



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y
VINCULACIÓN CON LA COLECTIVIDAD**

CENTRO DE POSGRADOS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN ENERGÍAS RENOVABLES

IV PROMOCIÓN

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MAGISTER EN ENERGÍAS RENOVABLES**

**TEMA: “CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DEL CICLO DE
VIDA DEL BIODIESEL PRODUCIDO A PARTIR DEL CULTIVO
MIXTO DE MICROALGAS DURANTE EL TRATAMIENTO DE
AGUAS NEGRAS Y GRISES”**

AUTORA: YÁNEZ TORRES, PATRICIA IVONNE

DIRECTORA: KOCH KAISER, ALMA ROSEL

SANGOLQUÍ

2016



CENTRO DE POSGRADOS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN ENERGÍAS RENOVABLES
IV PROMOCIÓN

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DEL CICLO DE VIDA DEL BIODIESEL PRODUCIDO A PARTIR DEL CULTIVO MIXTO DE MICROALGAS DURANTE EL TRATAMIENTO DE AGUAS NEGRAS Y GRISES” realizado por la señorita PATRICIA IVONNE YANEZ TORRES, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita PATRICIA IVONNE YANEZ TORRES para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 13 de julio de 2016

Alma Rosel Koch Kaiser

ALMA ROSEL KOCH KAISER
DIRECTORA



CENTRO DE POSGRADOS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN ENERGÍAS RENOVABLES
IV PROMOCIÓN

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, PATRICIA IVONNE YANEZ TORRES, con cédula de identidad N° 1713799565, declaro que este trabajo de titulación “CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DEL CICLO DE VIDA DEL BIODIESEL PRODUCIDO A PARTIR DEL CULTIVO MIXTO DE MICROALGAS DURANTE EL TRATAMIENTO DE AGUAS NEGRAS Y GRISES” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 13 de julio de 2016



PATRICIA IVONNE YANEZ TORRES
C.C. 1713799565



**CENTRO DE POSGRADOS
PROGRAMA DE MAestrÍA EN ENERGÍAS RENOVABLES
IV PROMOCIÓN**

AUTORIZACIÓN

Yo, PATRICIA IVONNE YANEZ TORRES, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DEL CICLO DE VIDA DEL BIODIESEL PRODUCIDO A PARTIR DEL CULTIVO MIXTO DE MICROALGAS DURANTE EL TRATAMIENTO DE AGUAS NEGRAS Y GRISES” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 08 de agosto de 2016

PATRICIA IVONNE YANEZ TORRES

C.C. 1713799565

DEDICATORIA

A la mujer que ha sido el motor de mi vida y mi inspiración

A ti, Piedad Margarita

AGRADECIMIENTO

A Carlos Eduardo, Ingrid Giselle, Andrea Estefanía por su aliento, su ánimo y sus fuerzas.

A Sisa Rafaela por ser mi inspiración, la alegría de mi corazón.

A mis amigos que cerca o lejos no han dejado de estar ahí.

A mi equipo de trabajo por su valiosa colaboración.

A mi directora Almita Koch, Blanquita Naranjo, Dr. Electo Silva, Dr. Ever Morales, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo y por permitirme aprender tanto.

CONTENIDO

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
INDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPITULO I	
1. GENERALIDADES	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Estado del arte	2
1.3 Definición del problema	5
1.4 Objetivos	6
1.4.1 General	6
1.4.2 Específicos	7
1.5 Alcance	7
1.6 Justificación e importancia de la investigación	7
CAPITULO II	
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1 Biodiesel y generaciones de biocombustibles	10
2.2 Microalgas y sus aplicaciones energéticas	12
2.3 Conversión de aceites en combustible	14
2.4 Análisis del Ciclo de Vida (LCA)	15
CAPÍTULO III	
3. METODOLOGÍA	22
3.1 Cultivo	22
3.2 Selección de la técnica de recuperación de biomasa	24
3.3 Screening	26
3.4 Identificación	28
3.5 Extracción de ésteres	28
3.6 Transesterificación	31
3.7 Caracterización del biodiesel	33
3.8 Análisis del ciclo de vida	34
CAPÍTULO IV	
4. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN	37
4.1 Identificación	37
4.2 Técnica de recuperación de biomasa	39
4.3 Screening	39
4.3.1 Remoción de nutrientes	39
4.3.2 Concentración de biomasa	39
4.3.3 Perfil lipídico	40
4.4 Rendimiento	41
4.4.1 Lípidos	41

4.4.2 Reacción de transesterificación	41
4.5 Análisis de parámetros de calidad	41
4.6 Análisis del ciclo de vida	42
4.6.1 Análisis de los impactos.....	42
4.6.2 Resultados del inventario	43
4.6.3 Resultados del LCIA	48
CAPITULO V	50
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
5.1 Conclusiones.....	50
5.2 Recomendaciones	53
BIBLIOGRAFÍA	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Sistema de fotobiorreactores en Bahía Mobile - Alabama.....	4
Figura 2.	Temperatura media global de la tierra y el océano entre 1880 y 2010	5
Figura 3.	Procesos de conversión energética de la biomasa algal	13
Figura 4.	Reacción de transesterificación para obtención de biodiesel... ..	15
Figura 5.	Marco de referencia del análisis del ciclo de vida	16
Figura 6.	Ciclo de vida genérico de un producto	17
Figura 7.	Esquema de laguna de oxidación	22
Figura 8.	Forma y dimensiones de laguna de oxidación	23
Figura 9.	<i>Bulk tank</i> de 1000 L de capacidad adecuado como fotobiorreactor	24
Figura 10.	Recuperación de biomasa por flotación en la laguna de oxidación	25
Figura 11.	Sedimentadores	25
Figura 12.	Muestra de cultivo antes y después de la centrifugación	26
Figura 13.	Destrucción mecánica de biomasa seca en mortero.....	29
Figura 14.	Esquema de un sistema de extracción Soxhlet.....	30
Figura 15.	Separación de biodiesel y subproductos.....	32
Figura 16.	Diagrama del proceso de transesterificación	32
Figura 17.	Bomba calorimétrica adiabática	33
Figura 18.	Pesaje de muestra de combustible	34
Figura 19.	Límites del sistema para la obtención de biodiesel de microalgas cultivadas en aguas residuales	34
Figura 20.	Factores de normalización del método ReCiPe endpoint	35
Figura 21.	Entradas y salidas del sistema de producción de biodiesel en cultivo continuo	36
Figura 22.	Entradas y salidas del sistema de producción de biodiesel en cultivo batch	36
Figura 23.	Especies de <i>Tetrastrum</i> encontradas en el cultivo	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de microalgas identificadas.....	38
Tabla 2.	Evaluación de las técnicas de recuperación de biomasa	39
Tabla 3.	Perfil de ácidos grasos de biomasa microalgal	40
Tabla 4.	Parámetros de calidad analizados mezcla B10.....	42
Tabla 5.	Identificación de impactos ambientales.....	43
Tabla 6.	Resultados LCI para cultivo continuo	44
Tabla 7.	Resultados LCI para cultivo batch.....	46
Tabla 8.	LCIA para cultivo continuo.....	48
Tabla 9.	LCIA para cultivo batch	49

RESUMEN

El interés global por reducir los efectos del cambio climático mediante la creación de tecnologías más limpias y el uso de fuentes de energía alternativa ha sido el precursor de las investigaciones para la obtención de biocombustibles de fuentes renovables y de bajas emisiones. Con el presente trabajo se busca establecer un punto de partida para el desarrollo de tecnologías que permitan el aprovechamiento energético de cultivos de microalgas en aguas residuales. En base al concepto de los biocombustibles de tercera generación se pretende sustituir, para el caso del cultivo de microalgas, el uso de agua para consumo y productos fertilizantes. Para esto, se ha realizado el *screening* de las microalgas y el análisis del ciclo de vida del biodiesel obtenido a partir del cultivo mixto de microalgas que se desarrollan en forma espontánea en la laguna de oxidación que es parte de un sistema continuo de tratamiento de aguas negras y grises con una carga diaria de 2 m³. Se identificó que el género predominante en el cultivo es *Tetrastrum* y durante la fase de *screening* se determinó que los ácidos grasos producidos por estos microorganismos son 20,55% poliinsaturados, 12,33% saturados y 4,22% monoinsaturados. Se obtuvo que la tasa de remoción de nitrógeno es del 57,14% y de fósforo, el 33,33%. El rendimiento de biomasa estuvo en el orden de 10,7 a 337,11 g/m³ en sistema continuo y 529,4g/m³ en cultivo en batch. El rendimiento de aceite a partir de biomasa seca fue de 4,25% lo que resulta en 0,041 g de biodiesel/ g biomasa. Finalmente, del análisis del ciclo de vida se puede concluir que en el aspecto técnico y ambiental el procedimiento para la producción del biocombustible propuesto en el presente trabajo es aplicable. Sin embargo es importante estudiar los mecanismos para aumentar el rendimiento de biomasa en al menos 7 veces sin que esto implique el consumo de otros recursos para que resulte económicamente viable.

Palabras clave:

- **MICROALGAS**
- **BIODIESEL**
- **AGUAS RESIDUALES**
- **ANÁLISIS DEL CICLO DE VIDA**

ABSTRACT

Global interest in reducing the climate change effects through the creation of new and cleaner technologies and use of alternative energy resources has been the forerunner of research for the production of low emission biofuels from renewable resources. The aim of this job is to establish the starting point for the development of technologies for energy exploitation of microalgae cultures in domestic sewages from oil industry. Based on fourth generation biofuels concepts, the purpose is to replace the use of fresh water and commercial fertilizer for cultivation of microalgae. Therefore, the microalgae screening and Life Cycle Assessment of the system production was carried out. Microalgae grow spontaneously in a mixed culture within an oxidation pond which is part of a domestic sewage treatment continuous system with a daily flow of 2m³. *Tetrastrum* was found to be the predominant genus in the culture. Result of the screening, it was determined that the fatty acids produced by this species are polyunsaturated 20.55%, saturated 12.33% and 4.22% monounsaturated. Biomass yield was from 10.7 to 337.11 g/m³ in continuous system and 529.4 g/m³ for batch culture. Algae oil yield from dried biomass was 4.25% or 0.041g biodiesel/g biomass. Results of LCA show that the proposed procedure for biodiesel production is technical and environmentally applicable as long as alternative mechanisms be studied to enhance biomass in at least seven fold yield without involving consume of other resources, so it would be economically sustainable.

Key words:

- **MICROALGAE**
- **BIODIESEL**
- **SEWAGE**
- **LIFE CYCLE ASSESSMENT**

CAPITULO I

1. GENERALIDADES

1.1 Antecedentes

La Empresa Eléctrica Quito S.A. inauguró en el 2013 el primer laboratorio de biotecnología con fines energéticos, específicamente para la producción a escala piloto de biodiesel a partir de microalgas cultivadas en fotobiorreactores (EEQ, 2014). Además de esto, no existe en el país un desarrollo importante sobre la producción de biocombustibles a partir de microorganismos fotosintéticos.

La tasa de crecimiento de las microalgas es tan alta que pueden duplicar su población en menos de 24 horas y su producción de biomasa a escala de laboratorio puede ser hasta 30 veces mayor a los valores en la agricultura (Adey, Kangas, & Mulbry, 2011) lo que sugiere, que bajo las condiciones adecuadas el rendimiento en la producción de lípidos puede ser alto también. Según Chisti (2007) se puede producir a escala piloto entre 7500 y 22500 L de aceite por hectárea por año siendo para el caso de la palma africana o la soya entre 75 y 975 L. Asimismo, las microalgas son capaces de crecer en casi cualquier ambiente, desde agua dulce pasando por aguas residuales, hasta agua de mar. Otra ventaja que presentan es que su fuente de carbono proviene del CO₂ del ambiente (Hall & Benemann, 2011). Es así que la producción de biodiesel a partir de estos microorganismos resulta sustentable y sostenible cuando los cultivos se desarrollan en aguas residuales domésticas e industriales, ya que pueden considerarse como fuentes renovables tanto de agua como de nutrientes, a la vez de que existe un “secuestro de CO₂” del ambiente durante el proceso.

1.2 Estado del arte

Incluso antes de la era petrolera, ya existían motores de combustión que funcionaban con aceites vegetales y grasas animales.

La crisis energética llevó a científicos alemanes a extraer lípidos a partir de diatomeas durante la Segunda Guerra Mundial. A mediados de los años 80 se iniciaron estudios sobre microalgas como fuente de ácidos grasos para producción de combustibles líquidos (Cohen, Norman, & Heimer, 1995).

Gran parte de los estudios se han enfocado en la transesterificación de aceites vírgenes de soya, girasol o colza mediante catálisis alcalina. Freedman *et al.* (1984) investigaron cómo la relación molar entre el aceite y el alcohol, el tipo de catalizador (ácido vs. base), la temperatura y grado de refinamiento del aceite influyen en el rendimiento de biodiesel, obteniendo un 98% utilizando un catalizador alcalino. Es por esto que el biodiesel que se produce actualmente es mediante transesterificación catalizada por KOH o NaOH lo cual permite una rápida velocidad de reacción (Freedman, Pryde, & Mounts, 1984).

Otro tema estudiado es la biocatálisis mediante el uso de enzimas sintetizadas por microorganismos del género *Pseudomonas*, *Candida* entre otros, a través de diversas rutas metabólicas para la síntesis de biodiesel a partir de aceites de canola, soya, ricino y oliva. Estas investigaciones fueron desarrolladas por Iso *et al.* (2001), Chen & Wu (2003), Soumanou & Bornscheuer (2003), Zu *et al.* (2004), Deng *et al.* (2005), Nureddini *et al.* (2005), Sanchez & Vasudevan (2006) y otros.

El aceite de soya ha sido el más usado en la elaboración de biodiesel. En el año 2002 la producción de soya en Estados Unidos representó el 40% de la producción mundial (Vasundevan & Briggs, 2008). Con el tiempo se ha determinado que este aceite al contener ácidos grasos insaturados posee inestabilidad oxidativa y baja fluidez en climas fríos lo cual ha limitado su aplicabilidad. Es por esto que utilizando herramientas biotecnológicas se ha estudiado la forma de modificar el perfil de ácidos grasos para mejorar sus características (Kinney & Clemente, 2005).

Posterior al uso de aceites comestibles se estudió el uso de aceites no comestibles y de desecho. De estos últimos se encontró que la presencia de ácidos grasos libres y agua derivaban en la obtención de jabón en presencia de un catalizador alcalino lo cual hace necesario un proceso de lavado adicional para remover estas impurezas por lo que se determinó que la catálisis ácida era la más adecuada a pesar de su bajo rendimiento y mayor relación molar alcohol:aceite (Canakci & Van Gerpen, 1999). Por otro lado, la transesterificación de aceites no comestibles provenientes de *Ricinus comunis*, *Jatropha curcas*, *Pongamia pinnata*, etc. ha sido estudiada, tal es el caso de las publicaciones de Tiwari *et al.* (2007) y Karmee & Chadha (2005).

