

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Procedimiento de extracción de ácido láctico de un caldo de fermentación microbiana en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala

Trabajo de graduación presentado por Renata Tello Aguilar para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Química Industrial

Guatemala

2021

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Procedimiento de extracción de ácido láctico de un caldo de fermentación microbiana en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala

Trabajo de graduación presentado por Renata Tello Aguilar para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Química Industrial

Guatemala

2021

Vo. Bo. :

(f)

Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano, M. Sc.

Tribunal examinador:

(f)

Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano, M. Sc.

(f)

Ing. Carmen Alicia Ortiz Pinea, M.A.

(f)

Ing. Luis Ernesto Núñez González, M. Sc./MBA

Fecha de aprobación: Guatemala, 14 de mayo de 2021

PREFACIO

Desde que tengo memoria me ha interesado conocer el porqué de las cosas y el funcionamiento de las mismas. Es debido a este interés que decidí estudiar ingeniería. A través de los seis años de estudio, los procesos de producción para entregar un producto final, listo para su uso me han apasionado. Este Trabajo de Graduación sigue esta línea de pensamiento ya que se propone un método de extracción y purificación de ácido láctico, tomando la materia prima bruta proveniente de un proceso de fermentación y transformándola en un producto listo para utilizar en otro proceso productivo, la síntesis de PLA. Se comparan dos distintos métodos para proponer el más adecuado para su aplicación a nivel industrial.

En este trabajo agradezco principalmente a Dios por permitirme haber llegado hasta aquí, a mi familia y amigos que me han apoyado incondicionalmente, principalmente a Sebas que me enseñó a seguir mis sueños y hacer lo que me apasiona, a mis catedráticos, asesor y director de carrera, que me han dado los conocimientos y las herramientas necesarias para poder desarrollarme como profesional y me han transmitido su pasión por la ingeniería química. A todos los que de una u otra forma formaron parte de este viaje, gracias.

ÍNDICE

PREFACIO.....	v
ÍNDICE.....	vi
LISTADO DE CUADROS.....	viii
LISTADO DE FIGURAS.....	xii
LISTADO DE ECUACIONES	xvii
RESUMEN.....	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	3
III. OBJETIVOS.....	5
A. General.....	5
B. Específicos	5
IV. MARCO TEÓRICO	6
A. Ácido láctico	6
B. Plásticos biodegradables	14
C. Extracción líquido-líquido.....	17
D. Procedimientos de análisis	22
V. ANTECEDENTES	24
VI. METODOLOGÍA.....	41
A. PRIMERA ETAPA: Determinación de propiedades de caldo de fermentación	41
B. SEGUNDA ETAPA: Preparación de soluciones	43
C. TERCERA ETAPA: Regulación de propiedades	47
D. CUARTA ETAPA: Procedimientos de extracción y purificación.....	48
E. QUINTA ETAPA: Preparación de muestras	55
VII. RESULTADOS	57
A. Método de extracción propuesto	62
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	68
IX. CONCLUSIONES.....	78
X. RECOMENDACIONES	80
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
XII. APÉNDICE	85

A.	Datos originales.....	85
B.	Datos calculados.....	93
C.	Datos de reactivos y equipo	100
D.	Cálculos de muestra	103
E.	Análisis de error	109
F.	Cromatogramas	111
G.	Anexos.....	121
H.	Ilustraciones	125
XIII.	GLOSARIO.....	141

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1: Propiedades del ácido láctico 90% (m/m)	8
Cuadro 2: Métodos de extracción y purificación para ácido láctico	13
Cuadro 3: Propiedades de los solventes orgánicos utilizados	21
Cuadro 4: Estructuras químicas de los solventes orgánicos utilizados	21
Cuadro 5: Productos plásticos manufacturados en Guatemala junto a su valor comercial en 2019	35
Cuadro 6: Propiedades físicas determinadas experimentalmente para los caldos de fermentación utilizado para extraer ácido láctico.....	57
Cuadro 7: Concentración y contenido final promedio de ácido láctico, obtenidos del proceso de extracción líquido-líquido de la primera muestra de fermentación (caldo MF4.n de Barillas), partiendo de una concentración inicial de ácido láctico de 0.45 % (m/v) (1.125 g de ácido láctico en 25 mL de solución)	58
Cuadro 8: Concentración y contenido final promedio de ácido láctico, obtenidos del proceso de extracción líquido-líquido de la segunda muestra de fermentación (caldo MF5.n de Barillas), partiendo de una concentración inicial de ácido láctico de 1.36 % (m/v) (3.400 g de ácido láctico en 25 mL de solución)	59
Cuadro 9: Concentración y contenido final promedio de ácido láctico, obtenidos del proceso de extracción líquido-líquido de la tercera muestra de fermentación (caldo PFn.1 de Barillas), partiendo de una concentración inicial de ácido láctico de 1.82 % (m/v) (4.550 g de ácido láctico en 25 mL de solución).....	60
Cuadro 10: Concentración y contenido final promedio de ácido láctico, obtenidos del proceso de extracción líquido-líquido de solución blanco, partiendo de una concentración inicial de ácido láctico de 3.00 % (m/v) (7.500 g de ácido láctico en 25 mL de solución)	61
Cuadro 11: Concentración y contenido final promedio obtenidos de ácido láctico con formación de lactato de calcio, como producto intermedio, de acuerdo a datos de análisis por HPLC	62
Cuadro 12: Concentración inicial de ácido láctico y cantidad producida en las muestras proporcionadas de caldos (de Barillas), obtenidas por HPLC y cálculos (Estos caldos fueron usados para todas las pruebas de este estudio)	85

Cuadro 13: Tiempos utilizados para la determinación de la viscosidad de las muestras analizadas.....	85
Cuadro 14: Masas utilizadas para determinar la densidad del agua y de los caldos de fermentación de las muestras analizadas.....	86
Cuadro 15: Volumen recuperado en primera fermentación posterior a llevar a cabo la extracción líquido-líquido, utilizando una ampolla de decantación de 125 mL, partiendo de 45 mL de extracto.....	86
Cuadro 16: Volumen recuperado en segunda fermentación posterior a llevar a cabo la extracción líquido-líquido, utilizando una ampolla de decantación, partiendo de 45 mL de extracto.....	87
Cuadro 17: Volumen recuperado en tercera fermentación posterior a llevar a cabo la extracción líquido-líquido, utilizando una ampolla de decantación, partiendo de 45 mL de extracto.....	87
Cuadro 18: Cuantificación de ácido láctico obtenido de los procedimientos de extracción líquido-líquido llevados a cabo con la primera muestra de caldo de fermentación	88
Cuadro 19: Cuantificación de ácido láctico obtenido de los procedimientos de extracción líquido-líquido llevados a cabo con la segunda muestra de caldo de fermentación.....	88
Cuadro 20: Cuantificación de ácido láctico obtenido de los procedimientos de extracción líquido-líquido llevados a cabo con la tercera muestra de caldo de fermentación	89
Cuadro 21: Cuantificación de ácido láctico obtenido de los procedimientos de extracción líquido-líquido llevados a cabo con la la solución blanco de ácido láctico.....	90
Cuadro 22: Cantidad de reactivos utilizados durante el proceso de formación de lactato de calcio para extraer ácido láctico del caldo de fermentación.....	90
Cuadro 23: pH de las soluciones utilizadas, para monitorear el proceso de extracción y purificación de ácido láctico.....	91
Cuadro 24: Temperaturas de ebullición de la mezcla de caldo de fermentación con solución alcalina durante el proceso de formación de lactato de sodio para la extracción de ácido láctico.....	91
Cuadro 25: Cuantificación de ácido láctico obtenido posterior a los procedimientos de extracción y purificación por el método de formación de lactato de calcio como intermediario	92

Cuadro 26: Concentración de ácido láctico obtenido mediante un proceso de extracción líquido-líquido, basado en datos obtenidos del análisis de HPLC. Datos obtenidos de la primera muestra de fermentación analizada (caldo MF4.n de Barillas).....	93
Cuadro 27: Concentración de ácido láctico obtenido mediante un proceso de extracción líquido-líquido, basado en datos obtenidos del análisis de HPLC. Datos obtenidos de la segunda muestra de fermentación analizada (caldo MF5.n de Barillas)	94
Cuadro 28: Concentración de ácido láctico obtenido mediante un proceso de extracción líquido-líquido, basado en datos obtenidos del análisis de HPLC. Datos obtenidos de la tercera muestra de fermentación analizada (caldo PFn.1 de Barillas).....	95
Cuadro 29: Concentración de ácido láctico obtenido mediante un proceso de extracción líquido-líquido, basado en datos obtenidos del análisis de HPLC. Datos obtenidos de la solución blanco analizada (3% (m/v) de ácido láctico).....	96
Cuadro 30: Ácido láctico disuelto en agua y por ende no extraído ni contabilizado en análisis HPLC de la primera muestra de fermentación (caldo MF4.n Barillas) con una concentración inicial de ácido láctico de 0.45 % (m/v) (1.125 g de ácido láctico en 25 mL de solución)..	97
Cuadro 31: Ácido láctico disuelto en agua y por ende no extraído ni contabilizado en análisis HPLC de la segunda muestra de fermentación (caldo MF5.n Barillas) con una concentración inicial de ácido láctico de 1.36 % (m/v) (3.400 g de ácido láctico en 25 mL de solución)..	98
Cuadro 32: Ácido láctico disuelto en agua y por ende no extraído ni contabilizado en análisis HPLC de la tercera muestra de fermentación (caldo PFn.1 Barillas) con una concentración inicial de ácido láctico de 1.82 % (m/v) (4.550 g de ácido láctico en 25 mL de solución)..	99
Cuadro 33:Ácido láctico disuelto en agua y por ende no extraído ni contabilizado en análisis HPLC de la solución blanco con una concentración inicial de ácido láctico de 3.00 % (m/v) (7.500 g de ácido láctico en 25 mL de solución).....	99
Cuadro 34: Concentración de ácido láctico obtenido mediante un proceso de formación de lactato de calcio como intermediario, basado en datos obtenidos del análisis de HPLC. ...	100
Cuadro 35: Reactivos utilizados en la extracción líquido-líquido.....	100
Cuadro 36: Datos de balanza analítica	101
Cuadro 37: Datos de centrífuga utilizada para el procedimiento de extracción líquido-líquido	101
Cuadro 38: Datos de estufa eléctrica	101

Cuadro 39: Datos de potenciómetro	102
Cuadro 40: Datos de HPLC	102
Cuadro 41: Datos de cristalería utilizada en mediciones.....	102
Cuadro 42: Solubilidades de los reactivos en agua	121

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del monómero constituyente del PLA.	17
Figura 2: Diagrama de coordenadas triangulares para un sistema de tres líquidos en los que A y B son parcialmente solubles.	19
Figura 3: Capacidad de producción global de plásticos biodegradables y no degradables en 2020.	28
Figura 4: Capacidad de producción global de plásticos biodegradables y no degradables por tipo de material en 2020	28
Figura 5: Capacidad de producción mundial de bioplásticos en las principales industrias consumidoras de plásticos en 2020.	29
Figura 6: Exportaciones de Guatemala por sector, en 2018, según estudio realizado por la Oficina Económica y Comercial de España en Guatemala, utilizando datos del Banco Central de Guatemala.	30
Figura 7: Exportaciones de Guatemala por capítulos arancelarios, en 2018, según estudio realizado por la Oficina Económica y Comercial de España en Guatemala, utilizando datos del Banco Central de Guatemala.	31
Figura 8: Importaciones de Guatemala por sector, en 2018, según estudio realizado por la Oficina Económica y Comercial de España en Guatemala, utilizando datos del Banco Central de Guatemala.	32
Figura 9: Importaciones de Guatemala por capítulos arancelarios, en 2018, según estudio realizado por la Oficina Económica y Comercial de España en Guatemala, utilizando datos del Banco Central de Guatemala.	33
Figura 10: Principales productos de intercambio comercial de Guatemala. Datos obtenidos de un análisis de Comercio Exterior realizado por el Ministerio de Economía.	34
Figura 11: Proceso de producción de PLA partiendo de melaza llevado a cabo por CENGICAÑA en su informe anual 2018-2019.	37
Figura 12: Inversión total para la planta productora de PLA	37
Figura 13: Costos de producción total para la planta productora de PLA.	38
Figura 14: Representación, en porcentaje, de exportaciones en Guatemala en 2019.	38

Figura 15: Producción de azúcar en Guatemala en las zafras 2019-2020 y 2020-2021. Información obtenida de CENGICAÑA	40
Figura 16: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF2.12, extracción del primer caldo de fermentación (MF4.n de Barillas) utilizando octanol como solvente.....	111
Figura 17: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF2.3, extracción del primer caldo de fermentación (MF4.n de Barillas) utilizando éter dietílico como solvente	112
Figura 18: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF2.13, extracción del segundo caldo de fermentación (MF5.n de Barillas) utilizando octanol como solvente.....	113
Figura 19: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF2.11, extracción del segundo caldo de fermentación (MF5.n de Barillas) utilizando éter isopropílico como solvente.....	114
Figura 20: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF3.12, extracción del tercer caldo de fermentación (PFn.1 de Barillas) utilizando octanol como solvente.....	115
Figura 21: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF3.10, extracción del tercer caldo de fermentación (PFn.1 de Barillas) utilizando éter isopropílico como solvente.....	116
Figura 22: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF3.13, extracción de la solución blanco utilizando octanol como solvente.....	117
Figura 23: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF3.9, extracción de la solución blanco utilizando alcohol isoamílico como solvente.....	118
Figura 24: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF2.14, extracción del segundo caldo de fermentación (MF5.n de Barillas) utilizando el método de extracción de formación de lactato de calcio como intermediario	119
Figura 25: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF3.14, extracción de la solución blanco utilizando el método de extracción de formación de lactato de calcio como intermediario	120

Figura 26: Datos utilizados para la elaboración de la curva de calibración en el HPLC para la determinación de ácido láctico de las muestras MF3.1-15.....	121
Figura 27: Curva de calibración en el HPLC para la determinación de ácido láctico de las muestras MF3.1-15.....	122
Figura 28: Datos utilizados para la elaboración de la curva de calibración en el HPLC para la determinación de ácido láctico de las muestras MF2.1-16.....	122
Figura 29: Curva de calibración en el HPLC para la determinación de ácido láctico de las muestras MF2.1-16.....	122
Figura 30: Datos utilizados para la elaboración de la curva de calibración en el HPLC para la determinación de ácido láctico de las muestras F1M1-8, F2M1-7 y F3M2-7	123
Figura 31: Curva de calibración en el HPLC para la determinación de ácido láctico de las muestras F1M1-8, F2M1-7 y F3M2-7.....	123
Figura 32: Curva de calibración de pH utilizando una solución de HCl 4M.	124
Figura 33: Curva de calibración de pH utilizando una solución de H ₂ SO ₄	124
Figura 34: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del primer caldo de fermentación. Solventes de izquierda a derecha: Acetato de etilo, éter isopropílico, alcohol isoamílico, éter dietílico, 1-butanol, alcohol isobutílico, octanol.....	125
Figura 35: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando acetato de etilo como solvente.....	125
Figura 36: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando alcohol isoamílico como solvente.....	126
Figura 37: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando utilizando octanol como solvente	126
Figura 38: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando alcohol isobutílico como solvente	127
Figura 39: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando éter isopropílico como solvente	127
Figura 40: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando éter dietílico como solvente	128
Figura 41: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando 1-Butanol como solvente	128

Figura 42: Resultado de extracción líquido-líquido de la tercera muestra de fermentación utilizando, de izquierda a derecha, acetato de etilo, alcohol isoamílico, octanol y alcohol isobutílico como solventes. Resultado previo a separar las fases.....	129
Figura 43: Resultado de extracción líquido-líquido de la tercera muestra de fermentación utilizando, de izquierda a derecha, éter isopropílico, éter dietílico y 1-Butanol como solventes. Resultado previo a separar las fases.	129
Figura 44: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando acetato de etilo como solvente	130
Figura 45: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando alcohol isoamílico como solvente.....	130
Figura 46: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando octanol como solvente	131
Figura 47: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando alcohol isobutílico como solvente	131
Figura 48: Resultado de extracción líquido-líquido de la tercera muestra de fermentación utilizando alcohol isobutílico como solvente.	132
Figura 49: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando éter isopropílico como solvente	132
Figura 50: Resultado de extracción líquido-líquido de la tercera muestra de fermentación utilizando éter isopropílico como solvente.....	133
Figura 51: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando éter dietílico como solvente	133
Figura 52: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando 1-Butanol como solvente	134
Figura 53: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando acetato de etilo como solvente	134
Figura 54: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando alcohol isoamílico como solvente	135
Figura 55: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando octanol como solvente.....	135

Figura 56: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando alcohol isobutílico como solvente	136
Figura 57: Resultado de extracción líquido-líquido de la solución blanco utilizando alcohol isobutílico como solvente	136
Figura 58: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando éter isopropílico como solvente.....	137
Figura 59: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando éter dietílico como solvente.....	137
Figura 60: Resultado de extracción líquido-líquido de la solución blanco utilizando éter dietílico como solvente.....	138
Figura 61: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando 1-Butanol como solvente.....	138
Figura 62: Resultado de extracción líquido-líquido de la solución blanco utilizando 1-Butanol como solvente	139
Figura 63: Sistema de titulación armado de forma correcta.....	139
Figura 64: Procedimiento para doblar papel filtro y colocarlo de forma adecuada en embudo	140
Figura 65: Viscosímetro de Ostwald	140

LISTADO DE ECUACIONES

Cálculo 1: Determinación de densidad del caldo de fermentación (cf) utilizando un picnómetro.....	103
Cálculo 2: Determinación de viscosidad del caldo de fermentación (cf) utilizando un viscosímetro de Oswald y agua destilada a 20°C como fluido de referencia.....	104
Cálculo 3: Concentración real de ácido láctico en el extracto obtenido, basada en la concentración de la muestra analizada utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	105
Cálculo 4: Masa de ácido láctico presentes en el extracto analizado, utilizando la concentración real del extracto y el volumen del mismo.	106
Cálculo 5: Porcentaje de aumento de contenido de ácido láctico comparado con la cantidad inicial en el caldo de fermentación trabajado.	107
Cálculo 6: Concentración de ácido láctico en el caldo de fermentación utilizado	108
Cálculo 7: Propagación de error en una suma y/o resta de valores	109
Cálculo 8: Propagación de error en una multiplicación o división de valores	109

RESUMEN

El objetivo general de este trabajo es proponer el método de extracción de ácido láctico de un caldo de fermentación microbiana en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala. Para cumplir con este objetivo se evaluaron dos métodos de extracción: extracción líquido-líquido y extracción utilizando lactato de calcio como intermediario. Para llevar a cabo estos procesos se utilizaron tres caldos de fermentación del Trabajo de Graduación “Cinética de reacción para la síntesis fermentativa de ácido láctico usando melaza de caña de azúcar con la utilización de *Lactobacillus leichmannii*” de Barillas, 2021. Se utilizaron las muestras con concentraciones iniciales de ácido láctico de 0.45 % (m/v), 1.36 % (m/v) y 1.82 % (m/v). Además, se elaboró una solución blanco con concentración inicial de ácido láctico de 3.00 % (m/v) utilizando ácido láctico al 90 % (m/m).

Con el método de extracción líquido-líquido se evaluaron siete solventes orgánicos: acetato de etilo, éter dietílico, éter isopropílico, alcohol isoamílico, alcohol isobutílico, 1-butanol y octanol. Se utilizó volúmenes iguales de caldo de fermentación y solvente (25 mL de cada uno) para llevar a cabo la extracción. Las concentraciones fueron determinadas utilizando análisis con HPLC.

Para la extracción y purificación con la formación de lactato de calcio se utilizó 25 mL del caldo de fermentación y soluciones 0.1 M de hidróxido de calcio y 4 M de ácido sulfúrico para controlar el pH de la solución. Adicionalmente, se utilizó carbón activado para filtrar la solución obtenida posterior a la adición de las soluciones de Ca(OH)_2 y H_2SO_4 .

Se obtuvo una concentración promedio final de ácido láctico de $0.444 \pm 8.0 \times 10^{-4}$ % (m/v) utilizando el método de extracción y purificación con la formación intermedia de lactato de calcio y de $10.626 \pm 5.5 \times 10^{-4}$ % (m/v) utilizando el método de extracción líquido-líquido, utilizando octanol como solvente orgánico de extracción, con el cual se obtuvo la mayor concentración en comparación con los demás solventes evaluados. De acuerdo con estos resultados se concluyó que el mejor método para extraer y purificar ácido láctico es el

de extracción líquido-líquido utilizando octanol, en las condiciones evaluadas. Sin embargo, la concentración obtenida es muy baja como para purificar el ácido y evaluar la factibilidad en síntesis de PLA, por lo que se recomienda llevar a cabo la metodología expuesta en este trabajo de graduación con caldos filtrados y centrifugados de fermentación con concentraciones de ácido láctico mucho mayores y entonces determinar la concentración adecuada para utilizar los métodos expuestos.

Adicionalmente, se determinó las características fisicoquímicas de los caldos de fermentación analizados, obteniendo un rango de valores de 1.05 – 1.17 g/mL para la densidad, 2.36 – 6.98 cP para la viscosidad, 82.0 – 93.5 °C para el punto de ebullición y 4.32 – 4.83 para el pH.

I. INTRODUCCIÓN

El ácido láctico es un químico ampliamente utilizado en la industria, principalmente en industrias de cosméticos, alimentos, plásticos, textiles y agricultura. En la industria de plásticos se utiliza principalmente para la producción de ácido poliláctico (PLA).

En Guatemala, el azúcar, junto con sus derivados, fue el tercer producto de mayor exportación en 2018. Dada la abundancia del azúcar en el país, se propone utilizar melaza, procedente del proceso de producción de azúcar, como materia prima para la síntesis de ácido láctico por un proceso de fermentación, seguido de una extracción y purificación.

La extracción se define como un proceso de separación de un compuesto de una mezcla, utilizando un solvente y su afinidad selectiva al soluto. El principal objetivo de llevar a cabo una extracción es obtener un compuesto de forma más pura, eliminando los posibles componentes presentes en la solución original. Este proceso tiene amplias aplicaciones en la industria por su versatilidad, confiabilidad y amplio rango de aplicación ya que existen diversos métodos de extracción, aun cuando el soluto a separar sea un ácido orgánico.

La extracción de ácidos orgánicos, como el ácido láctico, es un proceso complejo y costoso. Los procesos más comunes para extraer ácidos orgánicos son precipitación, destilación, membranas de separación, extracción con solventes, adsorción y cromatografía de intercambio iónico como primera fase y cromatografía y cristalización como segunda. Adicionalmente, en la industria también se utilizan métodos de esterificación y filtración para extraer el ácido láctico específicamente (Guauque y Gómez, 2019).

Para llevar a cabo la extracción en uno de los métodos evaluados en este Trabajo de Graduación se utilizó una extracción líquido-líquido, la cual es una operación de extracción en la cual se pone en contacto un solvente con una mezcla donde se encuentra incluido el soluto deseado, formando así una nueva etapa del solvente añadido y el soluto (extracto), separado de la etapa pobre en soluto (refinado). Las operaciones de extracción líquido-líquido

pueden llevarse a cabo en una sola etapa, en cascada o a contracorriente (Treybal, 2007). En este Trabajo de Gradación se realizó un proceso de extracción en una etapa.

II. JUSTIFICACIÓN

El ácido láctico es un químico altamente utilizado en las industrias de plásticos biodegradables, cosméticos, alimentos, textiles, fármacos, entre otras. Uno de los usos principales del ácido láctico, y el de interés para este trabajo de graduación, es la producción de ácido poliláctico (PLA por sus siglas en inglés), el cual es un polímero utilizado en la fabricación de empaques en la industria de alimentos, automotriz, electrónica, de textiles, entre otras. Es debido principalmente a esta aplicación que el mercado de ácido láctico ha tenido un alza notable en los últimos años, con una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR por sus siglas en inglés) del 12.8 %, principalmente en la región Asia-Pacífico y Norteamérica (Markets And Markets, 2015).

Según estudios llevados a cabo por MarketsAndMarkets, el mercado internacional de ácido láctico reportó un valor de US\$1.1 mil millones para el 2020, y está proyectado que alcance los US\$ 2.1 mil millones en 2025. El mercado internacional de PLA tenía un valor aproximado de US\$ 786 millones en 2020 y podría alcanzar hasta los \$1.756 mil millones para 2025, indicando así que existe una gran posibilidad de inclusión de nuevos procesos de producción de ácido láctico. El alza notable en este mercado se debe principalmente al uso de ácido láctico como materia prima de PLA, que a su vez, es ampliamente utilizado en la producción de empaques de alimentos. Contar con un nuevo proceso para producción de ácido láctico es, por ende, de vital importancia.

Es debido al gran interés comercial que posee el ácido láctico que en este Trabajo de Graduación se hizo un estudio para proponer un procedimiento para extraer ácido láctico, obtenido previamente de un caldo de fermentación microbiana partiendo de melaza y utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 como cepa, para luego ser extraído.

Los procesos de extracción y purificación del ácido láctico tienen una alta importancia en la industria ya que influyen directamente en la calidad y por ende precio del ácido láctico, especialmente para las industrias de alimentos y plásticos. Este factor,

junto al hecho de que Guatemala es un país con abundancia de azúcar (12 ingenios llegando a producir en la zafra 2019-2020 2,763,656 t de azúcar), se propone este Trabajo de Graduación buscando un método de extracción de ácido láctico que satisfaga las necesidades del mercado y que entregue como producto final ácido láctico de alta pureza, para poder ser utilizado como materia prima para la síntesis de PLA.

III. OBJETIVOS

A. General

Proponer el método de extracción de ácido láctico de un caldo de fermentación microbiana en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala.

B. Específicos

1. Determinar las características fisicoquímicas: densidad, viscosidad, punto de ebullición y pH, del caldo de fermentación de *Lactobacillus Leichmannii*, que contiene ácido láctico.
2. Evaluar dos métodos para la extracción de ácido láctico del caldo de fermentación, utilizando diferentes solventes y calcular los rendimientos respectivos.
3. Desarrollar el método de extracción de ácido láctico a escala laboratorio en función del solvente con mejor rendimiento. Y según lo anterior hacer las modificaciones correspondientes.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Ácido láctico

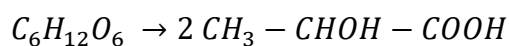
El ácido láctico es un ácido carboxílico con un grupo hidroxilo en el carbono adyacente a este grupo, de la forma $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) que fue descubierto por Scheele en 1780, quien lo aisló de la leche agria. Sin embargo, fue reconocido como un producto de la fermentación hasta 1847 por Blondeaur. En 1881, Littleton inició la producción industrial de ácido láctico utilizando la vía fermentativa (Parés i Farràs, 1997).

El ácido láctico se produce de forma natural por el cuerpo humano, como un producto final del metabolismo anaeróbico de la glucosa. El ácido láctico se obtiene por la reducción del ácido pirúvico en una reacción que es principalmente catalizada por deshidrogenasa láctica, utilizando nicotinamida adenina dinucleótico (NAD) como coenzima (Soler, 2000).

Adicionalmente, el ácido láctico puede ser sintetizado siguiendo una ruta química o una biotecnológica. La síntesis química puede utilizar como materia prima biomasa o bien derivados del petróleo. Al utilizar biomasa se deben utilizar tecnologías de conversión hidrotermal en condiciones alcalinas mientras que al partir de derivados del petróleo (acetaldehídos) se debe utilizar una solución en fase acuosa y bajo presión, utilizando cianuro de hidrógeno, ácido sulfúrico y metanol.

Si se utilizan rutas biotecnológicas, la materia prima para partir es biomasa y se utiliza un proceso de fermentación microbiana. En estas rutas se pueden obtener isómeros específicos (L o D) dependiendo de los microorganismos utilizados en la fermentación. En las rutas químicas únicamente es posible obtener una mezcla racémica entre los estereoisómeros L y D. Es debido a este factor principalmente que las síntesis por fermentaciones microbianas han estado ganando más protagonismo en la industria de producción de ácido láctico, ya que los polímeros sintetizados de isómeros puros, tanto L como D poseen propiedades superiores a los elaborados por mezclas racémicas, dando así propiedades más adecuadas para los plásticos (Vuan, 2018).

El ácido láctico posee dos estereoisómeros D(-) y L(+) como fue previamente mencionado, además de una forma racémica que es ópticamente inactiva. Ambos estereoisómeros tienen las mismas propiedades físicas y químicas, excepto en casos en los que en las reacciones se encuentre otro compuesto con actividad óptica. En una reacción normal siempre se obtiene todos los estereoisómeros; sin embargo, depende del mecanismo seguido, cuál isómero predominará en el producto de la fermentación. La reacción general de una fermentación láctica es la siguiente:

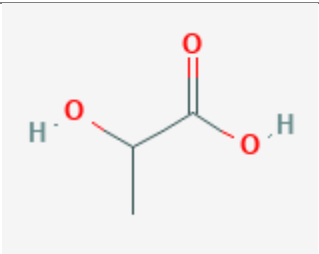


(Parés i Farràs, 1997)

El isómero L(+) es producido por el metabolismo humano al llevar a cabo una contracción muscular, mientras que el isómero D(-) es obtenido únicamente por una ruta sintética (química o biotecnológica).

El ácido láctico tiene múltiples usos en la industria. Su aplicación se puede observar en las industrias de: cosméticos, alimentos, farmacéuticos y químicos. Adicionalmente, los isómeros D(-) y L(+) descritos previamente son ampliamente deseados debido a su aplicación en la producción de polímeros lácticos biodegradables, como el PLA (Serna-Cock y Rodríguez, 2005).

Cuadro 1: Propiedades del ácido láctico 90% (m/m)

Estructura química	
Peso molecular	90.08 g/mol
Estado físico	Líquido incoloro o levemente amarillo
Punto de ebullición	122 °C (a 20 hPa)
Punto de fusión	18 °C
Punto de inflamación	113 °C
Densidad	1.21 g/mL (a 20 °C)
Solubilidad	Completamente soluble en agua
Viscosidad dinámica	7.0 cP a 20 °C
pH	2.8

Datos obtenidos de ficha técnica del reactivo utilizado en la experimentación: ácido láctico al 90 %.

1. Uso industrial

El ácido láctico es ampliamente utilizado en la industria. Según Herryman y Blanco, en 2005 aproximadamente el 85 % del ácido láctico producido es utilizado en la industria alimenticia, mientras que el restante 15 % se distribuía entre las industrias farmacéuticas, de textiles, de plásticos, agroquímicas y de cosméticos, entre otras.

Actualmente, según el estudio llevado a cabo por MarketsAndMarkets, los principales usos del ácido láctico son: producción de polímeros biodegradables, comidas y bebidas, farmacéutico, producto de cuidado personal y otros.

Adicionalmente, en 2013, la demanda anual de ácido láctico alcanzaba las 714.2 toneladas, esperando llegar a una demanda para el año 2020 de 1,960.1 toneladas. Los mayores consumidores de ácido láctico a nivel mundial son Estados Unidos, China y Europa Occidental. Por otro lado, los mayores productores de ácido láctico a nivel mundial son PURAC, Cargill y Henan Jindan Lactic Acid Technology Co., Ltd (Komesu, *et al*, 2017).

Uno de los principales beneficios del ácido láctico es su estado físico, ya que, si se trabaja con alguno de los estereoisómeros o la forma racémica activa, estos se encontrarán en estado líquido. En estado puro; sin embargo, son sólidos altamente higroscópicos, lo que hace su utilización ampliamente factible (Serna-Cock y Rodríguez, 2005).

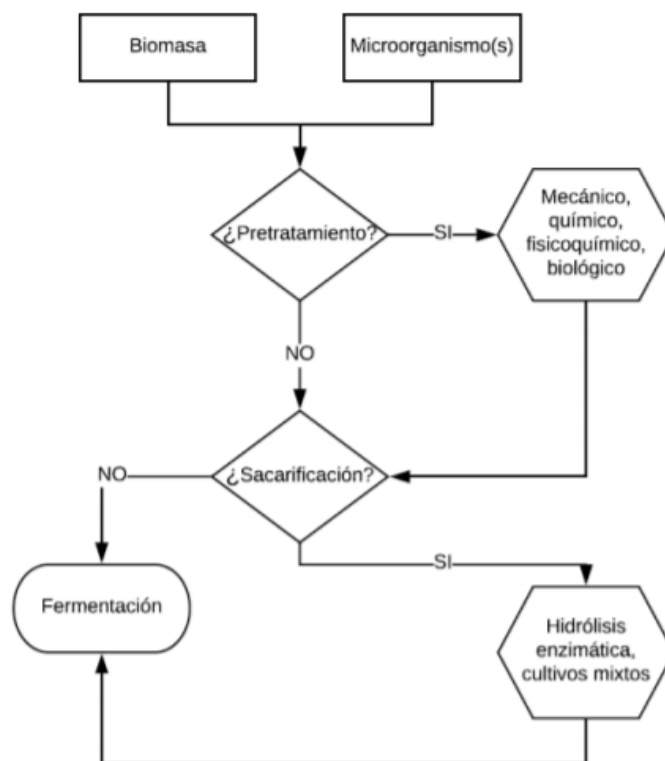
2. Síntesis

El ácido láctico es obtenido principalmente por dos vías: química o biotecnológica. En la producción química, si se parte de recursos derivados del petróleo, se usa la reacción de ácido cianhídrico (HCN) con acetaldehído, formando así un lactonitrilo que posteriormente, por una ionización, puede obtenerse ácido láctico. Adicionalmente, reemplazando la reacción con HCN se puede hacer reaccionar el acetaldehído con monóxido de carbono (CO) y agua (H₂O), utilizando ácido sulfúrico (H₂SO₄) como catalizador. Estas reacciones deben controlarse con precaución debido a la alta toxicidad de los compuestos (HCN y H₂SO₄). En esta vía sintética se obtiene una mezcla entre los isómeros L(+) y D(-) ópticamente inactivos, lo cual no es deseado en la industria y conduce a que esta vía de producción no sea muy utilizada (Serna-Cock y Rodríguez, 2005). Adicionalmente, este mecanismo de síntesis de ácido láctico ha sido el único que ha sido comprobado ser técnica y económicamente rentable.

Siempre siguiendo una ruta química, el ácido láctico puede ser sintetizado partiendo de biomasa como materia prima aplicando procesos de combustión directa, pirólisis y conversión hidrotermal (HTC). El proceso de HTC es el más rentable para la síntesis de ácido láctico y utiliza agua subcrítica y supercrítica como medio de reacción. En este proceso la celulosa presente en la biomasa debe ser hidrolizada a monosacáridos (glucosa) o oligosacáridos. La glucosa es oxidada, en un medio alcalino, a gliceraldehído, precursor de ácido láctico, formando piruvaldehído como producto intermedio (Vuan, 2018).

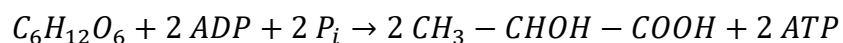
La obtención de ácido láctico por vía biotecnológica se lleva a cabo por la fermentación de compuestos ricos en carbono. La fermentación puede llevarse a cabo utilizando bacterias u hongos. Las principales bacterias utilizadas para esta síntesis son las BAL (bacterias ácido lácticas) las cuales comparten características como ser anaeróbicas facultativas, catalasa negativa, no presentan motilidad, no forman esporas, tienen alta tolerancia a pH más altos (mayores a 4) y pueden desarrollarse en rangos de temperatura desde 20 a 45 °C, estos factores las hace adecuadas y efectivas en el medio ácido que predominará durante la fermentación. Adicionalmente, las BAL pueden ser clasificadas según su producción: homofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas (Vuan, 2018). Las cepas más utilizadas para las fermentaciones son las de la familia *Lactobacillus*, como las *Lactobacillus delbrueckii*, *L. amylophilus*, *L. bulgaricus* y *L. leichmanii* según Jamshidian *et al.* la cual fue utilizada en la fermentación para producir el ácido láctico con el que se trabajó en este estudio. Además de las BAL, el ácido láctico puede ser producir utilizando hongos como *Rhizopus* (*Rhizopus oryzae*), *Mucor* y *Monilia*. Este tipo de síntesis produce isómeros L(+) o D(-) ópticamente activos, lo que la hace el método más utilizado en la producción de ácido láctico y el seleccionado para la producción del caldo de fermentación utilizado como punto de partida en este trabajo de graduación (Serna-Cock y Rodríguez, 2005). Una vez seleccionada la biomasa y el microorganismo adecuado, el proceso de síntesis de ácido láctico por ruta biotecnológica es el siguiente según Vuan 2018.

