

**SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE CICLO DE VIDA DE BIODIESEL PRODUCIDO A
PARTIR DE MICROALGAS**

LUIS CARLOS CASTAÑEDA RAMÍREZ

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUCARAMANGA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
INGENIERÍA EN ENERGÍA
BUCARAMANGA
2017**

**SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE CICLO DE VIDA DE BIODIESEL PRODUCIDO A
PARTIR DE MICROALGAS**

LUIS CARLOS CASTAÑEDA RAMÍREZ

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero en Energía:**

Directora:

**Dra. GRACIELA CHALELA ÁLVAREZ
Unab Ambiental-CINBBYA**

Codirector:

Dr. HERNDERSON IVAN QUINTERO PEREZ

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUCARAMANGA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
INGENIERÍA EN ENERGÍA
BUCARAMANGA**

2017

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma Director

Firma Calificador

AGRADECIMIENTOS

Deseo dar las gracias a mi familia, Luis Orlando mi padre, Olga Lucia mi madre, Miguel Ángel mi hermano, y Camila Alexandra mi hermana, ustedes son el motor de mi vida, siempre han estado para mí en los momentos más difíciles, sin ustedes nada de esto sería posible.

Muchas personas me han ayudado, pero en especial mi directora, Dr. Graciela Chalela Álvarez, una persona sabia y maravillosa, quien dedico su tiempo y paciencia para ayudarme a comprender la complejidad de la biología, y por aguantar algunas de las preguntas, tremendamente ingenuas, que le planteé.

También debo agradecer a las siguientes personas la ayuda que me prestaron de diferentes maneras.

Dr. Henderson Iván Quintero Pérez, quien siempre estuvo a mi lado en la realización del proyecto guiándome y aconsejándome.

Ing. María del Pilar Velazco Uribe, Ing. Norma Yadira Rojas Aguilar, Helga Mora Jaimes, y a todo el grupo de grandiosas mujeres que conforma Unab ambiental.

Marvin Torres Camacho, auxiliar de planta piloto, quien siempre estuvo dispuesto a ayudar sin importar lo ocupado que estuviese.

En cualquier caso, cualquier error que haya en este libro es enteramente de mi responsabilidad.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1 MICROALGAS COMO FUENTE DE COMBUSTIBLE	13
2.2 DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DEL BIODIESEL	15
2.3 ACV – GENERALIDADES (FASES DEL ACV).....	17
2.3.1 Metodología del ACV	17
3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	20
4. SÍNTESIS DE BIODIESEL A PARTIR DE LA MICROALGA <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	22
4.1 CEPA DE MICROALGA, CONDICIONES Y MEDIO DE CULTIVO.....	22
4.2 SELECCIÓN DE FLUJOS DE AIRE	24
4.3 COSECHA DE MICROALGAS	27
4.3.1 Centrifugación.....	28
4.3.2 Sedimentación por gravedad.....	29
4.3.3 Floculación	30
4.4 PRETRATAMIENTO DE BIOMASA PARA DISRUPCIÓN CELULAR	32
4.4.1 Microondas.....	34
4.4.2 Autoclave	34
4.5 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS.....	35
4.5.1 Extracción de lípidos de microalga en un solo proceso.....	37
4.6 Método de verificación de lípidos TG color GPO/PAP AA.....	43
4.7 TRANSESTERIFICACIÓN DE LÍPIDOS	46
5. ANÁLISIS DE CICLO DE VIDA DE BIODIESEL A PARTIR DE LA MICROALGA <i>Chlorella vulgaris</i>	49
5.1 DEFINICIÓN DEL OBJETIVO DEL ACV.....	49
5.2 DEFINICIÓN DE ALCANCE	49
5.2.1 Sistema del producto bajo estudio	49

5.2.2	Funciones del sistema bajo estudio	50
5.2.3	Unidad funcional.....	50
5.2.4	Límites del sistema	50
5.2.5	Reglas de asignación	51
5.2.6	Tipos de impacto y metodología de evaluación	52
6.	INVENTARIO DE CICLO DE VIDA (ICV)	53
7.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	54
7.1	Resultados de cultivo y selección de ruta de producción de biodiesel a partir de la microlaga <i>Chlorella vulgaris</i>	54
7.2	Selección de categorías de impacto	55
7.3	Asignación e interpretación de resultados del inventario a las categorías de impacto	55
8.	CONCLUSIONES	1
9.	RECOMENDACIONES	3
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	4

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de distintas fuentes de materia prima para la producción de biodiesel [15].	16
Tabla 2. Ventajas y desventajas del biodiesel [14]	16
Tabla 3. Diferentes tecnologías a escala de laboratorio para el cultivo de microalgas. Y su potencial de escalamiento a nivel industrial. Adaptado de [44].	23
Tabla 4. Diferentes tecnologías a escala de laboratorio para la cosecha de microalgas. Y su potencial de escalamiento a nivel industrial. [44]	28
Tabla 5. Eficacia de la recuperación de biomasa /peso seco.	31
Tabla 6. Diferentes tecnologías a escala de laboratorio para el pretratamiento del concentrado de microalgas. Y su potencial de escalamiento a nivel industrial. [44].	32
Tabla 7. Diferentes tecnologías a escala de laboratorio para la extracción de lípidos de microalgas. Y su potencial de escalamiento a nivel industrial. [44]	36
Tabla 8. Condiciones óptimas para extracción de lípidos	39
Tabla 9. Eficiencia de extracción de lípidos de microalga	41
Tabla 10. Consumo energético proceso de extracción de lípidos mediante exposición a campo magnético	42
Tabla 11. Medida de reactivos prueba de triglicéridos.	45
Tabla 12. Resultados prueba de triglicéridos con aceite de microalgas	45
Tabla 13. Inventario de ciclo de vida ICV.	53
Tabla 14. Categorías de impacto y unidad de referencia.	55
Tabla 15. Cuantificación de cargas ambientales categoría cambio climático.	57
Tabla 16. Cuantificación de cargas ambientales categoría acidificación terrestre.	1
Tabla 17. Cuantificación de cargas ambientales categoría eutrofización.	1
Tabla 18. Cuantificación de cargas ambientales categoría eco toxicidad del agua.	1
Tabla 19. Cuantificación de cargas ambientales categoría agotamiento de los recursos fósiles.	1
Tabla 20. Cuantificación de cargas ambientales categoría cambio climático salud humana	1
Tabla 21 Cuantificación de cargas ambientales categoría toxicidad humana	1
Tabla 22 Cuantificación de cargas ambientales categoría calentamiento global.	1

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes resultados energéticos para la conversión de biomasa de algas. La figura contiene un esquema que representa el marco completo de los combustibles que pueden provenir de algas obtenidas. [25].	14
Figura 2. Fases del análisis de ciclo de vida (ACV) [18].	18
Figura 3. Metodología de la investigación.	21
Figura 4. Observación del crecimiento en fotobiorreactores, cultivo macroscópico y observación microscópica de <i>Chlorella vulgaris</i> .	24
Figura 5. Observación del flujo de aire en fotobiorreactor.	25
Figura 6. Observación del crecimiento en fotobiorreactores día 1 (1), Observación del crecimiento en fotobiorreactores día 2 (2) Observación del crecimiento en fotobiorreactores semana 3 (3) Observación del crecimiento en fotobiorreactores semana 5 (4) Observación del crecimiento en fotobiorreactores semana 6 (5) Observación del crecimiento en fotobiorreactores semana 8 (6) de Chlorella vulgaris .	25
Figura 7. Curvas de absorción por espectrofotometría, crecimiento de microalga con cambios de flujo de aire	26
Figura 8. Curvas de pH en etapa de crecimiento del alga <i>Chlorella vulgaris</i> .	26
Figura 9. Método de centrifugación de cultivo de microalgas a escala laboratorio.	29
Figura 10. Recolección de biomasa mediante sedimentación por gravedad	29
Figura 11. Método de recolección de microalgas con adición de floculante PAC (Policloruro de aluminio).	30
Figura 12. Método de recolección de microalgas con adición de floculante (Metanol).	30
Figura 13. Método de recolección de microalgas variando el pH del cultivo.	31
Figura 14. Método de recolección de microalgas con adición de floculante (Cloruro ferrico).	31
Figura 15. Diferentes vías de pretratamiento de microalgas.	33
Figura 16. Cultivo de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> antes de someter a pretratamiento por diferentes medios	33
Figura 17. Microalgas antes de pretratamiento con microondas, y después de tratamiento	34
Figura 18. Microalgas antes de pretratamiento con autoclave y después de tratamiento.	35
Figura 19. Cultivo de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> sometido a procesos de pretratamiento, autoclave, microondas, cambio de pH.	35
Figura 20. Método de extracción de lípidos de microalgas OriginOil, Inc [23].	38
Figura 21. Prototipo para extracción de lípidos mediante campo magnético.	39
Figura 22. Proceso de extracción de lípidos mediante exposición a campo magnético.	40
Figura 23. Demanda Energética Nacional Sector Industrial Tendencial	42
Figura 24. Muestra de aceite de microalgas.	44
Figura 25. Reactivos sometidos a lecturas de espectrofotometría.	44
Figura 26. Mediciones espectrofotometría.	45
Figura 27. Transesterificación de biodiesel de micro algas.	47
Figura 28. Sistema bajo estudio producción de biodiesel	50

Figura 29. Red de cargas ambientales categoría cambio climático.....	57
Figura 30. Grafica de impactos ambientales categoría cambio climático	1
Figura 31. Red de cargas ambientales categoría acidificación terrestre.....	1
Figura 32. Grafica de impactos ambientales categoría acidificación terrestre	1
Figura 33. Red de cargas ambientales categoría eutrofización.	1
Figura 34 . Red de cargas ambientales categoría eco toxicidad del agua.	1
Figura 35. Grafica de impactos ambientales categoría Eco-toxicidad en agua	1
Figura 36. Red de cargas ambientales categoría Agotamiento de los recursos fósiles	1
Figura 37. Grafica de impactos ambientales categoría agotamiento de los recursos fósiles	1
Figura 38. Red de cargas ambientales categoría cambio climático salud humana.....	1
Figura 39. Grafica de impactos ambientales categoría cambio climático salud humana	1
Figura 40. Red de cargas ambientales categoría toxicidad humana.....	1
Figura 41. Grafica de impactos ambientales categoría toxicidad humana	1
Figura 42. Red de cargas ambientales categoría Calentamiento Global.....	1
Figura 43. Grafica de impactos ambientales categoría calentamiento global	1

1. INTRODUCCIÓN

El constante crecimiento en la demanda de lípidos y ácidos grasos para uso industrial, ha generado la necesidad de encontrar nuevas y mejores fuentes para la obtención de los mismos. Por esto se buscan mecanismos que trabajen de forma eficiente, eliminando los daños ambientales y, a su vez, permitan abastecer satisfactoriamente la demanda de estas materias primas. Se considera que los combustibles provenientes de biomasa de microalga tienen un alto potencial y pueden verse como una de las alternativas promisorias para el reemplazo del petróleo en el mediano plazo dado su desempeño en motores diésel y la disminución de liberación de CO₂ [2].

Las algas verdes (conocidas también en la industria como microalgas) objeto del estudio, son un grupo diverso de microorganismos eucariótica y eucarióticos fotosintéticos que crecen rápidamente debido a su estructura simple. Potencialmente pueden ser empleadas para la producción de biocombustibles (biodiesel, biogás, hidrocarburos y bio-hidrógeno) ambientalmente sostenibles y económicamente eficaces.

La obtención de ácidos grasos y lípidos, a partir de biomasa de microalga, es un tema que se viene estudiando desde hace mucho tiempo, por ser una alternativa para producir energías más limpias y amigables con el medio ambiente, y reduciendo costos a la hora de su producción. En comparación con otras materias primas, no son fuente de alimento humano, no presentan gran complejidad química en su estructura, lo que hace su modificación y manipulación más sencilla. El cultivo de las microalgas y sus condiciones, permiten que se produzcan a gran escala y en muy cortos periodos de tiempo. Además, por ser fotosintéticas, absorben en gran medida el dióxido de carbono presente en la atmosfera. Por lo anterior Este trabajo de grado centra sus esfuerzos en evaluar las mejores condiciones de cultivo, los mejores medios químicos y físicos para la producción de lípidos y ácidos grasos de

microalga, además se evalúan las cargas ambientales en todo el proceso de producción utilizando la metodología de análisis de ciclo de vida.

Se utiliza la metodología de análisis de ciclo de vida (ACV) establecida en la norma ISO 14040 ya que permite definir el impacto real de la cadena productiva del biodiesel a partir de microalga, la correcta determinación de los impactos ambientales potenciales a lo largo de todo el proceso se logra mediante la recopilación, cuantificación, evaluación e interpretación de las entradas y salidas de materia y energía del sistema estudiado. El ACV ha sido aplicado en muchos trabajos para evaluar los impactos ambientales potenciales de fuentes alternativas de energía *Peyman Fasahati et al* [22][27].

En este trabajo se realizará la síntesis de biodiesel a partir de aceite de microalga, partiendo del cultivo, recolección y extracción del aceite, continuando con la transesterificación con metanol para de esta manera obtener un biocombustible limpio y de alta pureza. Se realizarán las pruebas de control de calidad y pruebas complementarias que permitan caracterizar y evaluar el desempeño ambiental del producto.

Todas las etapas de la cadena productiva “de la cuna a la tumba” del biodiesel de micro algas serán evaluadas con el fin de determinar los procesos o etapas de producción de mayor impacto y serán identificadas las categorías de impactos ambientales que se ven más afectadas por el ciclo de vida de este producto. El software SIMAPRO® en su versión académica será usado para el tratamiento de datos de inventario de los procesos y sus resultados serán la base de interpretación y cuantificación de impactos ambientales de la cadena productiva del biodiesel de micro algas.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar biodiesel a partir de micro algas, realizar su caracterización y obtener el perfil de impactos ambientales a lo largo de su ciclo de vida.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener biodiesel de micro algas con alta pureza.
2. Cuantificar los flujos de materia y energía requeridos en la etapa de cultivo de la microalga, obtención del aceite y conversión a biodiesel.
3. Obtener y analizar el perfil de impactos ambientales asociados a la cadena productiva del biodiesel de microalgas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 MICROALGAS COMO FUENTE DE COMBUSTIBLE

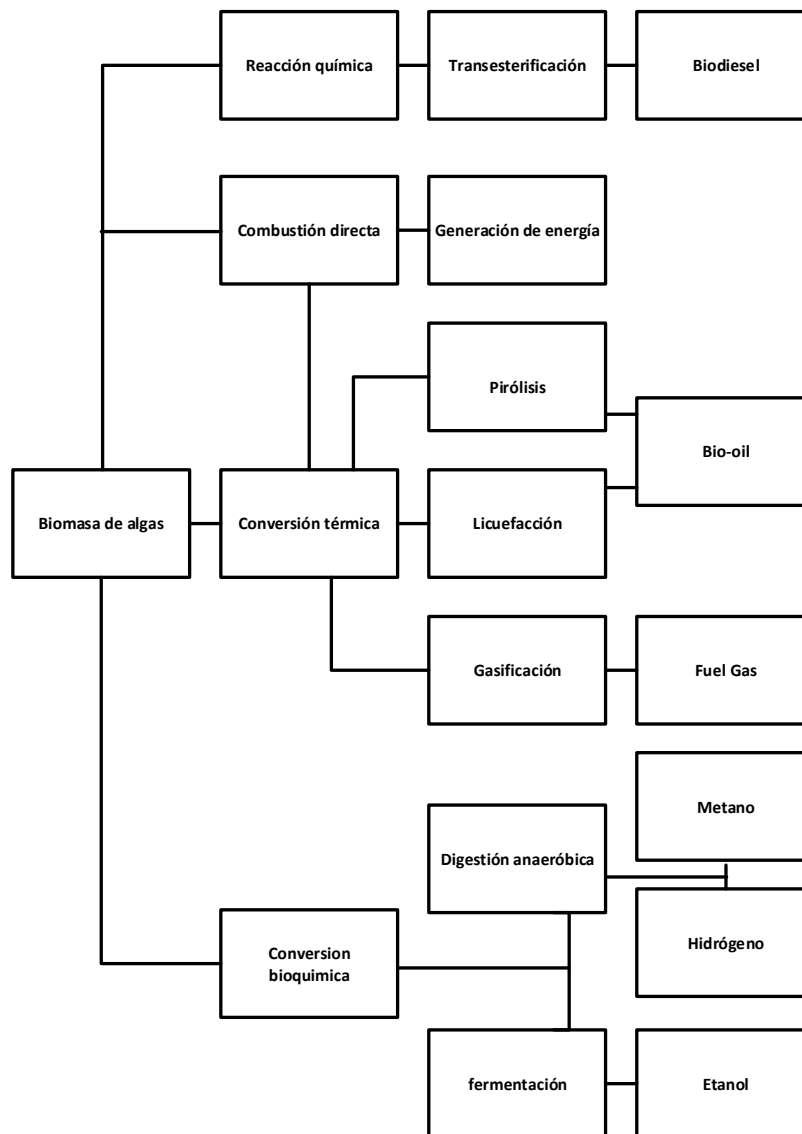
En la actualidad no se puede hablar de biocombustibles sin tener en cuenta el concepto de sostenibilidad de la bioenergía, en donde los pilares fundamentales son, la protección de la biodiversidad y el ahorro neto de los gases de efecto invernadero. Tomando como base este concepto, la Unión Europea ha establecido recientemente criterios estrictos de sostenibilidad para los biocombustibles y biolíquidos, *YAO, L HAMMOND et al* ^{[5][7]}, E . Estos criterios deben garantizar que dichos biocombustibles no se produzcan con materias primas obtenidas de tierras con alto grado de biodiversidad. Lo cual implica que el uso de plantas terrestre como fuente de biomasa para la producción de bioenergía podría ser prohibido. Como alternativa a la biomasa de plantas terrestres, las microalgas se muestran como un candidato promisorio para la producción de bioenergías, como el biodiesel, pues el cultivo de las mismas no solo cumplen con los criterios de sostenibilidad establecidos por la EU, sino que además tienen una alta capacidad para fijar CO₂, pueden utilizarse como materia prima para la producción de coproductos de valor añadido, como productos farmacéuticos y aditivos alimenticios, y cultivarse de forma más sostenible en relación con el uso del agua *HANSEN, C. M. et al* ^{[3][8][9]}.

En particular, las microalgas como materia prima para la producción de biodiesel tienen una ventaja superior sobre la biomasa vegetal terrestre debido a su mayor capacidad de producir lípidos ricos en carbonos neutros como el los (TGA), además, las microalgas tienen tasas de crecimiento rápido y ciclos de cosecha muy cortos, por lo que tienen una productividad de biomasa muy alta.

En la actualidad, el aprovechamiento de las microalgas como materia prima cruda para la producción económicamente viable de biocombustibles sigue siendo

impulsada por la ciencia y la tecnología, pero no por el mercado (en la figura número (2) se observan los diferentes tipos de energía que se pueden obtener de las microalgas). Sin embargo, en términos de sus beneficios ambientales, no puede descartarse que en un futuro próximo las microalgas se convertirán en una de las fuentes más prometedoras para producir combustibles verdes.

Figura 1. Diferentes resultados energéticos para la conversión de biomasa de algas. La figura contiene un esquema que representa el marco completo de los combustibles que pueden provenir de algas obtenidas. [25].



2.2 DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DEL BIODIESEL

En los últimos años, el uso de biocombustibles líquidos en el sector del transporte ha mostrado un rápido crecimiento mundial, impulsado principalmente por las políticas orientadas en el logro de la seguridad energética y la mitigación de gases de efecto invernadero.

El biodiesel es un combustible de origen vegetal que puede reemplazar al tradicional combustible de origen fósil, diésel o ACPM. Las razones para su uso en motores de combustión interna alternativos de encendido por compresión (diésel) son principalmente dos: primero que toda su naturaleza biodegradable y renovable convirtiéndolo en una alternativa de desarrollo sostenible; y segundo, la reducción de la emisión de contaminantes al medio ambiente en comparación con el diésel convencional *GUNSTONE, F.D., et al*^{[3][8][9]}.

La *American Standards for Testing and Materials (ASTM)* lo define como “Ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables tales como aceites vegetales y que se emplean en los motores de ignición de compresión (motores diésel) o en calderas de calefacción” [9].

Uno de sus principales beneficios es su bajo contenido de azufre, debido a la presencia de oxígeno en su composición química, su combustión es más completa, reduciendo la emisión de partículas, monóxido de carbono e hidrocarburos no quemados, entre otros contaminantes.

El biodiesel tiene las ventajas de ser una fuente de energía potencialmente renovable y biodegradable, durante su combustión produce menos emisiones nocivas de sulfuros, hidrocarburos aromáticos y partículas de hollín, posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste de los motores Sarmidi Amin, et al⁹, es un producto seguro para su transporte y manejo debido a su elevado punto de inflamación (150 °C) y baja volatilidad.

