



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE INGENIERIA
ESCUELA DE INGENIERIA BIOQUIMICA

Proyecto de Título

**EVALUACIÓN TÉCNICO-ECONÓMICA DE UNA PLANTA PRODUCTORA DE ÁCIDO P-CUMÁRICO
POR FERMENTACIÓN**

Integrantes: Paula Araya Ruiz
Matías Fardella Cisternas
Profesor guía: Juan Carlos Gentina M.

Septiembre 2015

RESUMEN

En la siguiente memoria de título se detalla la evaluación técnica y económica de una planta productora de ácido p-cumárico por fermentación.

Se describen las propiedades del ácido p-cumárico; un ácido hidroxicinámico que se encuentra en algunas frutas y vegetales como manzanas y berries, entre otros. Dentro de sus propiedades se destacan las anticancerígenas y propiedades de prevención y tratamiento para enfermedades cardiovasculares, siendo este último el mercado escogido para determinar la capacidad de la planta y realizar la evaluación técnica y económica.

La producción de ácido p-cumárico se realizó mediante una fermentación con cultivo por lote alimentado de una cepa previamente modificada de la bacteria *Pseudomonas putida*, seguido por un proceso de purificación que incluye centrifugación, extracción por surfactante (también conocida como CPE), cromatografía de intercambio iónico, evaporación y secado. La concentración máxima alcanzada en una fermentación fue de 1,67 mg/L, mediante la modalidad de lote alimentado que, en este caso, consiste en detener la alimentación de fenilalanina y reemplazarla por una alimentación de glucosa.

Se optó por instalar la planta en la Región de Valparaíso y producir 1 tonelada de ácido p-cumárico al año, con un aumento gradual de 29 kg por año, para alcanzar al año 10 una producción de 1261 kg de p-cumárico. La evaluación económica de la planta productora indicó un Valor Actual Neto (VAN) de 63.823 [UF] y una Tasa Interna de Retorno (TIR) de un 55%. De esta manera, el proyecto entrega una rentabilidad mayor a la mínima aceptada (15%), pudiendo establecer que con un precio de venta neto de 55 [UF/kg] se obtendría un proyecto rentable. Se realizó una sensibilización a la inversión inicial, el precio de las materias primas y el precio de venta del producto. Al realizar el análisis de sensibilidad económica se determinó que el factor más afecta los indicadores económicos es el precio de venta del producto.

En conclusión, se determina que el proyecto es rentable y capaz de insertarse en una futura demanda y actual competencia de productos análogos. Se recomienda realizar constantes investigaciones acerca de las condiciones de producción, recuperación, purificación y propiedades del producto, con el objetivo de proporcionar alguna innovación que resulte interesante.

AGRADECIMIENTOS

En esta etapa que hoy termina, no queda más que agradecer.

Mis más sinceros agradecimientos a mi padre, incondicional en todo momento.

Gracias a nuestro profesor guía, que siempre nos impulsó a seguir adelante, aun cuando no nosotros no teníamos muy claro el rumbo y teníamos ganas de abandonar el bote. Gracias a su ánimo y su fe en nosotros, no nos perdimos y hoy llegamos a buen puerto.

Gracias a los amigos que de una u otra forma se hicieron parte de este proceso.

Y gracias a Matías, porque este logro es de ambos.

Paula Araya

A mi familia en general y en especial a mi incondicional Mamá

A mis amigos en general, a los más cercanos en especial y a la Flori

A todos los profesores que he tenido en general dentro y fuera de la universidad y a Juan Carlos Gentina en especial por guiarnos sabiamente

A mi compañera de tesis, Paula, sin ti este proyecto habría tenido un camino mucho más tortuoso

A todos ustedes quiero agradecer por todo tipo de apoyo emocional y teórico. Son lo mejor y una gran inspiración para continuar

Matías Fardella.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Aspectos generales	1
1.2 Ácido p-Cumárico.....	1
1.3 Propiedades del ácido p-cumárico.....	2
1.3.1 Efecto antiplaquetario.....	2
1.3.2 Efecto preventivo del infarto al miocardio (IAM).....	3
1.3.3 Efecto preventivo alteraciones metabólicas post IAM	4
1.3.4 Efecto inhibitorio de la angiogénesis	7
1.3.5 Efecto supresor de la inflamación inducida por MSU	8
1.4 Producción actual de ácido p-cumárico	10
1.5 Causas de muerte en Chile.....	12
1.6 Objetivos.....	13
1.6.1 Objetivo general	13
1.6.2 Objetivos específicos.....	13
Referencias capítulo 1.....	14
CAPÍTULO 2.....	16
ESTUDIO DE MERCADO, CAPACIDAD Y UBICACIÓN DE LA PLANTA.....	16
2.1 Introducción	16
2.2 Submercado consumidor.....	17
2.2.1 Enfermedades asociadas al sistema cardíaco	18
2.2.2 Tumores malignos.....	21
2.3 Submercado competidor	23
2.3.1 Tratamiento farmacológico para infarto agudo al miocardio.....	24
2.3.2 Tratamiento a tumores malignos con antiangiogénicos.....	27

2.4 Submercado proveedor	30
2.5 Submercado distribuidor	31
2.6 Estimación de la capacidad de la planta.....	31
2.7 Ubicación de la planta	33
Referencias capítulo 2.....	37
CAPÍTULO 3.....	39
SÍNTESIS Y SELECCIÓN DE PROCESOS.....	39
3.1 Aspectos generales	39
3.2 Etapa previa a la fermentación (upstream)	39
3.2.1 Elección del microorganismo	39
3.2.2 Medio de cultivo.....	42
3.2.3 Preparación del inóculo.....	43
3.3 Fermentación	43
3.3.1 Modalidad de cultivo	44
3.3.2 Condiciones de operación	46
3.3.3 Información obtenida de laboratorio	47
3.3.4 Escalamiento.....	49
3.4 Recuperación (downstream).....	49
3.4.1 Separación de células.....	49
3.4.2 Purificación	54
3.4.3 Concentración/Secado.....	58
3.5 Esterilización.....	60
3.5.1 Esterilización de Bioreactores y medio de cultivo.....	61
3.5.2 Esterilización por filtración.....	61
3.6 Disposición de residuos.....	62
3.7 Diagrama de flujos	62

Referencias Capítulo 3	64
CAPÍTULO 4.....	66
BALANCES DE MASA Y ENERGÍA	66
4.1 Medio de cultivo	66
4.1.1 Composición del medio de cultivo.....	66
4.1.2 Preparación del Medio de Cultivo	68
4.1.4 Fenilalanina.....	71
4.2 Fermentaciones previas (upstream)	73
4.2.1 Fermentación Previa 1	75
4.2.2 Fermentación Previa 2	80
4.2.3 Fermentación Previa 3	93
4.2.4 Fermentación Previa 4	99
4.3 Fermentación final.....	107
4.4 Esterilización de equipos y medio de cultivo	118
4.5 Recuperación (Downstream).....	124
4.5.1 Balance de masa en la centrifugación (C-1).....	124
4.5.2 Balance de Energía en la centrifugación (C-1)	126
4.5.3 Condiciones para la CPE (Cloud-Point Extraction).....	127
4.5.4 Balance de Energía a la CPE	132
4.5.5 Balance de masa a la cromatografía de intercambio aniónico (C-IA).....	133
4.5.6 Determinación de la masa de resina (C-IA)	134
4.5.7 Determinación del flujo de alimentación (C-IA).....	135
4.5.8 Determinación del flujo de eluyente (C-IA)	136
4.4.9 Balance de masa a la Evaporación EV-01.....	138
4.4.10 Balance de energía a la Evaporación EV-01.....	140
4.4.11 Balance de masa al secador	143

4.6.1 Balance de masa del secado	146
Referencias capítulo 4.....	149
CAPÍTULO 5.....	150
DISEÑO Y SELECCIÓN DE EQUIPOS.....	150
5.1 Estanques para Medio de cultivo	150
5.1.1 Estanques de disolución de elementos traza y de L-fenilalanina.....	152
5.1.2 Estanque de disolución de medio de cultivo	155
5.1.3 Estanque de disolución de glucosa.....	156
5.2 Bioreactores	158
5.2.1 Bioreactor para FP1	160
5.2.2 Bioreactores para FP2, FP3, FP4 y FF	160
5.2.3 Diseño de serpentines.....	163
5.3 esterilización de equipos	164
5.3.1 Autoclave	164
5.3.4 Caldera.....	165
5.4 Centrifugación	165
5.5 CPE (Cloud Point Extraction)	168
5.5.1 Diseño del estanque E-5.....	168
5.5.2 Diseño de la centrífuga.....	168
5.5.3 Diseño del estanque E-6.....	169
5.5.4 Diseño del serpentín del estanque E-6	169
5.6 Diseño de la cromatografía intercambio aniónico (C-IA)	170
5.6.1 Área y diámetro por de la columna de Intercambio aniónico	171
5.6.2 Altura de la columna de intercambio aniónico.....	172
5.7 Evaporación.....	173
5.8 Diseño estanque E-7.....	174

5.9 Secado	175
5.10 Equipos auxiliares.....	176
5.10.1 Bombas	176
5.10.2 Soplador.....	177
Referencias Capítulo 5	178
CAPÍTULO 6.....	179
ADMINISTRACIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LA PLANTA	179
6.1 Organización Administrativa	180
6.1.1 Secciones de trabajo	180
6.2 Organización de Personas.....	183
6.2.1 Requerimientos de Personal.....	183
6.2.3 Jornadas de Trabajo.....	186
6.3 Organización de las tareas de Producción.....	186
6.3.1 Plan de Producción	186
6.3.2 Carta Gantt.....	187
6.4 Lay-out de la planta.....	189
Referencias Capítulo 6	190
CAPÍTULO 7.....	191
EVALUACIÓN ECONÓMICA.....	191
7.1 Capital de Inversión o Costos de Capital	191
7.1.1 Costo del Terreno	192
7.1.2 Capital Fijo Directo.....	193
7.1.3 Capital Fijo Indirecto	197
7.1.4 Capital de Trabajo.....	198
7.1.5 Capital de Inversión Total	198
7.2 Costo total de Producción (CP).....	199

7.2.1 Costos de Manufactura	199
7.2.2 Costos Generales de Producción.....	206
7.2.3 Costos de Producción.....	207
7.3 Ingresos.....	208
7.4 Flujo de Caja	208
7.5 Rentabilidad Económica	212
7.6 Análisis de Sensibilidad Económica.....	213
7.6.1 Variación en la materia prima.....	213
7.6.2 Variación en la inversión inicial.....	213
7.6.3 Variación en el precio de venta del ácido <i>p</i> -cumárico.....	213
REFERENCIASCAPÍTULO 7.....	215
CAPÍTULO 8.....	216
DISCUSIÓN, CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	216
APÉNDICE	218
Anexo A	218
Estimación de la capacidad de la planta	218
Anexo B	220
Materias primas	220
Anexo C	231
Suministros básicos	231

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Niveles de colesterol total, triglicéridos y ácidos grasos libres en el suero.....	6
Tabla 1.2 Concentraciones de colesterol total, triglicéridos y ácidos grasos libres en el corazón.....	6
Tabla 1.3 Niveles de colesterol LDL, colesterol VLDL y colesterol HDL en el suero.....	6
Tabla 1.4: Productores de ácido p-cumárico y su precio de venta.....	11
Tabla 2.1: Defunciones según causa de muerte en Chile, 2007-2011.....	19
Tabla 2.2: Incidencia estimada de cáncer según localizaciones en Hombres y Mujeres. Chile 2003-2007.....	22
Tabla 2.3: Mortalidad estimada de cáncer según localizaciones en Hombres y Mujeres. Chile 2003-2007.....	23
Tabla 2.4: Fármacos Anticoagulantes.....	25
Tabla 2.5 Determinación de ubicación de la planta.....	36
Tabla 3.1 Crecimiento de cepas de <i>P. putida</i> en presencia de pHCA.....	40
Tabla 3.2 Efecto de pHCA en crecimiento y fermentación de <i>E. coli</i>	41
Tabla 3.3 Composición medio de cultivo.....	42
Tabla 3.4: Composición de la solución de trazas.....	42
Tabla 3.5 Información obtenida de figura 3.2.....	48
Tabla 3.6 Centrífugas de discos según forma de descarga.....	53
Tabla 3.7 Separación de ácido p-cumárico de una fase acuosa en un sistema modelo (volumen inicial $V_0=10,5$ mL; concentración inicial pCA $C^{pCA}_0=0,2$ g/L; concentración del surfactante=5% v/v).....	56
Tabla 4.1 Cantidad de nutrientes del medio de cultivo por etapa de fermentación en [g].....	67
Tabla 4.2 Cantidad en [g] de nutrientes en solución traza por etapa de fermentación.....	67
Tabla 4.3 Propiedades de nutrientes traza y volúmenes requeridos.....	68
Tabla 4.4 Propiedades de nutrientes del medio de cultivo y volúmenes requeridos.....	70
Tabla 4.5 Masa de L-fenilalanina y Δ biomasa para cada etapa de fermentación en [g].....	71

Tabla 4.6 Volúmenes a extraer del estanque de L-fenilalanina para cada etapa.....	73
Tabla 4.7 Volumen ocupado por la masa de L-fenilalanina (V_p) en cada etapa.....	73
Tabla 4.8 Resultados de volúmenes de caldo para fermentaciones previas	75
Tabla 4.9 Biomasa esperada por etapa cada etapa de fermentación [g]	75
Tabla 4.10 Resultados de densidad de mezcla de nutrientes en [Kg/L].....	77
Tabla 4.11 Volúmenes FP1 en [L].....	78
Tabla 4.12 Resultado balance de masa FP1	79
Tabla 4.13 Parámetros de FP2.....	82
Tabla 4.14 Volúmenes de la FP2 en [L].....	84
Tabla 4.15 Resultado balance de masa FP2	85
Tabla 4.16 Solubilidad de O_2 a 1 atm en agua a varias temperaturas, (Bailey & Ollis, 1986)	89
Tabla 4.17 Demanda y transferencia de oxígeno para FP2.....	90
Tabla 4.18 Valores a utilizar en el balance de energía de la FP2	91
Tabla 4.19 Resumen de resultados del B.E.	93
Tabla 4.20 Parámetros de FP3.....	94
Tabla 4.21 Volúmenes de la FP3 en [L].....	95
Tabla 4.22 Resultado balance de masa FP3	96
Tabla 4.23 Demanda y transferencia de oxígeno para FP3.....	97
Tabla 4.24 Valores a utilizar en el balance de energía de la FP3	98
Tabla 4.25 Resumen de resultados del B.E. de FP3.....	99
Tabla 4.26 Parámetros de FP4.....	100
Tabla 4.27 Volúmenes de la FP4 en [L].....	103
Tabla 4.28 Resultado balance de masa FP4	104
Tabla 4.29 Demanda y transferencia de oxígeno para FP4.....	105
Tabla 4.30 Valores a utilizar en el balance de energía de la FP4 para un fermentador.....	106
Tabla 4.31 Resumen de resultados del B.E. de FP4.....	107