El desarrollo del proceso de producción del biodiesel a partir de aceite de algas es el foco de las investigaciones actuales. Esto se debe a que resulta de gran interés la alta tasa fotosintética (11,6%) que poseen estos organismos, que se traduce en una captura de CO₂ atmosférica más eficiente que en las especies vegetales (2%) sin embargo, es necesario continuar investigando formas de producción a escala industrial más económicas y con mayor rendimiento de aceite (Vasundevan & Briggs, 2008). El cultivo de microalgas en aguas residuales se ha visto como una alternativa económica y de mayor impacto ambiental positivo. Ya en 1998 Sheehan *et al.* determinaron que la manera más práctica de producir biodiesel es mediante este tipo de cultivo. El crecimiento de algas en las lagunas de estabilización contribuye a su tratamiento ya que aportan con oxígeno disuelto y asimilan nutrientes (Fulke, 2013).

La empresa estadounidense Algae Systems LLC posee una unidad de fotobiorreactores (PBR) en una planta de tratamiento de aguas residuales en Daphne – Alabama en un área aproximada de 2000 m² en unidades flotantes sobre la bahía Mobile (Figura 1). Allí además de producir la materia prima para biocombustibles se trata entre 150 y 230 m³ de aguas residuales por día. No existe un control sobre las cepas que se cultivan ya que varían de acuerdo a las estaciones y depredación ecológica y de esta forma se mantiene la estabilidad del sistema (Kotrba, 2015).



Figura 1. Sistema de fotobiorreactores en Bahía Mobile - Alabama
(Fuente: Biodiesel Magazine, 2015)

En cuanto al ámbito nacional, en Ecuador, el 17 de septiembre de 2012 se publicó el Decreto Ejecutivo N°1303 cuyos Artículos N° 1, 2 y 3 citan: *“Declárese de interés nacional el desarrollo de biocombustibles en el país como medio para el impulso del fomento agrícola...”*; *“El combustible diésel premium que se utilice en el país deberá contener biodiesel de origen vegetal de producción nacional, para uso en motes diésel.”* y *“... la distribución y comercialización de la mezcla de diésel base con biodiesel de producción nacional, se aplicará en todo el territorio nacional en una proporción del 5% de biodiesel (B5), de acuerdo con los requisitos técnicos que determine la Agencia de Regulación y Control Hidrocarburífero”* y la Primera Disposición General indica: *“El combustible diésel destinado al sector automotriz que se utilice en el país deberá ir incrementando progresivamente el porcentaje de biodiesel de origen vegetal de producción nacional, hasta llegar a un 10% (B10)...”*. Pese a esto, el desarrollo industrial del biodiesel de origen vegetal en el país no ha sido relevante por lo cual hasta la fecha los artículos y disposición citados, no se han aplicado, mucho de esto se debe a drástica reducción de los precios del petróleo lo cual deja al Estado sin los fondos para realizar los estudios y además resta competitividad a los costos de producción de biodiesel.

1.3 Definición del problema

La crisis energética mundial es debida a la reducción de las fuentes no renovables de combustibles fósiles. El uso de combustibles a base de petróleo resulta insostenible por el agotamiento de los yacimientos y la gran contaminación ambiental a la que contribuyen (Khan, Rashmi, Hussain, Prasad, & Banerjee, 2009).

Cada año se liberan a la atmósfera alrededor de 1000 toneladas métricas de CO₂ per cápita lo cual ha provocado un constante y creciente aumento de la temperatura global en el planeta (Figura 2). En el caso de Ecuador fueron 2,4 toneladas en el 2011, que provienen de la fabricación de cemento, de la quema de combustibles fósiles sólidos, líquidos y gaseosos (Banco Mundial, 2016).

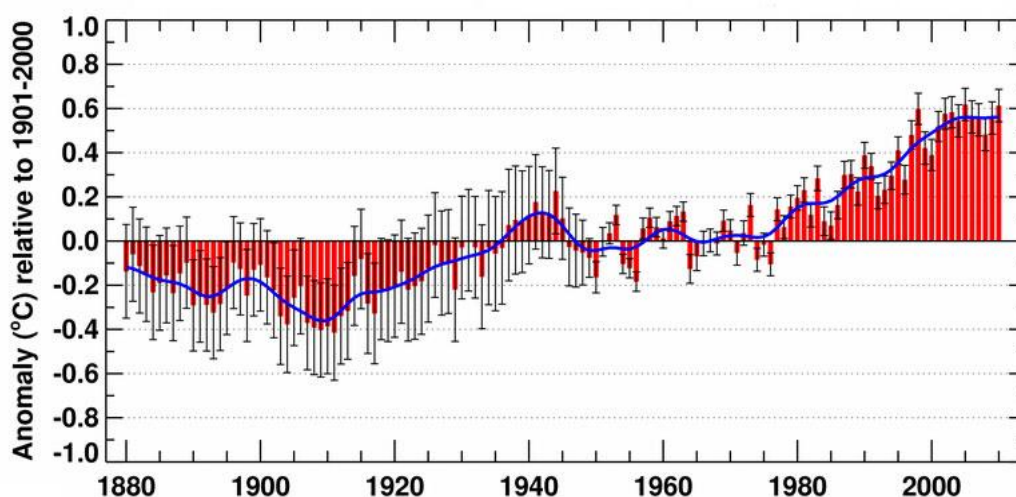


Figura 2. Temperatura media global de la tierra y el océano entre 1880 y 2010

(Fuente: NCDC¹/NESDIS²/NOAA³, 2010)

Aproximadamente el 60% del consumo global de petróleo corresponde al sector del transporte terrestre, en el caso de Ecuador para el año 2010 fue del 86% para el parque automotor del cual, el 45,7% corresponde a

¹ National Climatic Data Center

² National Environmental Satellite, Data, and Information Service

³ National Oceanic and Atmospheric Administration

vehículos pesados que en mayor proporción utiliza el diésel como combustible. Adicionalmente, el diésel que se produce en el país tiene una concentración de 462 ppm de azufre, la más alta entre los países de la región siendo esto un problema adicional al de las emisiones, por el daño que causa a los motores de combustión (Izurieta, Corral, & Guayanlema, 2013).

La producción de aguas residuales domésticas e industriales es permanente y creciente conforme aumenta la población y el grado de industrialización de una región. Muchos gobiernos locales en el Ecuador tienen ordenanzas que regulan la emisión de aguas residuales en la industria pero poco se ve en el sector urbano. Los vertidos son descargados en quebradas y ríos ocasionando un impacto ambiental negativo importante. Grandes ciudades como Quito y Guayaquil no tienen plantas de tratamiento bien establecidas, apenas se ha iniciado con proyectos piloto y de diseño que abarcan a ciertos sectores (EPMAPS, 2013), (Municipio de Guayaquil, 2015). En este contexto, resulta de interés local y nacional el desarrollo de tecnologías para el tratamiento de efluentes con fines de saneamiento ambiental de las fuentes hídricas.

Se ha demostrado que las microalgas y cianobacterias utilizan la energía solar para la remoción de nutrientes (nitrógeno y fósforo) de las aguas eutrofizadas o degradadas a la vez que liberan oxígeno (Adey, Kangas, & Mulbry, 2011). La obtención de biocombustibles a partir de la biomasa cultivada en un sistema de tratamiento de agua es un valor agregado al proceso, haciéndolo autosustentable y económico.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Caracterizar y realizar el análisis del ciclo de vida del biodiesel obtenido a partir del cultivo mixto de microalgas durante el tratamiento de aguas negras y grises.

1.4.2 Específicos

- Recuperar la biomasa de microorganismos fotosintéticos que crecen de manera espontánea en la laguna de oxidación del sistema de tratamiento de aguas residuales del Centro de Investigación de Tecnologías Ambientales (CITGAV) de PETROAMAZONAS EP.
- Realizar la identificación morfológica de las microalgas presentes en el cultivo.
- Determinar el rendimiento de biomasa en g/m³ de agua en tratamiento.
- Determinar el perfil lipídico de la biomasa cultivada.
- Extraer los ácidos grasos de la biomasa microalgal y realizar la transesterificación.
- Determinar la calidad del biocombustible obtenido.
- Realizar el Análisis del Ciclo de Vida del biodiesel en función del proceso específico realizado y en base a éste determinar la factibilidad del escalamiento del proceso.

1.5 Alcance

En el marco de los biocombustibles de tercera generación se ha estudiado a escala de laboratorio la producción de biodiesel a partir del aceite extraído de microalgas cultivadas en aguas residuales domésticas con el fin de determinar la escalabilidad del proceso en función de la energía obtenida, el rendimiento y la viabilidad técnica, ambiental y económica.

1.6 Justificación e importancia de la investigación

Según registros de la Agencia Espacial Norte Americana (NASA) y la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA), el año 2015 fue el más caluroso desde 1880 cuando se tienen los primeros registros, lo cual lleva a pensar seriamente en que resulta imperante tomar acciones

definitivas para cambiar la matriz energética de tal forma que se pueda reducir la cantidad de gases de efecto invernadero (GEI), en especial el CO₂. Los gases de efecto invernadero se producen principalmente por las actividades antropogénicas, por lo tanto, es necesario implementar esquemas de eficiencia energética, el uso de energías alternativas y el establecimiento de sistemas que absorban el CO₂ liberado tales como los “sumideros de carbono” que corresponden al cultivo de organismos fotosintéticos tales como plantas, algas y ciertas bacterias (Bravo, 2006).

En lo que respecta a las energías alternativas, la reducción de las emisiones es la principal meta. En el balance de masa de los biocombustibles, es necesario que la cantidad de CO₂ producido por la combustión de los mismos sea menor o igual a la cantidad de CO₂ consumida por la materia prima durante la fotosíntesis; es el caso del biodiesel o el bioetanol (Bravo, 2006).

La producción industrial de biocombustibles actualmente involucra el uso de extensas áreas de tierras y grandes volúmenes de agua para consumo, como es el caso de los cultivos energéticos de caña de azúcar, palma africana, colza, maíz, girasol, entre otros. El costo del petróleo es además el mayor condicionante sobre la competitividad respecto al costo de producción de los biocombustibles (Avinash, Subramaniam, & Murugesan, 2014).

Otro aspecto relevante es el político, ya que la influencia de los países productores ocasiona que el precio del petróleo varíe constantemente lo cual ocasiona incertidumbre económica entre los países cuya economía se fundamenta en la producción del hidrocarburo (Pardal, 2012).

Aparentemente no existe un sustituto del petróleo que se pueda producir en las cantidades que el mundo demanda (Hall & Benemann, 2011). Sin embargo, el biodiesel es de especial interés ya que puede utilizarse para reemplazar al diésel fósil sin necesidad de realizar cambios en los motores y con una ventaja tecnológica adicional, ya que no requiere de un tratamiento para la reducción de sulfuros (Demirbas & Demirbas, 2010).

Los avances tecnológicos y la búsqueda por fuentes renovables para la producción del biodiesel han encaminado los estudios hacia las

microalgas. Tales microorganismos acuáticos tienen una tasa fotosintética, y contenido de lípidos incluso mayor que las plantas terrestres (Samorì, et al., 2013) (Whalen, Willis, & Seefeldt, 2011).

Tanto las microalgas como las cianobacterias fueron los primeros organismos vivos que habitaron la Tierra, en un mundo en el cual la atmósfera llena de CO₂ no permitía otras formas de vida. Ellas tomaron ese CO₂ y lo transformaron en O₂, lo cual dio lugar al apareamiento de nuevas especies. Es así que muchos consideran a las microalgas como los organismos capaces de combatir el calentamiento global (Gouveia, 2011).

El costo que representa cultivar microalgas con medios artificiales justifica plenamente el uso de medios de cultivo complejos de origen natural y cuya composición no es constante ni determinada (Sydney, et al., 2011).

La producción de biocombustible a partir de microalgas se vuelve económicamente viable y comercialmente atractiva al combinarla con sistemas de tratamiento de efluentes y obtención simultánea de balanceados para ganado u otros subproductos de valor nutricional. Actualmente a nivel mundial, las microalgas se producen en estanques agitados por paletas que se accionan mediante un motor eléctrico. Esta forma de cultivo se realiza principalmente con fines de producción de suplementos nutricionales. Por otro lado, en Estados Unidos por ejemplo, las aguas municipales son tratadas en sistemas de lagunas pero, por lo general las microalgas que crecen en dichos sistemas no son cosechadas o al menos no con fines energéticos (Hall & Benemann, 2011).

En un análisis de ciclo de vida realizado por Clarens *et al.* (2010) se encontró que los sistemas para obtener energía a partir de microalgas son más favorables cuando se utilizan los nutrientes presentes en los efluentes que los fertilizantes comerciales.

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Biodiesel y generaciones de biocombustibles

Por el año 1890, Rudolph Diesel desarrolló un motor con un sistema de combustión basado en el uso de aceite de maní, conocido como “ciclo diésel”. Sin embargo, con la creciente explotación de petróleo, su bajo costo y su fácil refinación, el uso de aceites vegetales y grasas animales fue desplazado (Wang, et al., 2006) en (Avinash, Subramaniam, & Murugesan, 2014).

El biodiesel es un biocombustible de origen animal o vegetal obtenido a partir de aceites y grasas mediante un proceso químico conocido como transesterificación, constituyendo así un compuesto monoalquil éster de ácidos grasos. La condición de renovable del biodiesel, viene dada por el origen de la materia prima que se use para su producción (De Boer, Moheimani, Borowitzka, & Bahri, 2012).

Esta mezcla de metil ésteres de ácidos grasos de cadena larga tales como los ácidos láurico, palmítico, esteárico, oleico, etc. se encuentran en la palma africana o palma aceitera, aceite de girasol, aceite de soya, canola, entre otros. De igual forma, el biodiesel puede obtenerse de grasas animales y aceite de cocina usado (Ghasemi, et al., 2012).

La evolución del biodiesel junto con los biocombustibles en general involucra a cuatro generaciones. El biodiesel de primera generación (FGB) utiliza tecnologías convencionales para producir el combustible a partir de aceites vegetales (girasol, colza, palma aceitera) o animales (Leite, Abdelaziz, & Hallenbeck, 2013).

El biodiesel de segunda generación, es considerado como biocombustible avanzado. Es producido a partir de cultivos no alimentarios y se los conoce como los combustibles renovables o “verdes”, que primera instancia se lo combinaba con diésel de petróleo para obtener un combustible con alto número de cetano y sin contenido de oxígeno (Demirbas & Demirbas, 2010).

La explotación de los diversos recursos de biomasa para la obtención de los biocombustibles de primera y segunda generación han tenido como consecuencia una gran escasez de biomasa sin la debida compensación ocasionando disminución de la biodiversidad y deforestación (Behera, et al., 2015).

La tercera generación de biocombustibles involucra cambios tecnológicos que permiten obtener la materia prima de tierras no cultivables casi en cualquier lugar donde exista suficiente CO₂, radiación solar y agua. Este tipo de combustibles se derivan de la biomasa algal y fueron desarrollados para contrarrestar las desventajas de los biocombustibles de primera y segunda generación ya que la biomasa algal no compite con el cultivo y la producción de alimentos. Las investigaciones sobre la biomasa algal y su modificación genética, se han encaminado al desarrollo de procesos de conversión para obtención de biodiesel, bioetanol, butanol, biogás, biohidrógeno y otros subproductos de valor energético. Su bajo contenido de hemicelulosa y lignina permite una mayor eficiencia de la fermentación (Behera, et al., 2015).