Tabla 1. Comparación de distintas fuentes de materia prima para la producción de biodiesel [15].

ORGANISMO	RENDIMIENTO DE ACEITE	PRODUCTIVIDAD DE BIODIESEL	SUPERFICIE EQUIVALENTE REQUERIDA
	(L/ha)	(L/ha/año)	(ha x 10 ⁶)
Palma	2400	5950	3.972
Jatropha	1300	1892	12.49
Colza	1100	1190	19.859
Girasol	690	952	24.823
Soja	400	446	52.986
Microalga (Chlorella vulgaris)	18750	12000	1.969

Tabla 2. Ventajas y desventajas del biodiesel [14]

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Producción doméstica a partir de recursos renovables.	Muy pocas mezclas han sido aprobadas por las marcas de automóviles
Puede ser usado en la mayoría de motores DIESEL, especialmente en los modernos	Menor poder calorífico (mayor consumo)
Menor emisión de contaminantes al aire	Más costoso
Menor emisión de gases de efecto invernadero [CO ₂]	Por el contenido de grasas no es bueno usarlo a bajas temperaturas
Biodegradable	Cuestionamiento sobre el impacto en la vida útil del motor
No tóxico	Pequeño incremento en las emisiones de NO _x
Más fácil de manejar (transporte, almacenar, producir)	

2.3 ACV – GENERALIDADES (FASES DEL ACV)

El análisis de ciclo de vida es una herramienta de gestión ambiental y tiene como finalidad analizar de manera objetiva, sistemática y científica, el impacto ambiental originado por un producto durante su ciclo de vida completo [4]. El ciclo de vida de un producto considera toda la historia del producto, desde su origen como materia prima hasta su final como residuo. Se tiene en cuenta todas las fases intermedias como transporte y preparación de materias primas, manufactura, transporte a mercados, distribución, uso, etc.

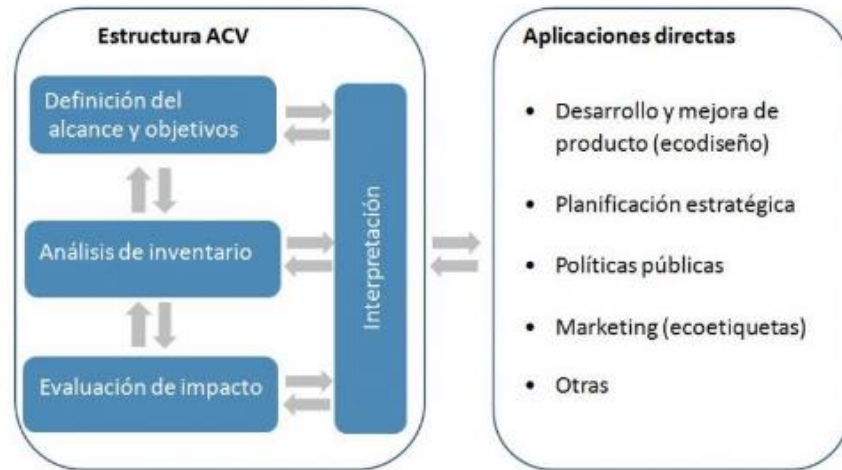
En un ACV completo se atribuyen a los productos todos los efectos ambientales derivados del consumo de materias primas y energías necesarias para su manufactura, las emisiones y residuos generados en el proceso de producción así como los efectos ambientales procedentes del fin de vida del producto cuando este se consume o no se puede utilizar más *Rojan P. John, G.S.A., et al*⁵

Las categorías generales de impactos medioambientales que precisan consideración incluyen el uso de recursos, la salud humana y las consecuencias ecológicas (ISO International Standard, 1997) [18].

2.3.1 Metodología del ACV

De acuerdo con la metodología propuesta por la normativa ISO 14040 un proyecto de ACV puede dividirse en cuatro fases: objetivos y alcance del estudio, análisis de inventario, análisis del impacto e interpretación [18].

Figura 2. Fases del análisis de ciclo de vida (ACV) [18].



Donde:

Definición del objetivo y alcance

En esta primera etapa se deben identificar las razones que llevan a aplicar el ACV y también establecer el contexto en el cual va a desarrollarse. Entre otros aspectos, en esta etapa se deben definir aspectos como el sistema de producto que se evalúa, la unidad funcional considerada (medida de la función de un producto), los requisitos de calidad de los datos, las hipótesis utilizadas, etc, *Liang, Y., N. Sarkany, et al*^{[20][24]}.

Se trata de una fase de gran importancia ya que de ella dependen las siguientes; así, por ejemplo, los resultados finales pueden quedar afectados sustancialmente por errores en los límites del sistema o incluso verse comprometidos por una selección incorrecta de la unidad funcional.

Inventario de ciclo de vida

Consiste en el análisis de todos los flujos de entrada y salida de los diferentes procesos que forman parte del sistema en estudio, tanto en la escala local como en la global. Además de conocerse los productos y subproductos generados, deben recogerse los datos referentes a entradas (consumo de materia y energía) y salidas (residuos emitidos al aire, agua y suelo) de los diferentes procesos o subsistemas

incluidos en el sistema analizado. Los datos considerados más habitualmente a la hora de realizar las tablas de inventario son: entradas de materiales, consumo de agua, consumo de energía, emisiones al aire, emisiones al agua, residuos sólidos, etc, *Woon Wallace, et al*⁸.

Evaluación de impacto de ciclo de vida

En esta etapa, se lleva a cabo la clasificación y caracterización de los resultados de inventario, pudiéndose realizar como pasos opcionales su normalización y ponderación. Todas las entradas y salidas del inventario de ciclo de vida deben clasificarse en diferentes categorías de impacto, de acuerdo con el tipo de impacto que pueden tener en el medio ambiente [16]. A continuación, la caracterización de los resultados consiste en que, para cada categoría de impacto, se evalúa la relevancia de las distintas entradas o salidas mediante el uso de factores de caracterización que representan la cantidad de ese compuesto que, de ser emitido, tendría un efecto en el medio ambiente cuantitativamente comparable a una unidad base de la categoría de impacto (por ejemplo, 1 kg de CH₄ tiene el mismo efecto de calentamiento global que 23 kg de CO₂), *Cardozo, K.H.M., et al*^{[18][19]}. Así, multiplicando cada una de las entradas y salidas del inventario por el factor de caracterización correspondiente, se calcula su contribución relativa a la categoría de impacto en relación a un determinado compuesto al que se le da el valor de referencia "1" (por ejemplo, el CO₂ en el caso de la categoría de impacto sobre calentamiento global) [18].

Una vez clasificados y caracterizados, los resultados pueden ser también normalizados y/o ponderados. La normalización pretende facilitar la interpretación de los resultados al usuario final, presentándole una indicación de la importancia relativa del impacto medioambiental causado por el sistema en estudio en relación a una determinada área geográfica [21]. Por último, los indicadores normalizados se pueden multiplicar por factores de ponderación y después sumar los resultados parciales para producir un único indicador de impacto ambiental global [24]. La ponderación es sin duda el paso más arbitrario de todo el proceso de evaluación de

impactos ya que la selección de los factores de ponderación es, en gran medida, una decisión política con limitada relevancia científica (o ninguna, según ISO 14044) [18].

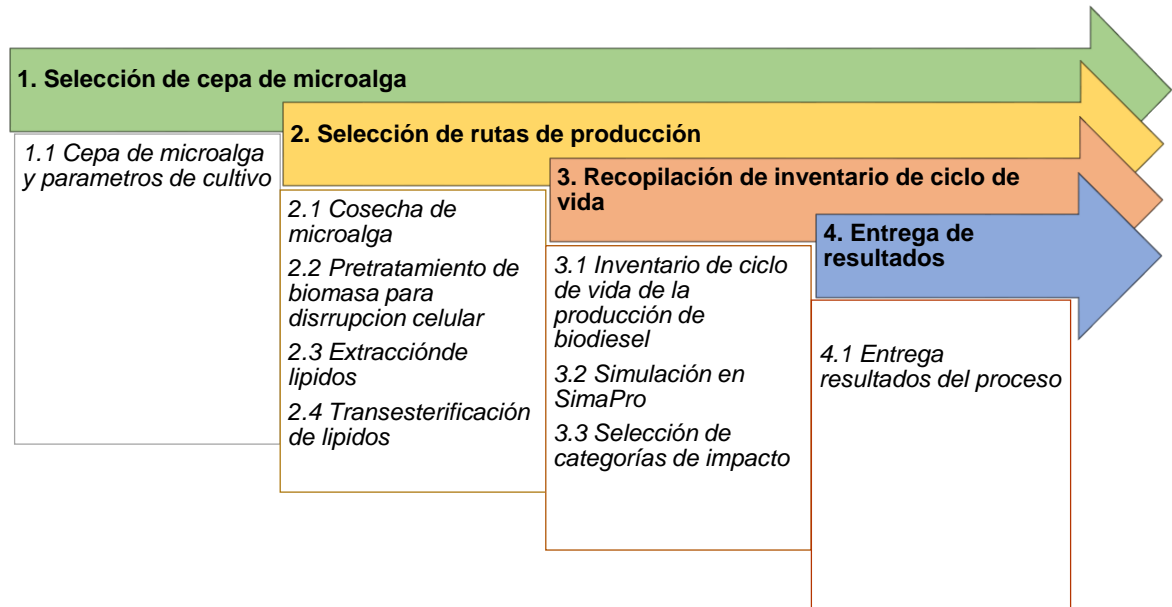
Interpretación

Este es la cuarta y última fase de la metodología de ACV que, según las normas ISO 14040 y 14044, debería incluir la identificación de los asuntos significativos, su evaluación y la presentación de conclusiones y recomendaciones. La interpretación debería también incluir un análisis de sensibilidad de los principales resultados obtenidos e incorporar recomendaciones de mejora, *Frater, D., Kaloustian, J., et al*^[23], Finalmente, la revisión crítica es otro elemento opcional del ACV mediante la cual revisores internos o externos que no han participado en el estudio examinan las suposiciones adoptadas, los datos que las complementan y su integridad metodológica [22].

3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

La metodología de investigación utilizada para lograr los objetivos planteados es presentada en la figura (3).

Figura 3. Metodología de la investigación.



Con lo anterior, la tesis se divide en cuatro procesos fundamentales: El proceso I tiene como finalidad encontrar la cepa de microalga adecuada para la producción de biodiesel. El proceso II está dedicado a la selección de parámetros de cultivo y rutas de producción de biodiesel a escala laboratorio, teniendo como eje central la eficiencia energética, la carga ambiental de cada proceso unitario, así como, su potencial de escalamiento a nivel industrial. El proceso III se centra en la recopilación de inventario de ciclo de vida de la producción de biodiesel, simulación en SimaPro y selección de categorías de impacto. Posteriormente en el proceso IV se entregan los resultados de los procesos anteriormente mencionados.

4. SÍNTESIS DE BIODIESEL A PARTIR DE LA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS*

La obtención de biomasa de microalga y su viabilidad desde el punto de vista industrial requiere de conocimiento sobre los factores que permitan disminuir los costos de producción y aumentar la cantidad de biomasa obtenida; dentro de los factores que requieren evaluación se encuentran, sustancias que puedan ser empleadas como fuentes de carbono y nitrógeno y que no representen costos excesivos en los procesos de producción, *Piloto-Rodríguez, et al*³¹.

El principal factor de influencia en la producción de biodiesel de microalga es la correcta selección de la cepa, la cual debe adaptarse a la zona donde va realizarse el cultivo, conociendo los nutrientes que van a ser destinados para su crecimiento. Después de que el cultivo de microalgas se recoge del biorreactor, se tienen diversas formas de tratar la biomasa concentrada para la posterior extracción de lípidos. Durante la extracción de lípidos de la matriz celular aparecen diversos residuos que deben ser separados mediante un disolvente, el cual debe retirarse junto con cualquier agua residual para la purificación del biodiesel.

4.1 CEPA DE MICROALGA, CONDICIONES Y MEDIO DE CULTIVO

El cultivo de microalgas se realiza en estanques en sistemas exteriores o en fotobiorreactores en sistemas interiores [44]. En los sistemas al aire libre, las microalgas se cultivan en un entorno abierto donde los parámetros de cultivo tales como temperatura e intensidad de luz dependen de las condiciones meteorológicas de la zona donde este se realice [26]. Las microalgas cultivadas en estanques con frecuencia tienen tasas de crecimiento inconsistentes y son susceptibles a invasión de especies locales *Woon Wallace, et al*²⁵. Por otra parte, las microalgas pueden ser cultivadas en fotobiorreactores donde las condiciones de cultivo son controladas,

sin embargo, su alto costo de operación hace de los fotobiorreactores una opción no viable a nivel industrial.

Tabla 3. Diferentes tecnologías a escala de laboratorio para el cultivo de microalgas. Y su potencial de escalamiento a nivel industrial. Adaptado de [44].

<i>Etapa del proceso</i>	<i>Tecnologías</i>	<i>Potencial de escalamiento</i>
Cultivo	Estanques de conducción	Altamente viable
	Fotobiorreactores	No viable

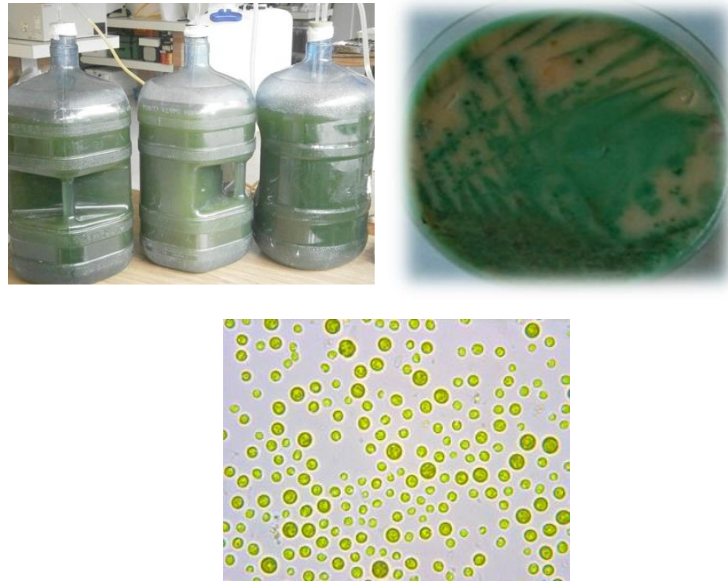
El desarrollo de un proceso a escala laboratorio que a su vez sea perfectamente escalable a nivel industrial es uno de los ejes de esta investigación, por tal motivo, se implementaron fotobioreactores de 17 litros, para obtener un crecimiento rápido y mantener el cultivo aislado de las especies nativas, aclarando, que no se controlaron condiciones de temperatura, luz o alguna otra que no pueda ser escalada a nivel industrial y de esta manera mantener el estudio lo más centrado posible.

Como cepa de trabajo se seleccionó la microalga *Chlorella vulgaris*, debido a su alta concentración en clorofila y su gran capacidad fotosintética. Tiene un contenido de lípidos de 5-58% (porcentaje de biomasa peso seco) dependiendo de las condiciones de cultivo. El crecimiento de la microalga se llevó a cabo en fotobioreactores, en donde se monitorean las condiciones de crecimiento. El flujo de aire suministrado se realizó por medio de bombas de acuario **JAD** con capacidad de 4 L/min, a su vez se utilizó como medio de cultivo el fertilizante agrícola **10-30-10**. Se prepararon medios de cultivo con una concentración de 17 milimolar de fertilizante con agua. Para ello se utilizaron recipientes plásticos con capacidad de 1L.

La microalga fue seleccionada de cultivos obtenidos en experimentos anteriores a los cuales se le realizaron estudios previos para descartar cualquier tipo de contaminación. Se inocularon 1.7 L de microalga en fotobioreactores plásticos con capacidad de 17 L cada uno, manteniendo una relación de 1:10 volumen/volumen. La relación inicial microalga-agua- medio de cultivo, se estableció teniendo en

cuenta que durante la etapa de crecimiento es importante que los microorganismos tengan buena disponibilidad de nutrientes minerales.

Figura 4. Observación del crecimiento en fotobiorreactores, cultivo macroscópico y observación microscópica de *Chlorella vulgaris*.



4.2 SELECCIÓN DE FLUJOS DE AIRE

El flujo de aire suministrado se estableció como parámetro experimental, teniendo en cuenta criterios teóricos y soportados con un proceso previo de pre-experimentación. Se implementaron 5 fotobiorreactores numerados de izquierda a derecha (**ver figura 5**), en los fotobiorreactores número 1 y 2 se suministró un flujo netamente laminar alrededor de 1 L/min, para el fotobiorreactor número 3 se suministró un flujo de 2.5 L/min, y por último en los fotobiorreactores 4 y 5 se suministró un flujo de aire de 4 L/min en flujo totalmente turbulento.

El cultivo de microalgas se realizó en ausencia de CO_2 para cuantificar de manera precisa las cargas ambientales en el análisis de ciclo de vida (ACV).

Figura 5. Observación del flujo de aire en fotobiorreactor.



Una vez seleccionados los diferentes flujos de aire suministrado, se monitoreo la etapa de crecimiento de la microalga por medios cualitativos y cuantitativos como espectrofotometría y cambios de pH.

Figura 6. Observación del crecimiento en fotobiorreactores día 1 (1), Observación del crecimiento en fotobiorreactores día 2 (2) Observación del crecimiento en fotobiorreactores semana 3 (3) Observación del crecimiento en fotobiorreactores semana 5 (4) Observación del crecimiento en fotobiorreactores semana 6 (5) Observación del crecimiento en fotobiorreactores semana 8 (6) de **Chlorella vulgaris**

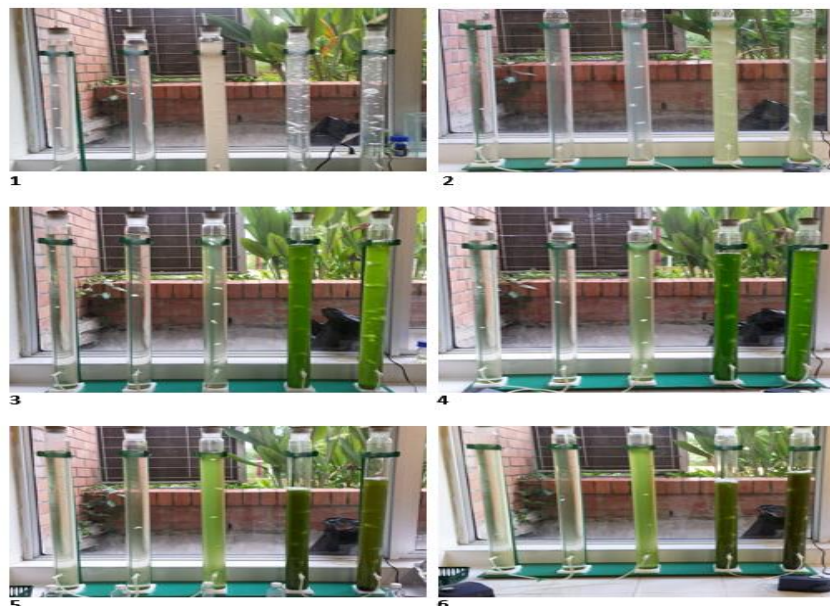


Figura 7. Curvas de absorción por espectrofotometria, crecimiento de microalga con cambios de flujo de aire

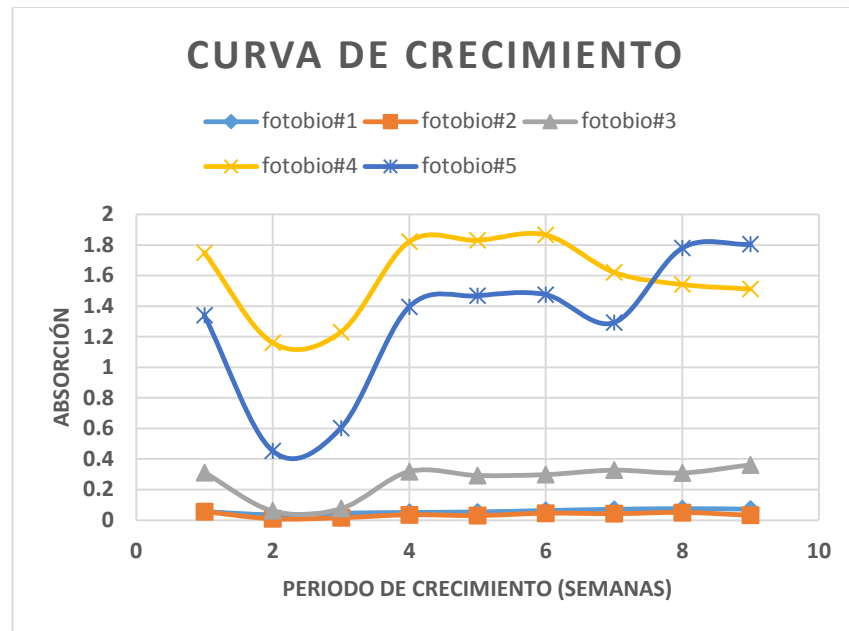
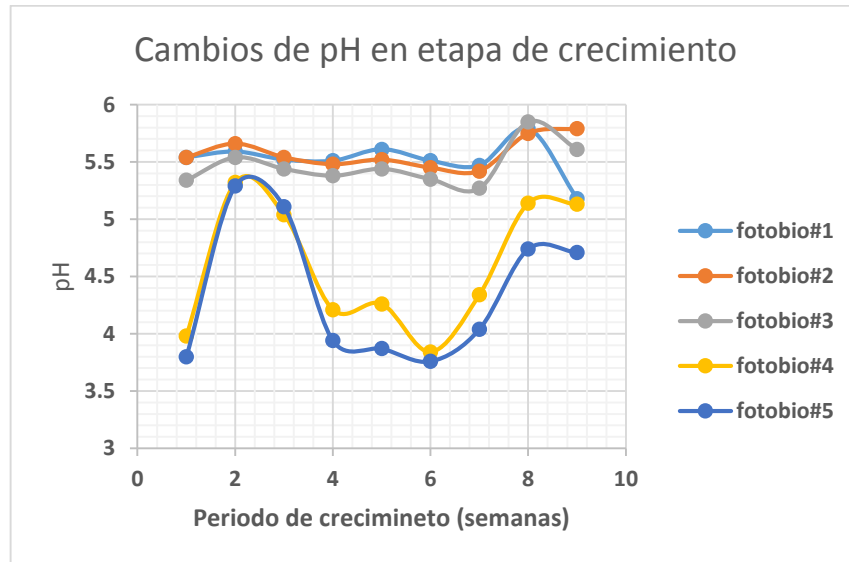


Figura 8. Curvas de pH en etapa de crecimiento del alga *Chlorella vulgaris*.