Tabla 4.32 Parámetros de FF.....	109
Tabla 4.33 Volúmenes de la FF en [L].....	113
Tabla 4.34 Resultado balance de masa FF.....	114
Tabla 4.35 Demanda y transferencia de oxígeno para FF.....	116
Tabla 4.36 Valores a utilizar en el balance de energía de la FF para un fermentador.....	117
Tabla 4.37 Resumen de resultados del B.E. de FP4.....	118
Tabla 4.38 Tiempos de esterilización de cada fermentador.....	119
Tabla 4.39 Resumen resultados de vapor para esterilización fermentadores F3, F4 Y F5.....	121
Tabla 4.40 Vapor para mantenimiento de temperatura de pared.....	122
Tabla 4.41 Características de medio de cultivo en zona de calentamiento.....	123
Tabla 4.42 Cantidades requeridas de vapor para esterilización.....	124
Tabla 4.43 Condiciones iniciales y finales de la biomasa en la centrifugación 1.....	126
Tabla 4.44 Parámetros de extracción de ácido p-cumárico utilizando Pluronic L92 al 5% v/v.....	129
Tabla 4.45 Condiciones de entrada y salida de los flujos por cada CPE.....	130
Tabla 4.46 Masa de producto por cada CPE.....	130
Tabla 4.47 Flujos máxicos de un ciclo de CPE.....	131
Tabla 4.48 Condiciones iniciales y finales de C-IA.....	138
Tabla 4.49 Condiciones iniciales de la solución a evaporar.....	138
Tabla 4.50 Condiciones finales de las corrientes del evaporador EV-01.....	140
Tabla 4.51 Calores de vaporización.....	141
Tabla 4.52 Balance de masa al secador S-1.....	144
Tabla 4.53 Resultados de balance de masa secado de residuos.....	148
Tabla 5.1 Razones geométricas recomendadas para el diseño de mezclador.....	151
Tabla 5.2 Valores de parámetros para mezclador disolución elementos traza y L-fenilalanina.....	153
Tabla 5.3 Resultados agitación estanque disolución traza y L-fenilalanina.....	154
Tabla 5.4 Valores de parámetros para mezclador disolución medio de cultivo.....	155

Tabla 5.5 Resultados agitación estanque disolución medio de cultivo.....	156
Tabla 5.6 Valores de parámetros para mezclador disolución de glucosa.....	157
Tabla 5.7 Resultados agitación estanque disolución de glucosa	157
Tabla 5.8 Resultados agitación estanque disolución de L-fenilalanina.....	158
Tabla 5.9 Razones geométricas recomendadas para el diseño de fermentador	160
Tabla 5.10 Resultados de dimensiones de fermentadores.....	161
Tabla 5.11 Resultados de aireación de fermentadores.....	162
Tabla 5.12 Resultados del diseño de serpentines.....	164
Tabla 5.13 Características del autoclave seleccionado.....	165
Tabla 5.14 Características de la caldera seleccionada.....	165
Tabla 5.15 Especificaciones técnicas de la Centrífuga CLARA 20	166
Tabla 5.16 Dimensiones estanque E-5.....	168
Tabla 5.17 Características del Estanque de recepción E-6.....	169
Tabla 5.18 Características del Estanque de recepción E-6.....	169
Tabla 5.19 Características de la Resina 201*7(717)	171
Tabla 5.20 Rangos de operación recomendados para la Resina 201*7(717)	171
Tabla 5.21 Especificaciones técnicas del evaporador rotatorio GRFE 100 J	174
Tabla 5.22 Características del Estanque de recepción E-7.....	175
Tabla 5.23 Características del Secador spray seleccionado	175
Tabla 5.24 Bombas necesarias según flujos de líneas de operación.....	176
Tabla 5.25 Características de los sopladores seleccionados	177
Tabla 6.1 Cargos de trabajo por sección.....	182
Tabla 6.2 Etapas de producción.....	184
Tabla 6.3 Trabajadores del Departamento de Producción	185
Tabla 6.4 Personal Auxiliar necesario en la organización de la planta.....	186
Tabla 6.5 Estimación del número de lotes a producir de acuerdo a la demanda proyectada.....	187

Tabla 7.1 Indicadores económicos utilizados.....	191
Tabla 7.2 Referencias de cotizaciones de terrenos de internet (Locanto, 2014)	192
Tabla 7.3 Referencias de cotizaciones de terrenos de Sub-gerente de Kaufen Propiedades.....	193
Tabla 7.4 Costos de equipos del proceso productivo.....	195
Tabla 7.5 Porcentaje de costos asociados al Capital Fijo Directo	196
Tabla 7.6 Capital Fijo Directo.....	196
Tabla 7.7 Capital Fijo Indirecto	197
Tabla 7.8 Capital total de Inversión.....	198
Tabla 7.10 Costo año 1 de Reactivos Downstream.....	200
Tabla 7.9: Costo Materias Primas Fermentación año 1.....	201
Tabla 7.11 Costos anual de Suministros Básicos.....	202
Tabla 7.12 Costo en Mano de Obra.....	203
Tabla 7.13 Costos de Manufactura	206
Tabla 7.14 Costos Totales de Producción	207
Tabla 7.15 Ingresos anuales por venta de ácido p-cumárico.....	209
Tabla 7.16: Costos Variables.....	209
Tabla 7.17 Flujo de caja del proyecto.....	211
Tabla 7.18 Resultados de sensibilización	214
Tabla B1: Costo anual de materias primas año 1.....	221
Tabla B2: Costo anual de materias primas año 2.....	222
Tabla B3: Costo anual de materias primas año 3.....	223
Tabla B4: Costo anual de materias primas año 4.....	224
Tabla B5: Costo anual de materias primas año 5.....	225
Tabla B6: Costo anual de materias primas año 6.....	226
Tabla B7: Costo anual de materias primas año 7.....	227
Tabla B8: Costo anual de materias primas año 8.....	228

Tabla B9: Costo anual de materias primas año 9.....	229
Tabla B10: Costo anual de materias primas año 10	230
Tabla C1: Consumo de Agua por Lote de Fermentación	231
Tabla C2: Consumo de Electricidad por Lote de Fermentación.....	232
Tabla C3: Consumo Anual de agua y energía	233

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Estructura del ácido p-cumárico.....	2
Figura 1.2: Inhibición de la agregación plaquetaria en muestras de sangre de conejos alimentados con una dieta estándar enriquecida con 5 mg/kg de ácido p-cumárico	3
Figura 1.3: Cortes de corazón de rata con tinción de 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio. Fig. 1.3 A es un corte de corazón de rata normal mostrando tejido completamente viable. Fig. 1.3 B es un corte de corazón de rata tratada con ác. p-cumárico (8 mg/kg) mostrando tejido completamente viable. Fig. 1.3 C es un corte de corazón de rata que sufrió un infarto al miocardio inducido por isoproterenol (100 mg/kg), mostrando las regiones afectadas por el infarto. Fig. 1.3 D es un corte de corazón de rata pretratada con ác. p-cumárico (8 mg/kg) que sufrió un infarto al miocardio inducido por isoproterenol (100mg/kg) mostrando un tamaño de infarto mucho más reducido en comparación a la Fig. 1.3 C.....	4
Figura 1.4 Actividad de la HMG-CoA reductasa en el hígado.....	5
Figura 1.5 Porcentaje de reducción de peso y volumen de tumor tratado con ác. p-cumárico.....	8
Figura 1.6 Efecto del p-CA en la actividad de enzimas lisosomales en el hígado	9
Figura 1.7 Efecto del p-CA en la actividad de enzimas lisosomales en el bazo	9
Figura 1.8 Efecto del p-CA en la actividad de enzimas lisosomales en el suero.....	10
Figura 1.9: Porcentaje de defunciones según causa de muerte en Chile, 2005-2011	12
Figura 2.1: Enfermedad que causa más muertes en cada país del mundo. Fuente: Global Post.....	17
Figura 2.2: Tasas de incidencia de infarto agudo del miocardio según grupo de edad en Chile, 2001-2007	20
Figura 3.1: Diagrama básico de bloques	39
Figura 3.2: Producción de p-cumarato (cuadrados), cinamato (rombos) y biomasa (triángulos) en cultivo lote alimentado con limitación de L-fenilalanina por <i>P.putida</i> S12 C3.....	48
Figura 3.3 Centrífuga tubular.....	52
Figura 3.4 Centrífuga de discos de tazón abierto	53
Figura 3.5 Representación esquemática del método de extracción por surfactante.....	55
Figura 3.6: Secador en spray	60

Figura 3.7 Diagrama de flujos del proceso.....	63
Figura 4.1 Diagrama de bloques de la preparación del medio de cultivo	70
Figura 4.2 Diagrama de bloques de FP1	76
Figura 4.3 Diagrama de bloque FP2	81
Figura 4.4 Diagrama de bloques de FP3	94
Figura 4.5 Diagrama de bloques de FP4	100
Figura 4.6 Diagrama de bloque de FF.....	108
Figura 4.7 Esquema para C-1.....	125
Figura 4.8 Diagrama de bloque de la CPE	127
Figura 4.9 Representación gráfica de un ciclo de CPE con 4 extracciones	131
Figura 4.10 Esquema para C-IA.....	134
Figura 4.11 Curva de elución de ácido p-cumárico en la resina aniónica 717	137
Figura 4.12 Esquema de evaporador EV-01.....	139
Figura 4.13 Diagrama de bloques del secador	143
Figura 4.14 Diagrama de bloques secado en bandejas	146
Figura 5.1: Nomenclatura normalizada para estanques de agitación.....	150
Figura 5.2 Nomenclatura normalizada para estanques (González & Salinas, 2011)	159
Figura 6.1 Organigrama de la empresa.....	180
Figura 6.2 Carta Gantt.....	188
Figura 6.3 Lay-out de la Planta	189
Figura 7.1 Representación gráfica de VAN y TIR del proyecto	212

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 ASPECTOS GENERALES

La necesidad de buscar nuevas alternativas tanto de tratamiento como de prevención de enfermedades es una realidad tanto a nivel nacional como global. Dentro de ella, se destaca la investigación para descubrir aplicaciones de diversas moléculas que actúen de manera específica para combatir dichas enfermedades. Estudios epidemiológicos han sugerido una asociación entre el consumo de ácidos fenólicos en comidas y bebidas y la prevención de diversas enfermedades (Morton, 2000).

Los ácidos hidroxicinámicos y fenólicos son un grupo de compuestos presentes en la pared celular vegetal, conocidos por su capacidad antioxidante, cuyas propiedades y aplicaciones aún se están investigando. Estudios recientes han confirmado que el ácido p-cumárico (uno de los ácidos hidroxicinámicos más abundante en la naturaleza) tiene efectos preventivos para enfermedades del sistema circulatorio (Mainzen Prince P. S., 2013), además de un efecto que favorecería al tratamiento de ciertos tipos de cáncer (Luceri, 2007).

1.2 ÁCIDO P-CUMÁRICO

El ácido p-cumárico (ácido 3-(4 hidroxifenil)-2-propenoico) es un ácido hidroxicinámico, un compuesto orgánico derivado del ácido cinámico. Existen 3 isómeros; o-cumárico, m-cumárico y p-cumárico, siendo éste último el más abundante en la naturaleza. Es un sólido cristalino poco soluble en agua, pero muy soluble en etanol y dietil éter. En la Figura 1.1 es posible apreciar la estructura molecular del ácido.

Se puede encontrar en algunas frutas, vegetales, cereales, té y vino, mayormente como conjugado con otros ácidos cinámicos. Se presenta como ácido libre (cerca de 22 mg/l) y como ácido p-cumaroil tartárico (cerca de 139 mg/l) en el vino tinto (Ghiselli, Luceri, & Giovanelli, 2003). Otras

abundantes fuentes de ácido p-cumárico son las manzanas y los berries (69-1700 mg/kg) y el salvado de maíz (2,9 g/kg) (Stich, 1991; Zhao, et al., 2005).

Son diversos los estudios que revelan que el ácido p-cumárico presenta propiedades antioxidantes (Castelluccio & Paganga, 1995, Zang & al, 2000, Clifford, 2000).

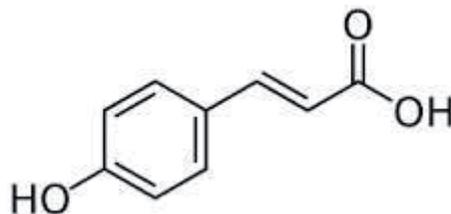


Figura 1.1: Estructura del ácido p-cumárico

1.3 PROPIEDADES DEL ÁCIDO P-CUMÁRICO

Para todas las propiedades presentadas a continuación, los estudios son muy recientes (desde el año 2005 hasta 2013). Esto se debe a que actualmente el ácido p-cumárico se utiliza sólo para investigación, para poder descubrir sus propiedades y luego poder ubicarlas en algún mercado. No todos los estudios se han hecho en humanos, por lo que se carece de información acerca de efectos secundarios y no se tiene certeza sobre la posología adecuada en todos los casos.

1.3.1 Efecto antiplaquetario

La agregación plaquetaria juega un rol crítico en la patología de los desórdenes vasculares y existe evidencia de que la terapia antiplaquetaria reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Youssef & al, 2005), previniendo la trombosis. Uno de los mecanismos propuestos como aparente beneficio de algunos polifenoles es su efecto favorable en la agregación plaquetaria (Cordova, 2005).

Administrando ácido p-cumárico *in vivo*, éste fue capaz de reducir significativamente la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico y adenosin difosfato (AA y ADP, respectivamente) luego de dos semanas de tratamiento, ver Figura 1.2. La ruta oxidativa del AA obtiene como

productos principales prostaglandinas y tromboxanos que, junto con el ADP, estimulan a la agregación plaquetaria.

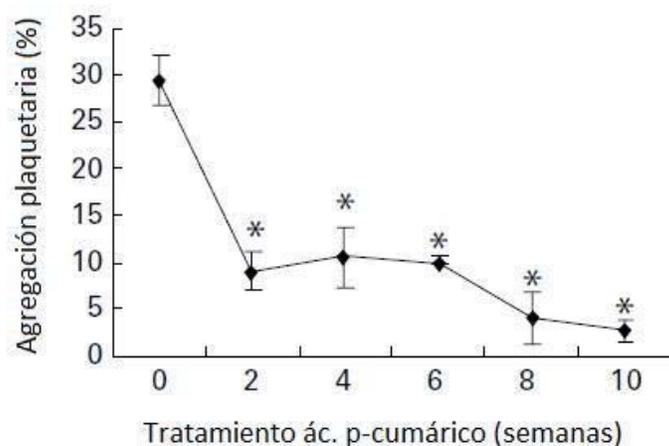


Figura 1.2: Inhibición de la agregación plaquetaria en muestras de sangre de conejos alimentados con una dieta estándar enriquecida con 5 mg/kg de ácido p-cumárico

In vitro, el ácido p-cumárico fue capaz de inhibir la agregación plaquetaria sin efectos en pruebas de laboratorio que evalúan extrínsecamente la coagulación sanguínea, como lo son el tiempo de protrombina y el tiempo de tromboplastina activada (Luceri, 2007). En síntesis, el ácido p-cumárico demuestra claras propiedades anti-agregantes sin alterar la coagulación sanguínea a concentraciones que podrían ser obtenidas al mantener una dieta saludable que incluya consumo de bastantes frutas y vegetales y un moderado consumo de vino. Se ha estimado que el consumo diario de ácidos hidroxibenzoicos y sus derivados debería ser de 1 g/d, correspondiente a 15 mg/kg de peso corporal diario para un adulto (Tomàs-Barberan & Clifford, 2000).

1.3.2 Efecto preventivo del infarto al miocardio (IAM)

Estudios recientes *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el ácido p-cumárico es capaz de preservar la integridad de la membrana lisosomal al mantener la actividad de las enzimas lisosomales y los niveles de peroxidación lisosomal en ratas a las que les indujo un infarto al miocardio mediante isoproterenol (100 mg/kg). Esto puede deberse a su efecto de eliminación de los radicales libres y su efecto de estabilización de la membrana. Además, el ácido p-cumárico logró reducir el tamaño

o grado del infarto al corazón hasta en un 50% en comparación a un control que también fue inducido, pero no se le administró ácido p-cumárico, ver Figura 1.3. De acuerdo a una cuantificación por planimetría acumulativa, las ratas que fueron pretratadas con ácido p-cumárico y sufrieron IAM inducido por isoproterenol mostraron una reducción en el porcentaje de la región infartada (18,4%) en comparación a una rata sin pretratamiento (41,2%) (Mainzen Prince P. S., 2013). Debido a estas características o propiedades, las posibilidades de un segundo infarto disminuyen considerablemente, por lo que se puede concluir que el ácido p-cumárico posee un efecto preventivo al IAM.