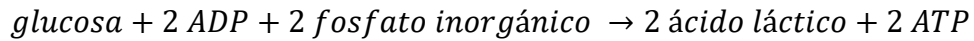
Figura 1: Síntesis de ácido láctico mediante una ruta biotecnológica utilizando biomasa como materia prima.



El ácido láctico, a nivel industrial, es mayormente producido por fermentación microbiana, ya sea homofermentativa o heterofermentativa (prefiriendo la homofermentativa debido a su selectividad), por las razones previamente expuestas. Usualmente, la materia prima utilizada es un residuo orgánico, lo que hace que el proceso sea menos contaminante. Además, para el proceso de fermentación no se utilizan combustibles fósiles.

Dentro del grupo recomendado de bacterias para producir ácido láctico se encuentra el tipo de homofermentativas. Estas bacterias producen únicamente un tipo de estereoisómero del ácido láctico y por ende su rendimiento es mayor. La ecuación general de esta reacción se presenta a continuación:





El fosfato inorgánico (P_i) es producido por la ruptura de ATP, y por lo tanto es utilizado, junto al ADP para regenerarlo. (Serna-Cock y Rodríguez, 2005).

Una síntesis llevada a cabo por ruta química no es ampliamente utilizada en la industria debido a que tiene un bajo desempeño provocado por la dependencia de un producto alternativo de otro producto industrial. Es por esto que en este trabajo, se usó ácido láctico producido por un proceso fermentativo. De esta forma se puede representar mejor el proceso a seguir a nivel industrial.

3. Métodos de extracción

A continuación, se presenta los métodos seleccionados de extracción y purificación del ácido láctico tomando en cuenta la tecnología y equipos disponibles en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala.

Cuadro 2: Métodos de extracción y purificación para ácido láctico

FORMA DEL SUSTRATO	MÉTODO	MATERIALES NECESARIOS	OBSERVACIONES
Ácido láctico en caldo de fermentación	Purificación de ácido láctico	Ca (OH) ₂ (aumentar pH) H ₂ SO ₄ (formación de ácido) Carbón activado (1 g/L) Ozono (30 L/min)	<ul style="list-style-type: none"> ● No se obtiene totalidad de ácido ya que parte (hasta 18%) por retención en carbón activado ● Necesario uso de ozono
Ácido láctico en caldo de fermentación	Extracción líquido-líquido	HCl (ajuste de pH a 3) Acetato de etilo (1) Eter dietílico (5) Alcohol isobutílico (2) 1-Butanol (3) Alcohol isoamílico (4) Éter isopropílico Ampoyas de separación	<ul style="list-style-type: none"> ● 5 mL de solución (ajustado pH) se coloca en matraces con distintos solventes orgánicos ● Se agita a 150 rpm 30 min ● Se separa con ampollas de decantación.
Sal de calcio	Cristalización de lactato de calcio	H ₂ SO ₄	<ul style="list-style-type: none"> ● Sal cruda del caldo de fermentación se cristaliza, disuelve y acidifica para obtener ácido láctico
Sal de calcio	Recristalización de lactato de zinc	ZnCO ₃ (transformar sal de calcio en lactato de zinc) H ₂ SO ₄ (precipitación del zinc en exceso)	<ul style="list-style-type: none"> ● Sal cruda se convierte a lactato, se recristaliza y disuelve en agua ● Zinc en exceso y se precipita
Ácido láctico en caldo de fermentación	Separación e hidrólisis de ésteres lácticos	Vapor a P _{atm}	<ul style="list-style-type: none"> ● Lactatos de metilo, etilo, propilo, isopropilo o butilo se hidrolizan fácilmente. ● Concentrar residuo al vacío

Notas: Procedimiento de extracción de purificación de ácido láctico y extracción líquido-líquido fueron obtenidos de Núñez *et al*, 2009. Procedimiento de cristalización de lactato de calcio se obtuvo de Xu y Xu, 2014. Procedimiento de cristalización de lactato de zinc se extrajo de Komesu *et al*, 2017. Procedimiento de separación e hidrólisis de ésteres lácticos se obtuvo de Sun *et al*, 2006.

De las técnicas de extracción y purificación presentadas en el Cuadro 2, una de las más efectivas es la extracción líquido-líquido utilizando solventes orgánicos debido a que los solventes son altamente selectivos, logrando así altas eficiencias de extracción y purificación. Además, es necesario regular el pH antes de la extracción ya que no es el adecuado para el uso de los solventes orgánicos (Serna-Cock y Rodríguez, 2005).

B. Plásticos biodegradables

Los plásticos biodegradables son aquellos que pueden ser descompuestos de forma aeróbica o anaeróbica por acción de microorganismos en condiciones ambientales adecuadas, en un periodo de tiempo establecido, producir un alto porcentaje de CO₂ y reducir el tamaño de las piezas del material en forma sustancial. Pueden obtenerse a partir de recursos renovables o de materia fósil. La principal forma de obtener estos polímeros es por fermentación y síntesis. Los plásticos biodegradables más comunes son: Biopol™, poliésteres copolímeros del tipo polihidroxibutirato (PHB)/polihidroxivalerato (PHV), pululano y el PLA, entre muchos otros (Plastivida. 2009).

Ya que el objetivo principal de este trabajo de graduación persigue la extracción y purificación de ácido láctico para evaluar el uso en producción de PLA, se dará principal enfoque a este plástico biodegradable.

1. Ácido poliláctico (PLA)

El PLA es el más conocido de los plásticos biodegradables y se caracteriza por ser fabricado a partir de ácido láctico proveniente de fermentación de fuentes de azúcar, como los almidones, obtenido de fuentes naturales como papa, trigo o maíz (Plastivida. 2009).

a. Uso en la industria

Los plásticos biodegradables como el PLA son ampliamente utilizados en la industria de empaques y son un material innovador. Por otra parte, se ha utilizado hasta la fecha polímeros derivados del petróleo como empaques debido a su alta durabilidad y resistencia. Adicionalmente, estos polímeros poseen un bajo costo y tiempo de producción muy corto debido al alto desarrollo tecnológico de la industria. Estos materiales cuentan con un buen desempeño, comprobado en el tiempo que se han utilizado en la industria. Algunas propiedades que caben resaltar de estos materiales son sus buenas propiedades como barrera ante contaminantes, protegiendo así el material empacado y buena estabilidad ante el calor (Jamshidian *et al*, 2010). Sin embargo, estos polímeros derivados del petróleo cuentan con varias desventajas, como utilización y por ende, disminución de las reservas de petróleo y gas, incremento en los precios del petróleo y gas, de acuerdo con la demanda por este mercado de empaques, altos tiempos y complicados procesos de degradación, afectando así al ambiente, procesos de reciclado con altos costos y altos riesgos de contaminación cruzada y posible contaminación al consumidor de acuerdo con los componentes de estos polímeros (Jamshidian *et al*, 2010).

El uso de biopolímeros, como el PLA, reduce muchas de las desventajas que presentan originalmente los polímeros derivados del petróleo, debido a que proceden de fuentes naturales, como polisacáridos, proteínas y algas procariotas marinas. Además, pueden producirse por síntesis química de monómeros derivados de la naturaleza, como es el ejemplo del PLA, producido a partir de ácido láctico del metabolismo de microorganismos o bacterias genéticamente modificadas o por síntesis partiendo de derivados del petróleo (Jamshidian *et al*, 2010).

b. Obtención

La producción del PLA tiene muchas ventajas, como lo son: el monómero láctico puede ser producido a partir de ácido láctico, provee ahorros energéticos en el proceso de

obtención, puede ser descompuesto a ácido láctico de vuelta por hidrólisis o alcoholisis, producción de empaque papel-plástico compostable, mejoramiento de la economía de agricultura ya que es posible el uso de residuos que se pueden aprovechar o algunos cultivos destinados para el efecto, fácil acople de propiedades físicas de acuerdo con modificaciones del material.

El PLA se puede obtener por tecnologías combinadas de agricultura e industria, como lo es el crecimiento de cultivos, tecnologías biológicas, como la fermentación o tecnologías químicas, como la polimerización (Jamshidian *et al*, 2010).

c. Proceso productivo

El PLA se obtiene por un proceso de polimerización del ácido láctico, para obtener largas cadenas moleculares (Plastivida. 2009).

Las tres principales rutas para producir PLA son polimerización directa por condensación, policondensación directa usando una solución azeotrópica y polimerización usando la formación de lactida. La lactida es un diéster cíclico del ácido láctico.

En la polimerización directa por condensación se produce una esterificación de los monómeros con ayuda de solventes, eliminando el agua usando vacío y calentamiento. Con este método no se obtiene PLA de alto peso molecular, por lo que su uso para empaques es poco viable.

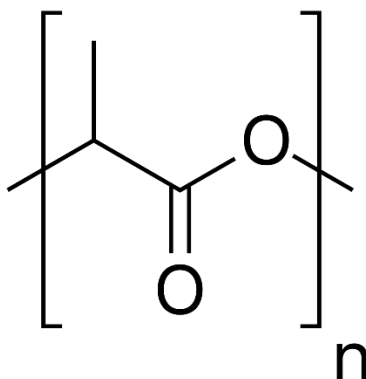
La policondensación directa con una solución azeotrópica es el método más utilizado para obtener PLA de alto peso molecular. Este producto se obtiene debido a que el uso de una solución azeotrópica disminuye la presión necesaria para llevar a cabo el proceso de destilación y por ende, facilita la extracción del PLA del solvente en el que se encuentre.

A pesar de que con la policondensación directa se obtiene buenos rendimientos y PLA de alto peso molecular, a nivel industrial el método de producción más utilizado es la

polimerización con la formación de lactida. En este método se obtiene PLA con una destilación a altas temperaturas y utilizando vacío. Posteriormente, se lleva a cabo una polimerización por apertura de anillo.

A continuación, se presenta la estructura química del monómero formado para posteriormente llevar a cabo la polimerización del PLA.

Figura 2: Estructura del monómero constituyente del PLA.



C. Extracción líquido-líquido

Es una operación de extracción en la cual se pone en contacto un solvente con una mezcla donde se encuentra incluido el soluto deseado, formando así una nueva etapa del solvente añadido y el soluto (extracto), separado de la etapa pobre en soluto (refinado). Las operaciones de extracción líquido-líquido pueden llevarse a cabo en una sola etapa, en cascada o a contracorriente (Treybal, 2007).

La extracción aumenta conforme se utilizan etapas múltiples, debido a que se aprovecha la afinidad de los componentes de la mezcla inicial a los solventes utilizados. Otro método para aumentar la eficiencia de extracción es el uso de reflujo. Además, se puede utilizar dos disolventes mezclados para lograr una mejor extracción del soluto. Los solventes utilizados deben ser escogidos según su afinidad a los isómeros del soluto (en caso existieran)

para asegurar así la extracción de la mayor cantidad posible de del soluto, en todas sus formas (Treybal, 2007).

La extracción líquido-líquido, en comparación con otros métodos de separación como la destilación o la evaporación, debe evaluarse económicamente ya que no se da una separación directa, sino que se forma una nueva solución que debe ser separada posteriormente ya sea por destilación o por evaporación. Se utiliza la extracción debido a su selectividad entre solvente y soluto.

Además, la extracción líquido-líquido, utilizada previo a una destilación o evaporación, proporciona una opción más económica de extraer un soluto de una solución acuosa. Esto se debe a que evaporar el agua para obtener el soluto requiere mayor energía que evaporar un solvente orgánico con menor punto de ebullición que el agua.

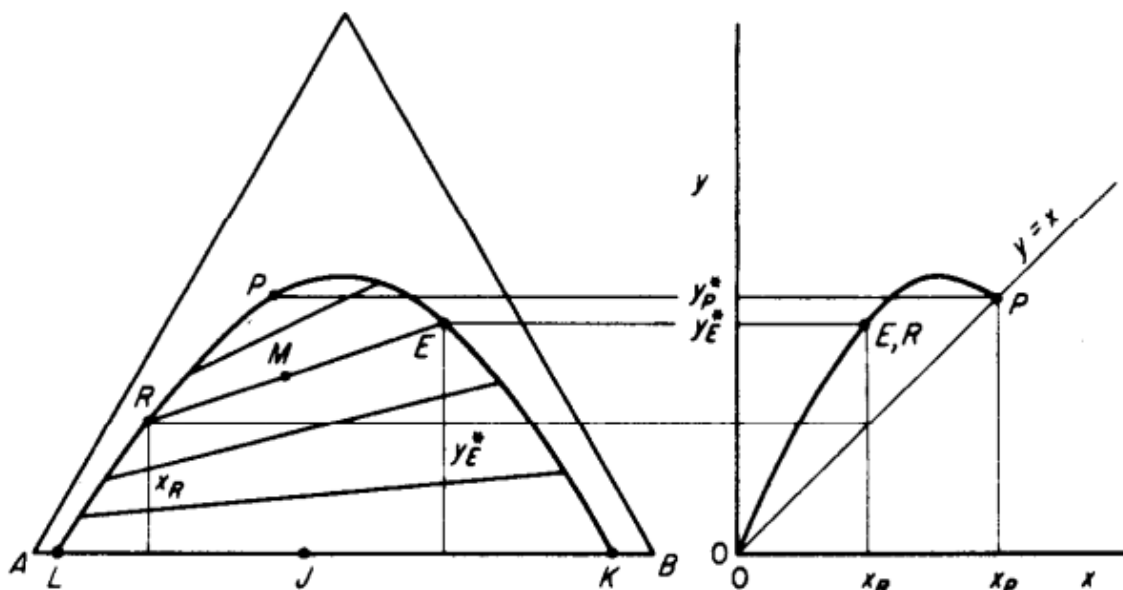
Como se mencionó anteriormente, es necesario llevar a cabo un proceso de extracción de varias etapas para obtener un porcentaje aceptable de ácido láctico, razón principal por la que los métodos de extracción del mismo son tan costosos. Entre las diversas técnicas de extracción que pueden emplearse se encuentran: filtración, ablandamiento (remoción de cationes), electrodiálisis (concentración del ácido), *polishing* (eliminar trazas de contaminantes, cromatografía) y destilación (o evaporación al vacío) (Guauque y Gómez, 2019).

En la extracción, como se ha mencionado anteriormente, están presentes por lo menos tres sustancias. Tanto el solvente de la mezcla original como el disolvente utilizado para la extracción están presentes en las dos fases formadas, extracto y refinado. Debido a esto se utilizan diagramas con coordenadas triangulares equiláteras para representar la concentración de soluto en cada fase.

La forma de los diagramas de coordenadas triangulares cambiará dependiendo del sistema con el que se está trabajando. Sin embargo, siempre tomará en cuenta los tres ejes

necesarios: soluto (C), solvente (A) y disolvente (B). A continuación, se representa un caso que representa un sistema de 3 líquidos, donde A y B son parcialmente solubles.

Figura 3: Diagrama de coordenadas triangulares para un sistema de tres líquidos en los que A y B son parcialmente solubles.



Fuente: Treybal, 2007

1. Solventes orgánicos

Los solventes orgánicos son solventes compuestos de carbono, hidrógeno y otros elementos que le dan características distintivas. Son ampliamente utilizados debido a su alta volatilidad, bajo punto de ebullición, bajo peso molecular y color. Dichos solventes son utilizados principalmente en procesos de extracción, ya que, por las características previamente mencionadas, dan paso a un proceso más eficiente, en el que se puede utilizar menos energía para eliminar dicho solvente del soluto deseado (Joshi y Adhikari, 2019).

Los solventes orgánicos son utilizados, principalmente en extracciones líquido-líquido, ya que, dependiendo de su afinidad, pueden formar enlaces con el soluto deseado, separándolo así de la mezcla original, y posteriormente puede ser eliminado con un proceso ya sea de evaporación o destilación. Si la solución original es acuosa, las características

hidrofóbicas de la mayoría de los solventes orgánicos, basado en su estructura química, ayuda a no tener altas trazas de agua en el producto final.

Los solventes orgánicos más utilizados se pueden clasificar en grandes grupos, como lo son: hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos halogenados, hidrocarburos cíclicos, hidrocarburos aromáticos, aminas, cetonas, ésteres, aldehídos y alcoholes (Joshi y Adhikari, 2019).

a. Cuadro de propiedades

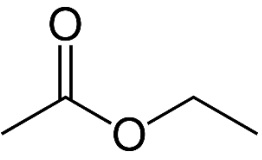
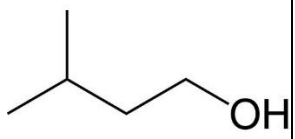
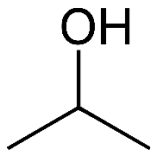
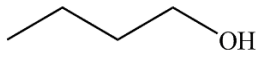
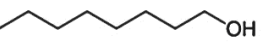
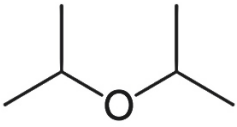

En el presente Trabajo de Graduación, se utilizó siete solventes orgánicos para el proceso de extracción líquido-líquido, por lo que a continuación se presenta sus principales propiedades fisicoquímicas.

Cuadro 3: Propiedades de los solventes orgánicos utilizados

Solvente	Fórmula	Peso molecular	Pto. de ebullición (°C)	Pto. de fusión (°C)	Densidad (g/mL)	Punto de inflamabilidad (°C)
Acetato de etilo	C ₄ H ₈ O ₂	88.11	77	-83.6	0.895	-4
Alcohol isoamílico	C ₅ H ₁₂ O	88.15	131	-117	0.81	45
Alcohol isobutílico	C ₄ H ₁₀ O	74.12	107	-108	0.802	28
1-Butanol	C ₄ H ₁₀ O	74.12	117.7	-88.6	0.8095	37
Octanol	C ₈ H ₁₈ O	130.23	194.5	-16.5	0.827	81.1
Éter isopropílico	C ₆ H ₁₄ O	102.18	68	-85.5	0.720	-29
Éter dietílico	C ₄ H ₁₀ O	74.12	34.5	-116.2	0.713	-45

Fuente: Joshi y Adhikari, 2019 y fichas técnicas de los reactivos.

Cuadro 4: Estructuras químicas de los solventes orgánicos utilizados

			
Acetato de Etilo	Alcohol Isoamílico	Alcohol isobutílico (isobutanol)	1-Butanol
			
Octanol	Éter Isopropílico	Éter dietílico	

D. Procedimientos de análisis

1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) es la cromatografía más utilizada y versátil, para separar e identificar compuestos en los siguientes grupos: materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos (Skoog *et al*, 2015).

Al ser un método tan versátil, existen distintos tipos de HPLC, los cuales se enumeran a continuación:

- Cromatografía de partición o líquido-líquido
- Cromatografía de adsorción o líquido-sólido
- Cromatografía de intercambio iónico
- Cromatografía de exclusión molecular
- Cromatografía de afinidad
- Cromatografía quiral

En este Trabajo de Graduación se utilizó la cromatografía de partición (líquido-líquido) utilizando agua como fase móvil, la cual se puso en contacto con las muestras analizadas para obtener cromatogramas indicando la cantidad de ácido láctico identificado.

Para llevar a cabo un análisis utilizando la cromatografía líquida de alta resolución se debe tomar en cuenta la remoción de gases disueltos y las micropartículas del líquido, ya que éstos podrían causar velocidades de flujo no reproducibles y ensanchamiento de banda.

Para cargar las muestras, se utiliza un sistema de inyección, en el que se puede graduar la dosificación por tamaño de muestra desde 1 hasta 100 μL .

Uno de los componentes principales de los equipos de HPLC es, por supuesto, la columna. Las columnas pueden clasificarse en los siguientes dos grupos generales:

- Columnas analíticas: son columnas pequeñas de 5 – 25 cm de largo y 3 – 5 μm de diámetro. Pueden llegar a tener hasta 100,000 platos/m y son preferidas por su velocidad de análisis y consumo mínimo de disolvente.
- Precolumnas: existen dos tipos principales de precolumnas, una que se encuentra entre el reservorio de solvente y el inyector para acomodar la fase móvil (columna de desperdicios) y otro que se encuentra entre el inyector y la columna analítica (columna de protección) (Skoog, *et al.* 2015)

V. ANTECEDENTES

En el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad del Valle de Guatemala se ha llevado a cabo múltiples investigaciones acerca de la obtención de ácido láctico y su extracción. A continuación, se presenta la información más relevante de estos estudios.

En el año 2011, el M.Sc. Carlos Edmundo Rolz Asturias, junto con su equipo de investigadores, llevó a cabo el proyecto FODECYT No. 003-2008, titulado “Obtención de ácido láctico a partir de la caña de azúcar”. En el trabajo de investigación se utilizó caña de azúcar madura para la producción de ácido láctico con una fermentación utilizando una cepa del hongo *Rhizopus oryzae* (CBS 146.22) y la bacteria *L. lactis* DSM 4366. Se obtuvo como resultado 0.203 g de ácido láctico por 100 mL de solución, partiendo de 22.4 g de caña fresca, 1.33 g de ácido láctico por 100 mL de solución partiendo de caña previamente congelada y esterilizada y 0.491 g de ácido láctico por 100 mL de solución partiendo de 1.46 g/L de biomasa seca.

En el año 2011, Andrea María Barascout González llevó a cabo el trabajo de investigación titulado “Producción de ácido láctico a partir de residuos de cosecha y jugos de caña de azúcar” en el cual se realizó una fermentación microbiana de melaza para producir ácido láctico. En el trabajo se propuso el diseño de un reactor que podía ser utilizado para la producción de ácido láctico con la materia prima escogida (melaza) y la cepa *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, la cual es una cepa homo fermentativa. El proceso se llevó a cabo en dos condiciones: a 31 – 32 °C por 225 horas y a 40 – 41 °C por 60 horas, con una agitación de 100 – 120 rpm obteniendo una concentración de ácido láctico de 11.1 g/L para una solución de 200 mL. Además, se determinó que las condiciones más adecuadas de operación eran entre 31 – 32 °C, con agitación leve y en forma anaeróbica (Barascout, 2011).

En el año 2021, se presentó el Trabajo de Graduación titulado “Cinética de reacción para la síntesis fermentativa de ácido láctico usando melaza de caña de azúcar con la utilización de *Lactobacillus leichmannii*” en el cual se trabajó con soluciones sin y con inversión ácida de azúcares. La melaza utilizada presentaba los siguientes valores de

propiedades fisicoquímicas: densidad de 1.25 ± 0.01 g/mL, viscosidad dinámica de $2.95 \times 10^4 \pm 1.61 \times 10^2$ cP, humedad en base seca de 2.54 ± 0.27 %, °Brix de 87.15 ± 0.29 y pH de 5.11 ± 0.03 . Las soluciones sin hacer inversión ácida de azúcares tenían una concentración inicial de 15 % (m/v) de azúcares y se obtuvieron producciones fermentativas de ácido láctico de 0.0339, 0.0179 y 0.0162 g/mL. Adicionalmente se obtuvo un consumo máximo de azúcares del 81%. Las soluciones con inversión tenían una concentración inicial de 14 % (m/v) de monosacáridos, determinadas por análisis con HPLC, y con ellas se obtuvieron producciones fermentativas de ácido láctico de 0.0039, 0.0031 y 0.0037 g/mL, obteniendo también una conversión de azúcares de 75% máximo. Es decir, se generó 218.40 g de ácido láctico correspondientes a los 16 L del caldo en el fermentador, durante 190.75 h de proceso de fermentación, obteniendo una concentración de 1.36 % (m/v) de ácido láctico y de 1.89 % (m/v) de ácido cítrico. Las soluciones MF4.n (sin inversión), MF5.n (con inversión) y FPN.1 (con inversión) fueron utilizadas para realizar el procedimiento de extracción y purificación de ácido láctico de este Trabajo de Graduación (Ver Cuadro 12 en sección de Apéndice, Datos Originales).

En 2017 Vidra, Tóth y Németh llevaron a cabo un estudio titulado “*Lactic acid production from cane molasses* en el cual se fermentó melaza para producir ácido láctico. Se utilizaron *Lactobacillus casei* (NCAIM B.02467) y *Lactobacillus sp. MKT878* (NCAIM B.02375)” como cepas en la fermentación. Se realizó un pretratamiento de la melaza que consistía en una acidificación, una inversión de azúcares y por último adición de enzima a un pH de 4.5. Las soluciones iniciales poseían una concentración inicial de monosacáridos de 162 g/L (glucosa y fructosa) llegando hasta una concentración final de 16 g/L. Se obtuvieron concentraciones finales de ácido láctico de 146 g/L utilizando *Lactobacillus casei* y de 89 g/L utilizando *Lactobacillus sp. MKT878*. La fermentación tuvo una duración de 150 h.

Adsul, Khire, Chaudhari y Gokhale publicaron en 2008 el artículo científico titulado “Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation”, en el cual se obtuvieron concentraciones finales de 129 y 166 g/L de ácido láctico en fermentaciones microbianas de 30 y 40 h, respectivamente. La fermentación se llevó a cabo a escala laboratorio en Erlenmeyers de 250

mL, a 42 °C, y con una agitación constante de 150 rpm. Las soluciones iniciales contenían entre 46 y 48 % (m/m) de azúcares invertidas.

En el año 2014, se presentó un Trabajo de Graduación en modalidad de Megaproyecto titulado “Diseño de una planta para la producción de poliácido láctico por policondensación a partir de ácido láctico proveniente de la fermentación de melaza utilizando el hongo *Rhizopus oryzae*”. En este trabajo de graduación, la fermentación se llevó a cabo a partir de melaza, obteniendo una solución al 0.7702 % (m/m) de ácido láctico partiendo de una solución 20 % (v/v) de melaza, que fue fermentada, filtrada y tratada con ácido sulfúrico para llevar el valor de pH a 3 durante 24 horas, para luego volver a elevarlo a 6 utilizando una solución de hidróxido de sodio 10N. La solución fue centrifugada a 2500 rpm por 10 min y posteriormente se decantó para recuperar únicamente el sobrenadante. Este sobrenadante fue analizado en HPLC (Agilent C18 de 250 mL x 4.6 mL, 5 µm) a 16 °C y un flujo de fase móvil de 0.4 mL/min. Además, se planteó el diseño de una planta de producción, tomando en cuenta equipos de transferencia de calor, equipos de vacío, transporte de fluidos e instrumentación básica de la planta (Balsells *et al*, 2014).

En el año 2014, Xu y Xu publicaron un artículo titulado “*Efficient calcium lactate production by fermentation coupled with crystallization-based in situ product removal*” en el cual se llevó a cabo una fermentación partiendo de 200 g/L de glucosa, 1.2 g/L de peptina de soya, 12.6 g/L de levadura, 1 g/L de nitrato de sodio, 1 g/L de cloruro de amonio y 3 g/L de proteína de semilla de algodón. Durante el proceso de fermentación se reguló el pH a un valor de 6.2 utilizando una solución al 25 % (m/v) de hidróxido de calcio. Para favorecer la cristalización del lactato de calcio se ingresó cristales semilla al biorreactor utilizado de 5 L. En una prueba llevada a cabo a escala laboratorio únicamente se pudo extraer 120 g/L de ácido láctico. Sin embargo, con el nuevo método practicado por Xu y Xu se obtuvo concentraciones finales de ácido láctico de 725.8 y 765 g/L, posterior a retirar los cristales de lactato de calcio formados durante la fermentación.

En el año 2016, se presentó otro Trabajo de Graduación en modalidad de Megaproyecto titulado “Análisis de mercado y de etapas en la producción a escala laboratorio

de PLA, por fermentación de melaza”. Para este trabajo se fermentó una solución de melaza a una concentración inicial del 20% (m/v) utilizando un cultivo láctico y *Rhizopus oryzae* como cepa. Se obtuvo una concentración final máxima de ácido láctico de 11.03 g/L para el cultivo ABY-3 partiendo de una concentración de 5.5 g/L y de 7.86 g/L para el cultivo YC-370 partiendo de una concentración de 6.25 g/L. Estas concentraciones fueron determinadas utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con un equipo Hewlett Packard 1100 Series y columna 79916OD-572 ODS Hypersil, con dimensiones de 200 x 2.1 mm y un tamaño de partícula de 5 micrones. Posteriormente, se llevó a cabo una extracción con dodecanol, octanol y heptano obteniendo fracciones máxicas máxicas de ácido láctico de 0.13, 0.72 y 0.52, respectivamente sin TOA (triocilamina) y de 0.27, 0.23 y 0.40, respectivamente utilizando TOA. La extracción se llevó a cabo sumergiendo la solución solvente-solución con ácido láctico en un baño térmico a 25 °C por 17 h. La concentración fue determinada evaluando 1.5 mL de solución en cada análisis utilizando un cromatógrafo de gases con detector de masas, con una columna DB-WAX 60 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno, 0.25 µm recubierto. Adicionalmente, las condiciones del horno fueron: 50 °C por 3 min, luego aumentando 10 °C cada minuto hasta llegar a 80 °C. Se mantuvo esta temperatura por 4 min y luego se hizo incrementos de 30 °C por minuto hasta llegar a 220 °C, manteniendo la temperatura por 10 min. Para determinar la concentración de ácido láctico se inyectó 1µm de la muestra utilizando un inyector 220 °C Split 10:1, Interfase 260 °C. (Nájera *et al*, 2016).

Los estudios realizados que plantean procesos para llevar a cabo la síntesis de PLA son de gran importancia para Guatemala ya que la industria de plásticos tiene mucho peso en la economía, como se presenta a continuación, y existe mercado para comercializar plásticos biodegradables como el PLA. En las Figuras 3, 4 y 5, obtenidas de European Bioplastics, se presenta la capacidad global de producción de bioplásticos biodegradables y bioplásticos no biodegradables y el uso de plásticos por industria.

Figura 4: Capacidad de producción global de plásticos biodegradables y no degradables en 2020.

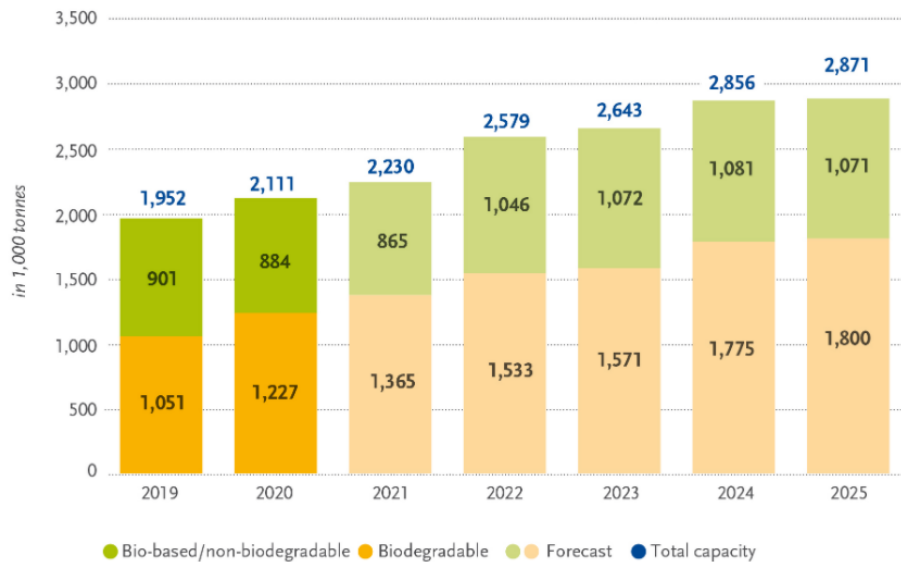


Figura 5: Capacidad de producción global de plásticos biodegradables y no degradables por tipo de material en 2020

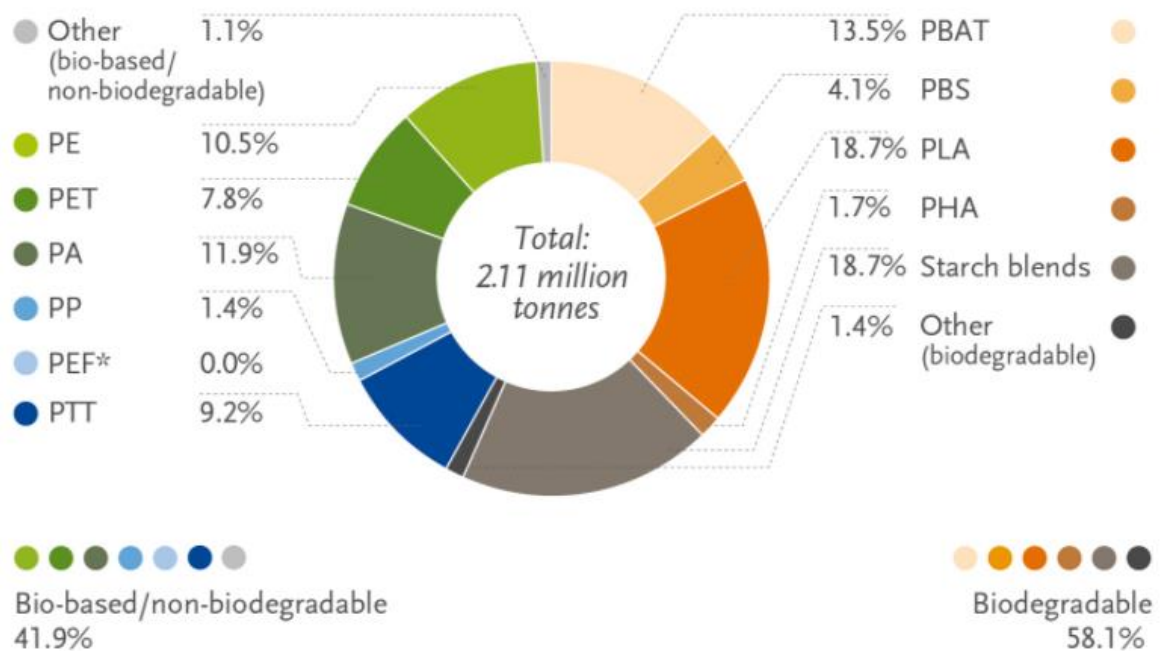
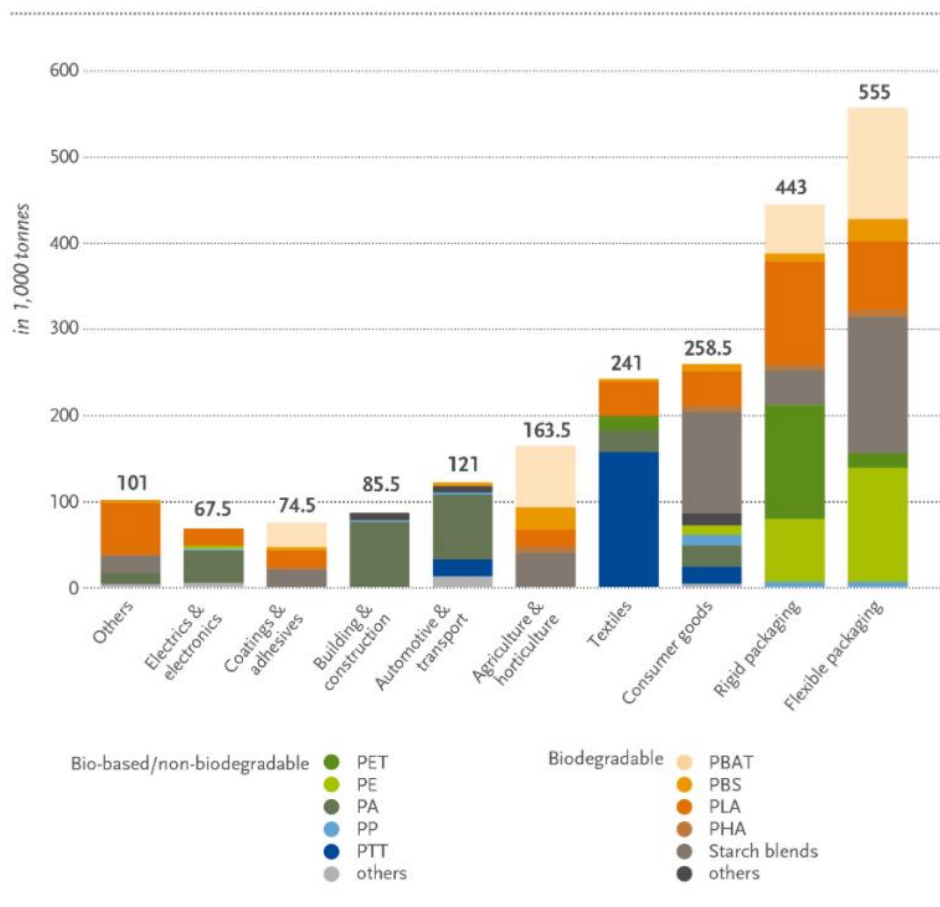


Figura 6: Capacidad de producción mundial de bioplásticos en las principales industrias consumidoras de plásticos en 2020.