La verificación del crecimiento del cultivo y la producción de biomasa en los diferentes fotobioreactores se realizó cualitativamente por cambios físicos como el color y el volumen del cultivo; así mismo se realizó seguimiento cuantitativo a través

de las mediciones de pH y pruebas de absorción por espectrofotometría donde se comprobó el aumento diario de las células en los diferentes fotobioreactores.

Se observan las curvas de crecimiento de los 5 fotobioreactores (ver grafica 1), quedando en evidencia que los flujos de 4 L/min favorecen al rápido crecimiento en un periodo de tres semanas, el fotobioreactor número 3 al cual se le proporciono un flujo de 2.5 L/min muestra un suave crecimiento a partir de la tercera semana sin cambios significativos en el volumen de cultivo, los fotobioreactores 1 y 2 con flujo de aire suministrado de 1 L/min no muestran cambios en el crecimiento microbiano en el periodo de tiempo estudiado.

Las condiciones de cultivo seleccionadas en los fotobioreactores 4 y 5: flujo de aire (4 L/min) temperatura ($23^{\circ}\text{C} + 10^{\circ}\text{C}$), pH (3-5), para el crecimiento y posterior escalamiento de la microalga, demostraron ser las adecuadas para la acumulación acelerada de biomasa y ácidos grasos, sin embargo, Para un mejor aprovechamiento de las condiciones de cultivo se aconseja mantener el flujo de aire de 4L/min hasta la 4 semana, y de esta forma evitar la reducción de volumen de agua por exceso de aireación, la cual limita el medio de cultivo y a su vez el crecimiento de la microalga, desde la cuarta semana debe implementarse un flujo de aire de 2.5 L/min para aumentar y favorecer el crecimiento si tener cambios bruscos de pH.

4.3 COSECHA DE MICROALGAS

La producción de biocombustibles a partir de microalgas requiere procesos energéticamente eficientes para extraer y convertir triglicéridos en combustible, la extracción con disolvente húmedo implica ruptura mecánica de células, extracción de lípidos por contacto con disolventes, separación por fases físicas, recuperación de disolventes con medios térmicos y transesterificación [28] [32].

El cultivo de las microalgas cosechado existe como una suspensión acuosa diluida que varía de 0.1 a 2 gramos de biomasa de microalgas secas / L de cultivo, dependiendo del método de cultivo, y necesita concentrarse para reducir el costo de procesamiento de las siguientes etapas del proceso, ya que la cosecha sola representa entre el 20% - 30% del costo de la producción total [29].

Existen métodos de separación sólido-líquido, tales como centrifugación, filtración, y floculación, que se utilizan para concentrar entre 10 a 450g de biomasa de microalgas/ L seca de cultivo, *Howard Passell, et al*³³. El desarrollo de una tecnología de cosecha rentable y eficiente energéticamente es actualmente un campo activo de investigación, no obstante, solo algunas tecnologías son viables en el momento de escalar el proceso. Por otro lado, el método adecuado de recolección de microalgas para la producción de biocombustibles depende en gran medida de la cepa con la cual se esté trabajando, así como de las especificaciones del producto deseado.

Tabla 4. Diferentes tecnologías a escala de laboratorio para la cosecha de microalgas. Y su potencial de escalamiento a nivel industrial. [44]

Proceso	Tecnologías	Potencial de escalamiento
Deshidratación	Aglomeración	Altamente viable
	Centrifugación	Viable
	Filtración	Viable
	Floculación	Altamente viable
	Deshidratación por presión	No viable

4.3.1 Centrifugación

Este método de recolección consiste en utilizar una máquina que aprovecha la aceleración centrípeta para separar el cultivo de las algas debido a la diferencia de densidades, la centrifugación puede ser eficaz en la recolección de algas con recuperación superior al 90% y la recuperación depende directamente del flujo de

rendimiento, *H.H. Khoo, C.Y. et al*, sin embargo los altos consumos de energía lo vuelven económicamente inviable.

Figura 9. Método de centrifugación de cultivo de microalgas a escala laboratorio.



4.3.2 Sedimentación por gravedad

En este método, las partículas en suspensión se depositan en la parte baja del recipiente formando una suspensión concentrada y el caldo de cultivo queda en la parte superior, es altamente eficiente si hablamos en términos energéticos, sin embargo, requiere de altos tiempos de retención del cultivo si la cepa con la que se está trabajando tiene densidades bajas, *Namita Pragya, et al*⁴⁸.

Figura 10. Recolección de biomasa mediante sedimentación por gravedad



4.3.3 Floculación

La floculación es un método en el que las partículas de soluto en una solución se unen para formar aglomeraciones, acelerando de esta forma la sedimentación [45]. Las microalgas llevan una carga negativa, como resultado de la adsorción de iones procedentes de la materia orgánica y la disociación o ionización de los grupos funcionales superficiales. Esta carga negativa común no las deja aglomerar en suspensión. Las microalgas pueden cosecharse con éxito sólo interrumpiendo este sistema estable, *Glacio S. Araujo, et al*⁴⁵. Productos químicos llamados Floculantes ayudan a contrarrestar esta carga negativa en la superficie del cultivo. Los floculantes desplazan la carga negativa y permiten la aglomeración de células de microalgas. La floculación cuando se combina con sedimentación o filtración aumenta la eficiencia de la cosecha al bajar los tiempos de retención del cultivo.

Figura 11. Método de recolección de microalgas con adición de floculante PAC (Policloruro de aluminio).



Figura 12. Método de recolección de microalgas con adición de floculante



Figura 13. Método de recolección de microalgas variando el pH

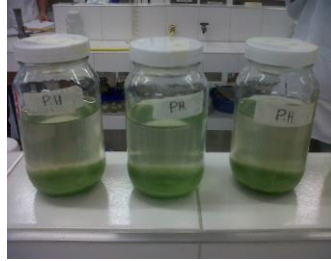


Figura 14. Método de recolección de microalgas con adición de floculante



Tabla 5. Eficacia de la recuperación de biomasa /peso seco

PROCESO	gr
Metanol	1.59
Alumbre	1
Filtración por gravedad	0.327
PAC	1.33
pH (HCl)	1.14
Cloruro Férrico	0.42

Una de las dificultades a la hora de producir biodiesel a partir de microalgas es la recolección, esta no solo debe ser eficiente, sino que a su vez, debe estar en concordancia con los estándares ambientales establecidos, si bien cada uno de los métodos anteriormente mencionados tiene sus ventajas y desventajas, se puede mejorar la eficiencia y reducir el impacto ambiental mezclándolos, por ejemplo, mezclando la sedimentación por gravedad con la floculación con policloruro de aluminio, todo esto teniendo en cuenta cuales métodos se muestran más favorables con la cepa con la cual se esté trabajando.

La floculación con policloruro de aluminio demostró ser el método más eficiente para concentrar masa microbiana, sin embargo, debido a que la técnica de extracción de lípidos que se va a aplicar en esta investigación es el sometimiento de la masa microbiana a campo magnético, este método no es conveniente debido a que el policloruro de aluminio impide reducir el pH de la masa microbiana, lo cual genera inconvenientes en la etapa de extracción de lípidos, por lo tanto, el método de recolección más adecuado es la floculación mediante cambios de pH, ya que, no solo concentra la masa microbiana, sino que a su vez, reduce procesos aguas abajo.

4.4 PRETRATAMIENTO DE BIOMASA PARA DISRUPCIÓN CELULAR

Después de la cosecha de microalgas, la biomasa se somete a un proceso de pretratamiento, el cual está directamente ligado a la eficiencia de extracción de lípidos, el proceso de pretratamiento puede tomar caminos diferentes dependiendo de las alteraciones deseadas en la biomasa. El pretratamiento se puede realizar en un solo paso o en múltiples pasos. En ocasiones, no se realiza ningún tratamiento previo y la biomasa se procesa directamente para la extracción de lípidos [35].

Tabla 6. Diferentes tecnologías a escala de laboratorio para el pretratamiento del concentrado de microalgas. Y su potencial de escalamiento a nivel industrial. [44].

Proceso	Tecnologías	Potencial de escalamiento
Pretratamiento : ruptura celular	Ultrasonicación	Viable
	Homogeneización a alta presión	Altamente viable
	Microonda	Viable
	Lisis química (ácidos & Enzimas)	Viable
	Shock osmótico	Viable

Los métodos de ruptura celular pueden clasificarse en dos grandes grupos: procesos mecánicos y procesos no mecánicos dentro de los mecánicos están

autoclave, microondas, ultrasonido, entre otros; no mecánicos incluyen la disrupción de la pared celular por enzimas, por acción de ácidos o bases y por choque osmótico

Figura 15. Diferentes vías de pretratamiento de microalgas.

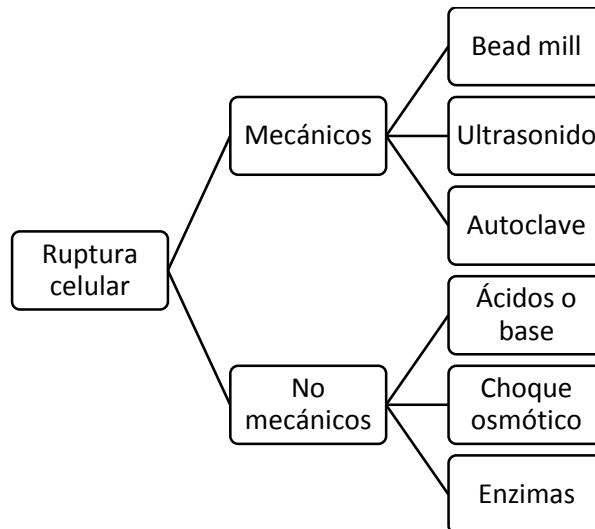


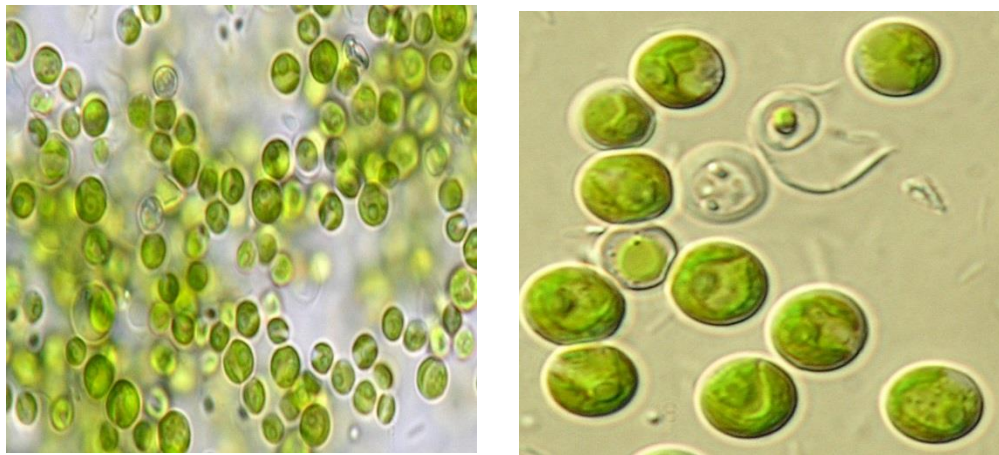
Figura 16. Cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* antes de someter a pretratamiento por diferentes medios



4.4.1 Microondas

Las microondas son radiaciones que pertenecen al espectro electromagnético en la gama de 300 MHz a 300 GHz. Para uso doméstico e industrial dos frecuencias son las más utilizadas: 0.915 GHz y 2.45 GHz en el calentamiento vía microondas, [37] [48]. Cuando la biomasa es alcanzada por las microondas, el agua presente en la célula calentada genera vapor quebrando la pared celular desde adentro.

Figura 17. Microalgas antes de pretratamiento con microondas, y después de tratamiento

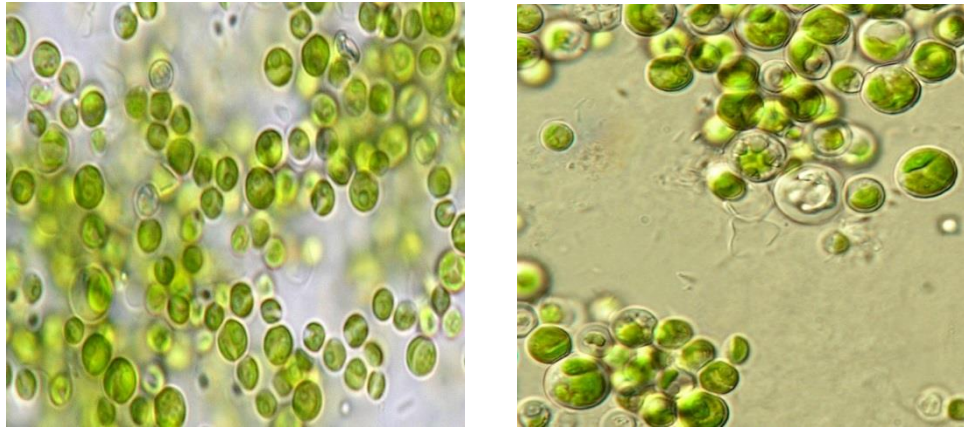


Fuente: autor

4.4.2 Autoclave

Los métodos de ruptura de biomasa de microalga vía autoclave utilizan una cámara donde se calienta agua a una temperatura de 121 °C y se presuriza a 101.35 kPa, *María Luisa N.M, et al*^{[44][45]}, este método es similar al anteriormente mencionado (microondas), sin embargo, la ruptura celular se da de afuera hacia adentro. Reportes de varias investigaciones afirman que la efectividad del método varía a causa de la pared celular pues es más fácil romperla de dentro hacia afuera, *Jingcheng Wu, Md, et al*^[45], como ocurre en el tratamiento con microondas

Figura 18. Microalgas antes de pretratamiento con autoclave y después de tratamiento.



Fuente: autor

Figura 19. Cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* sometido a procesos de pretratamiento, autoclave, microondas, cambio de pH.



Fuente: autor

4.5 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

Durante los últimos años, se han realizado diversos estudios sobre los métodos de extracción de lípidos en cultivos de microalgas, tales como el método Soxhlet, la extracción líquido-líquido y la extracción de fluidos supercríticos; Necesarios para mejorar la eficiencia del proceso, *Sergio D. Ríos, et al⁵⁰*, debido a que las

composiciones de ácidos grasos varían entre especies de microalgas de agua dulce, así como entre especies de microalgas marinas, además, es posible manipular el tipo de lípidos producidos variando las condiciones de cultivo; cada cepa debe ser investigada para encontrar el mejor ajuste de características climáticas y de ubicación [38].

Hay que tener en cuenta el costo y la viabilidad de ajustar las condiciones de cultivo. El ajuste de la temperatura de cultivo se utiliza generalmente a escala laboratorio para inducir cambios en las características lipídicas [48]. El cultivo a gran escala en forma de estanques generalmente no incorpora control de temperatura, esto niega el ajuste de la temperatura como una opción viable. Además, la incorporación de tales sistemas en estanques aumenta el requerimiento energético para el cultivo, afectando así el balance energético global y la viabilidad económica, *H.H. Khoo, C.Y, et al*⁴⁴.

Los ácidos grasos pueden dividirse en grasas saturadas, mono-saturadas y poliinsaturadas que pueden utilizarse para diferentes aplicaciones. Cada alga tiene diferentes perfiles de ácidos grasos. Por lo tanto, la determinación de las microalgas más adecuadas para la producción de biodiesel puede verse afectada por su composición ya que las moléculas en biodiesel son principalmente ésteres metílicos de ácidos grasos.

Tabla 7. Diferentes tecnologías a escala de laboratorio para la extracción de lípidos de microalgas. Y su potencial de escalamiento a nivel industrial. [44]

Proceso	Tecnologías	Potencial de escalamiento
	Extracción con disolvente orgánico	Viable
	Extracción de fluidos supercríticos	Viable

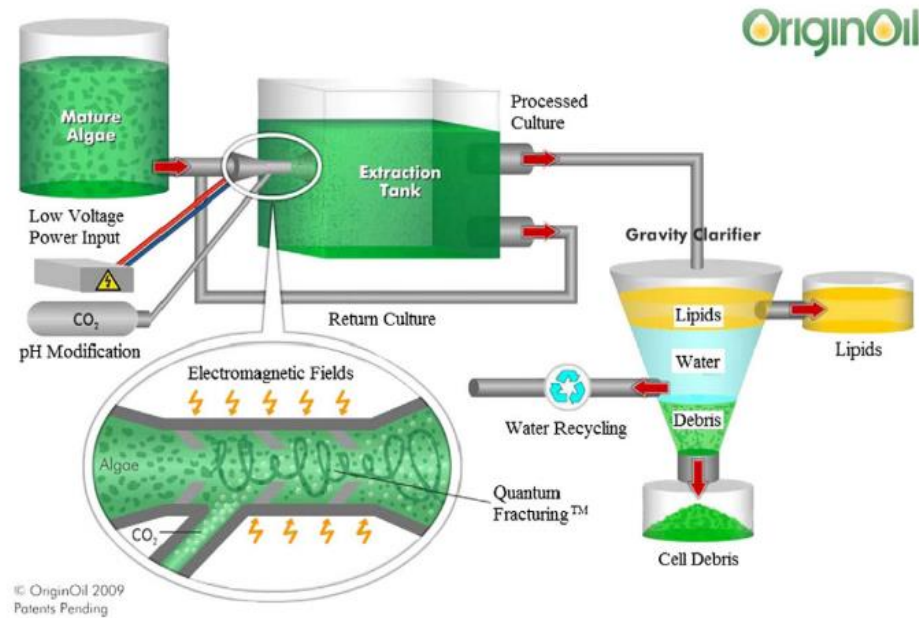
Extracción de lípidos	Extracción con disolvente orgánico con aparato Soxhlet	No viable
	Extracción asistida con Ultrasonido y solvente orgánico	Viable
	Extracción asistida por microondas y solvente orgánico	Viable
	Extracción acelerada con disolvente orgánico	Viable
	Extracción mediante disolvente orgánico subcrítico	Viable

Investigaciones recientes sobre producción de biodiesel a partir de microalgas han centrado sus esfuerzos en el desarrollo de un método de producción que disminuya el consumo energético y a su vez reduzca las cargas ambientales del mismo, como resultado se creó un proceso de extracción y transesterificación, conocido como, transesterificación directa o transesterificación in situ, pues combina la extracción de lípidos y la transesterificación en una sola etapa.

4.5.1 Extracción de lípidos de microalga en un solo proceso

OriginOil, Inc ha establecido un nuevo método para la extracción de lípidos de microalgas. Este proceso de extracción de lípidos de microalgas es mucho más simple que los sistemas actuales, no requiere de productos químicos o de grandes gastos en maquinaria pesada [47]. La extracción se lleva a cabo en un solo paso en donde se aplican campos magnéticos en algas con pH bajos y de esta forma se liberan los lípidos contenidos, la cantidad de energía utilizada para romper las algas puede llegar a ser significativamente menor que en otras tecnologías de extracción.

Figura 20. Método de extracción de lípidos de microalgas OriginOil, Inc [23].