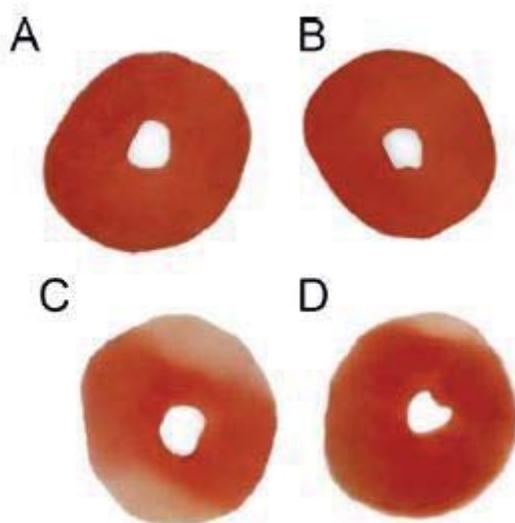


Figura 1.3: Cortes de corazón de rata con tinción de 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio. Fig. 1.3 A es un corte de corazón de rata normal mostrando tejido completamente viable. Fig. 1.3 B es un corte de corazón de rata tratada con ác. p-cumárico (8 mg/kg) mostrando tejido completamente viable. Fig. 1.3 C es un corte de corazón de rata que sufrió un infarto al miocardio inducido por isoproterenol (100 mg/kg), mostrando las regiones afectadas por el infarto. Fig. 1.3 D es un corte de corazón de rata pretratada con ác. p-cumárico (8 mg/kg) que sufrió un infarto al miocardio inducido por isoproterenol (100 mg/kg) mostrando un tamaño de infarto mucho más reducido en comparación a la Fig. 1.3 C.

1.3.3 Efecto preventivo alteraciones metabólicas post IAM

Haciendo una continuación en lo que respecta a los efectos del ácido p-cumárico relacionados con el infarto al miocardio, se realizaron estudios en ratas para evaluar su efecto en la hipertrofia cardíaca, las alteraciones en el electrocardiograma, y los niveles de lípidos y de lipoproteínas luego de inducir al infarto mediante isoproterenol (ISO). Al administrar ácido p-cumárico se logró un

efecto preventivo de la alteración en los niveles de lípidos y lipoproteínas al inhibir la actividad de la HMG-CoA reductasa en el hígado (Mainzen Prince P. S., 2013). Las Tablas 1.1, 1.2 y 1.3 presentan los niveles de lípidos y lipoproteínas en el suero y en el corazón, mientras que la Figura 1.4 muestra la actividad de la HMG-CoA reductasa en el hígado. A mayor razón HMG-CoA/mevalonato, menor es la actividad de la enzima.

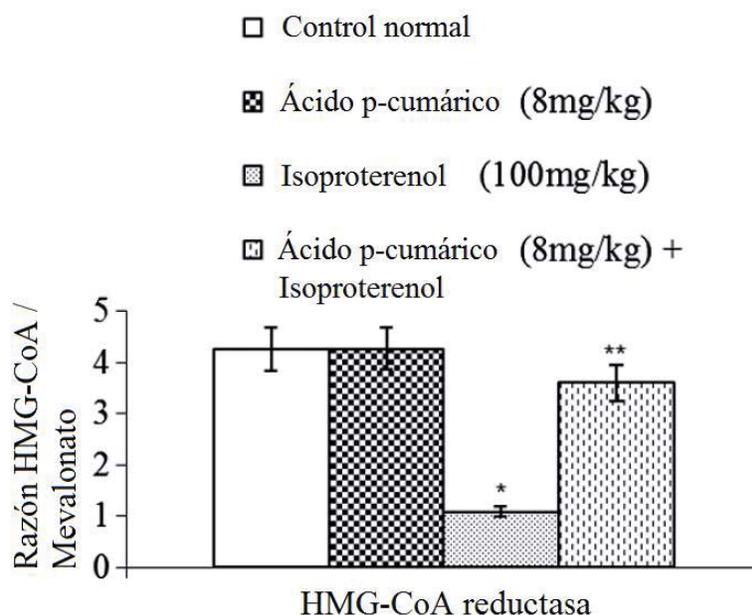


Figura 1.4 Actividad de la HMG-CoA reductasa en el hígado.

Analizando los datos de las tres tablas, es posible observar que los niveles de lípidos y lipoproteínas aumentan considerablemente después del infarto, llegando en la mayoría de los casos al doble de su valor inicial. Comparando las 2 últimas columnas de la tabla se puede observar el efecto preventivo del ácido p-cumárico. Administrado previo al infarto, el ácido p-cumárico logró disminuir los niveles de lípidos y lipoproteínas entre un 70 y un 85%, acercándose bastante a los valores iniciales.

Tabla 1.1 Niveles de colesterol total, triglicéridos y ácidos grasos libres en el suero

Mg/dL de suero	Normal pretratado Infarto inducido Infarto inducido por ISO			
	Normal	con p-cumárico	por ISO	pretratado con p-cumárico
Colesterol	70	70	110	78
Triglicéridos	40	40	74	44
Ácidos grasos libres	38	38	68	42

Tabla 1.2 Concentraciones de colesterol total, triglicéridos y ácidos grasos libres en el corazón

Mg/g tejido húmedo	Normal pretratado Infarto inducido Infarto inducido por ISO			
	Normal	con p-cumárico	por ISO	pretratado con p-cumárico
Colesterol	7,8	7,8	14,3	9
Triglicéridos	3,5	3,5	8	4,8
Ácidos grasos libres	0,24	0,24	0,78	0,32

Tabla 1.3 Niveles de colesterol LDL, colesterol VLDL y colesterol HDL en el suero

Mg/dL de suero	Normal pretratado Infarto inducido Infarto inducido por ISO			
	Normal	con p-cumárico	por ISO	pretratado con p-cumárico
Colesterol LDL	34	34	81	43
Colesterol VLDL	7	7	14	8
Colesterol HDL	29	29	12	25

Además de afectar positivamente a las alteraciones en los niveles de los lípidos, el ácido p-cumárico previene la hipertrofia cardíaca y logra casi normalizar el electrocardiograma. El peso promedio del corazón de los ratones estudiados era de unos 540 mg., mientras que el corazón de los ratones que sufrieron un infarto inducido aumentó a los 800 mg. El peso promedio del corazón de los ratones que sufrieron un infarto, pero que fueron pretratados con ácido p-cumárico (8 mg/kg), fue de 600 mg. Por lo tanto, al igual que en el caso de los niveles de lípidos, el ácido p-

cumárico logró atenuar la hipertrofia cardiaca, llegando a valores del peso de miocardio muy cercanos a los iniciales.

Los posibles mecanismos para los efectos preventivos del p-cumárico se deben a sus propiedades antilipídica, antihipertrófica y a su capacidad de eliminación de los radicales libres (Mainzen Prince P. S., 2013).

1.3.4 Efecto inhibitorio de la angiogénesis

Angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos nuevos. Este proceso consiste en la migración, crecimiento y diferenciación de células endoteliales, las cuales recubren las paredes internas de los vasos sanguíneos. Es crítico para muchos procesos fisiológicos y patológicos incluyendo embriogénesis, cicatrización de heridas, enfermedades cardiovasculares, crecimiento tumoral y metástasis (Lamy & al, 2010). La angiogénesis requiere que se unan moléculas de señalización, tal como el factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endotelial growth factor, VEGF). Cuando el (VEGF) y otros factores de crecimiento endotelial se unen a sus receptores en las células endoteliales, se inician señales dentro de estas células que promueven el crecimiento y la supervivencia de vasos sanguíneos nuevos (Markowska, 2010).

La inhibición de la angiogénesis a través de la regulación negativa del VEGF es una estrategia de terapia anticáncer. Se demostró que el ácido p-cumárico suprime de manera efectiva la migración celular endotelial, la formación de capilares y el brote de anillos en la aorta de ratón (Chang-Seok Kong, 2013). Además, se comprobó que el ácido p-cumárico suprime significativamente el crecimiento tumoral in vivo bloqueando la angiogénesis, tanto en volumen como en peso, ver Figura 1.5.

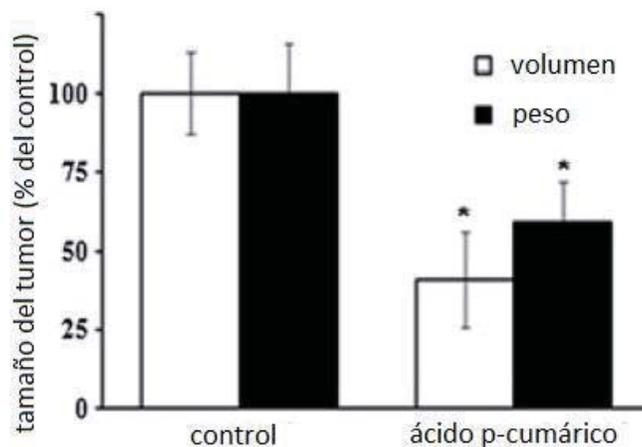


Figura 1.5 Porcentaje de reducción de peso y volumen de tumor tratado con ác. p-cumárico

1.3.5 Efecto supresor de la inflamación inducida por MSU

La gota es una forma muy dolorosa y recurrente de artritis inflamatoria desencadenada en respuesta a los depósitos articulares de cristales de urato monosódico (MSU). Además, los cristales de MSU inducen la liberación de diversos mediadores inflamatorios, incluyendo citoquinas, quimioquinas, metabolitos del ácido araquidónico, proteasas y radicales de oxígeno, lo que conduce a una condición inflamatoria en toda regla. Se indujo la inflamación a 6 ratas mediante MSU, y se administró ácido p-cumárico (100 mg/kg). Las Figuras 1.6, 1.7 y 1.8 presentan el efecto del p-CA en la actividad de diversas enzimas en el hígado, bazo y suero, respectivamente. La actividad enzimática está expresada como fosfatasa ácida- μmol fenol liberado/min/mg de proteína; N-acetil glucosaminidasa, β -glucuronidasa y β -galactosidasa- μmol p-nitrofenol formado/h/mg de proteína; cathepsina-D- $\mu\text{mol} \times 10^{-2}$ de tirosina liberada/h/mg de proteína; respectivamente.

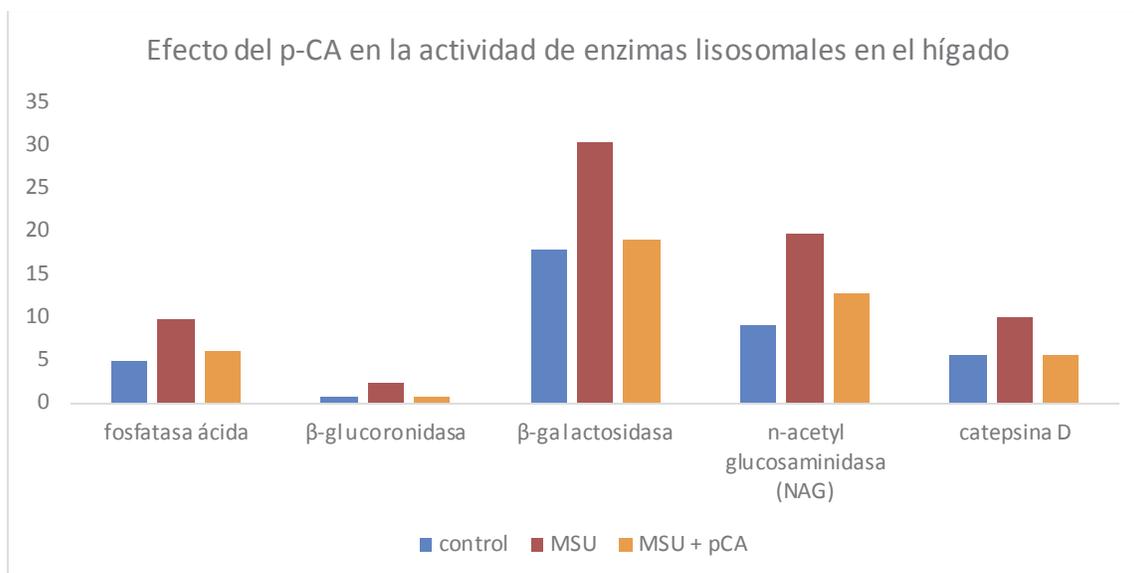


Figura 1.6 Efecto del p-CA en la actividad de enzimas lisosomales en el hígado

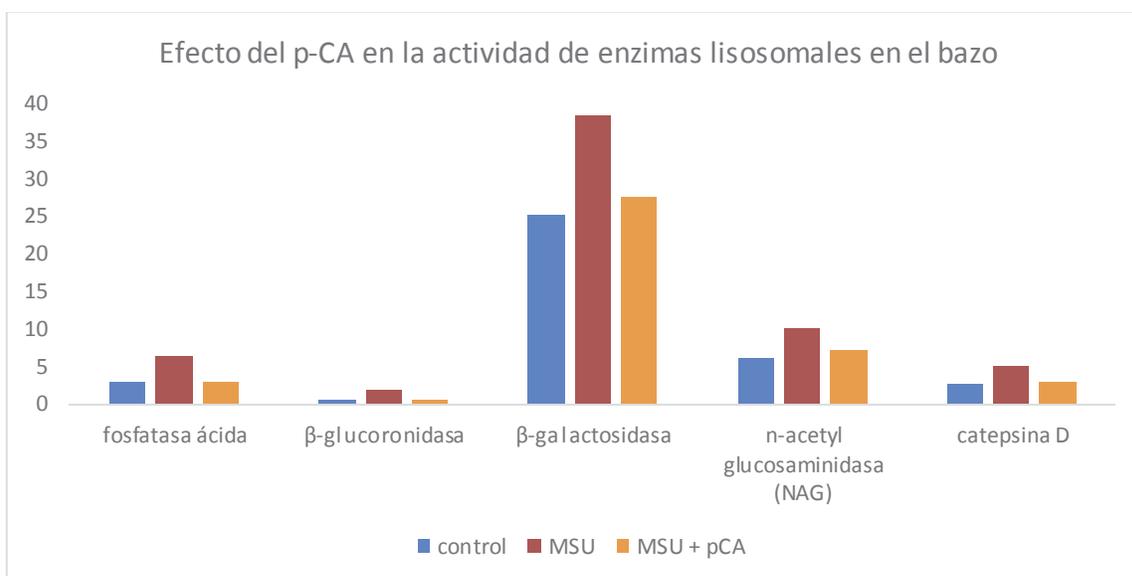


Figura 1.7 Efecto del p-CA en la actividad de enzimas lisosomales en el bazo

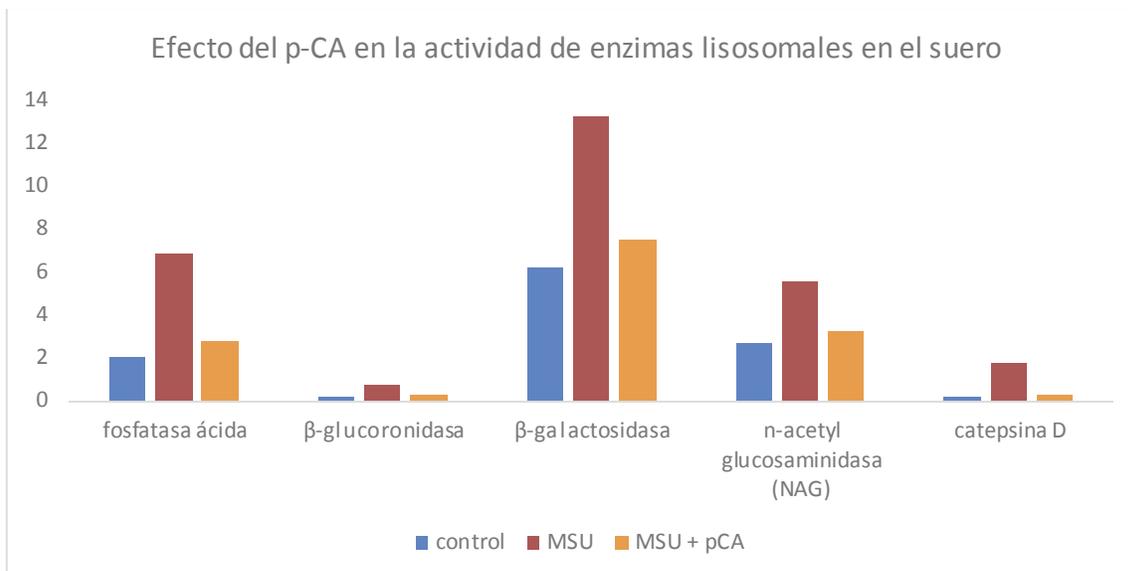


Figura 1.8 Efecto del p-CA en la actividad de enzimas lisosomales en el suero

1.4 PRODUCCIÓN ACTUAL DE ÁCIDO P-CUMÁRICO

Actualmente el ácido p-cumárico se produce por extracción de distintas fuentes vegetales con una pureza desde un 50% hasta un 98% HPLC. Existen diversos laboratorios, en su mayoría chinos, que lo producen a partir de extracción para luego comercializarlo a otros laboratorios o centros de investigación. Sin embargo, los métodos de extracción, aislamiento y purificación del ácido a partir de plantas son procesos laboriosos que requieren mucho tiempo, por lo que se desea encontrar un método de producción para una síntesis comercial y a gran escala del compuesto. También se puede producir por síntesis química, pero estos métodos son costosos y resultan en una gran cantidad de productos secundarios. En ambos casos, para llegar a un alto grado de pureza el proceso de recuperación o *downstream* hace que el costo del producto aumente considerablemente. La Tabla 1.4 presenta algunos de los productores y el precio al cual lo comercializan, información recibida directamente a partir de cotizaciones desde las páginas web de los proveedores.