El aceite algal, o biodiesel de tercera generación, tiene un rendimiento más alto respecto a los cultivos energéticos y con un bajo requerimiento de materia prima (Arias, Martínez, & Cañizares, 2013). Según el Departamento de Energía de los Estados Unidos el rendimiento de estos cultivos puede ser hasta 10 veces mayor respecto a los biocombustibles de segunda generación, lo que significa que en el 0,42% del territorio estadounidense se podría producir la cantidad de biocombustible necesaria para cubrir la demanda energética del país (Biofuel.org.uk, 2010). Sin embargo el requerimiento de nutrientes y la adaptación de los cultivos implica altos costos de capital (Biofuels digest, 2010)

Finalmente, la cuarta generación de biocombustibles también puede producirse en tierras no cultivables sin requerir la destrucción de la biomasa. Dentro de este grupo se encuentran los electrocombustibles y los combustibles de sustitución como la biogasolina que es obtenida a partir de aceites vegetales y biodiesel (Ghasemi, et al., 2012). El principal propósito del desarrollo de estos sistemas de producción es mejorar la captura de carbono de tal forma que el CO₂ que consumen los cultivos de

biomasa sea mayor al liberado por la combustión. Sobre esto se han modificado especies vegetales que captura carbono y lo traslocan hacia hojas, tallos o tronco; esta biomasa es convertida en combustible mediante técnicas de segunda generación. El dióxido de carbono (de emisiones históricas incluso) se captura antes, durante o después del proceso de bioconversión mediante “precombustión”, combustión oxigenada o “postcombustión”, de esta forma es geosequestrado y almacenado en yacimientos de petróleo, gas o carbón agotados y acuíferos salinos donde permanecería hasta por miles de años; este concepto es conocido como Bioenergía con Almacenamiento de Carbono (BECS). De esta forma se obtiene un combustible sintético ultra-limpio (Biopact, 2007).

2.2 Microalgas y sus aplicaciones energéticas

Las microalgas, algas fitoplanctónicas o “carbón verde”, son organismos microscópicos fotosintéticos que viven en suspensión en la zona eutrófica de una columna de agua. Son de rápido crecimiento y forman parte esencial de la cadena trófica de los ambientes acuáticos (Pacheco, 2013). Como cualquier planta, para su supervivencia necesitan de CO₂, luz y agua a partir de los cuales pueden producir biomasa y liberar oxígeno (Hakeem, Jawaid, & Rashid, 2014). Producen además una variedad de metabolitos que son aprovechados en nutrición humana, alimentos para animales, control de contaminación, biofertilizantes y tratamiento de efluentes.

Las microalgas se encuentran clasificadas en cuatro tipos: diatomeas, algas verdes, cianobacterias y algas doradas que se organizan como fitoplancton y filamentosas. Al igual que las plantas mayores, producen y almacenan aceites en forma de triacilgliceroles (TAG) y en comparación con las algas multicelulares y especies vegetales superiores, tienen la capacidad de almacenar mayor proporción de lípidos. De alrededor de 50.000 especies de microalgas que existen en el mundo, cerca de 30.000 han sido utilizadas para distintas investigaciones (Brennan, 2010).

Inicialmente, la masificación de estos microorganismos fotosintéticos se realizaba en medios de cultivo especialmente formulados y

suplementados con fertilizantes y haciendo uso de agua dulce (Khozin-Goldberg & Cohen, 2006) lo cual significaba un impacto ambiental negativo sobre los cuerpos hídricos. Se conoce sin embargo que muchas especies de microalgas tienden a incrementar la acumulación de lípidos y carbohidratos ante el déficit de nitrógeno en el medio pero a costa de una reducción en la tasa de crecimiento (Converti, Casazza, Ortiz, Perego, & Del Borghi, 2009).

La producción de biocombustibles de microalgas puede realizarse a partir extractos como en el caso de la síntesis de biodiesel; por procesamiento de biomasa para obtención de biogás por digestión anaerobia, biogasolina a través de pirólisis, gas de síntesis mediante gasificación y biohidrógeno; además de la producción directa de bioetanol (o algenol) y alcanos (Gouveia, 2011). Estas tecnologías de conversión se organizan en tres categorías: bioquímica, química y termoquímica (Figura 3) (Behera, et al., 2015).

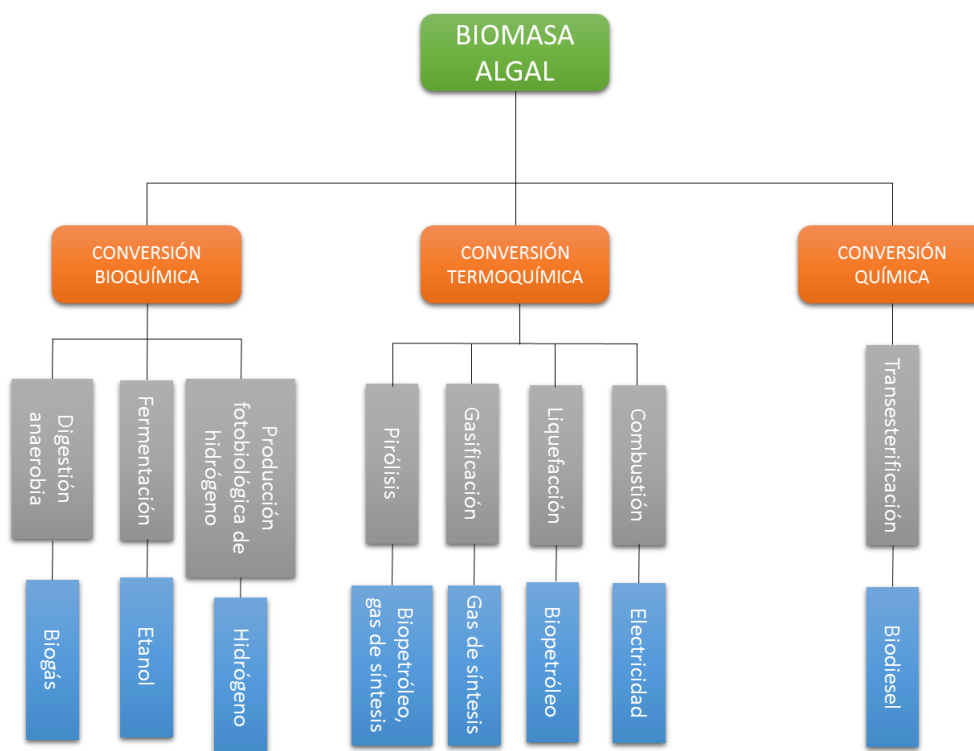


Figura 3. Procesos de conversión energética de la biomasa algal (Adaptado de Behera et al., 2015)

De toda esta gama de aplicaciones, la más desarrollada hasta el momento a nivel mundial es la producción de biodiesel. La posibilidad de cultivar a lo largo de todo el año, la alta tasa metabólica y de crecimiento, la excelente tolerancia a grandes concentraciones de dióxido de carbono, el bajo consumo de agua, el cultivo libre de pesticidas o herbicidas y la versatilidad en el cultivo puede resultar económica y científicamente atractivo. Sin embargo debe considerarse ciertas desventajas como son los altos costos de cultivo en comparación con cultivos tradicionales, el costo de energía demandada puede ser entre 20 y 30% del costo de producción. Es así que resulta importante determinar hasta qué punto la producción de biodiesel resulta ambientalmente viable considerando desde la producción de biomasa hasta la combustión del biodiesel (Lardon, Hélias, Sialve, Steyer, & Bernard, 2009).

2.3 Conversión de aceites en combustible

A partir de los años 80 inició el interés por el uso de aceites de origen vegetal como un combustible alternativo, sin embargo se presentaron problemas en los motores al usarlos directamente debido sobre todo a la alta viscosidad y a la cantidad de depósitos carbonáceos que se formaban en los cilindros e inyectores por lo cual se optó por una conversión química de los aceites mediante un proceso conocido como transesterificación (Avinash, Subramaniam, & Murugesan, 2014).

La transesterificación consiste en la reacción de los ácidos grasos con un alcohol que puede ser metanol o etanol que se aplica en exceso para aumentar el rendimiento de la reacción, en presencia de un catalizador como el hidróxido de sodio o el hidróxido de potasio para formar biodiesel, metil o etil ésteres y glicerina (Figura 4). Esta reacción permite reducir la viscosidad y punto de flama de los lípidos vegetales (Cantero & Faber, 2010).

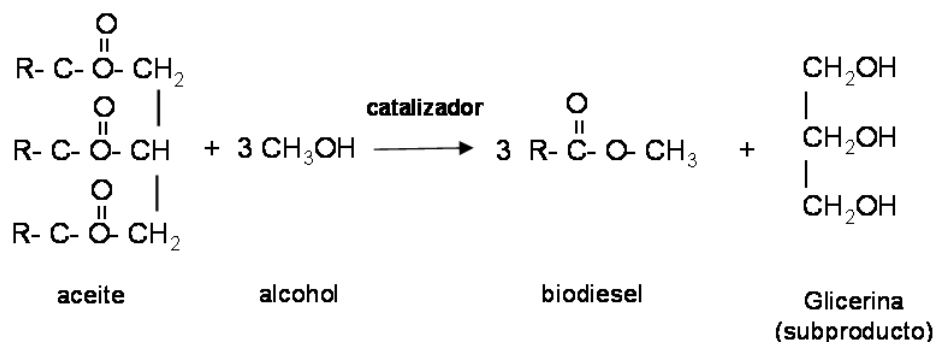


Figura 4. Reacción de transesterificación para obtención de biodiesel

Los aceites vegetales con cadenas de entre 16 y 22 átomos de carbono por lo general se encuentran en forma de triacilgliceroles (TAG) que posterior a una transesterificación forman metil ésteres de ácidos grasos (FAME) que son precursores del biodiesel, y glicerina que viene a ser el subproducto de la reacción, obtenido en una relación de 1kg de glicerol por cada 9 kg de biodiesel (Dasari, Kiatsimkul, Sutterlin, & Suppes, 2005) (Demirbas & Demirbas, 2010).

El biodiesel puede usarse directamente o en mezclas, las más utilizadas son del 5%, 10% y 25% dependiendo del motor. La calidad del biocombustible es determinada en función de las de las normas EN 14214 o ASTM D6751 donde se incluyen características tales como densidad, viscosidad, punto de nube, índice de yodo, índice ácido, volatilidad y calor bruto de combustión (Anexo 3). En comparación con el diésel fósil produce ligeramente menos potencia y torque, y mayor consumo pero entre sus ventajas se encuentra la eficiencia de combustión superior (HHV), número de cetano más alto, bajo contenido de sulfuros y compuestos aromáticos, biodegradabilidad y renovabilidad (Zhang, Dub, McLean, & Kates, 2003).

2.4 Análisis del Ciclo de Vida (LCA)

Para medir la sostenibilidad ambiental, económica y social de un bien o servicio es necesario aplicar herramientas y metodologías que permitan una evaluación del conjunto de impactos ambientales que se encuentran relacionados con los productos (Rebitzer, et al., 2004).

Cada producto tiene una “vida”, inicia como un proyecto, desarrollo del producto, seguido de la extracción de recursos, producción, consumo y termina con la recolección, reciclaje, reutilización y tratamiento de residuos (Silva, 2005).

El Análisis del Ciclo de Vida o LCA por sus siglas en inglés, es un método utilizado para determinar cómo una actividad afecta al ambiente a partir de la preocupación que existe sobre el agotamiento de los recursos naturales y la degradación progresiva de la calidad ambiental (EPA - SAIC, 2006). Mediante esta herramienta se puede identificar y cuantificar la energía y materiales utilizados así como liberados al ambiente y sus potenciales impactos a lo largo de todo el ciclo de vida en lo que se conoce como “de la cuna a la tumba” (Zbicinski, Stavenuiter, Kozlowska, & van de Coevering, 2006). Esta metodología, se encuentra enmarcada en las normas internacionales ISO 14000 (Figura 5) tales como:

- ISO 14040, principios y marco de referencia
- ISO 14041, metas y alcance de la definición y análisis de inventario
- ISO 14042, análisis del impacto del ciclo de vida
- ISO 14043, interpretación del ciclo de vida

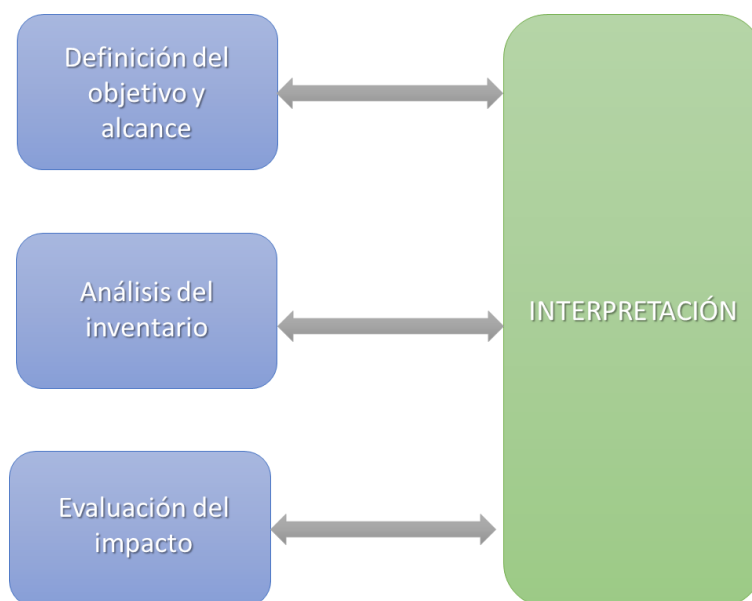


Figura 5. Marco de referencia del análisis del ciclo de vida
(Adaptado de Silva, 2015)

Los aspectos que se evalúan van desde la extracción de las materias primas, las manufactura, el consumo de recursos, el uso del suelo, transporte e incluso el manejo que se le da a los residuos y al producto al final de su vida útil ya que en cada uno de estas fases se producen impactos ambientales que se relacionan con el cambio climático, la afectación a la capa de ozono, eutrofización, daños al ecosistema, efectos en la salud humana, uso del agua, ruido, etc. (Figura 6). No se incluye en el análisis las fases de diseño e implementación, ya que se considera que no contribuyen de forma significativa aunque influyen en otras fases del ciclo de vida (Rebitzer, et al., 2004).