Aprovechando los beneficios de este método, la reducción de procesos unitarios y cargas ambientales, en este proyecto se aplicó el principio físico, aclarando que al ser una tecnología pendiente de patente los datos de funcionamiento son limitados, por tal motivo se realizó un prototipo experimental a pequeña escala del proceso de extracción de lípidos mediante campo magnético, una vez verificado el rendimiento de extracción, y encontrado parámetros de funcionamiento, se realizó un diseño a mayor escala, en donde se hicieron dos bobinas de cobre, en un tubo de acetato para tratar 3 litros de cultivo de microalgas (ver figura 21).

Este prototipo es un método de extracción de lípidos tipo Bach, pero dado los resultados de eficiencia obtenidos puede realizarse un proceso de extracción dinámico, que mejore los tiempos de extracción; para esto es necesario aumentar el embobinado en el tubo y es recomendable incorporar una válvula de estrangulamiento a la entrada del prototipo, de esta manera ayudar al debilitamiento

de las paredes de las microalgas por presión, reduciendo la necesidad de disminuir el pH, y la energía requerida para generar campo magnético.

Figura 21. Prototipo para extracción de lípidos mediante



Fuente. Autor

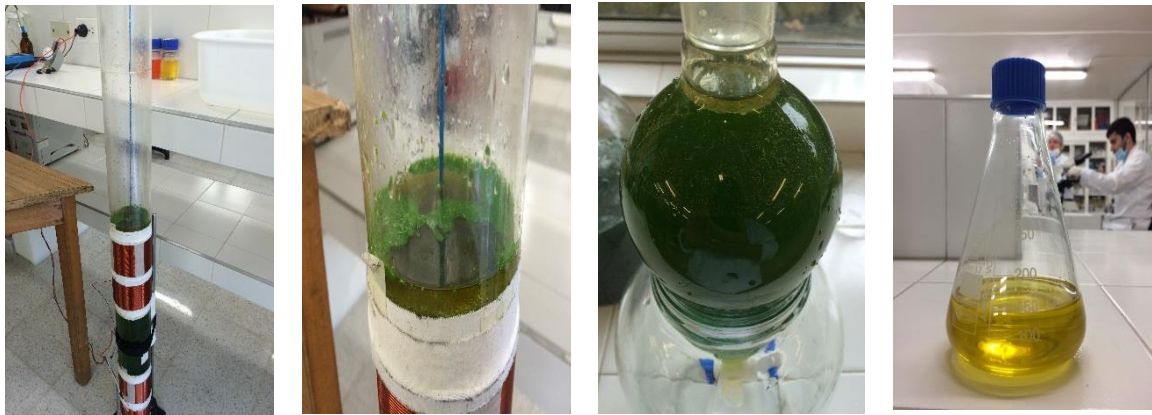
El propósito del diseño experimental es optimizar las condiciones para la máxima extracción de lípidos de la biomasa de algas húmedas. La aplicación de campos electromagnéticos para la extracción de lípidos depende de variables independientes como temperatura de extracción (C), carga de biomasa (% en peso de biomasa / peso de agua), tiempo de extracción (min), intensidad de campo, pH del caldo de cultivo. Después de conocer las condiciones adecuadas se escaló el prototipo para procesar un mayor volumen de biomasa.

Tabla 8. Condiciones óptimas para extracción de lípidos

PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES
Temperatura	5 a 10	°C
Campo electromagnético	54	Weber
pH	4.5 a 5.2	
Carga de biomasa	3	lts

Uno de los grandes retos a la hora de extraer lípidos de microalga por exposición a campos electromagnéticos es la disminución de pH, este debe estar en un rango de 4.5 y 5.2, al estar por encima de estos rangos la eficiencia de extracción es muy baja debido a que la pared celular no está debilitada, lo que implica un mayor consumo energético. Ya que en esta investigación se utilizó ácido clorhídrico (HCl) para la disminución de pH en vez de CO₂ como lo describe el método OriginOil Single-Step Extraction™, la carga ambiental es mucho más alta.

Figura 22. Proceso de extracción de lípidos mediante exposición a campo



Fuente. Autor

En la figura 22 se observa de izquierda a derecha el funcionamiento del prototipo construido, en la primera imagen se encuentra el cultivo de microalgas el cual previamente fue sometido a cambios de pH y ahora es expuesto a campo magnético, en la segunda imagen se puede ver el aceite en suspensión luego de terminar el proceso de extracción mediante campo magnético, una vez extraídos los lípidos se llevan a un embudo de decantación para separar los lípidos del caldo de cultivo residual como se ve en la tercera imagen, por último se observa el aceite de microalga.

Tabla 9. Eficiencia de extracción de lípidos de microalga

Método de extracción	Eficiencia de extracción de lípidos (1kg de biomasa)
Extracción por solvente químico	180 - 200 ml de aceite de microalga
Extracción con exposición a campo magnético	150 ml aceite de microalga

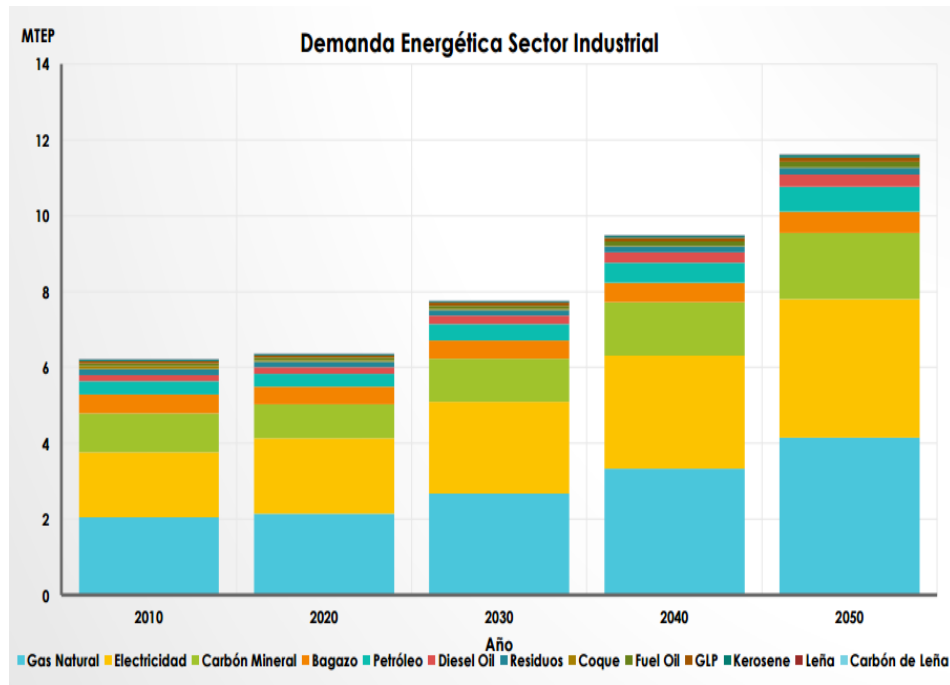
Fuente. Autor

Los lípidos extraídos por este método están libres de cualquier disolvente por lo que no necesitan someterse a ningún proceso de recuperación de disolvente.

Precio de la energía

De las variables analizadas, el costo de la energía no sólo es una de las más influyentes, sino también una de las más cambiantes. Al aumentar el precio internacional del crudo, empieza a hacerse atractiva la búsqueda de nuevas alternativas energéticas, que bajo otras condiciones serían impensables. No obstante, en el Sistema Interconectado nacional en Colombia, gran parte de la demanda energética en el sector industrial es proporcionado por energéticos como el diésel, gas natural, carbón y fuentes hidroeléctricas, lo que genera un aumento de los costos de producción.

Figura 23. Demanda Energética Nacional Sector Industrial Tendencial



Fuente. UPME

La extracción de aceite de microalga mediante exposición a campo magnético hace uso menos intenso de la energía, y por lo mismo es menos sensible a esta variable. En la **tabla 10** se observa el cálculo del consumo energético del prototipo realizado para extraer lípidos de microalgas.

Tabla 10. Consumo energético proceso de extracción de lípidos mediante exposición a campo magnético

Equipo	Potencia en vatios	Horas de uso	Energía consumida
Prototipo extracción de lípidos mediante campo magnético	2850	3.5	9975

Fuente. Autor

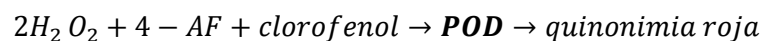
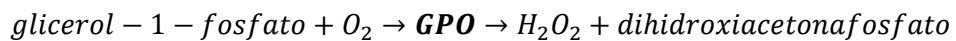
Los cálculos del consumo energético presentados en la tabla 10 hacen referencia a la energía consumida en una operación tipo bacht de 3.5 horas que corresponde a 9975 vatios por lote de extracción.

4.6 Método de verificación de lípidos TG color GPO/PAP AA

Se utilizó un método de presencia y medición de lípidos, para comprobar la calidad del aceite obtenido, este método es el utilizado para identificar el aumento de triglicéridos como factor de riesgo en enfermedades humanas.

Fundamento del método

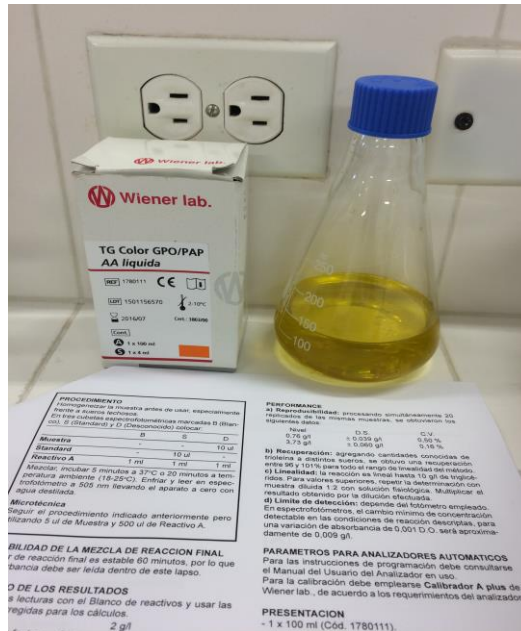
El esquema de la reacción consiste en:



Procedimiento

Paso 1: Se homogeneizó la muestra antes de usar.

Figura 24. Muestra de aceite de microalgas.



Paso 2: Se marcaron tres cubetas espectrofotométricas con: B (blanco), S (estándar), D (desconocido).

Figura 25. Reactivos sometidos a lecturas de espectrofotometría.

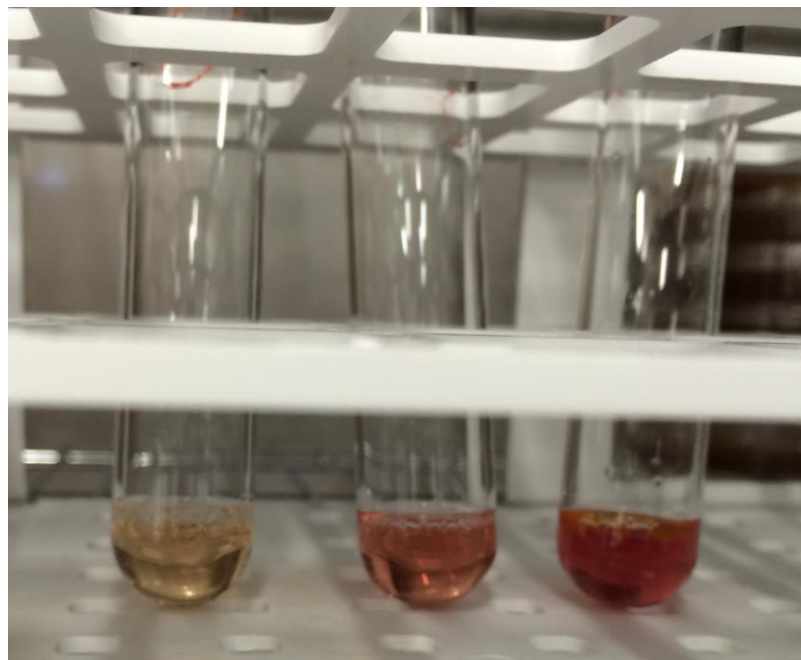


Tabla 11. Medida de reactivos prueba de triglicéridos.

	B	S	D
Muestra	-	-	10 ul
Estándar	-	10 ul	-
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml

Paso 3: se incuba la muestra de aceite de microalgas en el reactivo A, 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).

Paso 4: Se lee en el espectrofotómetro a 505 nm calibrando el aparato a cero con agua destilada.

Figura 26. Mediciones espectrofotometría.



Calculo de resultados

Se corrigen las lecturas con el blanco de reactivos y se usan las lecturas corregidas para los cálculos.

$$factor = \frac{2 \text{ g/l}}{S}$$

Tabla 12. Resultados prueba de triglicéridos con aceite de microalgas

Resultados de la muestra	
B	0
S	0.033
D	0.12
TG (g/l)	7.27

Valores de referencia

El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de Triglicéridos [50]:

- Deseable: < 1,50 g/l
- Moderadamente elevado a elevado: 1,50 - 1,99 g/l
- Elevado: 2,00 - 4,99 g/l
- Muy elevado: \geq 5,00 g/l

Como el resultado de la muestra de aceite de microalgas fue 7.27 TG (g/l) se comprueba que tiene un porcentaje muy elevado triglicéridos, lo cual garantiza que en la transesterificación se va a obtener un porcentaje alto de biodiesel,

4.7 TRANSESTERIFICACIÓN DE LÍPIDOS

La transesterificación de los lípidos obtenidos de la microalga *Chlorella vulgaris*, consta básicamente de una reacción, en donde se mezcla el aceite de microalgas con metanol y NaOH como catalizador; como resultado se obtiene biodiesel y glicerina.

Para este proceso se utilizó un sistema que comprende de; un reactor de 500 ml una plancha de calentamiento con agitación magnética. Se realizó la reacción usando 100 g de aceite de microalga, 23 gramos metanol y 1 gramo de NaOH, teniendo en cuenta que la relación molar de la reacción es, 3 moles de alcohol por una mol de aceite de microalga, sin embargo, la reacción se hace en exceso de alcohol para garantizar que se produzcan la mayor cantidad de esteres, el tiempo de reacción fue de 2 horas, a una temperatura de 60 °C.

Metodología

Primero se precalentó el aceite de microalga hasta alcanzar una temperatura de 60°C, el metanol mezclado con el NaOH también se precalienta para obtener una

fase homogénea, una vez alcanzada la temperatura de reacción se agregó la mezcla de metanol/NaOH, se mantiene en agitación a 300 rpm durante las dos horas de reacción. La conversión a biodiesel usualmente se da en los primeros 20 minutos de reacción, el tiempo restante se da para garantizar una relación de conversión de biodiesel alta.

Figura 27. Transesterificación de biodiesel de micro algas



Fuente. Autor

Una vez obtenido el aceite de la microalga *Chlorella vulgaris* se precalienta a 60°C, de igual forma se precalienta el metanol como se muestra en la figura 26, se deja en agitación durante un periodo de dos horas, al final se obtiene biodiesel y glicerina, como se observa en la **figura 26**, donde la fase oscura es la glicerina y fase más clara es el biodiesel.

En cuanto al rendimiento de biodiesel se obtuvieron 96 ml de biodiesel y 43.5 ml de glicerina por kilogramo de masa microbiana, que confirma que los parámetro de eficiencia del prototipo de extracción de lípidos debe ser perfeccionado.

Caracterización de biodiesel de microalgas

Se aclara que en esta investigación no se realizaron todas la pruebas de caracterización de biodiesel por motivos de logística y tiempos en los equipos de prueba, sin embargo, se realizaron pruebas de densidad a 15 °C arrojando un resultado de 874 (kg/m²) aprox, lo cual entra en el rango de resultados establecido por la *American Standards for Testing and Materials* (ASTM), se espera realizar pruebas como contenido de esteres para demostrar que el biodiesel obtenido es de gran calidad.

5. ANÁLISIS DE CICLO DE VIDA DE BIODIESEL A PARTIR DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris*

La aplicación de la evaluación del ciclo de vida (ACV) como técnica de evaluación del desempeño ambiental del biodiesel obtenido a partir de microalgas, es una ruta válida para demostrar las ventajas que ofrecen los biocombustibles de tercera generación. Este análisis de ciclo de vida (ACV) se realizó luego de establecer una ruta de producción de biodiesel que fuese más eficiente en términos ambientales, sea económicamente viable, y a su vez pueda ser escalable a nivel industrial.

5.1 DEFINICIÓN DEL OBJETIVO DEL ACV

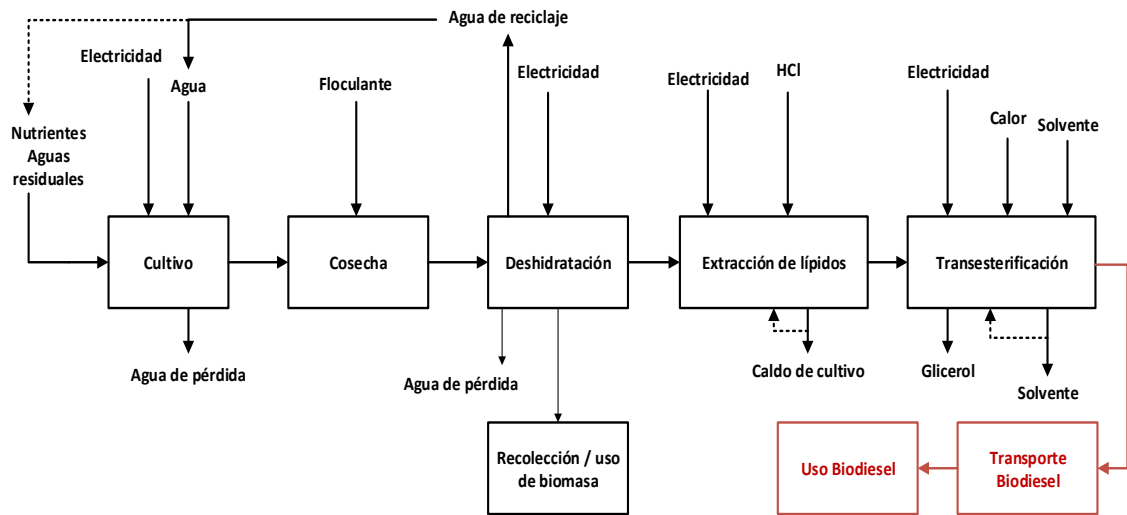
Obtener y analizar el perfil de impactos ambientales de la cadena de producción de biodiesel de aceite de microalgas e identificar las etapas del proceso de producción donde se generan las emisiones contaminantes más relevantes.

5.2 DEFINICIÓN DE ALCANCE

5.2.1 Sistema del producto bajo estudio

El sistema a estudiar es la producción de biodiesel obtenido a partir de aceite de microalgas, donde se encuentran involucradas las etapas de cultivo, cosecha, pretratamiento, extracción de lípidos, y transesterificación.

Figura 28. Sistema bajo estudio producción de biodiesel



Fuente. Autor

5.2.2 Funciones del sistema bajo estudio

El sistema bajo estudio cumple la función de servir como combustible para vehículos que trabajen con motores diésel, sin la necesidad de ser modificados.

5.2.3 Unidad funcional

Una vez definida la función del producto sometido a estudios, se escogió como unidad funcional 1 litro de biodiesel.

5.2.4 Límites del sistema

Los límites del sistema se definen los procesos que se incluyen dentro del análisis de ciclo de vida, cargas ambientales, y el nivel de detalle.

Límites del proceso: Para la obtención de biodiesel se incluyen la fase agrícola, el proceso de extracción del aceite, y su conversión a biodiesel.

Límites geográficos: El estudio se limitó a la producción de biodiesel en Colombia, considerando que toda la cadena de producción del biodiesel se localizó en el departamento de Santander.

Límites temporales: Se tomó como horizonte temporal 10 años con base a estudios ya realizados.

Etapas excluidas del análisis. Para este estudio, las cargas ambientales generadas en la producción de la maquinaria e infraestructura necesaria para la producción y transporte de Biodiesel no se tuvieron en cuenta, de igual manera se excluyeron las etapas de transporte, combustión, disposición final de los residuos.

5.2.5 Reglas de asignación

La asignación consiste en distribuir las cargas ambientales entre las etapas del proceso y sus salidas.

- I. **Asignación nula:** las cargas energéticas se asignan al producto principal y los subproductos no tienen cargas energéticas.
- II. **Valor del mercado o asignación económica:** el valor económico del producto es el quien distribuye las cargas energéticas
- III. **Asignación de masa de energía:** la asignación energética se da en función de alguna propiedad física, como: masa, o valor calórico.
- IV. Método de expansión, sustitución o desplazamiento: en este método los coproductos son requisitos de energía sustituta.

La ventaja de la asignación física es que se basa en datos que son constantes en el tiempo. La ISO 14044 recomienda evitar la asignación dividiendo el sistema en subsistemas y sugiere una asignación basada en las propiedades físicas de los productos.

