de resultados:**

Los resultados obtenidos del análisis cromatográfico proporcionan información sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos presentes en las microalgas.

Esta información es útil para determinar la calidad nutricional y el potencial de los lípidos como materia prima para la producción de biocombustibles, alimentos funcionales y otros productos de interés industrial.

## CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 CONFIGURACIÓN DEL FOTOBIOREACTOR

Dado que la producción de aceite de microalgas está estrechamente ligada a la cantidad de biomasa, en primer lugar, se determinó la biomasa requerida para distintas especies con diferentes niveles de contenido lipídico: bajo, medio y alto. Se seleccionó la especie de microalga a cultivar en función del porcentaje de contenido lipídico, considerando que este debería ser superior al 5% del peso de la biomasa seca para obtener biocombustibles, según investigaciones realizadas en la Universidad de Cádiz-UCA.

Por ejemplo, en el caso de *Chlorella Vulgaris*, que tiene un contenido lipídico mínimo del 5%, se necesitará:

$$m_{bs} = \frac{100 * 30 [ml \text{ lipidos}] * 0,912 \left[ \frac{g \text{ lipidos}}{ml \text{ lipidos}} \right]}{5 \left[ \frac{g \text{ lipidos}}{g \text{ biomasa seca}} \right]}$$
$$m_{bs} = 547,2 [g \text{ biomasa seca}]$$

Se consideran un rango de 5 al 58% para obtener 30 ml de aceite crudo de microalga. y los resultados se presentan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

**Tabla 6. Contenido de lípidos en gr. de *Chlorella Vulgaris* para obtener 30 ml de aceite crudo.**

| ESPECIE                   | CONTENIDO DE LIPIDOS<br>(BASE SECA DE BIOMASA) [%]<br>(Milano, 2016) | BIOMASA<br>TEORICA (g) |
|---------------------------|--|------------------------|
| <i>Chlorella Vulgaris</i> | 5 - 58   | 547,20 – 47,17         |

Fuente: Elaboración a partir de la Tabla 2.

Considerando tanto el escenario más favorable como el menos favorable, el Reactor de Lecho Fluidizado (FBR, fotobioreactor) deberá generar al menos entre 60 y 70 g de biomasa respectivamente.

Se estima que la productividad volumétrica de biomasa varía entre 0,200 y 0,500 ( $g/l - d$ ), según los datos bibliográficos disponibles.

Para lograr una producción de biomasa de 60 g de una especie con una productividad volumétrica de 0,200  $g/l - d$  y un tiempo de cosecha promedio de 20 días, se calculó el volumen del fotobiorreactor (FBR) de la siguiente forma:

$$V_{FBR} = \frac{60 [g \text{ biomasa seca}]}{0,200 \left[ \frac{g \text{ biomasa seca}}{l \text{ cultivo} * d \text{ cultivo}} \right] * 20[d \text{ cultivo}]}$$

$$V_{FBR} = 15 [l]$$

El volumen de 15 litros representa el volumen efectivo del cultivo, pero se debe tener en cuenta un espacio adicional necesario debido a la formación de vórtices causados por la agitación. Por lo tanto, para obtener el volumen real del Reactor de Lecho Fluidizado (FBR, fotobiorreactor), se aumenta un 12,5 % respecto al volumen efectivo, como sugiere (Conesa, 2006). Esto significa que se necesitaría un FBR de 15 litros.

Finalmente, se calculó el volumen de cultivo requerido para alcanzar una biomasa de 60 y 70 gramos, considerando las productividades volumétricas mínima y máxima. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 7. Volumen real del fotobiorreactor para generar.**

| <b>PRODUCTIVIDAD VOLUMETRIC DE BIOMASA (<math>g/l - d</math>)</b> | <b><math>V_{FBR}</math> (l) para generar 60 g de biomasa</b> | <b><math>V_{FBR}</math> (l) para generar 70 g de biomasa</b> |
|---|--|--|
| <b>0,200</b>  | 16,875 $\approx$ 17  | 19,69 $\approx$ 20   |
| <b>0,500</b>  | 6,75 $\approx$ 4   | 7,875 $\approx$ 8  |

Fuente: Elaboración a partir del cálculo para el volumen del fotobiorreactor.

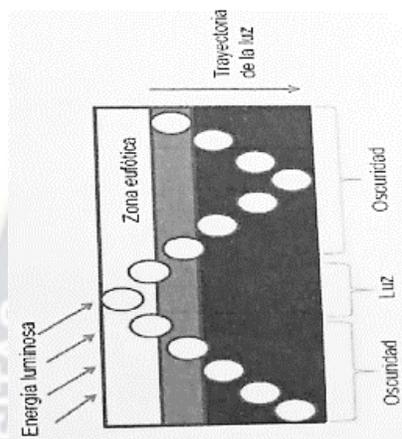
Por lo tanto, se requieren Fotobiorreactores (FBR) con capacidades volumétricas de 4, 8, 17 y 20 litros, respectivamente. Estos datos de referencia se consideraron para el escalado del proceso. Se decidió construir FBR de 5 y 20 litros.

Para llevar a cabo los cultivos en FBR de 20 litros, primero se realizó un escalado previo utilizando sistemas de 100, 500 y 5000 ml. Finalmente, se realizaron los cultivos en los FBR de 20 litros.

### **La limitación de iluminación debido a la atenuación o saturación de luz.**

Se analizó la limitación de iluminación debido a la atenuación o saturación lumínica. Para los biorreactores de 20 litros, se tomó en cuenta el nivel máximo de saturación lumínica (ver Figura 17), que según la bibliografía (Cervantes, 2010) no debería superar los 20 cm de profundidad.

**Figura 17. Distribución de la luz dentro de un fotobiorreactor.**



Fuente: Adaptado de Cervantes (2010)

Los fotobiorreactores de lecho fluidizado (FBR) son utilizados comercialmente en diversos lugares donde, generalmente, se dispone de menos de 30 centímetros de profundidad para el cultivo de microalgas. Se ha observado que a medida que se incrementa la profundidad del lecho, la iluminancia disminuye. Por ejemplo, para un fotobiorreactor de menos de 30 cm de profundidad, la iluminancia es de aproximadamente 54,3 klx (Janssen, 2002).

En la tabla 8, se detallan los volúmenes y propiedades de la resistencia a la iluminación de los sistemas adquiridos.

**Tabla 8. Fotobiorreactores para cultivo**

| 100 ml                              |                                  |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Material</b>                     | Vidrio Pirex (Matraz Erlenmeyer) |
| <b>Volumen Total</b>                | 100 ml                           |
| <b>Volumen efectivo</b>             | 100 ml                           |
| <b>Resistencia a la iluminación</b> | No determinado                   |



| 500 ml                              |                                  |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Material</b>                     | Vidrio Pirex (Matraz Erlenmeyer) |
| <b>Volumen Total</b>                | 500 ml                           |
| <b>Volumen efectivo</b>             | 500 ml                           |
| <b>Resistencia a la iluminancia</b> | No determinado                   |



| 5000 ml                             |                            |
|-------------------------------------|----------------------------|
| <b>Material</b>                     | Vidrio (Matraz Erlenmeyer) |
| <b>Volumen Total</b>                | 5000 ml                    |
| <b>Volumen efectivo</b>             | 5000 ml                    |
| <b>Resistencia a la iluminancia</b> | No determinado             |



| 20000 ml                            |                |
|-------------------------------------|----------------|
| <b>Material</b>                     | Plastico       |
| <b>Volumen Total</b>                | 20000 ml       |
| <b>Volumen efectivo</b>             | 20000 ml       |
| <b>Resistencia a la iluminancia</b> | No determinado |



Fuente: Elaboración a partir de volúmenes de fotobiorreactores adquiridos.

## 5.2 Cultivo de microalgas en medio sintético

### 5.2.1.1.1 Recolección de muestras

Se tomaron muestras de agua del Altiplano paceño para recolectar microalgas nativas. Cada muestra fue identificada con un código y se registraron los parámetros físico-químicos, así como la ubicación geográfica, la altitud y la fecha de muestreo (Tabla 9). Las muestras fueron transportadas en bote, y las limitaciones incluyeron las distancias entre cada punto de recolección, las cuales se registraron utilizando un sistema de muestreo y se determinaron las coordenadas geográficas mediante un Sistema de Posicionamiento Global (GPS).

**Tabla 9. Datos In- situ de muestreo de Lago Titicaca.**

Lago Titicaca - Altiplano Paceño (sector Copacabana)  
 Fecha de muestreo: 16/09/2023  
 ALTURA: 3834 msnm  
 Temperatura: 16.7 y 17.2 °C

| PUNTO   | LATITUD (GPS) | LONGITUD (GPS) | UTM<br>19K(ESTE) | UTM<br>(NORTE) |
|---------|---------------|----------------|------------------|----------------|
| PUNTO 1 | 16°09'29,6" S | 69°04'59" O    | 491122,2         | 8213561,3      |
| PUNTO 2 | 16°09'30,3" S | 69°04'59,5" O  | 491104,7         | 8213538,5      |
| PUNTO 3 | 16°09'31" S   | 69°05'0,1" O   | 491088,5         | 8213518,9      |
| PUNTO 4 | 16°09'31,2" S | 69°05'1,4" O   | 491048,3         | 8213512,2      |
| PUNTO 5 | 16°09'32,6" S | 69°05'1" O     | 491060,6         | 8213469,4      |
| PUNTO 6 | 16°09'29,1" S | 69°04'56,1" O  | 491205,5         | 8213576        |

Fuente: Elaboración Propia registradas en Lago Titicaca

Se tomaron muestras de agua en seis ubicaciones distintas del Lago Titicaca, y se registraron las coordenadas geográficas usando sistemas GPS y UTM.

**Figura 18. Sector Geográfico donde se tomaron las Muestras**



Fuente: Google Maps

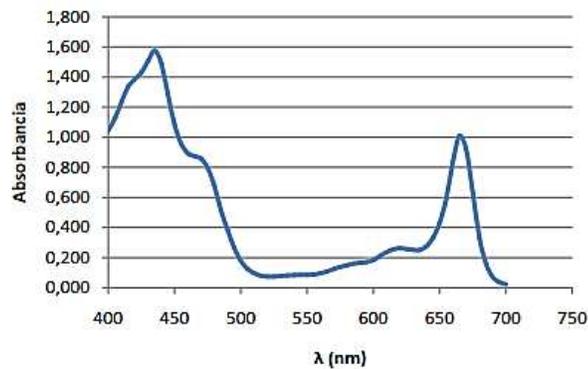
Las muestras recolectadas mostraban las siguientes condiciones:

El pH se situaba en un rango entre 8.38 y 9.04. La temperatura, medida entre las 11:00 y las 14:00 horas, fluctuaba entre 16.7 y 17.2 °C durante el mes de septiembre. La salinidad se mantenía en un 0% debido a que el Lago Titicaca es un cuerpo de agua dulce.

### 5.2.1.1.2 Análisis de las muestras

Los datos proporcionados muestran los máximos de absorción para un tejido vegetal sano, donde se registran valores de 1,600 en 450 nm (azul) y de 1,000 en 665 nm (rojo) (Figura 19). Estos máximos de absorción indican qué longitudes de onda son más eficientemente absorbidas por el tejido vegetal. Es importante destacar que, aunque todos los cromóforos presentes contribuyen a la absorción total reflejada en el espectro, la absorción está principalmente determinada por las clorofilas. En una planta en estado sano, las clorofilas están en mayor proporción, siendo la clorofila a la más abundante (Alfaro Vives, 2008).

**Figura 19. Absorbancia vs longitud de onda asociada a las muestras Extraídas del lago Titicaca**



Fuente: Elaboración a partir del análisis de muestra en espectrofotómetro.

Este análisis sugiere que el tejido vegetal es altamente eficiente en la absorción de luz azul (450 nm) y roja (665 nm). Estos picos de absorción coinciden con los máximos de eficiencia fotosintética, ya que las clorofilas, especialmente la clorofila a, son los principales pigmentos fotosintéticos responsables de la captura de energía luminosa para la fotosíntesis. La alta absorción en estas longitudes de onda sugiere una salud óptima de las plantas y una capacidad fotosintética activa.

## 5.2.2 Aislamiento

### 5.2.2.1 Aislamiento en medio sintético sólido

Según (UNP, 2011), los principales requisitos para un cultivo son los siguientes:

**Tabla 10. Parámetros para el aislamiento en medio sólido**

| PARÁMETRO   | VALOR     | UNIDADES |
|-------------|-----------|----------|
| ILUMINANCIA | 2000-4000 | lx       |
| TEMPERATURA | 15 - 28   | °C       |
| PH          | 7-9       |          |

Fuente: (UNP, 2011)

Para cumplir con estos requisitos, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Se utilizó un sistema, mostrado en la figura 20, para mantener una temperatura media de  $26 \pm 1$  °C. Este sistema consiste en un recipiente térmico de plastofomo equipado con un foco fluorescente y un ventilador para la circulación del aire.

El pH del medio se ajustó a alrededor de 7 utilizando almidón de papa y nitrofoska.

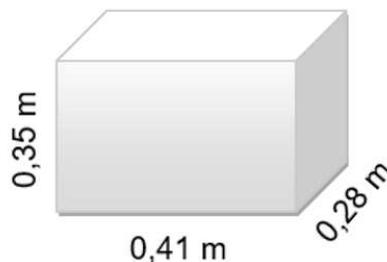
Dado que no teníamos un luxómetro disponible, se determinó la iluminancia del sistema utilizando el método que se describe a continuación.

- a) Se desarrollaron incubadoras para aislar macroalgas en medios sólidos. Se propuso una analogía con el cálculo utilizado en el diseño de la iluminación interior (Raitelli, 2011), donde se aplicó el método del coeficiente de utilización para determinar la iluminación en la superficie del recipiente.

$$E = \frac{n * \varphi_T * F_u * M}{S}$$

Se asegura una limpieza continua y un buen mantenimiento de la fuente de luz, con un factor de utilización (M) de 0,95, lo que implica una lámpara por recipiente o incubadora. Los focos fluorescentes, emiten 900 lúmenes cada uno.

**Figura 20. Especificaciones de la incubadora para el cultivo de microalgas.**



Fuente: Elaboración propia a partir de las dimensiones del sistema encontrado.

## b) Factor de utilización

Es esencial establecer el índice local y definir la reflectancia de las paredes y el techo del recipiente. Se optó por un valor de reflectancia del 70% para ambos, ya que el interior del recipiente es de color blanco y la trayectoria de la luz no es larga.

Para calcular el índice local se utiliza:

$$k = 5 * h * \frac{l + a}{l * a}$$

$$k = 5 * 0.35 * \frac{0.41 + 0.28}{0.41 * 0.28}$$

$$k = 10.4 \approx 10$$

Consultando la tabla 5, se obtiene:

Factor de utilización:

$$Fu = 0,28$$

La superficie del área de trabajo  $S = 0,115 \text{ m}^2$ . Finalmente, utilizando la ecuación, se calcula la iluminancia media en la base del recipiente.

$$E = \frac{1 * 900 [\text{lumen}] * 0,28 * 0,95}{0,115} = 2,1[\text{klx}]$$

La iluminación determinada se ajusta a los niveles requeridos (entre 2000 y 4000 lux) según las especificaciones de (UNP, 2011). Por consiguiente, se utilizó una bombilla de 12 W para la incubación y el cultivo de las especies de microalgas. Esta medida permitió mantener la temperatura dentro del sistema en torno a los 26 °C.

**Figura 21. Se emplearon incubadoras para el cultivo de microalgas**



Fuente: Fotografía tomada en domicilio, El Alto, Distrito 7.

Una vez que se completó la construcción del sistema, se inició el cultivo en medio sólido, como se detalla en la sección 4.7 y se describen las condiciones de cultivo en la Tabla 11.

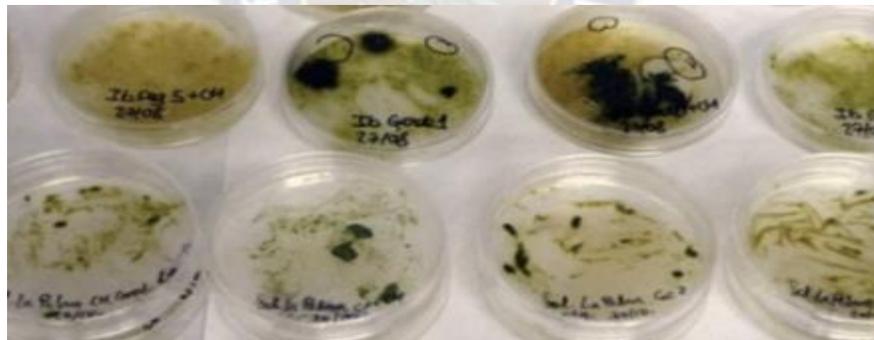
**Tabla 11. Características y parámetros del cultivo en medio sintético.**

| PARÁMETRO   | VALOR  | UNIDADES |
|-------------|--------|----------|
| ILUMINANCIA | 2,1    | klx      |
| TEMPERATURA | 26 ± 1 | °C       |
| FOTOPERIODO | 24:0   | h        |

Fuente: Elaboración a partir de la sección 4.7

El crecimiento microalgal en almidón y nitrofoska se manifiesta entre el tercer y décimo día posterior a la inoculación. Esto está relacionado con la densidad celular algal (DCA) en las muestras tomadas.

**Figura 22. Cultivo de microalgas nativas del lago Titicaca en medio sintético sólido.**



Fuente: Fotografías tomadas en domicilio, El Alto, distrito 7.

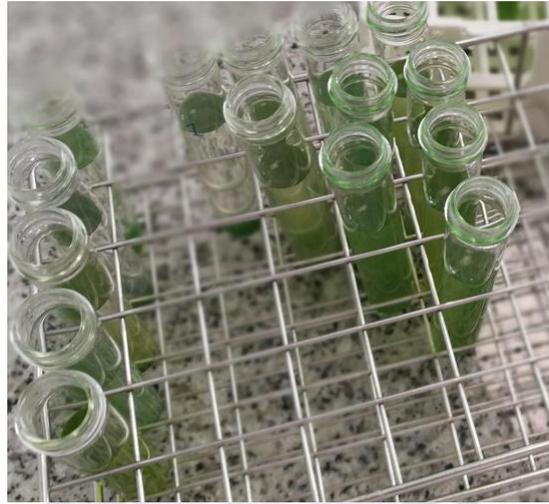
Se llevó a cabo el cultivo hasta lograr la separación de colonias, lo cual simplifica el proceso de aislamiento en el "Inoculación al medio líquido" desarrollado en este estudio.

#### **5.2.2.2 Inoculación del medio sólido al medio líquido**

Después de realizar el repique siguiendo las indicaciones de la sección 4.8, los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones estándar de 2,1 klx, 26 °C y un fotoperiodo de 24

horas de luz y 0 horas de oscuridad (condiciones de origen). Se observó la aparición de microalgas, evidenciada por un medio de color verde tenue (Figura 23), y se llevaron a cabo observaciones microscópicas para confirmar el crecimiento de una sola cepa (monocultivos).

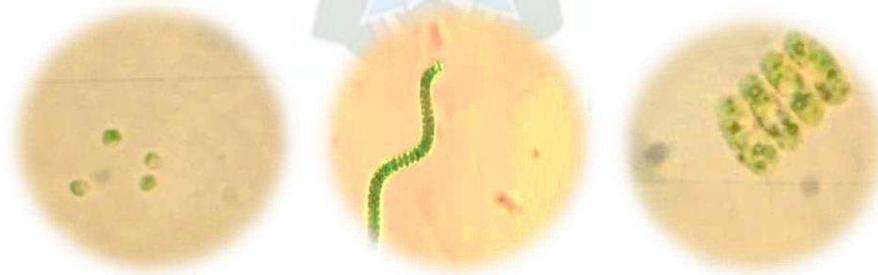
**Figura 23. Microalgas presentes en cultivos en medio líquido.**



Fuente: Fotografías tomadas en domicilio, El Alto, distrito 7.

Después de llevar a cabo múltiples ciclos de aislamiento, se logró aislar 3 monocultivos de microalgas provenientes del medio de cultivo sólido. En esta etapa, se preparó un medio de cultivo convencional específico para cada especie microalgal, como se muestra en la Figura 24.

**Figura 24. Especies de microalgas aisladas del Lago Titicaca.**



Fuente: Fotografías tomadas con microscopio en Carrera de Gas y Petroquímica UPEA.

El medio Bold Basal ha demostrado ser altamente efectivo para la mayoría de las especies microalgales aisladas, como se evidencia en la figura 24. Varios estudios (Watanabe, 2005) han confirmado que especies como *Stigeoclonium pascheri*, *Chlorococcum* sp., ***Chlorella***, y *Scenedesmus* sp., tienen un buen desarrollo en este medio, que es ampliamente utilizado para la producción de biomasa celular. Los resultados obtenidos en este proyecto confirman la eficacia del medio Bold Basal en la propagación y selección de diferentes especies microalgales aisladas.

### 5.2.3 Preparación del inóculo

Después de cultivar 10 ml mediante la siembra de 1 ml de cultivo madre, se preparó un inóculo de 100 ml.

Para determinar la cantidad de aire necesaria para el cultivo, considerando la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire y la agitación por aireación, se calculó el flujo de gas ( $F_g$ ) que se suministrará al sistema. Esto se realizó utilizando una bomba de 35 W de potencia, que proporcionó 0,5 vvm (volúmenes de aire por volumen de cultivo-min).

$$F_v = \frac{1}{v_c} * F_g$$

Con un volumen de cultivo de 100 ml y una tasa de 0,5 vvm, se calculó el flujo de aire que se debe suministrar al sistema. Se busca proporcionar un flujo de aire de:

$$F_g \left[ \frac{l}{min} \right] = 0.1[l cultivo] * 0.5 \left[ \frac{l aire}{l cultivo * min} \right] = 0.05 \left[ \frac{l aire}{min} \right] = 50 \left[ \frac{ml aire}{min} \right]$$

Vamos a realizar una medición de la velocidad del aire en un conducto de 3 mm, lo que nos permitirá calcular la velocidad del aire en metros por segundo.

$$v = \frac{F_g}{A_t}$$

$$v = \frac{0.05 \left[ \frac{l}{min} \right] * \left[ \frac{m^3}{10^3 l} \right] * \left[ \frac{min}{60 seg} \right]}{\pi * \frac{(3 * 10^{-3})^2}{4} [m^2]} = 0.12 \left[ \frac{m}{s} \right]$$

Con base en los datos anteriores, se llevó a cabo la primera subcultura de cultivos aislados, comenzando con 1 ml de cultivo y aumentándolo hasta 100 ml en la

preparación del inóculo. En resumen, las condiciones utilizadas se detallan en la tabla 12.

**Tabla 12. Características y parámetros del cultivo.**

| PARÁMETRO          | SÍMBOLO   | CANTIDAD | UNIDADES |
|--------------------|-----------|----------|----------|
| VOLUMEN DEL FBR    | $V_{FBR}$ | 100      | ml       |
| VOLUMEN DE INOCULO | $V_i$     | 1        | ml       |
| VOLUMEN DE CULTIVO | $V_c$     | 100      | ml       |
| ILUMINANCIA        | E         | 3000     | lx       |
| TEMPERATURA        | T         | 26 ±1    | C        |
| FOTOPERIODO        | $F_p$     | 24:0     | h        |
| FLUJO DE AIRE      | $F_g$     | 0,5      | vvm      |

Fuente: Elaboración propia

La proliferación celular comenzó a ser evidente el segundo día después de la inoculación (Figura 25). Los cultivos muestran una tonalidad verdosa debido a la síntesis de clorofila, y con el paso del tiempo, la concentración se incrementa.