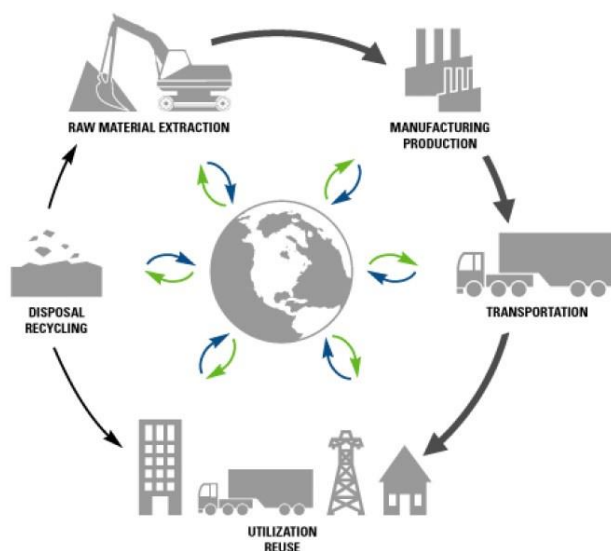


Figura 6. Ciclo de vida genérico de un producto

(NIST⁴, 2008 [<http://www.mel.nist.gov/programs/pbookweb.pdf>])

Existen dos categorías que definen la meta que persigue un LCA; el LCA atribucional que describe el sistema del producto y su intercambio con el ambiente y el LCA consecuente que describe como suceden los intercambios con el ambiente de un sistema como consecuencia de una modificación realizada al mismo. Por tanto se debe definir el alcance del LCA para un correcto modelamiento (EPA - SAIC, 2006).

Los resultados de un LCA proveen información que resulta útil para prever impactos y mejorar los procesos productivos a fin de que los

⁴ National Institution of Standards and Technology's Manufacturing Engineering, EEUU

mismos puedan considerarse como ambientalmente seguros y sostenibles. Actualmente existe una variedad de *software* que se utiliza como herramienta para realizar el análisis tales como GaBi, SimaPro, Umberto, Bees, OpenLCA, entre otros.

De acuerdo con Rebitzer *et al.* (2004), existen varios conceptos asociados al LCA que es importante conocer para el uso de ésta herramienta que son:

Producto del sistema

Comprende el ciclo de vida completo, incluidos los flujos de materia y energía dentro de los límites establecidos y en relación a la unidad funcional.

Unidad funcional

Es la base que permite realizar análisis y comparaciones con servicios o productos alternativos (EPA - SAIC, 2006).

Inventario del ciclo de vida

Se refiere a la tabulación, compilación y análisis preliminar de los intercambios ambientales como emisiones, consumo de recursos, etc. que pueden ocurrir en varios sitios y regiones, en emisiones fraccionadas del total en cualquier sitio, en distintos tiempos (producción y disposición no ocurren en el mismo momento) y durante varios periodos de tiempo (generación continua de residuos) por unidad funcional.

Análisis del impacto del ciclo de vida (LCIA)

Permite a través de la identificación cálculo e interpretación de indicadores o factores, obtener un inventario de todos los potenciales impactos ambientales de la extracción de los recursos y del manejo de los residuos. Estos indicadores se encuentran agrupados en categorías y varían según el método de análisis que se utilice, las categorías más comunes se describen a continuación (Acero, Rodríguez, & Citroth, 2015):

Acidificación

Es provocada por la emisión antropogénica de gases como SO_x y NO_x que al reaccionar con el agua de la atmósfera, produce la llamada “lluvia ácida”, la cual provoca un deterioro de los ecosistemas en mayor o menor grado. Está expresado en kg SO₂ equivalente.

Cambio climático

Se refiere a la modificación histórica del clima a nivel regional y global relacionada con el impacto humano sobre la Tierra, especialmente debido a la liberación de gases de efecto invernadero (GEI). Los factores se expresan como *Global Warming Potential* en un escenario de un período de tiempo definido, por lo general de 100 años (GWP100) y cuya unidad es kg CO₂ equivalente.

Agotamiento de recursos abióticos

Los recursos abióticos son aquellos que se encuentran junto a los seres vivos formando parte del Ecosistema, los mismos pueden ser combustibles fósiles, agua, minerales, metales, etc. La importancia del agotamiento de los mismos radica en el aspecto económico y corresponde al costo del daño causado por la falta del recurso no-renovable. Dependiendo del modelo, las unidades en las que se expresa este factor pueden ser: kg de antimonio equivalente, kg de minerales, MJ de combustibles fósiles o m³ de agua consumida.

Ecotoxicidad

Conocida también como toxicidad ambiental, representa a los efectos tóxicos producidos por agentes físicos y químicos en los ecosistemas de agua dulce, marinos y terrestres. Se encuentra expresada en kg 1,4-diclorobenceno equivalente, fracción de especies potencialmente extintas (PDF) o fracción de especies potencialmente afectadas (PAF).

Eutrofización

Es un proceso natural o antropogénico de enriquecimiento del agua con nutrientes (nitrógeno y fósforo) de tal forma que no pueden ser mineralizados causando una disminución del oxígeno por la descomposición de la materia orgánica y la consecuente proliferación de algas y plantas acuáticas lo cual reduce la calidad del agua. Se expresa en unidades de kg PO_4^{-3} equivalente o kg N equivalente.

Toxicidad humana

El Potencial de Toxicidad Humana es un índice que representa el daño potencial de una unidad de químico liberado en el ambiente y se basa en la toxicidad inherente del compuesto y su dosis potencial. Los compuestos o sub-productos son principalmente arsénico, dicromato de sodio y ácido fluorhídrico que tienen su origen en fuentes fósiles y resultan tóxicos por inhalación, ingestión y contacto. Este índice se encuentra expresado en $\text{kg 1,4 diclorobenceno}$ equivalente o DALY⁵.

Radiación ionizante

Es una forma de energía liberada como ondas electromagnéticas (rayos gama, rayos X) o partículas (alfa, beta y neutrones) capaces de ionizar la materia. En un LCA se refiere al daño causado a la salud humana por la liberación de radionucleidos en el ciclo de vida de un producto. La unidad está expresada en kg U^{235} y DALY.

Uso de suelo

Se enfoca en los impactos causados por la ocupación de la tierra por parte de los seres humanos para producción o modificación. Se encuentra expresado en PDF/m^2 o $\text{m}^2\cdot\text{año}$.

⁵ DALY = disability-adjusted life year (cantidad de años perdidos debido a enfermedad, incapacidad o muerte prematura).

Agotamiento de la capa de ozono

Es la destrucción acelerada de la capa estratosférica de ozono causada por los gases de efecto invernadero, compuestos clorados y bromados. La reducción de la capa de ozono permite que los rayos UVB, potencialmente carcinogénicos, alcancen la atmósfera de la Tierra. Está expresado en kg CFC-11 equivalente.

Material particulado

Es una mezcla de partículas, pueden ser estas líquidas o sólidas de compuestos orgánicos e inorgánicos que se encuentran suspendidas en el aire siendo éstas un componente de la contaminación del mismo. Pueden ocasionar varios problemas de salud, especialmente respiratorios. Se mide en PM_{10} equivalente para partículas con un tamaño de $10\mu m$ y la unidad es kg PM.

Oxidación fotoquímica

Determina el potencial de producción fotoquímica del ozono a nivel de la biósfera. El ozono fotoquímico se forma por la reacción de compuestos orgánicos volátiles (COVs) y óxidos de nitrógeno (NOx) en presencia de luz solar. El impacto de este factor está en función de la concentración de CO, SO₂, NO, NH₄⁻ y COVs distintos del metano (NMVOC). Se expresa en kg etileno equivalente, kg NMVOC y kg de ozono formado.

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1 Cultivo

Las condiciones del cultivo pueden modificarse en función del requerimiento de producción de determinados compuestos sean proteínas, pigmentos, polisacáridos y en este caso, para propiciar la producción y acumulación de lípidos (Lourenço, 2006) en (Pacheco, 2013).

Se ha demostrado que la deficiencia de nutrientes, específicamente nitrógeno y fósforo, ocasiona en las microalgas un estado de estrés que las lleva a producir y acumular ácidos grasos (Fuentes-Grünwald, Garcés, Alacid, Rossi, & Camp, 2013).

El sistema de tratamiento de aguas residuales de éste estudio comprende una fase de filtración mediante un humedal de flujo subsuperficial que descarga el efluente hacia una laguna de oxidación de fase continua (Figura 7, Figura 8) donde en forma espontánea crecen microorganismos fotosintéticos lo cual puede claramente evidenciarse por la tonalidad verde brillante que toma el agua en tratamiento.

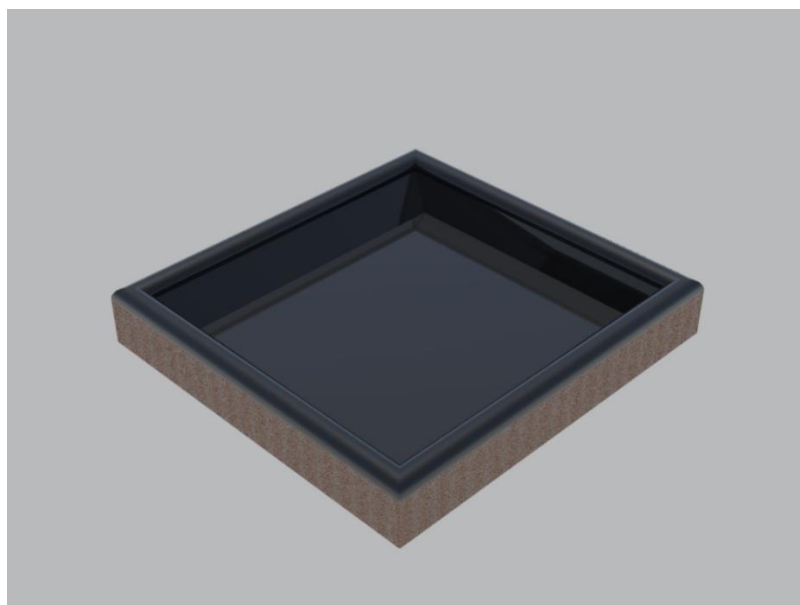


Figura 7. Esquema de laguna de oxidación

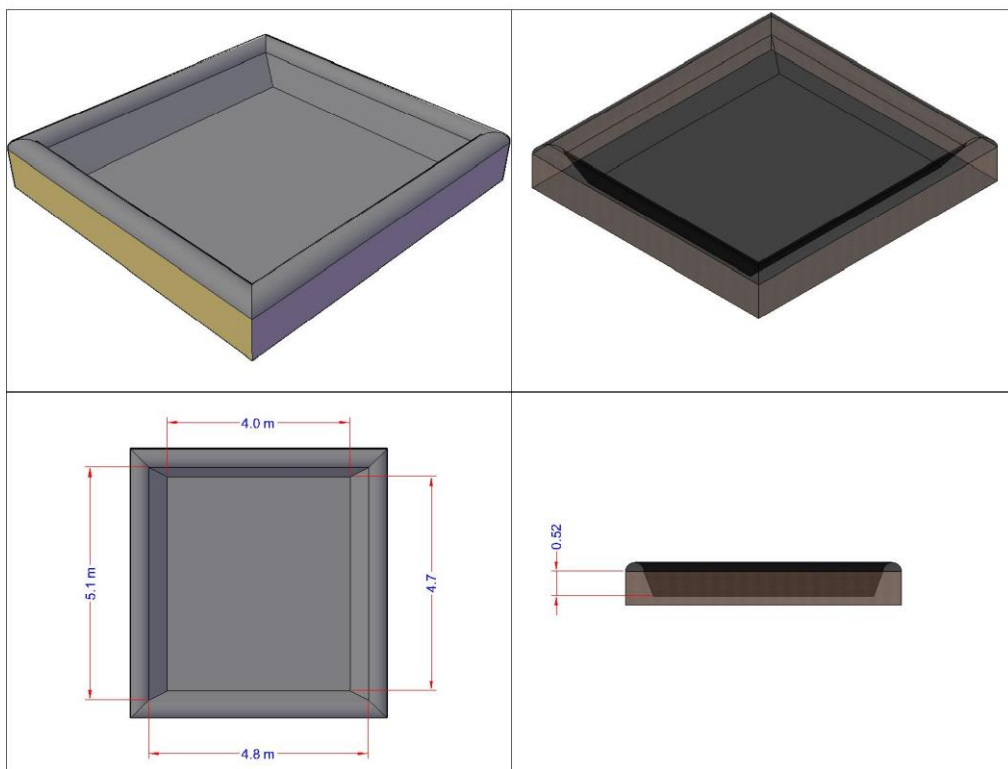


Figura 8. Forma y dimensiones de laguna de oxidación

Se asume que la materia orgánica presente en el efluente y los residuos de productos de limpieza disueltos en él, resultan una fuente de nutrientes suficiente para el crecimiento. A fin de obtener un cultivo homogéneo y para garantizar que toda la biomasa reciba la misma cantidad de luz solar, se implementó un sistema de aireación mediante una bomba eléctrica sumergible de pecera de 25W.

De forma paralela, se transfirió agua de la laguna hacia un contenedor (*bulk tank*) de 275 gal (1000 L) de capacidad a manera de fotobiorreactor para realizar un cultivo en *batch* y de esta forma comparar los rendimientos de biomasa (Figura 9).



Figura 9. *Bulk tank* de 1000 L de capacidad adecuado como fotobiorreactor

3.2 Selección de la técnica de recuperación de biomasa

El propósito de evaluar más de una técnica para recuperación de biomasa, es seleccionar aquella que resulte viable en cuanto a rendimiento, costo y consumo de energía.

Entre varias alternativas que existen se probaron las siguientes:

- **Flotación**

Consistió en recuperar la biomasa suspendida sobre el espejo de agua. Se lo realizó de forma manual, mediante el uso de una red de material sintético (Figura 10).



Figura 10. Recuperación de biomasa por flotación en la laguna de oxidación

- **Sedimentación**

Se recolectó el cultivo en recipientes de 5 galones adaptados para hacer las veces de sedimentadores. El cultivo se dejó en reposo por 72 horas para posteriormente recuperar el sedimento (Figura 11).



Figura 11. Sedimentadores

- **Centrifugación**

El cultivo homogenizado se recolectó y colocó en tubos falcon previamente pesados (Figura 12), se centrifugó a 5000 rpm durante 30

minutos en una centrífuga Thermo Scientific Sorval ST16 y finalmente se eliminó cuidadosamente el sobrenadante.

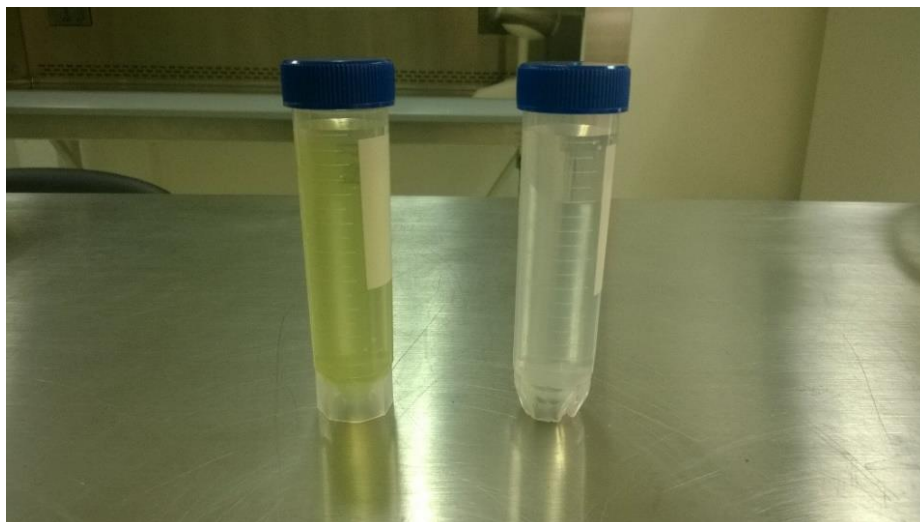


Figura 12. Muestra de cultivo antes y después de la centrifugación

Para las tres técnicas de recuperación de biomasa propuestas, se realizó un secado solar a una temperatura ambiente que oscila entre 30°C – 35°C durante un período de 5 a 7 días para evitar la degradación de los ácidos grasos y por ser el método más escalable y menos costoso al consumir una energía renovable (Salazar, 2012).