5.2.6 Tipos de impacto y metodología de evaluación

Los procesos de producción de biodiesel a partir de microalgas cambian de acuerdo a la metodología planteada por el autor, en esta investigación la metodología de evaluación de impacto seleccionada es ReCipe, creada por RIVM, CML, PRé, la cual se desarrolló para combinar las ventajas de los modelos CML2001 y Eco-indicator 99, la ventaja de este método radica en su solidez científica y su facilidad de interpretación, Esta metodología integra el enfoque orientado al problema ambiental y el orientado al daño. Comprende, por tanto, dos grupos de categorías de impacto: uno de puntos intermedios, que incluye 18 categorías (Cambio climático, Disminución de la capa de ozono, Toxicidad humana, Formación de oxidantes fotoquímicos, Formación de materia particulada, Radiación ionizante, Acidificación terrestre, Eutrofización de agua dulce, Eutrofización marina, Ecotoxicidad terrestre, Ecotoxicidad de agua dulce, Ecotoxicidad marina, Ocupación de terreno agrícola, Ocupación de terreno urbano, Transformación de terreno natural, Disminución de cantidad de agua dulce, Disminución de recursos minerales y Disminución de combustibles fósiles) y otro de puntos finales que incluye 3 categorías (salud humana, ecosistemas y aumento del coste de recursos).

Las categorías de impacto más representativas a la hora de analizar la producción de biodiesel de tercera generación son: potencial de calentamiento global (GWP), acidificación de suelos y eutrofización de agua. Ya que en este trabajo se realiza el análisis de ciclo de vida solo al proceso de producción, no se tendrán en cuenta las emisiones de los diversos gases de efecto invernadero (CO_2 , N_2O , CH_4) producidos en la quema del biodiesel, las emisiones del sistema de producción de biodiesel de microalgas se asocian principalmente a los consumos de energía en la fase de cosecha, extracción de lípidos, y transesterificación.

6. INVENTARIO DE CICLO DE VIDA (ICV)

En el inventario de ciclo de vida (ICV) se recopilaron los datos del proceso de producción de biodiesel, llevado a cabo en el laboratorio de bioética y biotecnología CINBBYA, con el fin de cuantificar las entradas y salidas que se requieren y producen en las operaciones unitarias involucradas. En esta investigación se ha fraccionado el proceso de producción en cinco operaciones unitarias fundamentales: cultivo, cosecha, pretratamiento, extracción de lípidos y transesterificación.

Tabla 13. Inventario de ciclo de vida ICV.

	ENTRADAS DEL PROCESO	VALOR	UNIDAD
Entradas cultivo	Fertilizante (Nitrógeno)	0,26	kg
	Fertilizante (Potasio)	0,045	kg
	Fertilizante (Fosforo)	0,045	kg
	Agua	580	kg
	Electricidad (bombas de aireación)	42	KWh
Salida cultivo	Caldo de cultivo	10	kg
Retratamiento	Electricidad (agitación magnética)	6,17	KWh
	Ácido clorhídrico (HCl)	27	kg
Entradas extracción de aceite	Electricidad	25,5	KWh
Salidas extracción de aceite	Caldo de cultivo	18	kg
	Lípidos de bajo valor	0,053	kg
	Aguas residuales	280	kg
	Aceite de microalgas	0,87	kg
Entradas transesterificación	Aceite de microalgas	1	kg
	Metanol	0,1249	kg
	Hidróxido de sodio	0,021	kg
	Electricidad	0,85	KWh
salidas transesterificación	Biodiesel de microalga	0,756	kg
	Glicerina	0,112	kg

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 Resultados de cultivo y selección de ruta de producción de biodiesel a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*.

Se logró aislar la microalga *Chlorella vulgaris* en el Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente, CINBBYA, donde se realizaron estudios de crecimiento y se sometió a previa adaptación de los parámetros de cultivo.

Los parámetros establecidos en la etapa de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* mejoraron la velocidad de crecimiento, esto no solo se traduce en menores tiempos de retención en la etapa de cultivo, sino que a su vez disminuye la carga energética de todo el proceso de producción.

En la etapa de cosecha de microalgas se probaron diversos métodos de recolección mediante solventes químicos, como: policloruro de aluminio, metanol, cloruro férrico y reducción de pH con HCl, siendo este último el más conveniente para la ruta de producción seleccionada, pues, la extracción de lípidos mediante exposición a campo magnético requiere de reducción de pH para debilitar las paredes de la microalga, además, las muestras de microalga sometidas a floculación con solvente químico mostraron gran resistencia a la hora de reducir el pH.

La extracción de lípidos mediante exposición a campo magnético resultó ser un proceso altamente eficiente tanto en términos ambientales, como energéticos, sin embargo, a la hora de comparar los resultados obtenidos con aquellos reportados en diferentes investigaciones, *Cardozo, K.H.M.et al*²⁵, en donde se usa extracción de lípidos mediante solventes químicos, se muestra una disminución de rendimiento de alrededor de un 15% a 20% en la extracción de lípidos. Teniendo en cuenta que el proceso de extracción de lípidos mediante campo magnético fue netamente experimental y que no se encontraron reportes de los parámetros de funcionamiento, puede decirse que el porcentaje de eficiencia extracción depende en parte de la tecnología empleada y el perfeccionamiento de la misma,

A la hora de comparar el requerimiento energético de los procesos de extracción de lípidos mediante campo magnético y extracción de lípidos con solventes químicos, se puede ver que la extracción con campo magnético utiliza alrededor de 40% menos de energía, esto no solo mejora la carga ambiental del proceso global, sino que disminuye el costo de producción de biodiesel.

7.2 Selección de categorías de impacto

El análisis de ciclo de vida (ACV) permite determinar la composición y las cantidades de contaminantes generados, recursos consumidos, señalando el impacto que cada uno produce al medio ambiente y los agrupa en categorías de impacto. La tabla (11) muestra las categorías evaluadas en esta investigación.

Tabla 14. Categorías de impacto y unidad de referencia

CATEGORÍA	UNIDAD DE REFERENCIA
Cambio climático	kg CO2 eq
Acidificación terrestre	kg SO2 eq
Eutrofización	kg P eq
Eco-toxicidad al agua	kg 1,4-DB eq
Agotamiento de los recursos fósiles	kg oil eq
Toxicidad humana	kg 1,4-DB eq

7.3 Asignación e interpretación de resultados del inventario a las categorías de impacto

En esta etapa se combinan los resultados del inventario de ciclo de vida con la evaluación de impacto, de esta forma se determina las fases del producto donde se generan las mayores cargas ambientales, lo cual permite analizar y mejorar los métodos de producción y evaluar nuevas tecnologías para reducir los daños ocasionados al medio ambiente.

A continuación se presentan las redes del proceso las cuales nos permiten ver las cargas ambientales de una manera interactiva a lo largo del proceso de producción

de biodiesel, de igual forma se presentan las cargas ambientales de manera cuantitativa y sus respectivas gráficas.

➤ **Calentamiento global**

Figura 29. Red de cargas ambientales categoría cambio climático.

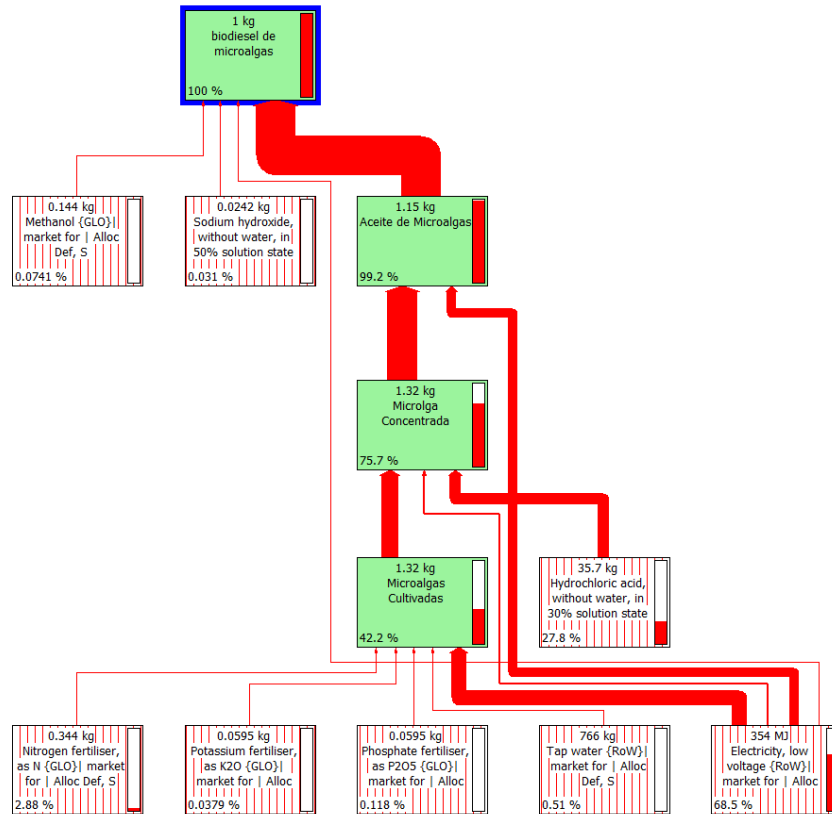
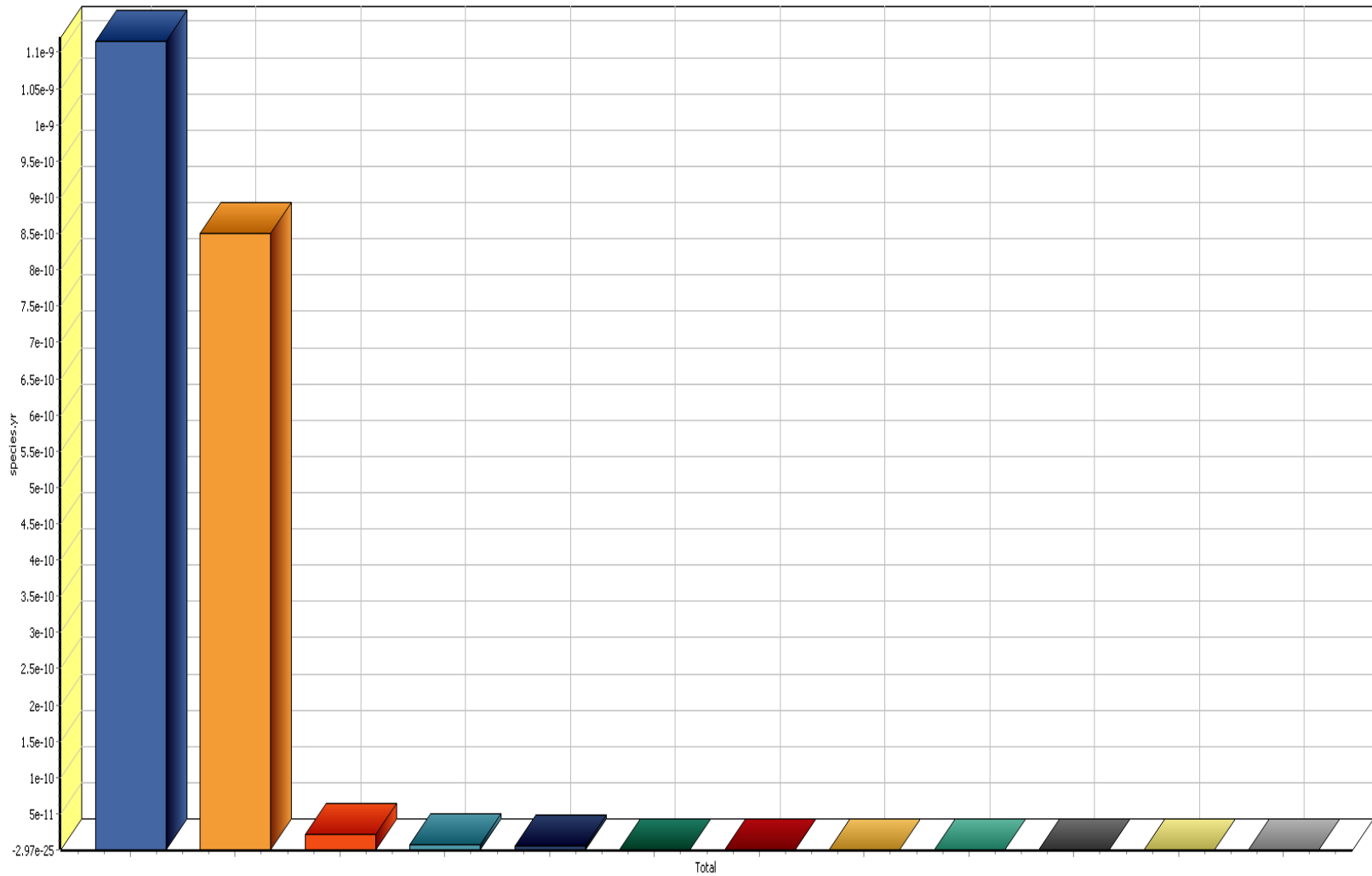


Tabla 15. Cuantificación de cargas ambientales categoría cambio climático.

No	Proceso	Proyecto	Unidad	Total
	El total de todos los procesos		kg CO2 eq	98.9
1	Electricity, low voltage {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	67.7
2	Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state {RER} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	27.5
3	Nitrogen fertiliser, as N {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	2.85
4	Tap water {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	0.504
5	Phosphate fertiliser, as P2O5 {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	0.117
6	Methanol {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	0.0733
7	Potassium fertiliser, as K2O {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	0.0375
8	Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state {GLO} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	0.0306



- Electricity, low voltage {RoW} market for | Alloc Def, S
- Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state {RER} market for | Alloc Def, S
- Nitrogen fertiliser, as N {GLO} market for | Alloc Def, S
- Tap water {RoW} market for | Alloc Def, S
- Phosphate fertiliser, as P2O5 {GLO} market for | Alloc Def, S
- Methanol {GLO} market for | Alloc Def, S
- Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state {GLO} market for | Alloc Def, S
- Potassium fertiliser, as K2O {GLO} market for | Alloc Def, S
- Microalga Concentrada

➤ **Acidificación terrestre**

Figura 31. Red de cargas ambientales categoría acidificación terrestre

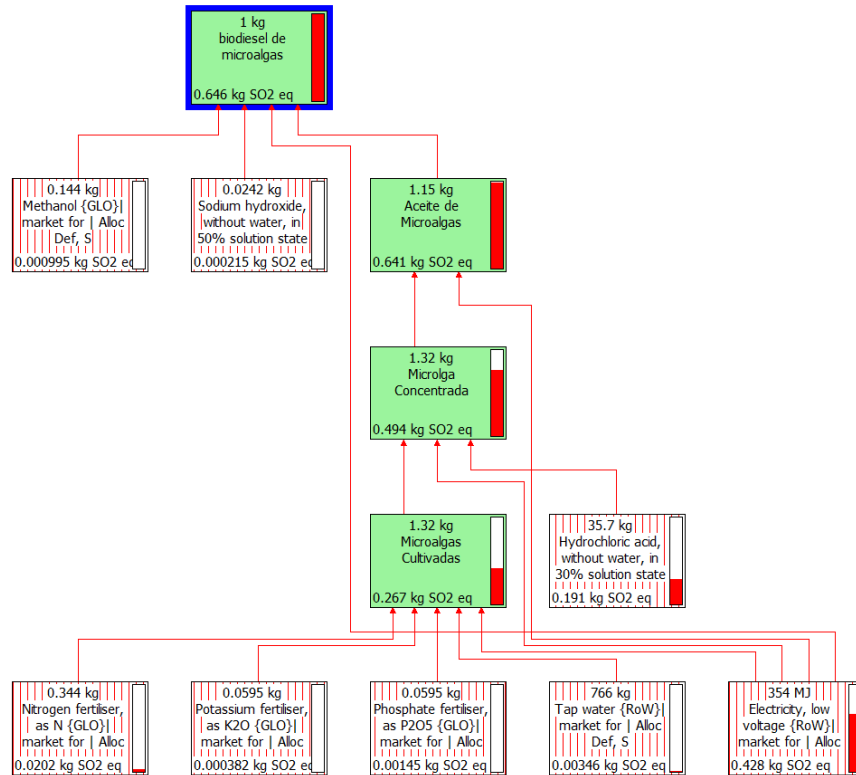
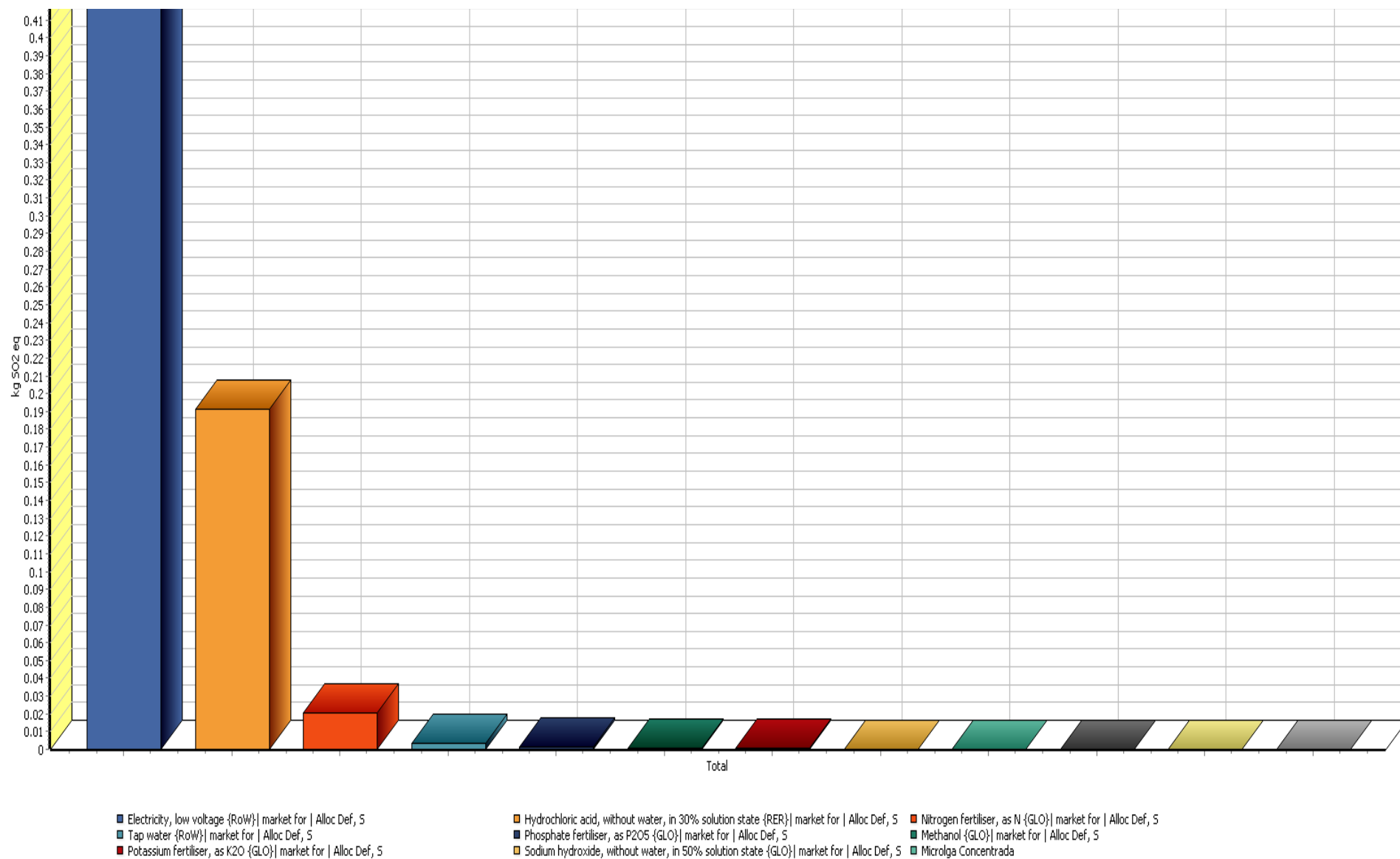


Tabla 16. Cuantificación de cargas ambientales categoría acidificación terrestre.

No	Proceso	Proyecto	Unidad	Total
	El total de todos los procesos		kg SO2 eq	0.646
1	Electricity, low voltage {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg SO2 eq	0.428
2	Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state {RER} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg SO2 eq	0.191
3	Nitrogen fertiliser, as N {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg SO2 eq	0.0202
4	Tap water {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg SO2 eq	0.00346
5	Phosphate fertiliser, as P2O5 {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg SO2 eq	0.00145
6	Methanol {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg SO2 eq	0.000995
7	Potassium fertiliser, as K2O {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg SO2 eq	0.000382
8	Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state {GLO} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg SO2 eq	0.000215

Figura 32. Grafica de impactos ambientales categoría acidificación terrestre



➤ Eutrofización

Figura 33. Red de cargas ambientales categoría eutrofización.