**Figura 25. Cultivos de referencia para el crecimiento (inóculos).**



Fuente: Elaboración propia en domicilio, El Alto, distrito 7

Es importante destacar que durante esta etapa de la investigación se trabajó con el máximo nivel de asepsia posible para asegurar la estabilidad del inóculo.

## 5.2.4 Identificación

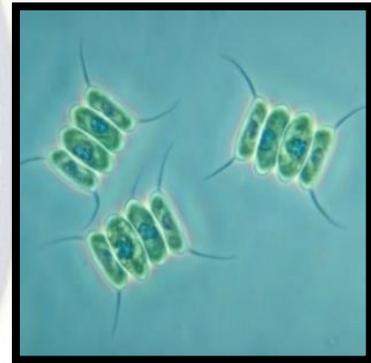
### 5.2.4.1 Caracterización Morfológica para identificación

La identificación morfológica se realizó utilizando un microscopio, examinando diversas secciones del portaobjetos que contenía la muestra in vitro. Se extrajeron muestras de los cultivos obtenidos del inóculo y, al mismo tiempo, se tomaron varias fotografías (Figura 26) para compararlas con referencias de la literatura (Ashish Bhatnagar, 2010), (Watanabe, 2005) y (Issa, 1995). Para conservar las cepas de microalgas, se colocaron en tubos con su medio correspondiente a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

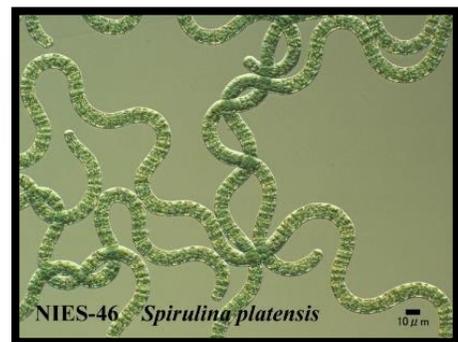
**Figura 26. Se realizó la identificación morfológica de microalgas (Scenedesmus sp., Spirulina platensis, Chlorella Vugaris)**

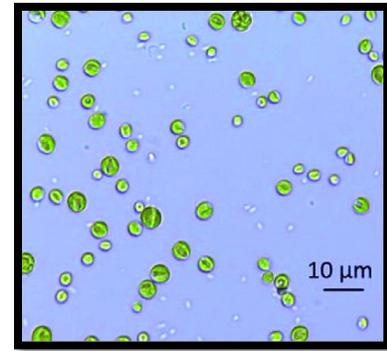


Scenedesmus sp



Spirulina platensis





Chlorella Vugaris

Fuente: Fotografía microscopio Zuzy serie E y (Ashish Bhatnagar, 2010), (Watanabe, 2005) y (Issa, 1995)

Tras realizar la observación morfológica en el Laboratorio. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 13.

**Tabla 13. Identificación de microalgas**

| <b>CÓDIGO</b> | <b>MEDIO DE CULTIVO</b> | <b>NOMBRE DE LA ESPECIE</b> |
|---------------|-------------------------|-----------------------------|
| <b>I</b>      | Bold Basal              | Chlorella Vulgaris          |
| <b>II</b>     | Bold Basal              | Chlorella Vulgaris          |
| <b>III</b>    | Bold Basal              | Spirulina platensis         |
| <b>IV</b>     | Bold Basal              | No Identificado             |
| <b>V</b>      | Bold Basal              | Spirulina platensis         |
| <b>VI</b>     | Bold Basal              | No Identificado             |
| <b>VII</b>    | Bold Basal              | No Identificado             |
| <b>VIII</b>   | Bold Basal              | Scendesmus sp.              |
| <b>IX</b>     | Bold Basal              | Chlorella Vulgaris          |
| <b>X</b>      | Bold Basal              | Scendesmus sp.              |

Fuente: Elaboración propia

La identificación de las especies de microalgas ha permitido confirmar la diversidad del fitoplancton en el país, y este estudio servirá como base para investigaciones futuras. Además, facilitará la comparación con otras investigaciones que hayan trabajado con las mismas especies. Se identificaron tres microalgas del género *Chlorella*, cuya morfología es claramente reconocible. Se observó que la mayoría de las cepas aisladas corresponden a la división Chlorophyta y, en particular, al género *Chlorella*, según la clasificación de (Richmond A. , 2004)

DIVISIÓN: Chlorophyta

CLASE: Chlorophyceae

ORDEN: Chlorococcales

GÉNERO: *Chlorella*

Especies:

- *Chlorella Fusca*
- *Chlorella Fusca* Var. *Rubescens*
- *Chlorella Homosphaera*
- *Chlorella Kessleri*
- *Chlorella Luteorivida*
- *Chlorella Minutissima*
- *Chlorella Protothecoides*
- *Chlorella Saccarophila*
- *Chlorella Vulgaris*
- *Chlorella Vulgaris Fortertia*

Es posible que las cepas no identificadas se asocien con alguna de las cepas mencionadas previamente.

### **5.2.5 Estimación de la densidad celular algal**

La principal ventaja de utilizar un banco de diluciones seriadas es su simplicidad en los cálculos. Solo se requiere conocer la concentración inicial, el volumen deseado para cada dilución y el factor de dilución.

Se asume que el volumen necesario es el mismo para todas las concentraciones y varía según el experimento. Es fácil ver que el volumen final obtenido de cada concentración es igual al volumen fijo de solvente ( $V_f$ ) que se carga en todos los tubos del banco.

El factor de dilución se calcula o se estima considerando las concentraciones máxima y mínima que se desean estudiar, así como el número de concentraciones diferentes que se pretenden obtener.

El conteo de cel./ml se lo realizo con microscopio y una cámara de Neubauer.

El cálculo de las concentraciones en los tubos sucesivos es tan simple como multiplicar la concentración del tubo anterior por el factor de dilución. Por ejemplo, si queremos obtener concentraciones de microalgas en células por mililitro (cel./ml), y el factor de dilución es 10, la concentración en el segundo tubo sería 10 veces menor que en el primero, y así sucesivamente.

Después de cultivar 10 muestras de 10 ml mediante la siembra de 1 ml de cultivo madre, se preparó 6 cultivos con 6 de esos 10 ml en un volumen total de 100 ml. Para calcular la densidad celular algal, se toma una muestra representativa llamada alícuota de 10 ml de cada cultivo inicial de 100 ml.

**Tabla 14. Determinación de la densidad celular algal de 6 muestras.**

|                      |     |    |
|----------------------|-----|----|
| VOLUMEN FIJO         | 9   | ml |
| VOLUMEN DE PASO      | 1   | ml |
| FACTOR DE DILUCION   | 0,1 |    |
| NUMERO DE DILUCIONES | 5   |    |

| DIA 0 = 0 HORAS       | MUESTRA 1 CEL./ML | MUESTRA 2 CEL./ML | MUESTRA 3 CEL./ML | MUESTRA 4 CEL./ML | MUESTRA 5 CEL./ML | MUESTRA 6 CEL./ML |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| CONCENTRACION FINAL   | 31                | 35                | 29                | 34                | 31                | 34                |
| CONCENTRACION INICIAL | 3,10E+06          | 3,50E+06          | 2,90E+06          | 3,40E+06          | 3,10E+06          | 3,40E+06          |

Fuente: Elaboración propia a partir de Datos de Conteo de Células y dilución seriada.

De los cuatro métodos mencionados, se recomienda el uso de Densidad Óptica (Sheng-Yi, 2009) mediante disoluciones seriadas, para cuantificaciones rápidas, mientras que el recuento celular (Alpha A., 1995) para el cultivo es una cámara de Neubauer (Padovan, 1992) para cultivos en medio sintético.

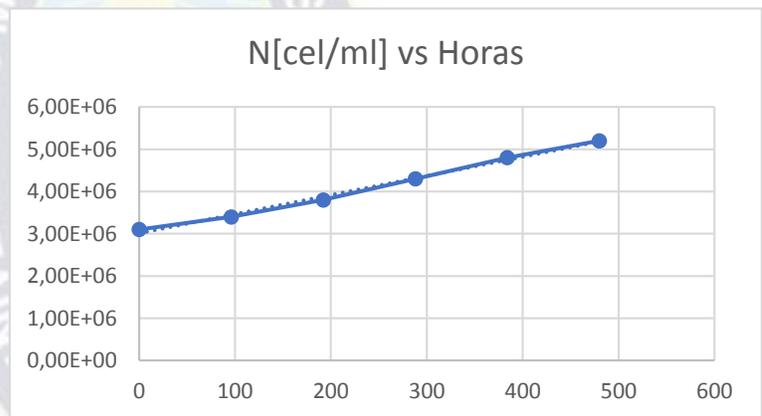
### 5.2.5.1 Curva de crecimiento de referencia

Se llevó a cabo un seguimiento diario del crecimiento celular (Densidad Celular Algal, DCA) de 6 muestras de *Chlorella Vulgaris* durante 20 días, utilizando curvas de calibración que se presentarán a continuación en la tabla 15.

**Tabla 15. Seguimiento de Crecimiento celular.**

#### Curva referencial de la Muestra 1

| Muestra 1 |           |
|-----------|-----------|
| Tiempo    | N[cel/ml] |
| 0         | 3,10e+06  |
| 96        | 3400000   |
| 192       | 3800000   |
| 288       | 4300000   |
| 384       | 4800000   |
| 480       | 5200000   |

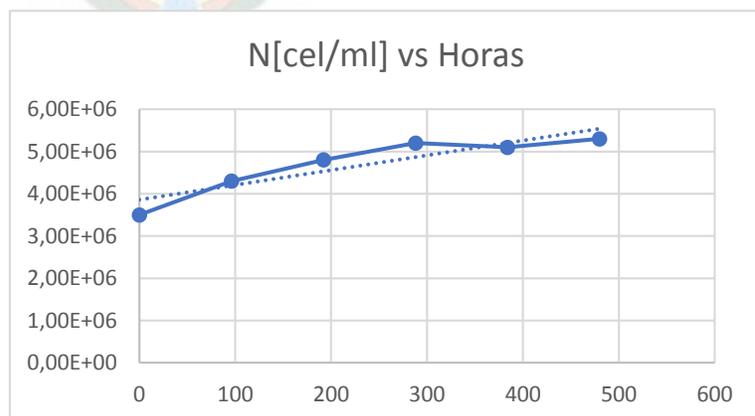


$$N \left[ \frac{cel}{ml} \right] = 4523,8 * (t[horas]) + 3E + 06$$

$$R^2 = 0,9941$$

#### Curva referencial de la Muestra 2

| Muestra 2 |           |
|-----------|-----------|
| Tiempo    | N[cel/ml] |
| 0         | 3,50e+06  |
| 96        | 4300000   |
| 192       | 4800000   |
| 288       | 5200000   |
| 384       | 5100000   |
| 480       | 5300000   |

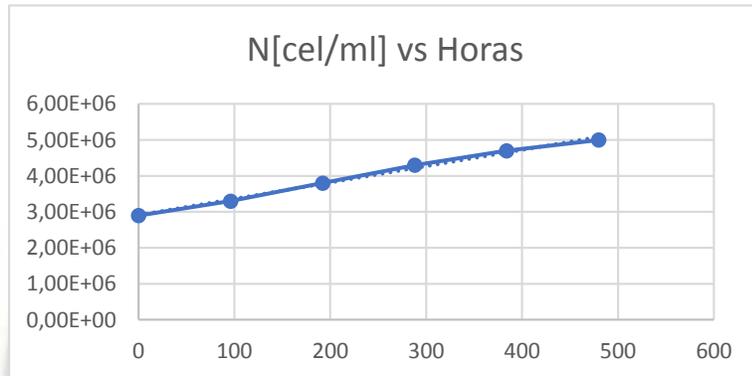


$$N \left[ \frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right] = 3511,9 * (t[\text{horas}]) + 4E + 06$$

$$R^2 = 0,8358$$

### Curva referencial de la Muestra 3

| Muestra 3 |           |
|-----------|-----------|
| Tiempo    | N[cel/ml] |
| 0         | 2,90E+06  |
| 96        | 3300000   |
| 192       | 3800000   |
| 288       | 4300000   |
| 384       | 4700000   |
| 480       | 5000000   |

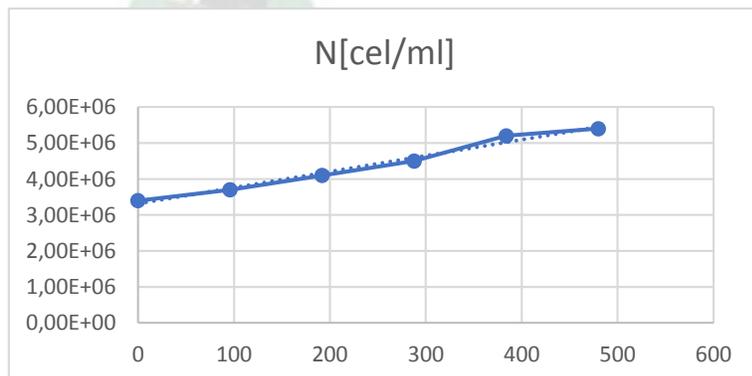


$$N \left[ \frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right] = 4523,8 * (t[\text{horas}]) + 3E + 06$$

$$R^2 = 0,9941$$

### Curva referencial de la Muestra 4

| Muestra 4 |           |
|-----------|-----------|
| Tiempo    | N[cel/ml] |
| 0         | 3,40E+06  |
| 96        | 3700000   |
| 192       | 4100000   |
| 288       | 4500000   |
| 384       | 5200000   |
| 480       | 5400000   |

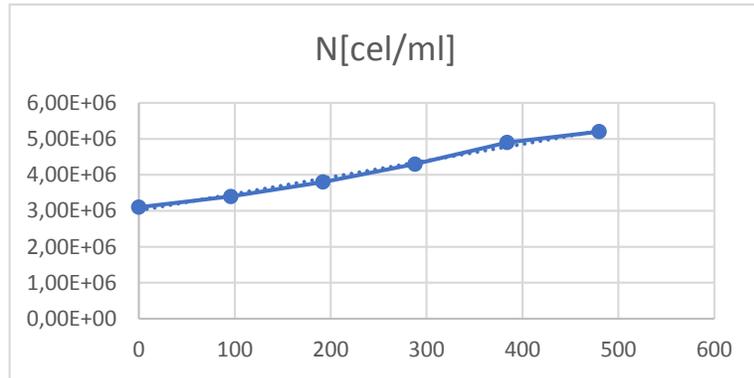


$$N \left[ \frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right] = 4434,5 * (t[\text{horas}]) + 3E + 06$$

$$R^2 = 0,9824$$

### Curva referencial de la Muestra 5

| Muestra 5 |           |
|-----------|-----------|
| Tiempo    | N[cel/ml] |
| 0         | 3,10E+06  |
| 96        | 3400000   |
| 192       | 3800000   |
| 288       | 4300000   |
| 384       | 4900000   |
| 480       | 5200000   |

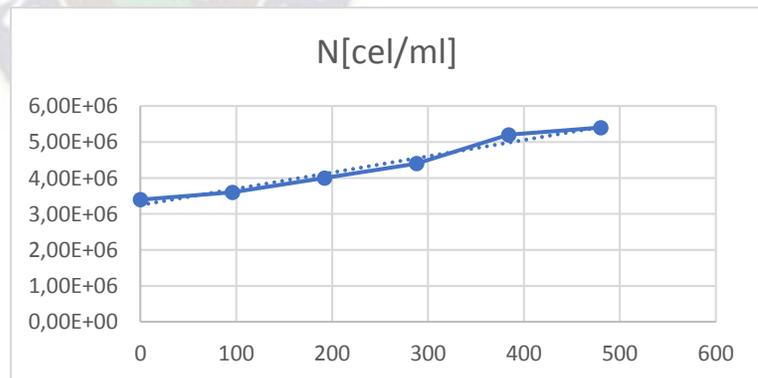


$$N \left[ \frac{cel}{ml} \right] = 4613,1 * (t[horas]) + 3E + 06$$

$$R^2 = 0,9896$$

### Curva referencial de la Muestra 6

| Muestra 6 |           |
|-----------|-----------|
| Tiempo    | N[cel/ml] |
| 0         | 3,40E+06  |
| 96        | 3600000   |
| 192       | 4000000   |
| 288       | 4400000   |
| 384       | 5200000   |
| 480       | 5400000   |

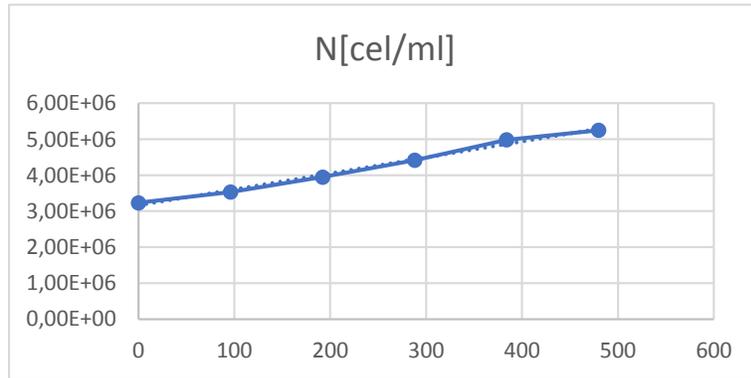


$$N \left[ \frac{cel}{ml} \right] = 4523,8 * (t[horas]) + 3E + 06$$

$$R^2 = 0,9670$$

### Curva referencial de la Muestra Promedio

| Curva Promedio |           |
|----------------|-----------|
| Tiempo         | N[cel/ml] |
| 0              | 3,23e+06  |
| 96             | 3,53e+06  |
| 192            | 3,95e+06  |
| 288            | 4,42e+06  |
| 384            | 4,98e+06  |
| 480            | 5,25e+06  |



$$N \left[ \frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right] = 4434,5 * (t[\text{horas}]) + 3E + 06$$

$$R^2 = 0,9912$$

Fuente: Elaboración a partir de datos de conteo de células y diluciones seriadas.

En la Tabla 16 se presenta un resumen de la duplicación del cultivo referencial y la cinética de crecimiento elaboradas con las siguientes ecuaciones.

$$\mu = \frac{\ln(N_f) - \ln(N_0)}{t_f - t_0} \quad t_d = \frac{0,6931}{\mu} [d]$$

**Tabla 16. Tasa cinética de crecimiento.**

|                         | $\mu$ (1/DÍAS) | $\tau$ (DÍAS) |
|-------------------------|----------------|---------------|
| <b>MUESTRA 1</b>        | 0,027          | 26            |
| <b>MUESTRA 2</b>        | 0,022          | 32            |
| <b>MUESTRA 3</b>        | 0,029          | 24            |
| <b>MUESTRA 4</b>        | 0,024          | 29            |
| <b>MUESTRA 5</b>        | 0,027          | 26            |
| <b>MUESTRA 6</b>        | 0,024          | 29            |
| <b>MUESTRA PROMEDIO</b> | 0.026          | 27            |

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de la Tabla 15

Se observa que no hay mucha diferencia entre los valores de cada tasa cinética de crecimiento, lo cual sugiere que en los 6 casos se tratan de la misma cepa de microalgas. Existe un crecimiento notable en el caso de las muestras 3 y 5, pero en el caso de la muestra 2 se observa un crecimiento algo lento, pero con poca diferencia.

**Figura 27. Comparación de los cultivos en el día de inoculación y al final del cultivo.**



Fuente: Fotografías de cultivos realizados en domicilio, El Alto, distrito 7

### **5.3 Medio voluminoso para Cultivo de microalgas**

#### **5.3.1 Selección de medio de cultivo voluminoso**

La producción del material celular de microalgas se lleva a cabo siguiendo la ecuación estequiométrica propuesta por (Alfaro Vives, 2008)

La ecuación química propuesta es:



Es crucial contar con fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo en los medios de cultivo. Por esta razón, se prefiere utilizar sustratos que contengan estas fuentes, como la urea, nitrofoska y el fosfato Di amónico, al formular los diferentes medios de cultivo.

#### **a) Medios de cultivo**

Los medios de cultivo modificados utilizados se detallan a continuación. Medio de cultivo voluminoso

Medios de cultivo: Fertilizantes agrícolas

Nro. de nutrientes: 4

Ph: 7-8

Se requirió a la empresa EPSAS información sobre la presencia de ciertos metales para comparar los resultados obtenidos en el laboratorio. Una parte de este informe se presenta en la Tabla 17.

**Tabla 17. Composición de metales en agua.**

| Hierro total [mg/l] | Cobre [mg/l] | Manganeso [mg/l] | Cromo total [mg/l] | Zinc [mg/l] | Sodio [mg/l] |
|---------------------|--------------|------------------|--------------------|-------------|--------------|
| 0,037               | 0,0005       | 9,56             | 0,0005             | 0,021       | 5,228        |

Fuente: Reporte de EPSAS ANEXO V.

**b) Dosificación de aire**

El flujo de aire utilizado fue de 1 vvm, con el objetivo de garantizar la uniformidad en el medio. Se realizaron pruebas preliminares con flujos inferiores a 0.5 vvm, lo que resultó en una disminución en el crecimiento celular debido a la acumulación de colonias sedimentadas en el fondo del recipiente.

**c) Iluminancia**

Se decidió ubicar los recipientes de cultivo a una distancia aproximada de 10 cm del tubo fluorescente, colocándolos de manera perpendicular al mismo. El objetivo era proporcionar una iluminación media de 15,180 klx en las paredes de los recipientes, según las mediciones centrales sin tener en cuenta los extremos. Respecto a la relación entre la fuente de luz y el recipiente (llamada  $R_a$ , resistencia a la iluminancia por la distancia muy corta, 3 mm), se asignó un valor de cero debido a que se considera una distancia mínima entre la fuente y el recipiente de cultivo.

$$E_f = E_o - R_a - R_m$$

$$E_f = 15,180 - 0 - 7,692 \cong 7,500 [klx]$$

Se optó por establecer una iluminancia aproximada de 7,5 klx en el contenedor, considerando la resistencia entre la película del medio de cultivo y la iluminancia por frasco. Con estos datos, se prepararon distintos medios con los parámetros necesarios para llevar a cabo la prueba de cultivo en observación.

**5.3.2 Optimización del método de cultivo**

Las concentraciones del cultivo con fertilizantes agrícolas se incrementaron en un 67% aproximadamente. El resumen del diseño se lo puede apreciar en la Tabla 18.

**Tabla 18. Resumen del diseño experimental.**

| FACTOR | NOMBRE | UNIDADES | LÍMITE INFERIOR | PUNTO CENTRAL | LÍMITE SUPERIOR |
|--------|--------|----------|-----------------|---------------|-----------------|
| A      | Urea   | g/l      | 0,0200          | 0,0600        | 0,1000          |
| B      | FDA    | g/l      | 0,0080          | 0,0230        | 0,0380          |

Fuente: Elaboración a partir de (González, 1999)

Las combinaciones resultantes se presentan en la tabla 19:

**Tabla 19. Combinaciones de optimización del medio**

| CORRIDA | UREA[G/L] | FDA [G/L] |
|---------|-----------|-----------|
| 1       | 0,094     | 0,034     |
| 2       | 0,024     | 0,038     |
| 3       | 0,031     | 0,030     |
| 4       | 0,049     | 0,025     |
| 5       | 0,067     | 0,023     |
| 6       | 0,034     | 0,017     |
| 7       | 0,069     | 0,029     |
| 8       | 0,043     | 0,023     |
| 9       | 0,061     | 0,011     |
| 10      | 0,067     | 0,026     |
| 11      | 0,069     | 0,024     |
| 12      | 0,023     | 0,008     |
| 13      | 0,093     | 0,038     |

Fuente: Elaboración propia de datos tomando en cuenta los rangos de la Tabla 18.