3.3 Screening

El screening comprende la determinación de varios parámetros que permiten evaluar el potencial de las microalgas cultivadas para la producción de lípidos y por otro lado, para la remoción de compuestos nitrogenados y fosforados en las aguas residuales.

Los parámetros determinados son:

- **Porcentaje de remoción de compuestos nitrogenados**

Se determinó mediante un análisis por el método kjeldhal de la cantidad de nitrógeno presente en el efluente a la salida del humedal y en el punto de descarga al ambiente para de esta forma calcular la tasa de remoción mediante la ecuación [1].

Las muestras se tomaron entre un día y el siguiente para asegurar

que los nutrientes hayan estado en contacto con las microalgas por el tiempo suficiente para que hayan sido asimilados, sin recambio del efluente.

$$[1] \quad \% \text{ Remoción } N = \frac{(N_1 - N_2)}{N_1} * 100$$

Donde:

N = concentración de nitrógeno total en mg/L

- **Porcentaje de remoción de compuestos fosforados**

Mediante el método colorimétrico del Ácido Ascórbico (HACH TNT 843), se midió la concentración de fósforo asimilable en un espectrofotómetro UV-VIS HACH DR5000. El muestreo y el cálculo se realizaron de la misma manera que para los compuestos nitrogenados (Ecuación [2]).

$$[2] \quad \% \text{ Remoción } P = \frac{(P_1 - P_2)}{P_1} * 100$$

Donde:

P = concentración de fósforo asimilable en mg/L

- **Concentración de biomasa**

Se calculó mediante el procedimiento descrito por Liu *et al.* (2013) que consiste en determinar el peso seco de la biomasa microalgal en un volumen específico del cultivo y pasándolo por un filtro previamente pesado de 0,45 μm . El filtrado se realizó con ayuda de una bomba de vacío MILLIPORE. El filtro con las microalgas se secaron a 105°C en estufa WISEVEN durante 48 horas. Finalmente se calculó el peso seco por diferencia.

- **Perfil lipídico**

También conocido como perfil de ácidos grasos o perfil FAME (*Fatty Acid Methyl Esters*). La detección se hizo mediante cromatografía de gases. Se tomó una muestra del cultivo y se dejó sedimentar por

un lapso de 72 horas, se recuperó el sedimento y se llevó a un laboratorio especializado para realizar el análisis.

3.4 Identificación

La identificación de las especies microalgales presentes permite conocer en función de trabajos previos, el potencial que posee el cultivo para la producción de aceites.

Para el efecto, se recolectaron muestras de agua de la superficie, el fondo y las paredes de la laguna para observarlas en fresco con un microscopio óptico OLYMPUS CX41 con los objetivos 40x y 100x; se tomaron fotografías de los campos para realizar una identificación morfológica.

Una vez identificado el género, se realiza una revisión bibliográfica a fin de determinar si las especies encontradas han mostrado potencial para la producción de biodiesel.

3.5 Extracción de ésteres

Para llevar a cabo una extracción efectiva y con el fin de aumentar el rendimiento de aceite, se requiere realizar un pretratamiento a la biomasa. La selección de la técnica estará en función del método de extracción que se va a efectuar.

Al partir de una muestra seca, el pretratamiento aplicable es el de "Destrucción Mecánica" descrito por Salazar (2012) y que consiste en pulverizar la biomasa seca para aumentar la superficie de contacto entre el solvente y la muestra y además permite una homogenización de la misma. La pulverización puede realizarse mediante el uso de un mortero (Figura 13). A una mayor escala esto puede llevarse a cabo con instrumentos como homogeneizadores celulares, molinos de bolas y sistemas de prensado.



Figura 13. Destrucción mecánica de biomasa seca en mortero

Cuando se utiliza biomasa húmeda, existen otros procesos de pretratamiento como autoclavado, sonicación y microondas, que lo que hacen es romper paredes celulares para permitir una extracción de aceites más efectiva.

La extracción en sí se realizó mediante un Soxhlet. Este sistema es el más comúnmente utilizado en la extracción de aceites de microalgas y comprende los siguientes elementos: un balón donde se coloca el solvente, un tubo de extracción donde se coloca la muestra y una columna refrigerante. El principio de la extracción Soxhlet es la concentración del extracto mediante ciclos de evaporación y condensación del solvente. El solvente en el balón se evapora y se condensa en el refrigerante haciéndolo caer sobre la muestra en el tubo, cuando el solvente condensado más el extracto alcanzan el nivel más alto del brazo del sifón, cae nuevamente hacia el balón y comienza un nuevo ciclo mientras en el balón continúa concentrándose el extracto por tener una temperatura de ebullición más alta que el solvente (Figura 14).

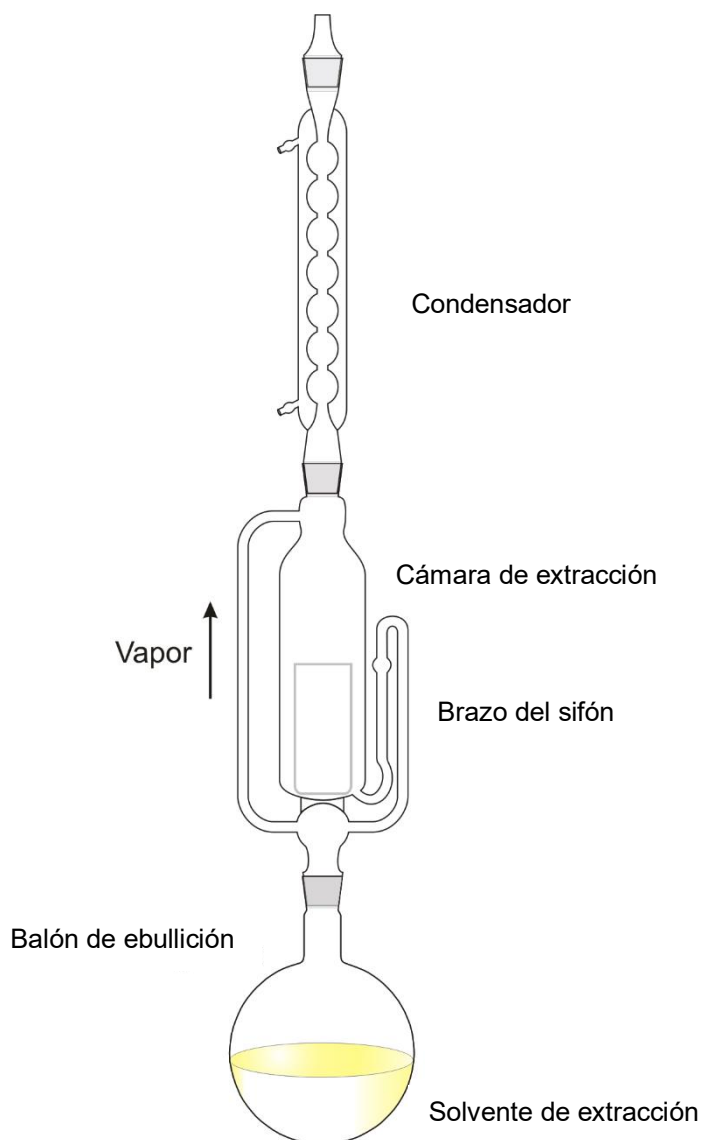


Figura 14. Esquema de un sistema de extracción Soxhlet

Fuente: <http://glossary.periodni.com/glossary.php?en=Soxhlet+extractor>

Se aplicó el procedimiento descrito por Salazar (2012) que se detalla a continuación:

La muestra pulverizada, se pesó (aproximadamente 17 g) y transfirió a un cartucho de papel filtro. Se colocó el cartucho en el interior del extractor. Se añadió 250 mL de hexano al balón del 500mL previamente pesado y se calentó a 70°C con una manta eléctrica J. P. Selecta de 260W, de tal forma que se observe que el solvente se evapora y condensa con una velocidad media de goteo.

Se repitieron los ciclos de extracción hasta observar que el solvente en la columna no tuviera ningún color (durante aproximadamente 4 horas). Se

dejó enfriar el balón y retiró para recuperar el solvente en un rotavapor HEIDOLPH a 30°C y 40 rpm durante 20 min, tiempo en el cual se observó que todo el solvente se había recuperado. Se colocó el balón a temperatura ambiente para permitir la evaporación de algún remanente de solvente. Se determinó el peso del balón con el aceite extraído para calcular el rendimiento de lípidos.

3.6 Transesterificación

El procedimiento aplicado se tomó y adaptó de lo descrito por Pasquale & Ruiz (2010) y Cantero & Faber (2010), se ajustaron estequiométricamente las proporciones de hidróxido de sodio y metanol respecto al ácido graso predominante y al volumen de aceite para conseguir el mayor rendimiento, el procedimiento es como sigue:

Se partió de medir el pH del aceite con un medidor multiparamétrico Thermo Scientific Orion 3Star seguido de una titulación con NaOH y de esta forma determinar el volumen de catalizador necesario para obtener un pH 7. En función del ácido graso predominante en el aceite extraído, se determinó la relación molar con el metanol. Se pesó la cantidad requerida de NaOH y se lo disolvió en el volumen calculado de metanol para de esta forma obtener metilato de sodio.

Por otro lado, el aceite fue precalentado en un calentador-agitador Thermo Scientific CIMAREC a 120°C durante 5 minutos para eliminar la humedad contenida en el mismo. Se dejó enfriar el aceite hasta que alcance una temperatura de 60°C y se lo mantuvo a esta temperatura y en agitación vigorosa mientras se agregó lentamente la solución de metilato de sodio.

Se agitó durante unos 5 minutos más para luego transferir la mezcla a un balón de separación y se dejó reposar durante una hora. Al cabo de ese tiempo, las fases del biodiesel y co-productos fueron fácilmente observables (Figura 15). Se descartó la fase inferior que debía contener glicerina agua y residuos de jabón, hidróxido de sodio y metanol sin reaccionar.



Figura 15. Separación de biodiesel y subproductos

Finalmente, es necesario realizar un lavado del biodiesel para eliminar residuos que pudieron quedar emulsionados, para lo cual se agregó 30% de agua destilada caliente (60°C - 80°C) respecto al volumen de aceite y se agitó lentamente para disolver los residuos en la fase acuosa. Se dejó reposar durante la noche para una completa separación de las fases y así drenar la fase inferior. El lavado debe repetirse las veces necesarias hasta que el biodiesel tenga un color ámbar cristalino sin partículas suspendidas (Figura 16).

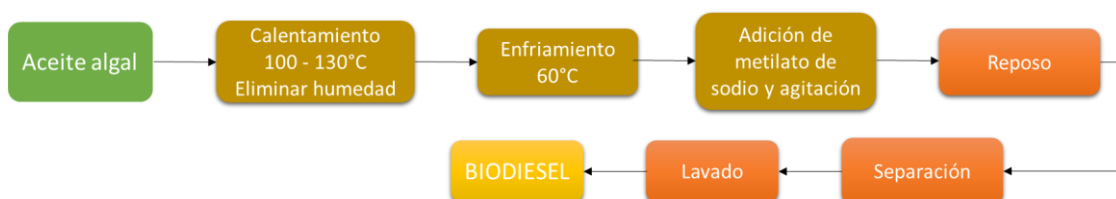


Figura 16. Diagrama del proceso de transesterificación

3.7 Caracterización del biodiesel

- **Medición del valor calorífico superior (HHV)**

El valor calorífico corresponde a las unidades de calor liberadas al quemar una unidad de combustible bajo condiciones específicas, en este caso a presión constante. La determinación fue realizada mediante una bomba calorimétrica adiabática Gallenkamp (Figura 17) para lo cual primero se quemó 1 g de ácido benzoico, que es el estándar termoquímico con un valor calorífico conocido (26.454 J/g) y se registra el aumento de temperatura del equipo. Una muestra de 0,8 g de combustible (Figura 18) se carga a la bomba a la cual se le aplica una presión de 15 bar con oxígeno de tal forma que como producto de la combustión se obtenga agua condensada, la medición se realizó por quintuplicado con muestras de B100 y B10. Con cada muestra se registró el aumento de temperatura y posteriormente se realizó el cálculo para obtener el HHV con la media aritmética de las variaciones de temperatura. Se tomó como referencia un HHV de diésel fósil previamente determinado de 46.301,77 J/g.



Figura 17. Bomba calorimétrica adiabática



Figura 18. Pesaje de muestra de combustible

3.8 Análisis del ciclo de vida

El análisis parte de la definición del alcance y la meta lo cual permitió establecer los límites del sistema (Figura 19) y la identificación de cada parámetro dentro de los límites establecidos. Para este caso, de dónde proviene la materia prima, energía, carbono y nutrientes para el desarrollo del cultivo; la energía consumida en la cosecha de biomasa y el impacto ambiental del manejo de los residuos (disposición final, reutilización o reciclaje). Se elaboraron los balances de materia y energía (Anexo 2) y seleccionó como unidad funcional la energía producida por kg de biodiesel por día.

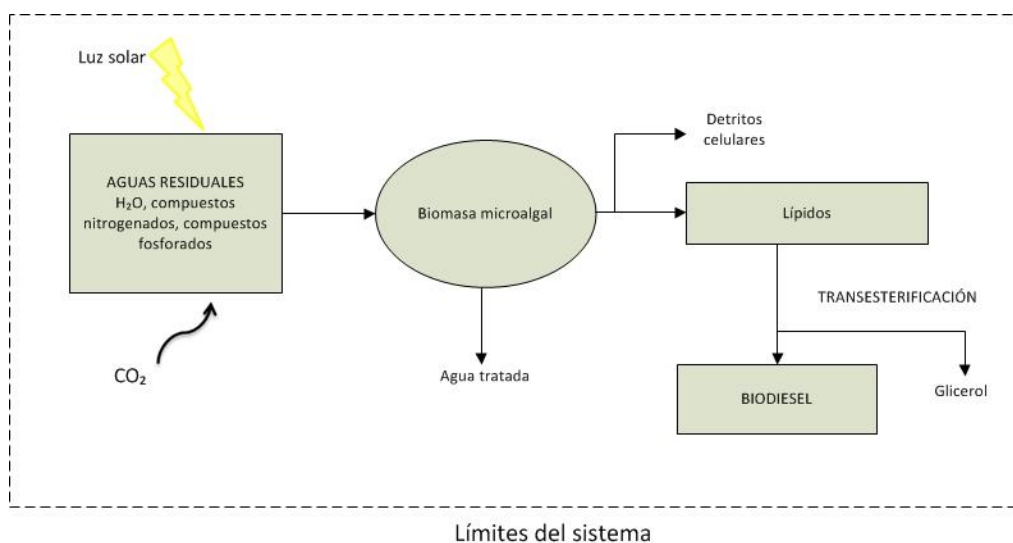


Figura 19. Límites del sistema para la obtención de biodiesel de microalgas cultivadas en aguas residuales

El software que se utilizó es openLCA 1.4 se aplicó la base de datos BioEnergieDat, ambos de acceso libre. El análisis ha sido realizado para las dos formas de cultivo ensayadas: en la laguna de oxidación (sistema continuo) y en el fotobiorreactor (sistema *batch*), sin control de concentración de nutrientes y en comparación con la producción de biodiesel de aceite vegetal y combustibles de origen fósil.