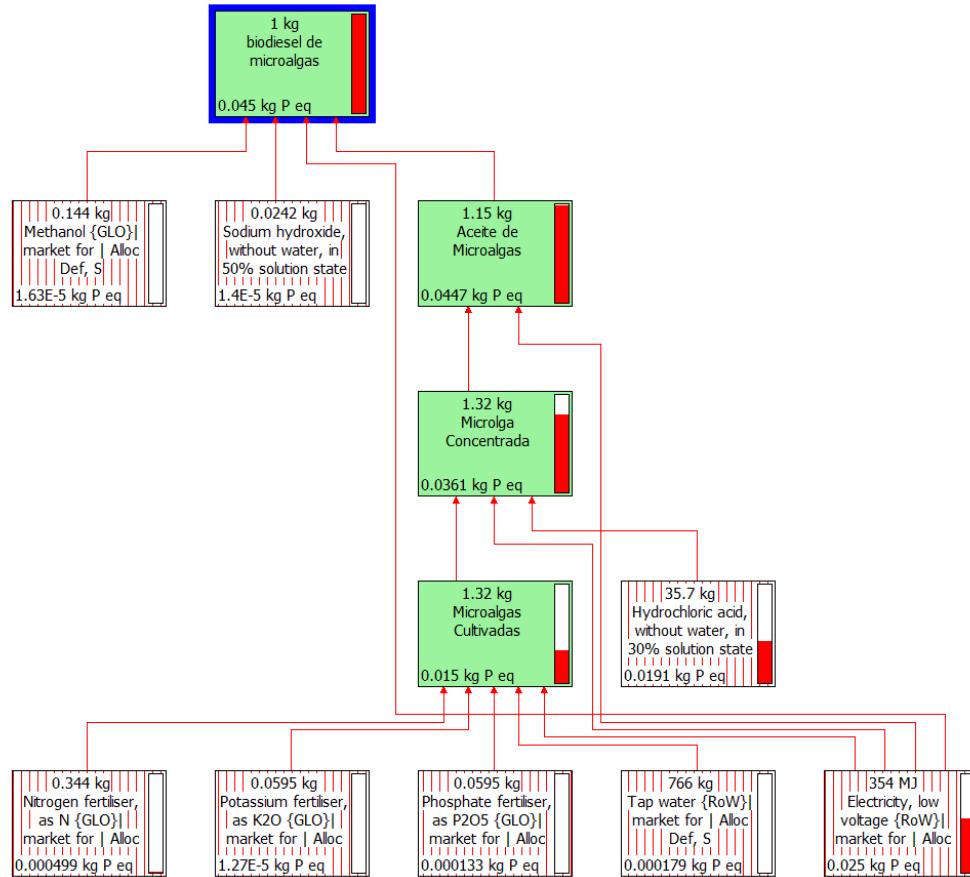
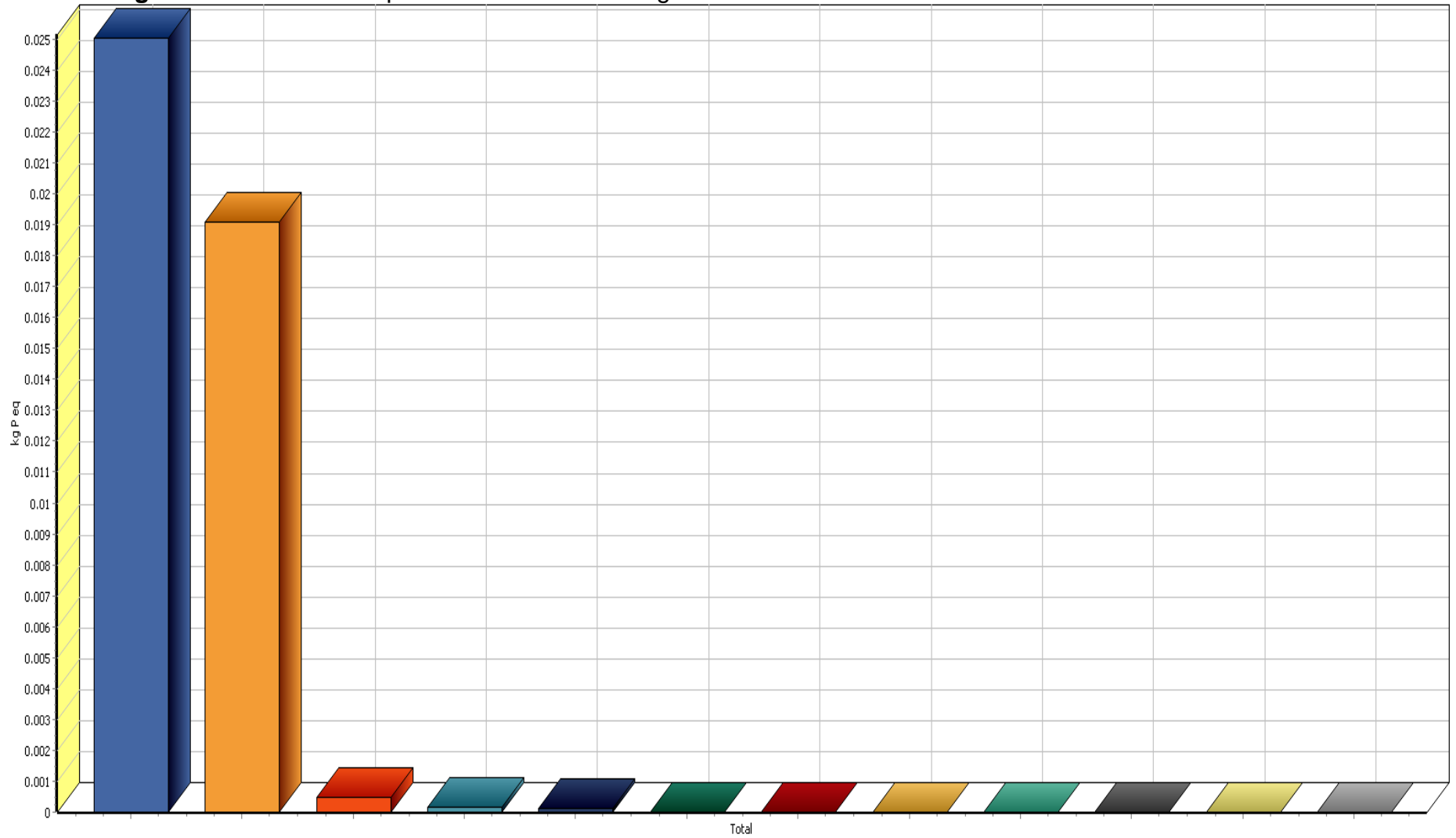


Tabla 17. Cuantificación de cargas ambientales categoría eutrofización.

No	Proceso	Proyecto	Unidad	Total
	El total de todos los procesos		kg P eq	0.045
1	Electricity, low voltage {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg P eq	0.025
2	Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state {RER} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg P eq	0.0191
3	Nitrogen fertiliser, as N {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg P eq	0.000499
4	Tap water {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg P eq	0.000179
5	Phosphate fertiliser, as P2O5 {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg P eq	0.000133
6	Methanol {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg P eq	1.63E-5
7	Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state {GLO} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg P eq	1.4E-5
8	Potassium fertiliser, as K2O {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg P eq	1.27E-5
9	Microalga Concentrada	Biodiesel Microalgas	kg P eq	-
10	Microalga Cultivadas	Biodiesel Microalgas	kg P eq	-
11	biodiesel de microalgas	Biodiesel Microalgas	kg P eq	-
12	Aceite de Microalgas	Biodiesel Microalgas	kg P eq	-

Figura 31. Grafica de impactos ambientales categoría eutrofización



- Electricity, low voltage {RoW} market for | Alloc Def, 5
- Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state {RER} market for | Alloc Def, 5
- Nitrogen fertiliser, as N {GLO} market for | Alloc Def, 5
- Tap water {RoW} market for | Alloc Def, 5
- Phosphate fertiliser, as P2O5 {GLO} market for | Alloc Def, 5
- Methanol {GLO} market for | Alloc Def, 5
- Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state {GLO} market for | Alloc Def, 5
- Potassium fertiliser, as K2O {GLO} market for | Alloc Def, 5
- Microlga Concentrada

➤ **Eco-toxicidad en agua**

Figura 34 . Red de cargas ambientales categoría eco toxicidad del agua.

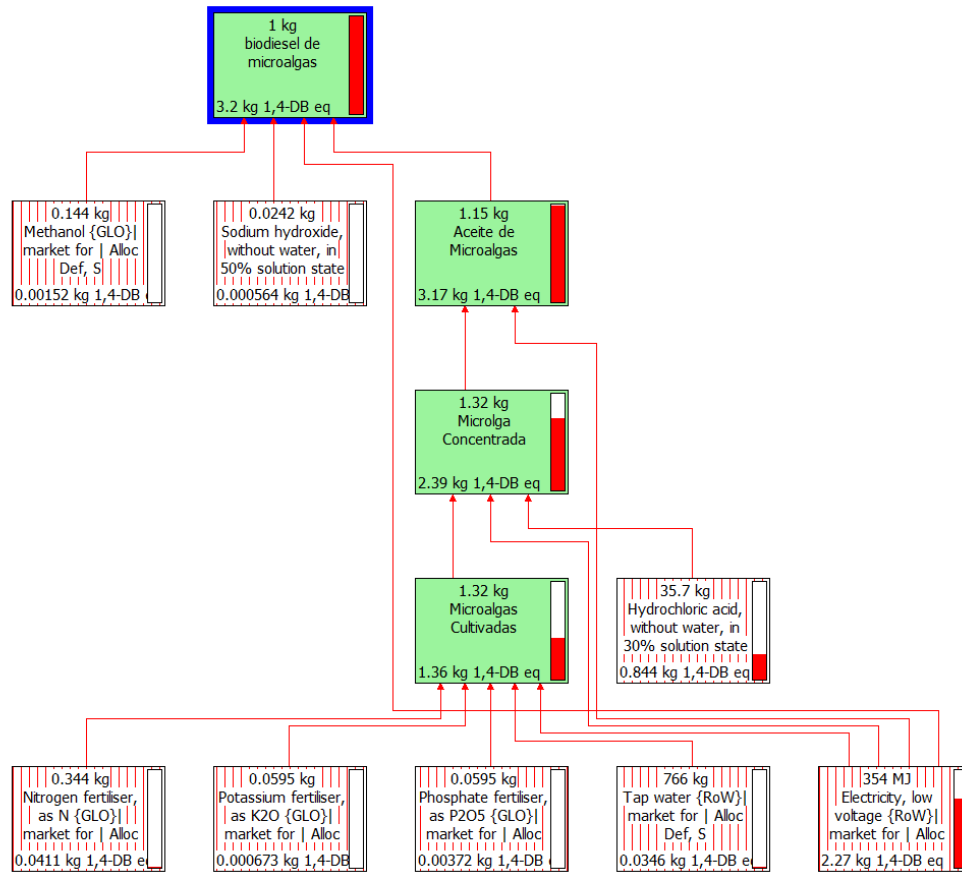
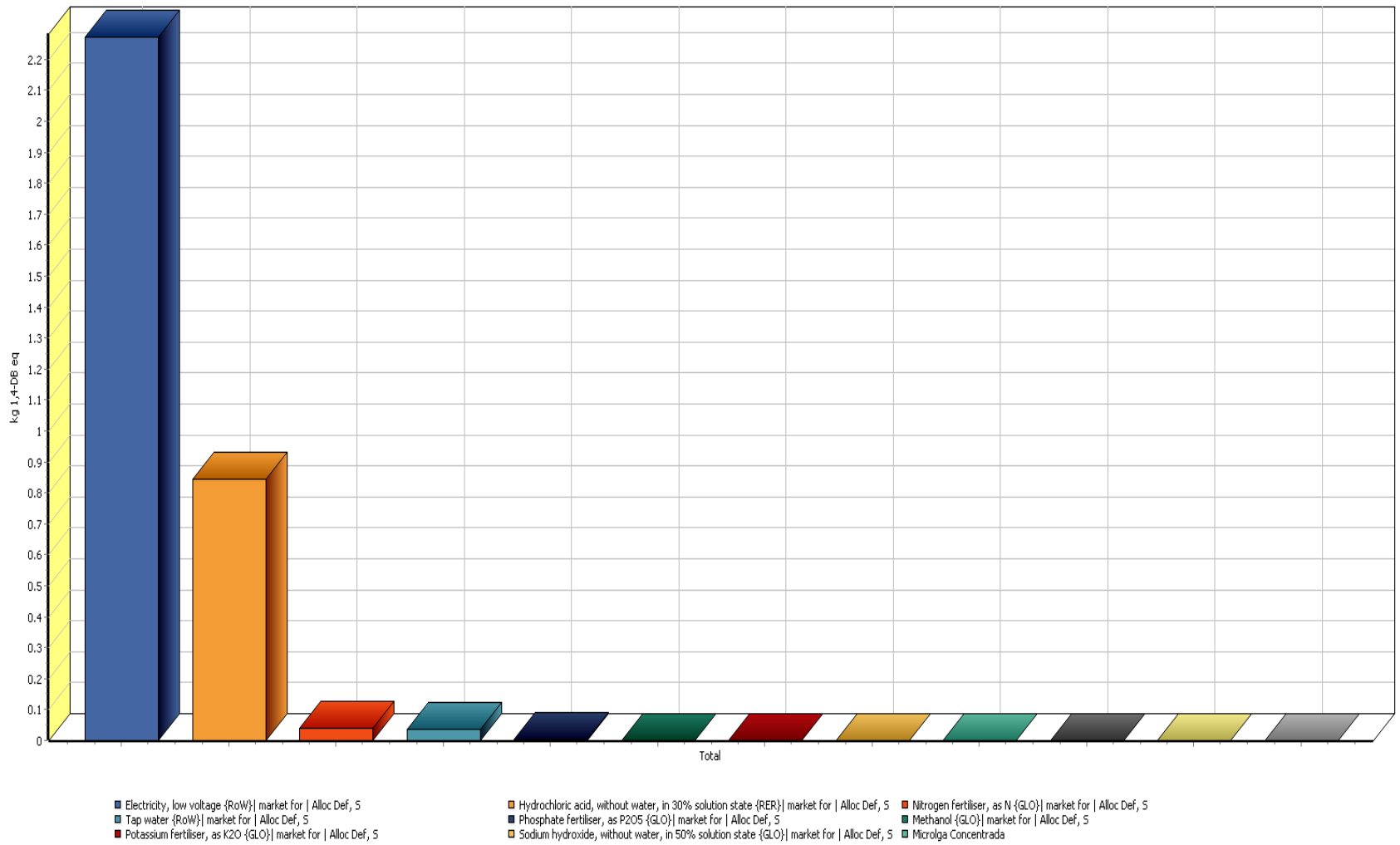


Tabla 18. Cuantificación de cargas ambientales categoría eco toxicidad del agua

No	Proceso	Proyecto	Unidad	Total
	El total de todos los procesos		kg 1,4-DB eq	3.2
1	Electricity, low voltage {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg 1,4-DB eq	2.27
2	Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state {RER} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg 1,4-DB eq	0.844
3	Nitrogen fertiliser, as N {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg 1,4-DB eq	0.0411
4	Tap water {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg 1,4-DB eq	0.0346
5	Phosphate fertiliser, as P2O5 {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg 1,4-DB eq	0.00372
6	Methanol {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg 1,4-DB eq	0.00152
7	Potassium fertiliser, as K2O {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg 1,4-DB eq	0.000673
8	Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state {GLO} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg 1,4-DB eq	0.000564

Figura 35. Grafica de impactos ambientales categoría Eco-toxicidad en agua



➤ Agotamiento de los recursos fósiles

Figura 36. Red de cargas ambientales categoría Agotamiento de los recursos fósiles

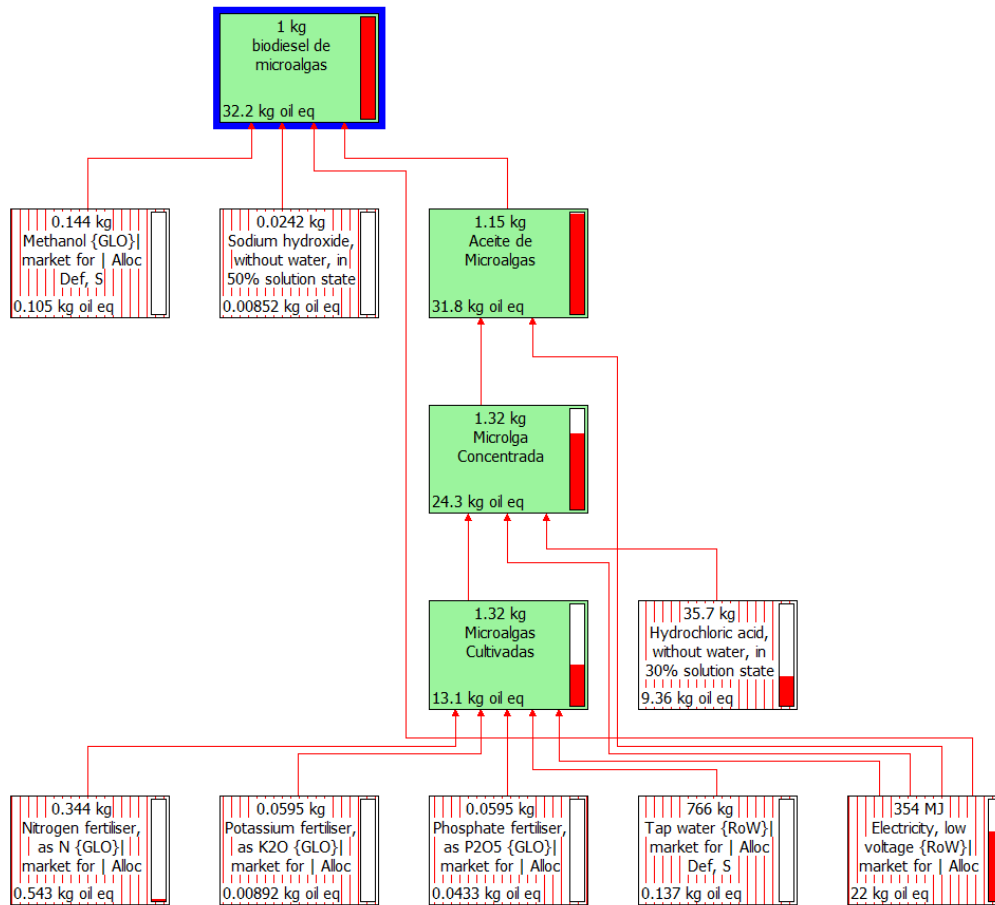
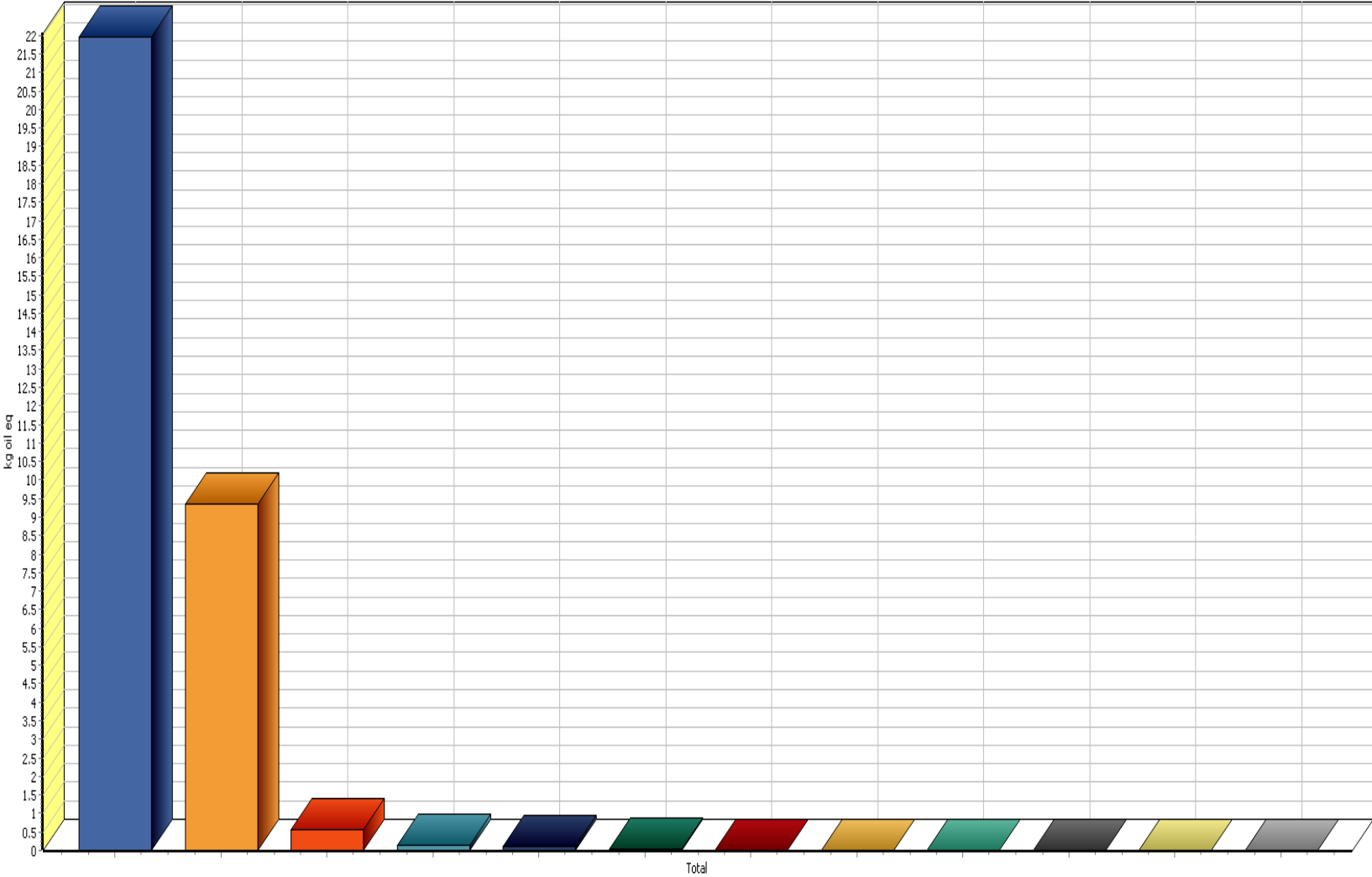


Tabla 19. Cuantificación de cargas ambientales categoría agotamiento de los recursos fósiles.