Actualmente, en Guatemala, las exportaciones pueden dividirse en tres grandes sectores: productos agropecuarios que representan el 3.7 %, productos de industrias extractivas, que representan el 21.3 % y productos de la industria manufacturera, que representan el 74.7 %, según estudio realizado por la Oficina Económica y Comercial de España en Guatemala. Del 74.7 % de las exportaciones totales que incluyen los productos de la industria manufacturera, la industria del plástico representa el 5.03 % (US\$ 349 millones en 2018 como se observa en la Figura 6), siendo la industria de exportación directa más importante del país según la Comisión de Plásticos de la Asociación Guatemalteca de Exportadores (Secretaría de Estado de Comercio. Esta Comisión está formada por 57 empresas productoras de productos plásticos, generando alrededor de 25,000 empleos

directos y hasta 100,000 indirectos. Esta industria exporta cerca de US\$ 346 millones anualmente, representando el 2 % del PIB (Agexport,S/F).

Según datos presentados por el Ministerio de Economía de Guatemala, en 2020, los plásticos y sus manufacturas están en el grupo de los 10 principales productos de intercambio comercial con un saldo comercial total acumulado para el 2020 de -US\$123.1 millones, indicando así que en el país se importa más materiales plásticos y sus derivados de lo que se exporta, como se muestra en la Figura 10. Dentro de este sector arancelario se encuentra todos los productos derivados del plástico, como el PLA que se identifica bajo la partida arancelaria 39077000 del SAC. El ácido láctico, por otra parte, está incluido en la partida número 1539 y posee el código 29181100 (Ácido láctico, sus sales y sus ésteres).

Figura 7: Exportaciones de Guatemala por sector, en 2018, según estudio realizado por la Oficina Económica y Comercial de España en Guatemala, utilizando datos del Banco Central de Guatemala.

PRINCIPALES PRODUCTOS EXPORTADOS (sectores y productos)						
(Datos en millones US\$)	2014	2015	2016	2017	2018 p/	% Variación 2018/2017
Industrias agropecuarias	2.518	2.574	2.546	2.974	3.077	3,46%
Café	668	663	649	748	680	-9,09%
Banano	652	715	703	782	815	4,22%
Frutas	263	287	310	310	328	5,81%
Cardamomo	240	243	229	367	434	18,26%
Industrias manufactureras	6.426	6.559	6.595	6.896	6.934	0,55%
Azúcar	952	851	817	825	633	-23,27%
Artículos de vestuario	1.277	1.325	1.269	1.340	1.450	8,21%
Grasas y aceites comestibles	379	361	469	570	565	-0,88%
Bebidas alcohólicas	340	299	328	326	325	-0,31%
Materiales plásticos	308	322	323	329	349	6,08%
Farmacéuticos	273	321	318	232	225	-3,02%
Industrias extractivas	1.860	1.542	1.308	1.112	979	-11,96%
Piedras y metales preciosos	388	332	252	97	12	-87,63%
Petróleo	277	127	84	119	125	5,04%
Plomo	353	309	328	153	5	-96,73%
TOTAL	10.803	10.675	10.449	10.982	10.990	0,07%

Figura 8: Exportaciones de Guatemala por capítulos arancelarios, en 2018, según estudio realizado por la Oficina Económica y Comercial de España en Guatemala, utilizando datos del Banco Central de Guatemala.

PRINCIPALES CAPITULOS TARIC EXPORTADOS						
(Datos en millones USD)	2015	2016	2017	2018	%Variación 2018/2017	%/Total 2018
08 FRUTAS Y FRUTOS COMESTIBLES	1.053	1.092	1.180	1.237	4,83%	11,26%
61 PRENDAS Y COMPLEMENTOS (ACCESORIOS)	1.048	1.027	1.093	1.171	7,14%	10,66%
09 CAFÉ, TE, YERBA MATE Y ESPECIAS	911	883	1.123	1.121	-0,18%	10,20%
17 AZUCARES Y ARTICULOS DE CONFITERIA	974	930	930	741	-20,32%	6,74%
15 GRASAS Y ACEITES ANIMALES O VEGETALES	361	471	572	566	-1,05%	5,15%
27 COMBUSTIBLES MINERALES	440	338	382	456	19,37%	4,15%
39 PLASTICOS Y SUS MANUFACTURAS	313	311	316	336	6,33%	3,06%
22 BEBIDAS, LIQUIDOS ALCOHOLICOS Y VINAGRE	288	315	317	317	0,00%	2,88%
30 PRODUCTOS FARMACEUTICOS	312	309	223	215	-3,59%	1,96%
26 MINERALES METALIFEROS	734	648	321	41	-87,23%	0,37%
RESTO	4.241	4.125	4.525	4.789	5,83%	43,58%
TOTAL	10.675	10.449	10.982	10.990	0,07%	100,00%

Figura 9: Importaciones de Guatemala por sector, en 2018, según estudio realizado por la Oficina Económica y Comercial de España en Guatemala, utilizando datos del Banco Central de Guatemala.

PRINCIPALES PRODUCTOS IMPORTADOS (sectores y productos)						
(Datos en millones US\$)	2015	2016	2017	2018 p/	%/Total 2018	% Variación 2018/2017
Industrias agropecuarias	706	649	686	735	3,7%	7,1%
Industrias manufactureras	13.654	13.315	14.076	14.786	74,9%	5,0%
Vehículos y material de transporte	1461	1569	1738	1195	6,1%	-31,2%
Máquinas y aparatos mecánicos electrotécnicos	1.562	1.365	1.419	881	4,5%	-37,9%
Materiales plásticos y sus manufacturas	1055	1035	1079	871	4,4%	-19,3%
Productos diversos de la industria química	737	726	753	614	3,1%	-18,5%
Productos farmacéuticos	727	687	675	526	2,7%	-22,1%
Materiales textiles (tejidos o telas)	673	605	581	446	2,3%	-23,2%
Aparatos transmisores y receptores	589	585	666	460	2,3%	-30,9%
Manufacturas de papel y cartón	364	359	407	299	1,5%	-26,5%
Resto	6486	6384	6758	9494	48,1%	40,5%
Industrias extractivas	3.282	3.038	3.628	4.213	21,3%	16,1%
Gasolina	845	820	982	871	4,4%	-11,3%
Diesel	807	713	882	782	4,0%	-11,3%
Hierro y acero	462	430	503	448	2,3%	-10,9%
Gas propano	236	234	310	243	1,2%	-21,6%
TOTAL	17.641	17.003	18.390	19.734	100,0%	7,3%

Figura 10: Importaciones de Guatemala por capítulos arancelarios, en 2018, según estudio realizado por la Oficina Económica y Comercial de España en Guatemala, utilizando datos del Banco Central de Guatemala.

PRINCIPALES CAPÍTULOES TARIC IMPORTADOS						
(Datos en millones USD)	2015	2016	2017	2018	% Variación 2018/2017	%/Total 2018
27 COMBUSTIBLES MINERALES	2.512	2.315	2.817	3.269	16,0%	16,6%
85 MAQUINAS, APARATOS Y MATERIAL ELECTRICO	1.492	1.458	1.560	1.575	1,0%	8,0%
87 VEHICULOS AUTOMOVILES	1.299	1.391	1.391	1.432	2,9%	7,3%
84 REACTORES NUCLEARES, MAQUINARIA	1.540	1.346	1.404	1.382	-1,6%	7,0%
39 PLASTICOS Y SUS MANUFACTURAS	1.035	1.010	1.051	1.141	8,6%	5,8%
48 PAPEL Y CARTON	606	581	717	759	5,9%	3,8%
72 FUNDICION, HIERRO Y ACERO	533	504	624	743	19,1%	3,8%
30 PRODUCTOS FARMACEUTICOS	677	634	615	656	6,7%	3,3%
10 CEREALES	420	384	407	429	5,4%	2,2%
33 ACEITES ESENCIALES Y RESINOIDES	373	377	388	398	2,6%	2,0%
RESTO	7.154	7.003	7.416	7.950	7,2%	40,3%
TOTAL	17.641	17.003	18.390	19.734	7,3%	100,0%

Figura 11: Principales productos de intercambio comercial de Guatemala. Datos obtenidos de un análisis de Comercio Exterior realizado por el Ministerio de Economía.

10 Principales Productos del Intercambio Comercial						
Producto	Febrero 2019	Febrero 2020	Acumulado 2019	Acumulado 2020	Interanual (febrero)	Acumulado (febrero)
	Millones de dólares				% Variación	
Exportaciones Totales	893.8	1,026.0	1,749.1	2,045.8	14.8%	17.0%
Vehículos y material de transporte	3.6	9.4	7.2	14.7	159.0%	105.0%
Artículos de vestuario	112.9	121.3	230.0	242.4	7.4%	5.4%
Máquinas y aparatos mecánicos	7.9	8.7	17.7	15.4	11.2%	-12.7%
Materiales plásticos y sus manufacturas	28.7	34.7	54.3	64.0	20.8%	17.8%
Gasolina	0.4	0.8	3.6	7.7	109.0%	115.5%
Diesel	0.0	0.2	0.2	0.8	455.6%	343.5%
Productos farmacéuticos	18.4	21.2	33.8	39.0	14.9%	15.3%
Productos diversos de la industria química	10.9	12.7	20.4	24.4	16.4%	19.7%
Hierro y acero	32.4	30.0	65.2	83.2	-7.4%	27.6%
Banano	63.3	65.9	130.6	134.3	4.1%	2.8%
Importaciones Totales	1,459.4	1,532.5	3,145.0	3,268.1	5.0%	3.9%
Vehículos y material de transporte	108.6	124.6	240.8	271.5	14.7%	12.7%
Artículos de vestuario	19.5	18.9	37.2	35.2	-2.7%	-5.3%
Máquinas y aparatos mecánicos	93.1	106.8	211.9	232.3	14.7%	9.6%
Materiales plásticos y sus manufacturas	85.5	88.5	189.3	187.1	3.5%	-1.2%
Gasolina	73.3	103.4	140.6	189.5	40.9%	34.7%
Diesel	116.7	80.7	189.0	170.8	-30.9%	-9.6%
Productos farmacéuticos	49.8	45.8	98.8	104.4	-8.1%	5.6%
Productos diversos de la industria química	54.0	65.8	131.5	144.1	21.8%	9.6%
Hierro y acero	45.7	53.5	86.1	118.6	17.1%	37.8%
Banano	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0%	-3.2%
Saldo Comercial Total	-565.6	-506.5	-1,395.9	-1,222.3	--	--
Vehículos y material de transporte	-105.0	-115.2	-233.6	-256.7	--	--
Artículos de vestuario	93.5	102.3	192.8	207.1	--	--
Máquinas y aparatos mecánicos	-85.3	-98.1	-194.2	-216.9	--	--
Materiales plásticos y sus manufacturas	-56.8	-53.8	-135.0	-123.1	--	--
Gasolina	-73.0	-102.6	-137.1	-181.8	--	--
Diesel	-116.7	-80.5	-188.8	-170.1	--	--
Productos farmacéuticos	-31.4	-24.6	-65.0	-65.4	--	--
Productos diversos de la industria química	-43.1	-53.1	-111.1	-119.6	--	--
Hierro y acero	-13.3	-23.5	-20.9	-35.5	--	--
Banano	63.3	65.9	130.6	134.3	--	--

A continuación, se presenta información sobre el uso de los tipos de plástico en Guatemala, junto a su valor comercial. Estos datos fueron obtenidos de *The Observatory of Economic Complexity*. Como se puede observar, actualmente ya se sintetizan polímeros naturales, por lo que la síntesis de PLA, a partir de azúcar, es una opción viable para el país.

Cuadro 5: Productos plásticos manufacturados en Guatemala junto a su valor comercial en 2019

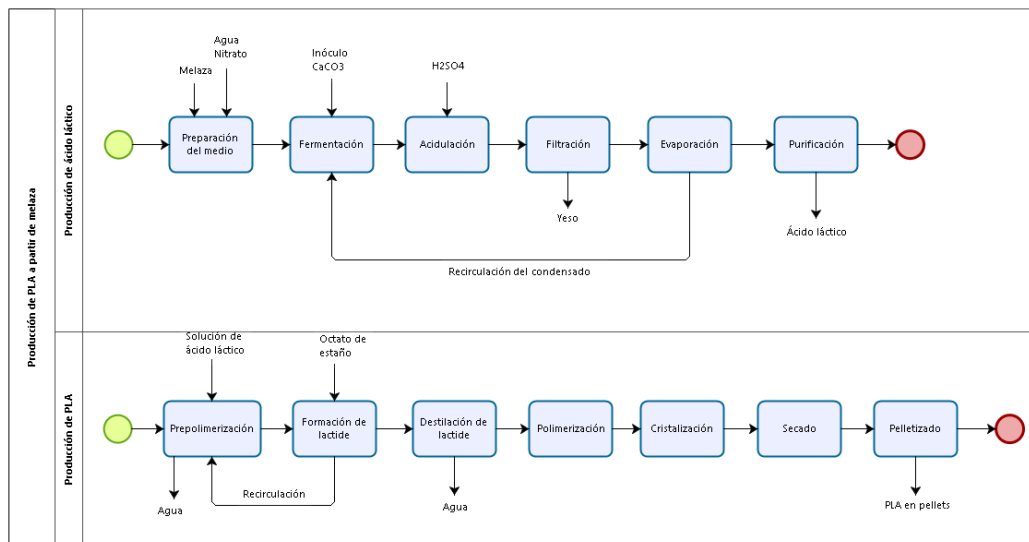
Producto	Valor comercial
Tapas de plástico	\$ 126,134,357.00
Láminas de plástico crudo	\$ 63,520,084.00
Tuberías plásticas	\$ 47,532,555.00
Artículos para el hogar de plástico	\$ 34,801,183.00
Otros productos plásticos	\$ 18,532,701.00
Materiales plásticos para construcción	\$ 8,997,536.00
Poliacetatos	\$ 8,364,165.00
Otras láminas de plástico	\$ 6,957,771.00
Otros polímeros vinílicos	\$ 5,755,867.00
Plásticos auto-adhesivos	\$ 5,750,473.00
Polímeros de etileno	\$ 5,100,496.00
Polímeros de vinil cloro	\$ 4,419,166.00
Celulosa	\$ 2,848,114.00
Polímeros acrílicos	\$ 2,223,327.00
Residuos plásticos sobrantes de procesos industriales	\$ 2,181,207.00
Monofilamentos	\$ 1,060,958.00
Lavabos de plástico	\$ 1,057,605.00
Polímeros de propileno	\$ 1,044,797.00
Silicona	\$ 923,729.00
Amino-resinas	\$ 578,103.00
Polímeros de estireno	\$ 395,613.00
Revestimientos de piso de plástico	\$ 295,462.00
Resinas de petróleo	\$ 188,084.00
Polímeros de intercambio iónico	\$ 123,312.00
Polímeros naturales	\$ 38,110.00
Poliamidas	\$ 37,526.00

Información obtenida de *The Observatory of Economic Complexity (2019)*.

A nivel nacional, el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña (CENGICAÑA) llevó a cabo un proyecto de investigación titulado “Proyecto de factibilidad técnica-financiera para la producción de ácido poliláctico (PLA) a partir de la glucosa contenida en la melaza de caña de azúcar”. Desde hace varios años, la industria azucarera se ha interesado en producir coproductos que partan del mismo proceso productivo del azúcar. CENGICAÑA se interesó en este tema debido a la oportunidad comercial que presenta el PLA y que una posible fuente de obtención del mismo es la caña de azúcar. CENGICAÑA tomó como referencia información obtenida de “*The eco-profiles for current and near-future NatureWorks polylactide (PLA) production*” de Vink *et al*, 2007. Vink *et al* partió de melaza con una concentración de 40-50 % (m/m) y la diluyó a 7-10 % (m/m) agregando 5 g/L de una fuente de nitrógeno para beneficiar la fermentación anaeróbica. La fermentación se llevó a cabo utilizando *Lactobacillus delbrueckii* y duró 24 - 48 horas, adicionando carbonato de calcio para regular el pH. Posterior a la fermentación Vink *et al* recomienda realizar una filtración y luego una evaporación, llegando a concentrar el ácido láctico a una concentración del 90% (m/m). Por último, se Vink *et al* recomienda realizar una purificación utilizando carbón activado o una resina catiónica, para tener ácido láctico apto para la síntesis de PLA.

Una vez obtenido el ácido láctico (residuos filtrados y evaporados), Vink *et al* sintetiza el PLA haciendo una prepolimerización, formación, destilación de lactida y polimerización. El el PLA obtenido se encuentra en forma de pellets. A continuación, se presentan los diagramas de proceso de la producción de ácido láctico y PLA.

Figura 12: Proceso de producción de PLA partiendo de melaza llevado a cabo por CENGICAÑA en su informe anual 2018-2019.



En este estudio CENGICAÑA también llevó a cabo un estudio económico y determinó que es un estudio económicamente factible basado en los indicadores de VAN de US\$ 28,270,670.76, TIR de 77.89 % y PRI de 1.3 años (dos zafras). Este estudio comprueba que la utilización de melaza como materia prima para producir PLA es un proceso rentable en Guatemala. A continuación, se detallan los datos obtenidos por CENGICAÑA de inversión y costos de producción.

Figura 13: Inversión total para la planta productora de PLA

Parámetro	Costo
Inversión del capital	US\$ 5,562,708.00
Montaje	US\$ 447,600.00
Intereses	US\$ 721,236.96
Inversión total	US\$ 6,731,544.96

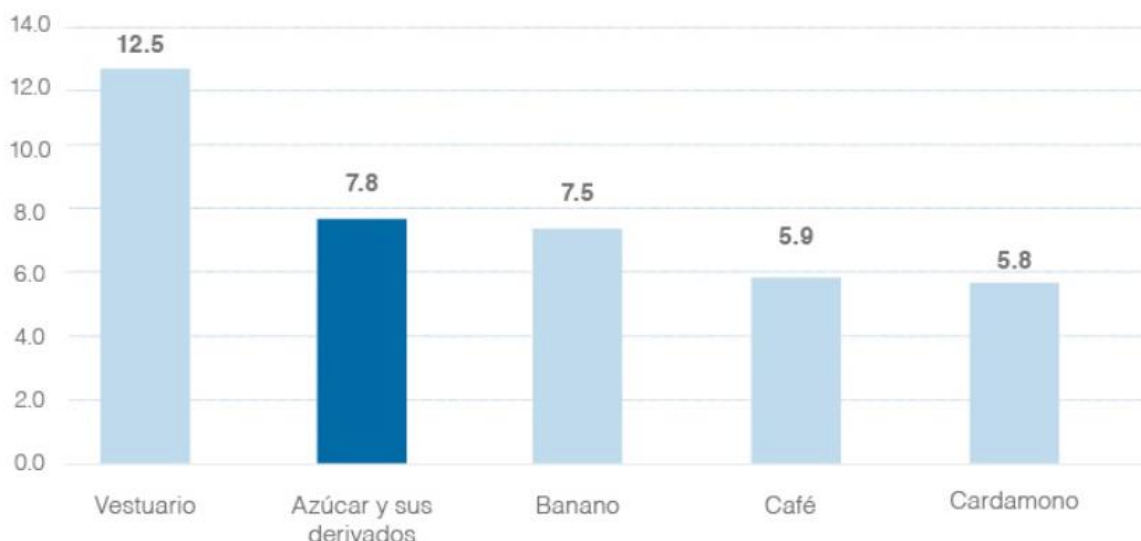
Figura 14: Costos de producción total para la planta productora de PLA

Parámetro	Costo
Costo total en materia prima y reactivos	US\$ 12,584,733.40
Costo total de personal operativo	US\$ 295,560.00
Mantenimiento	US\$ 55,950.00
Prestaciones salariales	US\$ 120,761.03
Costo total en servicios	US\$ 1,043,700.00
Otros costos de producción	US\$ 21,896,267.18
Costo de producción total	US\$ 35,996,971.61

Además de la viabilidad del proyecto, la industria de azúcar en Guatemala es amplia y próspera. En el año 2019 el azúcar y sus derivados fue el segundo producto de mayor exportación en Guatemala, aun cuando únicamente se exporta el 70% del azúcar producido. De este 70%, el 79.4% representó azúcar, el 14.2% alcohol y el 6.4% melaza.

Adicionalmente, Guatemala es el segundo país exportador de azúcar en Latinoamérica y el cuarto en el mundo y es el tercer país con mayor productividad de azúcar en el mundo (Azúcar de Guatemala).

Figura 15: Representación, en porcentaje, de exportaciones en Guatemala en 2019



Notas: la información fue obtenida de CENGICAÑA y el Banco de Guatemala.

La caña de azúcar cosechada en Guatemala posee un 15% de fibra, la cual es insoluble, y por ende 85 % de jugo. La composición de este jugo se puede dividir en 70 % agua y 15 % materia disuelta, de la cual el 13 % representa sacarosa y el adicional 2 % son impurezas. Es decir, 13 % de la caña de azúcar es sacarosa.

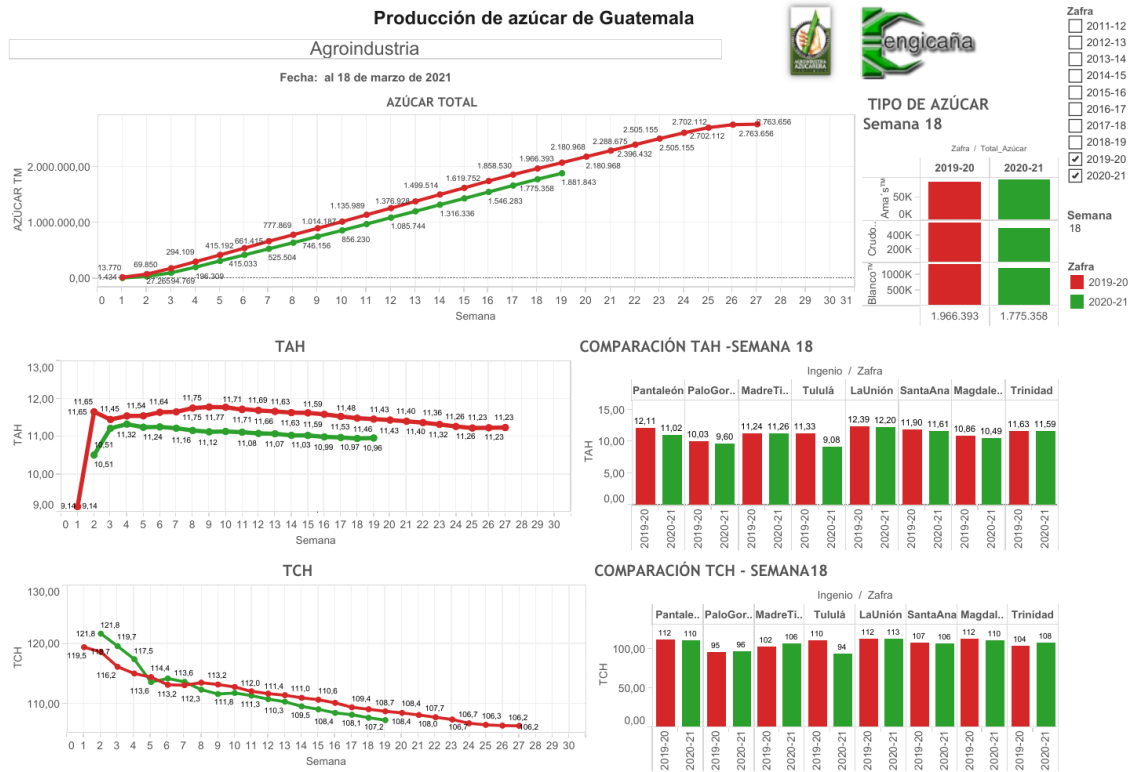
Los jugos de caña están constituidos por múltiples componentes orgánicos como flucosa, fructosa, sacarosa, oligosacáridos, polisacáridos como ISP (Indigenous Sugarcane Polysaccharide), almidón, glucana y dextrana, colorantes como fenoles y flavonoides, aminoácidos, proteínas y ácidos orgánicos; y de componentes inorgánicos como sales de potasio, dosfato, sílica, calcio, magnesio y hierro entre otros (Larrahondo, 2017).

En Guatemala, la industria azucarera es muy grande. En el país existen 12 ingenios: Pantaleón, Magdalena, Santa Ana, La Unión, El Pilar, Concepción, Madre Tierra, Palo Gordo, Tululá, Trinidad, San Diego, Guadalupe, Los Tarros, Santa Teresa, Chabil Utzaj y La Sonrisa (CENGICANÑA, S/F).

Según datos provistos por el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICANÑA), durante la zafra 2019 - 2020 se produjo 2,763,656 t de azúcar mientras que en la zafra 2020 - 2021 a la fecha, se ha producido aproximadamente 1,881,843 t, como se puede observar en la Figura 15. Esto conlleva al hecho de que la industria azucarera es idónea para obtener la materia prima para llevar a cabo este procedimiento de extracción de ácido láctico a nivel industrial, sustentado por el procedimiento presentado en este Trabajo de Graduación. Además, tomando en cuenta un estudio financiero llevado a cabo por CENGICANÑA, expuesto en la sección de Anexos, se concluyó que sí es factible invertir en la planta de producción de PLA, ya que con una inversión de US\$ 6,731,544.96 se obtendría un periodo de retorno de la inversión de 1.3 años, lo cual es sumamente rentable.

Figura 16: Producción de azúcar en Guatemala en las zafras 2019-2020 y 2020-2021.

Información obtenida de CENGICAÑA



VI. METODOLOGÍA

A. PRIMERA ETAPA: Determinación de propiedades de caldo de fermentación

1. Determinación de densidad utilizando un picnómetro

Reactivos necesarios:

- Caldo de fermentación microbiana proveniente de la fermentación de melaza utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 como cepa en el proceso.
- Agua destilada

Equipos, cristalería y otros:

- Picnómetro de vidrio de 25 mL con termómetro de bulbo.
 - Balanza analítica de 0 a 110 g, marca OHAUS, modelo PA114
 - Piseta con agua destilada
1. Se pesó el picnómetro utilizando una balanza analítica y se anotó su masa.
 2. Se llenó el picnómetro utilizando agua destilada a 20°C y se pesó utilizando una balanza analítica. Se anotó esta masa y la temperatura del agua destilada.
 3. Se desechó el agua contenida en el picnómetro y se secó cuidadosamente.
 4. Se repitió el paso 3 utilizando el líquido a analizar a 20°C de igual forma, en este caso caldo de fermentación que contenía ácido láctico.
 5. Se desechó el caldo de fermentación contenido en el picnómetro y se secó cuidadosamente.
 6. Se determinó la densidad de los fluidos utilizando la Ecuación 1 de la sección de Cálculos de Muestra.

7. Para determinar la masa del fluido, se restó la masa del picnómetro vacío de los valores obtenidos en los puntos 3 y 5.
8. Una vez se obtuvo la masa del fluido, se dividió dentro del volumen del picnómetro calculado con la calibración con agua, a la temperatura definida (20 °C) para determinar la densidad del caldo de fermentación. La densidad del agua se utilizó posteriormente para la calibración del viscosímetro y luego para el cálculo de la viscosidad del caldo de fermentación.

2. Determinación de viscosidad del utilizando un viscosímetro de Ostwald

Reactivos necesarios:

- Caldo de fermentación microbiana proveniente de la fermentación de melaza utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 como cepa en el proceso
- Agua destilada

Equipos, cristalería y otros:

- Viscosímetro de Ostwald
 - Termómetro de bulbo de -20 a 150 °C con incertidumbre de ± 0.1 °C.
 - Cronómetro digital
 - Beaker de 2000 mL
 - Piseta con agua destilada
1. Se llenó un Beaker de 2000 mL con agua destilada.
 2. Se armó un sistema de soporte para mantener seguro y recto el viscosímetro de Ostwald, para asegurar un termómetro de bulbo usado para determinar la temperatura del agua destilada en el Beaker, asegurando así las condiciones de la medición.

3. Se aseguró el termómetro de bulbo y el viscosímetro de Ostwald, asegurando que el instrumento esté recto y asegurado.
4. Una vez se hubo asegurado el viscosímetro, se llenó con agua destilada usando la boquilla izquierda. Se agregó agua destilada hasta que el fluido alcanzó la mitad de la esfera del lado derecho del viscosímetro (Figura 65 de la sección de Ilustraciones).
5. Se ajustó un bulbo en la boquilla derecha del viscosímetro hasta que el fluido alcanzó la segunda marca determinada en el instrumento (Figura 65 de la sección de Ilustraciones).
6. Una vez el fluido se encontraba en el nivel necesario, se retiró el bulbo y se determinó el tiempo que toma para que el fluido recorra la distancia entre las dos marcas.
7. Se repitió los pasos 5 y 6, 3 veces para poder tener información estadísticamente significativa.
8. Una vez se habían realizado todas las corridas, se calculó un promedio del tiempo obtenido en cada una.
9. Se retiró el agua destilada del viscosímetro y se sustituyó por el caldo de fermentación.
10. Se repitió los pasos 5 a 8 con el caldo de fermentación a analizar.
11. Se utilizó la Ecuación 2 de la sección de Cálculos de Muestra para determinar la viscosidad del caldo de fermentación a analizar.

B. SEGUNDA ETAPA: Preparación de soluciones

1. Elaboración de 100 mL de solución de hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) 0.1 M/Cloruro de Calcio (CaCl) 1 M

Reactivos necesarios:

- Hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) en forma de cal/Cloruro de calcio.
- Agua destilada

Equipos, cristalería y otros:

- Papel aluminio
- Balanza analítica de 0 a 110 g marca OHAUS modelo PA114
- Espátula analítica de acero inoxidable
- Beaker de 100 mL
- Piseta con agua destilada
- Varilla de agitación de vidrio
- Frasco Schott de 250 mL.

1. Se cortó un trozo de papel de aluminio de 10 cm x 10 cm y se dobló las orillas para formar una cajilla para pesar.
2. Se taró en la balanza electrónica.
3. Se pesó dentro de la cajilla tarada de papel de aluminio, 0.7409 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ grado industrial, utilizando una espátula analítica. Al utilizar cloruro de calcio como reactivo, como ocurrió al analizar la primera muestra de caldo de fermentación microbiana, se pesó 10.00 g del reactivo utilizando una espátula analítica
4. Se trasladó el $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{CaCl}$ pesado a un Beaker de 100 mL.
5. Se agregó agua destilada con una piseta cuidando no sobrepasar la marca de 100 mL. Se utilizó una varilla de agitación para asegurar la disolución del sólido.
6. Se trasvasó solución a contenedor plástico con tapadera y se rotuló.

2. Elaboración 100 mL de solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1M

Reactivos necesarios:

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) grado industrial marca J.T.Baker al 95%.
- Agua destilada

Equipos, cristalería y otros:

- Campana de extracción
- Beaker de 50 mL
- Beaker de 100 mL
- Varilla de agitación de vidrio
- Pipeta graduada de 10 mL
- Piseta de agua destilada
- Frasco Schott de 250 mL
- Equipo de protección personal (bata, lentes, guantes, mascarilla)

1. En un Beaker de 100 mL se agregó 75 mL de agua destilada.
2. En una campana de extracción, se vertió aproximadamente 10 mL de ácido sulfúrico grado industrial en un beaker de 50 mL utilizando una varilla de agitación de vidrio para guiar el líquido. NOTA: se utilizó lentes de protección, mascarilla y guantes para llevar a cabo este procedimiento.
3. Utilizando una pipeta graduada de 10 mL se tomó una alícuota de 5.4 mL de ácido sulfúrico.
4. Se vertió la alícuota de ácido sulfúrico en un Beaker con los 75 mL de agua destilada. Nota: Se esperó que la solución se enfriara. Recordar que el ácido se debe agregar al agua.
5. Se agregó agua destilada hasta llegar a la marca de 100 mL, cuidando no pasarse de la marca final.
6. Se trasvasó la solución a un Frasco Schott y se rotuló.

3. Elaboración de 500 mL de solución de ácido clorhídrico (HCl) 4 M

Reactivos necesarios:

- Ácido clorhídrico (HCl) grado industrial marca Merck al 37 %
- Agua destilada

Equipos, cristalería y otros:

- Campana de extracción
 - Beaker de 500 mL
 - Beaker de 1000 mL
 - Varilla de agitación de vidrio
 - Pipeta graduada de 20 mL
 - Piseta de agua destilada
 - Frasco Schott de 250 mL
 - Equipo de protección personal (bata, lentes, guantes, mascarilla)
1. En un Beaker de 1000 mL se agregó 200 mL de agua destilada.
 2. En una campana de extracción se vertió aproximadamente 250 mL de ácido clorhídrico al 37 % grado industrial en un beaker de 500 mL utilizando una varilla de agitación para dirigir el flujo del ácido hacia el Beaker. NOTA: se utilizó lentes de protección, mascarilla y guantes para llevar a cabo este procedimiento
 3. Utilizando una pipeta graduada de 250 mL, se tomó una alícuota de 213 mL de HCl 30 %.
 4. Se vertió una lentamente alícuota de ácido clorhídrico en un Beaker con 200 mL de agua destilada. NOTA: Se espero que la solución se enfríe, recordando que el ácido se debe agregar al agua.
 5. Se llenó, con agua destilada, hasta la marca de 500 mL del beaker utilizando una piseta de agua destilada.
 6. Se trasvasó solución a frasco Schott y se rotuló.

C. TERCERA ETAPA: Regulación de propiedades

1. Regulación de pH con HCl, H₂SO₄ y Ca(OH)₂

Reactivos necesarios:

- Solución de hidróxido de calcio (Ca(OH)₂) 0.1 M
 - Solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 M
 - Solución de ácido clorhídrico (HCl) 4 M
- microbiana proveniente de la fermentación de melaza utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 como cepa en el proceso

Equipos, cristalería y otros:

- Pipeta volumétrica de 25 mL
 - 3 Erlenmeyer de 250 mL
 - 1 agitador magnético de 2.54 cm (1 in) de largo
 - 3 buretas de 50 mL (de estar disponibles, si no únicamente 1)
 - 1 Beaker de 250 mL
 - Medidor multiparámetro marca Oakton modelo PCSTestr 35 con medición de pH de 0 a 14.
 - Soporte universal
 - Pinza mariposa
 - Aro metálico
1. Se tomó una alícuota de 25 mL del caldo de fermentación utilizando la pipeta volumétrica de 25 mL.
 2. Se vertió alícuota a Erlenmeyer de 250 mL.
 3. Se midió pH inicial del caldo de fermentación utilizando papel indicador y se anotó el valor obtenido.

4. Se agregó el agitador magnético al Erlenmeyer que contenía el caldo de fermentación.
5. Se agregó 25 mL de solución de hidróxido de calcio a la bureta de 50 mL. Se midió el volumen alcanzado y se anotó el valor.
6. Se agregó 5 mL de Ca(OH)_2 al Erlenmeyer con caldo de fermentación.
7. Se midió el pH de la solución utilizando papel indicador y se anotó valor obtenido.
8. Se repitió los pasos 6 y 7 hasta completar los 25 mL de Ca(OH)_2 presentes en la bureta. Se anotó los valores de pH con cada adición de 5 mL.
9. Una vez terminadas las corridas con la base/ácido, el sobrante se desechó en un beaker de 250 mL rotulado “residuos”.
10. Se repitió los pasos 1-8 con las soluciones de H_2SO_4 y HCl.
11. Se desechó los ácidos en el mismo beaker que estaba la base. Se midió el valor de pH y se agregó base o ácido según fuera necesario. Una vez neutralizado (pH 7) se desechó por el drenaje.