La selección del método de cálculo se hizo posterior a una revisión de las propiedades de los métodos disponibles para openLCA, en función a los factores de normalización que poseen, el propósito del análisis y la región para la cual se aplican dichos factores. De esta forma el método que se utilizó es ReCiPe endpoint (E).

El método ReCiPe tiene como principal objetivo transformar el LCI en un número limitado de indicadores valorados con el fin de expresar la severidad ambiental relativa de la categoría de impacto. Los indicadores tienen niveles de punto medio (midpoint) y punto final (endpoint) y distingue tres perspectivas culturales: jerárquica (H), individualista (I) e Igualitaria (E). En la Figura 20 se muestran las categorías que corresponde al método.

Method: ReCiPe endpoint (E, H & I)				
Impact category group	Name of the impact category in the method	E	H	I
Acidification	Terrestrial acidification	TAPinf EQ-E	TAP100 EQ-H	TAP20 EQ-I
Climate change	Climate change	GWPinf HH-E	GWP100 HH-H	GWP20 HH-I
		GWPinf EQ-E	GWP100 EQ-H	GWP20 EQ-I
Depletion of abiotic resources	Metal depletion	MDPinf RD-E	MDP100 RD-H	MDP20 RD-I
	Fossil depletion	FDPinf RD-E	FDP100 RD-H	FDP20 RD-I
Ecotoxicity	Freshwater ecotoxicity	FETPinf EQ-E	FETP100 EQ-H	FETP20 EQ-I
	Marine ecotoxicity	METPinf EQ-E	METP100 EQ-H	METP20 EQ-I
	Terrestrial ecotoxicity	TETPinf EQ-E	TETP100 EQ-H	TETP20 EQ-I
Eutrophication	Freshwater	FEPinf EQ-E	FEP100 EQ-H	FEP20 EQ-I
Human toxicity	Human toxicity	HTPinf HH-E	HTP100 HH-H	HTP20 HH-I
Ionising radiation	Ionising radiation	IRPinf HH-E	IRP100 HH-H	IRP20 HH-I
Land use	Agricultural land occupation	ALOPinf EQ-E	ALOP100 EQ-H	ALOP20 EQ-I
	Urban land occupation	ULOPinf EQ-E	ULOP100 EQ-H	ULOP20 EQ-I
	Natural land transformation	LTPinf EQ-E	LTP100 EQ-H	LTP20 EQ-I
Ozone layer depletion	Ozone depletion	ODPinf HH-E	ODP100 HH-H	ODP20 HH-I
Particulate matter	Particulate matter formation	PMFPinf HH-E	PMFP100 HH-H	PMFP20 HH-I
Photochemical oxidation	Photochemical oxidant formation	POFPinf HH-E	POFP100 HH-H	POFP20 HH-I

Figura 20. Factores de normalización del método ReCiPe endpoint

Fuente: Acero *et al.*, 2015

Para realizar el análisis, se enlistaron todas las entradas y salidas identificadas con las unidades y valores correspondientes según la unidad funcional (Figura 21, Figura 22).

Producción b... Producción b... Analysis res... Producción b... Producción b... Analysis res.

Process: Producción biodiesel continuo

Inputs

Flow	Category	Flow property	Unit	Amount
hexane - Al producing Area 2...	chemicals/organics	Mass	g	163.75
sodium hydroxide, 50% in H...	chemicals/inorganics	Mass	g	0.074
methanol, at regional storage...	chemicals/organics	Mass	g	0.988
electricity, oil, at power plant	oil/power plants	Energy	Wh	4659.2058
Carbon dioxide, fossil	air/low population density	Mass	kg	1.833
Biomass	resource/biotic	Mass	g	135.56
Energy, primary, from solar e...	resource/in air	Energy	Wh	5066.08
Fatty acids	water/unspecified	Mass	g	5.7613
Waste water/m3	water/unspecified	Volume	m3	2.0
Nitrogen	water/unspecified	Mass	g	22.4
Phosphorus	water/unspecified	Mass	g	0.64

Outputs

Flow	Category	Flow property	Unit	Amount
BIODIESEL		Energy/mass...	MJ/kg*d	39.6
Glycerin	BioEnergieDat/Hilfsflüsse	Mass	g	0.2313
Biomass	resource/biotic	Mass	g	129.8
Water, process and cooling, s...	water/unspecified	Volume	m3	1.999864
Hexane - EC	soil/industrial	Mass	g	147.375

Figura 21. Entradas y salidas del sistema de producción de biodiesel en cultivo continuo

Producción b... Producción b... Analysis res... Producción b... Producción b... Analys

Process: Producción biodiesel batch

Inputs

Flow	Category	Flow property	Unit	Amount
Nitrogen	water/unspecified	Mass	g	22.4
Energy, primary, from solar e...	resource/unspecified	Energy	Wh	5066.08
methanol, at regional storage...	chemicals/organics	Mass	g	0.988
Phosphorus	water/unspecified	Mass	g	0.64
Waste water/m3	water/unspecified	Volume	m3	2.0
hexane - Al producing Area 2...	chemicals/organics	Mass	g	163.75
Carbon dioxide, fossil	air/low population density	Mass	kg	1.833
Biomass	resource/biotic	Mass	g	1058.8
sodium hydroxide, 50% in H...	chemicals/inorganics	Mass	g	0.074
electricity, oil, at power plant	oil/power plants	Energy	Wh	4659.2058
Fatty acids	water/unspecified	Mass	g	44.999

Outputs

Flow	Category	Flow property	Unit	Amount
BIODIESEL		Energy/mass...	MJ/kg*d	39.6
Glycerin	BioEnergieDat/Hilfsflüsse	Mass	g	1.8
Biomass	resource/biotic	Mass	g	1013.801
Water, process and cooling, s...	water/unspecified	Volume	m3	1.9989412
Hexane - EC	soil/industrial	Mass	g	147.375

Figura 22. Entradas y salidas del sistema de producción de biodiesel en cultivo batch

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Identificación

De la observación de las imágenes tomadas a varias muestras del cultivo, se pudo determinar que de manera predominante existen especies del género *Tetrastrum* que pertenece al grupo de las clorofitas crucigenoides (Tabla 1). En la Figura 23 se observan algunas imágenes capturadas con lente 100x de muestras tomadas en suspensión, en el fondo y superficie de la laguna. Este grupo de especies fitoplanctónicas son generalmente de agua dulce y viven en ambientes eutróficos, forman colonias de cuatro individuos generalmente pero incluso pueden formar agregados de hasta 16 células cuya forma puede ser ovoidea, triangular o trapezoidal (AlgaeBAsE, 2016).

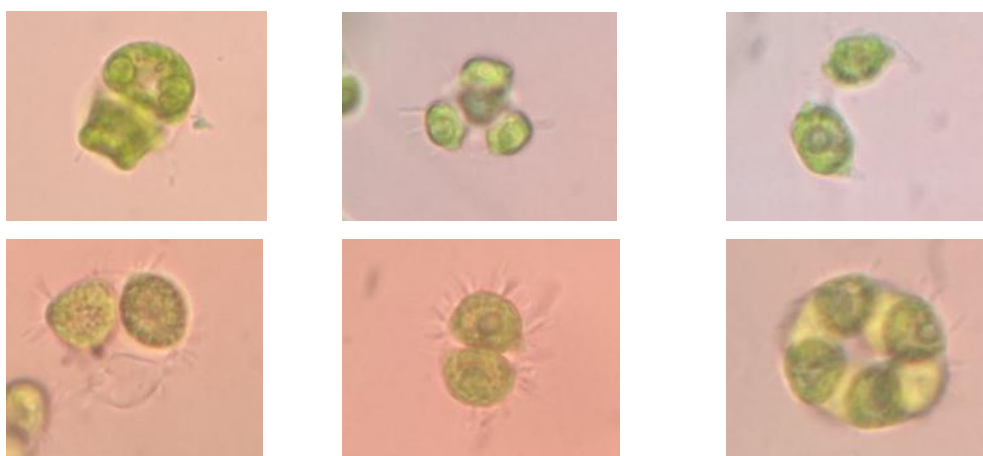


Figura 23. Especies de *Tetrastrum* encontradas en el cultivo

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de microalgas identificadas

División	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Sphaeropleales
Familia	Scenedesmaceae
Género	<i>Tetrastrum</i>
Especies más comunes	<i>Tetrastrum triangulare</i> <i>Tetrastrum asymmetricum</i> <i>Tetrastrum constrictum</i> <i>Tetrastrum elegans</i> <i>Tetrastrum glabrum</i> <i>Tetrastrum komarekii</i> <i>Tetrastrum parallelum</i> <i>Tetrastrum staurogeniaeforme</i> <i>Tetrastrum tenuispinum</i> <i>Tetrastrum triacanthum</i> <i>Tetrastrum heteracanthum</i>

Fuente: AlgaeBase, 2016

4.2 Técnica de recuperación de biomasa

De las técnicas evaluadas, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 2 para la recuperación de biomasa en 1 m³ de cultivo en la laguna de oxidación.

Tabla 2.

Evaluación de las técnicas de recuperación de biomasa

TÉCNICA	RENDIMIENTO (g/m ³)	COSTO USD/m ³	CONSUMO ENERGÍA (Wh/m ³)
Flotación	10,7	3,01	0,16
Sedimentación	67,78	6,02	374,85
Centrifugación	337,11	38,90	3800,00

4.3 Screening

4.3.1 Remoción de nutrientes

A fin de contar con suficientes datos para el cálculo del porcentaje de remoción de nitrógeno y fósforo en el agua en tratamiento, se realizó el muestreo por un período de dos semanas. Se obtuvo una tasa máxima de remoción de nitrógeno de 57% y de 33% para el fósforo.

4.3.2 Concentración de biomasa

Los rendimientos de biomasa cultivada en la laguna de oxidación (sistema continuo) y en fotobiorreactor (batch), se calcularon en función del peso seco y la técnica de recuperación seleccionada.

- *Sistema continuo:* 67,78 g/m³
- *Batch:* 529,4 g/m³

Lo que muestra que en lotes se puede aumentar el rendimiento de biomasa casi 8 veces respecto a la cantidad que puede recuperarse directamente de la laguna de oxidación.

4.3.3 Perfil lipídico

En función del peso seco de la muestra, 12,33% del extracto lipídico corresponde a ácidos grasos saturados, 4,22% ácidos grasos monoinsaturados y 20,55% ácidos grasos poliinsaturados. Estos valores permiten predecir la calidad del biodiesel que se obtendría a partir de los triglicéridos presentes en la composición, ya que se conoce que aquellos ricos en ácidos grasos poliinsaturados producen una disminución en el número de cetano y su estabilidad frente a la oxidación. De acuerdo con Imahara *et al.* (2006) y otros autores, los ácidos grasos saturados y monoinsaturados son los más aptos para la producción de biodiesel (Arias, Martínez, & Cañizares, 2013).

El screening de ácidos grasos realizado en el Laboratorio LASA se muestra en la Tabla 3 y el Anexo 4.

Tabla 3.

Perfil de ácidos grasos de biomasa microalgal⁶

CLASIFICACIÓN	PARÁMETROS	RESULTADO (%)
Ácidos grasos saturados	Ácido Palmítico (C16:0)	8,86
	Ácido Láurico (C12:0)	0,34
	Ácido Pentadecanoico (C15:0)	0,26
	Ácido Esteárico (C18:0)	2,17
	Ácido Araquídico (C20:0)	0,32
Ácidos grasos monoinsaturados	Ácido Behénico (C22:0)	0,22
	Ácido Oleico (C18:1)	4,04
	Ácido Palmitoleico (C16:1)	0,18
Ácidos grasos poliinsaturados	Ácido Linolénico (C18:3)	16,34
	Ácido Linoleico (C18:2)	4,21

⁶ Análisis realizado en laboratorio LASA

La sensibilidad a la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, específicamente del ácido linolénico encontrado predominantemente en la biomasa cosechada, indica que el biodiesel obtenido a partir del mismo debe usarse inmediatamente ya que por su inestabilidad frente a la oxidación, no puede almacenarse por tiempo prolongado.

4.4 Rendimiento

4.4.1 Lípidos

Para determinar el rendimiento de lípidos de la biomasa microalgal se calculó la fracción de aceite obtenido en la extracción Soxhlet respecto al peso de la biomasa seca utilizada obteniéndose como resultado 4,25%.

4.4.2 Reacción de transesterificación

Mediante varios ajustes al procedimiento, finalmente se obtuvo un porcentaje de rendimiento de biodiesel de 96% respecto al volumen inicial de aceite utilizado. La relación entre los componentes de la reacción es: 6 g de NaOH diluidos en 200 mL de CH₃OH por cada litro de aceite utilizado.

4.5 Análisis de parámetros de calidad

Debido a los bajos rendimientos de biomasa (529,4 g/m³) y aceite microalgal extraído (4,25%), no ha sido posible obtener la cantidad de muestra mínima de B100 (biodiesel 100%) necesaria para realizar el análisis de los parámetros según la norma ASTM D6751 (Anexo 3). Sin embargo, en consideración del Decreto Ejecutivo 1303⁷, la NTE INEN 2

⁷ Decreto Ejecutivo 1303 (2012). Desarrollo de biocombustibles, proporciones de mezcla de diésel base con biodiesel de producción nacional.

207:2002⁸, la norma ASTM D7467 (mezcla entre 6 y 20%) y la Ordenanza Metropolitana N° 038⁹ se realizaron las pruebas que se muestran en la Tabla 4 (Anexo 5).

Tabla 4.

Parámetros de calidad analizados mezcla B10

ENSAYO	UNIDAD	RESULTADO
Punto de inflamabilidad	°C	70,1
Agua y sedimento (%BSW)	%v	0,025
Viscosidad a 40°C	cSt**	4,3235
Residuo carbonoso en 10% del residuo de destilación	%m	4,506
Opacidad humo de escape*		
Diferencia	%	1,90
Promedio	%	1,92

* Media aritmética de 6 pruebas realizadas

** 1cSt = 1 mm²/s

Adicionalmente, de las pruebas realizadas para la determinación del poder calorífico superior, se obtuvo para B10 un valor de 46727,15 J/g, y para B100 41473,44 J/g.