No	Proceso	Proyecto	Unidad	Total
	El total de todos los procesos		kg oil eq	32.2
1	Aceite de Microalgas	Biodiesel Microalgas	kg oil eq	-
2	biodiesel de microalgas	Biodiesel Microalgas	kg oil eq	-
3	Electricity, low voltage {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg oil eq	22
4	Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state {RER} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg oil eq	9.36
5	Methanol {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg oil eq	0.105
6	Microalgas Cultivadas	Biodiesel Microalgas	kg oil eq	-
7	Microalga Concentrada	Biodiesel Microalgas	kg oil eq	-
8	Nitrogen fertiliser, as N {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg oil eq	0.543
9	Phosphate fertiliser, as P2O5 {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg oil eq	0.0433
10	Potassium fertiliser, as K2O {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg oil eq	0.00892
11	Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state {GLO} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg oil eq	0.00852
12	Tap water {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg oil eq	0.137

Figura 37. Grafica de impactos ambientales categoría agotamiento de los recursos fósiles



- Electricity, low voltage {RoW} market for | Alloc Def, S
- Tap water {RoW} market for | Alloc Def, S
- Potassium fertiliser, as K2O {GLO} market for | Alloc Def, S
- Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state {RER} market for | Alloc Def, S
- Methanol {GLO} market for | Alloc Def, S
- Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state {GLO} market for | Alloc Def, S
- Nitrogen fertiliser, as N {GLO} market for | Alloc Def, S
- Phosphate fertiliser, as P2O5 {GLO} market for | Alloc Def, S
- Microloga Concentrada

➤ **Cambio climático Salud humana**

Figura 38. Red de cargas ambientales categoría cambio climático salud humana

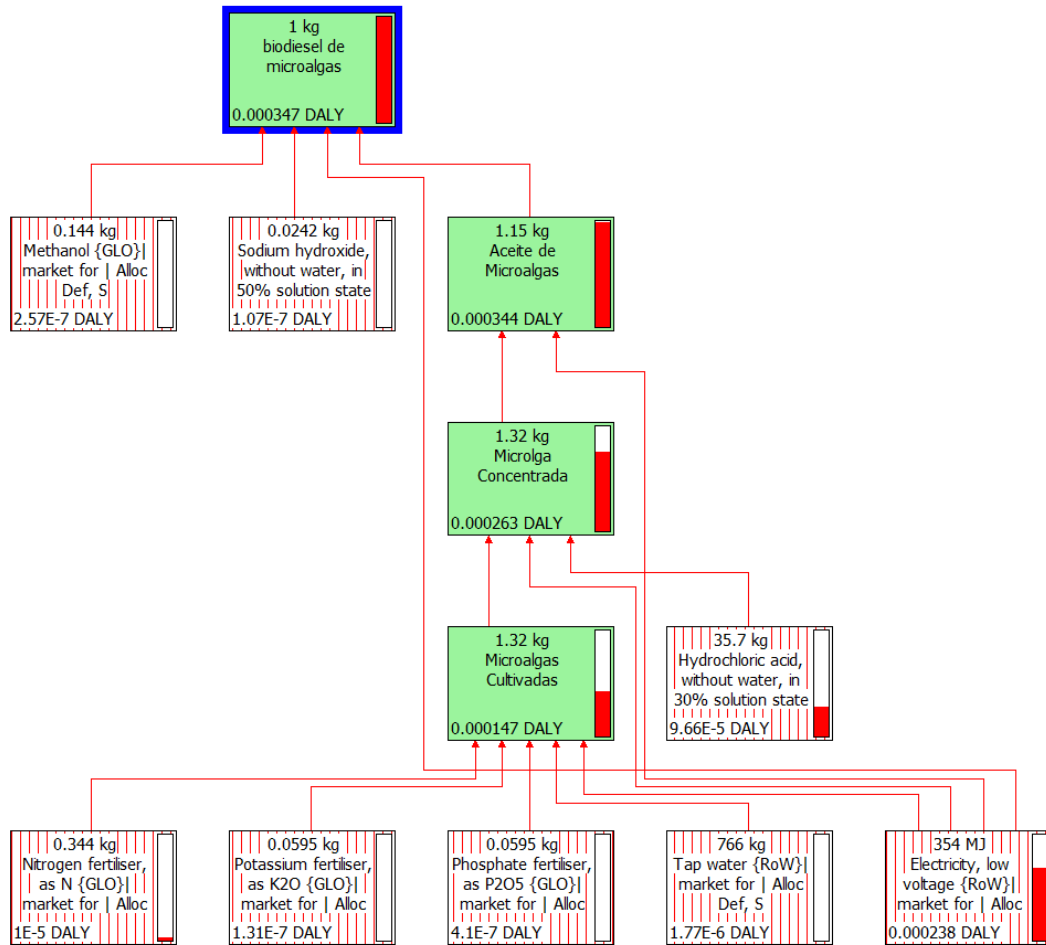
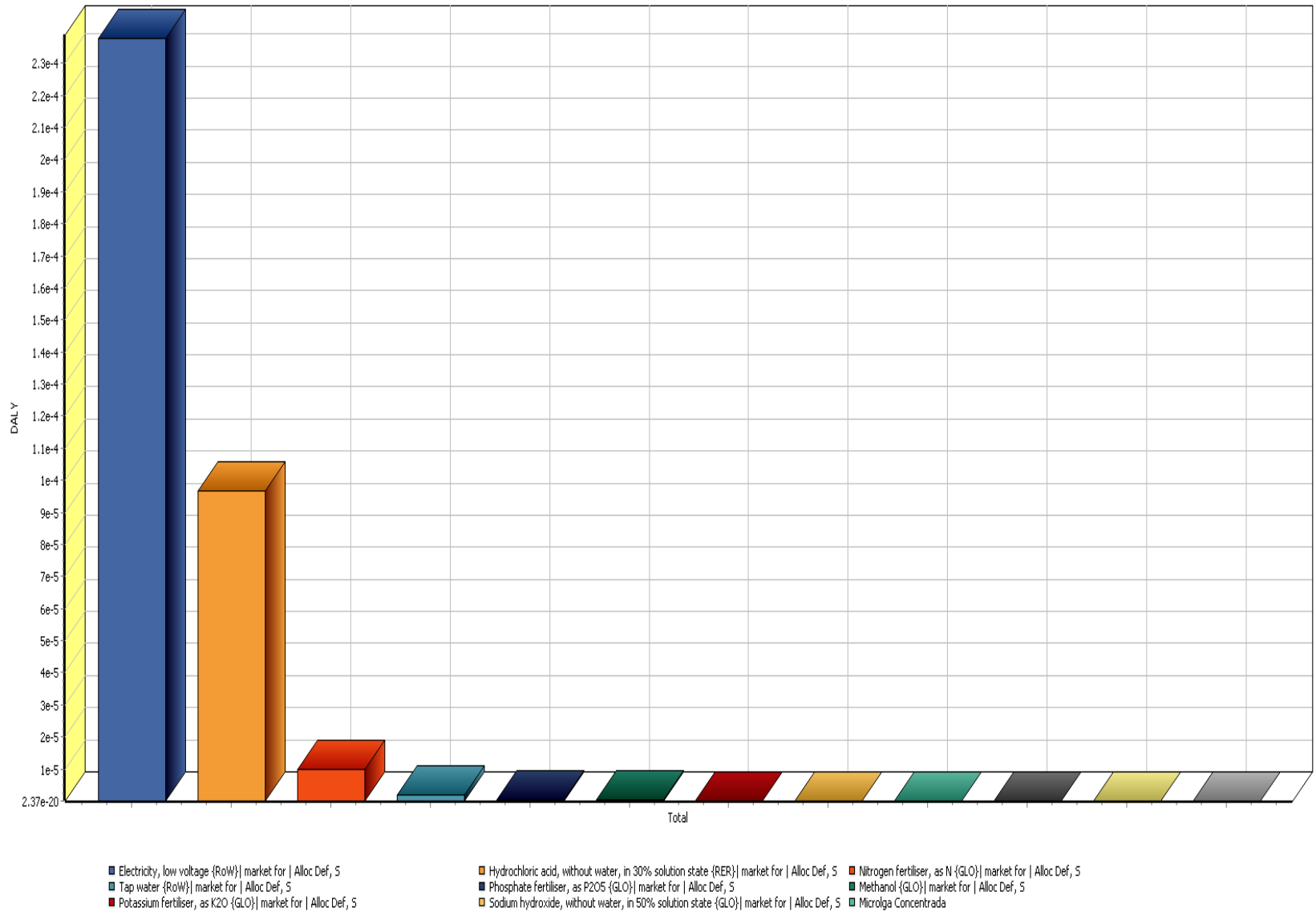


Tabla 20. Cuantificación de cargas ambientales categoría cambio climático salud humana

No	Proceso	Proyecto	Unidad	Total
	El total de todos los procesos		DALY	0.000347
1	Electricity, low voltage {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	0.000238
2	Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state {RER} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	9.66E-5
3	Nitrogen fertiliser, as N {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	1E-5
4	Tap water {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	1.77E-6
5	Phosphate fertiliser, as P2O5 {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	4.1E-7
6	Methanol {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	2.57E-7
7	Potassium fertiliser, as K2O {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	1.31E-7
8	Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state {GLO} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	1.07E-7

Figura 39. Grafica de impactos ambientales categoría cambio climático salud humana



➤ Toxicidad humana

Figura 40. Red de cargas ambientales categoría toxicidad humana.

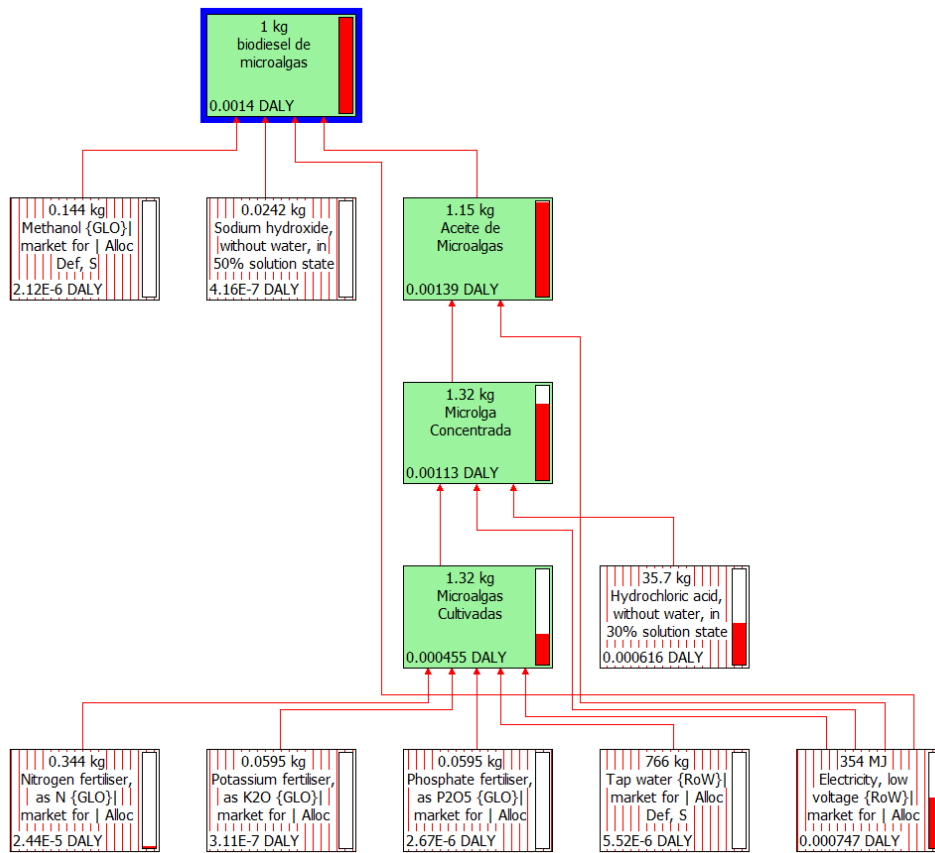
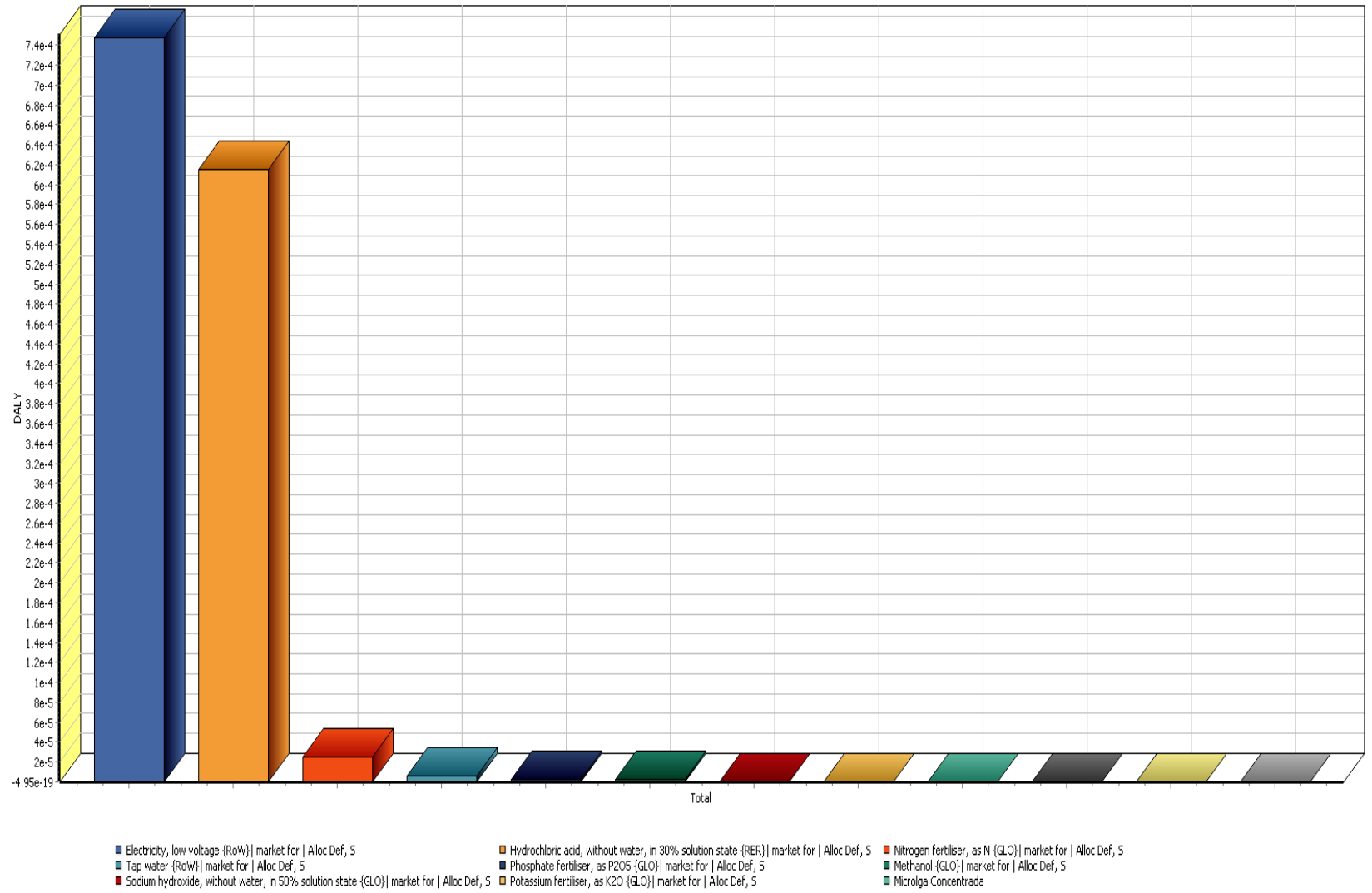


Tabla 21 Cuantificación de cargas ambientales categoría toxicidad humana

No	Proceso	Proyecto	Unidad	Total
	El total de todos los procesos		DALY	0.0014
1	Electricity, low voltage {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	0.000747
2	Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state {RER} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	0.000616
3	Nitrogen fertiliser, as N {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	2.44E-5
4	Tap water {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	5.52E-6
5	Phosphate fertiliser, as P2O5 {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	2.67E-6
6	Methanol {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	2.12E-6
7	Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state {GLO} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	4.16E-7
8	Potassium fertiliser, as K2O {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	DALY	3.11E-7
9	Microlga Concentrada	Biodiesel Microalgas	DALY	-