Tabla 1.4: Productores de ácido p-cumárico y su precio de venta

Productores	Cantidad (g)	Precio	Moneda
Sigma-Aldrich	1	19	USD
	10	84	USD
	25	151	USD
SCBT	1	19	USD
	25	78	USD
TRC- Canada	5	120	USD
	50	960	USD
Nanjing Zelang Medical	1	24,5	USD
	25	155,5	USD
Sichuan Weikeqi Biotech	1	80	USD
	25	1124	USD
Hangzhou dayangchem Co	1	160	USD
	25	220	USD

Debido a que todas las cotizaciones se hicieron para una pureza igual o mayor al 98%, las grandes variaciones de precio se pueden deber a la fuente de la cual extraen el ácido p-cumárico, el mecanismo de extracción y, principalmente, los pasos en la etapa de recuperación.

Actualmente no se produce ácido p-cumárico por síntesis biológica. Es importante destacar que no existe algún microorganismo silvestre que produzca ácido p-cumárico como producto de su metabolismo, pero se han hecho estudios (Nijkamp et al., 2007) en los que se ha modificado genéticamente alguno para que así lo hicieran. Bajo esa premisa, la posibilidad de producir ácido p-cumárico por fermentación a gran escala es una tentadora alternativa que entraría a competir directamente con la producción por extracción y la síntesis química.

1.5 CAUSAS DE MUERTE EN CHILE

A nivel nacional, la mayor causa de mortalidad son las enfermedades asociadas al sistema circulatorio, seguidas por los tumores malignos. Ambas causas constituyen aproximadamente el 50% de las defunciones anuales que, llevadas a números, ambas causas corresponden a un promedio de 45.000 muertes al año, dato que se ha mantenido relativamente constante durante los últimos años. Si bien entre un año y otro puede haber variaciones, éstas son mínimas y las proporciones porcentuales se han mantenido constantes en los últimos diez años, por lo que es posible realizar un promedio para presentar los datos que se muestran en la Figura 1.9.

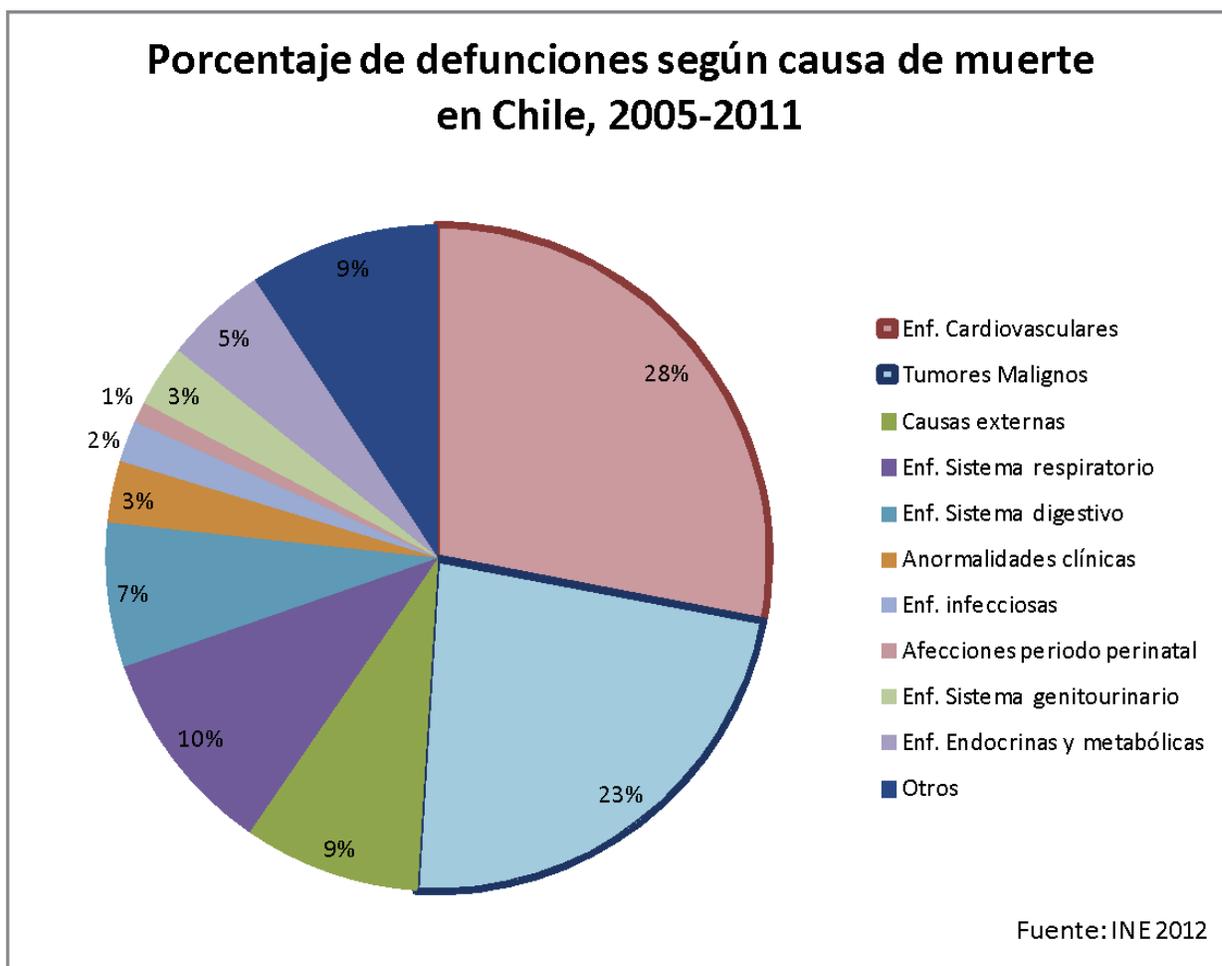


Figura 1.9: Porcentaje de defunciones según causa de muerte en Chile, 2005-2011

Todas las propiedades y efectos positivos del ácido p-cumárico descritos en los puntos anteriores, serían beneficiosos para prevenir, disminuir efectos o tratar las enfermedades que causan la mayor cantidad de defunciones en nuestro país.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo general

- Evaluar la factibilidad técnico-económica una planta productora de ácido p-cumárico por fermentación

1.6.2 Objetivos específicos

- Establecer un mercado para el ácido p-cumárico
- Definir el proceso productivo y diseñar una planta productora
- Evaluar la rentabilidad del proyecto

REFERENCIAS CAPÍTULO 1

- Castelluccio, C., Paganga, G. (1995). Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS*, 188-192.
- Chang-Seok Kong, C.-H. J.-S.-J.-W. (2013). Antiangiogenic Effects of P-Coumaric Acid in. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 317-323.
- Clifford, M. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Sci Food Agric*, 1033-1043.
- Cordova, e. a. (2005). The cardiovascular protective effect of red wine. *Am Coll Surg*, 428-439.
- Ghiselli, A., Luceri, C., Giovanelli, L. (2003). Effect of 4-coumaric and 3,4-dihydroxybenzoic acid on oxidative DNA damage in rat colonic mucosa. *Br J Nutr*, 581-587.
- Lamy, S. et al. (2010). Propranolol suppresses angiogenesis in vitro: inhibition of proliferation, migration and differentiation of endothelial cells. *Vascul Pharmacol*, 200-208.
- Luceri, C. e. (2007). p-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. *British Journal of Nutrition*, 458-463.
- Mainzen Prince Stanely P. (2013). Preventive effects of p-coumaric acid on cardiac hypertrophy and alterations in electrocardiogram, lipids, and lipoproteins in experimentally induced myocardial infarcted rats. *Food and Chemical Toxicology*, 348-354.
- Mainzen Prince Stanely P. (2013). Preventive effects of p-coumaric acid on lysosomal dysfunction and myocardial infarct size in experimentally induced myocardial infarction. *European Journal of Pharmacology*, 33-39.
- Markowska, A. e. (2010). Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med*, 1981-1993.
- Morton, L. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharm. Physiol*, 152-159.
- Stich, H. (1991). The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. *Mutat*, 307-324.
- Tomàs-Barberan, F., Clifford, M. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. *Sci Food Agric*, 1024-1032.
- Youssef, F., et al. (2005). Risk modification in patients with peripheral arterial disease: a retrospective survey. *Angiology*, 279-287.

Zang, I. (2000). Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 954-960.

Zhao, Z., Egashira, Y., Sanada, H. (2005). Phenolic antioxidants richly contained in corn bran are slightly bioavailable in rats. *J Agr Food Chem*, 5030-5035.

CAPÍTULO 2

ESTUDIO DE MERCADO, CAPACIDAD Y UBICACIÓN DE LA PLANTA

2.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo, se analizará el mercado del ácido p-cumárico, con el fin de establecer la importancia y el potencial comercial del producto en cuestión, de acuerdo a la propuesta en la que se basará este estudio técnico económico. Uno de los factores más críticos en el estudio de proyectos, es la determinación de su mercado, tanto por el hecho de que aquí se define la cuantía de su demanda e ingresos de operación como los costos e inversiones implícitos (Sapag N., 1995). Además es preciso para su estudio reconocer cada uno de los agentes que con su actuación tendrán algún grado de influencia sobre las decisiones que se tomarán al definir su estrategia comercial.

Es importante destacar que el ácido p-cumárico actualmente se comercializa sólo para investigaciones a nivel institucional y farmacológico, es decir, no existe un mercado ya preestablecido para dicho ácido. Bajo esta premisa, surge el desafío de encontrar un mercado en el cuál sus propiedades sean de utilidad para solucionar alguna problemática. Para ello, el estudio se dividió en dos. Por un lado, un mercado que hiciera alusión a sus múltiples efectos positivos en el sistema circulatorio: efecto antiplaquetario, efecto preventivo de infarto al miocardio, entre otros. Por otro lado, un mercado que hiciera referencia al efecto antiangiogénico del ácido p-cumárico, es decir, a una fracción de la población afectada por algún tipo particular de cáncer.

El objetivo principal de este estudio es verificar mediante la recopilación de información, la posibilidad real de implementar el producto al mercado actual de prevención y tratamiento de ciertas enfermedades. Son cinco los mercados que se reconocerán al realizar un estudio de factibilidad: Consumidor, competidor, proveedor, distribuidor y externo. Este último puede descartarse y sus variables incluirse según corresponda, en cada uno de los cuatro anteriores (Sapag N., 1995).

Se realizará un análisis de estudios y estadísticas tomando en cuenta la tasa de incidencia de infartos, supervivencia a éstos, trombosis y algunos tipos de cáncer, considerando también las defunciones para cada caso; con el fin de poder establecer el mercado consumidor. Además, se analizarán los medicamentos utilizados actualmente y su volumen de comercialización, para poder

establecer el mercado competidor. En base a esto, junto con algunos supuestos debido a la inexistencia de un mercado actual, se determinará la capacidad de la planta y la ubicación de esta.

2.2 SUBMERCADO CONSUMIDOR

En este estudio, el mercado consumidor hace alusión a los individuos que podrían utilizar el producto de manera preventiva o como tratamiento, es decir, las personas propensas a las enfermedades mencionadas anteriormente. Para dar cuenta de la cantidad de afectados por algún tipo de enfermedad y la gravedad de dicha enfermedad, un dato importante a considerar es la tasa de defunción. Si bien el dato de la cantidad de personas que fallecen no tiene relación directa con la cantidad de enfermos, es un índice relevante al momento de comenzar un estudio y realizar proyecciones acerca de las enfermedades.

Utilizando datos oficiales de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el portal estadounidense Global Post realizó un mapa (Figura 2.1) en el que se muestra la enfermedad que causa más muertes en cada país del mundo.

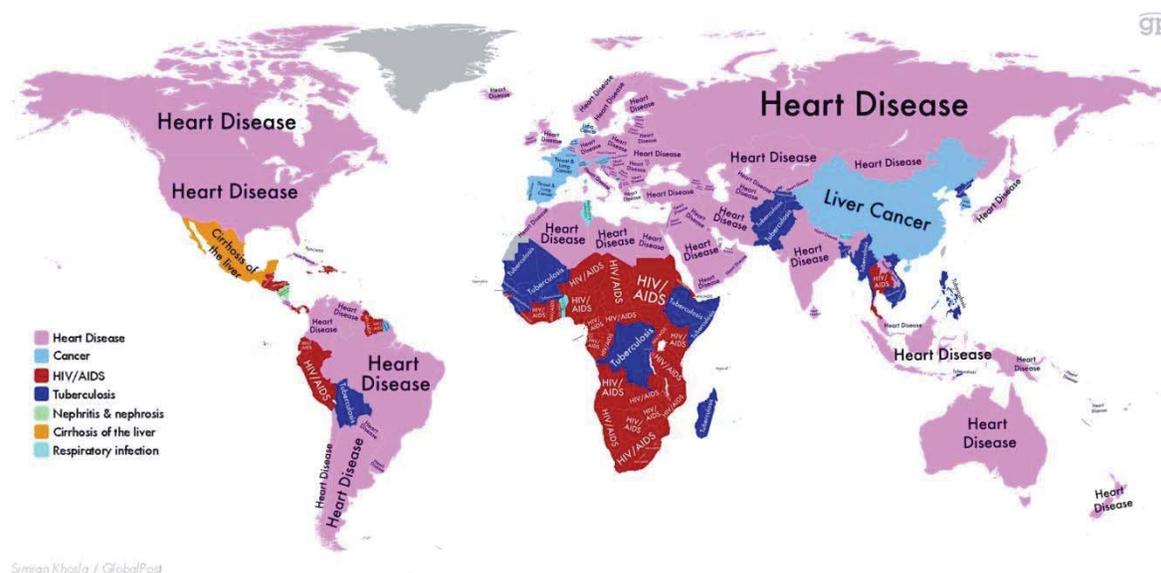


Figura 2.1: Enfermedad que causa más muertes en cada país del mundo. Fuente: Global Post

A simple vista, se puede apreciar que a nivel mundial el motivo de deceso más común son las patologías cardíacas. De hecho, en Chile, Argentina, Brasil, Canadá, Estados Unidos, Italia y Rusia,

entre otros, es la primera causa de muerte. En tanto, en naciones como China, España, Portugal y Francia predominan las muertes por cáncer.