4.6 Análisis del ciclo de vida

4.6.1 Análisis de los impactos

En forma preliminar, se determinaron los impactos ambientales positivos y negativos (Tabla 5) para el sistema de producción propuesto.

⁸ Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 207:2002 (Primera Revisión). Gestión ambiental. Aire. Vehículos automotores. Límites permitidos de emisiones producidas por fuentes móviles terrestres de diésel.

⁹ Ordenanza sustitutiva del capítulo IV, para el control de la contaminación vehicular, del título V del libro II, del Código Municipal.

Tabla 5.

Identificación de impactos ambientales

<i>Impactos negativos</i>	<i>Impactos positivos</i>
Proceso de extracción involucra el uso de un solvente derivado del petróleo, el mismo puede ser recuperado, aunque no en su totalidad (máximo 90%), y reutilizado	No requiere el uso de pesticidas o fertilizantes No existe competencia por el uso de suelo respecto a cultivos con fin alimentario
La energía requerida para bombeo, calentamiento y otros procesos proviene de una planta termoeléctrica	Las microalgas poseen una alta tasa fotosintética (3-8%) respecto a las plantas (0,5%) (Lardon, Hélias, Sialve, Steyer, & Bernard, 2009)
Equipamiento debe ser reemplazado cada 10 años	Al ser un cultivo desarrollado en aguas residuales, no se requiere el uso de agua dulce La mayor parte de la energía requerida proviene de una fuente renovable que es la energía solar
Productos químicos son fabricados fuera del país	La fuente de carbono es el CO ₂ emitido por la central termoeléctrica que se encuentra a menos de 100 m de las facilidades El secado de biomasa se realiza al ambiente facilitado por la temperatura de la localidad El agua resultante continúa el proceso de tratamiento de tal forma que puede ser evacuada al ambiente La glicerina puede recuperarse y al ser biodegradable, incorporarse a sistemas de compostaje, o utilizarse en elaboración de productos cosméticos La biomasa libre de aceite puede incorporarse al suelo para su degradación

4.6.2 Resultados del inventario

En las Tablas 6 y 7 se muestran los listados del inventario para sistema de cultivo.

Tabla 6.

Resultados LCI para cultivo continuo

ENTRADAS				
FLOW	CATEGORY	SUB-CATEGORY	UNIT	RESULT
agricultural machinery, general, production	agricultural means of production	machinery	kg	-4.81784E-06
harvester, production	agricultural means of production	machinery	kg	-4.11781E-06
tractor, production	agricultural means of production	machinery	kg	-2.39639E-06
trailer, production	agricultural means of production	machinery	kg	-6.69144E-07
calcium ammonium nitrate, as N, at regional storehouse	agricultural means of production	mineral fertiliser	kg	-0.000284386
potassium chloride, as K ₂ O, at regional storehouse	agricultural means of production	mineral fertiliser	kg	-0.000418215
triple superphosphate, as P ₂ O ₅ , at regional storehouse	agricultural means of production	mineral fertiliser	kg	-0.000167286
triazine-compounds, at regional storehouse	agricultural means of production	pesticides	kg	-8.3643E-06
rape seed IP, at regional storehouse	agricultural means of production	seed	kg	-6.69144E-06
Carbon dioxide, fossil	air	low population density	kg	1.833
Kohlenstoff, biogen	BioEnergieDat	Hilfsflüsse	kg	-0.003094436
phosphoric acid, industrial grade, 85% in H ₂ O, at plant	chemicals	inorganics	kg	-2.31298E-06
sodium hydroxide, 50% in H ₂ O, production mix, at plant	chemicals	inorganics	kg	4.99467E-05
Hexane	chemicals	organics	kg	0.163744448
lubricating oil, at plant	chemicals	organics	kg	-1.43443E-05
methanol, at regional storage	chemicals	organics	kg	0.000733565
concrete, exacting, at plant	construction materials	concrete	m ³	-6.28919E-10
electricity, production mix DE	electricity	production mix	MJ	-0.001080176
steel product manufacturing, average metal working	metals	general manufacturing	kg	-1.19746E-06
diesel, at regional storage	oil	fuels	kg	-8.68414E-05
electricity, oil, at power plant	oil	power plants	MJ	16.77314088

Energy, primary, from solar energy	resource	in air	MJ	18.237888
Occupation, arable	resource	land	m2*a	-0.016728595
transport, lorry >32t, EURO3	transport systems	road	t*km	-0.000282466
steam, for chemical processes, at plant	washing agents	auxiliary agents	kg	-0.002648717
Fatty acids	water	unspecified	kg	0.0057613
Nitrogen	water	unspecified	kg	0.0224
Phosphorus	water	unspecified	kg	0.00064
Waste water/m3	water	unspecified	m3	2

SALIDAS

Ammonia	air	unspecified	kg	-5.17989E-06
Carbon dioxide, fossil	air	unspecified	kg	-0.000270945
Dinitrogen monoxide	air	unspecified	kg	-5.58616E-06
Methane, fossil	air	unspecified	kg	-1.11912E-08
Nitrogen dioxide	air	unspecified	kg	-1.04052E-08
Nitrogen oxides	air	unspecified	kg	-7.96523E-06
NM VOC, non-methane volatile organic compounds, unspecified origin	air	unspecified	kg	-7.44418E-10
Sulfur dioxide	air	unspecified	kg	-8.77098E-08
Rapsmethylester (Biodiesel), ab Produktionsanlage	Biomassekonversion	Rapsmethylester Produktion (Biodiesel)	MJ	-0.085812866
Extraktionsschrot (Rapskorn), ab Produktionsanlage	Biomassekonversion	Rapsöl Produktion	kg	-0.00307631
Biomass	resource	biotic	kg	-0.00576
Hexane	soil	industrial	kg	0.147375
Water, process and cooling, surface	water	unspecified	m3	1.999864

Tabla 7.**Resultados LCI para cultivo batch**

ENTRADAS				
FLOW	CATEGORY	SUB-CATEGORY	UNIT	RESULT
agricultural machinery, general, production	agricultural means of production	machinery	kg	-3.7E-05
harvester, production	agricultural means of production	machinery	kg	-3.2E-05
tractor, production	agricultural means of production	machinery	kg	-1.9E-05
trailer, production	agricultural means of production	machinery	kg	-5.2E-06
calcium ammonium nitrate, as N, at regional storehouse	agricultural means of production	mineral fertiliser	kg	-0.00221
potassium chloride, as K ₂ O, at regional storehouse	agricultural means of production	mineral fertiliser	kg	-0.00325
triple superphosphate, as P ₂ O ₅ , at regional storehouse	agricultural means of production	mineral fertiliser	kg	-0.0013
triazine-compounds, at regional storehouse	agricultural means of production	pesticides	kg	-6.5E-05
rape seed IP, at regional storehouse	agricultural means of production	seed	kg	-5.2E-05
Carbon dioxide, fossil	air	low population density	kg	1.833
Kohlenstoff, biogen	BioEnergieDat	Hilfsflüsse	kg	-0.02408
phosphoric acid, industrial grade, 85% in H ₂ O, at plant	chemicals	inorganics	kg	-1.8E-05
sodium hydroxide, 50% in H ₂ O, production mix, at plant	chemicals	inorganics	kg	-0.00011
Hexane	chemicals	organics	kg	0.163707
lubricating oil, at plant	chemicals	organics	kg	-0.00011
methanol, at regional storage	chemicals	organics	kg	-0.00099
concrete, exacting, at plant	construction materials	concrete	m ³	-4.9E-09
electricity, production mix DE	electricity	production mix	MJ	-0.00841
steel product manufacturing, average metal working	metals	general manufacturing	kg	-9.3E-06
diesel, at regional storage	oil	fuels	kg	-0.00068

electricity, oil, at power plant	oil	power plants	MJ	16.77314
Occupation, arable	resource	land	m2*a	-0.13018
Energy, primary, from solar energy	resource	unspecified	MJ	18.23789
transport, lorry >32t, EURO3	transport systems	road	t*km	-0.0022
steam, for chemical processes, at plant	washing agents	auxiliary agents	kg	-0.02061
Fatty acids	water	unspecified	kg	0.044999
Nitrogen	water	unspecified	kg	0.0224
Phosphorus	water	unspecified	kg	0.00064
Waste water/m3	water	unspecified	m3	2
SALIDA				
Ammonia	air	unspecified	kg	-4E-05
Carbon dioxide, fossil	air	unspecified	kg	-0.00211
Dinitrogen monoxide	air	unspecified	kg	-4.3E-05
Methane, fossil	air	unspecified	kg	-8.7E-08
Nitrogen dioxide	air	unspecified	kg	-8.1E-08
Nitrogen oxides	air	unspecified	kg	-6.2E-05
NMVOOC, non-methane volatile organic compounds, unspecified origin	air	unspecified	kg	-5.8E-09
Sulfur dioxide	air	unspecified	kg	-6.8E-07
Rapsmethylester (Biodiesel), ab Produktionsanlage	Biomassekonversion	Rapsmethylester Produktion (Biodiesel)	MJ	-0.6678
Extraktionsschrot (Rapskorn), ab Produktionsanlage	Biomassekonversion	Rapsöl Produktion	kg	-0.02394
Biomass	resource	biotic	kg	-0.045
Hexane	soil	industrial	kg	0.147375
Water, process and cooling, surface	water	unspecified	m3	1.998941

Resultados obtenidos con el software OpenLCA 1.4

Los resultados con valor negativo indican la medida en que el sistema de proceso en la entrada y salida, evita el uso del factor dado. Por ejemplo, en el caso de los fertilizantes el número negativo muestra que no es necesario la adición de los mismos ya que la materia orgánica del agua residual provee los nutrientes necesarios y el valor asignado indica la magnitud de “ahorro” en fertilizantes. Por otro lado, en el caso de la energía producida por el biodiesel, en la salida tiene un valor negativo ya que existe en el sistema un consumo de energía superior a la que se produce.

4.6.3 Resultados del LCIA

Del análisis del impacto de ciclo de vida se obtuvieron para cada categoría los resultados que se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8.

LCIA para cultivo continuo

IMPACT CATEGORY	RESULT	REFERENCE UNIT
Ecosystems - Agricultural land occupation	-3.3E-10	species.yr
Ecosystems - Climate Change	3.43E-08	species.yr
Ecosystems - Freshwater ecotoxicity	1.1E-14	species.yr
Ecosystems - Freshwater eutrophication	2.84E-11	species.yr
Ecosystems - Marine ecotoxicity	8.33E-17	species.yr
Ecosystems - Natural land transformation	0	species.yr
Ecosystems - Terrestrial acidification	-2.9E-13	species.yr
Ecosystems - Terrestrial ecotoxicity	4.35E-11	species.yr
Ecosystems - Urban land occupation	0	species.yr
Ecosystems-total	3.4E-08	species.yr
Human Health - Climate Change	6.43E-06	DALY
Human Health - Human toxicity	1.17E-08	DALY
Human Health - Ionising radiation	0	DALY
Human Health - Ozone depletion	0	DALY
Human Health - Particulate matter formation	-8.9E-10	DALY
Human Health - Photochemical oxidant formation	-3.1E-13	DALY
Human Health-total	6.44E-06	DALY
Resources - Fossil depletion	0	\$
Resources - Metal depletion	0	\$
Resources-total	0	\$

Tabla 9.

LCIA para cultivo batch

IMPACT CATEGORY	RESULT	REFERENCE UNIT
Ecosystems - Agricultural land occupation	-2.6E-09	species.yr
Ecosystems - Climate Change	3.41E-08	species.yr
Ecosystems - Freshwater ecotoxicity	1.1E-14	species.yr
Ecosystems - Freshwater eutrophication	2.84E-11	species.yr
Ecosystems - Marine ecotoxicity	8.33E-17	species.yr
Ecosystems - Natural land transformation	0	species.yr
Ecosystems - Terrestrial acidification	-2.3E-12	species.yr
Ecosystems - Terrestrial ecotoxicity	4.35E-11	species.yr
Ecosystems - Urban land occupation	0	species.yr
Ecosystems-total	3.16E-08	species.yr
Human Health - Climate Change	6.4E-06	DALY
Human Health - Human toxicity	1.17E-08	DALY
Human Health - Ionising radiation	0	DALY
Human Health - Ozone depletion	0	DALY
Human Health - Particulate matter formation	-6.9E-09	DALY
Human Health - Photochemical oxidant formation	-2.4E-12	DALY
Human Health-total	6.41E-06	DALY
Resources - Fossil depletion	0	\$
Resources - Metal depletion	0	\$
Resources-total	0	\$

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- De las tres técnicas de recuperación de biomasa que fueron evaluadas, se determinó que aquella que tiene una mejor relación costo/rendimiento es la Sedimentación, sin embargo éste rendimiento no es suficiente para que en el balance de energía los consumos sean menores a la producción, lo cual muestra que existen oportunidades de mejora durante la fase de cultivo para lograr una mayor concentración de biomasa y en la extracción para un mayor rendimiento de aceite.
- Los impactos ambientales identificados que se encuentran asociados a la obtención de biodiesel mediante un sistema de cultivo de microalgas en aguas residuales y sistema continuo y por lotes son mayoritariamente positivos. Los impactos negativos relacionados con el uso de insumos o energía de origen fósil. Por una parte el hexano utilizado en la extracción de aceite puede ser reusado varias veces con pequeñas pérdidas en cada ciclo o reemplazado mediante otra técnica de extracción de aceite mientras que la energía eléctrica necesaria para aireación y calentamiento puede provenir de fuentes renovables como hídrica o solar.
- De acuerdo con los resultados del LCIA, si bien la cantidad de energía que se obtiene mediante este proceso es menor a la consumida, es importante remarcar que la energía de origen fósil demandada (16,77 MJ) es menor a la energía solar aprovechada en el crecimiento celular (18,23 MJ) lo que demuestra que existe un aporte en la reducción de la huella de carbono del producto.
- La mezcla de diésel de origen fósil y biodiesel al 10% confiere valores de HHV superiores a dicha mezcla, la diferencia del HHV entre diésel fósil y B10 no es significativa (0,91%) mientras que entre B10 y B100 se puede considerar como significativa (11,24%). Estos valores

permiten concluir que el rendimiento de motores será superior utilizando el biocombustible en mezcla B10 frente al biodiesel puro, siendo esto determinante en la factibilidad económica de un proyecto.