Se llevaron a cabo las condiciones de cultivo siguiendo las pautas establecidas. Se utilizó 10 ml de un inóculo de  $33,5 \cdot 10^6$  células/ml y se aplicó un flujo de aire de 0,5 vvm, en un volumen de 90 ml de agua.

Con esta información, podemos calcular el factor de dilución y la concentración final de células en la muestra.

El inóculo inicial contenía:

$$10\text{ ml} * 33,5 * 10^6 \text{ células/ml} = 335 \times 10^6 \text{ células}$$

El volumen total final es de:

$$10\text{ ml} + 90\text{ ml} = 100\text{ ml}$$

Entonces, la concentración final de células se calcula como:

$$\begin{aligned} \text{Concentración inicial (100 ml)} &= \frac{\text{Inoculo inicial}}{\text{Volumen total}} = \frac{335 * 10^6 \text{ células}}{100\text{ ml}} \\ &= 3,35 * 10^6 \text{ células/ml} \end{aligned}$$

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 20.

**Tabla 20. Resultados experimentales de la optimización del medio de cultivo.**

| Corrida | Urea[g/l] | FDA [g/l] | DCA máx.<br>*10 <sup>6</sup><br>[cel./ml] |
|---------|-----------|-----------|---|
| 1       | 0,094     | 0,034     | 17,05                                     |
| 2       | 0,024     | 0,038     | 11,22                                     |
| 3       | 0,031     | 0,030     | 35,82                                     |
| 4       | 0,049     | 0,025     | 33,41                                     |
| 5       | 0,067     | 0,023     | 27,72                                     |
| 6       | 0,034     | 0,017     | 11,42                                     |
| 7       | 0,069     | 0,029     | 18,34                                     |
| 8       | 0,043     | 0,023     | 32,85                                     |
| 9       | 0,061     | 0,011     | 24,69                                     |
| 10      | 0,067     | 0,026     | 28,52                                     |
| 11      | 0,069     | 0,024     | 27,35                                     |
| 12      | 0,023     | 0,008     | 26,92                                     |
| 13      | 0,093     | 0,038     | 20,61                                     |

Fuente: Elaboración propia a partir de conteo de microalgas en cultivos con urea y fosfato di amónico.

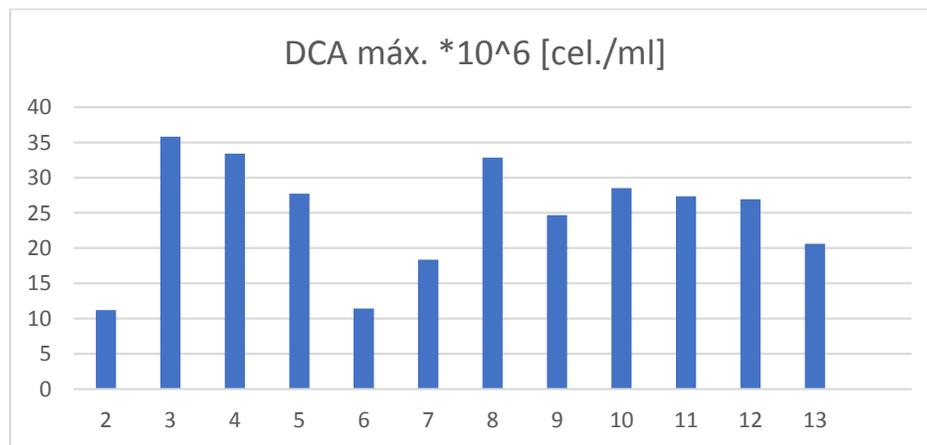
La concentración de urea en las corridas varía entre 0,02 g/l y 0,1 g/l.

La concentración de FDA en las corridas varía entre 0,008 g/l y 0,0442 g/l.

Los valores de DCA Máximo varían entre  $11,22 \times 10^6$  cel/ml y  $35,82 \times 10^6$  cel/ml.

La concentración de urea y FDA parece tener un impacto directo y claro en los valores de DCA Máximo.

**Figura 28. Crecimiento máximo de células respecto a UREA y FDA**



Fuente: Elaboración Propia a partir de la Tabla 20.

Observando los datos, la combinación con la mayor densidad celular es la de la corrida número 3, con una concentración de urea de 0,031 g/l, FDA de 0,03 g/l y una densidad celular máxima de  $35,82 \times 10^6$  cel./ml alcanzado.

### 5.3.3 Influencia de bicarbonato de sodio $\text{NaHCO}_3$ y cloruro de sodio $\text{NaCl}$

Para determinar el impacto del agregado de sales de sodio en el crecimiento celular de *Chlorella vulgaris*, se empleó un diseño experimental factorial de dos niveles con dos réplicas y cuatro puntos centrales. Las variables fueron designadas como A y B, tal como se muestra en la tabla 21. La proliferación de *Chlorella vulgaris* se realizó bajo condiciones de cultivo específicas, utilizando un inóculo de  $33,5 \times 10^6$  células/ml y aplicando un flujo de aire de 0,5 vvm en un volumen de 100 ml. La densidad celular máxima (DCA máx.) se estableció como la variable de respuesta principal para la obtención de biomasa.

**Tabla 21. Matriz experimental para análisis y establecimiento de combinación**

| FACTOR | NOMBRE             | UNIDADES | LÍMITE INFERIOR | PUNTO CENTRAL | LÍMITE SUPERIOR |
|--------|--------------------|----------|-----------------|---------------|-----------------|
| A      | NaHCO <sub>3</sub> | g/l      | 0,0045          | 0,0273        | 0,0500          |
| B      | NaCl               | g/l      | 0,040           | 0,1150        | 0,1200          |

Fuente. Elaboración propia a partir de (Devgoswami R. C., 2011)

La construcción de la matriz experimental (tabla 22) para el análisis estadístico incluyó una combinación aleatoria de las variables independientes A y B en relación con la variable de respuesta DCA, lo que resultó en 16 experimentos, dentro de los rangos establecidos y basados en la bibliografía consultada (Devgoswami R. C., 2011)

**Tabla 22. Resultados experimentales de la optimización del medio de cultivo con cloruro de sodio y bicarbonato de sodio.**

| Corrida | NACL[G/L] | NAHCO <sub>3</sub> [G/L] | DCA MÁX.<br>*10 <sup>6</sup> [CEL./ML] |
|---------|-----------|--------------------------|--|
| 1       | 0,0410    | 0,0045                   | 13,19                                  |
| 2       | 0,0410    | 0,0272                   | 11,31                                  |
| 3       | 0,0560    | 0,0480                   | 30,92                                  |
| 4       | 0,1890    | 0,0045                   | 13,82                                  |
| 5       | 0,0790    | 0,0045                   | 14,93                                  |
| 6       | 0,1520    | 0,0530                   | 32,8                                   |
| 7       | 0,0450    | 0,0540                   | 17,03                                  |
| 8       | 0,1360    | 0,0272                   | 16,07                                  |
| 9       | 0,1150    | 0,0272                   | 15,42                                  |
| 10      | 0,0440    | 0,0830                   | 11,96                                  |
| 11      | 0,0430    | 0,0270                   | 34,84                                  |
| 12      | 0,0580    | 0,0045                   | 12,17                                  |
| 13      | 0,1150    | 0,0272                   | 13,82                                  |
| 14      | 0,0430    | 0,0579                   | 15,91                                  |
| 15      | 0,0810    | 0,0045                   | 15,44                                  |
| 16      | 0,0950    | 0,0085                   | 16,11                                  |

Fuente: Elaboración propia a partir del conteo de microalgas en cultivos de NaCl y NaHCO<sub>3</sub>.

La concentración de NaCl varía entre 0.4 g/l y 1.9 g/l en las 16 corridas realizadas.

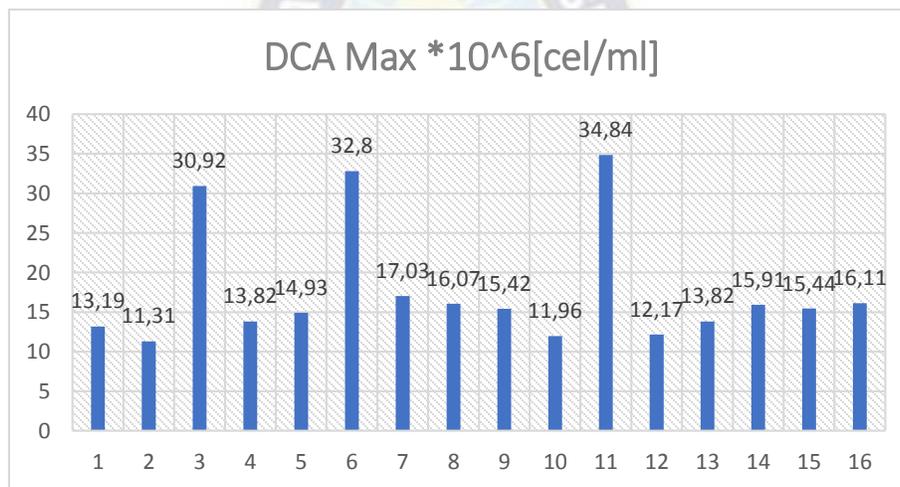
Las concentraciones de NaHCO<sub>3</sub> varían entre 0.0045 g/l y 0.0500 g/l.

Los valores de DCA Máximo varían entre 11.31 x10<sup>6</sup> cel./ml y 34.84 x10<sup>6</sup> cel./ml.

La corrida 11 obtuvo el DCA Máximo más alto, mientras que la corrida 2 tuvo el valor más bajo.

Las concentraciones medias de NaHCO<sub>3</sub> están asociadas con valores más altos de DCA Máximo, mientras que las concentraciones bajas de NaCl están asociadas con un valor máximo de DCA Máximo.

**Figura 29. Crecimiento celular máximo con relación a NaCl y NaHCO<sub>3</sub>**



Fuente: Elaboración Propia a partir de la Tabla 22.

En los datos del experimento, la corrida con la mayor densidad celular máxima es el número 11, que tiene una concentración de NaCl de 0,0430 g/l y una concentración de NaHCO<sub>3</sub> de 0,0270 g/l, con una densidad celular máxima de 34,84 \* 10<sup>6</sup> células/ml.

Por lo tanto, la combinación óptima de concentraciones sería NaCl: 0,0430 g/l y NaHCO<sub>3</sub>: 0,0270 g/l.

### 5.3.4 Influencia del flujo de aire

La influencia del flujo de aire en el cultivo algal es notable y afecta diversos aspectos del sistema. Este flujo está estrechamente vinculado con la uniformidad del sistema,

los ciclos de iluminación de las células, la evaporación del medio de cultivo, la sedimentación de las células y la DCA debido a la contribución del CO<sub>2</sub>.

**Tabla 23. Crecimiento celular respecto al flujo de aire**

|                     |       |       |      |      |
|---------------------|-------|-------|------|------|
| Flujo de aire (vvm) | 0,5   | 1,00  | 1,50 | 2,00 |
| DCA máx. (cel./ml)  | 11,83 | 14,37 | 17   | 10,8 |

Fuente: Elaboración propia a partir del conteo de microalgas en cultivos de flujo de aire controlado.

Los flujos de aire que oscilan entre 1 y 2 vvm promueven una reproducción celular más rápida y una DCA más alta en comparación con flujos de 0,5 vvm. Esto se debe a una mayor concentración de células, influenciada por la evaporación, más que por una mayor capacidad de reproducción microalgal. En resumen, un flujo de aire apropiado puede mejorar la eficacia del cultivo al crear condiciones más óptimas para el crecimiento celular.

Al trabajar con un flujo de aire de 0.5 o más, se observa un incremento en la productividad y el crecimiento de microalgas. Dentro de un rango de 0.5 a 1, no se aprecia una diferencia significativa en la productividad y el crecimiento. Sin embargo, se prefiere un valor máximo de flujo de aire de 1, ya que no existe una diferencia considerable entre 1 y 1,5 en el aumento del flujo y también se ahorrará energía. Flujos menores a 0,5 son recomendados para conservar energía, pero pueden causar sedimentación, y por el contrario flujos mayores a 1 vvm resulta en un menor contacto de las células con la luz, debido a ciclos de iluminación más cortos. Esto puede reducir la eficacia fotosintética ya que las células permanecen menos tiempo en la zona iluminada.

Para minimizar los efectos de la evaporación el flujo debe permanecer entre 0,5 y 1 vvm.

### **5.3.5 Influencia de la temperatura**

Se hizo un experimento con 3 diferentes temperaturas y comparando con la bibliografía se observa detalladamente la tabla 24, se evidencia que los cultivos de microorganismos mantenidos en un rango de temperatura entre 22 y 29 °C presentan

una notable estabilidad en la producción celular. Este rango térmico promueve un crecimiento celular constante, con incrementos en la densidad celular algal (DCA) de entre 4,98 y 5,25 \*10<sup>6</sup> células/ml.

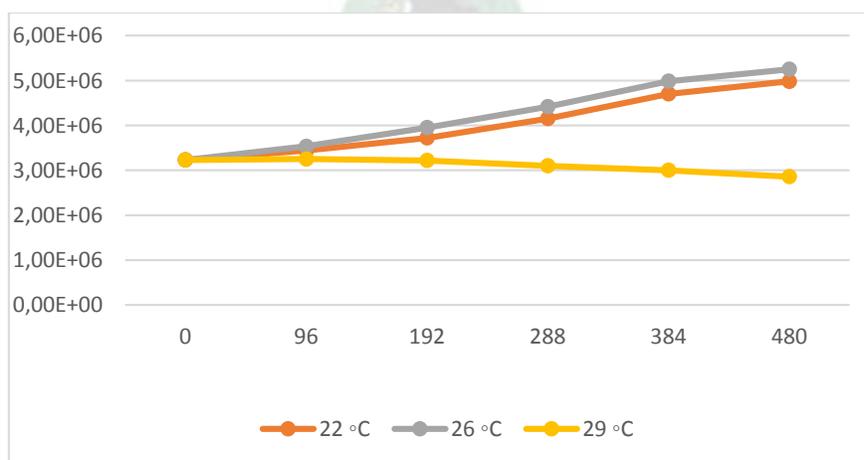
**Tabla 24. Crecimiento celular respecto a la temperatura**

|               | 22 °C             | 26 °C             | 29 °C             |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>TIEMPO</b> | <b>N[cel./ml]</b> | <b>N[cel./ml]</b> | <b>N[cel./ml]</b> |
| <b>0</b>      | 3,23E+06          | 3,23E+06          | 3,23E+06          |
| <b>96</b>     | 3,44E+06          | 3,53E+06          | 3,25E+06          |
| <b>192</b>    | 3,72E+06          | 3,95E+06          | 3,22E+06          |
| <b>288</b>    | 4,15E+06          | 4,42E+06          | 3,10E+06          |
| <b>384</b>    | 4,70E+06          | 4,98E+06          | 3,00E+06          |
| <b>480</b>    | 4,98E+06          | 5,25E+06          | 2,86E+06          |

Fuente: Elaboración propia a partir del conteo de microalgas en cultivos controlados por temperatura.

En contraste, se observa que temperaturas por encima de este rango generan un efecto adverso en la reproducción celular. A partir de los 26 °C, se aprecia un leve aumento en la densidad celular seguido de una disminución abrupta, lo que sugiere una tasa de mortalidad celular significativa. Este fenómeno puede estar relacionado con el estrés térmico, donde las condiciones extremas de temperatura comprometen la viabilidad y el crecimiento de las células.

**Figura 30. Verificación grafica del crecimiento celular**



Fuente: Elaboración Propia a partir de Tabla 24.

Por lo tanto, basándonos en los datos presentados en la figura 30, se deduce que mantener los cultivos a temperaturas cercanas a los 26 °C es la opción más adecuada para garantizar una reproducción celular óptima y estable. Esta temperatura ofrece un equilibrio entre el crecimiento celular y la viabilidad, lo que resulta en una producción sostenida de células algal en el medio de cultivo.

### 5.3.6 Influencia de la iluminancia

Se realizó un experimento para determinar la iluminancia adecuada para el crecimiento algal, se tomó en cuenta un volumen de 100 ml de cultivo con DCA inicial de 3,35E+05 cel./ml, a temperatura de 26 grados centígrados, durante 20 días.

**Tabla 25. Densidad celular respecto a la iluminancia.**

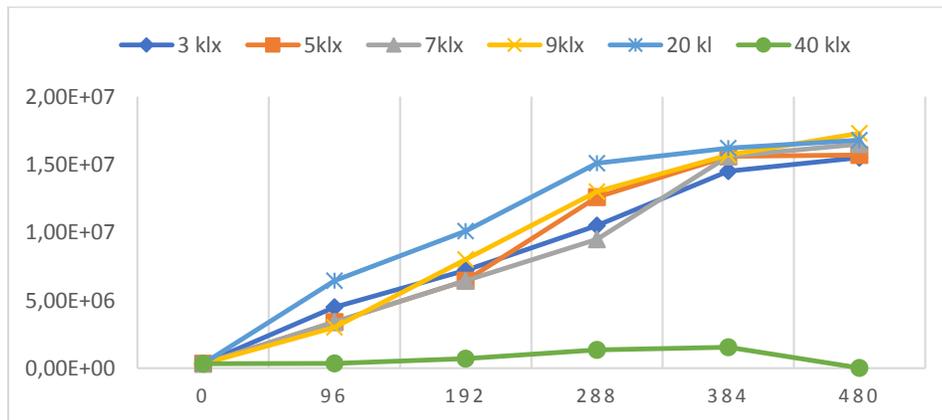
|        | 3 KLX     | 5KLX      | 7KLX      | 9KLX      | 20 KL     | 40 KLX    |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| TIEMPO | N[cel/ml] | N[cel/ml] | N[cel/ml] | N[cel/ml] | N[cel/ml] | N[cel/ml] |
| 0      | 3,35E+05  | 3,35E+05  | 3,35E+05  | 3,35E+05  | 3,35E+05  | 3,35E+05  |
| 96     | 4,50E+06  | 3390000   | 3,39E+06  | 3,00E+06  | 6,45E+06  | 3,50E+05  |
| 192    | 7,20E+06  | 6450000   | 6,45E+06  | 8,00E+06  | 1,01E+07  | 7,00E+05  |
| 288    | 1,05E+07  | 12600000  | 9,50E+06  | 1,30E+07  | 1,51E+07  | 1,35E+06  |
| 384    | 1,45E+07  | 15600000  | 1,56E+07  | 1,57E+07  | 1,62E+07  | 1,55E+06  |
| 480    | 1,55E+07  | 1,57E+07  | 1,65E+07  | 1,73E+07  | 1,68E+07  | 2,85E+04  |

Fuente: Elaboración propia a partir del conteo de microalgas de cultivos controlados por la iluminación.

Se observa que el crecimiento celular varía significativamente con la iluminancia. Sin embargo, entre 3 klx y 20 klx, no se observa una diferencia sustancial en el crecimiento celular.

A partir de 9 klx, el crecimiento celular alcanza su máximo, lo que indica que esta iluminancia es óptima para el crecimiento algal. Aunque iluminancias más altas pueden promover un mayor crecimiento celular, es importante considerar la eficiencia energética.

**Figura 31. Crecimiento celular respecto a la iluminancia.**



Fuente: Elaboración a partir de Tabla 25.

Se recomienda utilizar una iluminancia máxima de entre 3 a 9 klx, ya que proporciona un crecimiento celular óptimo mientras se ahorra energía. Iluminancias más altas no resultan en un incremento significativo del crecimiento.

A iluminancias extremadamente altas, como 40 klx, se observa un decrecimiento marcado en la densidad celular.

Este fenómeno se puede atribuir al efecto de fotoinhibición, donde la alta intensidad lumínica daña los fotosistemas y reduce la capacidad fotosintética de las células.

Iluminancias más altas pueden ser contraproducentes debido al aumento del consumo energético y al efecto negativo en la densidad celular.

### 5.3.7 Resultados óptimos para el cultivo.

Los parámetros para el cultivo se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 26. Características y parámetros de cultivo voluminoso**

| PARAMETRO          | SIMBOLO | CANTIDAD | UNIDADES |
|--------------------|---------|----------|----------|
| VOLUMEN DEL FBR    | V FBR   | 500      | ml       |
| VOLUMEN DE INOCULO | Vi      | 50       | ml       |
| VOLUMEN DE CULTIVO | Vc      | 500      | ml       |
| ILUMINANCIA        | E       | 7500     | lx       |

|                      |    |       |     |
|----------------------|----|-------|-----|
| <b>TEMPERATURA</b>   | T  | 26 ±1 | C   |
| <b>FOTOPERIODO</b>   | FP | 24:0  | h   |
| <b>FLUJO DE AIRE</b> | Fg | 1     | vvm |

Fuente: Datos obtenidos a partir de 5.3.6, 5.3.5 y 5.3.4

Los parámetros óptimos de cultivo de *Chlorella Vulgaris* con fertilizantes agrícolas se muestran en la siguiente tabla:

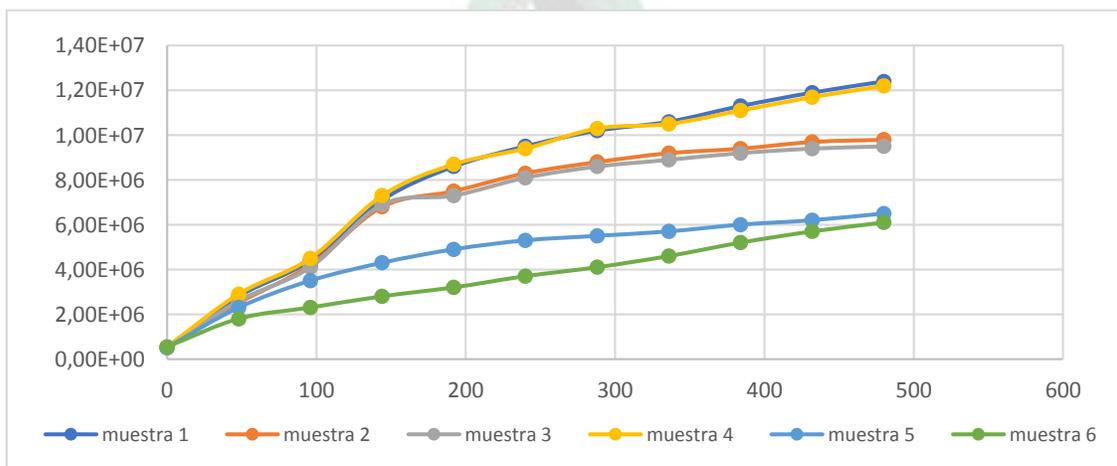
**Tabla 27. Cultivos en medio de Fertilizantes agrícolas**

|                  | Fosfato di amónico [g/l] | Urea [g/l] | Humus [g/l] | Nitrofoska [g/l] | Cloruro de sodio [g/l] | Bicarbonato de sodio [g/l] |
|------------------|--------------------------|------------|-------------|------------------|------------------------|----------------------------|
| <b>MUESTRA 1</b> | 0,0300                   | 0,0310     | -           | -                | 0,0430                 | 0,0270                     |
| <b>MUESTRA 2</b> | 0,0300                   | 0,0310     | -           | -                | -                      | -                          |
| <b>MUESTRA 3</b> | -                        | -          | 1,20        | -                | -                      | -                          |
| <b>MUESTRA 4</b> | -                        | -          | -           | 0,040            | 0,0430                 | 0,0270                     |
| <b>MUESTRA 5</b> | -                        | -          | -           | 0,040            | -                      | -                          |
| <b>MUESTRA 6</b> | -                        | -          | -           | -                | -                      | -                          |

Fuente: Datos obtenidos a partir 5.3.3 y 5.3.2

Una vez realizado el monitoreo diario de los cultivos, se determinaron las concentraciones utilizando el método de recuento por cámara Neubauer y diluciones seriadas. Las gráficas de crecimiento celular se pueden visualizar en la Figura 32.