Si bien el estudio realizado se basó en estadísticas nacionales tanto para defunciones, incidencia y comercialización de los productos con funciones análogas, las enfermedades asociadas al sistema circulatorio y el cáncer son las mayores causas de muerte a nivel mundial. El estudio se hizo pensando en el mercado nacional, más no se descarta la posibilidad de futuros estudios y una posible expansión y ampliación al mercado global, lo que se explicará posteriormente.

En Chile el panorama no se aleja de la realidad global. Según las Estadísticas demográficas del Instituto Nacional de Estadísticas (INE), las mayores causas de muerte son las enfermedades cardiovasculares y los tumores malignos, constituyendo entre ellas el 51% de las defunciones en los últimos años. Si bien entre un año y otro puede haber variaciones, éstas son mínimas y las proporciones porcentuales se han mantenido constantes en los últimos diez años, por lo que es posible realizar un promedio para presentar los datos.

2.2.1 Enfermedades asociadas al sistema cardíaco

Se ha demostrado el efecto positivo del ácido p-cumárico tanto para la prevención del infarto al miocardio (IAM) en sí, como para la prevención, inhibición o disminución de ciertos efectos relacionados con el infarto tales como el estrés oxidativo, la apoptosis cardíaca, la hipertrofia cardíaca y otras alteraciones metabólicas (Mainzen Prince P. S., 2013), (Mainzen Prince P. S., 2013).

Las estadísticas demográficas clasifican las enfermedades cardiovasculares en enfermedades cardíacas reumáticas crónicas, enfermedades hipertensivas, infarto agudo al miocardio, enfermedades cerebro-vasculares, aterosclerosis, enfermedades isquémicas del corazón y otras enfermedades del sistema circulatorio. Dentro de ellas, las con la mayor tasa de defunción son las enfermedades cerebro-vasculares, el infarto agudo al miocardio (IAM), las enfermedades hipertensivas y otras enfermedades isquémicas al corazón. La Tabla 2.1 presenta el número de defunciones según causa de muerte en Chile.

Tabla 2.1: Defunciones según causa de muerte en Chile, 2007-2011

Causa de muerte	2007	2008	2009	2010	2011
Enfermedades hipertensivas	3377	3493	3523	3976	3488
Infarto agudo al miocardio	6348	5744	5438	5973	5572
Enfermedades cerebro-vasculares	8278	8090	8130	8888	8736
Otras enfermedades isquémicas al corazón	2078	1923	1861	1816	1625

En las cuatro causales de muerte la tasa de defunción se mantiene relativamente constante y sólo en el caso de otras enfermedades isquémicas al corazón se presenta una leve disminución de las defunciones año a año.

Bajo otra clasificación de las enfermedades asociadas al sistema circulatorio, un estudio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile revela que la enfermedad coronaria (EC), responsable de 9,5% del total de defunciones en Chile, es la primera causa de muerte en hombres y la segunda en mujeres, después del accidente cerebro-vascular (Departamento de Estadísticas e Información de Salud, 2010). 73% de las muertes por EC son debidas a infarto agudo del miocardio (IAM) (Alonso F, 2010). Entre el año 2001 y 2007 se estimó que ocurrieron 83.754 casos de IAM con un promedio anual de 11.964 casos. La tasa cruda promedio de incidencia fue 74,4 casos por cada 100.000 habitantes (98,0 x 100.000 en hombres y 51,0 x 100.000 en mujeres) (Nazzari C, 2011). En la Figura 2.2 se muestran las tasas de incidencia para los distintos grupos de edad.

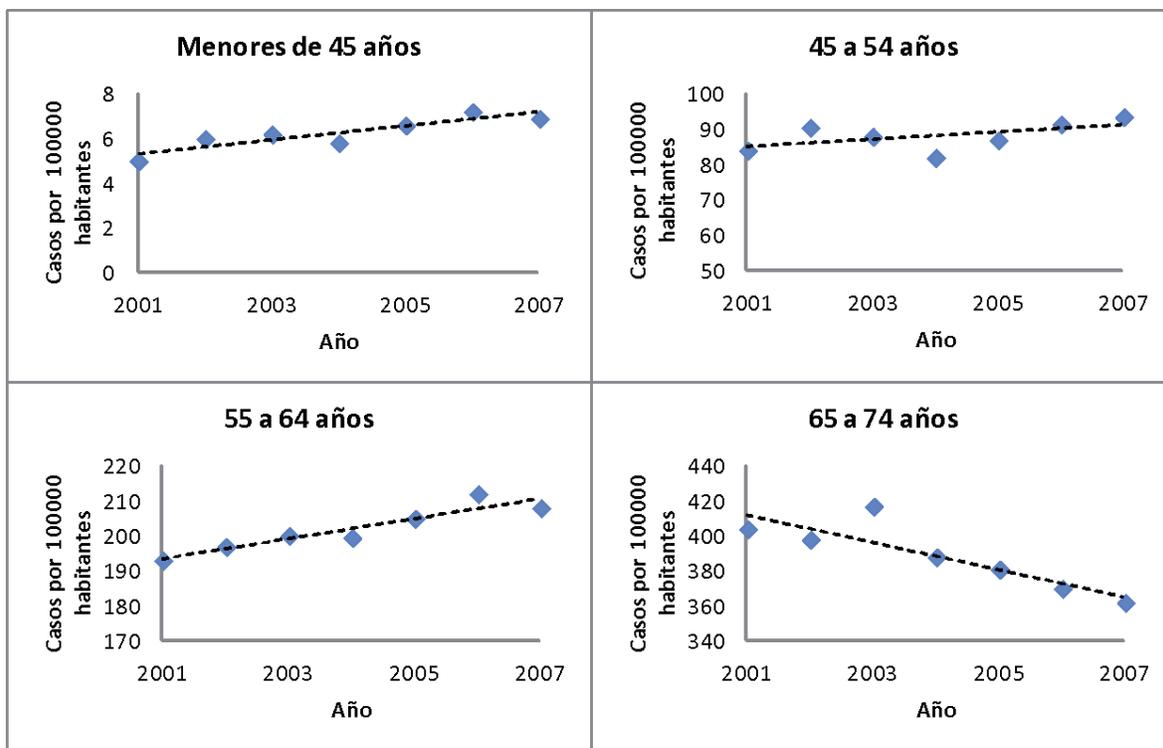


Figura 2.2: Tasas de incidencia de infarto agudo del miocardio según grupo de edad en Chile, 2001-2007

El análisis de la tendencia mostró un aumento de la incidencia en términos porcentuales en los grupos de menor edad: 34% en los menores de 45 años; y 9,2% en el de 55 a 64 años. Por el contrario, en el grupo de 65 a 74 años se registró una reducción en la incidencia de 11,3% en el período estudiado. El número de casos proyectados para el año 2015 es 16.041, lo cual corresponde a un aumento de 20,6% en la frecuencia absoluta, respecto a los casos reportados en 2007 (13.277) (Nazzal C, 2011). Si bien las tasas estandarizadas por edad no mostraron un incremento en la incidencia entre 2001 y 2007, debido al progresivo envejecimiento de la población chilena (Szot, 2003), es esperable un aumento en el número absoluto de casos en las próximas décadas y una creciente demanda de atención para el sector salud.

En cuanto a la mortalidad, se puede establecer un promedio de 5920 muertes por IAM anualmente; sin embargo, los análisis mostraron que ésta ha ido disminuyendo durante el período analizado en ambos sexos, particularmente en el masculino (reducción anual de 1,22% en hombres y 0,81% en mujeres).

Tomando como base la proyección de 16.041 casos de infarto al miocardio para el año 2015 y el promedio de 5920 de muertes, se tomará un estimado de 10.000 posibles consumidores de ácido p-cumárico para prevención de un infarto al miocardio o para disminuir o inhibir ciertas complicaciones y alteraciones metabólicas propias de un infarto tales como alteraciones en el electrocardiograma, lípidos y lipoproteínas.

2.2.2 Tumores malignos

El Primer Informe de Registros Poblacionales de Cáncer de Chile fue publicado el año 2012 realizando un registro del quinquenio 2003 – 2007. En él se encuentra el estudio de incidencia, mortalidad y estimación país, además de un detallado estudio para las regiones de Antofagasta, Los Ríos y Biobío.

Como se ha mencionado anteriormente, el estudio sobre el efecto anti-angiogénico del ácido p-cumárico es muy reciente, por lo que no se sabe aún con claridad para qué tumores sería aplicable. Para poder estimar el mercado consumidor, se dará el supuesto de que su aplicación es análoga a uno de los pocos productos en el mercado que ya se está comercializando como anti-angiogénico: Avastin. La descripción sobre dicho producto se analizará posteriormente, en el subcapítulo del mercado competidor, sin embargo, es necesario mencionar los tumores o cánceres en los que se aplica actualmente, para analizar la incidencia y la mortalidad de éstos. Avastin se utiliza para el cáncer colorrectal metastásico, cáncer de mama, cáncer al pulmón, cáncer a las células renales avanzado o metastásico, cáncer hepático y cáncer epitelial al ovario, trompas y peritoneal primario.

De acuerdo a la información entregada por el Primer Registro Poblacional del Cáncer, la Tabla 2.2 y la Tabla 2.3 presentan los datos sobre incidencia y mortalidad para hombres y mujeres en los cánceres ya mencionados (Ministerio de Salud, 2012).

Tabla 2.2: Incidencia estimada de cáncer según localizaciones en Hombres y Mujeres.
Chile 2003-2007

Hombres		Mujeres	
Localización del Cáncer	N° casos/año	Localización del Cáncer	N° casos/año
Colon	748,7	Colon	877,6
Recto y ano	425,2	Recto y ano	366,4
Bronquios y pulmón	1373,3	Bronquios y pulmón	815,4
Riñones	544,9	Riñones	366,5
Hígado	368,7	Hígado	302,3
		Mamas	3791,1
		Ovarios	553,1
		Trompas	368,3
Total	3460,8	Total	7440,7

Sumando los casos de hombres y mujeres, se obtiene una estimación de 10901,5 casos nuevos de cáncer al año que podrían ser tratados con tratamiento anti-angiogénico.

Sumando los casos de hombres y mujeres, se obtiene una estimación de 6717,4 muertes al año a causa de los tipos cáncer que podrían ser tratados con tratamiento anti-angiogénico.

A diferencia de los datos del infarto al miocardio en los que se restó la mortalidad a los datos de incidencia, para el caso de los tumores malignos se tomaron sólo los datos de incidencia. Esto se debe a que en el caso de un infarto, un porcentaje de las defunciones se produce previo a una hospitalización y las defunciones restantes se producen durante la hospitalización, pero es algo mucho más instantáneo que en el caso del cáncer, donde los pacientes pueden pasar años en tratamiento. Tomando en cuenta sólo los datos de incidencia de las locaciones de cáncer que podrían tratarse con anti-angiogénicos, se obtiene un total de 10.901,5 casos nuevos estimados para cada año.

Tabla 2.3: Mortalidad estimada de cáncer según localizaciones en Hombres y Mujeres.
Chile 2003-2007

Hombres		Mujeres	
Localización del Cáncer	Nº muertes/año	Localización del Cáncer	Nº muertes/año
Colon	458,8	Colon	586,6
Recto y ano	231,6	Recto y ano	215,8
Bronquios y pulmón	1475,2	Bronquios y pulmón	817,4
Riñones	333	Riñones	183
Hígado	448,6	Hígado	375,4
		Mamas	1128
		Ovarios	349,6
		Trompas	114,4
Total	2947,2	Total	3770,2

Considerando distintos factores como, por ejemplo, que no toda la población puede tener acceso a la misma calidad en cuanto a los servicios de salud, la suposición de que es aplicable para los tumores descritos y que el ácido p-cumárico es un producto nuevo en este mercado, se propone cubrir solamente el 50% del potencial mercado consumidor. Por consiguiente, se tomará un estimado de 5.000 personas como posibles consumidores de ácido p-cumárico como agente anti-angiogénico para el tratamiento de distintos tumores malignos.

2.3 SUBMERCADO COMPETIDOR

Al igual que en el subcapítulo anterior, el estudio del mercado competidor se realizará por separado para el caso del efecto preventivo al infarto al miocardio y para el caso del efecto anti-angiogénico que posee el ácido p-cumárico. Se presentarán los medicamentos con los cuales el ácido p-cumárico podría competir como análogo, dando cuenta de su dosis, modo de administración y analizando también los efectos secundarios o contraindicaciones de éstos.

2.3.1 Tratamiento farmacológico para infarto agudo al miocardio

El núcleo fisiopatológico del infarto agudo de miocardio (IAM) es la oclusión trombótica de la arteria coronaria. A partir de ese momento, el desarrollo de las estrategias de reperfusión farmacológicas y mecánicas con el objetivo de provocar la lisis o la fragmentación del trombo ha permitido reducir la mortalidad global en un 20%.

Numerosos fármacos están actualmente disponibles para el tratamiento de un infarto de miocardio, en adición con los trombolíticos. Algunos, particularmente los anticoagulantes y los beta-bloqueantes, se emplean para tratar el síndrome coronario agudo. Algunos de estos y otros fármacos están disponibles para la prevención del infarto de miocardio, ya sea primaria o secundaria (GeoSalud).

Los coágulos sanguíneos son el principal factor en los infartos de miocardio. Numerosos fármacos anticoagulantes están actualmente disponibles para tanto protección a largo plazo como para tratamiento del paciente durante el infarto o el síndrome coronario agudo. Los fármacos anticoagulantes incluyen antiagregantes plaquetarios (aspirina, los antagonistas de los receptores de la glicoproteína IIb/IIIa, clopidogrel) o anticoagulantes (heparina, warfarina). Pueden utilizarse solos o en combinación, dependiendo de la gravedad de la enfermedad.

Todos los pacientes con sospecha de IAM deben ser tratados de inmediato con aspirina (Ácido Acetil Salicílico), excepto aquellos con reacciones alérgicas serias documentadas o hemorragia activa o reciente. Su efecto antiagregante está relacionado con la inhibición de la ciclooxigenasa y la reducción de la producción de tromboxano A-2 por la plaqueta activada (Cannon, 2006) (Patrono, 1994). La dosis de AAS en el IAM es de 160-325 mg, inicialmente administrada por vía oral y masticada para lograr más rápido los efectos terapéuticos y luego continuada por vía oral (100-200 mg/día) en forma indefinida (Antman EM, 2004) (Antmann, 2007).

El clopidogrel es un agente antiplaquetario oral que bloquea selectivamente al receptor P2Y₁₂ (uno de los receptores plaquetarios del ADP (adenosín difosfato) al producir inhibición de la agregación y la activación plaquetaria. Es una prodroga que requiere un proceso de oxidación hepática (vía citocromo P-450) para transformarse en un compuesto activo (Cannon, 2006). Una dosis de 300-600 mg produce a las 2 horas una inhibición significativa de la agregación plaquetaria

inducida por el ADP y su efecto máximo (40-60%) se produce a las 6 horas de su administración. (Muller M, 2001)

Todos los tratamientos anticoagulantes comportan riesgo de sangrada, lo cual puede provocar situaciones peligrosas, incluido un accidente cerebro vascular que es la mayor causa de muerte en cuanto a enfermedades cardiovasculares. La Tabla 2.4 presenta un resumen de las características de los fármacos anticoagulantes.