D. CUARTA ETAPA: Procedimientos de extracción y purificación

1. Extracción utilizando lactato de calcio como intermediario

Reactivos necesarios:

- Caldo de fermentación microbiana proveniente de la fermentación de melaza utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 como cepa en el proceso
- Solución de hidróxido de calcio (Ca(OH)_2) 0.1M
- Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 M
- Carbón activado

Equipos, cristalería y otros:

- Pipeta volumétrica de 25 mL
- Pipeta volumétrica de 10 mL

- 2 Erlenmeyer de 100 mL
- 1 Tubo de ensayo con tapón
- 2 Buretas de 25 mL
- 2 Beaker de 50 mL
- Embudo de vidrio de 15 cm de diámetro
- Varilla de vidrio de agitación
- 2 tapones de hule para Erlenmeyer de 100 mL
- Medidor multiparámetro marca Oakton modelo PCSTestr 35 con medición de pH de 0 a 14.
- Soporte universal
- Pinza mariposa
- Aro metálico
- Agitador magnético de 2.54 cm (1 in) de largo
- Estufa eléctrica con agitación marca Thermo Scientific modelo SP88857100 de 120 V.
- Termómetro de bulbo de -20 a 150 °C con incertidumbre de $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$
- Guante de protección de calor
- Papel aluminio
- Papel filtro marca Whatman de 90 cm de diámetro, Cat No 1002 090
- Papel encerado
- Balanza analítica de 0 a 110 g marca OHAUS modelo PA114
- Espátula analítica
- Tijeras

1. Utilizando una pipeta volumétrica de 25 mL, se tomó alícuota de 25 mL de caldo de fermentación (solución 1) proveniente de la fermentación microbiana de melaza y se depositó en un Erlenmeyer de 100 mL.
2. Se midió el pH de la muestra utilizando papel indicador y se anotó el valor.
3. Se armó un sistema de soporte utilizando un soporte universal y una pinza. (Ver Figura 63 en sección de ilustraciones).

4. Se llenó, con la ayuda de un embudo, una bureta de 50 mL con la solución preparada de hidróxido de calcio 0.1 M (asegurándose que esté completamente limpia y seca).
5. Se colocó la bureta en soporte universal y se aseguró que estuviera recta y en posición adecuada para poder leer la graduación (Ver Figura 63 en sección de ilustraciones)
6. Se anotó el volumen inicial de solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en bureta.
7. Se repitió los pasos 4 a 6 con la solución de ácido sulfúrico 1 M.
8. Se agregó un agitador magnético de 2.54 cm (1 in) al Erlenmeyer conteniendo el caldo de fermentación.
9. Se colocó el Erlenmeyer sobre la superficie cerámica de una estufa eléctrica y se activó la agitación a 100 rpm (sin calentamiento).
10. Se agregó volumen de la solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ según valor definido en la segunda etapa, al Erlenmeyer con caldo de fermentación y se anotó el volumen añadido del reactivo (solución 2). Se determinó nuevamente el valor de pH con papel indicador. Se anotó el valor.
11. Se desechó la solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sin utilizar en un Beaker de 50 mL rotulado “desechos” y se tapó utilizando parafilm.
12. Se retiró bureta de soporte universal y se lavó.
12. Se colocó el Erlenmeyer sobre la superficie de cerámica de una estufa eléctrica y se calentó lentamente hasta que la solución alcanzó punto de ebullición, esto para acelerar el proceso de calentamiento, se activó la agitación a 100 rpm. Se midió la temperatura de ebullición de la solución con un termómetro de bulbo y se anotó el valor obtenido.
13. Se retiró la solución de la estufa utilizando un guante de protección y se colocó debajo de bureta que contenía la solución de ácido sulfúrico.
14. Se virtió volumen de H_2SO_4 según valor definido en la segunda etapa, en Erlenmeyer con solución previamente calentada (formación de solución 3). Se mantuvo la agitación a 100 rpm durante la adición de ácido sulfúrico.
15. Se determinó el valor de pH de solución utilizando el medidor multiparámetro marca *Oakton* y se anotó valor.

16. Se trasladó solución de H_2SO_4 sin utilizar a beaker de 50 mL y se tapó.
17. Se retiró bureta de soporte universal y se lavó.
18. Se cortó un trozo de papel de aluminio de 10 cm x 10 cm y se dobló las orillas para formar una cajilla.
19. Se taró en la balanza electrónica. Se anotó la masa del papel.
20. Utilizando el papel aluminio, se pesaron 0.05g de carbón activado utilizando una espátula analítica. Se anotó el valor real pesado.
21. Se tomó un trozo de papel filtro marca Whatman y se cortó un círculo con un diámetro 4 cm mayor al diámetro del embudo de vidrio utilizado. Se colocó el círculo de papel filtro en embudo y se dobló como se indica en la Figura 64 de la sección de anexos. Se cortó una esquina para que no se hiciera vacío.
22. Utilizando una espátula analítica, se colocó carbón activado pesado en embudo con papel filtro asegurándose que quedara distribuido por la superficie del papel filtro.
23. Se armó soporte como se indica en la Figura 63 de la sección de Ilustraciones utilizando un soporte universal, una pinza y un aro metálico.
24. Se colocó embudo sobre aro metálico y se posicionó el Erlenmeyer limpio, de 100 mL, debajo.
25. Se vertió lentamente, con ayuda de una varilla de vidrio la solución previamente trabajada (solución 3) dentro del embudo con papel filtro y el volumen de carbón activado determinado en el paso 20, colocado de forma uniforme cubriendo las paredes del papel filtro colocado en el embudo. asegurándose que toda la solución entrara en contacto con el carbón activado y que nada se perdiera.
26. Se desechó papel filtro con carbón activado y solución no filtrada, envolviéndolo en papel encerado a modo de que no quedara expuesto. Una vez envuelto se desechó en bote de basura.
27. Una vez filtrada toda la solución, se preparó muestra según procedimiento especificado en la Quinta Etapa de esta metodología y se rotuló agregando fecha de elaboración de la solución, nombre del analista, nombre del Trabajo de Graduación e identificación de la muestra. Estas muestras fueron analizadas con un equipo HPLC para determinar contenido de ácido láctico presente en cada fase.

El procedimiento para la preparación de muestra y análisis utilizando el HPLC se encuentra en la quinta etapa de esta sección de metodología.

2. Extracción líquido-líquido

Reactivos necesarios:

- Caldo de fermentación microbiana proveniente de la fermentación de melaza utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 como cepa en el proceso
- Solución de ácido clorhídrico (HCl) 4 M
- Acetato de etilo marca J.T.Baker con pureza de 99.5%
- Éter dietílico marca Merck con pureza mayor al 99.7% y grado ACS,ISO,Reag. Ph Eur
- Alcohol isobutílico marca Merck con pureza mayor al 99% y grado ACS,Reag. Ph Eur
- 1-Butanol marca Merck con pureza mayor al 99.5% y grado ACS,ISO,Reag. Ph Eur
- Alcohol isoamílico marca Merck con pureza de 98% y grado MQ200
- Éter isopropílico marca Merck con pureza mayor al 99% y grado ACS,Reag. Ph Eur
- Octanol marca Merck con pureza mayor al 99% y grado MQ200
- Agua destilada

Nota: las especificaciones de los solventes utilizados se encuentran en el Cuadro 3 del Marco teórico

Equipos, cristalería y otros:

- 1 probetas de 10 mL
- 1 probeta de 20 mL
- 2 Pipetas volumétricas de 10 mL

- 7 Erlenmeyer de 250 mL
- 8 Tubos de ensayo con tapón (para centrífuga)
- 14 Tubos de ensayo de vidrio con tapón
- 1 Buretas de 25 mL
- 1 Ampolla de decantación de 125 mL
- Embudo de vidrio de 15 cm de diámetro
- Varilla de agitación de vidrio
- 2 tapones de hule para Erlenmeyer de 100 mL
- Medidor multiparámetro marca Oakton modelo PCSTestr 35 con medición de pH de 0 a 14.
- Soporte universal
- Pinza mariposa
- Agitador magnético de 2.54 cm (1 in)
- Estufa eléctrica con agitación marca Thermo Scientific, modelo SP88857100 de 120V
- Centrífuga pequeña para 8 tubos de ensayo marca Eppendorf AG, modelo 5804 R
- Piseta de agua destilada

1. Utilizando un beaker de 100 mL y una varilla de vidrio, se midió 70 mL de acetato de etilo.
2. Utilizando una pipeta volumétrica de 50 mL, se tomó alícuota de acetato de etilo del beaker y se trasvasó a un Erlenmeyer de 250 mL.
3. Se rotuló una pipeta volumétrica de 50 mL, limpia y seca, para uso en medición de alícuotas de caldo de fermentación y que su uso fuera exclusivo para tomar alícuotas del caldo. Se midió y depositó en Erlenmeyer de 250 mL que contenía el acetato de etilo ya medido.
4. Se midió pH de la mezcla elaborada utilizando medidor multiparámetro y se anotó valor.
5. Se armó sistema de soporte utilizando un soporte universal y una pinza. (Ver Figura 63 en sección de ilustraciones)

6. Se llenó, con la ayuda de un embudo, una bureta de 10 mL con la solución preparada de ácido clorhídrico 4M (asegurándose que estuviera completamente limpia y seca).
7. Se colocó bureta en soporte universal y se aseguró que estuviera recta y en posición adecuada para poder leer la graduación (Ver Figura 63 en sección de Ilustraciones)
8. Se anotó volumen inicial de HCl en bureta.
9. Se agregó agitador magnético de 2.54 cm (1 in) al Erlenmeyer con mezcla de caldo de fermentación, acetato de etilo y HCl (solución 1).
10. Se colocó el Erlenmeyer sobre la superficie de cerámica de una estufa eléctrica y se activó agitación.
11. Se agregó volumen de HCl 4M según valor determinado en procedimiento de regulación de propiedades y se midió pH nuevamente. Se anotó valor. El valor de pH alcanzado se buscaba que fuera 3.
12. Se trasladó solución a tubo de ensayo de centrífuga y se tapó (45 mL).
13. Se repitió procedimiento de los pasos 1 al 4 y 10 al 12 con éter dietílico, alcohol isobutílico, 1-Butanol, alcohol isoamílico, éter isopropílico y octanol como solventes (sustituyendo al acetato de etilo). En el paso 12 todos los tubos de ensayo se llenaron con el mismo volumen de solución.
14. Se llenó un tubo de ensayo adicional con agua destilada, cuidando de utilizar el mismo volumen con el objetivo de balancear la centrífuga.
15. Una vez se contaba con los tubos de ensayo con las mezclas preparadas (utilizando todos los solventes orgánicos y un tubo de ensayo adicional con agua destilada) se cargaron en centrífuga.
16. Se centrifugó la muestra a 10 Hertz por 30 minutos.
17. Una vez hubiera transcurrido el tiempo de centrifugado, se utilizó una ampolla de decantación de 125 mL para separar las fases formadas.
18. Se decantó la primera fase en una probeta limpia de 100 mL. Se anotó el volumen recuperado.
19. Se decantó segunda fase a otra probeta limpia de 100 mL (distinta a la utilizada para recuperar la primera fase).

20. Se trasvasó separadamente volúmenes recuperados en ambas fases a dos tubos de ensayo según procedimiento especificado en la Quinta Etapa de esta metodología y se rotuló agregando fecha de elaboración de la solución, nombre del analista, nombre del Trabajo de Graduación e identificación de la muestra. Estas muestras fueron analizadas en HPLC para determinar contenido de ácido láctico presente en cada fase.
21. El volumen sobrante luego de llenar los tubos de ensayo con muestras preparadas, se trasladaron a nuevos tubos de ensayo y se rotularon con la misma información que se incluyó en la rotulación de los tubos de ensayo que se analizaron con HPLC. El procedimiento para la preparación de muestra y análisis utilizando el HPLC se encuentra en la quinta etapa de esta sección de metodología.

NOTA: Todas las soluciones fueron preparadas de forma simultánea previo al proceso de centrifugado guardando el debido cuidado para no confundir las muestras ya que se deseaba evaluar el desempeño de cada solvente orgánico.

E. QUINTA ETAPA: Preparación de muestras

1. Preparación de muestras para el proceso de extracción líquido-líquido

Reactivos necesarios:

- Extracto obtenido posterior a la extracción
- Agua destilada

Equipos, cristalería y otros:

- 1 micropipeta
- 1 pipeta graduada de 10 mL
- HPLC marca Agilent modelo 1100 1200 (detector IR), columna Hipler H y Software ChemStation for LC.

Para el proceso de extracción líquido-líquido se tomó una alícuota de 0.1 mL de las soluciones purificadas (extracto) y se diluyó en 9.9 mL de agua destilada para que esta muestra preparada pudiera ser analizada utilizando HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). Se analizó una solución con factor de dilución 1:100.

2. Preparación de muestras para el proceso de formación de lactato de calcio como intermediario

Reactivos necesarios:

- Solución obtenida posterior a la filtración con carbón activado
- Agua destilada

Equipos, cristalería y otros:

- 1 micropipeta
- 1 pipeta graduada de 10 mL

Para el proceso de extracción formando lactato de calcio como intermediario, se tomó una alícuota de 0.1 mL de las soluciones purificadas de ácido láctico y se diluyó en 7.9 mL de agua destilada, se rotuló y analizó utilizando HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).

VII. RESULTADOS

Cuadro 6: Propiedades físicas determinadas experimentalmente para los caldos de fermentación utilizado para extraer ácido láctico

Característica	Primera fermentación (MF4.n Barillas)	Segunda fermentación (MF5.n Barillas)	Tercera fermentación (PFn.1 Barillas)	Promedio
Estado físico	Líquido	Líquido	Líquido	-
Color	Café turbio	Café turbio	Café turbio	-
Aroma	Dulce	Dulce	Dulce	-
pH (± 0.01)	4.84	4.50	4.32	4.55
P. ebullición ($^{\circ}\text{C}$)	93.5 ± 0.1	82.0 ± 0.1	87.0 ± 0.1	87.5 ± 0.1
Densidad (g/mL)	$1.17 \pm 7.6 \times 10^{-5}$	$1.05 \pm 4.7 \times 10^{-5}$	$1.10 \pm 5.0 \times 10^{-5}$	$1.11 \pm 5.8 \times 10^{-5}$
Viscosidad (cP)	$6.98 \pm 8.4 \times 10^{-2}$	$2.36 \pm 3.2 \times 10^{-2}$	$3.86 \pm 5.7 \times 10^{-2}$	$4.40 \pm 5.8 \times 10^{-2}$
Concentración de ácido láctico (% m/v)	0.45	1.36	1.82	1.21

Notas: Los resultados fueron determinados para cada uno de los caldos de fermentación a 20 $^{\circ}\text{C}$, del estudio de Barillas 2021, utilizando agua destilada a 20 $^{\circ}\text{C}$ para determinar el valor de la densidad. Los datos originales proporcionados por Barillas se encuentran en el Cuadro 12 de Datos originales, en Anexos.

Cuadro 7: Concentración y contenido final promedio de ácido láctico, obtenidos del proceso de extracción líquido-líquido de la primera muestra de fermentación (caldo MF4.n de Barillas), partiendo de una concentración inicial de ácido láctico de 0.45 % (m/v) (1.125 g de ácido láctico en 25 mL de solución)

Solvente	Concentración máxima ácido láctico (% m/v) ($\pm 1.0 \times 10^{-4}$)	Masa de ácido láctico extraído (g)	% de recuperación de ácido láctico
Éter dietílico	13.259	$0.663 \pm 3.9 \times 10^{-4}$	58.93 ± 0.06
1-Butanol	20.629	$0.516 \pm 6.2 \times 10^{-4}$	45.84 ± 0.12
Octanol	23.779	$0.357 \pm 7.1 \times 10^{-4}$	31.71 ± 0.20
Éter isopropílico	19.269	$0.096 \pm 5.8 \times 10^{-4}$	8.56 ± 0.60
Alcohol isoamílico	18.648	$0.093 \pm 5.6 \times 10^{-4}$	8.29 ± 0.60
Acetato de etilo	4.639	$0.070 \pm 1.4 \times 10^{-4}$	6.19 ± 0.20
Alcohol isobutílico	-	-	-

Notas: Los datos están ordenados de mayor a menor porcentaje de recuperación de ácido láctico. Todas las concentraciones fueron obtenidas con un análisis de HPLC, ya corregidas para un factor de dilución (1:100).

Cuadro 8: Concentración y contenido final promedio de ácido láctico, obtenidos del proceso de extracción líquido-líquido de la segunda muestra de fermentación (caldo MF5.n de Barillas), partiendo de una concentración inicial de ácido láctico de 1.36 % (m/v) (3.400 g de ácido láctico en 25 mL de solución)

Solvente	Concentración máxima ácido láctico (% m/v) ($\pm 1.0 \times 10^{-4}$)	Masa de ácido láctico extraído (g)	% recuperación ácido láctico
Octanol	9.383	$1.877 \pm 2.8 \times 10^{-4}$	55.20 ± 0.02
Éter isopropílico	10.314	$1.753 \pm 3.1 \times 10^{-4}$	51.57 ± 0.02
Éter dietílico	14.595	$1.460 \pm 4.4 \times 10^{-4}$	42.93 ± 0.03
1-Butanol	18.990	$1.329 \pm 5.7 \times 10^{-4}$	39.10 ± 0.04
Alcohol isoamílico	28.053	$0.922 \pm 6.9 \times 10^{-4}$	27.12 ± 0.08
Alcohol isobutílico	13.234	$0.794 \pm 4.0 \times 10^{-4}$	23.35 ± 0.05
Acetato de etilo	4.829	$0.628 \pm 1.4 \times 10^{-4}$	18.46 ± 0.02

Notas: Los datos están ordenados de mayor a menor porcentaje de recuperación de ácido láctico. Todas las concentraciones fueron obtenidas con un análisis de HPLC, ya corregidas para un factor de dilución (1:100).

Cuadro 9: Concentración y contenido final promedio de ácido láctico, obtenidos del proceso de extracción líquido-líquido de la tercera muestra de fermentación (caldo PFn.1 de Barillas), partiendo de una concentración inicial de ácido láctico de 1.82 % (m/v) (4.550 g de ácido láctico en 25 mL de solución)

Solvente	Concentración máxima ácido láctico (% m/v) ($\pm 1.0 \times 10^{-3}$)	Masa de ácido láctico extraído (g)	% de recuperación de ácido láctico
Octanol	4.306	$1.077 \pm 1.3 \times 10^{-4}$	23.66 ± 0.01
Éter isopropílico	4.240	$1.018 \pm 1.3 \times 10^{-4}$	22.36 ± 0.01
Éter dietílico	5.255	$0.841 \pm 1.6 \times 10^{-4}$	18.48 ± 0.02
Acetato de etilo	5.357	$0.589 \pm 1.6 \times 10^{-4}$	12.95 ± 0.03
Alcohol isoamílico	4.819	$0.530 \pm 1.5 \times 10^{-4}$	11.65 ± 0.03
1-Butanol	4.147	$0.207 \pm 1.2 \times 10^{-4}$	4.56 ± 0.06
Alcohol isobutílico	-	-	-

Notas: Los datos están ordenados de mayor a menor porcentaje de recuperación de ácido láctico. Todas las concentraciones fueron obtenidas con un análisis de HPLC, ya corregidas para un factor de dilución (1:100).

Cuadro 10: Concentración y contenido final promedio de ácido láctico, obtenidos del proceso de extracción líquido-líquido de solución blanco, partiendo de una concentración inicial de ácido láctico de 3.00 % (m/v) (7.500 g de ácido láctico en 25 mL de solución)

Solvente	Concentración máxima ácido láctico (% m/v) ($\pm 1.0 \times 10^{-3}$)	Masa de ácido láctico extraído (g)	% de recuperación de ácido láctico
Octanol	5.035	$1.737 \pm 3.1 \times 10^{-4}$	23.16 ± 0.02
Alcohol isoamílico	4.911	$1.621 \pm 3.0 \times 10^{-4}$	21.61 ± 0.02
Éter isopropílico	4.741	$1.565 \pm 2.9 \times 10^{-4}$	20.86 ± 0.02
Alcohol isobutílico	5.358	$1.500 \pm 3.2 \times 10^{-4}$	20.00 ± 0.02
1-Butanol	4.066	$1.464 \pm 2.5 \times 10^{-4}$	19.52 ± 0.02
Éter dietílico	5.023	$1.457 \pm 3.0 \times 10^{-4}$	19.42 ± 0.02
Acetato de etilo	5.351	$1.284 \pm 1.6 \times 10^{-4}$	17.12 ± 0.01

Notas: Los datos están ordenados de mayor a menor porcentaje de recuperación de ácido láctico. Todas las concentraciones fueron obtenidas con un análisis de HPLC, ya corregidas para un factor de dilución (1:100).

Cuadro 11: Concentración y contenido final promedio obtenidos de ácido láctico con formación de lactato de calcio, como producto intermedio, de acuerdo a datos de análisis por HPLC

Solución	Concentración promedio ácido láctico (% m/v) ($\pm 8.0 \times 10^{-4}$)	Masa de ácido láctico extraído (g)	% recuperación de ácido láctico
1ra fermentación (caldo MF4.n Barillas)	0.269	$0.991 \pm 1.4 \times 10^{-4}$	$88.06 \pm 1.4 \times 10^{-2}$
2da fermentación (caldo MF5.n Barillas)	0.407	$1.415 \pm 1.9 \times 10^{-4}$	$41.62 \pm 1.4 \times 10^{-2}$
3ra fermentación (caldo PFn.1 Barillas)	0.477	$1.697 \pm 2.2 \times 10^{-4}$	$37.30 \pm 1.3 \times 10^{-2}$
Blanco	0.622	$3.379 \pm 2.9 \times 10^{-4}$	$45.05 \pm 8.6 \times 10^{-3}$

Notas: El blanco es una solución de ácido láctico al 3% (m/v) como validación de los métodos evaluados de extracción y purificación. El porcentaje de recuperación compara masa de ácido láctico en los 25 mL de caldo de fermentación contra la masa recuperada de la extracción.

A. Método de extracción propuesto

1. Objetivo

El objetivo del procedimiento planteado a continuación es llevar a cabo el proceso de extracción de ácido láctico por extracción líquido-líquido utilizando octanol como solvente, partiendo de un caldo de fermentación microbiana proveniente de la fermentación de melaza utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 como cepa en el proceso.

2. Alcance

El alcance de este procedimiento abarca desde la recepción del caldo de fermentación con ácido láctico hasta la obtención de una solución concentrada de ácido láctico, previo a ser tratada por un proceso de purificación, de ser así necesario.

3. Reactivos necesarios

- Caldo de fermentación microbiana proveniente de la fermentación de melaza utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 como cepa en el proceso
- Solución de ácido clorhídrico (HCl) 4 M
- Octanol marca Merck con pureza mayor al 99% y grado MQ200
- Agua destilada

4. Equipo y cristalería necesarios

- Potenciómetro de vidrio de 25 mL con termómetro de bulbo
- Viscosímetro de Ostwald
- Termómetro de bulbo de -20 a 150 °C con incertidumbre de ± 0.1 °C.
- Medidor multiparámetro con rango de 0 - 14 en valor de pH.
- Cronómetro digital
- Estufa eléctrica con agitación marca Thermo Scientific, modelo SP88857100 de 120V
- Centrífuga pequeña para 8 tubos de ensayo marca Eppendorf AG, modelo 5804 R
- HPLC marca Agilent modelo 1100 1200 (detector IR), columna Hipler H y Software ChemStation for LC.
- Piseta con agua destilada
- Beaker de 2000 mL
- Probeta de 25 mL

- 2 Pipetas volumétricas de 10 mL
- Pipeta graduada de 10 mL
- Micropipeta
- Erlenmeyer de 250 mL
- 8 Tubos de ensayo con tapón (para centrífuga)
- 6 Tubos de ensayo de vidrio con tapón
- Bureta de 25 mL
- Ampolla de decantación de 125 mL
- Embudo de vidrio de 15 cm de diámetro
- Varilla de agitación de vidrio
- Soporte universal
- Pinza mariposa
- Agitador magnético de 2.54 cm (1 in)

5. Desarrollo Fase I: Determinación de propiedades fisicoquímicas

1. Para determinar la densidad, emplear un picnómetro de vidrio de 25 mL utilizando agua destilada como reactivo patrón de comparación utilizando el procedimiento descrito en la Primera Etapa de la sección de Metodología y el Cálculo 1 de la sección de Cálculos de Muestra del Apéndice de este Trabajo de Graduación.
2. Para determinar la viscosidad utilizar un viscosímetro de Ostwald siguiendo el procedimiento descrito en la Primera Etapa de la sección de Metodología y el Cálculo 2 de la sección de Cálculos de Muestra del Apéndice de este Trabajo de Graduación.
3. Para determinar el pH del caldo de fermentación utilizando un Medidor multiparámetro, insertar el medidor en la solución y esperar que estabilice, anotar valor alcanzado (se espera un pH ácido debido a la presencia del ácido láctico).
4. Calentar la solución que contiene ácido láctico hasta que ésta alcance punto de ebullición y anotar valor.

6. Desarrollo Fase II: Extracción líquido-líquido

1. Utilizando una pipeta volumétrica de 50 mL, tomar alícuota de octanol del beaker que contenga el solvente y trasvasar a un Erlenmeyer de 250 mL.
2. Medir y depositar en Erlenmeyer de 250 mL que contenga el octanol ya medido, una alícuota del caldo de fermentación que contiene el ácido láctico. Se debe utilizar una pipeta volumétrica distinta.
3. Medir pH de la mezcla elaborada utilizando el medidor multiparámetro utilizando el mismo procedimiento descrito en el paso 3 del Desarrollo Fase I y anotar valor.
4. Armar sistema de soporte utilizando un soporte universal y una pinza. (Ver Figura 63 en sección de ilustraciones de este Trabajo de Graduación)
5. Llenar, con la ayuda de un embudo, una bureta de 10 mL con la solución preparada de ácido clorhídrico 4M (asegurarse que estuviera completamente limpia y seca) y anotar volumen inicial de HCl en bureta.
6. Agregar agitador magnético de 2.54 cm (1 in) al Erlenmeyer con mezcla de caldo de fermentación, acetato de etilo y HCl (solución 1).
7. Colocar el Erlenmeyer sobre la superficie de cerámica de una estufa eléctrica y activar agitación.
8. Agregar volumen de HCl 4M según valor determinado en procedimiento de regulación de propiedades en la sección de Metodología de este Trabajo de Graduación y medir pH nuevamente. El valor de pH alcanzado debe ser cercano a 3.
9. Trasladar solución a tubo de ensayo de centrífuga y tapar, trasladar 45 mL.
10. Repetir procedimiento dos veces más para tener 3 muestras y que la corrida con el caldo de fermentación utilizado sea estadísticamente confiable.
11. Llenar 5 tubos de ensayo adicionales con agua destilada, cuidando de utilizar el mismo volumen con el objetivo de balancear la centrífuga y cargar el equipo.
12. Centrifugar las muestras a 10 Hertz por 30 minutos.
13. Una vez transcurrido el tiempo de centrifugado, utilizar una ampolla de decantación de 125 mL para separar las fases formadas en las 3 muestras preparadas (una por una).
14. Decantar la primera fase en una probeta limpia de 100 mL y anotar volumen recuperado.

15. Decantar segunda fase a otra probeta limpia de 100 mL.
16. Trasvasar separadamente volúmenes recuperados en ambas fases a dos tubos de ensayo y rotular agregando fecha de elaboración de la solución, nombre del analista, nombre del Trabajo de Graduación e identificación de la muestra. Estas muestras serán analizadas por HPLC para determinar contenido de ácido láctico presente en cada fase.

7. Desarrollo Fase III: Análisis de muestras por HPLC

1. Tomar una alícuota de 0.1 mL de las soluciones purificadas (extracto)
2. Diluir 9.9 mL de agua destilada para obtener una solución con dilución 1:100.
3. Inyectar muestra en HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).
4. Analizar valores de ácido láctico obtenidos utilizando los Cálculos 3 – 5 de la sección de Cálculos de Muestra del Apéndice de este Trabajo de Graduación.

Nota: Para cuantificar el ácido láctico presente en las muestras analizadas por HPLC, se debe correr una solución blanco inicialmente en el equipo.

8. Indicadores

- Fase I:
 - **Temperatura** de fluidos utilizados para la medición de densidad y viscosidad.
- Fase II:
 - **pH** en la adición de la solución de ácido clorhídrico 4M.
 - **Tiempo y velocidad** de centrifugación.
- Fase III:
 - **Volumen** de caldo de fermentación y de agua destilada utilizados, para regular así el factor de dilución de la muestra.

9. Referencias

- Núñez, A; Michelena, G; Carrera, E; Álvarez, X. 2009. Estudio sobre la recuperación y purificación de ácido láctico para la producción de plásticos biodegradables. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Cuba.
- Komesu, A., Wolf Maciel, M. R., and Maciel Filho, R. (2017). Separation and purification technologies for lactic acid – A brief review. *BioRes.* 12(3), 6885-6901.
- Skoog, D; West, D; Holler, J; Crouch, S. 2015. Fundamentos de química analítica. 9na Edición. Cengage Learning. México
- Treybal, R. 2007. Operaciones de transferencia de masa. 2ª Ed. McGraw-Hill. 858 pp.

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para determinar el método para extraer y purificar ácido láctico que proporcionara la mayor recuperación del mismo, inicialmente se evaluó la viscosidad, densidad, pH, punto de ebullición y características físicas (como aspecto, olor y color) del caldo de fermentación proporcionado y resultado de otro estudio.

Para determinar la densidad y la viscosidad se utilizó los procedimientos expresados en la primera etapa de la sección de metodología previamente presentada. Al llevar a cabo este proceso se obtuvo un valor promedio para la densidad de 1.11 g/mL, con una desviación estándar de 0.06 g/mL (valores de 1.17 g/mL, 1.05 g/mL y 1.10 g/mL), y para la viscosidad, un promedio de 4.40 cP con desviación estándar de 2.36 cP (valores de 6.98 cP, 2.36 cP y 3.86 cP). La diferencia entre los tres valores obtenidos no es significativa, ya que para ambos parámetros, el 66 % de los datos se encuentra a una desviación estándar de la media y el 100 % de los datos se encuentra a dos desviaciones estándar. Los valores que no se encuentran a una desviación estándar, tanto para la densidad como para la viscosidad, pertenecen a la primera muestra de fermentación con la que se trabajó y aquí se ven reflejadas las distintas composiciones de las muestras analizadas. El primer caldo de fermentación analizado contaba con 0.45 % (m/v) de ácido láctico, el segundo contaba con 1.36 % (m/v) y el tercero con 1.82 % (m/v), es decir, entre las primera dos fermentaciones se obtuvo un valor tres veces más alto, y entre la segunda y tercera fermentación se observa un incremento del 34 % aproximadamente. Uno de los principales factores que influyó en la diferencia de características obtenidas fue la presencia de subproductos (posibles contaminantes) de la fermentación, principalmente afectando los sólidos presentes en la solución. La mayor cantidad presente de sólidos en la primera muestra explica el valor obtenido, de viscosidad. Las soluciones iniciales para la fermentación fueron preparadas por Barillas 2021 utilizando 70 mL de melaza sin inversión de azúcares y 105 mL de agua destilada (preparación de caldo 1 de fermentación) o bien 75 mL de melaza con inversión de azúcares con 100 mL de agua destilada (preparación de caldos de fermentación 2 y 3).

Según Barillas 2021, la melaza utilizada tenía densidad de 1.25 ± 0.01 g/mL, viscosidad dinámica de $2.95 \times 10^4 \pm 1.61 \times 10^2$ cP, porcentaje de humedad en base seca de 2.54 ± 0.27 %, es decir masa de agua/masa anhidra, °Brix de 87.15 ± 0.29 y pH de 5.11 ± 0.03 . Los °Brix indican la masa de los sólidos disueltos dentro la masa de solución. Tomando esta información se conoce entonces que la melaza contiene 87.15 g de azúcares/100 g de solución, que asumiendo que el resto es agua, posee 12.85 g de agua por cada 100 g de solución. Al utilizar este dato para calcular el porcentaje de humedad en base seca, se obtiene un porcentaje de 14.74%, muy distinto al 2.54 % reportado. Adicionalmente según Gómez *et al* 2011, la viscosidad dinámica de la melaza, a 25°C, se encuentra entre 1.20×10^3 cP y 2.21×10^3 cP. El valor de viscosidad reportado es 1 orden de magnitud mayor al máximo normal reportado en la literatura.

A pesar de que las cantidades utilizadas de melaza para la preparación de los caldos fueron similares, la composición de azúcares entre ambos sustratos cambia radicalmente al invertir o no las mismas. Esto contribuyó a que en las muestras sin inversión de azúcares presentaran un consumo máximo de azúcares de 81 % produciendo 0.0339 g/L de ácido láctico; mientras que las muestras con inversión ácida de azúcares únicamente alcanzaron un 77 % de consumo como máximo, produciendo 0.0031 g/L de ácido láctico. En este trabajo de graduación se evaluó los dos tipos de muestras, siendo la primera fermentación (caldo MF4.n Barillas) con inversión de azúcares y las otras dos (caldo MF5.n Barillas y PFn.1 Barillas) sin inversión ácida de azúcares. El menor consumo de éstos azúcares indicó que aun se encontraba un remanente al terminar la fermentación, afectando así las características del caldo de fermentación, principalmente la viscosidad.

Para determinar el valor de la viscosidad dinámica del caldo de fermentación se utilizó un viscosímetro de Ostwald. Para estas mediciones es más recomendable utilizar un viscosímetro rotacional que es más exacto en su medición. Sin embargo, el viscosímetro de Ostwald, al contar con una ecuación específica para calcular la viscosidad de un fluido de acuerdo con tiempo, volumen, y densidad del fluido a analizar y el blanco (Ecuación 02), hace que la determinación de este parámetro sea sencilla y confiable. En esta metodología se utilizó agua destilada como fluido para calibración. Además, la temperatura es clave para

determinar este parámetro ya que el mismo es sensible a los cambios mínimos de la temperatura, es por esto que la determinación de la viscosidad se llevó a cabo utilizando un baño térmico (Beaker con agua a temperatura controlada).

Los valores de las propiedades fisicoquímicas de una solución o suspensión dependen de los componentes y las concentraciones que las conforman ya que influirán sus propias propiedades. En los caldos de fermentación analizados, además del ácido láctico producido, también se determinó presencia de ácido cítrico, ácido acético y dióxido de carbono. Además, se contaba aun con presencia de sacarosa, glucosa y fructosa no metabolizadas, según datos presentados en “*Cinética de reacción para la síntesis fermentativa de ácido láctico usando melaza de caña de azúcar mediante la utilización de Lactobacillus leichmannii*” trabajo de graduación en el cual se produjo los caldos de fermentación utilizados en este trabajo. La información aquí discutida se encuentra de igual forma en la sección de *Antecedentes* de este Trabajo de Graduación.

La combinación y variación de concentraciones de todos estos componentes dentro de los caldos de fermentación analizados produjo los rangos de valores obtenidos con respecto a las propiedades fisicoquímicas. En la tercera muestra utilizada de fermentación se contó con una concentración de 1.89 % (m/v) de ácido acético (presente únicamente en esta muestra). La presencia de ácido acético puede deberse a fermentación acética directa o por fermentación de etanol formado. En las muestras 1 y 2 se determinó una concentración de 3.84 % (m/v) y 1.89 % (m/v) de ácido cítrico, respectivamente. La concentración de CO₂ no fue cuantificada durante y al final de la fermentación, ya que únicamente se observó su presencia cualitativamente, de acuerdo al reporte de Barillas 2021, por lo que no se puede determinar una influencia de este gas en específico sobre las propiedades fisicoquímicas. Debido al bajo porcentaje de ácido láctico obtenido en el proceso de fermentación no es posible determinar que el cambio en las condiciones fisicoquímicas tenga una relación directa con la cantidad de ácido láctico presente en los caldos analizados, sobre todo, en el pH.

Para poder determinar con mayor certeza el efecto que produce cada compuesto adicional en las propiedades fisicoquímicas del caldo de fermentación, se recomienda llevar

a cabo un análisis de las propiedades fisicoquímicas analizadas (densidad, viscosidad, pH y punto de ebullición) en relación al contenido de compuestos adicionales no deseados para así poder predecir el comportamiento de las mismas según la concentración de los compuestos contaminantes. Con la información obtenida en este Trabajo de Graduación es posible reducir la lista de compuestos adicionales a los de mayor concentración y relevancia: ácido cítrico, ácido acético, etanol y azúcares.