**Figura 32. Crecimiento de microalgas *Chlorella Vulgaris* en medio de fertilizantes agrícolas.**



Fuente: A partir de datos de la Tabla 28.

La Figura 32, revela una variación en las curvas de crecimiento celular según los diferentes medios de cultivo modificados empleados en las pruebas. Los medios que utilizan sustratos de calidad para propósitos más económicos en comparación con aquellos que emplean reactivos de calidad analítica, muestran una Densidad Celular Aparente (DCA) muy prometedora para la producción de biomasa.

**Tabla 28. Datos referenciales para producción a gran escala**

|                   | MUESTRA<br>1 | MUESTRA<br>2 | MUESTRA<br>3 | MUESTRA<br>4 | MUESTRA<br>5 | MUESTRA<br>6 |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| TIEMPO<br>[horas] | N[cel./ml]   | N[cel./ml]   | N[cel./ml]   | N[cel./ml]   | N[cel./ml]   | N[cel./ml]   |
| 0                 | 5,20E+05     | 5,30E+05     | 5,00E+05     | 5,40E+05     | 5,20E+05     | 5,40E+05     |
| 48                | 2,80E+06     | 2,50E+06     | 2,60E+06     | 2,90E+06     | 2,30E+06     | 1,80E+06     |
| 96                | 4,40E+06     | 4,20E+06     | 4,10E+06     | 4,50E+06     | 3,50E+06     | 2,30E+06     |
| 144               | 7,10E+06     | 6,80E+06     | 6,90E+06     | 7,30E+06     | 4,30E+06     | 2,80E+06     |
| 192               | 8,60E+06     | 7,50E+06     | 7,30E+06     | 8,70E+06     | 4,90E+06     | 3,20E+06     |
| 240               | 9,50E+06     | 8,30E+06     | 8,10E+06     | 9,40E+06     | 5,30E+06     | 3,70E+06     |
| 288               | 1,02E+07     | 8,80E+06     | 8,60E+06     | 1,03E+07     | 5,50E+06     | 4,10E+06     |
| 336               | 1,06E+07     | 9,20E+06     | 8,90E+06     | 1,05E+07     | 5,70E+06     | 4,60E+06     |
| 384               | 1,13E+07     | 9,40E+06     | 9,20E+06     | 1,11E+07     | 6,00E+06     | 5,20E+06     |
| 432               | 1,19E+07     | 9,70E+06     | 9,40E+06     | 1,17E+07     | 6,20E+06     | 5,70E+06     |
| 480               | 1,24E+07     | 9,80E+06     | 9,50E+06     | 1,22E+07     | 6,50E+06     | 6,10E+06     |

Fuente: Datos obtenidos a partir del conteo de microalgas en cámara neubauer y dilución seriada en los cultivos en medio de fertilizantes agrícolas.

Esta prueba ilustra la relevancia de la relación entre las fuentes de carbono, nitrógeno y fosforo proporcionadas a las microalgas y su adaptación al medio de cultivo más óptimo.

Basándonos en el cultivo de referencia y considerando un ligero aumento en la iluminación y una dosificación de aire de 1 vvm (aproximadamente 0,03 % de CO<sub>2</sub> v/v), la velocidad específica de crecimiento celular (ver Tabla 28) en cultivos masivos indica que el medio de cultivo modificado ofrece la velocidad de crecimiento máximo en las muestras 1, 4, 2 y 3 en comparación con los demás medios. Sin embargo, las cepas 1 y 4 muestran un mejor desarrollo en el medio de cultivo que se utilizó en su aislamiento.

Por otro lado, la especie 2 y 3 muestra una mejor proliferación en el medio Fertilizantes Agrícolas. Aunque hay una preferencia de cada cepa por ciertos medios de cultivo, todas ellas

muestran la viabilidad de realizar cultivos masivos utilizando fertilizantes agrícolas sin alejarse demasiado del medio en el que mostraron un mejor crecimiento celular ANEXO G.

**Tabla 29. Análisis de la velocidad de crecimiento en los medios de cultivo a gran escala.**

|                  | $\mu$ | T(DÍAS) | $\mu$ REFERENCIA | t (DÍAS) REFERENCIA |
|------------------|-------|---------|------------------|---------------------|
| <b>MUESTRA 1</b> | 0,159 | 5       | 0,027            | 26                  |
| <b>MUESTRA 2</b> | 0,148 | 5       | 0,022            | 32                  |
| <b>MUESTRA 3</b> | 0,143 | 5       | 0,029            | 24                  |
| <b>MUESTRA 4</b> | 0,157 | 5       | 0,024            | 29                  |
| <b>MUESTRA 5</b> | 0,124 | 6       | 0,027            | 26                  |
| <b>MUESTRA 6</b> | 0,121 | 6       | 0,024            | 29                  |

Fuente: Elaboración de la velocidad de crecimiento a partir de la Tabla 28

Al contar con un medio de cultivo (Fertilizantes Agrícolas) adecuado para las células, se reduce considerablemente la necesidad de preparación, lo que resulta en un método económico, eficaz y sencillo. Esto se refleja en el aumento del número de células (ver tabla 29), lo que permite alcanzar una concentración celular duplicada en un tiempo de duplicación menor de 5 a 6 días, en comparación con otros medios.

**Tabla 30. Productividad Volumétrica**

|                  | PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA [g/l-día] |
|------------------|-------------------------------------|
| <b>MUESTRA 1</b> | 0,231                               |
| <b>MUESTRA 2</b> | 0,218                               |
| <b>MUESTRA 3</b> | 0,209                               |
| <b>MUESTRA 4</b> | 0,226                               |
| <b>MUESTRA 5</b> | 0,202                               |
| <b>MUESTRA 6</b> | 0,202                               |

Fuente: Elaboración a partir de la biomasa obtenida.

Se evaluó la productividad de los cultivos en fase estacionaria de crecimiento. La productividad algal se determinó recolectando biomasa a 3500 rpm durante 25 minutos y secándola a 55 °C durante 2 horas. Se observó que las muestras 1 y 4 mostraron la capacidad de producir biomasa considerable, con una productividad estimada mayor a 0,200 g/l-d.

### 5.3.8 Escalamiento

Para realizar el escalado de los cultivos se realizó seis cultivos de 5 litros (ANEXO I) y cuatro de 20 litros (ANEXO J), se consideraron dos medios de cultivo con fertilizantes agrícolas de la muestra 1 de la tabla 27.

El escalado implica ajustar las proporciones de los componentes del medio de cultivo para garantizar un crecimiento celular óptimo en los volúmenes más grandes. Aquí hay un enfoque general para llevar a cabo el escalado:

**Tabla 31. Escalamiento del cultivo de microalgas para extracción de lípidos**

| Parámetro          | Símbolo | Cantidad | Unidades |
|--------------------|---------|----------|----------|
| Volumen del FBR    | V FBR   | 5000     | ml       |
| Volumen de inóculo | Vi      | 50       | ml       |
| Volumen de cultivo | Vc      | 5000     | ml       |
| Iluminancia        | E       | 7500     | Lx       |
| Temperatura        | T       | 26 +-1   | C        |
| Fotoperiodo        | FP      | 24:0     | h        |
| Flujo de aire      | Fg      | 1        | vvm      |

| Parámetro          | Símbolo | Cantidad | Unidades |
|--------------------|---------|----------|----------|
| Volumen del FBR    | V FBR   | 20000    | ml       |
| Volumen de inóculo | Vi      | 2000     | ml       |
| Volumen de cultivo | Vc      | 20000    | ml       |
| Iluminancia        | E       | 8500     | Lx       |
| Temperatura        | T       | 26 +-1   | C        |
| Fotoperiodo        | FP      | 24:0     | h        |
| Flujo de aire      | Fg      | 1        | vvm      |

Fuente: Parámetros obtenidos en experimentos previos.

### 5.3.9 Flocculación y centrifugado

La concentración inicial de microalgas varía entre los experimentos, con el Experimento 4 de (20000 ml) mostrando la mayor concentración inicial.

La temperatura se mantiene dentro de un rango cercano en todos los experimentos.

La velocidad y el tiempo de centrifugado también varían entre los experimentos, afectando el rendimiento de la centrifugación ANEXO K.

**Tabla 32. Parámetros y resultados de la floculación y centrifugación de los diferentes cultivos**

| Parámetro                          | Unidad de Medida   | Descripción  |
|------------------------------------|--|--|
| <b>Volumen de Cultivo</b>          | 100 ml (4 cultivos)<br>20 (L) (4 cultivos)   | Volumen total de la suspensión de microalgas                                   |
| <b>Concentración de Microalgas</b> | 5250000 Cél/ml (100 ml)<br>12500000 Cél/ml (20000 ml)  | Concentración inicial de microalgas en el cultivo                              |
| <b>Concentración de Floculante</b> | 2 g/L  | Cantidad de floculante agregado al cultivo (SULFATO DE ALUMINIO)               |
| <b>Tiempo de Floculación</b>       | 120 (min)  | Tiempo de agitación después de agregar el floculante                           |
| <b>pH del Medio</b>                | 7.2 (100 ml)<br>6.85 (20000ml)   | Valor del pH del medio de cultivo  |
| <b>Temperatura</b>                 | 21 (°C)  | Temperatura durante el proceso de floculación                                  |
| <b>Velocidad de Centrifugado</b>   | 3000 RPM<br>3500 RPM   | Velocidad de la centrifugadora   |
| <b>Tiempo de Centrifugado</b>      | 15 (min)<br>25 (min)   | Duración del proceso de centrifugado   |
| <b>Volumen del Sobrenadante</b>    | 19,4 (L)   | Volumen de líquido claro después de la centrifugación                          |
| <b>Masa recuperada</b>             | 0.29 gramos<br>0.26 gramos<br>0.24 gramos<br>0.28 gramos<br><br>122 gramos<br>119 gramos<br>121 gramos<br>123 gramos | Masa húmeda recuperada por centrifugación de 100 ml y 20000 ml respectivamente |

Fuente: Datos obtenidos en laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA.

El Experimento 2 muestra el menor rendimiento de la centrifugación, posiblemente debido a la menor concentración de floculante y al tiempo de floculación más corto.

Se observa una recuperación más alta de microalgas en el Experimento 1 y 2, con un rendimiento del 85%.

### 5.3.10 Secado

El proceso de secado ha provocado una pérdida de peso significativa en todas las muestras, lo que indica una reducción en el contenido de humedad y la obtención de biomasa seca. La pérdida de peso relativa es consistente en todas las muestras, independientemente de si se trata de microalgas individuales o un grupo. Esto sugiere que el proceso de secado ha sido efectivo y ha logrado reducir el contenido de agua de las microalgas en un porcentaje similar en ambos casos ANEXO L.

**Tabla 33. Parámetros utilizados en el secado de biomasa húmeda**

| <b>Parámetro</b>             | <b>Unidad de Medida</b>  |
|------------------------------|--|
| <b>Temperatura</b>           | 55 (°C)  |
| <b>Tiempo de Secado</b>      | 12 (h)   |
| <b>Método de Secado</b>      | Horno  |
| <b>Tipo de Microalgas</b>    | Chlorella Vulgaris   |
| <b>Peso Inicial de Algas</b> | 0.29 gramos<br>0.26 gramos<br>0.24 gramos<br>0.28 gramos<br>122 gramos<br>119 gramos<br>121 gramos<br>123 gramos |
| <b>Peso Final de Algas</b>   | 0.126 gramos<br>0.123gramos<br>0.121gramos<br>0.127 gramos<br>63 gramos<br>61 gramos<br>64 gramos<br>65 gramos   |

Fuente: Datos obtenidos en laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA.

Calcular la pérdida de peso para cada muestra de microalgas:

- Pérdida de peso = Peso Inicial - Peso Final

**Tabla 34. Comparación de resultados inicial y final de biomasa húmeda y seca**

| <b>Muestra</b> | <b>Peso Biomasa húmeda (g)</b> | <b>Peso Biomasa seca (g)</b> | <b>Pérdida de Peso (g)</b> |
|----------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <b>1</b>       | 0.29                           | 0.126                        | 0.164                      |
| <b>2</b>       | 0.26                           | 0.123                        | 0.137                      |
| <b>3</b>       | 0.24                           | 0.121                        | 0.119                      |
| <b>4</b>       | 0.28                           | 0.127                        | 0.153                      |
| <b>5</b>       | 122                            | 63                           | 59                         |
| <b>6</b>       | 119                            | 61                           | 58                         |
| <b>7</b>       | 121                            | 64                           | 57                         |
| <b>8</b>       | 123                            | 65                           | 58                         |

Fuente. Datos obtenidos en laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA.

Las muestras 1 a 4 muestran una pérdida de peso promedio de alrededor de 0,143 g, lo que representa aproximadamente el 49,3% del peso inicial promedio de 0,29 g.

Las muestras 5 a 8, con un peso inicial promedio de 121,25 g, muestran una pérdida de peso promedio de aproximadamente 58 g, lo que representa aproximadamente el 47,8% del peso inicial promedio.

### **5.3.11 Extracción de lípidos**

Durante el proceso de extracción de lípidos por el método Soxhlet, se utilizó n-hexano como disolvente debido a su capacidad para disolver eficientemente los lípidos presentes en las muestras de microalgas. Para cada ciclo de extracción Soxhlet, se emplearon 160 ml de n-hexano, los cuales fueron calentados a una temperatura de 60 grados centígrados. Esta temperatura permitió que el n-hexano se vaporizara y ascendiera por el extractor, extrayendo los lípidos de las muestras de microalgas.

Una vez que el disolvente alcanzaba el condensador, se enfriaba y condensaba, goteando nuevamente sobre las muestras de microalgas, continuando así el ciclo de extracción ANEXO N.

Después de completar el proceso de extracción, el disolvente recuperado se concentró utilizando un rotavapor a 70 rpm y una temperatura de 55 grados centígrados. Esto

permitió evaporar el n-hexano y dejar un residuo que contenía los lípidos extraídos. Durante este proceso, se recuperaron aproximadamente 110 ml de n-hexano en cada extracción ANEXO O.

Cada muestra de microalgas se pesó cuidadosamente antes de la extracción en una balanza analítica con un margen de error de 0,0001 g, asegurando una precisión excepcional en las mediciones de peso.

**Tabla 35. Resultados de la obtención de lípidos mediante extracción con hexano**

| <b>Muestra</b> | <b>Peso inicial biomasa seca (g)</b> | <b>Peso final biomasa seca (g)</b> | <b>Peso del extracto de lípidos (g)</b> | <b>Rendimiento de extracción (%)</b> |
|----------------|--------------------------------------|------------------------------------|---|--------------------------------------|
| 1              | 10,1456                              | 5,0214                             | 5,1242                                  | 49,50                                |
| 2              | 10,2264                              | 5,2121                             | 5,0143                                  | 48,99                                |
| 3              | 10,5842                              | 5,2374                             | 5,3468                                  | 50,60                                |
| 4              | 10,0263                              | 5,0832                             | 4,9431                                  | 49,33                                |
| 5              | 10,0459                              | 5,0425                             | 5,0034                                  | 49,75                                |
| 6              | 10,2164                              | 5,0734                             | 5,1430                                  | 50,38                                |
| 7              | 10,6964                              | 5,3503                             | 5,3461                                  | 49,99                                |
| 8              | 10,3216                              | 5,2185                             | 5,1031                                  | 49,34                                |
| 9              | 10,0025                              | 5,0682                             | 4,9343                                  | 49,33                                |
| 10             | 10,3665                              | 5,2175                             | 5,1490                                  | 49,63                                |
| 11             | 10,1596                              | 5,1533                             | 5,0063                                  | 49,32                                |
| 12             | 10,2493                              | 5,0820                             | 5,1673                                  | 50,47                                |
| 13             | 10,0456                              | 4,6226                             | 5,4230                                  | 53,87                                |
| 14             | 10,1264                              | 4,6115                             | 5,5149                                  | 54,45                                |
| 15             | 10,5875                              | 4,6962                             | 5,8913                                  | 55,65                                |
| 16             | 10,2363                              | 4,8942                             | 5,3421                                  | 52,12                                |
| 17             | 10,0420                              | 4,8786                             | 5,1634                                  | 51,51                                |
| 18             | 10,1214                              | 4,8725                             | 5,2489                                  | 51,79                                |

|    |         |        |        |       |
|----|---------|--------|--------|-------|
| 19 | 10,2934 | 4,9719 | 5,3215 | 51,61 |
| 20 | 10,1516 | 4,7529 | 5,3987 | 53,25 |
| 21 | 10,0005 | 4,7542 | 5,2463 | 52,46 |
| 22 | 10,3645 | 4,8014 | 5,5631 | 53,72 |
| 23 | 10,1496 | 4,8228 | 5,3268 | 52,54 |
| 24 | 10,1493 | 4,8025 | 5,3468 | 52,80 |
| 25 | 0.4970  | 0.4390 | 0,0580 | 11,67 |

Fuente. Datos obtenidos en laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA.

Durante el proceso de extracción de lípidos por el método Soxhlet, los lípidos extraídos se llevaron al horno a una temperatura de 60 grados centígrados para la evaporación total del n-hexano, dejando únicamente los lípidos purificados.

Es importante destacar que el rendimiento de extracción en su mayoría fue mayor al 50%, exactamente un promedio de 51,39% de rendimiento, lo cual se encuentra dentro del rango esperado de 5% a 58%. Esto puede atribuirse a la eficacia de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las microalgas, que favorecieron la acumulación de lípidos en las células.

Sin embargo, se observó que la última extracción tuvo un rendimiento cercano al 12%. Esto se debió a que las microalgas de esa muestra, no fueron alimentadas con ningún nutriente durante el periodo de cultivo, lo que resultó en una menor acumulación de lípidos en las células y, por lo tanto, un rendimiento de extracción más bajo.

**Tabla 36. Volumen de lípidos obtenido a partir de Microalgas *Chlorella Vulgaris***

| Muestra | Peso del Extracto de Lípidos (g) | Volumen del Extracto de Lípidos (ml) |
|---------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 1       | 5,1242                           | 5,6                                  |
| 2       | 5,0143                           | 5,5                                  |
| 3       | 5,3468                           | 5,9                                  |
| 4       | 4,9431                           | 5,4                                  |
| 5       | 5,0034                           | 5,5                                  |

|       |          |       |
|-------|----------|-------|
| 6     | 5,1430   | 5,6   |
| 7     | 5,3461   | 5,9   |
| 8     | 5,1031   | 5,6   |
| 9     | 4,9343   | 5,4   |
| 10    | 5,1490   | 5,6   |
| 11    | 5,0063   | 5,5   |
| 12    | 5,1673   | 5,7   |
| 13    | 5,4230   | 5,9   |
| 14    | 5,5149   | 6,0   |
| 15    | 5,8913   | 6,5   |
| 16    | 5,3421   | 5,9   |
| 17    | 5,1634   | 5,7   |
| 18    | 5,2489   | 5,7   |
| 19    | 5,3215   | 5,8   |
| 20    | 5,3987   | 5,9   |
| 21    | 5,2463   | 5,7   |
| 22    | 5,5631   | 6,1   |
| 23    | 5,3268   | 5,8   |
| 24    | 5,3468   | 5,9   |
| Total | 126,0677 | 138,1 |

Fuente: Datos obtenidos en laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA.

La tabla 36, muestra la cantidad de lípidos extraídos tanto en masa como en volumen, con esos datos podemos calcular la densidad de los lípidos.

$$\rho_{\text{lipidos extraidos}} = \frac{m_{\text{lipidos extraidos}}}{v_{\text{lipidos extraidos}}}$$

$$\rho_{\text{lipidos extraidos}} = \frac{126,0677}{138,1} = 0,913 \text{ gr/ml}$$

Según los estándares ASTM D6751 y EN14214, la densidad puede ser entre 860 kg/m<sup>3</sup> - 920 kg/m<sup>3</sup> para biodiesel estándar. La densidad de los lípidos de *Chlorella Vulgaris* (0.913 g/cm<sup>3</sup>) se encuentra dentro del rango típico para los aceites vegetales convencionales utilizados en la producción de biodiésel.

### 5.3.12 Recuperación de biomasa

Después de la extracción de los lípidos, la biomasa recuperada se vuelve a utilizar para un nuevo cultivo. Este proceso permite aprovechar al máximo los recursos y minimizar el desperdicio. La biomasa de las microalgas contiene nutrientes y materia orgánica que pueden ser reciclados y utilizados como alimento para un nuevo cultivo. Al reutilizar la biomasa, se reduce la necesidad de cultivar nuevas microalgas desde cero, lo que a su vez disminuye el consumo de recursos y energía.

Además, la biomasa previamente cultivada puede estar adaptada a las condiciones del medio, lo que puede llevar a un crecimiento más rápido y eficiente en el siguiente cultivo. Esto es especialmente importante en aplicaciones comerciales donde se busca maximizar la productividad y minimizar los costos.

### 5.4 Transesterificación

En este estudio, la obtención de FAME's se realizó por transesterificación in situ utilizando catalizadores ácidos. Esta técnica se prefirió sobre la transesterificación convencional con catalizadores alcalinos debido a que los últimos podrían causar reacciones de saponificación, dificultando la separación del biodiesel (FAME). Además, estudios previos han demostrado que el uso de catalizadores ácidos es más eficiente en la producción de FAME's a partir de aceite de microalga.

Se llevó a cabo la transesterificación de los lípidos utilizando etanol como alcohol de reacción, con una relación molar proporcionada de 6:1 (alcohol: aceite). Esto significa que, por cada mol de aceite, se necesitaron 6 moles de etanol absoluto.

Cálculo de Volumen de Etanol para 25 ml de lípidos de *Chlorella Vulgaris* (933 g/mol).

$$\begin{aligned} 25 \text{ ml lípidos de } Chlorella \text{ Vulgaris} & * \frac{0,913 \text{ gr lípidos de } Chlorella \text{ Vulgaris}}{\text{ml lípidos de } Chlorella \text{ Vulgaris}} \\ & * \frac{1 \text{ mol lípidos de } Chlorella \text{ Vulgaris}}{933 \text{ g lípidos de } Chlorella \text{ Vulgaris}} * \frac{6 \text{ mol Etanol}}{1 \text{ mol lípidos de } Chlorella \text{ Vulgaris}} \\ & * \frac{46 \text{ g Etanol}}{1 \text{ mol Etanol}} * \frac{1 \text{ ml Etanol}}{0,789 \text{ g Etanol}} = 8,6 \text{ ml Etanol} \cong 9 \text{ ml Etanol} \end{aligned}$$

Para facilitar la reacción, se utilizó hidróxido de sodio al 1% de peso (0,34 g) como catalizador. La reacción se realizó en un agitador magnético a una temperatura

constante de 55 grados centígrados y a una velocidad de agitación de 700 rpm durante 25 minutos, todo el proceso se muestra en el ANEXO Q.