Tabla 2.4: Fármacos Anticoagulantes

Agente	Aspirina	Clopidogrel	Heparina
Acciones	Antiagregante plaquetario	Agentes antiplaquetas (inhibidores plaquetarios)	Tanto la heparina estándar como la heparina de bajo peso molecular (HBPM).
Tratamiento durante un infarto de miocardio	<p>La aspirina masticable debe tomarse ante los primeros signos de un infarto.</p> <p><i>Con cirugía.</i> Se emplea con la angioplastia en combinación con otros agentes antiacoagulantes para prevenir la reoclusión de los vasos.</p>	<p><i>Con cirugía.</i> Los inhibidores plaquetarios, particularmente el clopidogrel, puede ser especialmente útil en combinación con la aspirina para la prevención de coágulos sanguíneos tras la angioplastia.</p> <p>Puede utilizarse en pacientes que no pueden tomar aspirina.</p>	<p>Administración intravenosa o subcutánea.</p> <p><i>Con cirugía.</i> Se emplea con la angioplastia. Con tratamiento trombolítico. Puede utilizarse con alteplasa.</p>
Prevención del infarto de miocardio	<p>La aspirina a bajas dosis es la primera elección en la prevención del infarto en aquellos pacientes que ya han sufrido un infarto, los que presentan angina estable, y los que tienen factores de riesgo para un primer infarto.</p>	<p>El clopidogrel puede emplearse en pacientes con angina inestable que no pueden tomar aspirina. Los estudios indican que el clopidogrel es más efectivo que otros, como la aspirina o la ticlopidina, en reducir la incidencia de infarto.</p>	<p>La HBPM se ha investigado para protección a largo plazo, pero no existen datos de que ofrezca ventajas adicionales frente a la aspirina.</p>

Efectos adversos. (Todos los tratamientos con anticoagulantes comportan riesgo de sangrado).	Su uso prolongado puede producir sangrado y úlcera gastrointestinales. Son preocupantes algunos estudios que sugieren una asociación reciente entre el uso de aspirina y otros fármacos similares llamados AINE con una alta incidencia de insuficiencia cardíaca en pacientes, particularmente si estos también estaban tomando diuréticos.	Estudios de trombocitopenia en pacientes que tomaban clopidogrel han provocado cierta preocupación.	Alto riesgo de sangrado. Debe ser monitorizada frecuentemente. (La HBPM puede requerir una monitorización menos rigurosa. Los pacientes pueden incluso ser capaces de administrársela, como los diabéticos la insulina)
---	---	---	--

A diferencia de los agentes anticoagulantes, el ácido p-cumárico inhibe la agregación plaquetaria sin afectar la coagulación sanguínea (Luceri, 2007), lo que le proporciona una ventaja considerable comparada con los demás antiagregantes plaquetarios y anticoagulantes descritos.

En la fase aguda del infarto hay un aumento de las catecolaminas circulantes secundario al dolor, la ansiedad y a la propia isquemia miocárdica, lo cual determina no sólo un incremento del consumo miocárdico de oxígeno, sino además estimulación de la lipólisis (con el aumento resultante de ácidos grasos libres plasmáticos), que ha demostrado que tiene un efecto proarrítmico en infartos experimentales en animales. Los efectos beneficiosos principales de los betabloqueantes están dirigidos a reducir el trabajo cardíaco y mejorar el metabolismo miocárdico; a su vez, poseen la capacidad de limitar la extensión del infarto y disminuyen la aparición de arritmias graves. Actualmente son conocidos por su capacidad de disminuir las muertes debidas a enfermedad cardíaca (Mauro V, 2009).

La administración intravenosa de beta-bloqueantes (metoprolol o esmolol) en las primeras horas tras un infarto puede reducir la destrucción del tejido cardíaco. Fuertes evidencias apoyan la baja incidencia de complicaciones y la mejoría de las tasas de supervivencias tras un infarto en aquellos pacientes que habían recibido beta-bloqueantes (GeoSalud). La indicación de betabloqueantes por vía intravenosa queda limitada a pacientes con IAM hiperdinámico (taquicardia sinusal e hipertensión arterial) y sin signos de insuficiencia cardíaca, mientras que el uso por vía oral se recomienda en todos los IAM luego de las 24 horas, en ausencia de insuficiencia cardíaca clínica.

Dentro de los efectos adversos más graves se los beta-bloqueantes, algunos de ellos tienden a bajar el colesterol LDL (colesterol bueno) alrededor de un 10%. Este efecto es más marcado en fumadores. La fatiga y letargia son los efectos adversos psicológicos más comunes. Algunas personas experimentan pesadillas y alteraciones del sueño, depresión, y pérdida de memoria. La capacidad de hacer ejercicio puede reducirse. Otros efectos adversos incluyen extremidades frías, asma, disminución de la función cardíaca, trastornos gastrointestinales, y disfunción sexual.

Los beta-bloqueantes, por otro lado, poseen diversas contraindicaciones. No deben utilizarse en pacientes con hipotensión arterial, mala perfusión periférica, estertores crepitantes pulmonares en más de un tercio de ambos campos pulmonares ni en pacientes con bloqueo auriculoventricular (BAV) de segundo o de tercer grado. En los pacientes con BAV de primer grado puede deteriorarse la conducción, por lo cual no se recomienda su empleo. También la contraindicación es absoluta en pacientes con asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) grave y deben evitarse en pacientes con reactividad bronquial que utilicen broncodilatadores con frecuencia. Si bien la diabetes tipo 1 no es una contraindicación absoluta para los betabloqueantes, no se recomienda utilizarlos en el contexto del infarto, dada la inestabilidad del paciente y la posibilidad de que los betabloqueantes enmascaren los signos de hipoglucemia. También deben evitarse en los pacientes con infarto secundario al uso de cocaína, debido al riesgo de favorecer el espasmo coronario (etiología más frecuente del IAM en estos casos) (Mauro V, 2009).

En cuanto a contraindicaciones del ácido p-cumárico, al ser un producto nuevo y ser éste un estudio prospectivo, no se describirán contraindicaciones ya que éstas se desconocen.

2.3.2 Tratamiento a tumores malignos con antiangiogénicos

Debido a que los tumores no pueden crecer más allá de un tamaño determinado ni diseminarse sin un suministro de sangre, los científicos están tratando de encontrar formas de bloquear la angiogénesis tumoral. Están estudiando inhibidores naturales y sintéticos de la angiogénesis, llamados también sustancias antiangiogénicas, con la idea de que estas moléculas impidan o hagan que sea lento el crecimiento del cáncer (Instituto Nacional del Cáncer, 2011).

La angiogénesis requiere que se unan moléculas de señalización, tal como el factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endotelial Growth Factor, VEGF), a receptores en la superficie de células endoteliales normales. Cuando el VEGF y otros factores de crecimiento endotelial se unen a sus receptores en las células endoteliales, se inician señales dentro de estas células que promueven el crecimiento y la supervivencia de vasos sanguíneos nuevos.

Los inhibidores de la angiogénesis interfieren con varios pasos en este proceso. Por ejemplo, bevacizumab (Avastin®) es un anticuerpo monoclonal que reconoce y se une específicamente al VEGF (Shih T, 2006). Cuando el VEGF se une al fármaco bevacizumab, no puede activar el receptor del VEGF. Otros inhibidores de la angiogénesis, como el sorafenib (Nexavar®) y el sunitinib (Sutent®), se unen a receptores en la superficie de células endoteliales o a otras proteínas en las vías de señalización descendentes y bloquean sus actividades (Gotink KJ, 2010).

La Administración de Alimentos y Drogas ha aprobado el uso del fármaco bevacizumab (Avastin®) solo para el tratamiento de glioblastoma que no ha mejorado con otros tratamientos y para su uso junto con otros fármacos para el tratamiento de cáncer colorrectal metastático, algunos cánceres de pulmón de células no pequeñas y cáncer de células renales metastático. Bevacizumab es el primer inhibidor de la angiogénesis que ha demostrado atrasar el crecimiento de tumores y, lo que es aún más importante, alargar la vida de pacientes con algunos tipos de cáncer.

AVASTIN® es el nombre comercial para el fármaco bevacizumab. Es comercializado por el laboratorio Roche y se presenta en envase de 1 vial que contiene 100 mg de bevacizumab en 4 ml de solución. AVASTIN® debe ser preparado por un profesional en los cuidados de la salud utilizando una técnica aséptica. La dosis inicial de AVASTIN® debe ser administrada durante 90 minutos en una infusión intravenosa. Si la primera infusión es bien tolerada, la segunda puede ser administrada durante 60 minutos. Si la infusión de 60 minutos es bien tolerada, todas las infusiones siguientes pueden ser administradas durante 30 minutos. No se recomienda la reducción de dosis de AVASTIN® por eventos adversos. Si se indica, AVASTIN® debe ser permanentemente discontinuado o suspendido temporalmente (Agencia Europea de Medicamentos, 2010).

En cuanto a las dosis, para el carcinoma metastático de colon o recto (CCRm), el cáncer de células renales avanzado y/o metastático (CRm) y el cáncer de mama metastático (CMm), la dosis recomendada de AVASTIN® es de 10 mg/kg de peso corporal administrados como perfusión

intravenosa una vez cada dos semanas o bien 15 mg/kg de peso corporal administrados una vez cada tres semanas. En el caso del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) AVASTIN® se administra en combinación con quimioterapia basada en platino durante 6 ciclos de tratamiento, seguido del medicamento en monoterapia hasta la progresión de la enfermedad. En la monoterapia la dosis recomendada es de 7,5 o 15 mg/kg de peso corporal una vez cada tres semanas. Para el cáncer de ovario epitelial, trompa de falopio o peritoneal primario AVASTIN® se administra en combinación con carboxiplatino y paclitaxel durante 6 ciclos de tratamiento, seguido por un uso continuado de la misma manera que para el CPNM. En todos los casos, se recomienda continuar el tratamiento hasta la progresión de la enfermedad subyacente o hasta toxicidad inaceptable (Agencia Europea de Medicamentos, 2010).

De acuerdo a información entregada por el departamento de ventas de Roche, se comercializan en Chile alrededor de 15.000 unidades de AVASTIN® al año. Si se toma como referencia para todos los casos los 6 ciclos de quimioterapia o un tratamiento de alrededor de 5 a 6 meses, son aproximadamente 2500 las personas tratadas con AVASTIN®.

La FDA ha aprobado el uso de otros fármacos con actividad antiangiogénica, tales como sorafenib (Nexavar®), sunitinib (Sutent®), pazopanib (Votrient®) y everolimus (Afinitor®). Sorafenib fue aprobado para el tratamiento de carcinoma hepatocelular y cáncer de riñón, sunitinib y everolimus tanto para cáncer de riñón como para tumores neuroendocrinos y pazopanib para cáncer de riñón (Instituto Nacional del Cáncer, 2011).

Nexavar es el nombre comercial para el fármaco sorafenib. Es comercializado por el laboratorio Bayer y se presenta en un envase como 112 comprimidos de 200 mg. La dosis diaria recomendada de sorafenib es 400 mg (2 comprimidos de 200 mg) tomados 2 veces al día, bien sin alimentos o con una comida con un contenido bajo o moderado en grasa. El tratamiento debe continuarse hasta que ya no suponga ningún beneficio clínico para el paciente o hasta que se manifieste una toxicidad inaceptable.

Tanto para Nexavar como para los otros medicamentos no fue posible contar con la información acerca del volumen comercializado en nuestro país, ya que los laboratorios lo consideran información confidencial.

Además de los inhibidores de la angiogénesis que ya han sido aprobados por la FDA, se están probando actualmente otros inhibidores que apuntan al VEGF o a otras vías de la angiogénesis en

estudios clínicos (estudios de investigación con pacientes). Si se comprueba que estos inhibidores de la angiogénesis son tanto seguros como efectivos en el tratamiento del cáncer en seres humanos, es posible que sean aprobados por la FDA y se pongan a disposición para uso amplio. Además, los inhibidores de la angiogénesis están siendo usados para tratar algunas enfermedades que consisten en la formación de crecimiento anormal de vasos sanguíneos en enfermedades no cancerosas, tal como la degeneración macular (Instituto Nacional del Cáncer, 2011).

2.4 SUBMERCADO PROVEEDOR

Las materias primas a considerar para el análisis son las fuentes de carbono y energía, aminoácidos y diferentes sales, que son necesarias para el crecimiento del microorganismo. Cabe mencionar que el medio de cultivo utilizado para realizar este proceso es un medio definido y no complejo ya que a nivel industrial elaborar el medio complejo resulta menos rentable.

Bajo este contexto existen cinco empresas principales, las cuales distribuyen estas materias primas de manera global: Sigma Aldrich, Winkler, Merck, Life Technologie y Gene X-press.

Sigma Aldrich es el mayor proveedor mundial de reactivos bioquímico, químico orgánicos y kits para la investigación y la industria. Como así también el mayor proveedor para la industria a granel. Sus productos bioquímicos, orgánicos y kits se utilizan en investigación científica, genoma, biotecnología, desarrollo farmacéutico, diagnóstico y manufactura química. Cuenta con sucursales en 37 países alrededor del mundo con más de 7800 empleados. Cuenta con una gama de más de 100 mil productos los cuales se agrupan bajo varias marcas de renombrada reputación por su calidad y desempeño a nivel mundial.

Winkler Ltda cuenta con una vasta experiencia en el área de los insumos cuyas fórmulas exclusivas y estandarizadas son empleadas por un amplio sector de la industria. Cuenta con tres áreas de producción: división de alimentos, división química y división detergentes.

Merck S.A Chile es una organización de ventas del grupo global Merck KGaA, Darmstadt, Alemania y provee al mercado en Chile productos farmacéuticos y químicos desde 1939. Sus productos abarcan la industria minera, farmacéutica, alimentaria, la industria de la celulosa, cosmética, universidades, hospitales y cadenas farmacéutica. En Chile cuenta con más de 250 trabajadores.

Life technologies es una empresa estadounidense con más de 50 mil productos y cinco mil patentes alrededor de todo el mundo. Con presencia en más de 180 países es una de las empresas más importantes del rubro a nivel mundial. Sus estudios y desarrollo de productos van desde las ciencias de la investigación como lo es la biología molecular, pasando por las ciencias aplicadas como es la salud animal, hasta las ciencias médicas como lo es la medicina genómica. A nivel mundial cuenta con más de 10 mil empleados y 1500 científicos.

Gene x-press es una Compañía chilena fundada el año 2001 dedicada a la distribución de productos en las áreas de investigación científica y biotecnológica. Representa variados productos de prestigiosos laboratorios a nivel mundial, desde análisis de endotoxinas a plásticos de laboratorios.

2.5 SUBMERCADO DISTRIBUIDOR

La disponibilidad de un sistema que garantice la entrega oportuna de los productos al consumidor toma en muchos proyectos un papel definitivo. Es el caso de productos perecederos donde el retraso más mínimo puede ocasionar pérdidas enormes, no sucede así con los productos no perecederos que cuya distribución puede programarse con holgura, sin afectar la rentabilidad del negocio (Sapag N., 1995). La distribución del producto puede ser de tipo directa, a terceros o mixta. En este caso la distribución de ácido p-cumárico se haría a algún laboratorio farmacológico para que se le agreguen los excipientes, se haga el recubrimiento en el caso de pastillas o la preparación en el caso de una solución intravenosa.

2.6 ESTIMACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LA PLANTA

La determinación del tamaño corresponde a un análisis interrelacionado de una gran cantidad de variables de un proyecto: demanda, disponibilidad de insumos, localización y plan de estratégica comercial de desarrollo. Futuro de la empresa que se crearía con el proyecto, entre otras (Sapag N., 1995). La cantidad proyectada demandada a futuro es quizás el factor condicionante más importante del tamaño y es recomendable definir un tamaño de planta superior, necesaria para cubrir la demanda actual, pero adecuado a las expectativas de crecimiento (Stuardo J. Sergio, 2008).

Como se ha mencionado en reiteradas ocasiones en este capítulo, no existe un mercado ya preestablecido para el ácido p-cumárico, por lo que no existen estadísticas de producción ni datos suficientes para realizar una proyección en el tiempo.