De acuerdo con los valores obtenidos en la caracterización fisicoquímica del caldo de fermentación se observó que una forma de disminuir la influencia de los subproductos en las propiedades fisicoquímicas sería por la implementación de un proceso filtración previo a llevarse a cabo los procesos de extracción. De esta forma se eliminaría los sólidos suspendidos remanentes (biomasa y otros) y cualquier compuesto incluido en ellos que pudiera interactuar con solventes usados o con las soluciones de ácidos y bases para regular el pH o formar lactatos. Con el análisis previamente planteado será posible determinar un modelo de comportamiento de las propiedades fisicoquímicas para así definir más adecuadamente el proceso de filtración previo requerido para eliminar estos compuestos adicionales no deseados.

Para el proceso de filtración se recomienda llevar a cabo una centrifugación para precipitar los sólidos presentes en el caldo de fermentación, para luego eliminarlos por decantación o bien por filtración al vacío según sea la necesidad. En este Trabajo de Graduación no se llevó a cabo este proceso debido a que se deseaba determinar la efectividad de los procesos de extracción con los caldos de fermentación tal y como se obtuvieron. Al observar los resultados se determinó que este proceso previo es necesario para eliminar las impurezas identificadas en el análisis fisicoquímico.

Adicionalmente, se recomienda evaluar la utilización de otro subproducto de la industria azucarera como materia prima para la fermentación de ácido láctico, como jugos clarificados. Esto debido a que la melaza también puede ser un factor contribuyente para los contaminantes encontrados.

Durante la experimentación del Trabajo de Graduación se evaluó dos métodos de extracción y purificación de ácido láctico: una extracción líquido-líquido utilizando siete solventes diferentes con el fin de determinar el más adecuado, de acuerdo a su capacidad extractiva, para llevar a cabo el proceso, y un proceso de extracción con la formación de lactato de calcio como producto intermedio, utilizando soluciones acuosas alcalinas (Ca(OH)_2 1 M) y ácidas acuosas (H_2SO_4 4 M).

La extracción líquido-líquido fue escogida como método a usar para llevar a cabo la extracción de ácido láctico debido a su alta recuperación del producto. En los estudios reportados en la sección de Antecedentes se ha obtenido valores de concentración de hasta 11.03 g/L con un porcentaje de recuperación de ácido láctico del 49.86%, posterior a llevar a cabo adicionalmente un proceso de purificación. Además, es un método que puede ser utilizado a nivel industrial, con un proceso de escalamiento adecuado, utilizando columnas de extracción y dosificación automatizada de disolventes.

Por otro lado, se escogió el método de formación de lactato de calcio como producto intermedio para ser evaluado en este estudio, debido a que es un método que aprovecha la propensión a formación de sales de calcio del ácido láctico, en las condiciones de pH y temperatura adecuadas. Adicionalmente, para convertir nuevamente el lactato de calcio a ácido láctico, únicamente es necesario acidificar el medio, y en este caso, agregando ácido sulfúrico. De acuerdo con esta información, es muy útil este método en la industria ya que permite aumentar el rendimiento de la recuperación de ácido láctico hasta en 1.7 veces más, según Xu y Xu, 2014.

Además, el método de formación de lactato de calcio puede ser utilizado durante el proceso de fermentación de igual forma, para regular el pH y que este no afecte el metabolismo de la cepa. Sin embargo, en este trabajo de graduación no se tomó en cuenta esta ventaja ya que las fermentaciones no fueron realizadas en estas condiciones y por este estudio.

Al comparar los resultados obtenidos en las extracciones líquido-líquido, se puede observar que la cantidad de ácido láctico recuperado varía dependiendo del solvente

utilizado, como era de esperarse. Según la literatura, el solvente con mayor capacidad extractiva para ácido láctico es el octanol, debido a que es el más afín al ácido. Esto se corroboró en la experimentación ya que utilizando este solvente se obtuvo la máxima concentración de ácido láctico, en las condiciones estudiadas, de $23.779 \pm 1.000 \times 10^{-4}$ % (m/v) y que corresponde a 0.357 g de ácido para los 25 mL de caldo analizado de la primera fermentación. De acuerdo con la comparación con la concentración inicial del primer caldo (0.45 % m/v, correspondiente a 1.125 g/25 mL de caldo analizado), en esta primera prueba se obtuvo un porcentaje de recuperación del 31.71%. Al realizar la misma comparación con la segunda muestra, se obtuvo un porcentaje de recuperación de ácido láctico de 55.20 %, el más alto obtenido en todos los análisis (concentración inicial de ácido láctico de 1.36 % (m/v), correspondiente a 3.400 g/25 mL analizados y concentración final de $9.383 \pm 1.000 \times 10^{-4}$ % (m/v), correspondiente a 1.877 g de ácido láctico). Con la tercera fermentación se obtuvo un porcentaje de recuperación del 23.66 % y para la solución blanco de 23.16%.

Al analizar el resto de valores obtenidos se puede observar que los alcoholes, en general, poseen mejor rendimiento en la extracción que el resto de solventes, seguidos por los éteres y por último el acetato de etilo. La estructura química de los alcoholes les permite tener mayor afinidad al ácido láctico, por lo que hace su extracción más eficiente.

Los alcoholes son sumamente utilizados en distintas industrias por lo que su obtención, manejo, almacenamiento y uso está ampliamente estudiado y normado, haciéndolo una materia prima más atractiva para el mercado, y por ende, para el proceso de extracción del ácido láctico. Los alcoholes son tan utilizados en la industria debido a su baja toxicidad y su eficacia en la disolución de sustancias no polares, como solventes orgánicos.

Para poder tener mayor información acerca de la afinidad de cada solvente a evaluar se recomienda utilizar información brindada por los diagramas de equilibrio ternario, que como se explicó en la sección de Marco Teórico de este Trabajo de Graduación, es una representación gráfica de la afinidad que tiene un soluto hacia un disolvente y hacia el solvente con el que se encuentra en solución al inicio de la experimentación. Para el procedimiento de extracción líquido-líquido propuesto en este Trabajo de Graduación, es

necesario que los solventes no sean afines al solvente con el cual se encuentra en solución el ácido láctico. Adicionalmente, es requerido que el disolvente no sea afín al agua, que es el solvente en el cual el ácido láctico se encuentra disuelto. Esta característica es requerida para asegurar un mejor proceso de extracción líquido-líquido.

En este Trabajo de Graduación no se reportó información de los diagramas de equilibrio ternario debido a que se deseaba evaluar la eficiencia de cada solvente propuesto y el efecto de los mismos en el proceso de extracción utilizando el caldo de fermentación evaluado. Las características de este caldo serán distintas a aquellas de una solución conformada únicamente por agua y ácido láctico, como lo plantea la literatura.

Sin embargo, no se logró recuperar tanto ácido láctico como se esperaba, de acuerdo con los datos reportados en estudios consultados de la literatura, que en promedio presentan concentraciones de 11.03 g/L. En su lugar, se extrajo únicamente, como máximo, una concentración de 2.78 g/L (23.779 gramos en 100 mL), es decir, la mitad del valor mínimo esperado según la literatura. Sin embargo, las muestras analizadas de los caldos en este Trabajo de Graduación correspondían a soluciones iniciales de melaza con concentración de 14 y 15 % (m/v), mientras que en la literatura se utilizó soluciones 20 % (m/v) de melaza y una recuperación de 11.03 g/L. Esto es debido a dos factores principales: el primer factor es que dentro de las muestras de las cuales se extrajo el ácido láctico, se encontraban presentes otras sustancias, como ácido cítrico. Los solventes evaluados, especialmente el 1-Butanol, acetato de etilo y éter isopropílico son más afines al ácido cítrico que al ácido láctico. Este factor pudo haber ocasionado que los solventes extrajeran más ácido cítrico de la mezcla, pero al ser un subproducto, este no estaba considerado en el análisis y es debido a esto que no se cuantificó para conocer qué tanto se favoreció el proceso de extracción de este ácido.

El segundo factor es que el solvente de la mezcla fermentada era agua, y según la información del Cuadro 42 de la sección de Anexos, todos los solventes orgánicos estudiados son solubles en agua en cierta proporción, a excepción del octanol, por ende, un volumen de solvente queda retenida en el agua y no llega al extracto. Este factor contribuyó igualmente a que el octanol produjera los resultados más favorables en el proceso de extracción. Según los Cuadro 30-32 de la sección de Datos Calculados, en todas las extracciones se perdió

solvente debido a que quedó disuelto en el agua, y se recuperó menos fase liviana (extracto), que es la que contiene mayor cantidad de ácido láctico, que pesada. Sin embargo, el agua no es el único compuesto que retiene el solvente, ya que hay presencia de biomasa y otros compuestos a los cuales los solventes orgánicos son afines formando emulsiones (Ver Figuras 34 - 62 en ilustraciones) o generando reacciones en el proceso de extracción. Al permanecer parte del solvente y por ende el ácido láctico presente en el mismo, en estos compuestos, se obtienen porcentajes de recuperación máximos de 55 % como se observa en los Cuadros 7 – 10 de la sección de Resultados.

Al analizar los resultados obtenidos utilizando el método de producir lactato de calcio como producto intermedio, se obtuvo una concentración promedio de ácido láctico de $0.444 \pm 8.0 \times 10^{-6}$ % (m/v). Este resultado, al ser comparado con el resultado obtenido con el proceso de extracción líquido-líquido es menor en 10.182 % (m/v). Esto era de esperarse ya que, según la literatura, utilizando este método no se obtiene un rendimiento tan alto debido a que parte del ácido láctico queda retenido en el carbón activado utilizado para llevar a cabo la última etapa de filtración del ácido. Además, se debe utilizar ozono para terminar de purificar la solución obtenida de ácido láctico del proceso de extracción, ya que el ozono elimina impurezas aún presentes en el ácido, las cuales el carbón activado no es capaz de remover. El uso de ozono no se llevó a cabo debido al elevado costo de este gas y a que no se contaba con disponibilidad en el Laboratorio de Operaciones Unitarias. Es debido a esto que a pesar de que el método es útil en la regulación de pH de la solución y es fácil realizarlo porque usa el pH como principal indicador, no es recomendable para escalar industrialmente el proceso. En el proceso se generaría pérdida de hasta el 18 % del ácido láctico debido a que éste quedaría retenido en el proceso de filtración y al utilizar ozono aumentaría el riesgo de llevar a cabo este proceso en una planta industrial, ya que este gas presenta riesgo de incendio y explosión al calentarse o al entrar en contacto con sustancias combustibles. Además, la concentración obtenida es únicamente un 7.44 % del valor obtenido utilizando el método de extracción líquido-líquido, por lo que el otro método evaluado es más indicado.

A pesar de que se obtuvo un valor mayor de concentración promedio de 23.779 % (m/v) con 31.71 % de recuperación de ácido láctico con los métodos evaluados, este no es

aceptable para que el ácido láctico pueda ser utilizado en la producción de PLA. Con el rango de concentraciones iniciales de los caldos de fermentación estudiados, el proceso de extracción y purificación no es rentable, ya que se requerirían grandes volúmenes de caldo y además, los solventes y reactivos, para obtener no más de 218 gramos de ácido láctico (valor inicial de masa del segundo caldo de fermentación evaluado). Sin embargo, los métodos planteados sí extraen el ácido láctico y con la eficiencia esperada según solvente, según la información reportada por la literatura. Las extracciones llevadas a cabo en este Trabajo de Graduación se vieron afectadas por factores externos al proceso, como la presencia de subproductos no deseados, en altas concentraciones. Se debe re analizar el proceso con caldos de fermentación que hayan sido previamente filtrados para reducir al mínimo la cantidad de partículas presentes en el medio que puedan generar competencia al momento de llevar a cabo la extracción. El ácido láctico utilizado en la polimerización del PLA debe ser lo más puro posible para de esta forma evitar la alteración del proceso de polimerización, obteniendo un producto que no cumpla con todas las características necesarias del PLA para su uso en la industria, especialmente en la industria de empaques.

Para evaluar la posibilidad de utilizar el ácido láctico extraído de estos procesos de extracción estudiados, es necesario evaluar los métodos con una solución de ácido láctico con mayor concentración que la que se utilizó en este trabajo. Además, es necesario que la fermentación no produzca subproductos en concentraciones iguales o mayores a las del producto deseado, como ocurrió en el caso del caldo de fermentación utilizado en este Trabajo de Graduación que presentaba concentraciones de ácido cítrico y ácido acético similares a las del ácido láctico. Esto ayudaría a que no se genere competencia con el ácido láctico en los procesos de transferencia de masa en la extracción líquido-líquido. Debido a esto se debe realizar un estudio analizando caldos de fermentación con distintas concentraciones de ácido láctico y de subproductos para poder escoger el solvente más adecuado para obtener la mayor cantidad de ácido láctico posible de un proceso de extracción líquido-líquido.

Basado en los resultados obtenidos, se puede inferir que el proceso de extracción propuesto, con las condiciones evaluadas en este Trabajo de Graduación no es rentable, ya que utilizando 25 mL de octanol, con 25 mL de caldo de fermentación (relación 1:1) se pueden extraer como máximo 1.877 g de ácido láctico, invirtiendo en equipo, energía, el solvente, etc. Se recomienda que al momento de desear escalar el procedimiento se realice un estudio económico para evaluar la rentabilidad del proyecto con valores a escala industrial, no a escala laboratorio.

IX. CONCLUSIONES

1. Al llevar a cabo análisis de laboratorio al caldo de fermentación del cual se partió como solución inicial para el proceso de extracción, se determinó un rango de valores de 4.32 – 4.84 para el pH, 82.0 – 93.5 °C para el punto de ebullición, 1.05 – 1.17 g/mL para la densidad y 2.36 – 6.98 cP para la viscosidad dinámica. Uno de los factores que posiblemente influyó en mayor proporción en los parámetros fisicoquímicos es la concentración de subproductos como azúcares no consumidas, ácido cítrico y ácido acético. Sin embargo, el comportamiento de los mismos se debe estudiar más a fondo.
2. El método que produjo la mayor concentración de ácido láctico extraído en las condiciones evaluadas y partiendo de caldos de fermentación microbiana con concentración inicial de ácido láctico de 0.45 % (m/v), 1.36 % (m/v), 1.82 % (m/v) y solución blanco con concentración inicial de 3.00 % (m/v) fue la extracción líquido-líquido con octanol. Se obtuvo una concentración máxima final del compuesto de $23.779 \pm 1.0 \times 10^{-4}$ % (m/v) con recuperación máxima de ácido láctico de 31.71 ± 0.20 % para el caldo de fermentación 1 (MF4.n), $9.383 \pm 1.0 \times 10^{-4}$ % (m/v) con recuperación máxima del 55.20 ± 0.02 % para el caldo de fermentación 2 (MF5.n), $4.306 \pm 1.0 \times 10^{-4}$ % (m/v) con recuperación máxima de 23.66 ± 0.01 % para el caldo de fermentación 3 (PFn.1) y $5.035 \pm 1.0 \times 10^{-4}$ % (m/v) con recuperación máxima de 23.16 ± 0.02 % para la solución blanco.
3. Utilizando el método de extracción de ácido láctico con la formación de lactato de calcio, como producto intermedio, se obtuvo concentraciones finales de ácido láctico promedio de $0.991 \pm 1.371 \times 10^{-4}$ % (m/v), $1.415 \pm 1.905 \times 10^{-4}$ % (m/v), $1.697 \pm 2.192 \times 10^{-4}$ % (m/v) y $3.379 \pm 2.924 \times 10^{-4}$ % (m/v) para los caldos de fermentación 1 (MF4.n), 2 (MF5.n), 3 (PFn.1) y la solución blanco, respectivamente. De acuerdo con las condiciones evaluadas, la concentración final fue 10.182 % (m/v) menor que el obtenido por extracción con solventes, por lo que no es el método más adecuado para la purificación y extracción de ácido láctico.

4. Con el método propuesto para la extracción de ácido láctico, utilizando un proceso de extracción líquido-líquido con octanol como solvente, es posible obtener una concentración promedio máxima de ácido láctico de $23.779 \pm 1.0 \times 10^{-4}$ % (m/v) con recuperación máxima de 31.71 ± 0.20 %, con los caldos de fermentación en las condiciones evaluadas en este Trabajo de Graduación.

X. RECOMENDACIONES

1. Llevar a cabo un estudio de la relación que tienen los distintos compuestos del caldo de fermentación con la concentración final de ácido láctico obtenida por los métodos de extracción para así determinar el solvente más adecuado, que no tenga mayor afinidad a los subproductos de la fermentación que al ácido láctico.
2. Evaluar la metodología de extracción presentada en este trabajo de graduación con soluciones de ácido láctico a distintas concentraciones, desde la utilizado en este Trabajo de Graduación de 1.21 % (m/v) hasta 16.6 % (m/v) que es la concentración más alta encontrada en literatura, para de esta forma poder determinar la correlación de la concentración del caldo de fermentación con la eficiencia de los métodos de extracción.
3. Purificar el caldo de fermentación utilizando técnicas de centrifugación, decantación y filtración, previo a llevar a cabo el proceso de extracción específico para ácido láctico para que de esta forma se puedan eliminar los subproductos no deseados que puedan generar competencia con el ácido láctico.
4. En el proceso de extracción líquido-líquido, utilizar solventes que no sean solventes en agua para favorecer así el equilibrio de extracción hacia el ácido láctico sin perder solvente que puede disolverse en el agua.
5. Llevar a cabo un análisis de las propiedades fisicoquímicas analizadas en relación al contenido de ácido láctico, ácido cítrico, etanol y azúcares para poder determinar el efecto certero de la presencia de cada componente en estas propiedades y así poder predecir el comportamiento de las mismas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adsul, M, *et al.* 2008. «Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation». *American Society for Microbiology* [Estados Unidos]. 74 (1)
- AGEXPORT. S/F. Agexport *Plásticos*. Disponible en línea en: <https://export.com.gt/publico/comision-de-plasticos> [02/2020]
- ASAZGUA. 2018. *El azúcar de Guatemala en el mundo*. Guatemala. Disponible en línea en: <https://www.azucar.com.gt/azucar-de-guatemala-en-el-mundo/> [09/2019]
- Balsells, L, *et al.* 2014. *Diseño de una planta para la producción de poliácido láctico por policondensación a partir de ácido láctico proveniente de la fermentación de melaza utilizando el hongo Rhizopus oryzae*. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería química. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 387 pp.
- Barascout, A. 2011. *Producción de ácido láctico a partir de residuos de cosecha y jugos de caña de azúcar*. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería química. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 92 pp.
- Barillas, S. 2021. *Cinética de reacción para la síntesis fermentativa de ácido láctico usando melaza de caña de azúcar mediante la utilización de Lactobacillus leichmannii*. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería química. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 104 pp
- CENGICAÑA. 2020. *Producción de azúcar de Guatemala*. Disponible en línea en: https://public.tableau.com/profile/cengicana#!/vizhome/ProduccionGuatemala_1/ProduccionGuatemala [02/2020]
- CENGICAÑA. 2020. *Informe Anual 2018-2019*. Guatemala.
- CENGICAÑA. 2020. *Informe Anual 2019-2020*. Guatemala.
- European Bioplastics. 2020. *Bioplastics Market Data*. Disponible en línea en: <https://www.european-bioplastics.org/market/>

- Gándara, N; García, O. 2019. «¿Es inviable la prohibición de plásticos desechables en Guatemala?» *Prensa Libre* [Guatemala]. 21 de septiembre.
- Guauque, S; Gómez, L. 2019. «Ácido láctico: una revisión sobre los métodos de Determinación y purificación». *Biociencias*. 14(2): 111-141: <https://doi.org/10.18041/2390-0512/biociencias.2.6027>
- Haynes, W; Lide, D y Bruno, T. 2017. *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press. Taylor & Francis Group. Estados Unidos.
- Herryman, M; Blanco, G. 2005. *Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias*. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Cuba.
- Jamshidian, M, *et al.* 2010. «Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. *Institute of Food and Technologies*. 9.
- Joshi, D; Adhikari, N. 2019. «An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity». *British Journal of Pharmaceutical Research*. 28(3): 1-18; Artículo No. JPRI.49840. Inglaterra.
- Komesu, A; Wolf Maciel, M. R. y Maciel Filho, R. 2017. «Separation and purification technologies for lactic acid – A brief review». *BioRes*. 12(3): 6885-6901.
- Larrahondo, J. 2017. *Composición química de la caña y factores que afectan la determinación de sacarosa y el proceso azucarero*. XIV Congreso de técnicos azucareros de Guatemala. Atagua. Guatemala.
- Markets And Markets. 2015. *Lactic Acid Market by Application (Biodegradable Polymers, Food & Beverages, Pharmaceutical Products), Form, and Region, Polylactic Acid Market, by Application (Packaging, Fiber & Fabrics, Agriculture), Form, and Region - Global Forecast to 2025*. Estados Unidos. Market Research Report. Disponible en línea en: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/polylacticacid-387.html>

- Nájera, D, *et al.* 2016. *Análisis de mercado y de etapas en la producción a escala laboratorio de PLA, por fermentación de melaza*. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería química. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 207 pp
- Núñez, A, *et al.* 2009. *Estudio sobre la recuperación y purificación de ácido láctico para la producción de plásticos biodegradables*. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Cuba.
- Observatory of Economic Complexity. 2019. *Comercio de productos en Guatemala*. Disponible en línea en:
https://oec.world/es/visualize/tree_map/hs92/export/gtm/all/show/2019/
- Oficina Económica y Comercial de España en Guatemala. 2019. *Informe Económico y Comercial*. Secretaría de Estado de Comercio. Guatemala.
- Parés i Farràs, R; Juárez, A. 1997. *Bioquímica de los microorganismos*. Reverte. España. 404 pp.
- Plastivida. 2009. *Plásticos Biodegradables, ¿qué son? Y su relación con los RSU*. Centro de Información Técnica – CIT. Boletín Técnico Informativo N° 25. Argentina. 8 pp.
- Serna-Cock, L; Rodríguez, A. 2005. «Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte Biotechnological Production of Lactic Acid: State of the Art». *Journal of Food [India]*. 5 (1): 54-65.
- Skoog, D, *et al.* 2015. *Fundamentos de química analítica*. 9na Edición. Cengage Learning. México.
- Soler, C. 2000. «Acidosis láctica». *Revista Cubana de Medicina*. 39 (2).
- Sun, X, *et al.* 2006. «Extraction and purification of lactic acid from fermentation broth by esterification and hydrolysis method». *Separation and Purification Technology [Estados Unidos]*. 49 (1): 43-48.
- Treybal, R. 2007. *Operaciones de transferencia de masa*. 2ª Ed. McGraw-Hill. 858 pp.
- Vásquez, E. 2018. «Mipymes se desarrollan en mercados biodegradables». *Economía - El Periódico [Guatemala]*. 02 de julio.

- Vidra, A; Tóth, A; Németh, A. 2017. «Lactic acid production from cane molasses». De *Gruyter Open* [Alemania]. 2 (1): 13-16.
- Vuan, V. 2018. *Tendencias de producción de ácido láctico a partir de recursos renovables*. Universidad ORT. Uruguay.
- Xu, K; Xu, P. 2014. «Efficient calcium lactate production by fermentation coupled with crystallization-based in situ product removal». *Bioresourse Technology*. 163 (1): 33 – 39.

XII. APÉNDICE

A. Datos originales

Cuadro 12: Concentración inicial de ácido láctico y cantidad producida en las muestras proporcionadas de caldos (de Barillas), obtenidas por HPLC y cálculos (Estos caldos fueron usados para todas las pruebas de este estudio)

Caldo de fermentación	Concentración ácido láctico (% m/v)	Volumen original producido (L)	Ácido láctico producido (g)	Ácido láctico en 25 mL de caldo para extracción (g)
Primera (MF4.n)	0.45	16.0	72.0	1.125
Segunda (MF5.n)	1.36	16.0	217.6	3.400
Tercera (PFn.1)	1.82	0.5	9.1	4.550
Blanco	3.00	0.5	15.0	7.500

Notas: Los valores de concentración de ácido láctico y volumen original fueron obtenidos del Trabajo de Graduación “Cinética de reacción para la síntesis fermentativa de ácido láctico usando melaza de caña de azúcar mediante la utilización de *Lactobacillus leichmannii*” de Barillas 2021.

Cuadro 13: Tiempos utilizados para la determinación de la viscosidad de las muestras analizadas

Primera fermentación				Segunda fermentación			
Caldo de fermentación		Agua		Caldo de fermentación		Agua	
T ₁ (s)	64.11	T ₁ (s)	10.65	T ₁ (s)	27.11	T ₁ (s)	12.42
T ₂ (s)	63.48	T ₂ (s)	10.94	T ₂ (s)	26.48	T ₂ (s)	11.42
T ₃ (s)	63.11	T ₃ (s)	10.51	T ₃ (s)	26.17	T ₃ (s)	11.8
\bar{T} (s)	63.57	\bar{T} (s)	10.7	\bar{T} (s)	26.59	\bar{T} (s)	11.88

Notas: Todos los valores fueron obtenidos a 20°C. Todos los tiempos tienen una incertidumbre de ± 0.11 s.

Cuadro 14: Masas utilizadas para determinar la densidad del agua y de los caldos de fermentación de las muestras analizadas.

	Primera fermentación		Segunda fermentación		Tercera fermentación	
Volumen picnómetro (± 0.001 mL)	24.36	mL	24.36	mL	24.36	mL
Masa picnómetro vacío	31.4347	g	31.4453	g	31.4436	g
Masa picnómetro con agua	55.7275	g	55.7737	g	55.7641	g
Masa picnómetro con muestra	59.9687	g	57.0541	g	57.4682	g

Notas: Todos los valores fueron obtenidos a 20 °C. Todos los valores de masa tienen una incertidumbre de $\pm 1 \times 10^{-4}$ g. El volumen del picnómetro fue determinado por el fabricante por lo que no es un dato calculado.

Cuadro 15: Volumen recuperado en primera fermentación posterior a llevar a cabo la extracción líquido-líquido, utilizando una ampolla de decantación de 125 mL, partiendo de 45 mL de extracto.

Solvente para extracción	Volumen fase liviana (mL)	Volumen fase pesada (mL)	Volumen perdido (mL)	Volumen total (mL)
Acetato de etilo	1.5 ± 0.3	31.0 ± 0.6	2.5 ± 1.5	35.0 ± 0.6
Éter dietílico	5.0 ± 0.3	20.0 ± 0.3	10.0 ± 1.2	35.0 ± 0.6
Alcohol isobutílico	0.0 ± 0.3	25.0 ± 0.3	10.0 ± 1.2	35.0 ± 0.6
1-Butanol	2.5 ± 0.3	26.0 ± 0.6	6.5 ± 1.5	35.0 ± 0.6
Alcohol isoamílico	0.5 ± 0.3	32.0 ± 0.6	2.5 ± 1.5	35.0 ± 0.6
Éter isopropílico	0.5 ± 0.3	31.5 ± 0.6	3.0 ± 1.5	35.0 ± 0.6
Octanol	1.5 ± 0.3	32.5 ± 0.6	1.0 ± 1.5	35.0 ± 0.6

Notas: Cada volumen fue medido utilizando una probeta de 25 mL. Para los volúmenes recuperados superiores a 25 mL, se utilizó la misma bureta de 25 mL midiendo en dos partes el volumen.

Cuadro 16: Volumen recuperado en segunda fermentación posterior a llevar a cabo la extracción líquido-líquido, utilizando una ampolla de decantación, partiendo de 45 mL de extracto.

Solvente para extracción	Volumen fase liviana (mL)	Volumen fase pesada (mL)	Volumen perdido (mL)	Volumen total (mL)
Acetato de etilo	13.0 ± 0.3	29.0 ± 0.6	3.0 ± 1.5	45.0 ± 0.6
Éter dietílico	10.0 ± 0.3	27.0 ± 0.6	8.0 ± 1.5	45.0 ± 0.6
Alcohol isobutílico	6.0 ± 0.3	37.0 ± 0.6	2.0 ± 1.5	45.0 ± 0.6
1-Butanol	7.0 ± 0.3	37.0 ± 0.6	1.0 ± 1.5	45.0 ± 0.6
Alcohol isoamílico	4.0 ± 0.3	39.0 ± 0.6	2.0 ± 1.5	45.0 ± 0.6
Éter isopropílico	17.0 ± 0.3	24.0 ± 0.3	4.0 ± 1.2	45.0 ± 0.6
Octanol	20.0 ± 0.3	23.0 ± 0.3	2.0 ± 1.2	45.0 ± 0.6

Notas: Cada volumen fue medido utilizando una probeta de 25 mL. Para los volúmenes recuperados superiores a 25 mL, se utilizó la misma bureta de 25 mL midiendo en dos partes el volumen.

Cuadro 17: Volumen recuperado en tercera fermentación posterior a llevar a cabo la extracción líquido-líquido, utilizando una ampolla de decantación, partiendo de 45 mL de extracto.

Solvente para extracción	Volumen fase liviana (mL)	Volumen fase pesada (mL)	Volumen perdido (mL)	Volumen total (mL)
Acetato de etilo	11.0 ± 0.3	31.0 ± 0.6	3.0 ± 1.5	45.0 ± 0.6
Éter dietílico	16.0 ± 0.3	21.0 ± 0.3	8.0 ± 1.2	45.0 ± 0.6
Alcohol isobutílico	1.5 ± 0.3	41.5 ± 0.6	2.0 ± 1.5	45.0 ± 0.6
1-Butanol	5.0 ± 0.3	36.0 ± 0.6	4.0 ± 1.5	45.0 ± 0.6
Alcohol isoamílico	11.0 ± 0.3	34.0 ± 0.6	0.0 ± 1.5	45.0 ± 0.6
Éter isopropílico	24.0 ± 0.3	17.0 ± 0.3	4.0 ± 1.2	45.0 ± 0.6
Octanol	25.0 ± 0.3	11.0 ± 0.3	9.0 ± 1.2	45.0 ± 0.6

Notas: Cada volumen fue medido utilizando una probeta de 25 mL. Para los volúmenes recuperados superiores a 25 mL, se utilizó la misma bureta de 25 mL midiendo en dos partes el volumen.

Cuadro 18: Cuantificación de ácido láctico obtenido de los procedimientos de extracción líquido-líquido llevados a cabo con la primera muestra de caldo de fermentación

Solvente utilizado	Muestra	Concentración	Muestra	Concentración
		ácido láctico (% m/v)		ácido láctico (% m/v)
Acetato de etilo	F1M1	-	MF2.1	$0.046 \pm 1.0 \times 10^{-6}$
Éter dietílico	F1M2	-	MF2.3	$0.132 \pm 1.0 \times 10^{-6}$
Alcohol isobutílico	F1M3	-	-	-
1-Butanol	F1M4	-	MF2.6	$0.206 \pm 1.0 \times 10^{-6}$
Alcohol isoamílico	F1M5	$1.4 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	MF2.8	$0.186 \pm 1.0 \times 10^{-6}$
Éter isopropílico	F1M6	$1.0 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	MF2.10	$0.193 \pm 1.0 \times 10^{-6}$
Octanol	F1M7	$3.0 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	MF2.12	$0.238 \pm 1.0 \times 10^{-6}$

Notas: Los datos fueron obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de una muestra con dilución 1:100 de la solución final obtenida del proceso de extracción líquido-líquido. Las muestras que no cuentan con valor es debido a que no se determinó presencia de ácido láctico en las muestras preparadas.

Cuadro 19: Cuantificación de ácido láctico obtenido de los procedimientos de extracción líquido-líquido llevados a cabo con la segunda muestra de caldo de fermentación

Solvente utilizado	Muestra	Concentración de	Muestra	Concentración de
		ácido láctico (% m/v)		ácido láctico (% m/v)
Acetato de etilo	F2M1	$1.7 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	MF2.2	$0.048 \pm 1.0 \times 10^{-6}$
Éter dietílico	F2M2	$2.1 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	MF2.4	$0.146 \pm 1.0 \times 10^{-6}$
Alcohol isobutílico	F2M3	$8.0 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	MF2.5	$0.132 \pm 1.0 \times 10^{-6}$
1-Butanol	F2M4	$1.0 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	MF2.7	$0.190 \pm 1.0 \times 10^{-6}$
Alcohol isoamílico	F2M5	-	MF2.9	$0.230 \pm 1.0 \times 10^{-6}$
Éter isopropílico	F2M6	-	MF2.11	$0.103 \pm 1.0 \times 10^{-6}$
Octanol	F2M7	$7.0 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	MF2.13	$0.094 \pm 1.0 \times 10^{-6}$

Notas: Los datos fueron obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de una muestra con dilución 1:100 de la solución final obtenida del proceso de extracción líquido-líquido. Las muestras

que no cuentan con valor es debido a que no se determinó presencia de ácido láctico en las muestras preparadas.

Cuadro 20: Cuantificación de ácido láctico obtenido de los procedimientos de extracción líquido-líquido llevados a cabo con la tercera muestra de caldo de fermentación

Solvente utilizado	Muestra	Concentración		
		ácido láctico (% m/v)	ácido láctico (% m/v)	
Acetato de etilo	F3M1	-	MF3.1	$0.054 \pm 1.0 \times 10^{-5}$
Éter dietílico	F3M2	-	MF3.3	$0.053 \pm 1.0 \times 10^{-5}$
Alcohol isobutílico	F3M3	$9.0 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	-	-
1-Butanol	F3M4	$4.0 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	MF3.6	$0.041 \pm 1.0 \times 10^{-5}$
Alcohol isoamílico	F3M5	-	MF3.8	$0.048 \pm 1.0 \times 10^{-5}$
Éter isopropílico	F3M6	-	MF3.10	$0.042 \pm 1.0 \times 10^{-5}$
Octanol	F3M7	$4.0 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	MF3.12	$0.043 \pm 1.0 \times 10^{-5}$

Notas: Los datos fueron obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de una muestra con dilución 1:100 de la solución final obtenida del proceso de extracción líquido-líquido. Las muestras que no cuentan con valor es debido a que no se determinó presencia de ácido láctico en las muestras preparadas.

Cuadro 21: Cuantificación de ácido láctico obtenido de los procedimientos de extracción líquido-líquido llevados a cabo con la solución blanco de ácido láctico

Solvente utilizado	Muestra	Concentración ácido
		láctico (% m/v)
Acetato de etilo	MF3.2	$5.35 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-5}$
Éter dietílico	MF3.4	$5.02 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-5}$
Alcohol isobutílico	MF3.5	$5.36 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-5}$
1-Butanol	MF3.7	$4.07 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-5}$
Alcohol isoamílico	MF3.9	$4.91 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-5}$
Éter isopropílico	MF3.11	$4.74 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-5}$
Octanol	MF3.13	$5.04 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-5}$

Notas: Los datos fueron obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de una muestra con dilución 1:100 de la solución final obtenida del proceso de extracción líquido-líquido.

Cuadro 22: Cantidad de reactivos utilizados durante el proceso de formación de lactato de calcio para extraer ácido láctico del caldo de fermentación.

Solución	Caldo de fermentación (mL)	Solución alcalina (mL)	Solución ácida (mL)	Carbón activado (g)
1ra fermentación (caldo MF4.n Barillas)	25.0 ± 0.3	10.00 ± 0.05	1.80 ± 0.05	$4.98 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-4}$
2da fermentación (caldo MF5.n Barillas)	25.0 ± 0.3	5.00 ± 0.05	4.80 ± 0.05	$5.01 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-4}$
3ra fermentación (caldo PFn.1 Barillas)	25.0 ± 0.3	6.10 ± 0.05	4.50 ± 0.05	$5.00 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-4}$
Blanco	25.0 ± 0.3	28.60 ± 0.05	0.70 ± 0.05	$4.96 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-4}$

Notas: En la primera fermentación se utilizó una solución de cloruro de calcio 1M. En las fermentaciones 2 y 3 y en la solución blanco se utilizó una solución de hidróxido de calcio 0.1M.

Cuadro 23: pH de las soluciones utilizadas, para monitorear el proceso de extracción y purificación de ácido láctico

Solución	pH₀	pH₁	pH₂
1ra fermentación (caldo MF4.n Barillas)	4.84	4.39	2.74
2da fermentación (caldo MF5.n Barillas)	4.85	7.42	2.95
3ra fermentación (caldo PFn.1 Barillas)	4.46	7.25	2.77
Blanco	2.00	8.70	1.99

Notas: Los valores de pH fueron determinados utilizando un potenciómetro con incertidumbre de ± 0.01 . El valor de pH₀ corresponde al pH de la solución original, pH₁ corresponde al valor de pH de la mezcla de caldo de fermentación con solución alcalina y pH₂ corresponde al pH de la mezcla posterior a agregar la solución ácida.