Del total de aceite Obtenido solo se utilizó 100 ml de lípidos o aceite crudo de *Chlorella Vulgaris*, repartidos en 4, y un total de 36 ml de etanol absoluto, igualmente repartido en 4.

**Tabla 37. Cantidad de biodiesel obtenido en el proceso de transesterificación**

| Muestra      | Cantidad de aceite crudo de microalgas (ml) | Cantidad de etanol (ml) | Cantidad de biodiesel obtenido (ml) | Cantidad de biodiesel obtenido (gr) |
|--------------|---|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1            | 25  | 9                       | 16,3                                | 13,9039                             |
| 2            | 25  | 9                       | 16,5                                | 14,0745                             |
| 3            | 25  | 9                       | 16,1                                | 13,7333                             |
| 4            | 25  | 9                       | 16,2                                | 13,8186                             |
| <b>Total</b> | <b>100</b>                                  | <b>36</b>               | <b>65,1</b>                         | <b>55,5303</b>                      |

Fuente: Datos obtenidos en el laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería, UMSA.

$$\text{Rendimiento de Biodiesel} = \frac{v_{\text{total de biodiesel obtenido}}}{v_{\text{total de aceite crudo de chlorella vulgaris}}} * 100\%$$

$$\text{Rendimiento de Biodiesel} = \frac{65,1 \text{ ml}}{(100) \text{ ml}} * 100\% = 65,1\% \cong 65\%$$

Después de la reacción, se decantó el biodiesel obtenido, gráficamente se muestra en el ANEXO R, logrando recuperar el 65% del biodiesel y el 35% restante en forma de glicerol, en relación con la cantidad inicial de lípidos y etanol utilizados en la transesterificación.

Este proceso proporcionó una forma eficiente de convertir los lípidos de las microalgas en biodiesel, con un rendimiento aceptable y un proceso relativamente sencillo y rápido.

#### 5.4.1 Refinado y lavado de Biodiesel

Después de la transesterificación, se llevó a cabo un proceso de refinado del biodiesel utilizando carbón activado para eliminar la clorofila y mejorar su color.

Para ello, el biodiesel se disolvió en hexano, creando una solución en la cual la clorofila se encuentra en suspensión. Luego, se agregó carbón activado a la solución y se agitó durante un período de tiempo determinado.

Durante este proceso, el carbón activado actúa como un agente adsorbente, atrapando las impurezas, incluida la clorofila, y mejorando así la claridad y el color del biodiesel. Una vez completada la adsorción, se separó el carbón activado del biodiesel mediante filtración u otro método adecuado.

Este proceso de refinado con carbón activado es una técnica efectiva y comúnmente utilizada en la industria del biodiesel para mejorar la calidad del producto final, eliminando impurezas que podrían afectar su rendimiento y estabilidad.

Después del proceso de refinado con carbón activado, se realizó un lavado del biodiesel con agua destilada para limpiar impurezas y recuperar el etanol excedente presente en el biodiesel.

El biodiesel refinado se mezcló con una cantidad adecuada de agua destilada y se agitó para permitir que el agua se mezclara con el biodiesel. Durante este proceso, el agua atrapa las impurezas restantes y el exceso de etanol que pueda quedar en el biodiesel.

Posteriormente, la mezcla se dejó reposar para que las fases de agua y biodiesel se separaran. El agua, que contiene las impurezas y el etanol, se separó y se eliminó. El biodiesel purificado se recuperó de la parte superior de la mezcla, como se muestra en el ANEXO S.

Este proceso de lavado con agua destilada garantiza la eliminación de las últimas impurezas y ayuda a reducir el contenido de etanol en el biodiesel, lo que mejora su calidad y estabilidad. Además, permite cumplir con los estándares de calidad requeridos para su uso como combustible.

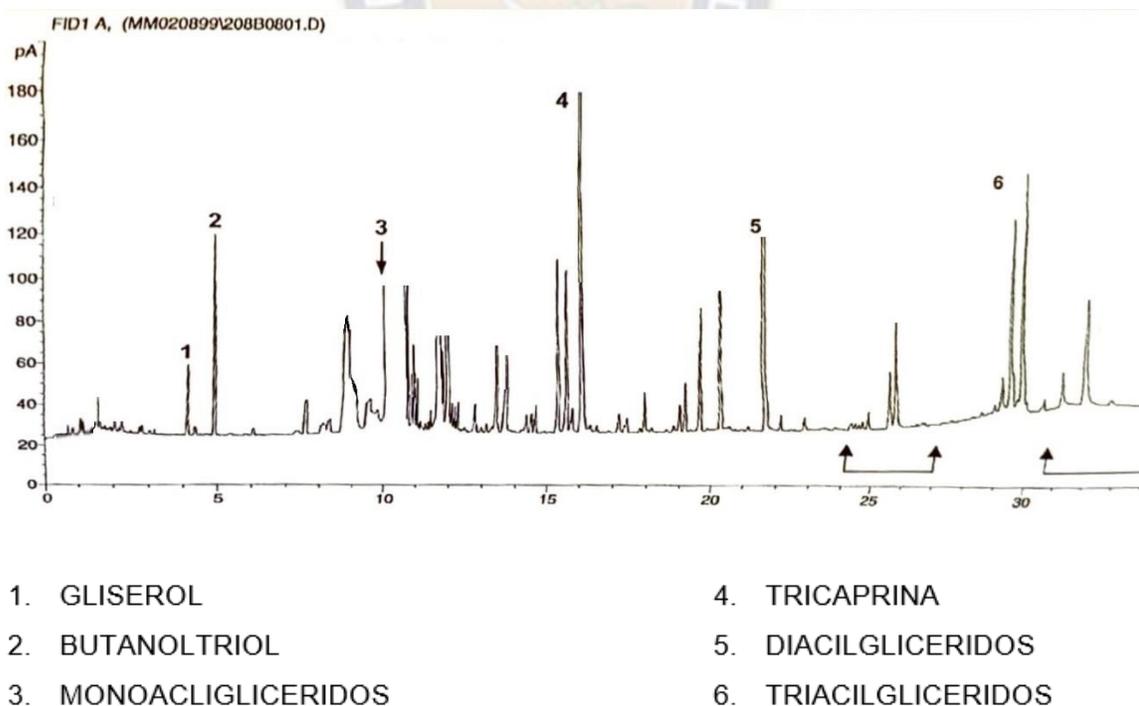
#### 5.4.2 Caracterización del Biodiesel

Este proceso implicó la ruptura de triacilgliceroles (TAG) y otros lípidos, seguido de la derivatización de los aceites en ácidos grasos mediante transesterificación a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME's).

El rendimiento obtenido de FAME's fue del 65 % (g biodiesel/g aceite de microalga), con datos de tabla 37 se obtuvo una densidad de biodiesel de 0,853 g/ml. lo cual es prometedor para su potencial uso como biodiesel. Estos FAME's fueron sometidos a un análisis por cromatografía de gases (GC) para su caracterización.

Para la purificación de los FAME's, se empleó carbón activo como agente de adsorción de clorofila, lo que garantizó un producto adecuado para el análisis por GC. La caracterización detallada de los ácidos grasos ésteres metílicos obtenidos se realizó en los laboratorios de UPEA.

**Figura 33. Cromatograma de una muestra de FAME procedente de microalgas *Chlorella Vulgaris*.**



Fuente: Cromatógrafo de gases

Los resultados del análisis por GC mostraron la presencia de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en los FAME's obtenidos. Este método de obtención de FAME's demostró ser eficiente y confiable, proporcionando una buena separación y caracterización de los ácidos grasos presentes en los lípidos de las microalgas.

El Glicerol y el Butanoltriol, no son parte del biodiésel. Los Monoacilgliceridos, puede estar presente en pequeñas cantidades en biodiésel. La Tricaprina, representa un tipo de triglicérido, predecesor de biodiésel. Los Diacilgliceridos, representa un intermediario en la producción de biodiésel. Los Triacilgliceridos, es principal componente de biodiésel.

**Tabla 38. Área de los picos mostrados en la cromatografía.**

| Ácidos Grasos      | Área de los picos |
|--------------------|-------------------|
| GLISEROL           | 8                 |
| BUTANOLTRIOL       | 5                 |
| MONOACLIGLICERIDOS | 50                |
| TRICAPRINA         | 80                |
| DIACILGLICERIDOS   | 100               |
| TRIACILGLICERIDOS  | 200               |

Fuente: Datos obtenidos sobre las áreas de la cromatografía de gases

El porcentaje de biodiésel se determina considerando las áreas de los picos que corresponden a los FAMEs en el cromatograma. Los componentes de biodiésel (monoacilgliceridos, diacilgliceridos, triacilglicéridos y en este caso tricaprina) son esenciales para calcular la proporción real de biodiésel presente en la muestra. Al sumar las áreas de estos picos y compararlas con el área total de todos los componentes detectados, se obtiene un porcentaje preciso de biodiésel en la muestra. Este método es confiable y ampliamente utilizado en la industria para asegurar que el

biodiésel producido cumpla con las especificaciones y estándares necesarios para su comercialización y uso eficiente como biocombustible.

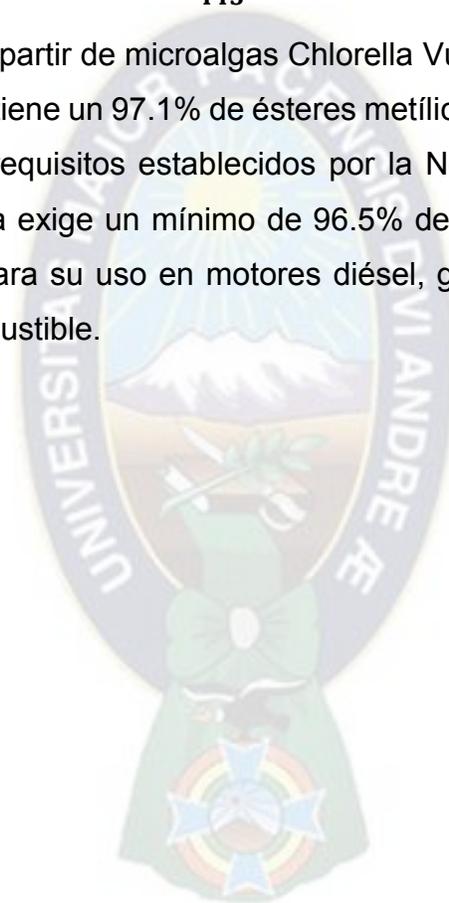
En nuestro caso nos da un área total de 443

### **Cálculo de porcentaje de FAME en el Biodiesel**

$$\% \text{ FAME} = \frac{\text{Area}_{\text{monoacilglicéridos}} + \text{Area}_{\text{diacilglicéridos}} + \text{Area}_{\text{triacilglicéridos}} + \text{Area}_{\text{tricaprina}}}{\text{Area total}} * 100\%$$

$$\% \text{ FAME} = \frac{50 + 80 + 100 + 200}{443} * 100\% = 97,1\%$$

El biodiésel producido a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris* ha sido analizado y se ha determinado que contiene un 97.1% de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), lo que cumple con los requisitos establecidos por la Norma EN 14214 de la Unión Europea. Esta normativa exige un mínimo de 96.5% de FAME para que el biodiésel sea considerado apto para su uso en motores diésel, garantizando así su calidad y eficiencia como biocombustible.



## **CAPITULO 6. ANÁLISIS ECONÓMICO Y ANÁLISIS AMBIENTAL**

### **6.1 Análisis económico Cualitativo**

#### **6.1.1 La importancia de la Materia Prima**

##### **6.1.1.1 Aceite de microalga Chlorella Vulgaris**

La Chlorella Vulgaris es una materia prima crucial para la producción de biodiésel debido a su alta productividad de lípidos y su contenido balanceado de nutrientes. Bajo condiciones óptimas, Chlorella Vulgaris puede alcanzar hasta un 58% de contenido de lípidos (Salunkhe, 1992).

En laboratorio, se ha determinado que esta microalga presenta una proporción de aceite extraído muy significativa respecto a su biomasa seca, obteniendo poco más de 51% de lípidos.

Comparada con otras materias primas como aceites vegetales, que contienen aproximadamente 20% de lípidos en la soya y 40% en la palma (Salunkhe, 1992), Chlorella Vulgaris se destaca como una alternativa prometedora y sostenible para la producción de biodiésel.

##### **6.1.1.2 Etanol.**

Bolivia incursionó en la producción de biocombustibles en 2018, con la generación de etanol. En marzo de 2017, el entonces presidente Evo Morales lanzó un programa para su producción, el cual aún está vigente en alianza con empresas privadas de Santa Cruz. Se proyectaba una producción de 80 millones de litros en 2018 y 380 millones de litros en 2023. En 2021, el Gobierno se comprometió a comprar 110 millones de litros, y en 2022, 160 millones de litros. (Salinas, 2024)

Bolivia produce anualmente 160 millones de litros de etanol, lo que resulta en una ventaja significativa para la producción de biodiésel en el país. El etanol, compatible con el proceso de transesterificación, es una alternativa más sostenible que el metanol, permitiendo una producción eficiente y de alta calidad de biodiésel y glicerina. A diferencia del metanol, que no se produce localmente, el etanol local elimina la dependencia de importaciones, reduciendo riesgos y costos asociados al transporte y

almacenamiento de metanol importado. Además, su producción fomenta la economía nacional y crea empleos. En resumen, el etanol es una opción estratégica que fortalece la autosuficiencia energética y contribuye al desarrollo sostenible de Bolivia.

### **6.1.1.3 Fosfato di-amónico, urea, cloruro de sodio y bicarbonato de sodio**

El gobierno, a través de Insumos Bolivia, asegura la venta directa de fertilizantes a pequeños productores agrícolas a un precio justo de 310 bolivianos por 50 kilos. La comercialización y distribución se coordinan con autoridades locales, federaciones de campesinos, y centrales y subcentrales campesinas, bajo un control social riguroso para evitar que los fertilizantes sean vendidos por particulares. Desde 2011, Insumos Bolivia ha importado 82,240 bolsas de fertilizantes, equivalentes a 4,112 toneladas métricas, con el apoyo del Gobierno de Japón (Fides, 2011).

Actualmente, la Planta de Amoniaco y Urea (PAU) en Bulo Bulo-Cochabamba produce 364,6 mil toneladas métricas anuales de urea, reduciendo las importaciones de fertilizantes en un 99% y apoyando la producción agropecuaria en Bolivia. Además, se están implementando plantas complementarias, como la Planta de Urea Formaldehído, la Unidad de Producción de Metanol, y la Planta de Nitrato de Amonio, la Planta de Nitrógeno, la Planta de Fósforo y Potasio, la Planta de Fosfato Monoamónico y la Planta de Fosfato Diamónico, para conformar el Complejo Petroquímico de Fertilizantes en Bulo Bulo (ypfb.gob.bo, 2024).

El salar de Uyuni, según estimaciones, contiene 10,000 millones de toneladas de sal, de la cual se extraen 25,000 toneladas cada año (Wikipedia, 2023).

Bolivia ha incursionado en la industria de química básica con la creación de la empresa pública Industria Boliviana Química (IBQ). En el marco de la política de industrialización y sustitución de importaciones, el presidente Arce anunció que el complejo industrial en Potosí permitirá sustituir importaciones por más de \$us 210 millones anuales. Este proyecto incluye la construcción de cuatro plantas en la comunidad Kulla, Uyuni, para producir ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, hidróxido de calcio, carbonato de sodio, hipoclorito de sodio, cloruro de

calcio y bicarbonato de sodio, beneficiando a empresas nacionales de todos los tamaños (La Razon, 2023).

Bolivia cuenta con producción local de urea y cloruro de sodio, extraídos de sus salares, lo que representa una ventaja en términos de disponibilidad y costo. Actualmente, existen proyectos para la producción nacional de fosfato diamónico y bicarbonato de sodio, aunque estos productos aún se importan. La producción de estos insumos podría beneficiar el cultivo de *Chlorella Vulgaris*. La baja demanda de estos productos, en comparación con la producción agrícola convencional, hace que su integración en el cultivo de microalgas sea factible y eficiente, contribuyendo a la autosuficiencia en insumos agrícolas y reduciendo costos.

### **6.1.2 El rol del Estado**

Los críticos de los biocombustibles frecuentemente cuestionan por qué estos requieren apoyo del Estado. Argumentan que, si el Biodiesel es un producto tan beneficioso, debería poder ganar su espacio en el mercado sin ayuda gubernamental. Sin embargo, este argumento se basa en la premisa errónea de que los mercados energéticos operan de manera perfecta, lo cual no es la realidad. Por lo tanto, el Estado debe desempeñar un papel activo en el desarrollo de esta industria a través de políticas públicas efectivas.

Además de establecer políticas públicas adecuadas, el Estado debe apoyar el desarrollo de la infraestructura necesaria para la producción de biocombustibles. El incentivo para el Estado radica en la oportunidad inigualable de generar empleo mediante el efecto multiplicador y virtuoso de los modelos agroindustriales orientados a la exportación.

### **6.1.3 Oportunidades para el Biodiesel a partir de Microalgas *Chlorella Vulgaris***

La Planta de Biodiésel 1, ubicada en Santa Cruz, Bolivia, es una instalación moderna y avanzada que procesa diversas materias primas locales, como soya, aceites usados de cocina y aceites vegetales del macororo. Inaugurada el 26 de marzo de 2024, la planta tiene una capacidad de recepción de 6,4 millones de litros y de despacho de 3,1 millones de litros de biodiésel, con una producción diaria de 1,500 barriles, ampliable

a 2,000 barriles. Además de biodiésel, produce borra, materia grasa y glicerina. La planta destaca por su flexibilidad en el uso de materias primas, un sistema de control dedicado, y equipos de última generación, garantizando seguridad energética y reduciendo emisiones de CO<sub>2</sub>, conforme a normativas bolivianas e internacionales (YPFB SOMOS ENERGIA, 2024).

La incorporación de microalgas *Chlorella Vulgaris* como materia prima, junto con la alta capacidad de producción, tecnología avanzada y compromiso con la sostenibilidad ambiental, posiciona a la planta como un actor clave en la seguridad energética de Bolivia y en el desarrollo de una economía circular. Esta integración es altamente beneficiosa, aprovechando recursos locales y promoviendo la innovación en la industria de los biocombustibles.

#### **6.1.4 Generación de nuevas inversiones**

La inversión extranjera directa en Bolivia ha mostrado una tendencia decreciente desde 1999, alcanzando su punto más bajo en 2005 con una desinversión de 241 millones de dólares estadounidenses. En 2006, se reportó una inversión de 237 millones de dólares, aunque representa una mejora respecto a 2005, no alcanza ni el 25% de la inversión extranjera reportada en 1998 (1.023,4 millones de dólares estadounidenses) (IBCE, 2007).

La producción de biodiésel a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris* tiene el potencial de estimular una serie de inversiones estratégicas y económicas a nivel nacional. La implementación de esta tecnología requiere una inversión inicial considerable en la construcción y mantenimiento de plantas de transformación, así como en el desarrollo de infraestructuras de transporte y servicios generales asociados.

Dado el impacto prometedor de esta industria emergente, es probable que, tras la inversión inicial del gobierno nacional en el establecimiento de las primeras instalaciones y en la creación de un entorno regulador favorable, se generen oportunidades significativas para la inversión extranjera. Los inversores internacionales, atraídos por el potencial de crecimiento en el sector de biodiésel y por

las ventajas competitivas que ofrece el uso de microalgas, podrían aportar capital adicional para la expansión de la infraestructura y el desarrollo de nuevas tecnologías.

La entrada de inversión extranjera en esta industria contribuirá no solo a la creación de empleo y al desarrollo de capacidades locales en áreas como la construcción, mantenimiento y operación de plantas, sino también a la consolidación del mercado interno del biodiésel. Esta dinámica no solo fortalecerá el sector energético nacional, sino que también posicionará al país como un líder emergente en la producción de combustibles sostenibles a nivel regional e internacional. En este contexto, el impacto económico positivo proyectado se traduce en un círculo virtuoso de desarrollo industrial, crecimiento económico y aumento de la competitividad en el mercado global del biodiésel.

#### **6.1.4.1 Mercados de Exportación para el Biodiésel**

##### **6.1.4.1.1 Europa**

La Unión Europea enfrenta una demanda de biodiésel que excede su capacidad de producción local. Para cubrir el consumo proyectado en 2010, la UE debería dedicar un 14% de su superficie agrícola cultivable a cultivos energéticos, lo cual es inviable debido a las restricciones en el uso sostenible del suelo. En lugar de expandir la producción local, la UE optará por importar biodiésel o aceite vegetal, siempre y cuando estos productos cumplan con los “Certificados de Sostenibilidad” (IBCE, 2007).

En este escenario, Bolivia tiene una ventaja competitiva. A través del Sistema Generalizado de Preferencias (SGP PLUS), Bolivia puede acceder al mercado europeo en condiciones preferenciales, mitigando así los altos costos logísticos. Además, la UE apoya a los países en desarrollo en la producción de biocombustibles, lo que abre mayores oportunidades para Bolivia.

Por otro lado, la producción de biodiésel de Estados Unidos no representa una amenaza significativa para Bolivia. La UE está adoptando medidas proteccionistas contra el biodiésel estadounidense, prohibiendo el traspaso de subsidios agrícolas al biodiésel en cumplimiento con el Acuerdo de la OMC. Esto limita la competencia de

los biocombustibles estadounidenses en el mercado europeo, favoreciendo las oportunidades para el biodiésel boliviano.

#### **6.1.4.1.2 Sudamérica**

En Sudamérica, Brasil presenta una alta demanda de diésel fósil, lo que lo convierte en un mercado atractivo para las exportaciones bolivianas. Los acuerdos energéticos entre ambos países han facilitado la transferencia tecnológica y el acceso preferencial a este mercado.

Chile también representa un mercado potencial significativo para Bolivia. El país vecino está en proceso de desarrollar su legislación y cuenta con una matriz energética predominantemente diésel. Bajo el Acuerdo de Complementación Económica (ACE-22) entre Bolivia y Chile (IBCE, 2007).

Bolivia tiene la oportunidad de ingresar al mercado chileno en condiciones preferenciales. Además, Chile enfrenta limitaciones en su capacidad para cubrir la demanda interna de biodiésel debido a restricciones en su superficie agrícola y pecuaria, lo que abre una puerta para las exportaciones bolivianas.

#### **6.1.4.2 Mercado interno**

Según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), al tercer trimestre de 2023, Bolivia importó combustibles por un valor de \$us 2.059,3 millones, de los cuales 35,1% correspondieron a gasolina y 64,9% a diésel. Para este año, el Gobierno nacional destinó Bs 7.642 millones a la subvención por la importación de diésel oíl y gasolina especial (Correo del Sur, 2024).