El volumen de producción se determinó tomando en cuenta el número de posibles consumidores calculados anteriormente multiplicados por la dosis de p-cumárico que deberían tomar y por el tiempo que ésta debería administrarse. Dado que actualmente no se administra como medicamento en humanos y los estudios acerca de las propiedades del ácido p-cumárico que se utilizaron como base son del año 2013, la dosis y el tiempo de administración son estimaciones.

En el caso del infarto al miocardio (IAM) se tienen 10.000 posibles consumidores de ácido p-cumárico. La dosis para prevenir los problemas asociados al infarto y prevenir un infarto en sí es de 15 mg/kg de peso corporal; llevada a un peso promedio de 70 kg resulta en 1050 mg que, para simplificar los cálculos, se aproximará a 1000 mg. Considerando como posología un comprimido de 1000 mg diario, por 30 días, se tendrá un total de 30 g/persona. Llevado a un consumo anual, se debe multiplicar dicho valor por 12 (12 meses), obteniendo así un valor de 360 g/persona. Multiplicando dicho valor por los posibles consumidores (10.000 posibles consumidores), da un total de 3.600.000 gr, es decir, 3.600 kg de ácido p-cumárico destinados a prevenir infarto al miocardio y ciertas complicaciones asociadas a la enfermedad.

En el caso de los tumores malignos, se calcularon 5.000 posibles consumidores que corresponden al 50% de la demanda. La dosis de tratamiento es de 15 mg/kg de peso corporal; llevada a un peso promedio de 70 kg resulta en 1050 mg que para simplificar los cálculos se aproximará a 1000 mg. Considerando como posología la misma de Avastin, administración durante 6 ciclos de quimioterapia o cada 3 semanas, se tiene un aproximado de 6 g/persona.

Para determinar la capacidad de la planta sólo se considerará el mercado asociado a las enfermedades del sistema circulatorio, dado que existe más información al respecto. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de hacer una expansión de la planta cuando se tenga mayor información acerca de las propiedades antiangiogénicas del ácido p-cumárico y sus efectos en los seres humanos.

Teniendo en cuenta el alto valor relativo de los compuestos análogos al ácido p-cumárico, es posible inferir que el uso sería recetado para una población acotada de infartados. Es decir, el ácido sería asequible para infartados con accesibilidad económica alta, específicamente,

pertenecientes a la clasificación socioeconómica ABC1. Este grupo representa aproximadamente un 5,4% de la población chilena (AIM, 2008), por ende, asumiendo que la cantidad de infartos se produce de forma relativamente homogénea entre las clases socioeconómicas se tiene que los 10.000 posibles consumidores, se reducen a 540 que pueden tener acceso al tratamiento con ácido p-cumárico. Por otro lado, se considerará que sólo el 20% de los que tienen la opción de tratamiento optarán por éste, dado que es un medicamento nuevo en el mercado, reduciendo el número de consumidores a 108. Multiplicando esta cantidad por 360 g/persona, se tiene que la cantidad de kilogramos son 38,9.

Por otro lado, se apunta a una pequeña fracción poblacional que realizará una prevención de IAM a través de un consumo de ácido p-cumárico. Este grupo acotado, incluye gente mayor a 50 años, con conciencia de prevención, y que estarían dispuestas a realizar un consumo preventivo con un remedio de precio relativamente caro. Es por esto que, nuevamente, el consumo estará dirigido al sector ABC1 del país. Los adultos mayores son aproximadamente el 13% de la población chilena y dentro de éstos, el 5% son ABC1. Llevando esto a números, los adultos mayores ABC1 en Chile son aproximadamente 116.300. De este grupo de adultos mayores, se estima que un 2,3% corresponderían a aquellos con conciencia de prevención de infartos y dispuestos a realizar un consumo preventivo de un medicamento nuevo en el mercado, reduciendo el número de consumidores a 2675. Al multiplicar esta cantidad por 360 g/persona, la cantidad de kilogramos necesarios resultan 963. Para mayor información, los cálculos de la estimación de la capacidad de la planta se encuentran en el ANEXO A.

Por lo tanto, al sumar ambas cantidad considerando las personas que se tratarían post y pre IAM, la producción anual sería de 1001,9 kg, que para fines prácticos se aproximarán a 1 tonelada.

2.7 UBICACIÓN DE LA PLANTA

Este estudio tiene por objetivo elegir aquella ubicación que permita mayores ganancias entre las alternativas que se consideren factibles. Estas últimas serán todas aquellas que cumplan con las restricciones impuestas por diferentes factores (técnicos, legales, tributarios, sociales e incluso ecológicos). Para su determinación se deben considerar los distintos factores de localización, aspectos que sirven de criterio para la búsqueda de sitios para la instalación de la planta (Schaffeld, 1984) y son los siguientes:

- Disponibilidad de materias primas
- Disponibilidad de energía
- Disponibilidad de agua en cantidad y calidad
- Disponibilidad de insumos
- Medios y costos de transporte
- Disponibilidad y costo de mano de obra
- Factores climáticos
- Aspectos ecológicos
- Cercanía de los mercados
- Disponibilidad y costo de los terrenos
- Topografía de suelos
- Aspectos tributarios y legales
- Facilidades financieras
- Comunicaciones
- Posibilidad de desprenderse de los desechos
- Aspectos culturales

Es necesario destacar que no siempre es necesario considerar todos los factores enumerados en la lista, ya que para cada proceso habrá factores más importantes que otros y algunos no intervienen simplemente. (Schaffeld et al., 1984).

Uno de los puntos más importantes a considerar es la cercanía a la materia prima y también la cercanía a los laboratorios farmacológicos. La materia prima más importante es la fuente de carbono y energía para el crecimiento del microorganismo, que en este caso es la glucosa, además del aminoácido fenilalanina. Tomando en cuenta la centralización como un factor importante, las

regiones escogidas fueron la Región de Valparaíso, la Región Metropolitana y la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins.

Posteriormente se enumeraron varios factores a considerar y se realizó una metodología de análisis dimensional simple la cual consistió en ponderar cada factor en función de su importancia relativa en el proyecto siendo $P_j = 1$ (menos relevante) a 3 (más relevante). Luego cada zona se evalúa respecto de cada factor según los siguientes conceptos (C) :

- +1 = Muy conveniente
- 0 = Normal
- -1 = Inconveniente

Después se multiplica la ponderación del factor por el concepto (+1, 0, -1) obteniéndose un puntaje para cada factor ($P_j * C$) y finalmente se suman todos los factores para un mismo lugar o región y se seleccionará aquel lugar que obtenga mayor puntaje. En la Tabla 2.5 se presentan las regiones seleccionadas con los factores y su respectiva ponderación.

Según los resultados obtenidos el lugar más apropiado a priori para ubicar la planta de producción de ácido p-cumárico es la Quinta Región, donde se privilegió la disponibilidad de materias primas, disponibilidad de agua, costos de terreno y transporte, partiendo desde la base de que se prefería tener una planta en la capital o en alguna región cercana a ella.

Tabla 2.5 Determinación de ubicación de la planta

Factores de localización	Ponderación	Quinta Región		Región Metropolitana		Sexta Región	
	Pj	C	Pj*C	C	Pj*C	C	Pj*C
Disponibilidad de materias primas	3	1	3	1	3	1	3
Disponibilidad de energía	3	0	0	0	0	0	0
Disponibilidad de agua en cantidad y calidad	3	1	3	1	3	1	3
Disponibilidad de insumos	2	1	2	1	2	0	0
Medios y costo de transporte	3	0	0	-1	-3	0	0
Disponibilidad y costo de mano de obra	2	1	2	1	2	1	2
Factores climáticos	1	0	0	0	0	0	0
Disponibilidad y costos de terreno	2	1	2	-1	-2	1	2
Posibilidad de desprenderse de los desechos	1	0	0	-1	-1	1	1
Total			12		4		11

REFERENCIAS CAPÍTULO 2

Agencia Europea de Medicamentos. (14 de enero de 2010). Obtenido de <http://www.ema.europa.eu>

AIM, A. C. (2008). *Grupos Socioeconómicos*. Santiago (Chile).

Alonso F, N. C. (2010). Mortalidad por cardiopatía isquémica en Chile: quiénes cuántos y dónde. *Panam Salud Pública*, 319-325.

Antman EM, A. D. (2004). ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST elevation myocardial infarction. En *A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines* (págs. E1-E211).

Antmann, E. (2007). ST Elevation Myocardial Infarction: Management. En Z. D. Braunwald E, *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine* (págs. 1234-1292). Philadelphia, PA: WB Saunders Co Ltd.

Cannon, C. (2006). Evolving management of ST segment elevation myocardial infarction: Update on recent data. *Am J Cardiol*, 98.

Departamento de Estadísticas e Información de Salud. (2 de noviembre de 2010). Obtenido de <http://deis.minsal.cl/deis.indexmc.asp>

GeoSalud. (s.f.). Obtenido de http://www.geosalud.com/Enfermedades%20Cardiovasculares/infarto_miocardio_pg8.htm

Gotink KJ, V. H. (2010). Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis*, 1-14.

Instituto Nacional del Cáncer. (7 de octubre de 2011). Obtenido de <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tratamiento/inhibidores-angiogenesis>

Luceri, C. e. (2007). p-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. *British Journal of Nutrition*, 458-463.

Mainzen Prince, P. S. (2013). Preventive effects of p-coumaric acid on cardiac hypertrophy and alterations in electrocardiogram, lipids, and lipoproteins in experimentally induced myocardial infarcted rats. *Food and Chemical Toxicology*, 348-354.

- Mainzen Prince, P. S. (2013). Preventive effects of p-coumaric acid on lysosomal dysfunction and myocardial infarct size in experimentally induced myocardial infarction. *European Journal of Pharmacology*, 33-39.
- Mauro V, B. P. (2009). Infarto agudo de miocardio. Tratamiento farmacológico en los síndromes coronarios con elevación del segmento ST. *PROSAC*.
- Ministerio de Salud. (2012). *Primer Informe de Registros Poblacionales de Cáncer en Chile, Quinquenio 2003-2007*.
- Muller M, S. S. (2001). Effect of a high loading dose of clopidogrel on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Heart*, 85:92-93.
- Nazzari C, F. T. (2011). Incidencia y letalidad por infarto agudo al miocardio en Chile 2001 - 2007. *Revista médica de Chile*, 1253-1260.
- Patrono, C. (1994). Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med*, 330: 1287-1294.
- Sapag N., S. R. (1995). *Preparación y evaluación de proyectos. Tercera Edición*. Santiago de Chile.
- Schaffeld, G. (1984). Taller de Formulación y evaluación de proyectos. *Curso Latinoamericano de Biotecnología y curso internacional de Ingeniería Bioquímica*, (pág. 350). Valparaíso.
- Shih T, L. C. (2006). Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clinical Therapeutics*, 1779-1802.
- Stuardo J. Sergio, V. (2008). *Evaluación Técnico-Económica de una Microcervecería. Capítulo 2; Estudio de Mercado*. Valparaíso, Chile.
- Szot, J. (2003). La transición demográfico-epidemiológica en Chile, 1960-2001. *Esp Salud Pública*, 605-613.

CAPÍTULO 3

SÍNTESIS Y SELECCIÓN DE PROCESOS

3.1 ASPECTOS GENERALES

Las características que, por su naturaleza, tiene un proceso industrial de tipo fermentativo, hacen dividir éste de manera general, en tres etapas: Etapa previa a la fermentación o *Upstream*, Fermentación y finalmente, Recuperación o *Downstream*; cada una de las cuales se describirá de manera detallada más adelante. La subdivisión y complejidad de cada etapa tiene directa relación con la calidad y pureza deseada en el producto final. La Figura 3.1 esquematiza de manera básica las etapas de producción.



Figura 3.1: Diagrama básico de bloques

3.2 ETAPA PREVIA A LA FERMENTACIÓN (UPSTREAM)

Las etapas previas a la fermentación cuentan con una serie de operaciones cuyo objetivo principal es establecer todas las condiciones necesarias para efectuar de forma adecuada los procesos posteriores, lo que se resume en un acondicionamiento para la etapa de fermentación.

3.2.1 Elección del microorganismo

La actividad fermentativa incluye la producción del ácido p-cumárico. Como es mencionado en el capítulo 1, éste es un ác. hidroxicinámico (ác. orgánico y aromático), el cual resulta tóxico para la mayoría de los microorganismos. En consecuencia, se considerará la bacteria *Pseudomonas putida* para realizar el proyecto. *P. putida* es una bacteria metabólicamente versátil que tiene un potencial considerable para aplicaciones biotecnológicas (Jimenez et al, 2002), (Nelson et al, 2002). Entre estas ventajas se encuentra la facilidad que el microorganismo tiene para bioconversión de azúcares en componentes aromáticos, que son metabolizados a partir de

intermediarios de la ruta central de metabolitos como la L-tirosina y la L-fenilalanina. La formación de éstos está ligada directamente al crecimiento celular (Koopman, de Winde, & Ruijssenaars, 2009). Ejemplos de dichas aplicaciones son la bioconversión de glucosa en fenol (Wierckx, 2005). En particular, la *P. putida* S12 fue construida para producir eficientemente ácidos cinámicos desde glucosa y glicerol a través del metabolismo central de fenilalanina (Nijkamp, van Luijik, de Bont, & Wery, 2005). Además, la cepa posee características extraordinarias en su membrana plasmática, las cuales la hacen resistente y tolerante a solventes orgánicos como el tolueno, en el cual la viabilidad es imposible para la mayoría de los microorganismos (de Bont, 1998).

Si bien *E. coli* o *S. cerevisiae* son microorganismos metabólicamente versátiles al igual que *P. putida*, el principal motivo por el cual se eligió esta última y no las otras cepas, es debido a su capacidad de expulsar activamente una serie de compuestos por medio de una bomba de solventes orgánicos (Kieboom & de Bont, 2001) (Rojas et al, 2001). De esta manera, la bomba de *P. putida* puede exportar el producto en cuestión (ácido p-cumárico) al medio, evitando así procesos de separación que incluyan rompimiento celular.

Por otro lado, la inhibición del crecimiento celular de *P. putida* y *E. coli* en distintas concentraciones de ácido para-hidroxicinámico (pHCA) y para-hidroxiestireno (pHS) muestra claras diferencias entre una cepa y la otra. La primera muestra inhibiciones de la velocidad de crecimiento de hasta un 18% a 25g/L de aHCA, mientras que la segunda tiene una inhibición casi completa a una concentración de solo 8g/L de aHCA. Por lo tanto, está demostrado que la *P. putida* es más tolerante a ácidos para-hidroxicinámicos (USA Patente nº EP 1616017, 2008).

Mediante las Tablas 3.1 y 3.2 queda en evidencia que la *P. putida* posee mayor tolerancia al ácido para-hidroxicinámico que la *E. coli*.

Tabla 3.1 Crecimiento de cepas de *P. putida* en presencia de pHCA

Cepa	pHCA, g/L	Tiempo de duplicación, min	Velocidad de Crecimiento, %
<i>P. putida</i> NCIMB 9866	0	19	100
<i>P. putida</i> NCIMB 9866	25	105	18
<i>P. putida</i> KT2440	0	17	100
<i>P. putida</i> KT2440	25	79	21

Se puede ver en la tabla anterior dos cepas diferentes de *P. putida* S12 con dos diferentes concentraciones (0 y 25 g/L). Es claro que existe un tiempo de duplicación mucho mayor al haber una mayor concentración de pHCA. Este fenómeno se aprecia en ambas cepas, aunque se acentúa menos en la KT2440.

Tabla 3.2 Efecto de pHCA en crecimiento y fermentación de *E. coli*

pHCA, g/L	DO550 (0 h)	DO550 (17,5 h)	DO550 (29 h)	DO550 (42 h)	Tyr mg/L	Phe mg/L
0,00	~0,05	1,14	5,44	5,52	700	200
1,00	~0,05	2,41	3,57	3,48	190	155
2,00	~0,05	1,27	1,47	1,62	105	95
4,00	~0,05	0,20	1,21	1,54	65	15
8,00	~0,05	0,15	0,16	0,18	15	10
16,00	~0,05	0,19	0,21	0,14	0	5

Se puede observar en la Tabla 3.2 la disminución de la densidad óptica medida a 500nm con mayores concentraciones de pHCA. También es importante destacar que esta inhibición de crecimiento conlleva a una menor producción de tirosina y fenilalanina medidas a las 42 horas de fermentación.