Figura 41. Grafica de impactos ambientales categoría toxicidad humana



➤ Calentamiento global

Figura 42. Red de cargas ambientales categoría Calentamiento Global

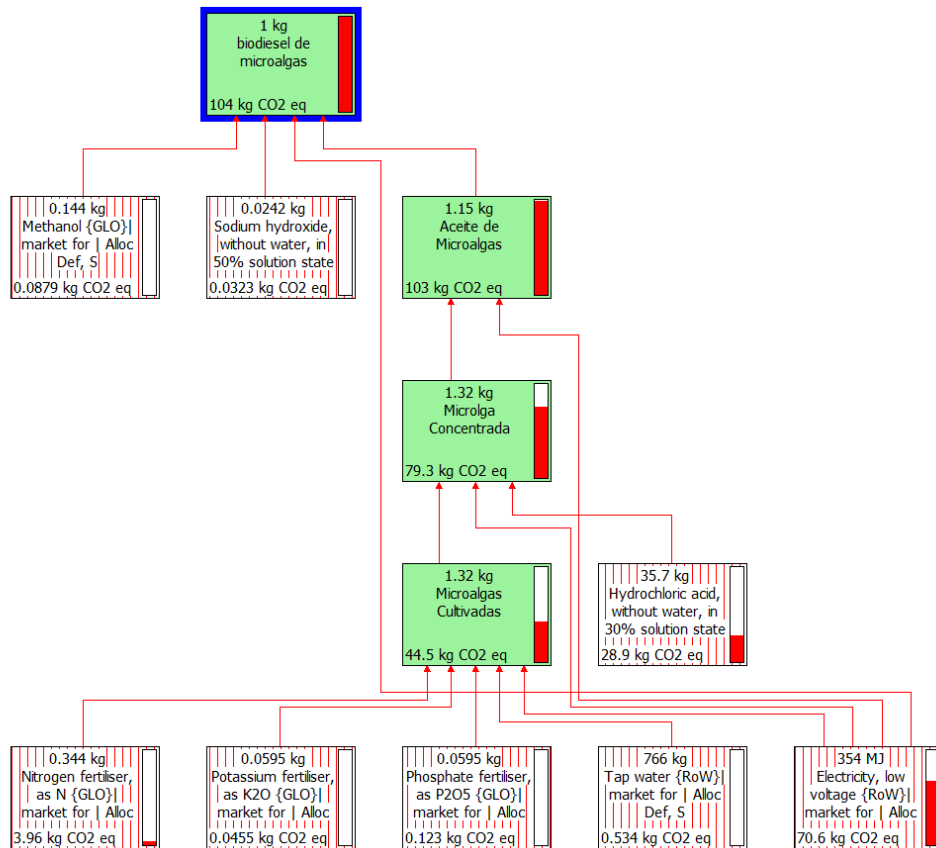
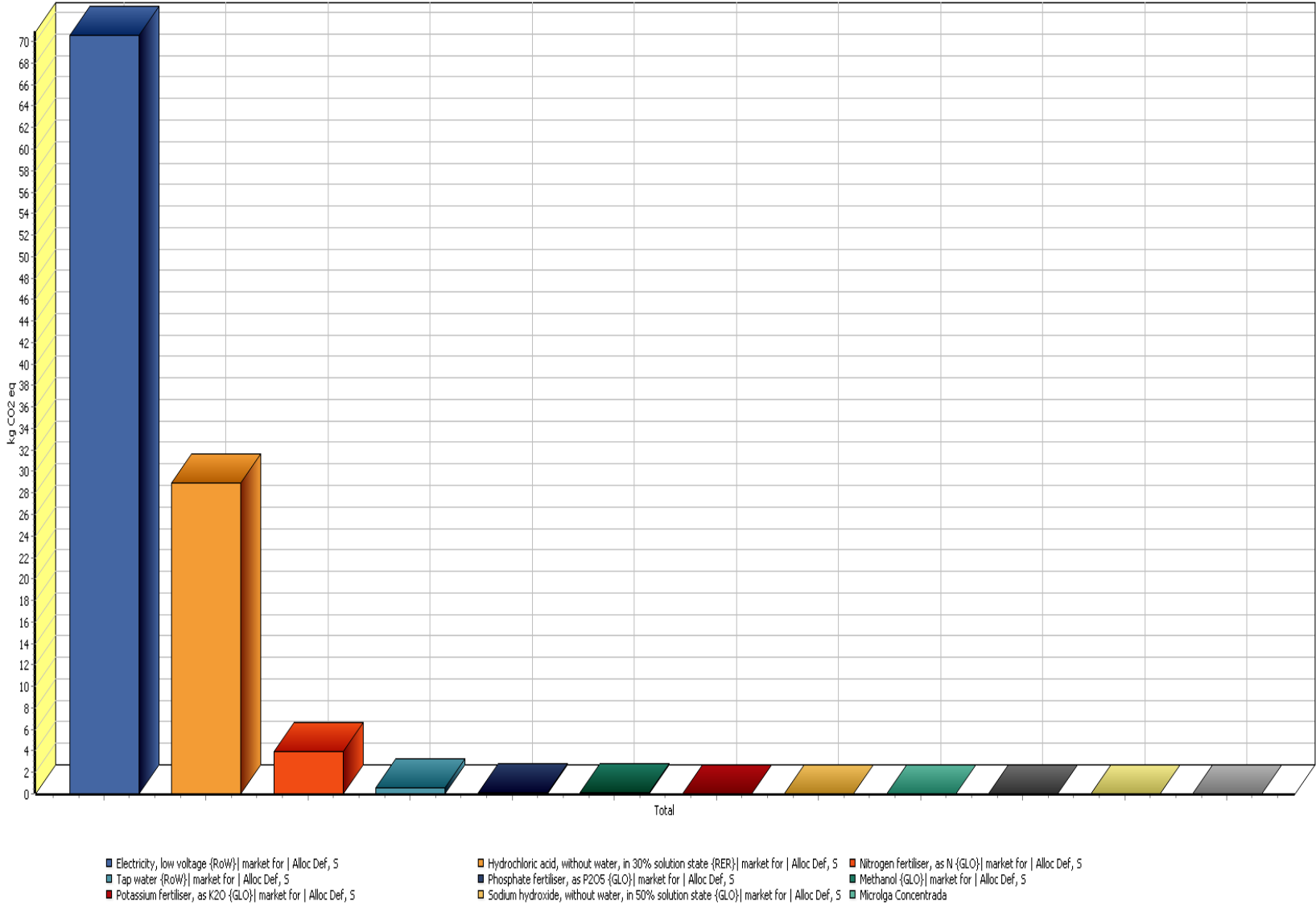


Tabla 22 Cuantificación de cargas ambientales categoría calentamiento global.

No	Proceso	Proyecto	Unidad	Total
	El total de todos los procesos		kg CO2 eq	104
1	Aceite de Microalgas	Biodiesel Microalgas	kg CO2 eq	-
2	biodiesel de microalgas	Biodiesel Microalgas	kg CO2 eq	-
3	Electricity, low voltage {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	70.6
4	Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state {RER} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	28.9
5	Methanol {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	0.0879
6	Microalgas Cultivadas	Biodiesel Microalgas	kg CO2 eq	-
7	Microalga Concentrada	Biodiesel Microalgas	kg CO2 eq	-
8	Nitrogen fertiliser, as N {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	3.96
9	Phosphate fertiliser, as P2O5 {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	0.123
10	Potassium fertiliser, as K2O {GLO} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	0.0455
11	Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state {GLO} market for A	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	0.0323
12	Tap water {RoW} market for Alloc Def, S	Ecoinvent 3 - allocation, c	kg CO2 eq	0.534

Figura 43. Grafica de impactos ambientales categoría calentamiento global



8. CONCLUSIONES

- Las condiciones de cultivo seleccionadas en los fotobioreactores 4 y 5: flujo de aire (4 L/min) temperatura ($23^{\circ}\text{C} + 10^{\circ}\text{C}$), pH (3-5), para el crecimiento y posterior escalamiento de la microalga, demostraron ser las adecuadas. Esto fue confirmado por medios cuantitativos, como las pruebas de absorción por espectrofotometría.
- Los resultados de la eficiencia de separación con los diferentes métodos muestran que se consigue 1.59 gr de biomasa seca en la misma cantidad de caldo de cultivo (300 g) utilizando el método de floculación con metanol, sin embargo, el proceso mas conveniente para la ruta de producción seleccionada es la floculación mediante cambios de pH (con la cual se consiguen 1.14 gr en (300 g) de caldo de cultivo), ya que el siguiente proceso es la extracción de lípidos mediante exposición a campo magnético, el cual requiere de reducción de pH para debilitar las paredes de la microalga.
- La extracción de lípidos mediante exposición a campo magnético en comparación con la extracción de lípidos con solventes químicos , resulta ser entre un 15% a 20% menos eficiente, sin embargo, al ser un método experimental y totalmente innovador se muestra como un método de extracción promisorio , si continua su desarrollo y perfeccionamiento, sin embargo, los cálculos del consumo energético del prototipo de extracción en una operación tipo batch de 3.5 horas corresponde a 9975 vatios por lote de extracción, convierten este método como una tecnología promisorio para la producción de biodiesel.
- Se obtuvieron 9.6 ml de biodiesel de microalga por kilogramo de masa microbiana, el cual siguió una ruta de producción que no solo se muestra más amigable con el medio ambiente respecto a los métodos de extracción convencionales, sino que a su vez, representa una menor inversión a la hora de escalar el proceso a nivel industrial; ya que el requerimiento energético del proceso de extracción de lípidos

mediante campo magnético es hasta un 40% menor que el requerimiento energético de la extracción de lípidos con solventes químicos, esto no solo mejora la carga ambiental del proceso global, sino que disminuye el costo de producción de biodiesel.

- Se recopilaron los datos del proceso de producción de biodiesel, llevado a cabo en el Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente, CINBBYA, de la Universidad Autónoma de Bucaramanga, con ellos se cuantificaron las entradas y salidas que se requieren y producen, esto dejó en evidencia que la ruta de producción seleccionada es significativamente mejor en términos medio ambientales y económicos, ya que, reduce el uso de solventes químicos en las etapas de extracción de aceite, al mismo tiempo disminuye los consumos energéticos pues ya no debe emplearse calor para recuperar los solventes utilizados en otras rutas de producción.
- Teniendo en cuenta que en el análisis de ciclo de vida (ACV) realizado en esta investigación no se incluyen las etapas de distribución y uso, que usualmente son las que representan un mayor impacto ambiental en combustibles de tercera generación como el biodiesel, se concluye que el uso de la energía eléctrica en las etapas de cultivo y extracción de lípidos, es la entrada al proceso de producción que más impacta a las categorías de calentamiento global (GW), y agotamiento de recursos fósiles, con aportes de 70 kg CO₂ eq, y 22 kg oil eq, respectivamente.

9. RECOMENDACIONES

- La eficiencia de extracción obtenida con el prototipo realizado para la extracción de lípidos con campo magnético es alta para ser un método experimental y puede ser mejorada perfeccionando el diseño.
- En la etapa de cultivo de microalgas, se recomienda utilizar flujos altos de aire en las 2 primeras etapas de crecimiento ya que esto acelera la tasa de crecimiento. Después de la segunda semana, debe reducirse el flujo de aire para evitar la reducción en la masa de cultivo debido a la oxidación de agua.
- Para un futuro análisis de ciclo de vida (ACV), incluir las etapas de distribución y transporte, y de esta manera saber con mayor certeza las ventajas que ofrece el biodiesel de microalgas en comparación con otros biocombustibles
- A la hora de producir biodiesel de microalgas se debe tener mucho cuidado en el manejo de sus aguas residuales, ya que, el ACV realizado en esta investigación demuestra que se corre el riesgo de eutrofización de las cuencas hídricas en las que desembocan, debido principalmente a los nutrientes como el fosforo y nitrógeno utilizados en la etapa de cultivo, y a las proliferaciones de microalgas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Henderson Quintero; “Desenvolvimento E Avaliação De Metodologias Para Purificação De Biolubrificantes Via Destilação Molecular De Filme Descendente” Campinas, 2012
- [2] HATAKEYAMA, T., QUINN, F. X. Thermal Analysis Fundamentals and Applications to Polymer Science, 2 ed. John Wiley & Sons, England, 1999.
- [3] HANSEN, C. M. Hansen Solubility Parameter. A User's Handbook. New York. Boca Raton, P. 208, 2000.
- [4] QUISPE TRINIDAD, Isabel et al; Análisis de ciclo de vida de los Biocombustibles en Perú. Red Peruana de ciclo de vida – sección Ingeniería Industrial: Pontificia Universidad Católica del Perú- Perú, 2009. 59p.
- [5] YAO, L., HAMMOND, E., WANG, T. Melting points and viscosities of fatty acid esters that are potential targets for engineered oilseed. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 85, p.77–82, 2008.
- [6] WILLING, A. Lubricants Based on Renewable Resources – an Environmentally Compatible Alternative to Mineral Oil Products. Chemosphere, v.53, p 89-98. 2001.
- [7] HAUS, F., BOISSEL, O., JUNTER, G.-A. Primary and Ultimate Biodegradabilities of Mineral Base Oils and Their Relationship with Oil Viscosity. International Biodeterioration & Biodegradation, v.54, p189-192, 2004.
- [8] GUNSTONE, F.D., HARWOOD, J.L., DIJKSTRA, A.J. The Lipid Handbook. 3.ed. Taylor & Francis Ltd., United Kingdom, 2004.
- [9] ASPENTech. 2001. Aspen plus, Unit Operation Models. Worldwide Headquarters. Aspen Technology, Inc. 200 Wheeler Road Burlington, United States.
- [10] Chisti, Y., Biodiesel From microalgae, Biotechnology Advances, 2007. 25: P. 294- 306.

[11]Liam Brennan, P.O., Biofuels From Microalgae- A Review Of Technologies For Production, Processing, And Extractions Of Biofuels And Co-Products. Renewable And Sustainable Energy Reviews, 2009 Accepted.

[12] Sarmidi Amin. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. Energy Conversion and Management. 2009; 50: 1834-1887.

[13] Woon Wallace, Fong Leung. Centrifugal separations in biotechnology. Elsevier. 2007.

[14]Murphy Thomas, Berberoglu Halil. Effect of algae pigmentation on photobioreactor productivity and scale-up: A light transfer perspective. Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer. 2011; 2-10.

[15] Cardozo, K.H.M., Et Al., Metabolites From Algae With Economical Impact. Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 146(1-2): P. 60-78.

[16] Frater, D., Kaloustian, J., Teixeira, C., Garcia, M, Biodiesel A Partir De Aceite De Algas, In Conferencia Monográfica Internacional. 23 De Enero Del 2008. 2008, Global Energy.

[17] Rojan P. John, G.S.A., K. Madhavan Nampoothiri, Ashok Pandey, Micro And Macroalgal Biomass: A Renewable Source For Bioethanol. Bioresource Technology, 2011. 102: P. 186-193.

[18] Liang, Y., N. Sarkany, And Y. Cui, Biomass And Lipid Productivities Of Chlorella Vulgaris Under Autotrophic, Heterotrophic And Mixotrophic Growth Conditions. Biotechnology Letters, 2009. 31(7): P. 1043-1049.

[19] Li, Y., Et Al., Effects Of Nitrogen Sources On Cell Growth And Lipid Accumulation Of Green Alga *Neochloris Oleoabundans*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 2008. 81(4): P. 629-636.

[20] Chisti, Y., Biodiesel From microalgae, *Biotechnology Advances*, 2007. 25: P. 294- 306.

[21] Liam Brennan, P.O., *Biofuels From Microalgae- A Review Of Technologies For Production, Processing, And Extractions Of Biofuels And Co-Products*. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, 2009 Accepted.

[22] Sarmidi Amin. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management*. 2009; 50: 1834-1887.

[23] Woon Wallace, Fong Leung. *Centrifugal separations in biotechnology*. Elsevier. 2007.

[24] Murphy Thomas, Berberoglu Halil. Effect of algae pigmentation on photobioreactor productivity and scale-up: A light transfer perspective. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*. 2011; 2-10

[25] Ramón Piloto-Rodríguez, Yisel Sánchez-Borroto, Eliezer Ahmed Melo-Espinosa, Sebastian Verhelst, Assessment of diesel engine performance when fueled with biodiesel from algae and microalgae: An overview, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 69, March 2017, Pages 833-842, ISSN 1364-0321, <http://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.015>.

[26] Ajith J. Kings, R. Edwin Raj, L.R. Monisha Miriam, M. Adhi Visvanathan, Cultivation, extraction and optimization of biodiesel production from potential microalgae *Euglena sanguinea* using eco-friendly natural catalyst, *Energy*

Conversion and Management, Volume 141, 1 June 2017, Pages 224-235, ISSN 0196-8904, <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.08.018>.

[27] Peyman Fasahati, J. Jay Liu, Application of MixAlco® processes for mixed alcohol production from brown algae: Economic, energy, and carbon footprint assessments, Fuel Processing Technology, Volume 144, April 2016, Pages 262-273, ISSN 0378-3820, <http://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.01.008>.

[28] Ramón Piloto-Rodríguez, Yisel Sánchez-Borroto, Eliezer Ahmed Melo-Espinosa, Sebastian Verhelst, Assessment of diesel engine performance when fueled with biodiesel from algae and microalgae: An overview, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Volume 69, March 2017, Pages 833-842, ISSN 1364-0321, <http://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.015>.

[29] Howard Passell, Harnoor Dhaliwal, Marissa Reno, Ben Wu, Ami Ben Amotz, Etai Ivry, Marcus Gay, Tom Czartoski, Lise Laurin, Nathan Ayer, Algae biodiesel life cycle assessment using current commercial data, Journal of Environmental Management, Volume 129, 15 November 2013, Pages 103-111, ISSN 0301-4797, <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.055>.

[30] Edgard Gnansounou, Jegannathan Kenthorai Raman, Life cycle assessment of algae biodiesel and its co-products, Applied Energy, Volume 161, 1 January 2016, Pages 300-308, ISSN 0306-2619, <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.10.043>.

[31] Simone P. Souza, Anand R. Gopal, Joaquim E.A. Seabra, Life cycle assessment of biofuels from an integrated Brazilian algae-sugarcane biorefinery, Energy, Volume 81, 1 March 2015, Pages 373-381, ISSN 0360-5442, <http://doi.org/10.1016/j.energy.2014.12.050>.

[32] Jia Yang, Ming Xu, Xuezhi Zhang, Qiang Hu, Milton Sommerfeld, Yongsheng Chen, Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance, *Bioresource Technology*, Volume 102, Issue 1, January 2011, Pages 159-165, ISSN 0960-8524, <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.017>.

[33] H.H. Khoo, C.Y. Koh, M.S. Shaik, P.N. Sharratt, Bioenergy co-products derived from microalgae biomass via thermochemical conversion – Life cycle energy balances and CO₂ emissions, *Bioresource Technology*, Volume 143, September 2013, Pages 298-307, ISSN 0960-8524, <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.004>.

[34] Atta Ajayebi, Edgard Gnansounou, Jegannathan Kenthorai Raman, Comparative life cycle assessment of biodiesel from algae and jatropha: A case study of India, *Bioresource Technology*, Volume 150, December 2013, Pages 429-437, ISSN 0960-8524, <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.118>.

[35] George Brownbridge, Pooya Azadi, Andrew Smallbone, Amit Bhave, Benjamin Taylor, Markus Kraft, The future viability of algae-derived biodiesel under economic and technical uncertainties, *Bioresource Technology*, Volume 151, January 2014, Pages 166-173, ISSN 0960-8524, <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.062>.

[36] Dongyan Mu, Roger Ruan, Min Addy, Sarah Mack, Paul Chen, Yong Zhou, Life cycle assessment and nutrient analysis of various processing pathways in algal biofuel production, *Bioresource Technology*, Volume 230, April 2017, Pages 33-42, ISSN 0960-8524, <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.108>.

[37] Maria Luisa N.M. Carneiro, Florian Pradelle, Sergio L. Braga, Marcos Sebastião P. Gomes, Ana Rosa F.A. Martins, Franck Turkovics, Renata N.C. Pradelle, Potential of biofuels from algae: Comparison with fossil fuels, ethanol and biodiesel in Europe and Brazil through life cycle assessment (LCA), *Renewable and*

Sustainable Energy Reviews, Volume 73, June 2017, Pages 632-653, ISSN 1364-0321, <http://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.152>.

[38] Cynthia Alcántara, Pedro A. García-Encina, Raúl Muñoz, Evaluation of mass and energy balances in the integrated microalgae growth-anaerobic digestion process, Chemical Engineering Journal, Volume 221, 1 April 2013, Pages 238-246, ISSN 1385-8947, <http://doi.org/10.1016/j.cej.2013.01.100>.

[39] Melissa Rickman, John Pellegrino, Jason Hock, Stephanie Shaw, Brice Freeman, Life-cycle and techno-economic analysis of utility-connected algae systems, Algal Research, Volume 2, Issue 1, January 2013, Pages 59-65, ISSN 2211-9264, <http://doi.org/10.1016/j.algal.2012.11.003>.

[40] Scott Grierson, Vladimir Strezov, Jonas Bengtsson, Life cycle assessment of a microalgae biomass cultivation, bio-oil extraction and pyrolysis processing regime, Algal Research, Volume 2, Issue 3, July 2013, Pages 299-311, ISSN 2211-9264, <http://doi.org/10.1016/j.algal.2013.04.004>.

[41] Robert M. Handler, David R. Shonnard, Tom N. Kalnes, F. Stephen Lupton, Life cycle assessment of algal biofuels: Influence of feedstock cultivation systems and conversion platforms, Algal Research, Volume 4, April 2014, Pages 105-115, ISSN 2211-9264, <http://doi.org/10.1016/j.algal.2013.12.001>.

[42] H.H. Khoo, C.Y. Koh, M.S. Shaik, P.N. Sharratt, Bioenergy co-products derived from microalgae biomass via thermochemical conversion – Life cycle energy balances and CO₂ emissions, Bioresource Technology, Volume 143, September 2013, Pages 298-307, ISSN 0960-8524, <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.004>.

[43] E. Gnansounou, A. Dauriat, J. Villegas, L. Panichelli, Life cycle assessment of biofuels: Energy and greenhouse gas balances, *Bioresource Technology*, Volume 100, Issue 21, November 2009, Pages 4919-4930, ISSN 0960-8524, <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.067>.

[44] Dan Zhou, Baoquan Qiao, Gen Li, Song Xue, Jianzhong Yin, Continuous production of biodiesel from microalgae by extraction coupling with transesterification under supercritical conditions, *Bioresource Technology*, Available online 27 April 2017, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.097>.

[45] Namita Pragma, Krishan K. Pandey, P.K. Sahoo, A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 24, August 2013, Pages 159-171, ISSN 1364-0321, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.03.034>.

[46] Jingcheng Wu, Md. Asraful Alam, Ying Pan, Dalong Huang, Zhongming Wang, Tiejun Wang, Enhanced extraction of lipids from microalgae with eco-friendly mixture of methanol and ethyl acetate for biodiesel production, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, Volume 71, February 2017, Pages 323-329, ISSN 1876-1070, <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.12.039>.

[47] Glacio S. Araujo, Leonardo J.B.L. Matos, Luciana R.B. Gonçalves, Fabiano A.N. Fernandes, Wladimir R.L. Farias, Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains, *Bioresource Technology*, Volume 102, Issue 8, April 2011, Pages 5248-5250, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.089>.

[48] Sergio D. Ríos, Joandiet Castañeda, Carles Torras, Xavier Farriol, Joan Salvadó, Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two

different paths: Screening studies toward biodiesel production, *Bioresource Technology*, Volume 133, April 2013, Pages 378-388, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.093>.

[50] Songmei Wang, Johnny Zhu, Lingmei Dai, Xuebing Zhao, Dehua Liu, Wei Du, A novel process on lipid extraction from microalgae for biodiesel production, *Energy*, Volume 115, Part 1, 15 November 2016, Pages 963-968, ISSN 0360-5442, <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.09.078>.