La capacidad de Bolivia para producir biodiésel localmente podría reducir significativamente la dependencia de importaciones de combustibles fósiles. Dado el alto costo asociado a la importación de diésel, fomentar la producción de biodiésel a partir de microalgas no solo disminuiría la necesidad de subvenciones para este combustible, sino que también estabilizaría los costos energéticos del país.

### 6.1.5 Viabilidad Cualitativa

La Planta Procesadora de Extracción de Aceite Vegetal y Aditivos, ubicada en el municipio de Villa Montes, tiene una capacidad de producción de 8 toneladas por hora. Esta planta, con una inversión total de más de 81,7 millones de bolivianos, desglosada en 65,8 millones para infraestructura y maquinaria, 1,3 millones para control y monitoreo, y 14,5 millones para operación, procesará 200 toneladas diarias de frutos de macororó, jatropha, soya y otros granos. El aceite producido será transformado en biocombustibles por YPFB, con la primera entrega programada para diciembre de 2024. La producción se destinará a la planta de biodiésel FAME I.

El Gobierno boliviano está invirtiendo 847,2 millones de bolivianos en la implementación de ocho plantas para desarrollar la industria oleoquímica de especies oleíferas. Este plan incluye cuatro plantas de extracción de aceite vegetal y aditivos y cuatro plantas de acopio y almacenaje de residuos líquidos para la producción de diésel ecológico. La Industria Boliviana de Aceites Ecológicos se enfocará en la generación de aceite vegetal y aditivos, que serán utilizados principalmente en la producción de biocombustibles. Se estima que esta industria permitirá al país reducir hasta 177 millones de dólares en importaciones de diésel al año (Visión 360 Periodismo Global, 2024).

Además, el Gobierno prevé la construcción de una segunda planta de biodiésel con capacidad de 1.500 barriles por día y una planta de diésel renovable con capacidad de 9.000 barriles por día (YPFB Somos Energía, 2024). Aunque el precio del biodiésel con una mezcla del 5% se estima en Bs 3,73 por litro y con una mezcla del 10% en Bs 4,12, ambos precios son superiores al actual de Bs 3,72 por litro. Las proyecciones del CEDLA indican que, bajo las condiciones actuales, la reducción de importaciones de diésel podría ser del 5% en 2024 y del 10% en 2025, lejos del objetivo gubernamental del 43%. Asimismo, se estima que el ahorro en subsidios sería del 4% en 2025 (Centro de estudios para el desarrollo laboral y agrario, 2024).

A continuación, se presenta una tabla que detalla la cantidad de materia prima necesaria para obtener 8 toneladas de aceite crudo. Los cálculos específicos se encuentran en el ANEXO T.

**Tabla 39. Cantidad de biomasa seca y nutrientes necesarios**

| <b>Insumos</b>                                       | <b>Cantidad necesaria para producción de 8 TM de lípidos de <i>Chlorella Vulgaris</i></b> |
|--|---|
| Biomasa seca de Microalgas <i>Chlorella Vulgaris</i> | 374 TM  |
| Agua (Volumen Fotobiorreactor)                       | 81000 m <sup>3</sup>  |
| Sulfato di amónico                                   | 2,43 TM   |
| Urea   | 2,51 TM   |
| Cloruro de calcio                                    | 3,48 TM   |
| Bicarbonato de sodio                                 | 2,19 TM   |

Fuente: Elaboración a partir de datos de laboratorio

La producción de biodiésel a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris* en Bolivia presenta una oportunidad prometedora para diversificar y fortalecer la matriz energética del país.

La viabilidad de este proyecto se sustenta en varios factores clave, incluyendo la inversión gubernamental en infraestructura, la disponibilidad de biomasa seca como materia prima, y la integración con las plantas de procesamiento existentes.

- **Inversión Gubernamental en Fotobiorreactores**

Para asegurar el éxito de la producción de biodiésel a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris*, es crucial comenzar con un fotobiorreactor piloto. El gobierno nacional puede desempeñar un papel fundamental invirtiendo en la construcción de estos sistemas controlados, que optimizan las condiciones de crecimiento de las microalgas y aseguran una producción constante y eficiente de biomasa.

Un fotobiorreactor piloto facilita la identificación de las condiciones óptimas de cultivo, la evaluación de la eficiencia del proceso y la reducción de riesgos financieros y operativos. Además, establece una base sólida para la futura expansión a instalaciones de mayor tamaño, proporcionando datos valiosos y experiencia práctica.

Esta inversión inicial es esencial para desarrollar una producción sostenible y eficiente de biodiésel en Bolivia.

- **Alternativa al sector sojero**

En el contexto actual del sector sojero en Bolivia, el aceite crudo necesario para la producción de biodiésel proviene mayoritariamente de este sector, que prefiere exportar a un precio mayor en lugar de abastecer la demanda para biocombustibles, las exportaciones de soya y derivados desde el año 2006 han alcanzado los 347 millones de dólares, que representa el 9,9 % de total exportado a nivel nacional y es el segundo producto en valor económico después del gas natural (Centro de estudios para el desarrollo laboral y agrario, 2024). Esta dependencia externa puede ser mitigada mediante el uso de microalgas como fuente de aceite crudo, ofreciendo una alternativa localmente viable y reduciendo la dependencia del sector sojero.

- **Integración con Plantas de Procesamiento Existentes**

Bolivia ya dispone de infraestructura clave para la producción de biodiésel. La Planta Procesadora de Extracción de Aceite Vegetal y Aditivos en Villa Montes tiene una capacidad de 8 toneladas por hora, mientras que la Planta de Biodiésel 1 en Santa Cruz puede procesar entre 1.500 y 2.000 barriles diarios de diversas materias primas locales. Estas instalaciones pueden adaptarse al nuevo esquema de producción de biodiésel basado en microalgas, utilizando la biomasa seca de *Chlorella Vulgaris* como una fuente adicional de aceite crudo.

- **Proyecciones y Beneficios**

La entrada en operación de las plantas complementarias, como las de *metanol*, urea formaldehído, nitrato de amonio y *fosfato diamónico*, que forman parte del Complejo Petroquímico de Fertilizantes en Bulo Bulo, es crucial para fortalecer la infraestructura necesaria para la producción de biodiésel en Bolivia. Además, la construcción de cuatro plantas industriales en la comunidad de Kulla, Uyuni, para la elaboración de ácido sulfúrico, *hidróxido de sodio*, ácido clorhídrico, hidróxido de calcio, carbonato de sodio, hipoclorito de sodio, cloruro de calcio y *bicarbonato de sodio*, contribuirá a la cadena de suministro indispensable para la producción de aceite crudo de *Chlorella*

Vulgaris. Estas inversiones en infraestructura petroquímica y química apoyarán de manera significativa la producción sostenible de biodiésel en el país.

## **6.2 Análisis ambiental**

### **6.2.1 Consumo de Agua y Manejo de residuos**

La sostenibilidad en la producción de biodiésel a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris* se ve significativamente mejorada mediante la reutilización del agua de cultivo. Este enfoque no solo reduce el consumo de agua fresca, sino que también disminuye los costos operativos y minimiza el impacto ambiental.

Diversos estudios y prácticas industriales respaldan la viabilidad de la reutilización del agua en el cultivo de microalgas. Según investigaciones como las de (Markou & Georgakakis, 2011) y (Rawat, Ranjith Kumar, Mutanda, & Bux, 2011), la implementación de prácticas de reutilización del agua de cultivo en la producción de biodiésel a partir de microalgas contribuye al cumplimiento del Artículo 39 CAPITULO II, DEL RECURSO AGUA, de la Ley de medio ambiente 1333, al minimizar el riesgo de contaminación y degradación del recurso hídrico.

El manejo adecuado de residuos y el tratamiento de subproductos son cruciales para la sostenibilidad ambiental en la producción de biodiésel. En particular, la biomasa residual, que puede ser reutilizada en nuevos cultivos o como alimento para animales, juega un papel fundamental. La reutilización de esta biomasa optimiza el uso de recursos, reduce residuos y minimiza el impacto ambiental, promoviendo un enfoque de economía circular.

Este enfoque está alineado con el Artículo 39 de la Ley de Medio Ambiente 1333, que establece que el Estado debe regular y controlar el vertido de cualquier sustancia o residuo que pueda contaminar las aguas o degradar el entorno. La adecuada gestión de la biomasa residual contribuye al cumplimiento de esta normativa, garantizando que los residuos no afecten negativamente a los recursos hídricos ni al entorno natural. Así, se asegura una producción de biodiésel más sostenible y una gestión ambiental responsable.

Al optimizar el uso del agua y reducir los residuos líquidos generados, se apoya una gestión responsable y sostenible del recurso, alineándose con los objetivos de protección y conservación establecidos por la Ley.

La filtración y desinfección son pasos cruciales para asegurar que el agua reutilizada esté libre de partículas sólidas y microorganismos no deseados. La filtración inicial elimina los sólidos suspendidos y restos de biomasa, mientras que la desinfección, mediante métodos como el cloro, ozono o luz ultravioleta (UV), garantiza la eliminación de cualquier potencial contaminante biológico.

Es esencial ajustar los niveles de nutrientes en el agua reutilizada. Durante el ciclo de cultivo, las microalgas consumen nutrientes del agua, y un análisis químico permite determinar las concentraciones de nitrógeno, fósforo y otros elementos esenciales. Ajustar estos niveles asegura que las microalgas tengan un ambiente óptimo para su crecimiento continuo.

El control del pH y la salinidad del agua reutilizada es otro aspecto crucial. La actividad metabólica de las microalgas puede alterar el pH, y mantenerlo dentro del rango óptimo es fundamental para su desarrollo. Asimismo, la salinidad, especialmente en cultivos que utilizan agua salina, debe ser monitoreada y ajustada según sea necesario.

Para que un fotobiorreactor a gran escala sea viable, es fundamental que esté ubicado cerca de una fuente de agua natural, como un lago o un río. La proximidad a estas fuentes garantiza el suministro constante y abundante de agua necesaria para el cultivo de microalgas, como la *Chlorella Vulgaris*. Según un estudio realizado por (Richmond & Hu, 2013), el cultivo de microalgas en fotobiorreactores requiere grandes volúmenes de agua para mantener las condiciones óptimas de crecimiento y para la gestión de nutrientes. Además, el acceso a agua de buena calidad es esencial para evitar la contaminación y asegurar la productividad del cultivo. La disponibilidad de agua dulce también puede reducir los costos operativos y mejorar la sostenibilidad del proceso de producción de biodiésel a partir de microalgas.

### **6.2.2 Impacto en la biodiversidad:**

La producción de biodiésel a partir de microalgas, alineada con el Artículo 73°, CAPITULO XII, DE LOS RECURSOS ENERGETICOS de la Ley de medio ambiente 1333, debe considerar los recursos energéticos como esenciales para el desarrollo sostenible del país. Es imperativo que el aprovechamiento de estos recursos se realice de manera eficiente y bajo estrictas normas de protección y conservación del medio ambiente.

Las actividades relacionadas con la producción de biodiésel, realizadas por YPF y otras empresas, deben integrar medidas ambientales para la prevención y control de la contaminación, deforestación, erosión y sedimentación. Además, deben proteger la flora y fauna silvestre, el paisaje natural y las áreas protegidas. La implementación de planes de contingencia es esencial para evitar derrames de hidrocarburos y otros productos contaminantes.

En el contexto de la producción de biodiésel a partir de microalgas, es crucial considerar los efectos en los ecosistemas locales, especialmente si se utilizan cuerpos de agua naturales para el cultivo de microalgas. La alteración de estos cuerpos de agua puede tener impactos significativos en la biodiversidad, afectando la flora y fauna locales. El uso de grandes volúmenes de agua puede modificar los hábitats acuáticos, alterar la calidad del agua y afectar a las especies que dependen de estos ecosistemas. Sin embargo, es importante destacar que, en el cultivo de microalgas, el agua utilizada es reutilizada en el proceso de cultivo, lo que reduce considerablemente la necesidad de agua fresca y minimiza el impacto en los recursos hídricos naturales y conservar la biodiversidad.

Para mitigar estos impactos, se deben implementar prácticas de manejo sostenible, como el uso de sistemas cerrados de fotobiorreactores, que minimizan la interacción con los cuerpos de agua naturales. Estos sistemas controlados permiten optimizar las condiciones de crecimiento de las microalgas, reduciendo al mínimo el uso de agua y evitando la contaminación de los ecosistemas acuáticos.

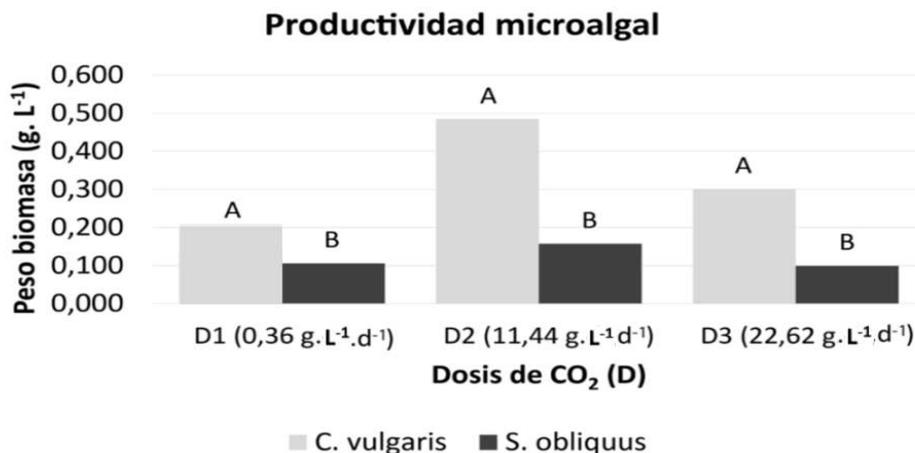
## 6.2.3 Emisiones de gases de efecto invernadero:

### 6.2.3.1 Absorción de CO<sub>2</sub> durante el cultivo

La dosificación óptima de CO<sub>2</sub>, establecida en 11,44 g/l\*día, es crucial para maximizar la productividad de biomasa en microalgas. Tanto *Chlorella Vulgaris* como *Scenedesmus obliquus* muestran disminución en la productividad de biomasa con exceso o insuficiencia de CO<sub>2</sub>. *Chlorella Vulgaris* demostró una mayor tolerancia y productividad en comparación con *Scenedesmus obliquus* bajo todas las dosis de CO<sub>2</sub>, destacándose especialmente a dosis medias. Estos resultados subrayan la importancia de ajustar la dosificación de CO<sub>2</sub> según las necesidades específicas de cada especie para optimizar la producción de biodiésel. (Kassim & Meng, 2017).

En el cultivo de microalgas *Chlorella Vulgaris*, la aireación y la concentración de CO<sub>2</sub> son factores cruciales para la productividad de biomasa. Con una aireación de 1 vvm y una concentración de CO<sub>2</sub> del 0.03%, que es la concentración natural del aire, se puede absorber aproximadamente 29,16 toneladas de CO<sub>2</sub> por día (cálculo realizado en ANEXO U), para lograr una producción de 374 toneladas de biomasa seca.

**Figura 34. Productividad Microalgal expresada en biomasa de *C. Vulgaris* y *S. Obliquus*. Dosificaciones de CO<sub>2</sub> D1, D2 y D3. Iluminación artificial (4400 lm), fotoperiodo 24:24 h, rango de temperatura 26 °C – 31 °C**



Fuente: Estudio realizado por (Kassim & Meng, 2017)

Si se optimiza la concentración de CO<sub>2</sub> a 11,44 g/l\*día, se alcanza la mejor absorción de CO<sub>2</sub> por parte de las microalgas, resultando en el mayor rendimiento de crecimiento. Bajo estas condiciones óptimas de aireación y concentración de CO<sub>2</sub>, es posible absorber hasta 926,64 toneladas de CO<sub>2</sub> por día (cálculo realizado en ANEXO U), lo cual permite producir 374 toneladas de biomasa seca.

Este análisis demuestra la importancia de ajustar la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire suministrado al cultivo de microalgas para maximizar la absorción de CO<sub>2</sub> y la productividad de biomasa. La optimización de estos parámetros no solo mejora el rendimiento del cultivo, sino que también contribuye significativamente a la mitigación de emisiones de CO<sub>2</sub>, aprovechando la capacidad de las microalgas para absorber grandes cantidades de este gas de efecto invernadero.

#### **6.2.3.2 Reducción de emisiones**

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) proporciona información sobre las emisiones de CO<sub>2</sub> de diferentes combustibles. Según la EPA, la combustión de un galón de diésel emite aproximadamente 10.21 kg de CO<sub>2</sub>. (EPA, 2023) Dado que un galón de diésel es equivalente a aproximadamente 3.785 litros, esto se traduce en aproximadamente 2.68 kg de CO<sub>2</sub> por litro de diésel. El uso de biodiésel puede reducir las emisiones netas de gases de efecto invernadero en comparación con los combustibles fósiles. Estos estudios indican que el biodiésel puede reducir las emisiones netas de CO<sub>2</sub> en hasta un 78% en comparación con el diésel fósil. (Clarens, Resurreccion, White, & Colosi, 2010)

#### **6.2.4 Uso de tierra:**

- **Impacto del uso del suelo**

A diferencia de los cultivos tradicionales de biocombustibles, como la soja o el maíz, las microalgas se cultivan en sistemas cerrados, como los fotobiorreactores, que requieren una superficie terrestre considerablemente menor. Esta característica reduce la competencia con cultivos alimentarios y contribuye a la preservación de áreas agrícolas dedicadas a la producción de alimentos. Las microalgas tienen la capacidad de generar grandes cantidades de aceite en espacios mucho más reducidos

en comparación con los cultivos terrestres. Esto permite la producción significativa de biodiésel sin la necesidad de extensas áreas de tierra, minimizando así el impacto sobre la disponibilidad de tierras agrícolas.

Esta eficiencia en el uso del suelo ayuda a minimizar el impacto sobre la disponibilidad de tierras agrícolas, alineándose con los principios del Artículo 32, CAPITULO I, DE LOS RECURSOS NATURALES RENOVABLES, de la Ley de Medio Ambiente 1333. Este artículo establece que es deber del Estado y de la sociedad preservar, conservar, restaurar y promover el aprovechamiento de los recursos naturales renovables, incluyendo el suelo. La utilización de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas evita la deforestación y la degradación de los ecosistemas naturales que comúnmente acompaña la expansión de cultivos agrícolas convencionales para biocombustibles.

#### **6.2.5 Sostenibilidad**

La producción de biodiésel a partir de *Chlorella Vulgaris* se presenta como una alternativa sostenible, con beneficios significativos en el consumo de agua, manejo de residuos, uso del suelo y reducción de emisiones de gases de efecto invernadero. Estos beneficios no solo optimizan la eficiencia del proceso, sino que también garantizan el cumplimiento de las normativas ambientales, apoyando una gestión ambiental responsable y eficaz.

## CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1 Conclusiones

#### a) Selección y caracterización de cepas de *Chlorella Vulgaris*

Se identificaron varias cepas prometedoras de microalgas a través de un cultivo por estría, lo que permitió la separación efectiva de cepas y tipos de microalgas presentes. Posteriormente, se realizó una identificación morfológica bajo microscopio, donde se encontró la microalga *Chlorella vulgaris* como una de las cepas más destacadas. Estas cepas no solo mostraron un alto contenido de lípidos, con un rendimiento teórico que oscila entre el 5 % y el 58 % respecto a la biomasa seca, sino que también demostraron un crecimiento óptimo.

Es importante destacar que estas cepas de *Chlorella vulgaris* han demostrado una notable capacidad de adaptación a diferentes entornos. Esta versatilidad es particularmente relevante para nuestro país, que experimenta variaciones climáticas significativas tanto en el oriente como en el occidente. La capacidad de estas cepas para prosperar en diversas condiciones climáticas garantiza una producción estable y confiable de biodiésel a lo largo del año, independientemente de los cambios estacionales.

#### b) Evaluación de sistemas de cultivo

Los sistemas cerrados, como los fotobiorreactores, ofrecen la ventaja de un control preciso sobre las condiciones ambientales, lo que es crucial para optimizar el crecimiento de las microalgas. En este estudio, se controlaron parámetros clave como la temperatura, la iluminancia, la aireación, el pH y la cantidad de nutrientes. Los valores óptimos identificados fueron: una temperatura de 26°C, una iluminancia de entre 3 y 9 klx, una aireación de 1 VVM (más óptimo) y 2 VVM, y la absorción de CO<sub>2</sub>. Además, se utilizó una cantidad controlada de nutrientes, como fosfato diamónico, urea, cloruro de sodio y bicarbonato de sodio, manteniendo el pH entre 7 y 8.

Este nivel de control en los sistemas cerrados no solo maximiza el crecimiento de las microalgas, sino que también resulta en una mayor producción de lípidos, esencial para la eficiencia en la producción de biodiésel. Además, los sistemas cerrados minimizan la contaminación y el riesgo de contaminación cruzada, lo que mejora la pureza de la biomasa y de los productos finales.

Los sistemas de cultivo abiertos, como estanques o lagunas, carecen de este nivel de control y están más expuestos a fluctuaciones ambientales. Aunque son más económicos de implementar y mantener, estos sistemas pueden ser afectados por variaciones climáticas, competencia de otras especies y contaminación, lo que resulta en una menor producción de lípidos en *Chlorella Vulgaris* en comparación con los sistemas cerrados.

#### c) Métodos de extracción de lípidos

Se evaluaron diferentes métodos de extracción de lípidos, entre los que se incluyen la extracción con solventes orgánicos y métodos mecánicos, con el objetivo de determinar cuál ofrecía el mejor rendimiento y eficiencia.

Los resultados demostraron que el método de extracción con solventes orgánicos fue el más eficaz y económico en la obtención de altos rendimientos de biodiésel a partir de *Chlorella Vulgaris*. Específicamente, el método Soxhlet que se utilizó por su alto rendimiento, proporcionando más del 50% de rendimiento en la extracción de lípidos.

La selección del método Soxhlet se basó en su eficacia comprobada y su relativa facilidad de implementación. Este método permitió obtener un rendimiento significativo de lípidos con un menor consumo de tiempo y recursos en comparación con otros métodos evaluados. Además, su versatilidad lo hace aplicable a una variedad de muestras y condiciones de laboratorio.

#### d) Producción de biodiésel

Se produjo biodiésel a partir de las microalgas *Chlorella Vulgaris* y obteniendo un rendimiento de 65 %, el cual es muy favorable para una producción a gran escala o escala industrial.

La evaluación de la producción de biodiésel a partir de *Chlorella Vulgaris* nos ha brindado una visión clara sobre la viabilidad de este proceso. En primer lugar, hemos confirmado que *Chlorella Vulgaris* es una fuente prometedora de lípidos, los cuales son los precursores clave para la producción de biodiésel.