Cuadro 24: Temperaturas de ebullición de la mezcla de caldo de fermentación con solución alcalina durante el proceso de formación de lactato de sodio para la extracción de ácido láctico.

Solución	Temperatura de ebullición
1ra fermentación (caldo MF4.n Barillas)	93.0°C
2da fermentación (caldo MF5.n Barillas)	75.0°C
3ra fermentación (caldo PFn.1 Barillas)	83.0°C
Blanco	87.0°C

Notas: Las temperaturas de ebullición de la solución fueron medidas utilizando un termómetro de bulbo de alcohol, con rango de -20 a 150 °C e incertidumbre de ± 0.1 °C. La solución fue calentada utilizando una estufa eléctrica con un voltaje de 120V y 13A.

Cuadro 25: Cuantificación de ácido láctico obtenido posterior a los procedimientos de extracción y purificación por el método de formación de lactato de calcio como intermediario

Solución	Muestra	Concentración de ácido láctico (% m/v)
1ra fermentación (caldo MF4.n Barillas)	MF2.15	$2.692 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-5}$
2da fermentación (caldo MF5.n Barillas)	MF2.14	$4.067 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-5}$
3ra fermentación (caldo PFn.1 Barillas)	MF3.15	$4.768 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-5}$
Blanco	MF3.14	$6.223 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-5}$

Notas: Los datos fueron obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de una muestra con dilución 1:100 de la solución final obtenida del proceso de extracción líquido-líquido.

B. Datos calculados

Cuadro 26: Concentración de ácido láctico obtenido mediante un proceso de extracción líquido-líquido, basado en datos obtenidos del análisis de HPLC. Datos obtenidos de la primera muestra de fermentación analizada (caldo MF4.n de Barillas).

Solvente utilizado para la extracción	Muestra	C. ácido láctico		% de recuperación de ácido láctico	C. ácido láctico en caldo de fermentación (% m/v)
		en extracto (% m/v) ($\pm 1.0 \times 10^{-4}$)	Ácido láctico (g)		
Acetato de etilo	MF2.1	4.639	$0.070 \pm 1.4 \times 10^{-4}$	6.19 ± 0.20	$1.16 \pm 1.4 \times 10^{-2}$
Éter dietílico	MF2.3	13.259	$0.662 \pm 4.0 \times 10^{-4}$	58.93 ± 0.06	$3.32 \pm 4.0 \times 10^{-2}$
Alcohol isobutílico	-	-	-	-	-
1-Butanol	MF2.6	20.629	$0.516 \pm 6.2 \times 10^{-4}$	45.84 ± 0.12	$5.16 \pm 6.2 \times 10^{-2}$
Alcohol isoamílico	MF2.8	18.648	$0.093 \pm 5.6 \times 10^{-4}$	8.29 ± 0.60	$4.66 \pm 5.6 \times 10^{-2}$
Éter isopropílico	MF2.10	19.269	$0.096 \pm 5.8 \times 10^{-4}$	8.56 ± 0.60	$4.82 \pm 5.8 \times 10^{-2}$
Octanol	MF2.12	23.779	$0.357 \pm 7.1 \times 10^{-4}$	31.71 ± 0.20	$5.94 \pm 7.1 \times 10^{-2}$
Acetato de etilo	F1M1	-	-	-	-
Éter dietílico	F1M2	-	-	-	-
Alcohol isobutílico	F1M3	-	-	-	-
1-Butanol	F1M4	-	-	-	-
Alcohol isoamílico	F1M5	1.400	$7.0 \times 10^{-3} \pm 4.7 \times 10^{-5}$	$0.62 \pm 4.18 \times 10^{-5}$	$3.50 \times 10^{-1} \pm 2.9 \times 10^{-2}$
Éter isopropílico	F1M6	0.100	$5.0 \times 10^{-4} \pm 8.0 \times 10^{-6}$	$0.04 \pm 7.11 \times 10^{-6}$	$2.50 \times 10^{-2} \pm 2.5 \times 10^{-2}$
Octanol	F1M7	0.300	$4.5 \times 10^{-3} \pm 2.4 \times 10^{-5}$	$0.40 \pm 2.13 \times 10^{-5}$	$7.50 \times 10^{-2} \pm 2.6 \times 10^{-2}$

Notas: Las muestras que no cuentan con valor es debido a que no se determinó presencia de ácido láctico en las muestras preparadas.

Cuadro 27: Concentración de ácido láctico obtenido mediante un proceso de extracción líquido-líquido, basado en datos obtenidos del análisis de HPLC. Datos obtenidos de la segunda muestra de fermentación analizada (caldo MF5.n de Barillas)

Solvente utilizado para la extracción	Muestra	C. ácido láctico		% de recuperación de ácido láctico	C. ácido láctico en caldo de fermentación (% m/v)
		en extracto (% m/v) ($\pm 1.0 \times 10^{-4}$)	Ácido láctico (g)		
Acetato de etilo	MF2.2	4.829	$0.627 \pm 1.4 \times 10^{-4}$	18.42 ± 0.02	$1.21 \pm 1.4 \times 10^{-2}$
Éter dietílico	MF2.4	14.595	$1.460 \pm 4.4 \times 10^{-4}$	42.93 ± 0.03	$3.65 \pm 4.4 \times 10^{-2}$
Alcohol isobutílico	MF2.5	13.234	$0.794 \pm 4.0 \times 10^{-4}$	23.35 ± 0.05	$3.31 \pm 4.0 \times 10^{-2}$
1-Butanol	MF2.7	18.989	$1.329 \pm 5.7 \times 10^{-4}$	39.10 ± 0.04	$4.75 \pm 5.7 \times 10^{-2}$
Alcohol isoamílico	MF2.9	23.053	$0.922 \pm 6.9 \times 10^{-4}$	27.12 ± 0.08	$5.76 \pm 6.9 \times 10^{-2}$
Éter isopropílico	MF2.11	10.314	$1.753 \pm 3.1 \times 10^{-4}$	51.57 ± 0.02	$5.58 \pm 6.7 \times 10^{-2}$
Octanol	MF2.13	9.383	$1.877 \pm 2.8 \times 10^{-4}$	55.20 ± 0.02	$4.85 \pm 5.8 \times 10^{-2}$
Acetato de etilo	F2M1	1.700	$0.221 \pm 1.8 \times 10^{-4}$	6.50 ± 0.08	$4.25 \times 10^{-1} \pm 3.0 \times 10^{-2}$
Éter dietílico	F2M2	2.100	$0.210 \pm 1.6 \times 10^{-5}$	6.18 ± 0.08	$5.25 \times 10^{-1} \pm 3.1 \times 10^{-2}$
Alcohol isobutílico	F2M3	0.800	$0.048 \pm 8.4 \times 10^{-4}$	1.41 ± 0.18	$2.00 \times 10^{-1} \pm 2.7 \times 10^{-2}$
1-Butanol	F2M4	1.000	$0.070 \pm 1.0 \times 10^{-4}$	2.06 ± 0.14	$2.50 \times 10^{-1} \pm 2.8 \times 10^{-2}$
Alcohol isoamílico	F2M5	-	-	-	-
Éter isopropílico	F2M6	-	-	-	-
Octanol	F2M7	0.700	$0.140 \pm 2.2 \times 10^{-4}$	4.12 ± 0.16	$1.75 \times 10^{-1} \pm 2.7 \times 10^{-2}$

Notas: Las muestras que no cuentan con valor es debido a que no se determinó presencia de ácido láctico en las muestras preparadas.

Cuadro 28: Concentración de ácido láctico obtenido mediante un proceso de extracción líquido-líquido, basado en datos obtenidos del análisis de HPLC. Datos obtenidos de la tercera muestra de fermentación analizada (caldo PFn.1 de Barillas)

Solvente utilizado para la extracción	Muestra	C. ácido láctico en extracto (% m/v) ($\pm 1.0 \times 10^{-3}$)	Ácido láctico (g)	% de recuperación de ácido láctico	C. ácido láctico en caldo de fermentación (% m/v)
Acetato de etilo	MF3.1	5.357	$0.589 \pm 1.6 \times 10^{-4}$	12.95 ± 0.03	$1.34 \pm 1.6 \times 10^{-2}$
Éter dietílico	MF3.3	5.255	$0.841 \pm 1.6 \times 10^{-4}$	18.48 ± 0.02	$1.31 \pm 1.6 \times 10^{-2}$
Alcohol isobutílico	-	-	-	-	-
1-Butanol	MF3.6	4.147	$0.207 \pm 1.2 \times 10^{-4}$	4.56 ± 0.06	$1.04 \pm 1.3 \times 10^{-2}$
Alcohol isoamílico	MF3.8	4.819	$0.530 \pm 1.5 \times 10^{-4}$	11.65 ± 0.03	$1.21 \pm 1.5 \times 10^{-2}$
Éter isopropílico	MF3.10	4.240	$1.018 \pm 1.3 \times 10^{-4}$	22.36 ± 0.01	$1.06 \pm 1.3 \times 10^{-2}$
Octanol	MF3.12	4.306	$1.076 \pm 1.3 \times 10^{-4}$	23.66 ± 0.01	$1.08 \pm 1.3 \times 10^{-2}$
Acetato de etilo	F3M1	-	-	-	-
Éter dietílico	F3M2	-	-	-	-
Alcohol isobutílico	F3M3	0.900	$0.014 \pm 4.2 \times 10^{-5}$	0.30 ± 0.31	$2.25 \times 10^{-1} \pm 2.8 \times 10^{-2}$
1-Butanol	F3M4	0.400	$0.020 \pm 6.2 \times 10^{-5}$	0.44 ± 0.31	$1.00 \times 10^{-1} \pm 2.6 \times 10^{-2}$
Alcohol isoamílico	F3M5	-	-	-	-
Éter isopropílico	F3M6	-	-	-	-
Octanol	F3M7	0.400	$0.100 \pm 2.6 \times 10^{-5}$	2.20 ± 0.26	$1.00 \times 10^{-1} \pm 2.6 \times 10^{-2}$

Notas: Las muestras que no cuentan con valor es debido a que no se determinó presencia de ácido láctico en las muestras preparadas.

Cuadro 29: Concentración de ácido láctico obtenido mediante un proceso de extracción líquido-líquido, basado en datos obtenidos del análisis de HPLC. Datos obtenidos de la solución blanco analizada (3% (m/v) de ácido láctico)

Solvente utilizado para la extracción	Muestra	C. ácido láctico		% de aumento de ácido láctico	C. ácido láctico en caldo de fermentación (% m/v)
		en extracto (% m/v) ($\pm 1.0 \times 10^{-3}$)	Ácido láctico (g)		
Acetato de etilo	MF3.2	5.351	$1.284 \pm 1.6 \times 10^{-4}$	17.12 ± 0.01	$1.34 \pm 1.6 \times 10^{-2}$
Éter dietílico	MF3.4	5.023	$1.457 \pm 3.0 \times 10^{-4}$	19.42 ± 0.02	$1.26 \pm 1.5 \times 10^{-2}$
Alcohol isobutílico	MF3.5	5.358	$1.500 \pm 3.2 \times 10^{-4}$	20.00 ± 0.02	$1.34 \pm 1.6 \times 10^{-2}$
1-Butanol	MF3.7	4.066	$1.464 \pm 2.5 \times 10^{-4}$	19.52 ± 0.02	$1.02 \pm 1.2 \times 10^{-2}$
Alcohol isoamílico	MF3.9	4.911	$1.621 \pm 3.0 \times 10^{-4}$	21.61 ± 0.02	$1.23 \pm 1.5 \times 10^{-2}$
Éter isopropílico	MF3.11	4.741	$1.564 \pm 2.9 \times 10^{-4}$	20.86 ± 0.02	$1.19 \pm 1.4 \times 10^{-2}$
Octanol	MF3.13	5.035	$1.737 \pm 3.1 \times 10^{-4}$	23.16 ± 0.02	$1.26 \pm 1.5 \times 10^{-2}$

Notas: El blanco es una solución de ácido láctico al 3% (m/v) elaborada como validación de los métodos evaluados de extracción y purificación. Fue elaborada utilizando ácido láctico al 90% (m/m) y agua destilada.

Cuadro 30: Ácido láctico disuelto en agua y por ende no extraído ni contabilizado en análisis HPLC de la primera muestra de fermentación (caldo MF4.n Barillas) con una concentración inicial de ácido láctico de 0.45 % (m/v) (1.125 g de ácido láctico en 25 mL de solución)

Solvente	Muestra	% perdido de ácido láctico	Masa de ácido láctico no extraída (g)	Muestra	% perdido de ácido láctico	Masa de ácido láctico no extraída (g)
Acetato de etilo	MF2.1	93.81 ± 0.20	1.06 ± 2.2 x10 ⁻³	F1M1	-	-
Éter dietílico	MF2.3	41.07 ± 0.06	0.46 ± 6.8 x10 ⁻⁴	F1M2	-	-
Alcohol isobutílico	-	-	-	F1M3	-	-
1-Butanol	MF2.6	54.16 ± 0.12	0.61 ± 1.4 x10 ⁻³	F1M4	-	-
Alcohol isoamílico	MF2.8	91.71 ± 0.60	1.03 ± 6.8 x10 ⁻³	F1M5	99.38 ± 6.7 x10 ⁻³	1.12 ± 7.6 x10 ⁻³
Éter isopropílico	MF2.10	91.44 ± 0.60	1.03 ± 6.8 x10 ⁻³	F1M6	99.96 ± 1.6 x10 ⁻²	1.12 ± 1.8 x10 ⁻²
Octanol	MF2.12	68.29 ± 0.20	0.77 ± 2.2 x10 ⁻³	F1M7	99.60 ± 5.3 x10 ⁻³	1.12 ± 6.0 x10 ⁻³

Notas: Las muestras que no cuentan con valor es debido a que no se determinó presencia de ácido láctico en las muestras preparadas.

Cuadro 31: Ácido láctico disuelto en agua y por ende no extraído ni contabilizado en análisis HPLC de la segunda muestra de fermentación (caldo MF5.n Barillas) con una concentración inicial de ácido láctico de 1.36 % (m/v) (3.400 g de ácido láctico en 25 mL de solución)

Solvente	Muestra	% perdido de ácido láctico	Masa de ácido láctico no extraída (g)	Muestra	% perdido de ácido láctico	Masa de ácido láctico no extraída (g)
Acetato de etilo	MF2.2	81.54 ± 0.02	2.772 ± 7.8 x10 ⁻³	F2M1	93.50 ± 0.08	3.18 ± 2.8 x10 ⁻³
Éter dietílico	MF2.4	57.07 ± 0.03	1.940 ± 1.0 x10 ⁻³	F2M2	93.82 ± 0.08	3.19 ± 2.6 x10 ⁻³
Alcohol isobutílico	MF2.5	76.65 ± 0.05	2.606 ± 1.7 x10 ⁻³	F2M3	98.59 ± 0.18	3.35 ± 6.0 x10 ⁻³
1-Butanol	MF2.7	60.90 ± 0.04	2.071 ± 1.5 x10 ⁻³	F2M4	97.94 ± 0.04	3.33 ± 4.9 x10 ⁻³
Alcohol isoamílico	MF2.9	48.43 ± 0.02	1.647 ± 6.0 x10 ⁻³	F2M5	-	-
Éter isopropílico	MF2.11	91.44 ± 0.60	1.029 ± 6.8 x10 ⁻³	F2M6	-	-
Octanol	MF2.13	44.80 ± 0.02	1.523 ± 5.1 x10 ⁻³	F2M7	95.88 ± 0.16	3.26 ± 5.4x10 ⁻³

Notas: Las muestras que no cuentan con valor es debido a que no se determinó presencia de ácido láctico en las muestras preparadas.

Cuadro 32: Ácido láctico disuelto en agua y por ende no extraído ni contabilizado en análisis HPLC de la tercera muestra de fermentación (caldo PFn.1 Barillas) con una concentración inicial de ácido láctico de 1.82 % (m/v) (4.550 g de ácido láctico en 25 mL de solución)

Solvente	Muestra	% perdido de ácido láctico	Masa de ácido láctico no extraída (g)	Muestra	% perdido de ácido láctico	Masa de ácido láctico no extraída (g)
Acetato de etilo	MF3.1	87.05 ± 0.03	3.961 ± 1.2 x10 ⁻³	F3M1	-	-
Éter dietílico	MF3.3	81.52 ± 0.02	8.618 ± 1.0 x10 ⁻⁴	F3M2	-	-
Alcohol isobutílico	-	-	-	F3M3	99.70 ± 0.31	4.54 ± 1.42
1-Butanol	MF3.6	95.44 ± 0.06	4.343 ± 2.7 x10 ⁻³	F3M4	99.56 ± 0.31	4.53 ± 1.41
Alcohol isoamílico	MF3.8	88.35 ± 0.03	4.020 ± 1.2 x10 ⁻³	F3M5	-	-
Éter isopropílico	MF3.10	77.54 ± 0.01	3.532 ± 5.8 x10 ⁻³	F3M6	-	-
Octanol	MF3.12	76.34 ± 0.01	3.474 ± 5.6 x10 ⁻⁴	F3M7	97.80 ± 0.26	4.45 ± 1.19

Notas: Las muestras que no cuentan con valor es debido a que no se determinó presencia de ácido láctico en las muestras preparadas.

Cuadro 33: Ácido láctico disuelto en agua y por ende no extraído ni contabilizado en análisis HPLC de la solución blanco con una concentración inicial de ácido láctico de 3.00 % (m/v) (7.500 g de ácido láctico en 25 mL de solución)

Solvente	Muestra	% perdido de ácido láctico	Masa de ácido láctico no extraída (g)
Acetato de etilo	MF3.1	88.82 ± 0.01	6.216 ± 9.5 x10 ⁻⁴
Éter dietílico	MF3.3	80.58 ± 0.02	6.043 ± 1.6 x10 ⁻³
Alcohol isobutílico	-	80.00 ± 0.02	6.000 ± 1.6 x10 ⁻³
1-Butanol	MF3.6	80.48 ± 0.02	6.036 ± 1.3 x10 ⁻³
Alcohol isoamílico	MF3.8	78.39 ± 0.02	5.879 ± 1.4 x10 ⁻³
Éter isopropílico	MF3.10	79.14 ± 0.02	5.935 ± 1.4 x10 ⁻³
Octanol	MF3.12	76.84 ± 0.01	5.763 ± 1.3 x10 ⁻⁴

Notas: Se partieron de 25 mL de caldo de fermentación y 25 mL de solvente orgánico para llevar a cabo la extracción.

Cuadro 34: Concentración de ácido láctico obtenido mediante un proceso de formación de lactato de calcio como intermediario, basado en datos obtenidos del análisis de HPLC.

Solución	Muestra	C. ácido láctico en			C. ácido láctico en caldo de fermentación (% m/v)
		extracto (% m/v) ($\pm 1.0 \times 10^{-5}$)	Ácido láctico (g)	% de aumento de ácido láctico	
1F	MF2.15	0.269	0.991 ± 0.164	$88.06 \pm 1.4 \times 10^{-2}$	$6.73 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-3}$
2F	MF2.14	0.407	1.415 ± 0.130	$41.62 \pm 1.4 \times 10^{-2}$	$1.02 \times 10^{-1} \pm 9.8 \times 10^{-3}$
3F	MF3.15	0.477	1.697 ± 0.153	$37.30 \pm 1.3 \times 10^{-2}$	$1.19 \times 10^{-1} \pm 1.2 \times 10^{-3}$
Blanco	MF3.14	0.622	3.379 ± 0.200	$45.05 \pm 8.7 \times 10^{-3}$	$1.53 \times 10^{-1} \pm 1.5 \times 10^{-3}$

Notas: 1F: Primera fermentación, caldo MF4.n de Barillas (0.45 % (m/v)), 2F: segunda fermentación, caldo MF5.n de Barillas (1.36 % (m/v)), 3F: tercera fermentación, caldo PFn.1 de Barillas (1.82×10^{-2}).

La solución blanco tiene una concentración 3.00 % (m/v) y fue elaborada con ácido láctico al 90%.

C. Datos de reactivos y equipo

Cuadro 35: Reactivos utilizados en la extracción líquido-líquido

Reactivo	CAS	Fórmula química	Pureza	Marca	Grado
Ácido láctico (L-)	79-33-4	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$	90%	Merck	Ph Eur, BP, E 270
Acetato de etilo	141-78-6	$\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$	99.50%	J.T.Baker	-
Éter dietílico	60-29-7	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$	$\geq 99.7 \%$	Merck	ACS, ISO, Reag. Ph Eur
Alcohol isobutílico	78-83-1	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{OH}$	$\geq 99 \%$	Merck	ACS, Reag. Ph Eur
1-Butanol	71-36-3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	$\geq 99.5 \%$	Merck	ACS, ISO, Reag. Ph Eur
Alcohol isoamílico	123-51-3	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	98%	Merck	MQ200
Éter isopropílico	108-20-3	$[(\text{CH}_3)_2\text{CH}]_2\text{O}$	$\geq 99 \%$	Merck	ACS, Reag. Ph Eur
Octanol	111-87-5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$	$\geq 99 \%$	Merck	MQ200
Ácido sulfúrico	7664-93-9	H_2SO_4	95%	J.T.Baker	Reactivo ACS
Ácido clorhídrico	7647-01-0	HCl	37%	Merck	ACS, ISO, Reag. Ph Eur

Notas: Los reactivos utilizados son los que estaban disponibles en el Laboratorio de Operaciones Unitarias.

Cuadro 36: Datos de balanza analítica

Equipo	Balanza analítica
Marca	OHAUS
Modelo	PA114
Capacidad máxima (g)	110
Legibilidad (g)	0.0001

Cuadro 37: Datos de centrífuga utilizada para el procedimiento de extracción líquido-líquido

Equipo	Centrífuga
Marca	Eppendorf AG
Modelo	5804 R
Clasificación	120V – 60Hz 12 ^a
Número de serie	5805F0033302
Velocidad máxima (rpm)	1400
Densidad de líquido máxima (Kg*dm⁻³)	1.2

Cuadro 38: Datos de estufa eléctrica

Equipo	Estufa eléctrica con agitación
Marca	Thermo Scientific
Modelo	SP88857100
Número de serie	C3710012101651308
Voltaje (V)	100 – 120
Amperaje (A)	13
Revoluciones (Hz)	50 - 60

Cuadro 39: Datos de potenciómetro

Equipo	Medidor multiparámetro
Marca	Oakton
Modelo	PCSTestr 35
Parámetros de medición	pH, conductividad, sólidos disueltos, salinidad
Reconocimiento de buffer	NIST y USA
Rango de pH	0 - 14
Incertidumbre de pH	0.01

Cuadro 40: Datos de HPLC

Equipo	HPLC
Marca	Agilent
Modelo	1100 1200 (detector IR)
Columna	Hiplex H
Software	ChemStation for LC

Cuadro 41: Datos de cristalería utilizada en mediciones

Cristalería	Capacidad	Incertidumbre	Marca
Probeta	25 mL	0.3 mL	Kimax
Pipeta graduada	2 mL	0.01 mL	Marienfeld
Pipeta graduada	10 mL	0.1 mL	Marienfeld
Bureta	50 mL	0.05 mL	LMS
Ampolla de decantación	125 mL	-	Pyrex
Termómetro de bulbo	-20 – 150 °C	0.1 °C	-

D. Cálculos de muestra

Cálculo 1: Determinación de densidad del caldo de fermentación (cf) utilizando un picnómetro.

Para determinar la densidad del caldo de fermentación es necesario utilizar la masa del picnómetro vacío y conteniendo el caldo de fermentación, datos encontrados en el cuadro 14 en la sección de Datos originales de este Apéndice. Adicionalmente, se debe conocer el volumen efectivo del picnómetro, dato reportado en el mismo cuadro 14. Es importante mencionar que todos los valores deben ser tomados a la misma temperatura, debido a que la densidad depende de esta variable. Una vez se conozcan estos datos se puede utilizar la siguiente ecuación:

$$\rho_{cf} = \frac{M_{cf} - M_p}{V_p}$$

Donde:

- ρ_{cf} es la densidad del caldo de fermentación
- M_{cf} es la masa del picnómetro una vez se ha llenado con el caldo de fermentación
- M_p es la masa del picnómetro vacío.
- V_p es el volumen del picnómetro.

Sustituyendo los valores reportados en el cuadro 14 de la sección de Datos originales se obtiene la siguiente densidad, reportada a su vez en el cuadro 6 de la sección de Resultados.

$$\rho_{cf} = \frac{59.9687 \text{ g} - 31.4347 \text{ g}}{24.36 \text{ mL}} = 1.1713 \text{ g/mL}$$

Nota: Se utilizó el mismo cálculo para determinar la densidad del segundo caldo de fermentación evaluado y para determinar la densidad del agua destilada a utilizar como líquido de referencia en el cálculo de viscosidad.

Cálculo 2: Determinación de viscosidad del caldo de fermentación (cf) utilizando un viscosímetro de Oswald y agua destilada a 20°C como fluido de referencia

Para determinar la viscosidad del caldo de fermentación es necesario conocer la densidad de dicho caldo y la densidad y viscosidad de un líquido patrón, en este caso agua. La densidad del caldo de fermentación fue previamente calculada con el cálculo 1 de esta sección y se encuentra reportada en el cuadro 6 de la sección de resultados. Los tiempos de recorrido fueron tomados utilizando un cronómetro digital y están reportados en el cuadro 13 de la sección de datos originales. Una vez se conozcan estos datos se puede utilizar la siguiente ecuación:

$$\eta_{cf} = \eta_{H_2O} * \frac{\rho_{cf} * t_{cf}}{\rho_{H_2O} * t_{H_2O}}$$

Donde:

- η_{cf} es la viscosidad aparente del caldo de fermentación
- η_{H_2O} es la viscosidad del líquido de referencia, en este caso agua destilada a 20°C.
- ρ_{cf} es la densidad del caldo de fermentación (previamente calculada utilizando un picnómetro)
- t_{cf} es el tiempo que le toma al caldo de fermentación recorrer el recorrido establecido en el viscosímetro de Oswald.
- ρ_{H_2O} es la densidad del líquido de referencia, en este caso agua destilada a 20°C.
- t_{H_2O} es el tiempo que le toma al agua recorrer el recorrido establecido en el viscosímetro de Oswald.

Sustituyendo los valores reportados en el cuadro 6 de la sección de resultados y en el cuadro 13 de la sección de datos originales, se obtiene la siguiente viscosidad, reportada a su vez en el cuadro 6 de la sección de resultados.

$$\eta_{cf} = 1.0000 \text{ cP} * \frac{\left(1.1713 \frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) (63.57 \text{ s})}{\left(0.9972 \frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) (10.70 \text{ s})} = 6.9780 \text{ cP}$$

Nota: Se utilizó el mismo cálculo para obtener la viscosidad del segundo caldo de fermentación analizado.

Cálculo 3: Concentración real de ácido láctico en el extracto obtenido, basada en la concentración de la muestra analizada utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Para analizar las muestras obtenidas del proceso de extracción, utilizando HPLC, fue necesario preparar diluciones de estas. Debido a esto, es necesario realizar un cálculo adicional para determinar la concentración real de ácido láctico en la muestra analizada. Para determinar la concentración se utiliza la siguiente ecuación, multiplicando la concentración obtenida utilizando el análisis HPLC (cuadros 18 – 21 y 25 de la sección de datos originales) y la dilución trabajada.

$$C = C_i * X$$

Donde:

- C es la concentración del extracto
- C_i es la concentración de la muestra analizada en HPLC
- X es la dilución de la muestra analizada

Sustituyendo los valores reportados en los cuadros 18 – 21 y 25 de la sección de datos originales, se obtiene la siguiente concentración real, reportada a su vez en los cuadros 26 – 29 y 34 de la sección de datos calculados.

$$C = 0.0536 \% * \frac{100 \text{ mL muestra}}{1 \text{ mL extracto}} = 5.357 \% \left(\frac{m}{v} \right)$$

Notas: Se utilizó el mismo procedimiento para obtener la concentración del extracto en todas las muestras analizadas mediante HPLC.

Cálculo 4: Masa de ácido láctico presentes en el extracto analizado, utilizando la concentración real del extracto y el volumen del mismo.

Para determinar la masa real de ácido láctico recuperada posterior al proceso de extracción es necesario utilizar la siguiente ecuación, relacionando la concentración real de ácido láctico en la muestra (calculada en el cálculo 3 y reportada en los cuadros 26 – 29 y 34 de la sección de datos calculados) con el volumen del extracto obtenido posterior a la extracción (cuadros 15 – 17 de la sección de datos originales).

$$M_{AL} = C * V$$

Donde:

- M_{AL} es la masa de ácido láctico presente en el extracto
- C es la concentración de ácido láctico en el extracto
- V es el volumen del extracto obtenido posterior a la extracción líquido-líquido

Sustituyendo los valores reportados en los cuadros 26 - 29 y 34 de la sección de datos calculados y en los cuadros 15 – 17 de la sección de datos originales, se obtiene la siguiente masa de ácido láctico, reportada a su vez en los cuadros 26 – 29 y 34 de la sección de datos calculados.

$$M_{AL} = 5.357 \frac{g}{mL} * 11 mL = 0.589 g \text{ de ácido láctico}$$

Notas: Se utilizó el mismo procedimiento para obtener la concentración del extracto en todas las muestras analizadas mediante HPLC.

Cálculo 5: Porcentaje de aumento de contenido de ácido láctico comparado con la cantidad inicial en el caldo de fermentación trabajado.

Para obtener una comparación confiable de la eficiencia de los métodos de extracción utilizados se determinó el porcentaje de recuperación de ácido láctico comparando la masa del ácido recuperada contra la masa original presente en el caldo de fermentación. La masa obtenida se calculó utilizando el cálculo 4 y los datos se reportaron en los cuadros 26 – 29 y 34 de la sección de datos calculados. La masa original de los caldos de fermentación fue tomada de la información del cuadro 12 de la sección de datos originales. Una vez se conozcan estos datos se puede utilizar la siguiente ecuación:

$$\%Recuperación = \frac{M_{AL}}{M_i} * 100\%$$

Donde:

- M_{AL} es la masa de ácido láctico obtenida del extracto
- M_i es la masa de ácido láctico obtenida en el caldo de fermentación inicial.

Sustituyendo los valores reportados en los cuadros 26 - 29 y 34 de la sección de Datos calculados y en el cuadro 12 de datos originales, se obtiene el siguiente porcentaje de recuperación de ácido láctico, reportada a su vez en los cuadros 26 – 29 y 34 de la sección de datos calculados.

$$\%Recuperación = \frac{0.589 \text{ g}}{4.550 \text{ g}} * 100\% = 12.95\%$$

Notas: Se utilizó el mismo procedimiento para obtener la concentración del extracto en todas las muestras analizadas mediante HPLC.

Cálculo 6: Concentración de ácido láctico en el caldo de fermentación utilizado

Para obtener la concentración de ácido láctico presente en el caldo de fermentación utilizado es necesario contar con la concentración real de ácido láctico obtenida con el cálculo 3 de esta sección (datos reportados en los cuadros 26 – 29 y 34 de la sección de datos calculados) y el volumen del extracto obtenido (datos reportados en cuadros 15 – 18 de la sección de Datos originales). Una vez se conozcan estos datos se puede utilizar la siguiente ecuación:

$$C_f = \frac{C}{100} * V_f$$

Donde:

- C_f es la concentración de ácido láctico en el caldo de fermentación utilizado
- C es la concentración de ácido láctico en el extracto
- V_f es el volumen de extracto obtenido

Sustituyendo los valores reportados en los cuadros 26 - 29 y 34 de la sección de datos calculados y en los cuadros 15 – 18 de la sección de datos originales, se obtiene el siguiente porcentaje de recuperación de ácido láctico, reportada a su vez en los cuadros 26 – 29 y 34 de la sección de datos calculados.

$$C_f = \frac{0.05357 \frac{g}{mL}}{100 mL} * 11 mL = 0.01339\% (m/v)$$

Notas: Se utilizó el mismo procedimiento para obtener la concentración del extracto en todas las muestras analizadas mediante HPLC.

E. Análisis de error

Cálculo 7: Propagación de error en una suma y/o resta de valores

$$\delta R = \delta X + \delta Y$$

Donde:

- δR es la incertidumbre del resultado
- δX y δY son la incertidumbre de los sumandos

$$V_P = V_T - V_{Fp} - V_{Fl} = (45.0 - 29.0 - 13.0)mL = 3.0 mL$$

$$\delta V_P = \delta V_T + \delta V_{Fp} + \delta V_{Fl} = (0.6 + 0.6 + 0.3)mL = 1.5 mL$$

$$V_P = 3.0 \pm 1.5 mL$$

Notas: El cálculo ejemplificado se llevó a cabo para determinar el volumen perdido (V_P) en el proceso de extracción líquido-líquido, restando del volumen total de la muestra (V_T) el volumen recuperado en la fase pesada (V_{Fp}) y el volumen recuperado en la fase liviana (V_{Fl}). Se utilizó el mismo procedimiento para determinar la incertidumbre de todo cálculo que involucrara sumas y restas.

Cálculo 8: Propagación de error en una multiplicación o división de valores

$$\frac{\delta R}{|R|} = \frac{\delta X}{|X|} + \frac{\delta Y}{|Y|}$$

Donde:

- $|R|$ es el valor absoluto del producto o cociente obtenido
- δR es la incertidumbre del producto o cociente obtenido
- $|X|$ y $|Y|$ son los valores absolutos de los elementos de la multiplicación o división.
- δX y δY son la incertidumbre de los elementos de la multiplicación o división.

$$M_{AL} = C_R * V_{Fl}/100 = 5.357 \frac{g}{mL} * 13.0 mL/100 = 0.589 g$$

$$\delta M_{AL} = |M_{AL}| * \left(\frac{\delta C_R}{|C_R|} + \frac{\delta V_{Fl}}{|V_{Fl}|} \right) = |0.589g| * \left(\frac{0.001 \frac{g}{mL}}{5.357 \frac{g}{mL}} + \frac{0.3 mL}{11.0 mL} \right) = 0.0274 g$$

$$M_{AL} = 0.589 \pm 0.0274 g$$

Notas: El cálculo ejemplificado se llevó a cabo para determinar la masa de ácido láctico (M_{AL}) obtenida en el proceso de extracción líquido-líquido, multiplicando la concentración real en la fase liviana de la extracción (C_R) con el volumen de la misma (V_{Fl}). Se utilizó el mismo procedimiento para determinar la incertidumbre de todo cálculo que involucrara multiplicación y división.

F. Cromatogramas

Nota: a continuación, se presentan los 10 cromatogramas de las muestras con mayor porcentaje de recuperación de ácido láctico como una muestra de las 51 muestras analizadas.