- Los parámetros de la norma ASTM D7467 analizados en una mezcla de biodiesel B10 muestran que los valores de Punto de Inflamabilidad ($70,1^{\circ}\text{C}$) y %BSW (0,025%) cumplen con los límites especificados, lo cual es consistente con los resultados obtenidos de valor calorífico. Sin embargo la mezcla de combustible no cumple con los valores establecidos para Viscosidad y Residuo Carbonoso, este último muy por encima del límite. Esto puede deberse a factores como: degradación térmica y oxidativa, polimerización y el tipo de ácidos grasos predominantes en el aceite algal (ácido linolénico C18:3) ya que la viscosidad cinemática está en función de la longitud de la cadena de carbonos y el número y posición de los dobles enlaces. La cantidad de residuos carbonosos en cambio tiene relación con el proceso de transesterificación, valores altos muestra que existe un alto contenido de glicéridos y otros contaminantes como catalizador o jabón.
- Los resultados de niveles de opacidad en la combustión del diésel de petróleo cumple con el valor límite definido para el año de fabricación del motor de prueba (50%), sin embargo la diferencia de los valores para la mezcla B10 (1,92%) es remarcable, ya que se traduce en una mejor calidad del aire debido a que la opacidad es un parámetro que se relaciona directamente con la concentración de material particulado presente en los gases de combustión.
- Los subproductos del proceso pueden ser reusados o reciclados. El hexano se recupera a través de un rotavapor para ser utilizado en la siguiente extracción, el agua del cultivo al ser agua tratada es descargada al ambiente previa verificación de los parámetros correspondientes, la biomasa resultante de la extracción puede ser utilizada como fertilizante natural o en procesos de compostaje.
- Con la reducción en los costos del petróleo la factibilidad económica de la producción a gran escala de este tipo de biocombustible se ve reducida, sin embargo vale la pena analizar el costo ambiental que representa el obtener biodiesel a partir de un residuo cuyo tratamiento

y disposición final típicamente representa un gasto. Las emisiones de la combustión del biodiesel no constituyen un impacto negativo sobre el calentamiento global ya que corresponden al CO₂ que inicialmente fue capturado del ambiente por las microalgas como fuente de carbono para su crecimiento.

5.2 Recomendaciones

- Las microalgas son organismos que poseen varias aplicaciones en la industria. La producción de biocombustibles a partir de las mismas es una materia que aún se encuentra en desarrollo para poder alcanzar niveles de industrialización, si bien los costos de producción en este estudio no son altos, es importante continuar con el desarrollo las técnicas de cultivo, cosecha y extracción de aceite de tal forma que el sistema resulte sustentable en función de la energía producida.
- El perfil lipídico de la biomasa microalgal indica que existe una concentración importante de ácidos grasos esenciales (37,1% respecto al peso seco de la muestra), lo cual es un indicador de que se mantienen las condiciones de estrés necesarias para inducir la producción y acumulación celular de lípidos pero a su vez sugiere la necesidad de mejorar las condiciones de la extracción de aceite, ya que el rendimiento podría ser mayor.
- Si bien este estudio se ha realizado a escala de laboratorio, se puede extrapolar a una producción de mayor escala ya que el esquema general del proceso no tiene variaciones. La implementación de lagunas abiertas o fotobiorreactores no requiere de mayor inversión.
- Es necesario mejorar el rendimiento de la reacción de transesterificación ya que esto se traduce en una mejora de los parámetros de calidad, especialmente es necesario reducir los valores de Residuo Carbonoso que al ser altos pueden provocar depósitos en los inyectores y reducir la vida útil de los motores.
- La captura de CO₂ puede mejorarse mediante la implementación de sistemas de inyección del gas, en caso de que se establecieran facilidades de mayor capacidad, la cercanía de la central termoeléctrica facilitaría.
- Junto con el mejoramiento del rendimiento de biomasa y extracción de aceite, es importante realizar pruebas en motores con las mezclas que se utilizan comercialmente, B100, B20 y B10, los resultados que se

obtengan podrían ayudar a definir la concentración de biomasa mínima requerida por lote de cultivo.

- Incluso si el cultivo con fines energéticos de microalgas no resultara sostenible después de las mejoras recomendadas, es importante considerar que la biomasa puede ser utilizada con fines nutricionales para el suelo, ya que el nitrógeno, fósforo y micronutrientes que toman de las aguas residuales son asimilados y transformados en formas que pueden ser aprovechadas por las plantas. De un análisis realizado a la biomasa seca posterior a la extracción de lípidos, se obtuvo una cantidad de nitrógeno total de 0,8% en base seca, valor considerado muy alto respecto al aporte de otros biofertilizantes (alrededor de 0,4% en el caso de bioles).

BIBLIOGRAFÍA

Acero, A., Rodríguez, C., & Ciroth, A. (2015). *LCIA Methods - Impact assessment methods in Life Cycle Assessment and their Impact categories*. GreenDelta. Versión 1.5.4.

Adey, W., Kangas, P., & Mulbry, W. (2011). *Algal Turf Scrubbing: Cleaning Surface Waters with Solar Energy While Producing a Biofuel*. *BioScience*, 61(6), 434 - 441.

AlgaeBAse. (2016). Retrieved marzo 09, 2016, from <http://www.algaebase.org/>

Arias, M., Martínez, A., & Cañizares, R. (2013). *Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parámetros de cultivo que afectan la producción de lípidos*. *Acta Biol Colomb*, 18(1), 43 - 48.

Avinash, A., Subramaniam, D., & Murugesan, A. (2014). *Bio-diesel - A global scenario*. *Renew Sustain Energy Rev*(29), 517 - 527.

Banco Mundial. (2016). *Emisiones de CO2 (toneladas métricas per cápita)*. Retrieved marzo 2016, from <http://datos.bancomundial.org/indicador/EN.ATM.CO2E.PC>

Behera, S., Singh, R., Arora, R., Kumar Sharma, N., Shukla, M., & Kumar, S. (2015). *Scope of algae as third generation biofuels*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2(90), 1-13.

Bertucco, A. &. (2014). *Continuous microalgal cultivation in a laboratory-scale photobioreactor under seasonal day-night irradiation: experiments and simulation*. *Bioprocess Biosyst Eng*.

Biofuel.org.uk. (2010). Retrieved 2016, from *Third Generation Biofuels*:

<http://biofuel.org.uk/third-generation-biofuels.html>

Biofuels digest. (2010). Retrieved may 2016, from What are – and who's making – 2G, 3G and 4G biofuels?: <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2010/05/18/3g-4g-a-taxonomy-for-far-out-%E2%80%94-but-not-far-away-%E2%80%94-biofuels/>

Biopact. (2007). A quick look at "fourth generation" biofuels. Retrieved 2016, from <http://global.mongabay.com/news/bioenergy/2007/10/quick-look-at-fourth-generation.html>

Borowitzka, M. &. (Ed.). (2013). Algae for Biofuels and Energy. Australia: Springer.

Bravo, E. (2006). Biocombustibles, Cultivos Energéticos y soberanía alimentaria en América Latina: Encendiendo el debate sobre biocombustibles. Acción Ecológica, Quito.

*Brennan, L. &. (2010). Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. *Renew Sustain Energy Rev*(14), 557 - 577.*

*Canakci, M., & Van Gerpen, J. (1999). Biodiesel production via acid catalysis. *Trans Am Soc Agric Eng*(42), 1203-1210.*

*Cantero, K., & Faber, J. (2010). Simulación de un Proceso de Producción de Biodiesel por Lotes a Través de Medios Químicos. *Prospect*, 8(1), 35 - 42.*

*Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*(25), 294 - 306.*

*Cohen, Z., Norman, H., & Heimer, Y. M. (1995). Microalgae as a source of α -3 fatty acids. *World Rev Nutr Diet*, 77, 1-31.*

Converti, A., Casazza, A., Ortiz, E., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). *Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production. Chem Eng Process(48), 1146 - 1151.*

Dasari, M., Kiatsimkul, W., Sutterlin, W., & Suppes, G. (2005). *Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. Applied Catalysis A: General, 281(1-2), 225 - 231.*

De Boer, K., Moheimani, N., Borowitzka, M., & Bahri, P. (2012). *Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption. J Appl Phycol(24), 1681 - 1698.*

Demirbas, A., & Demirbas, M. F. (Eds.). (2010). *Algae Energy - Algae as a New Source of Biodiesel. London, UK: Springer.*

EEQ. (2014). *La EEQ desarrolla proyecto de producción de biodiesel a partir de algas. Retrieved octubre 2015, from http://www.eeq.com.ec:8080/nosotros/comunicamos/noticias/-/asset_publisher/PDd0RO7ISu5d/content/id/55397*

EPA - SAIC. (2006). *Life Cycle Assessment: Principles and Practice. National Risk Management Research Laboratory, Ohio.*

EPMAPS. (2013). *Se firman estudios de factibilidad para la planta de tratamiento de aguas residuales de Vindobona. Retrieved noviembre 2015, from <http://www.aguaquito.gob.ec/urgente/se-firman-estudios-de-factibilidad-para-la-planta-de-tratamiento-de-aguas-residuales-de>*

Figuroa, F. (2008). *"Tablero de comando" para la promoción de los biocombustibles en el Ecuador. CEPAL - GTZ.*

Freedman, B., Pryde, E. H., & Mounts, T. L. (1984). *Variables affecting*

the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc*, 61, 1638 - 1643.

Fuentes-Grünewald, C., Garcés, E., Alacid, E., Rossi, S., & Camp, J. (2013). Biomass and lipid production of dinoflagellates and raphidophytes in indoor and outdoor photobioreactors. *Mar Biotechnol*, 15(1), 37 - 47.

Fulke, A. C. (2013). Potential of wastewater grown algae for biodiesel production and CO₂ sequestration. *African Journal of Biotechnology*, 12(20), 2939 - 2948.

Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Naseri, A., Montazeri-Najafabady, N., Mobasher, M., & Dabbagh, F. (2012). Microalgae Biofuel Potentials (Review). *Appl Biochem Microbiol*, 48(2), 126 - 144.

Gordon, R. &. (Ed.). (2012). *The Science of Algal Fuels*. Dordrecht, Netherlands: Springer.

Gouveia, L. (2011). *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. Portugal: Springer.

Guine'e, J. B. (Ed.). (2002). *Handbook on Life Cycle Assessment: Operational Guide to the ISO Standards*. New York: Springer.

Hakeem, K. R., Jawaid, M., & Rashid, U. (Eds.). (2014). *Biomass and Bioenergy: Processing and Properties*. Switzerland: Springer.

Hall, C., & Benemann, J. (2011). Oil from Algae? *BioScience*, 61(10), 741 - 742.

Izurieta, F., Corral, Á., & Guayanlema, V. (2013). Identificación de las necesidades de eficiencia energética en el transporte. INER, Quito.

Khan, S., Rashmi, H., Hussain, M. H., Prasad, S., & Banerjee, U. C. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India.

Renewable and Sustainable Energy Reviews, 13(9), 2361 - 2372.

Khozin-Goldberg, I., & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67(7), 697 - 701.

Kinney, A. J., & Clemente, T. E. (2005). Modifying soybean oil for enhanced performance in biodiesel blends. *Fuel Process Technol*, 86(10), 1137-1147.

Kotrba, R. (2015). State-of-the-Art Algae Photobioreactors. *Biodiesel Magazine*. Retrieved 2016, from <http://www.biodieselmagazine.com/articles/456920/state-of-the-art-algae-photobioreactors>

Laboratory, N. R. (2009). *Biodiesel Handling and Use Guide*.

Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.-P., & Bernard, O. (2009). Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. *Environmental Science & Technology*(43), 6475 - 6481.

Lee, J. (Ed.). (2013). *Biofuels and Bioproducts*. New York: Springer.

Leite, G., Abdelaziz, A., & Hallenbeck, P. (2013). Algal Biofuels: Challenges and oportunities. *Biores Technol*(145), 134 - 141.

Liu J., Z. Y. (2013). Freshwater microalgae harvested via flocculation induced by pH decrease. *Biotechnology for Biofuels*(6), 98.

Lourenço, S. (2006). *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa.

Maity, P. H. (2014). The production of biofuel and bioelectricity associated with wastewater treatment by green algae. *Energy*(78), 94 - 103.

Milledge, J. &. (2013). A review of the harvesting of micro-algae for

biofuel production. Rev Environ Sci Biotechnol(12), 165 - 178.

Municipio de Guayaquil. (2015). Municipio de Guayaquil inició construcción de planta de tratamiento Pantano Secos Artificiales en el sector de El Salitral-Tres Bocas. Retrieved noviembre 2015, from <http://www.guayaquil.gov.ec/content/municipio-de-guayaquil-inici%C3%B3-construcci%C3%B3n-de-planta-de-tratamiento-pantano-secos>

Mutanda, T. R. (2013). Sustainable Biodiesel Production Using Wastewater Streams and Microalgae in South Africa. Chemistry for Sustainable Development in Africa, 49 - 67.

Pacheco, F. (2013). Efeito de diferentes intensidades luminosas no crescimento em biomassa de Tetrastrum heteracanthum (NORDSTEDT) CHODAT como subsídio para a produção de biodiesel. Tesis licenciatura, Faculdade Católica do Espírito Santo, Espírito Santo - Brasil.

Pardal, A. (2012). Obtención de biodiesel por transesterificación de aceites vegetales: nuevos métodos de síntesis. Tesis doctoral, Universidad de Extremadura, España.

Pascuale, G. &. (2010). Biodiesel casero - Todo lo que hay que saber para fabricar un buen biodiesel. Centro de Estudios sobre el Desarrollo Sustentable, Buenos Aires - Argentina.

Passell, H. D. (2013). Algae biodiesel life cycle assessment using current commercial data. Journal of Environmental Management(129), 103 - 111.

Rebitzer, G., Ekvall, T., Frischknecht, R., Hunkeler, D., Norris, G., Rydberg, T., . . . Pennington, D. W. (2004). Life Cycle Assessment - Part I: Framework, goal and scope definition, inventory analysis, and applications.

Environment International(30), 701 - 720.

Salazar, L. (2012). *Evaluación de Métodos de Extracción de Aceite de Microalgas para la Producción de Biodiesel*. Universidad de Piura, Piura - Perú.

Samorì, C., López-Barreiro, D., Vet, R., Pezsolesi, L., Brilman, D., Galletti, P., & Tagliavini, E. (2013). *Effective lipid extraction from algae cultures using switchable solvents*. *Green Chem*(15), 353 - 356.

Sathish, A. &. (2012). *Biodiesel from mixed culture algae via wet lipid extraction procedure*. *Biores Technol*(118), 643 - 647.

Silva, E. (2005). *Sustentabilidade e ACV*. Itajubá.

Sydney, E., da Silva, T., Tokarski, A., Novak, A., Carvalho, J., Woiciechowski, C., . . . Soccol, C. (2011). *Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage*. *Appl Energy*(88), 3291 - 3294.

Vasundevan, P. T., & Briggs, M. (2008). *Biodiesel production - current state of the art and challenges*. *J Ind Microbiol Biotechnol*(35), 421-430.

Wang, Y. D., Al-Shemmeri, T., Eames, P., McMullan, J., Hewitt, N., & Huang, Y. (2006). *An experimental investigation of the performance and gaseous exhaust emissions of a diesel engine using blends of a vegetable oil*. *Applied Thermal Engineering*(26), 1684 - 1691.

Whalen, B., Willis, R., & Seefeldt, L. (2011). *Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures*. *Biores Technol*(102), 2724 - 2730.

Zbicinski, I., Stavenuiter, J., Kozłowska, B., & van de Coevering, H. (2006). *Product Design and Life Cycle Assessment*. Sweden: The Baltic

University Press.

Zhang, Y., Dub, M., McLean, D., & Kates, M. (2003). Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis. Biores Technol(90), 229 - 240.