Nuestros resultados muestran que, con un adecuado procesamiento de las microalgas, se pueden obtener suficientes lípidos para producir grandes cantidades de biodiésel. Este hecho es crucial en el contexto actual de la búsqueda de fuentes de energía renovable y sostenible. Además, la producción de biodiésel a partir de microalgas como *Chlorella Vulgaris* ofrece ventajas significativas en términos de eficiencia de cultivo, utilización de tierra y recursos hídricos, en comparación con los cultivos tradicionales utilizados para la producción de biocombustibles.

e) Evaluación integral de la producción de biodiésel

La viabilidad y sostenibilidad de la producción de biodiésel a partir de microalgas *Chlorella Vulgaris* en Bolivia se basa en varios factores clave. El uso de un fotobiorreactor piloto es esencial para optimizar las condiciones de cultivo y asegurar una producción eficiente y constante de biomasa, además de reducir los riesgos financieros y operativos. Esta iniciativa puede mitigar la dependencia del sector sojero, ofreciendo una alternativa local viable para la obtención de aceite crudo. Además, la integración con las plantas de procesamiento existentes en Bolivia y la inversión en infraestructura petroquímica y química fortalecerán la cadena de suministro y producción. La producción de biodiésel a partir de microalgas no solo es una opción sostenible, sino que también contribuye a la gestión responsable del agua, los residuos y el uso del suelo, y a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, asegurando el cumplimiento de las normativas ambientales y promoviendo una gestión ambiental eficaz.

## 7.2 Recomendaciones

Continuar con la búsqueda y evaluación de cepas de *Chlorella Vulgaris* con alto contenido de lípidos y tasas de crecimiento óptimas.

Realizar estudios genéticos para identificar y seleccionar cepas con características deseables para la producción de biodiésel.

Implementar sistemas cerrados de cultivo a mayor escala para optimizar la producción de lípidos.

Investigar nuevas tecnologías y técnicas de cultivo que mejoren la eficiencia y reduzcan los costos de producción.

Explorar métodos de extracción más eficientes y sostenibles, como la extracción asistida por ultrasonidos o enzimas.

Optimizar los parámetros de los métodos de extracción existentes para aumentar los rendimientos y reducir los costos, el aumento de concentración de CO<sub>2</sub> podría mejorar la cantidad de lípidos producida a partir de biomasa seca.

Realizar pruebas piloto a mayor escala para validar la viabilidad técnica y económica de la producción de biodiésel.

Realizar estudios de ciclo de vida para evaluar el impacto ambiental completo de la producción de biodiésel.

Realizar análisis de costos detallados para identificar áreas de mejora y reducir los costos de producción.

Promover la educación y concientización sobre la importancia de los biocombustibles y la sostenibilidad energética.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro Vives, O. G. (2008). *ESCALADO DEL CULTIVO DE LA MICROALGA CHLORELLA VULGARIS EN CULTIVADORES DE PELÍCULA DESCENDENTE. APLICACIÓN DE LA TEORÍA DE LOS MODELOS PARA EL ESCALADO*. Santiago de Cuba.
- Alibas, I. (2021). Microwave and convective drying kinetics and thermal properties of orange slices and effect of drying on some phytochemical parameters. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*.
- Alpha A. (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington.
- Ashish Bhatnagar, M. B. (2010). *Chlorella minutissima--a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters*. *Appl Biochem Biotechnol*.
- Auxiliar de Laboratorista Químico. (27 de octubre de 2015). TÉCNICA ASEPTICA. Obtenido de <https://pdfcoffee.com/tecnica-aseptica-5-pdf-free.html>
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2007). Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. *Journal of Phycology*.
- Becker, E. W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge: Syndicate of University of Cambridge.
- Blankenship, R. E. (2014). *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. *John Wiley & Sons*.
- blogceta.zaragoza.unam.mx. (s.f.). Cámara de Neubauer. *Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos II*. Obtenido de <https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/#:~:text=La%20c%C3%A1mara%20de%20recuento%2C%20Neubauer,leucocitos%2C%20eritrocitos%2C%20trombocitos>).
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.

- Cadima F., M. M. (2005). Algas de Bolivia con énfasis en el fitoplancton : importancia, ecología, aplicaciones y distribución de géneros. Bolivia.
- Centro de estudios para el desarrollo laboral y agrario. (29 de enero de 2024). La producción de biodiésel estará lejos de la meta de sustitución de importaciones. Obtenido de <https://cedla.org/noticias2/la-produccion-de-biodiesel-estara-lejos-de-la-meta-de-sustitucion-de-importaciones/>
- Cervantes, A. L. (2010). Captura de CO<sub>2</sub> por una comunidad de microalgas obtenidas de un ecosistema natural mexicano. Obtenido de <https://doi.org/10.24275/uami.vm40xr75s>
- Céspedes, A. G. (Octubre de 2015). ¿QUÉ SON LAS MICROALGAS? INTERÉS Y USO. Cajamar.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*.
- Clarens, A. F., Resurreccion, E. P., White, M. A., & Colosi, L. M. (2010). Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environmental science & technology*.
- Conesa, J. A. (2006). *Diseño de reactores de LECHO FLUIDIZADO*. Universidad de Alicante.
- CONFEDERACIÓN HIDROGRÁFICA DEL EBRO. (2011). METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL ESTADO ECOLÓGICO SEGÚN LA DIRECTIVA MARCO DEL AGUA EN LA CONFEDERACIÓN HIDROGRÁFICA DEL EBRO. *PROTOCOLOS DE MUESTREO Y ANÁLISIS PARA FITO`PLANTON*.
- Correo del Sur. (22 de Julio de 2024). El Presupuesto 2024 garantiza subvención al diésel y la gasolina. Obtenido de [https://correodelsur.com/politica/20231130\\_el-presupuesto-2024-garantiza-subvencion-al-diesel-y-la-gasolina.html](https://correodelsur.com/politica/20231130_el-presupuesto-2024-garantiza-subvencion-al-diesel-y-la-gasolina.html)
- cuadernolab.web. (2014). Diluciones seriadas. *Cuaderno de Laboratorio*. Obtenido de <https://cuadernolab.web.uah.es/web/tecnicas/diluciones-seriadas/>

- D6751, A. (2023). *ASTM D6751-23a Standard Specification for Biodiesel Fuel Blendstock (B100) for Middle Distillate Fuels*. (ASTM International) Obtenido de ASTM International: <https://www.astm.org/d6751-23a.html>
- Devgoswami, R. C. (2011). *Studies on the growth behavior of Chlorella, Haematococcus and Scenedesmus sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas*.
- Devgoswami, R. C. (2011). Studies on the growth behavior of Chlorella, Haematococcus and Scenedesmus sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas. *African Journal of Biotechnology*.
- EPA. (2023). *Greenhouse Gas Emissions from a Typical Passenger Vehicle*. Obtenido de <https://www.epa.gov/greenvehicles/greenhouse-gas-emissions-typical-passenger-vehicle>
- FAO, F. a. (2009). CULTIVO DE MICROALGAS. Obtenido de <https://www.fao.org/4/ab473s/AB473S02.htm>
- Fides, A. d. (5 de Octubre de 2011). Insumos Bolivia inicio provisión de fertilizantes a pequeños productores a precio justo. *Agencia de noticias Fides*.
- Gerhard Knothe, J. V. (2005). *The Biodiesel*. Estados Unidos: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
- Gómez Luna, L., Cedeño Tormos, L., & Díaz Ortega, Y. (30 de abril de 2012). *Mi SciELO*. Obtenido de Cultivo y aplicaciones de Chlorella vulgaris: principales tendencias y potencialidades en la agricultura: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-61852022000100070](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852022000100070)
- González, B. (1999). Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura. *Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales*.

- Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36:269–274.
- Guillard, R., & Ryther, J. (1962). Studies on Marine Planktonic Diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*.
- Harun, R., Singh, M., & Forde, G. M. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Hemming, F. W., & Parsons, W. J. (1963). Gas-liquid chromatography of fatty acids. *Advances in Lipid Research*.
- Hernández, A. E. (2017). *Pretratamientos de grasa residual de cocción de alimentos para la producción de biodiesel*. Brazil: Facultad de Ingeniería Mecánica. Instituto Superior Politécnico.
- Honorable Congreso Nacional de Bolivia. (15 de junio de 1992). LEY No. 1333. *LEY DEL MEDIO AMBIENTE*. Bolivia.
- IBCE, I. B. (2007). Biocombustibles. Obtenido de <http://www.ibce.org.bo>
- Issa, A. A. (1995). *Abolition of Heavy Metal Toxicity on Kirchneriella lunaris (Chlorophyta) by Calcium*. *Annals of Botany*.
- Janssen, M. (2002). *Cultivation of microalgae: Effect of light/dark cycles on biomass yield*.
- Kassim, M., & Meng, T. (2017). Carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. *Science of The Total Environment*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.172>
- Kiran, B., Pathak, K., Kumar, R., & Deshmukh, D. (2016). Growth pattern and biofuel production potential of newly isolated microalga, *Chlorococcum* sp. IM-03 under nitrogen limited conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*.
- La Razon. (26 de abril de 2023). Bolivia da el salto a la industria química básica. Obtenido de <https://www.la-razon.com/economia/2023/04/26/bolivia-da-el->



- Milano, J. &. (2016). Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation VOL 58.
- Milne, T. A., Evans, R. J., & Nagle, N. (1990). Catalytic conversion of microalgae and vegetable oils to premium gasoline, with shape-selective zeolites. *Biomass*.
- Morrison, V. (31 de julio de 2023). *Biocombustibles al descubierto: Descubriendo las ventajas y desventajas del biodiésel*. Obtenido de Fritz Energy: <https://fritzenenergy.com/the-advantages-and-disadvantages-of-biodiesel/>
- Padovan, A. (1992). *Isolation and culture of five species of freshwater algae from the Alligator Rivers Region, Northern Territory*. Australia: Australian Government Publishing.
- Peñuela Moreno, J. A. (2011). *DISEÑO DE UNA PLANTA PILOTO PARA PRODUCCIÓN DE BODIESEL A PARTIR DE ACEITE DE COCINA USADO*. Bogotá: Facultad de Ingeniería, Instituto de Posgrados, Especialización en gerencia ambiental.
- Peretti, S. (2007). Algae to biodiesel conversion and scale up. *Senior design project department of chemical*.
- Pérez, J. M. (2017). *Diferentes Especies De La Microalga Chlorella Como Complemento Dietético: Una Revisión Sistemática*. Coruña, España: Máster En Asistencia E Investigación Sanitaria. Obtenido de Chlorella, Chlorella vulgaris: <https://www.equisalud.com/producto/chlorella-chlorella-vulgaris/>
- Praveenkumar, R., Shameera, K., Mahalakshmi, G., Akbarsha, M. A., & Thajuddin, N. (2012). Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga Chlorella sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. Riyadh, Saudi Arabia.
- Raitelli, M. (2011). *Raitelli Mario [Sección de libro]// Diseño de*.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of

domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*. *Applied Energy*.

Reynoso, M. M. (1998). Cultivos en medios sólidos. *Libretexts*.

Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Ltd.

Richmond, A., & Hu, Q. (2013). Applied Phycology and Biotechnology. *Handbook of Microalgal Culture*.

Saini, R. K. (2021). Advances in Lipid Extraction Methods—A Review. *Molecular Sciences*. Obtenido de <https://www.mdpi.com/journal/ijms>

Salinas, J. C. (28 de marzo de 2024). Etanol en Bolivia: 6 claves para entender su uso como biocombustible. *economía EL DEBER*. Obtenido de [https://eldeber.com.bo/economia/etanol-en-bolivia-6-claves-para-entender-su-uso-como-biocombustible\\_361316](https://eldeber.com.bo/economia/etanol-en-bolivia-6-claves-para-entender-su-uso-como-biocombustible_361316) )

saludconlupa.com. (s.f.). La carrera científica contra las bacterias multirresistentes. Obtenido de <https://saludconlupa.com/noticias/la-carrera-cientifica-contra-las-bacterias-multirresistentes/>

Salunkhe, D. K. (1992). *World oilseeds : chemistry, technology, and utilization*. New York, Estados Unidos: Van Nostrand Reinhold.

Sheng-Yi, C. (2009). Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technology*.

Suarez, D. A. (15 de Mayo de 2020). *Aplicaciones industriales de las microalgas*. Obtenido de *Biología, Neoalgae*: <https://neoalgae.es/aplicaciones-industriales-de-las-microalgas/>

Torres, R. A. (2011). Diseño de Foto-Biorreactores para el Cultivo Micro Algas Oleaginosas Parte 1. Teoría y Generalidades. *Biología Práctica y Aplicada*.

- UNE-EN 14214, 2. V. (2018). Productos petrolíferos líquidos, Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) para motores diésel y equipos de calefacción. Madrid, España. Obtenido de [www.une.org](http://www.une.org)
- UNP, U. N. (2011). *Cultivo de una Microalga Dunaliella SP Mediante la tecnica de la masificación*. Piura, Peru.
- Vicente, E., Hoyos, C., Sánchez, P., & Cambra, J. (2005). Protocolo de muestreo y análisis. Obtenido de [http://195.5.247.234/webcalidad/estudios/indicadoresbiologicos/Manual\\_fitoplancton.pdf](http://195.5.247.234/webcalidad/estudios/indicadoresbiologicos/Manual_fitoplancton.pdf).
- Villanueva, R. O. (2013). *PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS*. México: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.
- Villarreal, N. A., & Kafarov, V. (9 de Junio de 2015). Desarrollo preliminar de una metodología de suministro de CO<sub>2</sub> a cultivos de *Botryococcus Braunii* para la producción de biocombustibles. Bucaramanga, Colombia.
- VISION 360 PERIDISMO GLOBAL. (26 de Julio de 2024). Prevén entregar la primera planta de extracción de aceite vegetal en diciembre. Obtenido de <https://www.vision360.bo/noticias/2024/07/18/8427-preven-entregar-la-primer-planta-de-extraccion-de-aceite-vegetal-en-diciembre>
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* .
- Watanabe, K. (2005). *Symbiotic association in Chlorella culture*. FEMS Microbiol Ecol.
- Wikipedia. (2023). *Salar de Uyuni*. Obtenido de Wikipedia, [https://es.wikipedia.org/wiki/Salar\\_de\\_Uyuni#:~:text=El%20salar%20de%20Uyuni%2C%20como,toneladas%20son%20extra%C3%ADdas%20cada%20a%C3%B1o.](https://es.wikipedia.org/wiki/Salar_de_Uyuni#:~:text=El%20salar%20de%20Uyuni%2C%20como,toneladas%20son%20extra%C3%ADdas%20cada%20a%C3%B1o.))
- Xue, Z., Yu, Y., Yu, W., Gao, X., Zhang<sup>1</sup>, Y., & Kou, X. (2020). Development prospect and preparation Technology of Edible Oil From Microalgae. *Frontiers in Marine Science*.

YPFB SOMOS ENERGIA. (26 de marzo de 2024). La Planta de Biodiésel I entra en marcha para garantizar la seguridad energética. Bolivia.

ypfb.gob.bo. (26 de enero de 2024). YPFB apunta a duplicar la producción de urea con una segunda planta que consumirá 1 TCF en 20 años. Bolivia.

Zhang, K., Kurano, N., & Miyachi, S. (2002). Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* .

## ANEXOS

### ANEXO A Sistema cerrado para fotobiorreactores de 100 ml, para visualización de crecimiento referencial de microalgas, comparando iluminación, aireación, temperatura, y nutrientes.



A



B

Fuente: Fotografías tomadas de cultivos realizados en casa, El Alto, Distrito 7

En las figuras A y B, se visualiza fotografías de fotobiorreactores de 100 ml, utilizados para realizar pruebas de crecimiento referencial en función a la iluminación, aireación, temperatura, y los nutrientes utilizados.

### ANEXO B Armado de sistema cerrado para fotobiorreactores de 500 ml



A



B



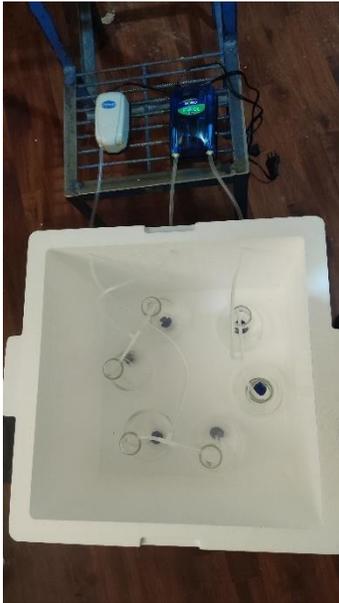
C

Fuente: Fotografías tomadas de cultivos realizados en casa, El Alto, Distrito 7

A. Matraz erlenmeyer de 500 ml

B, C. Sistema cerrado para cultivo de microalgas *Chlorella Vulgaris*

## ANEXO C Inoculación de microalgas para ver crecimiento referencial



A



B



C

Fuente: Fotografías tomadas de cultivos realizados en casa, El Alto, Distrito 7

En la figura A se ve la configuración que tomara el fobiorreactor.

En la figura B se realiza la inoculación de microalgas *Chlorella Vulgaris*.

En la figura C se visualiza la configuración final para ver el crecimiento de microalgas con aireación regulada de 1 vvm, la compresora de aire son regulables con capacidades de 1, 2, 5, 10 litros/min de aire.

## ANEXO D Nutrientes utilizados para el crecimiento de microalgas *Chlorella Vulgaris*



A



B



C



D



E



F

Fuente: Fotografías de los Nutrientes Adquiridos

En la figura A se muestran los nutrientes, que fueron adquiridos de manera local en la feria 16 de julio, los cuales algunos son utilizados como fertilizantes.

B. Nitrofoska, C. humus, D. Urea, E. Fosfato Diamonico y F. Bicarbonato de Sodio

## ANEXO E Pesando los nutrientes para su inoculación



A

B

C

D

E

Fuente: Fotografías tomadas de cultivos realizados en casa, El Alto, Distrito 7

A. UREA, B. FOSFATO DIAMONICO, C. HUMUS, D. NITROFOSKA y E. BICARBONATO DE SODIO

## ANEXO F Crecimiento de microalgas después de 2 días.



Fuente: Fotografías tomadas de cultivos realizados en casa, El Alto, Distrito 7

Se puede observar que existe crecimiento visual después de dos días que inicio el cultivo.

## ANEXO G Crecimiento algal después de 20 días



Fuente: Fotografías tomadas de cultivos realizados en casa, El Alto, Distrito 7

Se puede observar que después de 20 días, los cultivos muestran una densidad óptica algal diferente, las muestras 1 y 4 son las que tienen más contenido de microalgas.

## ANEXO H Muestras pequeñas para conteo de microalgas en laboratorio.



Fuente: Fotografías tomadas de cultivos realizados en casa, El Alto, Distrito 7

Se tomaron muestras de 10 ml para realizar conteos de microalgas en laboratorio, mediante difusión seriada.

## ANEXO I Escalamiento a 5 litros de cultivo



A



B



C



D

Fuente: Fotografías tomadas de cultivos realizados en casa, El Alto, Distrito 7

En la figura A se observa la preparación del cultivo de 5 litros. En la figura B, se realizó una inoculación de 500 ml de cultivo de microalgas, seguida de la adición de nutrientes (urea, fosfato diamónico, cloruro de sodio y bicarbonato de sodio), los cuales se muestran en la figura C.

La figura D muestra el sistema cerrado para el cultivo de 5 litros, con temperatura regulada a 26 °C y una aireación de 1 vvm, proporcionando 5 litros de aire por minuto.

## ANEXO J Escalamiento a cultivos de 20 litros



Fuente: Fotografías tomadas de cultivos realizados en casa, El Alto, Distrito 7  
Se realizó un cultivo de 20 litros, con aireación de 1 vvm y temperatura de 26 °C.

## ANEXO K Centrifugacion de los cultivos, para obtencion de biomasa



A



B



C



D

Fuente: Fotografías tomadas del proceso de centrifugación, realizados en casa, El Alto, Distrito 7

Se realizo la centrifugacion de los cultivos para obtener biomasa, a 300 rpm por 15 min. Utilizando un centrifugador BOECO. Notese que las microalgas se concentran en la parte inferior de los tubos de ensayo.

## ANEXO L Obtencion de la biomasa seca.



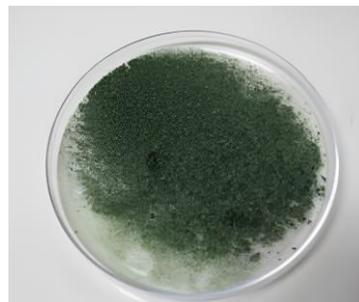
A



B



C



D

Fuente: Fotografías tomadas en casa, El Alto, Distrito 7 y en Laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA.

Después de la centrifugación, la biomasa húmeda se trasladó a una caja Petri, como se observa en la figura A. Luego, se secó en un horno a 60 °C y se transfirió a una bandeja, como se muestra en la figura B. Posteriormente, se realizó una molienda, ilustrada en la figura C, para finalmente obtener biomasa seca, visible en la figura D.

## ANEXO M Preparación del equipo de extracción Soxhlet, para extracción de lípidos



A



B



C

Fuente: Laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA.

Se pesaron muestras de biomasa seca de microalgas *Chlorella Vulgaris* de aproximadamente 10 gramos, como se muestra en la figura A. Luego, se midieron aproximadamente 160 ml de n-hexano, ilustrado en la figura B. Tanto la muestra de biomasa seca como el n-hexano se introdujeron en el equipo Soxhlet, como se observa en la figura C.

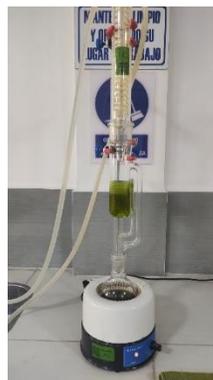
## ANEXO N Extracción de lípidos, método Soxhleth



A



B



C



D

Fuente: Laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA.

En las figuras A, B, C y D se observan diferentes etapas de la extracción de lípidos con n-hexano.

## ANEXO O Recuperación de n-hexano



Fuente: Laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA

La recuperación del n-hexano se realizó utilizando un equipo rotavapor, operando a 70 rpm y 60 °C, durante aproximadamente 5 minutos.

## ANEXO P Evaporación de n-hexano en horno



A



B



C



D

Fuente: Laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA

Las figuras A, B y C muestran el proceso de evaporación del n-hexano para la obtención de lípidos de microalga a 60 °C en horno. Simultáneamente, se secaron las muestras de biomasa residual después de la extracción Soxhlet, como se observa en la parte derecha de la figura C. Finalmente, los lípidos se trasladaron a tubos de ensayo para medir su peso y volumen.

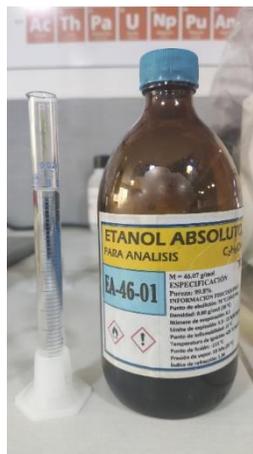
## ANEXO Q Proceso de transesterificación.



A



B



C



D



E



F



G

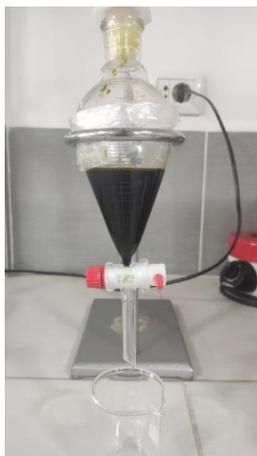
Fuente: Laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA.

Para el proceso de transesterificación, se utilizó hidróxido de sodio como catalizador (figura A y B), 9 ml de etanol al 99% de pureza y 25 ml de aceite crudo de microalgas (figura C y D). Finalmente, la conversión a biodiésel se realizó mediante agitación en un agitador magnético a 700 rpm y 55°C (figura E, F y G).