Figura 17: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF2.12, extracción del primer caldo de fermentación (MF4.n de Barillas) utilizando octanol como solvente

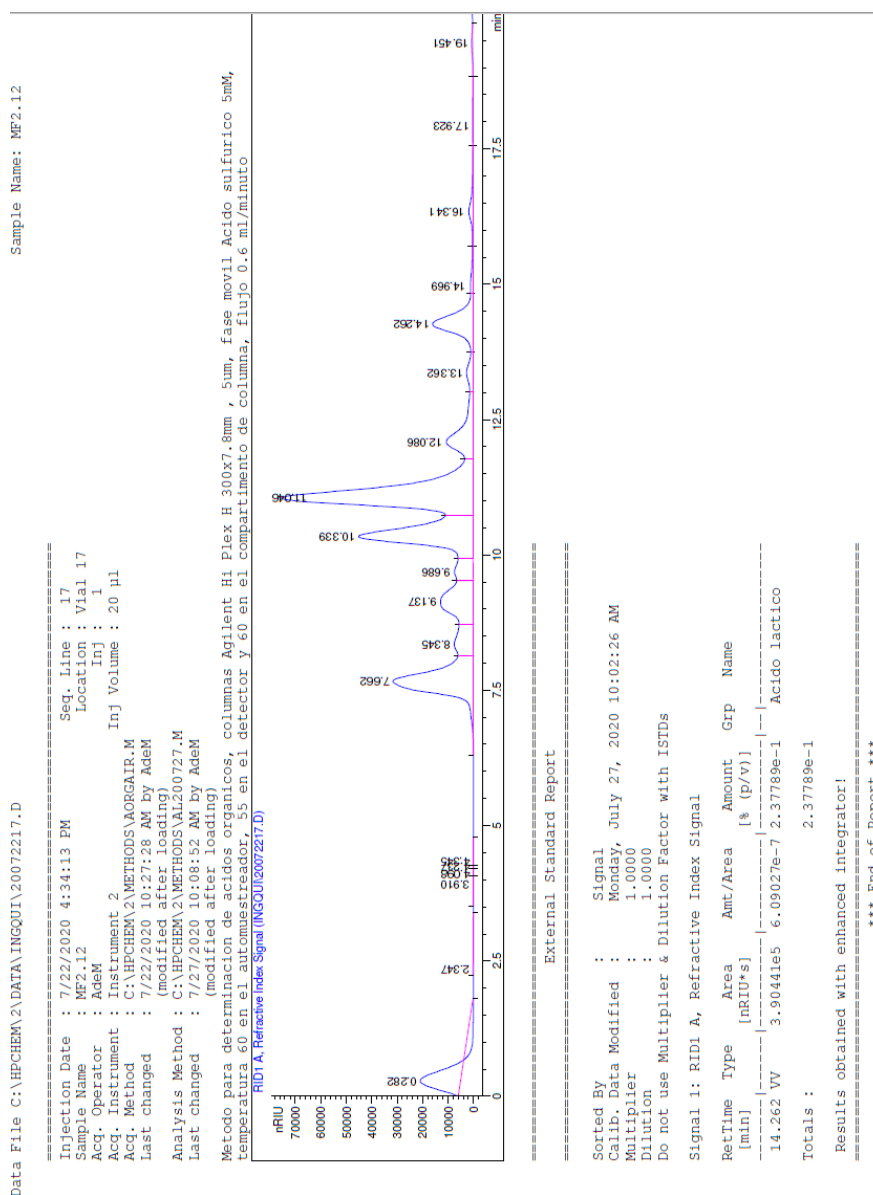


Figura 18: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF2.3, extracción del primer caldo de fermentación (MF4.n de Barillas) utilizando éter dietílico como solvente

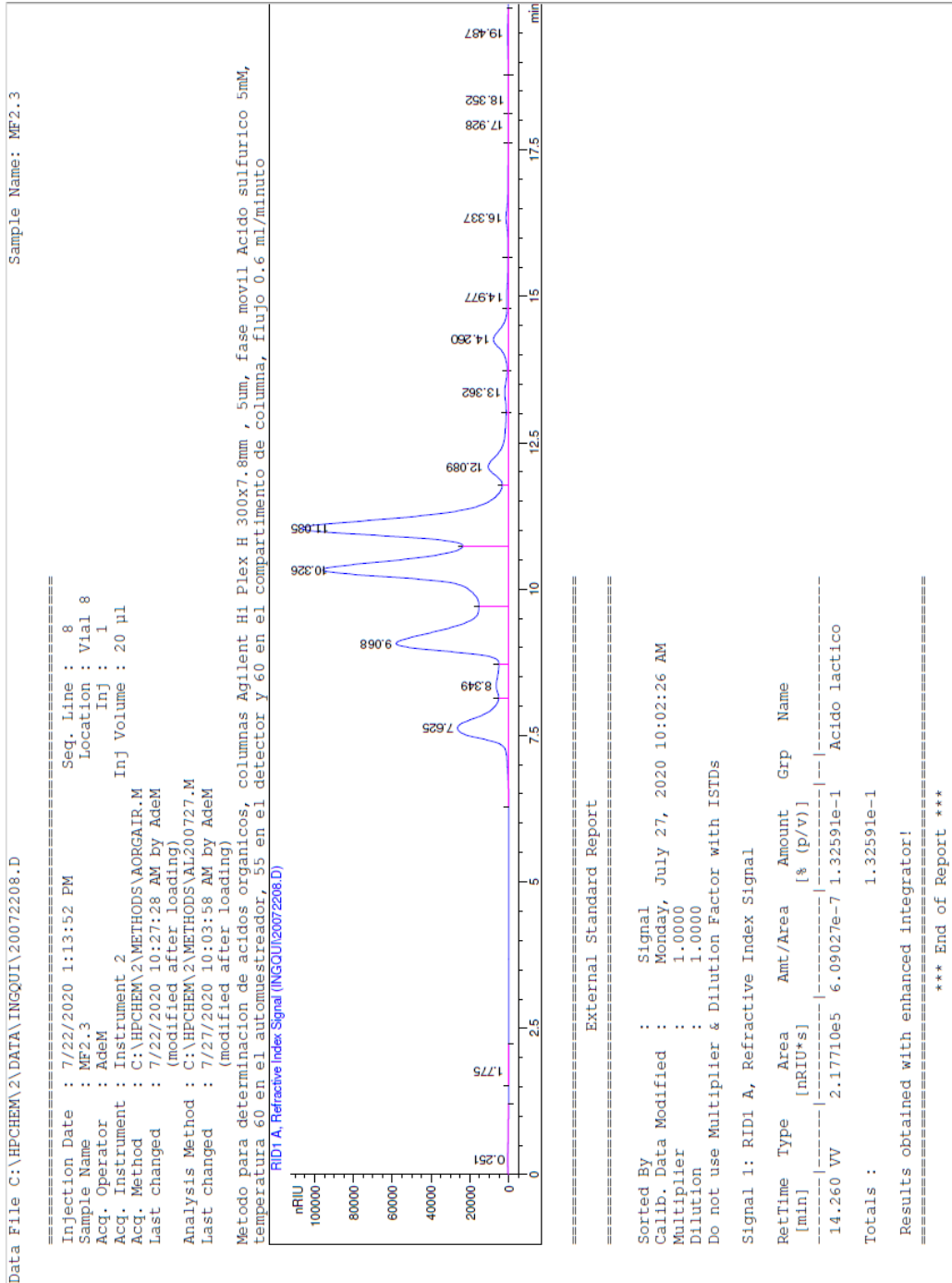


Figura 19: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF2.13, extracción del segundo caldo de fermentación (MF5.n de Barillas) utilizando octanol como solvente

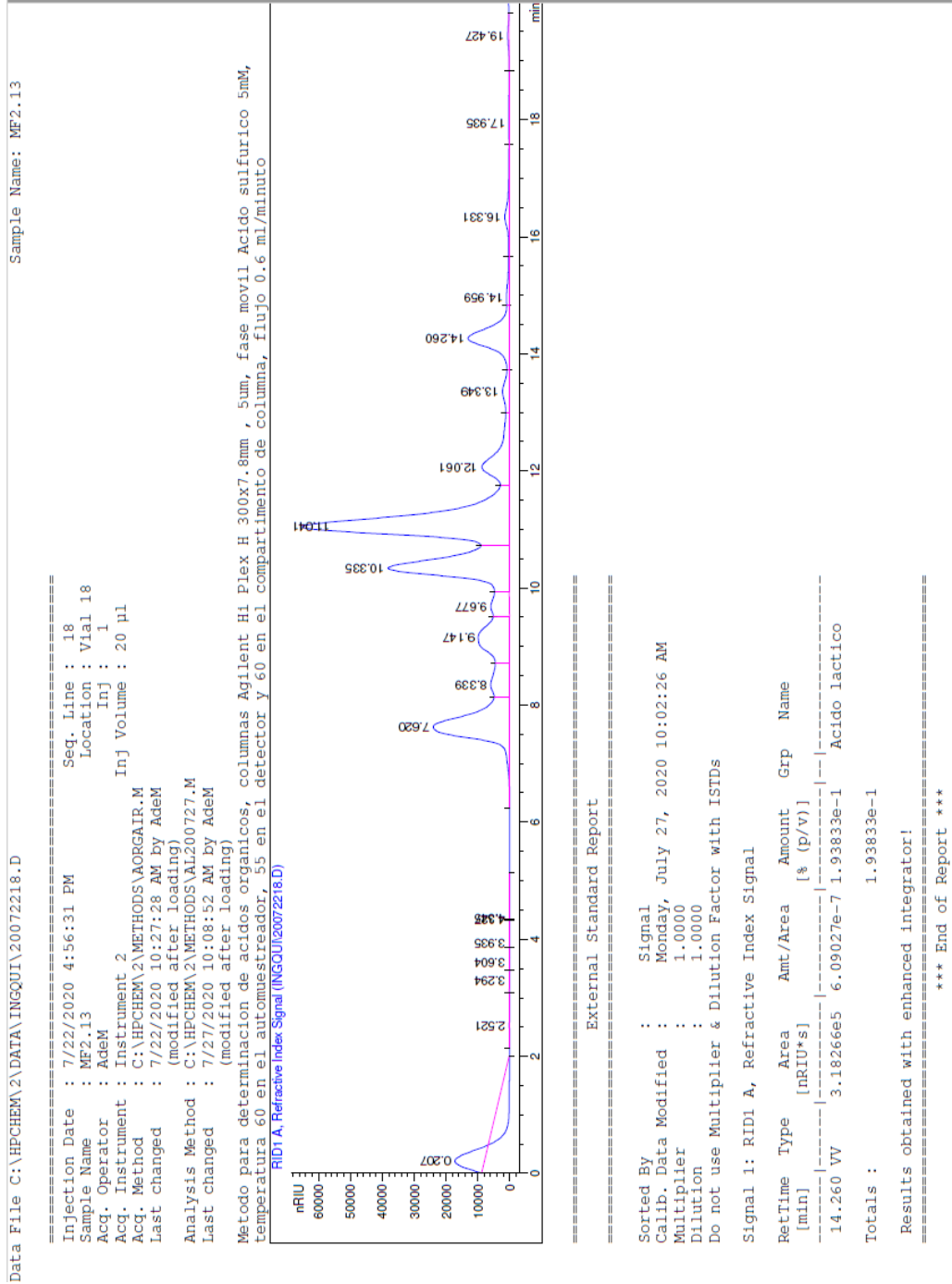


Figura 20: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF2.11, extracción del segundo caldo de fermentación (MF5.n de Barillas) utilizando éter isopropílico como solvente

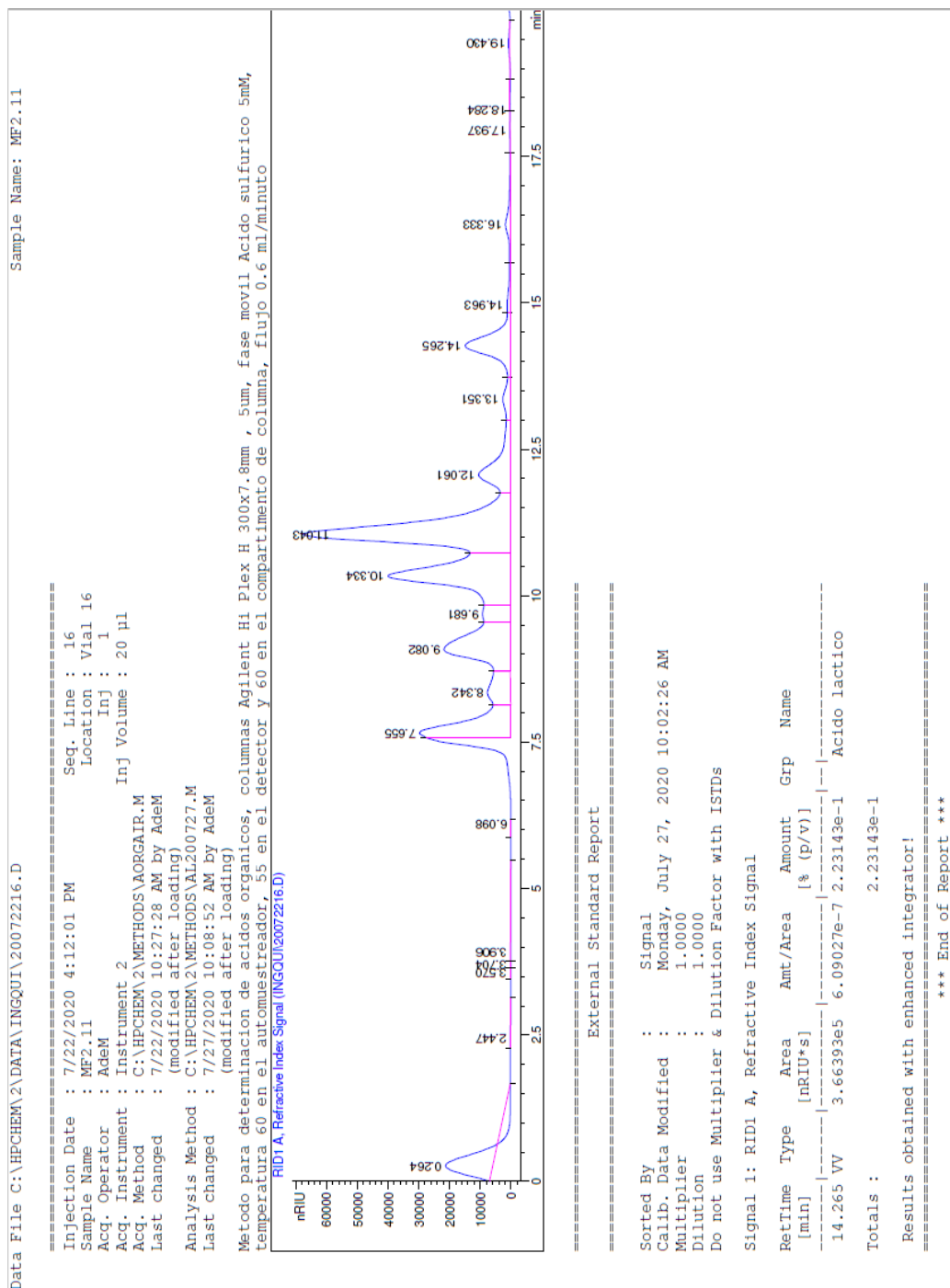


Figura 21: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF3.12, extracción del tercer caldo de fermentación (PFn.1 de Barillas) utilizando octanol como solvente

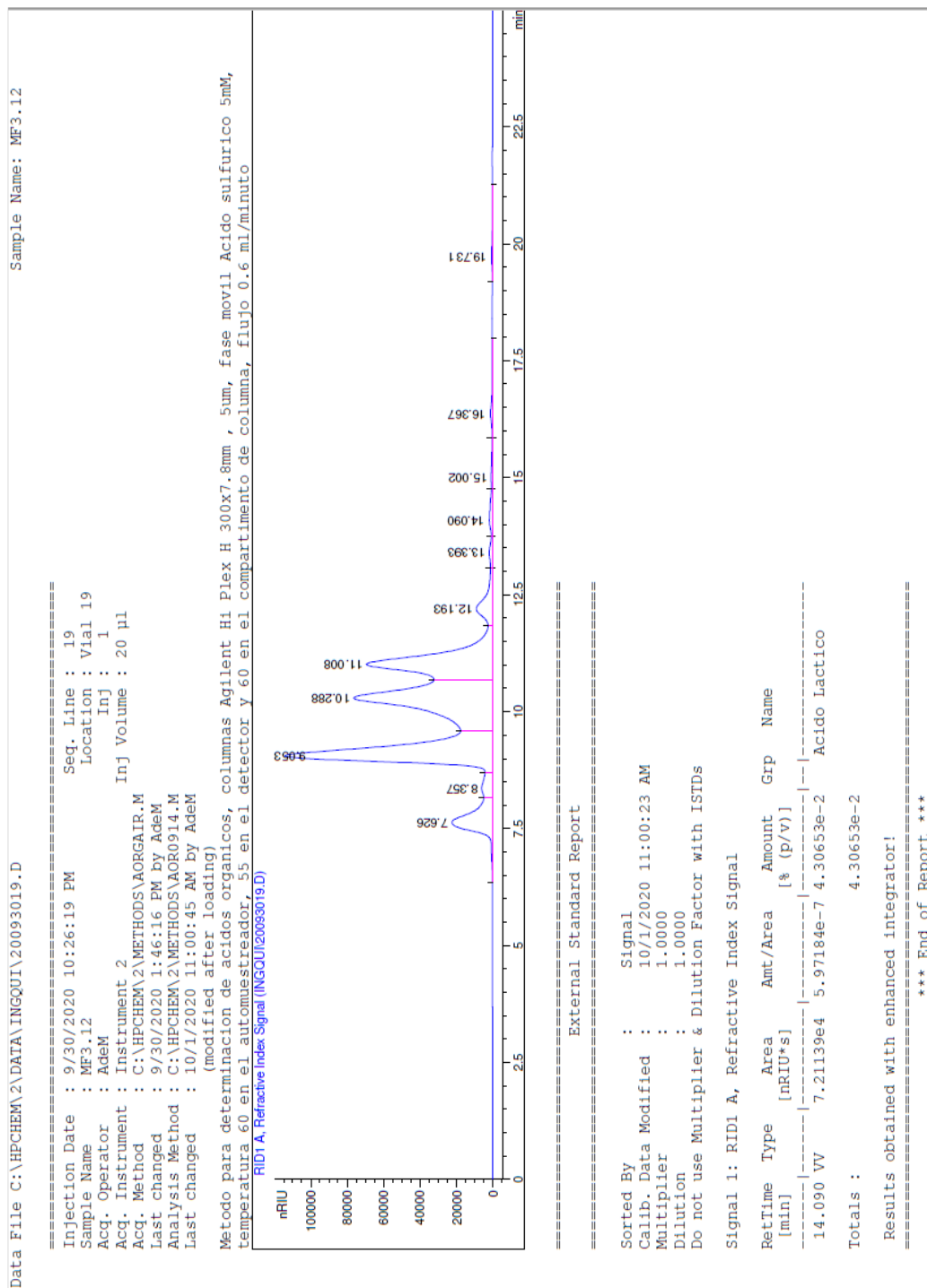


Figura 22: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF3.10, extracción del tercer caldo de fermentación (PFn.1 de Barillas) utilizando éter isopropílico como solvente

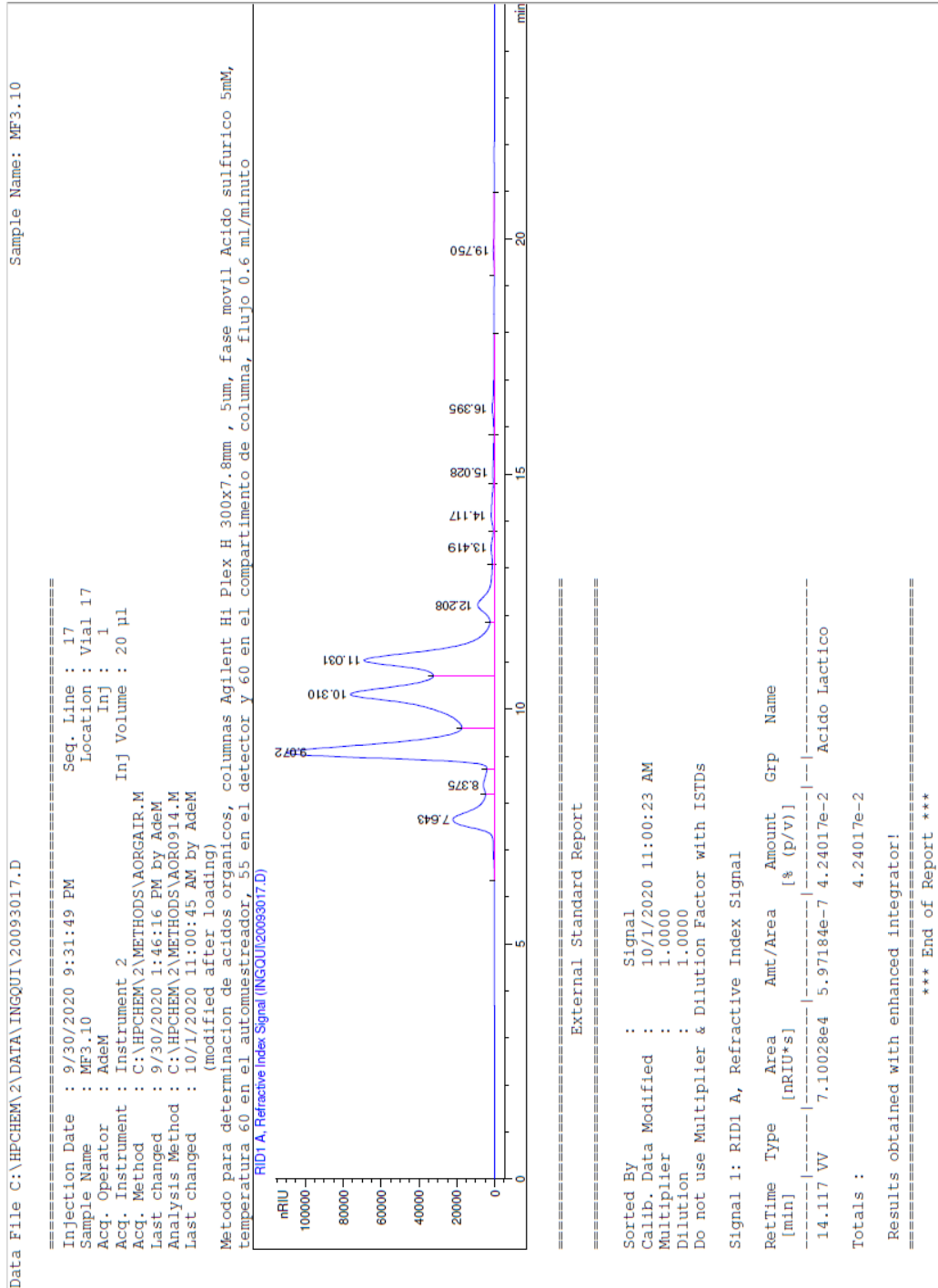


Figura 23: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF3.13, extracción de la solución blanco utilizando octanol como solvente

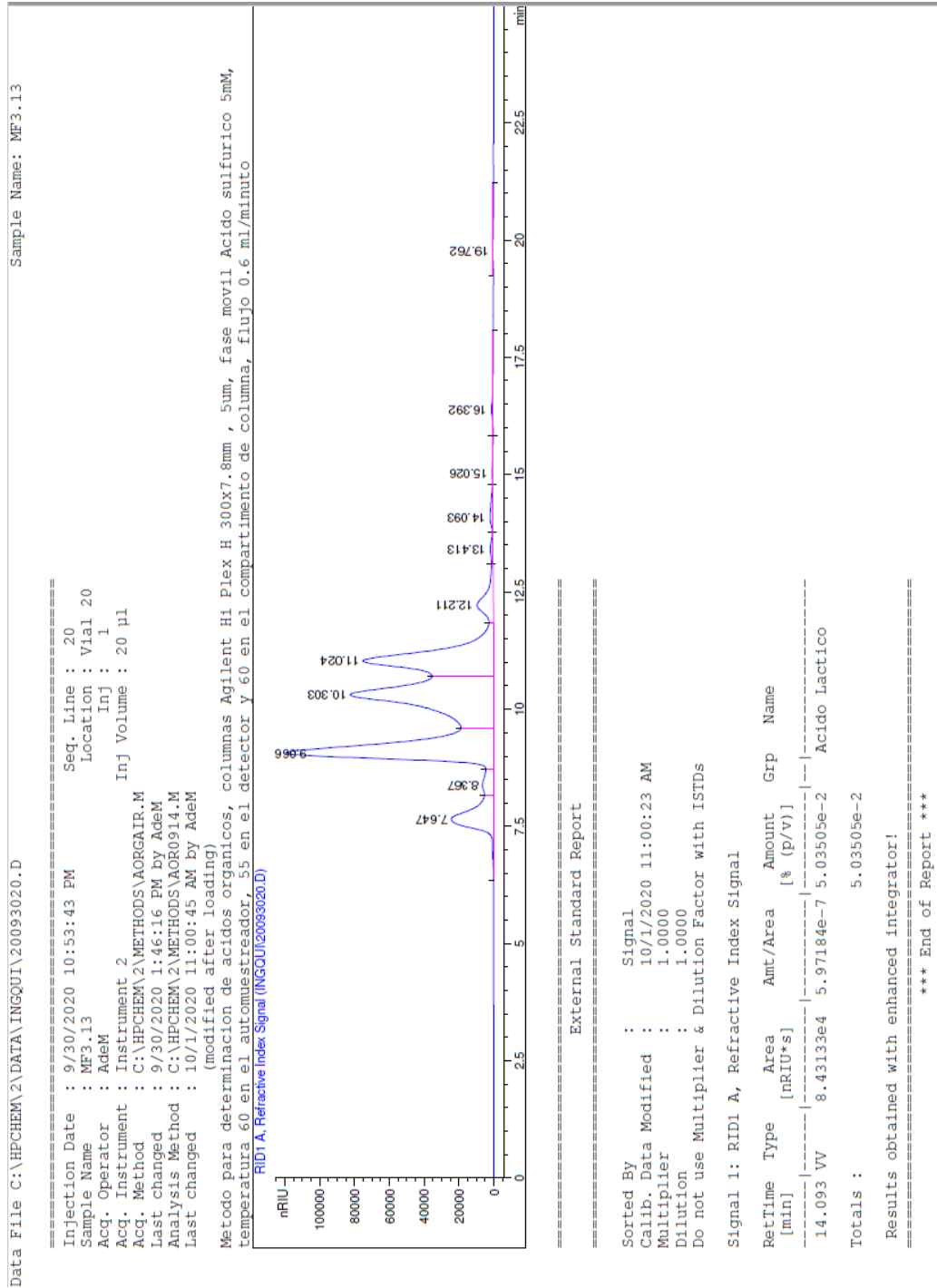


Figura 24: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF3.9, extracción de la solución blanco utilizando alcohol isoamílico como solvente

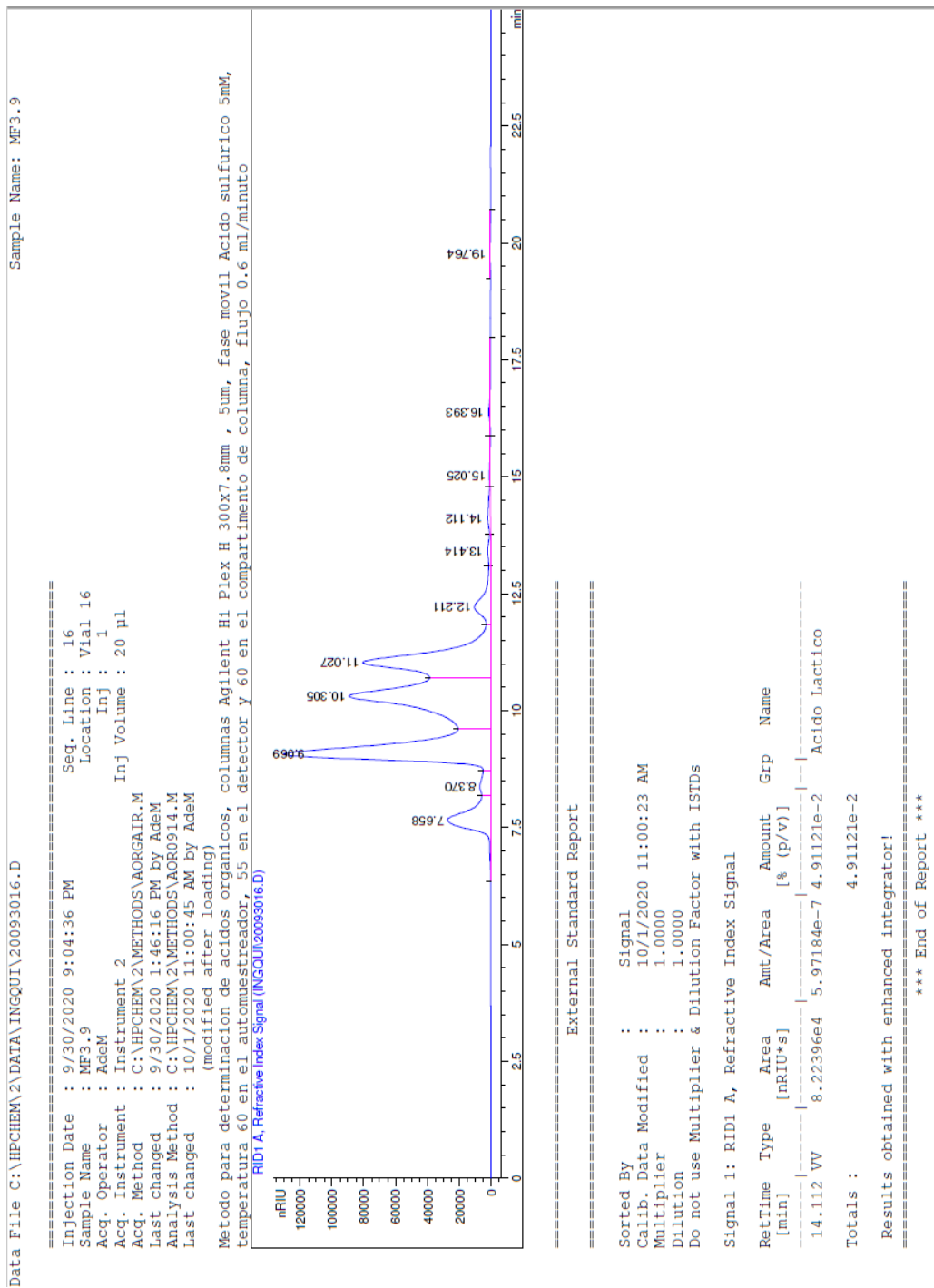


Figura 25: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF2.14, extracción del segundo caldo de fermentación (MF5.n de Barillas) utilizando el método de extracción de formación de lactato de calcio como intermediario

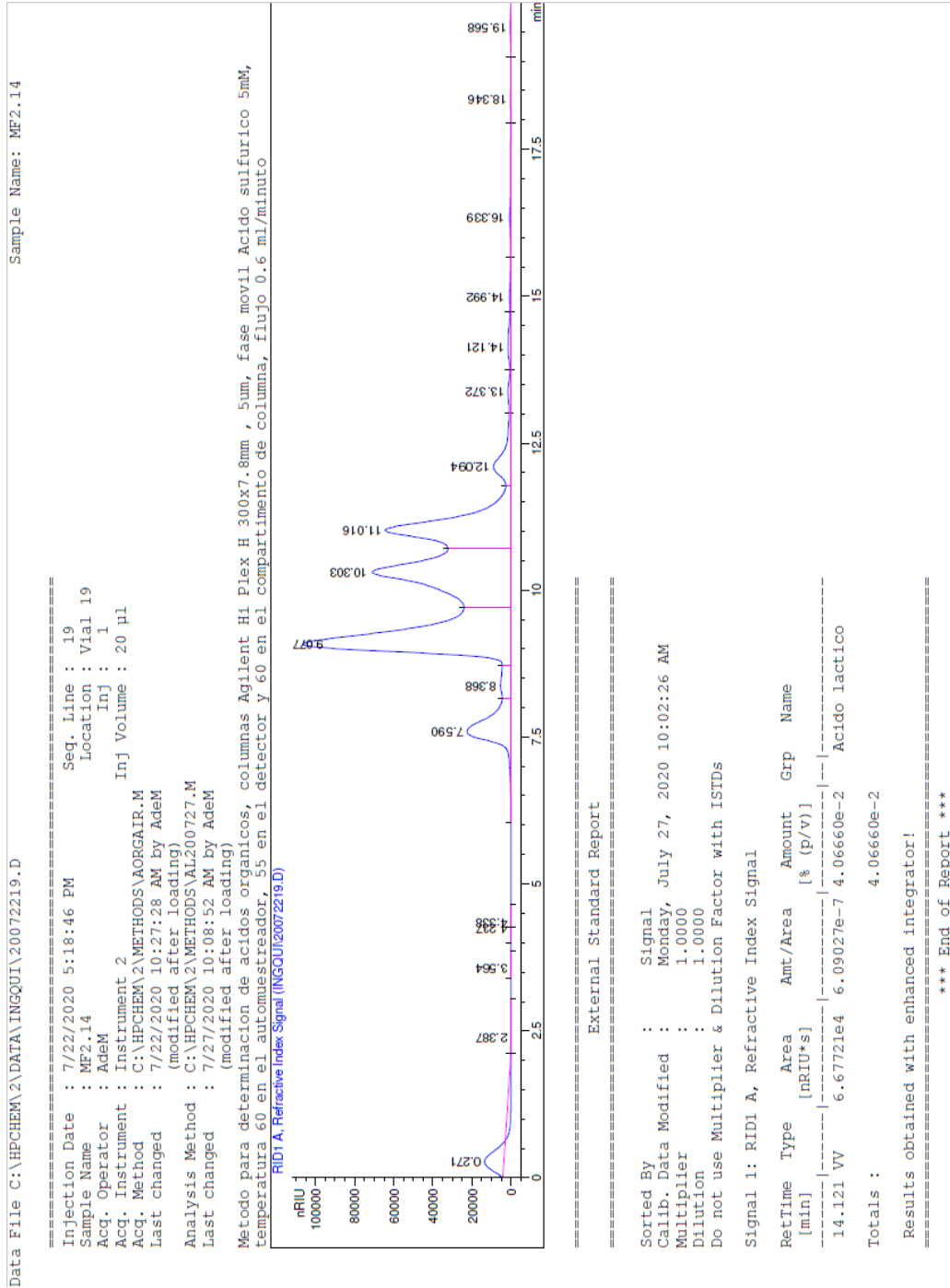
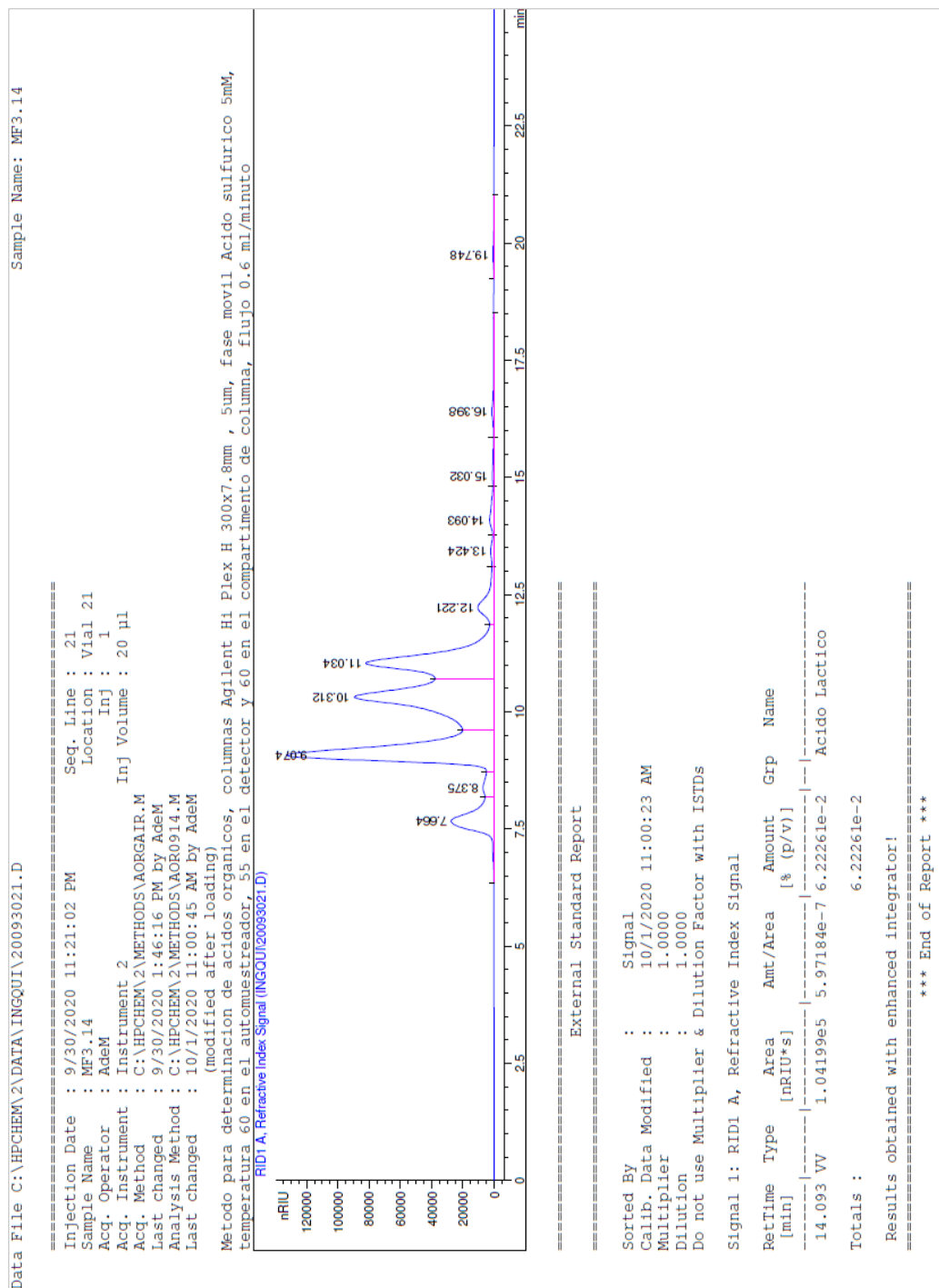


Figura 26: Cromatograma obtenido de un análisis con HPLC de la muestra MF3.14, extracción de la solución blanco utilizando el método de extracción de formación de lactato de calcio como intermediario



G. Anexos

Cuadro 42: Solubilidades de los reactivos en agua

Reactivo	Solubilidad agua a 20°C (g/L)
Ácido láctico (L-)	Soluble
Acetato de etilo	80
Éter dietílico	69
Alcohol isobutílico	85
1-Butanol	66
Alcohol isoamílico	25
Éter isopropílico	9
Octanol	No soluble
Ácido sulfúrico	Soluble
Ácido clorhídrico	Miscible
Cal (Ca(OH) ₂)	0.99

Fuente: Hojas de seguridad de los reactivos y Haynes, *et al*, 2017.