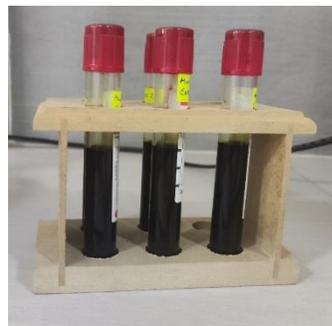
## ANEXO R Decantación y centrifugación de biodiesel



A



B



C



D



E



F

Fuente: Laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA.

Se realizó el armado de equipo de decantación (figura A), después de la transesterificación se añadió el contenido en el decantador (figura B), y después de la separación de fases, el biodiesel se puso en tubos de ensayo para su medición de peso y masa (figura C). Para lograr una separación completa de fases se utilizó un centrifugador y así se obtuvo el mayor rendimiento de biodiesel (figura D, E y F).

## ANEXO S Refinado y lavado de Biodiesel



A



B



C



D

Fuente: Laboratorio del Curso Básico de la Facultad de Ingeniería UMSA.

Para eliminar la clorofila del biodiésel, se utilizó carbón activado y n-hexano. Primero, se mezcló el biodiésel con n-hexano para facilitar su flujo a través del carbón activado (figura A). Luego, se recuperó el n-hexano y se obtuvo el biodiésel refinado (figura B). Finalmente, se lavó el biodiésel con agua (figura C) para eliminar el etanol residual (figura D).

## ANEXO T Cálculos para determinar la viabilidad del proyecto

- Cálculo de biomasa necesaria para obtener 8 toneladas de aceite crudo

$$\begin{aligned} & \frac{8000 \text{ kg de aceite crudo de Chlorella Vulgaris}}{\text{hora}} * \frac{24 \text{ horas}}{1 \text{ dia}} \\ & * \frac{100 \text{ kg de biomasa seca}}{51,36 \text{ kg de aceite crudo de Chlorella Vulgaris}} * \frac{1 \text{ TM}}{1000 \text{ kg}} \\ & = 373,8 \text{ TM biomasa seca} \cong 374 \text{ TM biomasa seca/dia} \end{aligned}$$

- Cálculo del volumen de fotobioreactor para obtener 8 toneladas de aceite crudo

$$\begin{aligned} V_{FBR} &= \frac{374000000 \text{ [g biomasa seca]}}{0,231 \left[ \frac{\text{g biomasa seca}}{\text{l cultivo} * \text{d cultivo}} \right] * 20[\text{d cultivo}]} = 80952380 \text{ l} \cong 81000000 \text{ l} \\ &\cong 81000 \text{ m}^3 \end{aligned}$$

- Cálculo de nutrientes necesarios para el cultivo a partir de datos de laboratorio

$$\frac{0,03 \text{ g fosfato diamonico}}{\text{l}} * 81000000 \text{ l} * \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} * \frac{1 \text{ TM}}{1000 \text{ kg}} = 2,43 \text{ TM fosfato diamonico}$$

$$\frac{0,031 \text{ g urea}}{\text{l}} * 81000000 \text{ l} * \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} * \frac{1 \text{ TM}}{1000 \text{ kg}} = 2,51 \text{ TM fosfato diamonico}$$

$$\frac{0,0430 \text{ g cloruro de sodio}}{\text{l}} * 81000000 \text{ l} * \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} * \frac{1 \text{ TM}}{1000 \text{ kg}} = 3,48 \text{ TM fosfato diamonico}$$

$$\begin{aligned} & \frac{0,0270 \text{ g bicarbonato de sodio}}{\text{l}} * 81000000 \text{ l} * \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} * \frac{1 \text{ TM}}{1000 \text{ kg}} \\ & = 2,19 \text{ TM fosfato diamonico} \end{aligned}$$

## ANEXO U Cálculo de la cantidad de dióxido de carbono que el cultivo puede absorber

- Concentración atmosférica

$$\frac{0,36 \text{ g } CO_2}{l * dia} * \frac{81000000 \text{ l cultivo}}{dia} = 29160000 \text{ g } CO_2/dia = 29,16 \text{ toneladas } CO_2/dia$$

- Concentración ideal para mejor crecimiento

$$\frac{11,44 \text{ g } CO_2}{l * dia} * \frac{81000000 \text{ l cultivo}}{dia} = 926640000 \text{ g } CO_2/dia = 926,64 \text{ toneladas } CO_2/dia$$

# ANEXO V INFORME DE EPSAS



|                            |                             |                                |              |                  |
|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------|------------------|
| <b>LABORATORIO CENTRAL</b> | <b>INFORME DE ENSAYOS</b>   |                                |              |                  |
|                            | Código<br>LAB ISO/FON 19.07 | Fecha de emisión<br>2023/05/17 | Versión<br>5 | Página<br>1 de 2 |

**Nro. de informe:** CI-VF-532 y CI-VF-533/2023

**Cliete:** Ing. Tomás Qulsbert

**Gerencia/Dpto./División:** Gerencia Técnica

**Dirección Solicitante:** Av. Las Américas N° 705, Villa Fátima

**Localidad del muestreo:** La Paz, Provincia Murillo, Municipio de La Paz

**Lugar del muestreo:** San Sebastián, Av. América N° 317, Alojamiento Mexico

**Tipo de muestra:** Agua Potable

**Procedimiento de Muestreo:** LAB ISO PRO 17

**Responsable de Muestreo:** Christian Yapu

**Fecha de Muestreo:** 2023/05/26

**Recipiente:** Plástico - Vidrio

**Volumen/Peso de la muestra:** 1L, 500 mL, 250 mL

**Condiciones de la muestra:** Cumple las condiciones establecidas en el procedimiento LAB ISO PRO 17

**Fecha de recepción laboratorio:** 2023/05/26

**Fecha inicio de Ensayo:** 2023/05/26

**Fecha emisión del Informe:** 2023/05/31

| N° | Puntos de muestreo             |                   | Antes del Medidor | Grifo de lavandaria | VALOR MÁXIMO ACEPTABLE NB 512 |                |
|----|--------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------------------|----------------|
|    | Hora de muestreo               |                   | 10:08             | 10:55               |                               |                |
|    | Código de muestra del cliente  |                   | AM                | GL                  |                               |                |
|    | Código interno del laboratorio |                   | CI-VF-532         | CI-VF-533           |                               |                |
|    | PARÁMETRO                      | MÉTODO            | UNIDADES          | RESULTADOS          |                               |                |
| 1  | pH a 25°C                      | LAB ISO MET 12.02 | Unidades de pH    | 8,86                | 8,87                          | 6,5 a 9,5      |
| 2  | Conductividad                  | LAB ISO MET 12.22 | µS/cm             | 528                 | 537                           | 1500           |
| 3  | Turbiedad                      | LAB ISO MET 12.37 | NTU               | 1,10                | 0,95                          | 5              |
| 4  | Cloro libre residual           | LAB ISO MET 12.27 | mg/L              | 0,51                | 0,51                          | 0,2 a 1,5      |
| 5  | Coliformes Termotolerantes     | LAB ISO MET 12.05 | UFC/100 mL        | <1                  | <1                            | <1             |
| 6  | Temperatura                    | SM - 2550 - B     | °C                | 10,4                | 9,8                           | No Determinado |
| 7  | Color                          | SM - 2120 - C     | UCV               | 0                   | 0                             | 15             |
| 8  | Sólidos totales disueltos      | LAB ISO MET 12.28 | mg/L              | 439                 | 442                           | 1000           |
| 9  | Alcalinidad total              | LAB ISO MET 12.33 | mg/L CaCO3        | 5,64                | 5,84                          | 370            |
| 10 | Calcio                         | LAB ISO MET 12.08 | mg/L              | 103,15              | 103,63                        | 200            |
| 11 | Cloruros                       | LAB ISO MET 12.11 | mg/L              | 11,35               | 10,76                         | 250            |
| 12 | Dureza total                   | LAB ISO MET 12.01 | mg/L CaCO3        | 296,94              | 298,15                        | 500            |
| 13 | Magnesio                       | LAB ISO MET 12.09 | mg/L              | 9,56                | 9,56                          | 150            |
| 14 | Nitratos                       | HACH 8039         | mg/L              | 7,3                 | 5,1                           | 45             |
| 15 | Nitritos                       | HACH 8507         | mg/L              | 0,021               | 0,013                         | 0,1            |

Laboratorio de Agua Potable: La Paz, Av. Las Américas N° 705, Villa Fátima - Teléfono: (+591) 22210295 - Fax: (+591) 2 221454  
 Laboratorio de Agua Residual: El Alto, Carretera a Viacha - calle D S/N, Zona Pacajes - Teléfono: (+591) 22834529/2836594

**Oficina Central La Paz:** Av. de las Américas N° 705, Villa Fátima - Casilla: 9359 - Teléfono: (+591) 2 2210295 - Fax: (+591) 2 221454  
**Regional El Alto:** Av. 16 de Julio N° 284 - Teléfono: (+591) 2 2842534 - Fax: (+591) 2 2843377 - e-mail: info@epsas.com  
 Línea gratuita de emergencia: 800 10 8644



| LABORATORIO CENTRAL | INFORME DE ENSAYOS |                  |         |        |
|---------------------|--------------------|------------------|---------|--------|
|                     | Código             | Fecha de emisión | Versión | Página |
|                     | LAB ISO FOR 18.07  | 2022/06/17       | 5       | 2 de 2 |

Nro. de informe: **CI-VF-532 y CI-VF-533/2023**

| N°                             | Puntos de muestreo  |                    | Antes del Medidor | Grifo de lavandaria | VALOR MÁXIMO<br>ACEPTABLE NB<br>512 |             |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------------------------|-------------|
|                                | Hora de muestreo    |                    | 10:08             | 10:55               |                                     |             |
| Código de muestra del cliente  |                     | AM                 |                   | CL                  |                                     |             |
| Código interno del laboratorio |                     | CI-VF-532          |                   | CI-VF-533           |                                     |             |
|                                | PARÁMETRO           | MÉTODO             | UNIDADES          | RESULTADOS          |                                     |             |
| 16                             | Sulfatos            | LAB ISO MET 12.12  | mg/L              | 101,2               | 104,4                               | 400         |
| 17                             | Hierro Total        | LAB ISO MET 12.03  | mg/L              | <0,061              | <0,061                              | 0,3         |
| 18                             | Manganeso           | LAB ISO MET 12.04  | mg/L              | <0,044              | <0,044                              | 0,1         |
| 19                             | Aluminio            | LAB ISO MET 12.29  | mg/L              | 0,038               | 0,041                               | 0,1         |
| 20                             | Amonio              | HACH - 8038        | mg/L              | 0,42                | 0,43                                | 0,5         |
| 21                             | Boro                | HACH - 8015        | mg/L              | <0,2                | <0,02                               | 0,3         |
| 22                             | Cadmio              | SAA - Llama - Cd   | mg/L              | <0,0001             | <0,0001                             | 0,003       |
| 23                             | Cobre               | LAB ISO MET 12.10  | mg/L              | <0,037              | <0,037                              | 1           |
| 24                             | Fluoruro            | HACH 8029 (SPADNS) | mg/L              | 0,69                | 0,77                                | 1,50        |
| 25                             | Índice de Langeller | Cálculo            | ---               | -0,12               | -0,11                               | -0,5 a +0,5 |
| 26                             | Piomo               | SAA - Llama - Pb   | mg/L              | <0,0040             | <0,0040                             | 0,01        |
| 27                             | Sodio               | SAA - Llama - Na   | mg/L              | 5,370               | 5,228                               | 200         |
| 28                             | Zinc                | LAB ISO MET 12.18  | mg/L              | <0,021              | <0,021                              | 5           |
| 29                             | Cianuro Libre       | HACH-8027          | mg/L              | 0,003               | 0,003                               | 0,07        |
| 30                             | Cromo Total         | SAA - Llama - Cr   | mg/L              | <0,0005             | <0,0005                             | 0,05        |
| 31                             | Mercurio            | LAB ISO MET 12.26  | mg/L              | <0,0002             | <0,0002                             | 0,001       |
| 32                             | Niquel              | SAA - Llama - Ni   | mg/L              | <0,0020             | <0,0020                             | 0,05        |

LAB ISO MET: Método Normalizado del Laboratorio Central

SAA - Llama - Espectrofotometría de Absorción Atómica - técnica Llama

SM : STANDARD METHODS - Métodos analíticos normalizados APHA, AWWA, y WPCF

HACH : WATER ANALYSIS HANDBOOK

NB 512: Norma Boliviana Requisitos para Agua Potable

El presente informe no puede ser reproducido, excepto en su totalidad y con la aprobación escrita del Laboratorio

Los resultados de los parámetros se refieren exclusivamente a la muestra analizada

Observaciones:

Los resultados de los parámetros analizados cumplen con el valor máximo aceptable de la NB 512 Agua Potable - Requisitos

La toma de muestra y medición de algunos parámetros fisicoquímicos en el sitio, fue realizada en presencia del técnico de laboratorio de la AAPS y notario de fe pública.

Analista (s):

SC/S.L./R.C.H./J.S./C.Y.



*[Signature]*  
DRA. GISELA DURAN LAYME  
JEFE DPTO. LABORATORIO CENTRAL S.A.  
EMPRESA PÚBLICA SOCIAL DE  
AGUA Y SANEAMIENTO - INTERV.

Laboratorio de Agua Potable: La Paz, Av. Las Américas N° 705, Villa Fátima - Teléfono: (+591) 22210295 - Fax: (+591) 2 2215454  
Laboratorio de Agua Residual: El Alto, Carretera a Viacha calle 8 S/N, Zona Pacajes - Teléfono: (+591) 22834529/2836594

Oficina Central La Paz: Av. de las Américas N° 705, Villa Fátima - Casilla: 9359 - Teléfono: (+591) 2 2210295 - Fax: (+591) 2 2212454

Regional El Alto: Av. 16 de Julio N° 284 - Teléfono: (+591) 2 2842584 - Fax: (+591) 2 2843377 - e-mail: info@epsas.com

Línea gratuita de emergencia: 800-10-8844





DIRECCIÓN DE DERECHO DE AUTOR  
Y DERECHOS CONEXOS  
RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA NRO. 1-2675/2024  
La Paz, 30 de agosto de 2024

**VISTOS:**

La solicitud de Inscripción de Derecho de Autor presentada en fecha **28 de agosto de 2024**, por **JOSE WILMER GONZALES HUANTO** con **C.I. N° 10030720 LP**, con número de trámite **DA-E 300179/2024**, señala la pretensión de inscripción del Proyecto de Grado titulado: **"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PRODUCTIVA DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS COMO ALTERNATIVA ECOLÓGICA A LOS COMBUSTIBLES FÓSILES"**, cuyos datos y antecedentes se encuentran adjuntos y expresados en el Formulario de Declaración Jurada.

**CONSIDERANDO:**

Que, en observación al Artículo 4º del Decreto Supremo N° 27938 modificado parcialmente por el Decreto Supremo N° 28152 el *"Servicio Nacional de Propiedad Intelectual SENAPI, administra en forma desconcentrada e integral el régimen de la Propiedad Intelectual en todos sus componentes, mediante una estricta observancia de los regímenes legales de la Propiedad Intelectual, de la vigilancia de su cumplimiento y de una efectiva protección de los derechos de exclusiva referidos a la propiedad industrial, al derecho de autor y derechos conexos; constituyéndose en la oficina nacional competente respecto de los tratados internacionales y acuerdos regionales suscritos y adheridos por el país, así como de las normas y regímenes comunes que en materia de Propiedad Intelectual se han adoptado en el marco del proceso andino de integración"*.

Que, el Artículo 16º del Decreto Supremo N° 27938 establece *"Como núcleo técnico y operativo del SENAPI funcionan las Direcciones Técnicas que son las encargadas de la evaluación y procesamiento de las solicitudes de derechos de propiedad intelectual, de conformidad a los distintos regímenes legales aplicables a cada área de gestión"*. En ese marco, la Dirección de Derecho de Autor y Derechos Conexos otorga registros con carácter declarativo sobre las obras del ingenio cualquiera que sea el género o forma de expresión, sin importar el mérito literario o artístico a través de la inscripción y la difusión, en cumplimiento a la Decisión 351 Régimen Común sobre Derecho de Autor y Derechos Conexos de la Comunidad Andina, Ley de Derecho de Autor N° 1322, Decreto Reglamentario N° 23907 y demás normativa vigente sobre la materia.

Que, la solicitud presentada cumple con: el Artículo 6º de la Ley N° 1322 de Derecho de Autor, el Artículo 26º inciso a) del Decreto Supremo N° 23907 Reglamento de la Ley de Derecho de Autor, y con el Artículo 4º de la Decisión 351 Régimen Común sobre Derecho de Autor y Derechos Conexos de la Comunidad Andina.

Que, de conformidad al Artículo 18º de la Ley N° 1322 de Derecho de Autor en concordancia con el Artículo 18º de la Decisión 351 Régimen Común sobre Derecho de Autor y Derechos Conexos de la Comunidad Andina, referentes a la duración de los Derechos Patrimoniales, los mismos establecen que: *"la duración de la protección concedida por la presente ley será para toda la vida del autor y por 50 años después de su muerte, a favor de sus herederos, legatarios y cesionarios"*

Que, se deja establecido en conformidad al Artículo 4º de la Ley N° 1322 de Derecho de Autor, y Artículo 7º de la Decisión 351 Régimen Común sobre Derecho de Autor y Derechos Conexos de la Comunidad Andina que: *"...No son objeto de protección las ideas contenidas en las obras literarias, artísticas, o el contenido ideológico o técnico de las obras científicas ni su aprovechamiento industrial o comercial"*

Que, el artículo 4, inciso e) de la ley N° 2341 de Procedimiento Administrativo, instituye que: *"... en la relación de los particulares con la Administración Pública, se presume el principio de buena"*



Oficina Central - La Paz  
Av. Montes, N° 515,  
entre Esq. Uruguay y  
C. Batallón Illimani.  
Telfs.: 2115700  
2119276 - 2119251

Oficina - Santa Cruz  
Av. Uruguay, Calle  
prolongación Quijarro,  
N° 29, Edif. Bicentenario.  
Telfs.: 3121752 - 72042936

Oficina - Cochabamba  
Calle Bolívar, N° 737,  
entre 16 de Julio y Artezana.  
Telfs.: 4141403 - 72042957

Oficina - El Alto  
Av. Juan Pablo II, N° 2560  
Edif. Multicentro El Cebo  
Ltda. Piso 2, Of. 5B,  
Zona 16 de Julio.  
Telfs.: 4110001 - 72043029

Oficina - Chuquisaca  
Calle Kilómetro 7, N° 366  
casi esq. Urriolagoitia,  
Zona Parque Bolívar.  
Telf.: 72005873

Oficina - Tarija  
Av. La Paz, entre  
Calles Ciro Trigo y Avaroa  
Edif. Santa Clara, N° 243.  
Telf.: 72015286

Oficina - Oruro  
Calle 6 de Octubre, N° 5837,  
entre Ayacucho  
y Junín, Galería Central,  
Of. 14.  
Telf.: 67201288

Oficina - Potosí  
Av. Villazón entre calles  
Wenceslao Alba y San Alberto,  
Edif. AM. Salinas N° 242,  
Primer Piso, Of. 17.  
Telf.: 72018160

[www.senapi.gob.bo](http://www.senapi.gob.bo)





MINISTERIO DE DESARROLLO PRODUCTIVO Y ECONOMÍA PLURAL

fe. La confianza, la cooperación y la lealtad en la actuación de los servidores públicos y de los ciudadanos ...", por lo que se presume la buena fe de los administrados respecto a las solicitudes de registro y la declaración jurada respecto a la originalidad de la obra.

**POR TANTO:**

El Director de Derecho de Autor y Derechos Conexos sin ingresar en mayores consideraciones de orden legal, en ejercicio de las atribuciones conferidas.

**RESUELVE:**

**INSCRIBIR** en el Registro de Tesis, Proyectos de Grado, Monografías y Otras Similares de la Dirección de Derecho de Autor y Derechos Conexos, el Proyecto de Grado titulado: "EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PRODUCTIVA DE BIODIÉSEL A PARTIR DE MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS COMO ALTERNATIVA ECOLÓGICA A LOS COMBUSTIBLES FÓSILES" a favor del autor y titular: **JOSE WILMER GONZALES HUANTO** con C.I. N° 10030720 LP, quedando amparado su derecho conforme a Ley, salvando el mejor derecho que terceras personas pudieren demostrar.

Regístrese, Comuníquese y Archívese.

CASA/Im

Firmado Digitalmente por:  
Servicio Nacional de Propiedad Intelectual - SENAPI  
**CARLOS ALBERTO SORUCO ARROYO**  
**DIRECTOR DE DERECHO DE AUTOR Y DERECHOS CONEXOS**  
LA PAZ - BOLIVIA

Firma:



2BCYt8Yw4Rt63G

PARA LA VALIDACIÓN DEL PRESENTE DOCUMENTO INGRESAR A LA PÁGINA WEB [www.senapi.gob.bo/verificacion](http://www.senapi.gob.bo/verificacion) Y COLOCAR CÓDIGO DE VERIFICACIÓN O ESCANEAR CÓDIGO QR.



Oficina Central - La Paz  
Av. Montes, N° 515,  
entre Esq. Uruguay y  
C. Batallón Illimani.  
Telfs.: 2115700  
2119276 - 2119251

Oficina - Santa Cruz  
Av. Uruguay, Calle  
prolongación Quijarro,  
N° 29, Edif. Bicentenario.  
Telfs.: 3121752 - 72042936

Oficina - Cochabamba  
Calle Bolívar, N° 737,  
entre 16 de Julio y Antezana.  
Telfs.: 4141403 - 72042957

Oficina - El Alto  
Av. Juan Pablo II, N° 2560  
Edif. Multicentro El Ceibo  
Ltda. Piso 2, Of. 5B,  
Zona 16 de Julio.  
Telfs.: 2141001 - 72043029

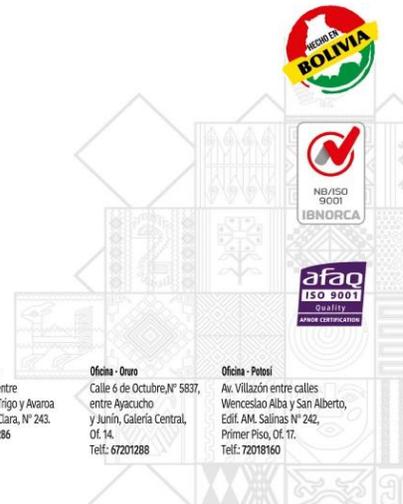
Oficina - Chuquisaca  
Calle Kilómetro 7, N° 366  
casi esq. Uruilagoitia,  
Zona Parque Bolívar.  
Telf.: 72005873

Oficina - Tarija  
Av. La Paz, entre  
Calle Ciro Trigo y Avaroa  
Edif. Santa Clara, N° 243.  
Telf.: 72015286

Oficina - Oruro  
Calle 6 de Octubre, N° 5837,  
entre Ayacucho  
y Junín, Galería Central,  
Of. 14.  
Telf.: 67201288

Oficina - Potosí  
Av. Villazón entre calles  
Wenceslao Alba y San Alberto,  
Edif. AM. Salinas N° 242,  
Primer Piso, Of. 17.  
Telf.: 72018160

[www.senapi.gob.bo](http://www.senapi.gob.bo)



**AUTOR:** JOSE WILMER GONZALES HUANTO

**CORREO:** gonzales.huanto.jose.wilmer@gmail.com

**CELULAR:** 60647219