Figura 27: Datos utilizados para la elaboración de la curva de calibración en el HPLC para la determinación de ácido láctico de las muestras MF3.1-15

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name	
14.041	1	1	2.00000	3.67423e6	5.44332e-7	Acido Lactico
		2	4.00000	6.86182e6	5.82936e-7	
		3	6.00000	1.03315e7	5.80749e-7	
		4	8.00000	1.37713e7	5.80917e-7	
		5	10.00000	1.61441e7	6.19423e-7	

Figura 28: Curva de calibración en el HPLC para la determinación de ácido láctico de las muestras MF3.1-15

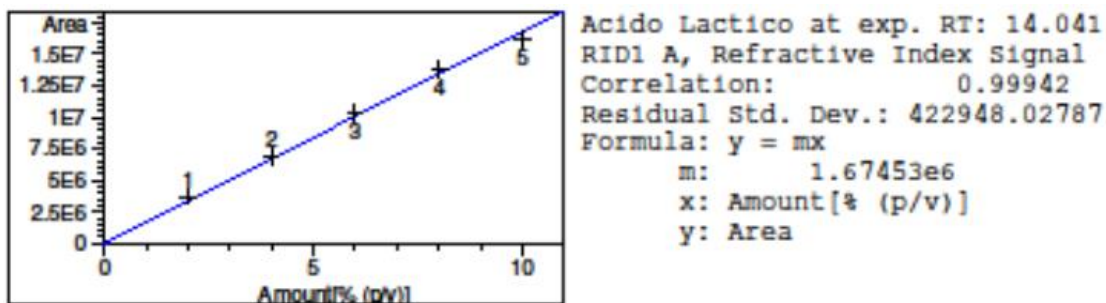


Figura 29: Datos utilizados para la elaboración de la curva de calibración en el HPLC para la determinación de ácido láctico de las muestras MF2.1-16

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
14.020	1	2.00000	3.50952e6	5.69878e-7	Acido lactico
	2	4.00000	6.66302e6	6.00328e-7	
	3	6.00000	1.06301e7	5.64438e-7	
	4	8.00000	1.32891e7	6.01998e-7	
	5	10.00000	1.57468e7	6.35050e-7	

Figura 30: Curva de calibración en el HPLC para la determinación de ácido láctico de las muestras MF2.1-16

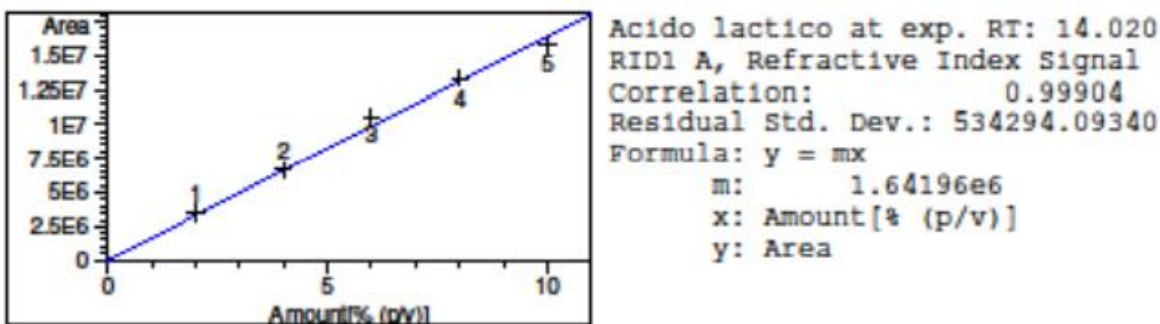


Figura 31: Datos utilizados para la elaboración de la curva de calibración en el HPLC para la determinación de ácido láctico de las muestras F1M1-8, F2M1-7 y F3M2-7

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [%]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
13.856	1	2.00000	4.05131e6	4.93667e-7	Acido Lactico
		4.00000	7.39067e6	5.41223e-7	
		6.00000	1.11641e7	5.37435e-7	
		8.00000	1.47139e7	5.43704e-7	
		10.00000	1.74450e7	5.73232e-7	

Figura 32: Curva de calibración en el HPLC para la determinación de ácido láctico de las muestras F1M1-8, F2M1-7 y F3M2-7

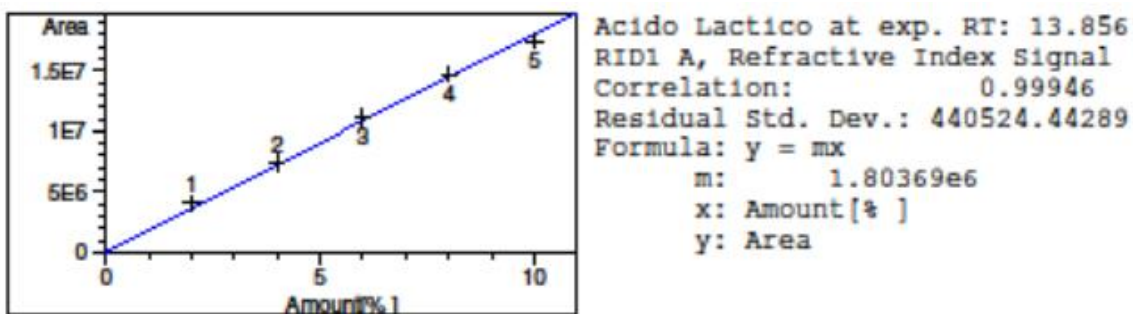


Figura 33: Curva de calibración de pH utilizando una solución de HCl 4M.

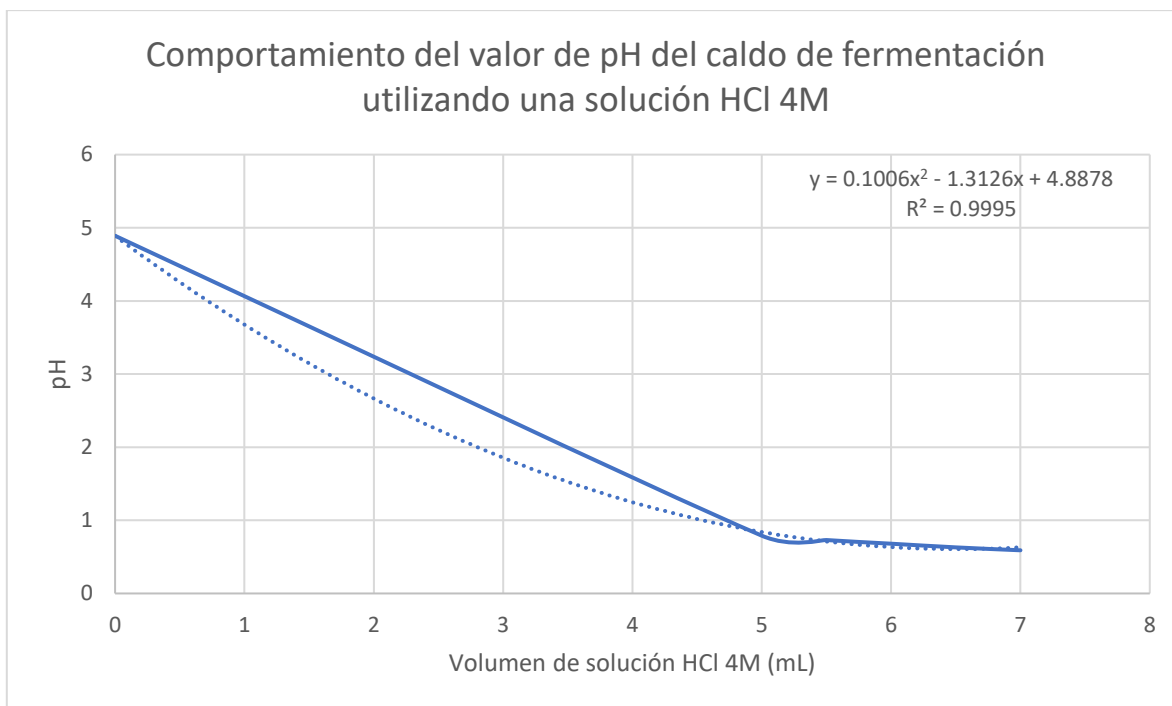
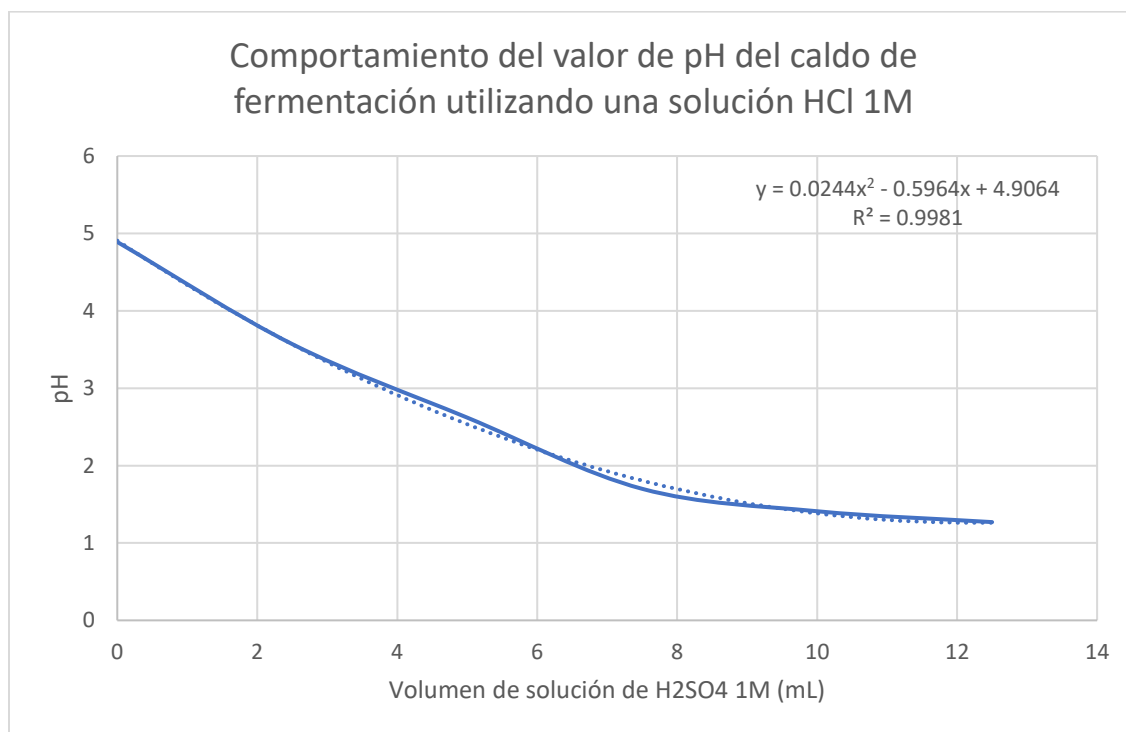


Figura 34: Curva de calibración de pH utilizando una solución de H₂SO₄



H. Ilustraciones

Figura 35: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del primer caldo de fermentación. Solventes de izquierda a derecha: Acetato de etilo, éter isopropílico, alcohol isoamílico, éter dietílico, 1-butanol, alcohol isobutílico, octanol



Figura 36: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando acetato de etilo como solvente.

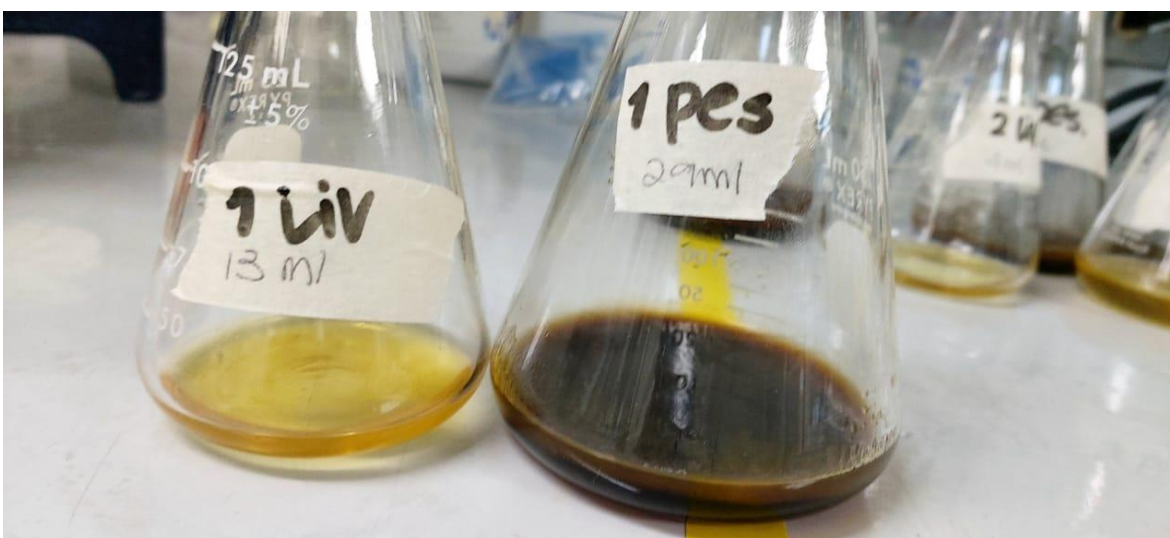


Figura 37: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando alcohol isoamílico como solvente

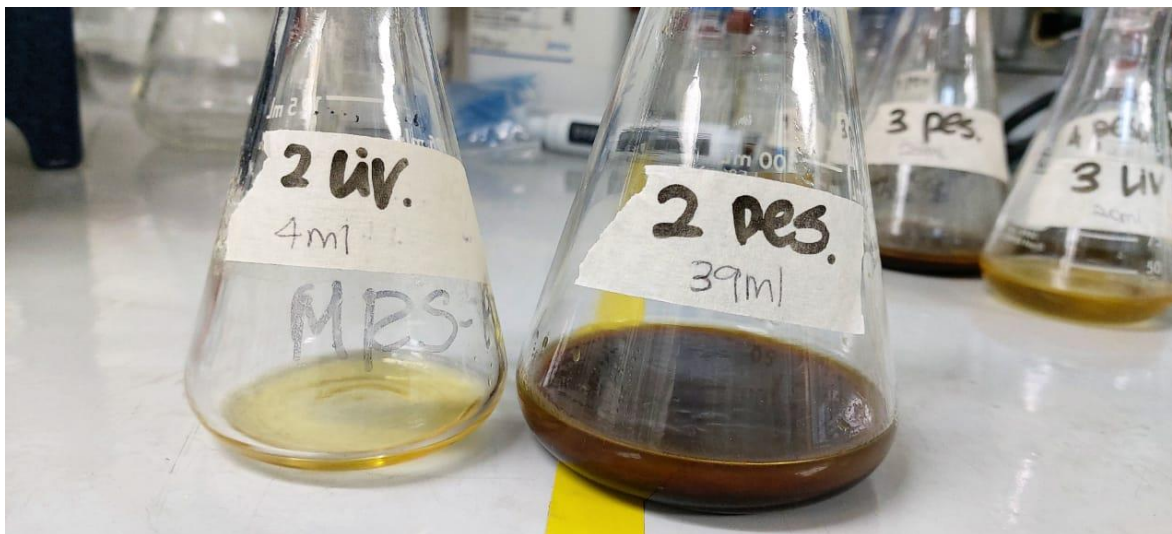


Figura 38: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando octanol como solvente



Figura 39: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando alcohol isobutílico como solvente



Figura 40: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando éter isopropílico como solvente



Figura 41: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando éter dietílico como solvente

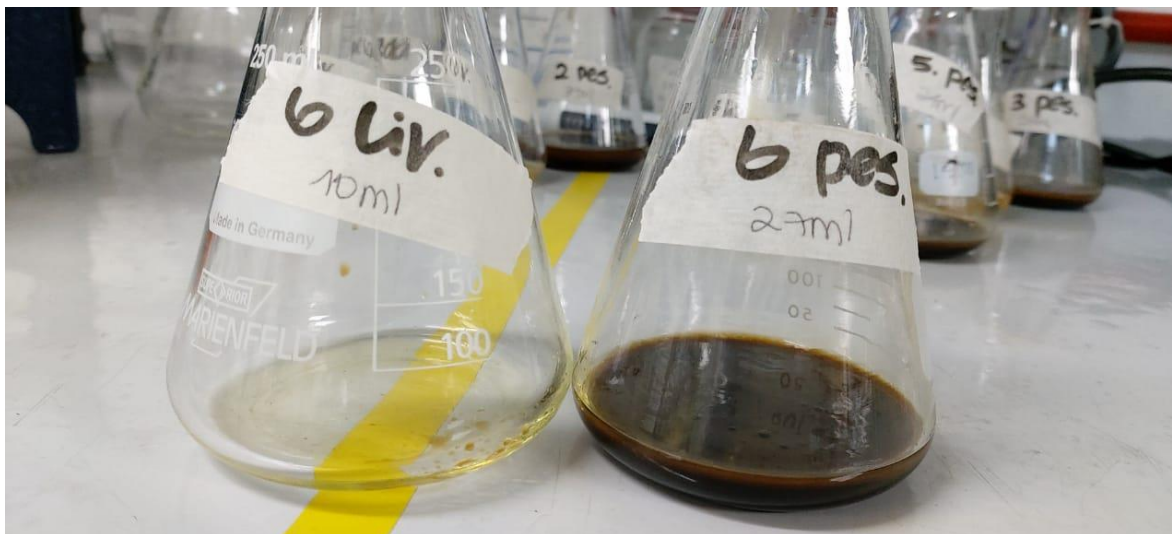


Figura 42: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del segundo caldo de fermentación utilizando 1-Butanol como solvente



Figura 43: Resultado de extracción líquido-líquido de la tercera muestra de fermentación utilizando, de izquierda a derecha, acetato de etilo, alcohol isoamílico, octanol y alcohol isobutílico como solventes. Resultado previo a separar las fases.



Figura 44: Resultado de extracción líquido-líquido de la tercera muestra de fermentación utilizando, de izquierda a derecha, éter isopropílico, éter dietílico y 1-Butanol como solventes. Resultado previo a separar las fases.



Figura 45: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando acetato de etilo como solvente

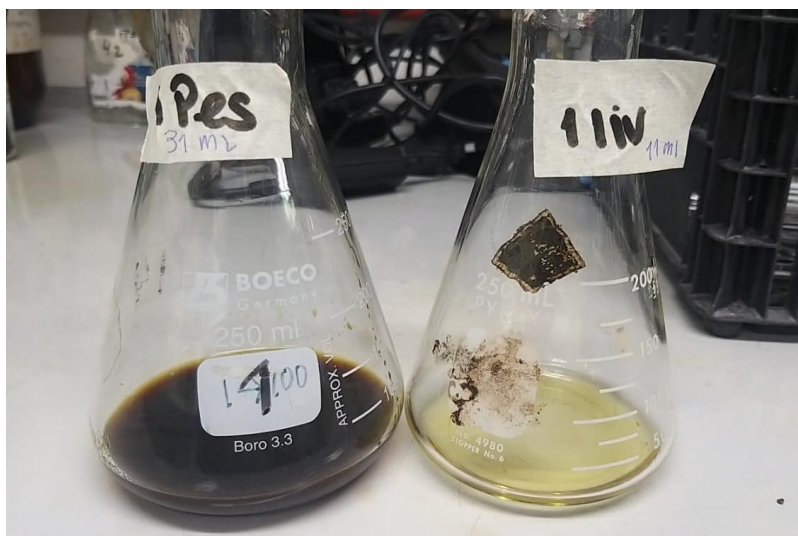


Figura 46: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando alcohol isoamílico como solvente



Figura 47: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando octanol como solvente



Figura 48: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando alcohol isobutílico como solvente

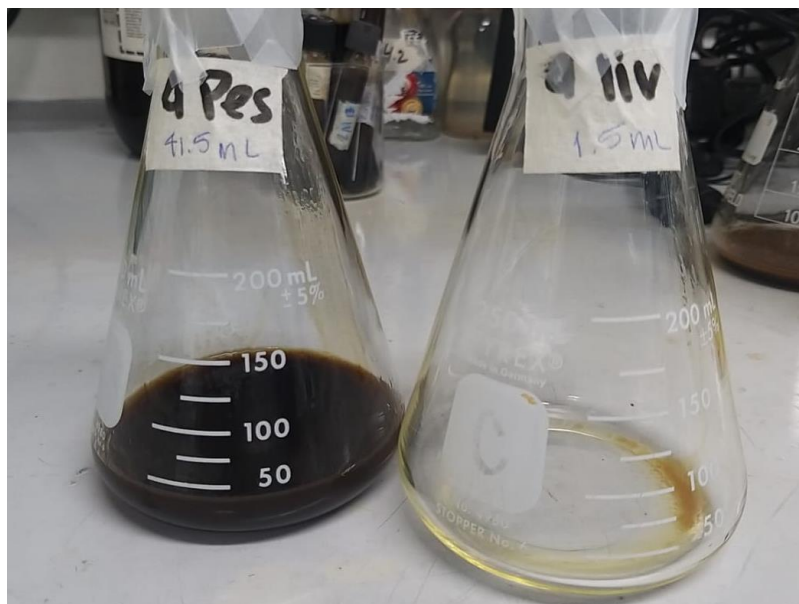


Figura 49: Resultado de extracción líquido-líquido de la tercera muestra de fermentación utilizando alcohol isobutílico como solvente.



Figura 50: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando éter isopropílico como solvente



Figura 51: Resultado de extracción líquido-líquido de la tercera muestra de fermentación utilizando éter isopropílico como solvente.



Figura 52: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando éter dietílico como solvente

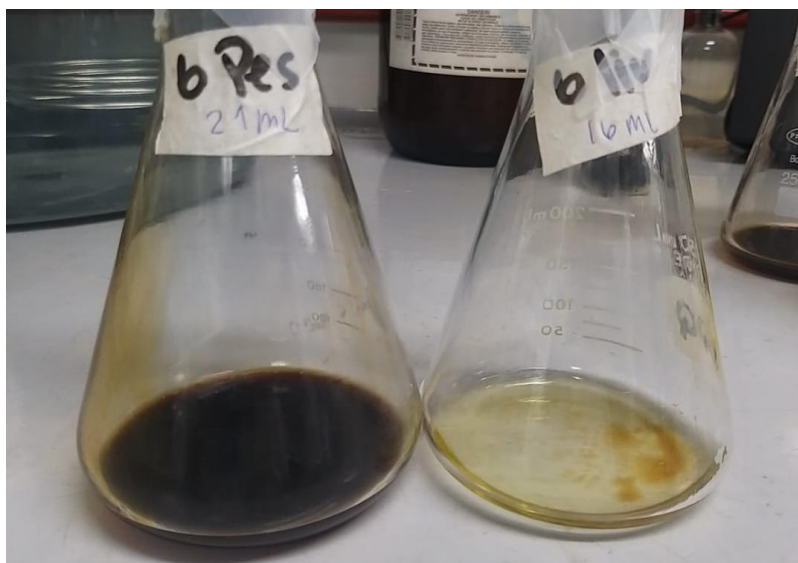


Figura 53: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de la muestra del tercer caldo de fermentación utilizando 1-Butanol como solvente

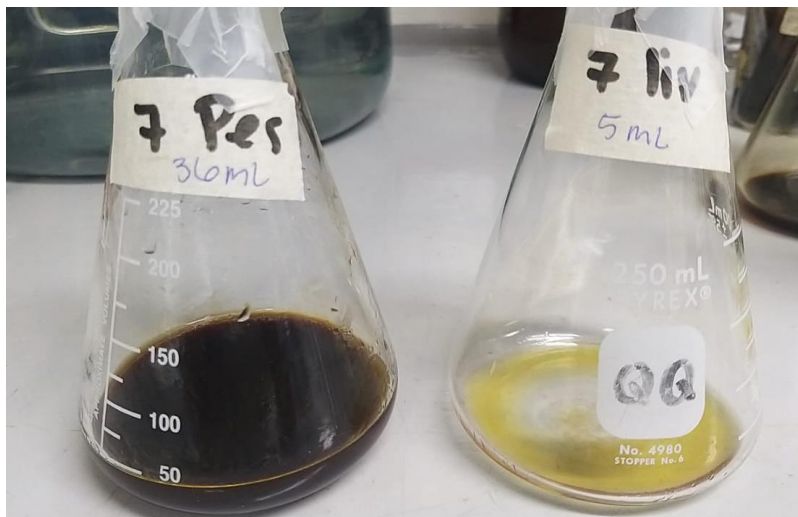


Figura 54: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando acetato de etilo como solvente



Figura 55: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando alcohol isoamílico como solvente

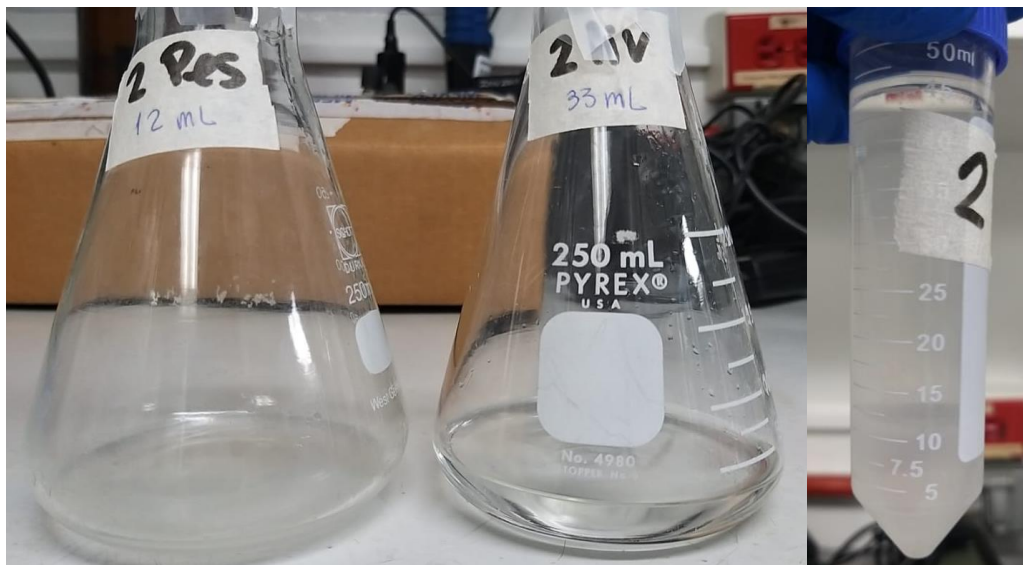


Figura 56: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando octanol como solvente



Figura 57: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando alcohol isobutílico como solvente

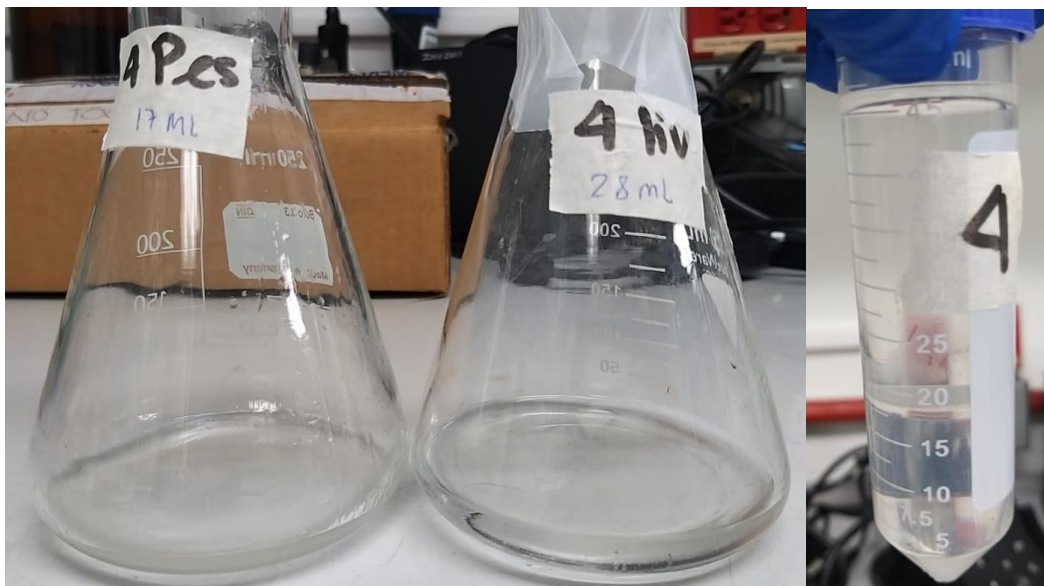


Figura 58: Resultado de extracción líquido-líquido de la solución blanco utilizando alcohol isobutílico como solvente

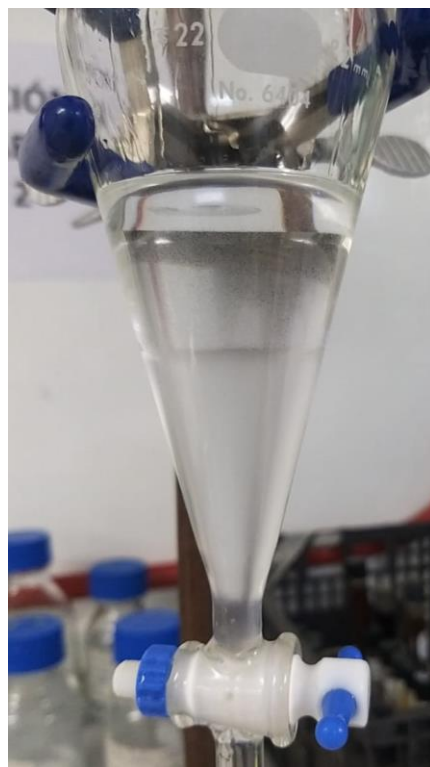


Figura 59: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando éter isopropílico como solvente



Figura 60: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando éter dietílico como solvente



Figura 61: Resultado de extracción líquido-líquido de la solución blanco utilizando éter dietílico como solvente



Figura 62: Fases recuperadas de la extracción líquido-líquido de una solución de ácido láctico al 3% utilizando 1-Butanol como solvente

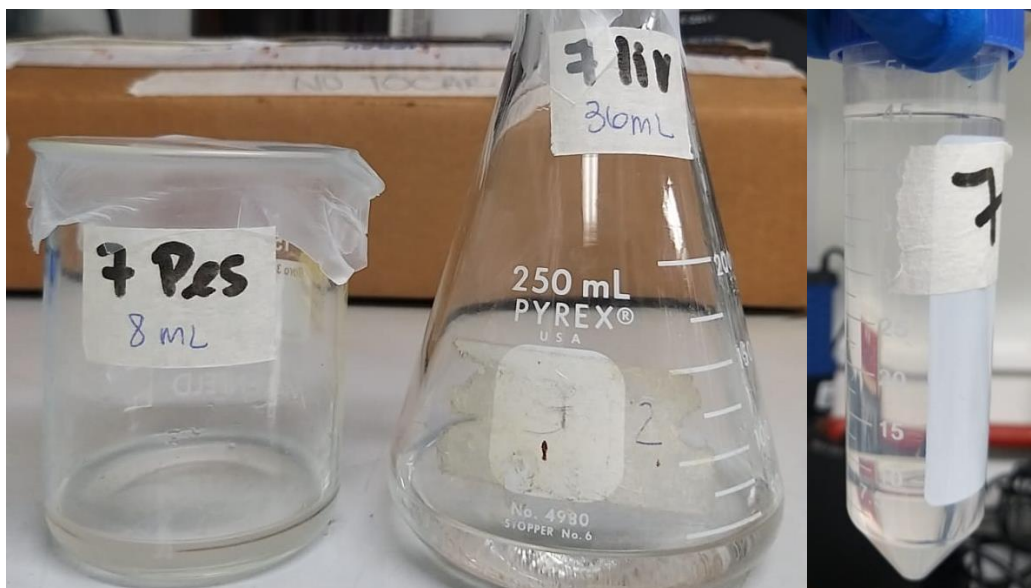


Figura 63: Resultado de extracción líquido-líquido de la solución blanco utilizando 1-Butanol como solvente



Figura 64: Sistema de titulación armado de forma correcta

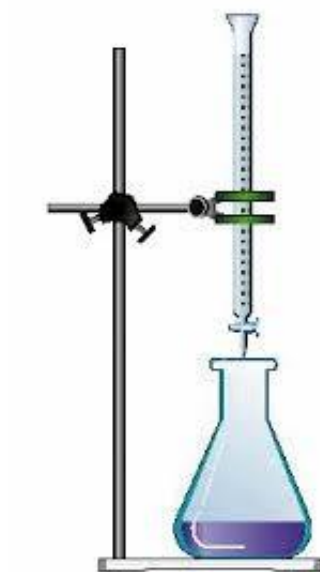


Figura 65: Procedimiento para doblar papel filtro y colocarlo de forma adecuada en embudo

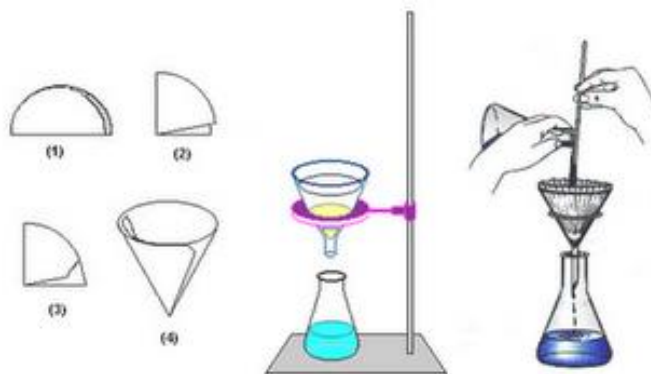
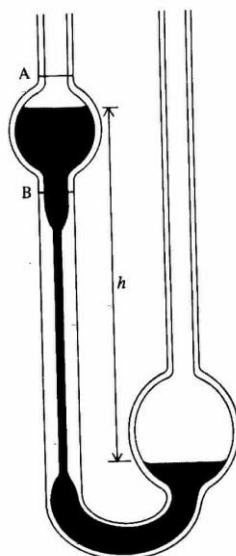


Figura 66: Viscosímetro de Ostwald



XIII. GLOSARIO

Ácido láctico: ácido carboxílico con un grupo hidroxilo en el carbono adyacente a este grupo, de la forma $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$). Es utilizado para la síntesis de PLA.

Ácido poliláctico (PLA): plástico biodegradable que se caracteriza por ser fabricado a partir de ácido láctico proveniente de fermentación de fuentes de azúcar, como los almidones, obtenido de fuentes naturales como papa, trigo o maíz.

Melaza: residuo del proceso de la cristalización del azúcar de caña, de color oscuro, sabor y olor dulce y alta viscosidad.

Lactato de calcio: sal cálcica del ácido láctico utilizado en la industria alimentaria como preservante natural

Solventes orgánicos: solventes compuestos de carbono, hidrógeno y otros elementos que le dan características distintivas. Son ampliamente utilizados, principalmente en proceso de extracción, debido a su alta volatilidad, bajo punto de ebullición, bajo peso molecular y color.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): cromatografía más utilizada y versátil, para separar e identificar compuestos en los siguientes grupos: materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos. Utiliza una fase móvil y una estacionaria para la identificación de componentes.