Más específicamente, la cepa de *P. putida* S12 que se ocupará para la fermentación es una mutante confeccionada para evitar los problemas que obstaculizan la producción del ácido en cuestión. Estos temas críticos a la hora de optimizar la producción son: degradación del cumarato (ácido p-cumárico) por parte de la bacteria, formación de subproducto (cinamato) via fenilalanina y disponibilidad de tirosina celular limitada. La mutante resultante es denominada *P. putida* S12 C3 confeccionada por Nijkamp *et al.* (2007) y es capaz de sortear estos problemas, ya que es auxótrofa de fenilalanina y tiene un *knock out* del gen *fes*, el cual codifica para la primera enzima de la ruta que degrada el cumarato (Nijkamp, Westerhof, Ballerstedt, de Bont, & Wery, 2007).

3.2.2 Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo que se utilizará se detalla en la Tabla 3.3. Además de los compuestos señalados ahí, se agregan 20 ml de una solución de trazas. La concentración de los elementos traza del mismo medio se detallan en la Tabla 3.4. Dichas composiciones fueron las utilizadas por Nijkamp *et al.* en su trabajo de optimización con *P. putida* (2007).

Tabla 3.3 Composición medio de cultivo

Compuesto	Concentración (g/L)
Glucosa	36
(NH ₄) ₂ SO ₄	4
K ₂ HPO ₄	3,88
NaH ₂ PO ₄	1,63

Tabla 3.4: Composición de la solución de trazas

Compuesto	Concentración (g/L)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10
EDTA	1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,02
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,02
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,04
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,1

Este medio de cultivo es complementado con una alimentación de fenilalanina óptima para obtener crecimiento y producción de cumarato. En el momento en que se consume la glucosa disuelta inicial, se detiene la alimentación de la fenilalanina y comienza la segunda etapa. Esto provoca una fermentación dividida en dos fases que luego serán descritas en el capítulo 3.3.1.

3.2.3 Preparación del inóculo

El punto de partida de toda fermentación es la preparación del inóculo. El procedimiento para preparar el inóculo incluye tres etapas; la recuperación de la cepa, el crecimiento del microorganismo en un medio de cultivo sólido y el crecimiento en un medio de cultivo líquido (Hernández, 2003). Es importante esterilizar previamente todo el material con el cual se va a inocular para evitar problemas de contaminación que puedan ocasionar problemas en las siguientes etapas.

El inóculo inicial para el caso de la fermentación de *P. putida* S12 C3 es de 50mL de una fermentación realizada durante la noche crecido en MMG con 100 mg L^{-1} de L-fenilalanina. Cabe decir, que MMG es un medio Luria-Bertoni (LB) y sales minerales fosfato-tamponadas; (Nijkamp et al., 2007). Con este inóculo se iniciará la fermentación de un lote en un fermentador de 1 litros. Luego se procederá a utilizar la fermentación previa como inóculo para el siguiente fermentador. Así, sucesivamente hasta llegar a los fermentadores de 10m^3 donde se procederá con el proceso por lote alimentado.

3.3 FERMENTACIÓN

La fermentación tiene por objetivo proporcionar al microorganismo las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. Por lo tanto el comportamiento cinético de una población se verá determinado por un conjunto de factores genéticos y ambientales, entre estos últimos destacan las condiciones de operación y modalidad de cultivo.

3.3.1 Modalidad de cultivo

Para este estudio se propone utilizar cultivo por lote alimentado (CLA), principalmente por las desventajas que tienen las otras modalidades de cultivo. En primer lugar, se rechaza la opción de realizar el proceso mediante cultivo continuo, principalmente porque no se aprovecha por completo el sustrato y además tiene una alta probabilidad de contaminación y mutación, lo que significa que para el proceso de producir un metabolito mediante una cepa mutada, no es recomendado. En segundo lugar se rechaza la opción de realizar el proceso mediante cultivo por lote, debido a que una vez acabado el nutriente limitante, hay un cese en el crecimiento celular, y para este caso lo que se necesita es precisamente aumentar la población celular.

El cultivo por lote alimentado (CLA), básicamente es una operación discontinua, durante la cual los nutrientes o parte de ellos ingresan al fermentador por una corriente de alimentación, y que al no existir una descarga provoca una continua variación del volumen de fermentación. Las condiciones iniciales de un cultivo por lote alimentado se logran a través de una etapa previa obligatoria de cultivo por lote. Una vez alcanzadas estas condiciones se inicia la alimentación, lo que marca el comienzo del CLA (Acevedo et al., 2002).

Este tipo de cultivo es útil de emplear cuando se necesita controlar la velocidad específica de crecimiento del microorganismo. Esto se logra mediante la corriente de alimentación, controlando así la disponibilidad de nutriente limitante en el fermentador, siendo una clara ventaja por sobre el cultivo tradicional por lotes. Esta flexibilidad del CLA permite su aplicación en la producción tanto de metabolitos secundarios como primarios, estos últimos sintetizados por mutantes sobre-productores sujetos a auxotrofías (Acevedo et al., 2002).

Los tipos de procesos en los cuales el CLA es efectivo se pueden resumir en los siguientes casos: inhibición por sustrato, alta concentración celular, mutantes auxotróficas y represión catabólica. Este último caso ocurre cuando un microorganismo está en presencia de una fuente de carbono que se pueda metabolizar rápidamente como la glucosa. Esto genera una alta concentración intracelular de ATP lo que lleva a la represión de la biosíntesis de enzimas, lo cual genera una lenta metabolización de la fuente de energía. Muchas enzimas, especialmente las involucradas en las vías catabólicas, están ligadas a esta regulación represiva.

Como se mencionó anteriormente, el microorganismo utilizado en la fermentación para la producción de p-cumarato es un mutante con auxotrofia de L-fenilalanina y tiene un *knock out* del

gen que codifica para la primera enzima de la ruta que degrada el cumarato. Se construyó especialmente una bacteria en la cual la síntesis de novo de L-fenilalanina fuese eliminada. Con este alcance se lograron mejorar tres aspectos: (1) se elimina la formación de cinamato a partir de L-fenilalanina, (2) se interrumpe el flujo de carbono hacia la L-fenilalanina, permitiendo que una mayor porción de éste se dirija hacia la L-tirosina y p-cumarato, y (3) el crecimiento de biomasa y la formación de producto pueden ser controladas aplicando un régimen de alimentación de L-fenilalanina específico (Nijkamp *et al*, 2007).

Las ventajas del cultivo por lote alimentado son la simpleza en su equipo y operación del sistema al igual en cultivo por lotes, además de que se puede tener un cierto control sobre la velocidad específica de crecimiento del microorganismo.

La alimentación se puede realizar de dos diferentes maneras:

CLA con velocidad de alimentación exponencial: La velocidad específica de crecimiento permanece constante durante todo el CLA. Para realizar esto, se debe imponer que durante todo el CLA la concentración de sustrato limitante en el fermentador sea constante. A partir de esto, se deduce que para lograr una velocidad específica constante, la alimentación debe ser del tipo exponencial.

CLA con velocidad de alimentación constante: el CLA se divide en dos zonas, de acuerdo al tipo de crecimiento que experimenta la masa celular. Una zona de crecimiento exponencial de la masa celular en donde la concentración de sustrato es mucho mayor que el K_s , y una zona de crecimiento limitado de la masa celular en donde la concentración de sustrato en el medio de cultivo disminuye como consecuencia de que la demanda máxima ha sobrepasado la oferta del nutriente limitante de la etapa anterior.

En el caso del cultivo para la producción de p-cumarato, en la etapa de cultivo por lote (fase I) se alimentará L-fenilalanina con una velocidad óptima, de manera que se produzca aumento de biomasa junto con producción de p-cumarato. Sin embargo, se pondrá énfasis en el crecimiento y concentración de la población bacteriana. Esta primera etapa finaliza al acabarse el sustrato limitante, que en este caso es la glucosa; además se corta el suministro de L-fenilalanina, ya que solo se necesita para el crecimiento celular y en la fase II no se desea ese aminoácido. La *P. putida* S12 C3 es Phe⁻, por ende en la etapa II se aprovecha esta auxotrofia para que todo el flujo sea dirigido hacia la producción de L-tirosina y posterior p-cumarato. En la etapa II se tendrá una

alimentación constante de glucosa para la mantención, crecimiento y producción de metabolitos (en especial p-cumarato).

Por lo tanto, como lo que se necesita en este proyecto es aumentar la población celular (fase I) para luego sólo producir el metabolito (fase II) y se tiene un caso de auxotrofia por mutación, se trabajará con cultivo por lote alimentado con velocidad de alimentación constante cuyos flujos de alimentación se detallarán en el capítulo de balance de masa.

3.3.2 Condiciones de operación

Dentro de las condiciones de operación se encuentran; la composición del medio, temperatura, pH, aireación y agitación. Estas condiciones toman un protagonismo si se habla de la velocidad específica de crecimiento (μ), ya que depende tanto del microorganismo como de las condiciones ambientales que tendrá el cultivo. Como se ha mencionado anteriormente, *Pseudomonas putida* S12 C3 es un microorganismo versátil y tolerante utilizado en diversos estudios biotecnológicos.

Dentro de las condiciones de operación, este organismo tiene una temperatura de crecimiento óptima alrededor de 30 [°C], además de trabajar a pH 7 que se mantendrá con adición de KOH y HCl.

Por otro lado, los flujos de alimentación variarán según la fase en la que se encuentre el cultivo. En la primera etapa se alimentará L-fenilalanina para que se pueda efectuar un buen crecimiento celular y la segunda etapa no habrá suministro del aminoácido, sino que de glucosa para las necesidades básicas de las bacterias.

La oxigenación del proceso de fermentación es de crítica importancia para una óptima producción y funcionamiento de la bacteria utilizada. Es sabido, que la *P. putida* es un microorganismo aerobio estricto y por ende, la disponibilidad de oxígeno que se pueda hallar en el caldo es vital para obtener un buen rendimiento metabólico y de esta manera, esperar una buena producción específica de ácido p-cumárico.

En los cultivos de *Pseudomonas putida* el oxígeno disuelto es prácticamente cero después de poco tiempo empezada la fermentación (Gomez, 2006). Por esta razón, la adición de oxígeno puro a la

alimentación de gas del fermentador es esencial para obtener un aire con mayor capacidad de oxigenación, favorecer el proceso metabólico del cultivo y mantener la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en las condiciones que se establecen en el capítulo de balance de masa.

El flujo de aireación durante el cultivo variará de acuerdo a la demanda de oxígeno que se tenga a medida que la concentración celular aumente, con el fin de mantener la TOD en su valor de set point.

3.3.3 Información obtenida de laboratorio

Los cálculos y estimaciones realizadas en este trabajo tienen como partida la información obtenida en los estudios de Nijkamp *et al* en 2007. El estudio realizado en laboratorio es considerado el inicio de la fermentación (o fermentación número 1) y, a partir de ésta, se escalará hasta llegar a una fermentación industrial. Por lo tanto, la primera fermentación se realiza en un fermentador de 1 [L] utilizando controlador BioFlo110. La fermentación por lotes se inició con un inóculo de 50 [ml] de un cultivo de mínima glucosa + 100 [mg/L] de L-fenilalanina (Nijkamp *et al*, 2007). El medio de cultivo utilizado es el mencionado en el punto 3.2.2 y la modalidad de cultivo es la descrita en el punto 3.3.1. En cuanto a condiciones de operación, la agitación se mantuvo a 200 [rpm] y el aire se suministró a 1 [L/min]. La TOD (Tensión de Oxígeno Disuelto) se mantuvo a 15% de aire saturado mediante ajuste automático de la velocidad de agitación y mezcla con oxígeno puro (Nijkamp *et al*, 2007).

Los resultados de la fermentación por lote alimentado bajo las condiciones antes descritas arrojaron los resultados que se presentan en la Figura 3.2.

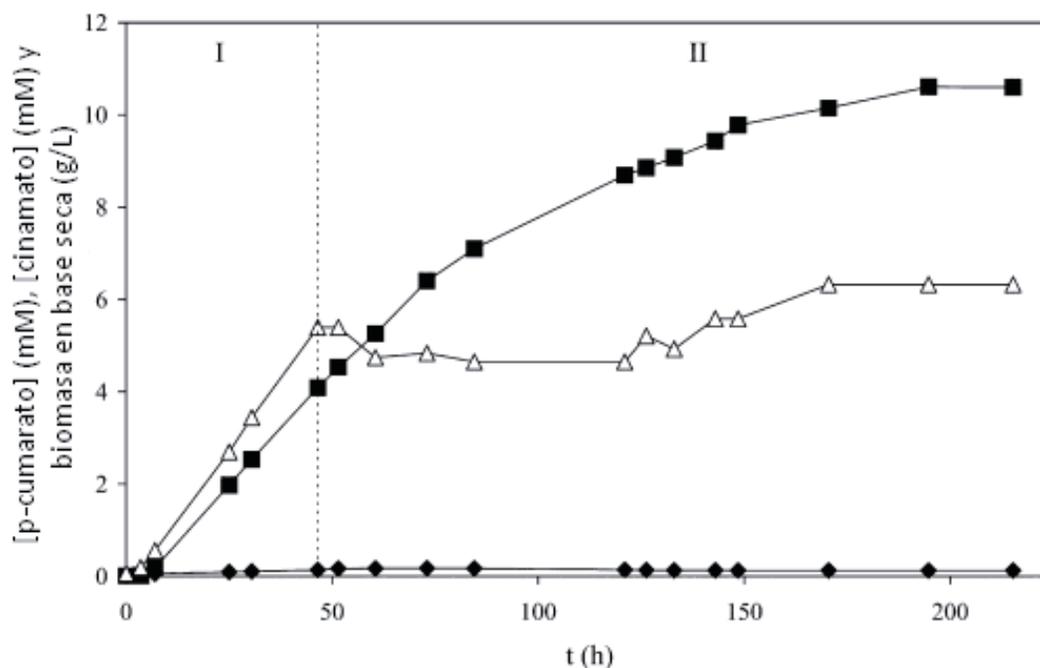


Figura 3.2: Producción de p-cumarato (cuadrados), cinamato (rombos) y biomasa (triángulos) en cultivo lote alimentado con limitación de L-fenilalanina por *P.putida* S12 C3.

La figura 3.2 se describe previamente en el capítulo 3.3.1 de modalidad de cultivo. Los datos obtenidos a partir de este gráfico son esenciales para la modelación del proceso a gran escala. Estos parámetros son la duración, la biomasa final y el p-cumarato final de las fases I y II mostradas en la figura. En la tabla 3.5 se detallan los valores encontrados en la figura 3.2.

Tabla 3.5 Información obtenida de figura 3.2

Parámetro	Fase I	Fase II
Duración [h]	47	124
Biomasa final [g/L]	5,3	6,1
p-cumarato final [g/L]	0,67	1,67

3.3.4 Escalamiento

Para alcanzar la producción anual propuesta, se deben realizar fermentaciones de gran volumen (mayor a 5 m³), por lo que se requieren fermentaciones previas hasta alcanzar la biomasa necesaria para inocular el último fermentador. El criterio para calcular el número de fermentaciones previas fue tomar entre un 5 y 10% de la concentración final de biomasa esperada en el biorreactor previo. Los biorreactores de las fermentaciones previas son más pequeños y por ende no necesitan el mismo porcentaje de inóculo que el biorreactor más grande. Se calculan cuatro fermentaciones previas. La primera se realiza como se especifica en la sección 3.3.3; la segunda se inocula con un 5% de la concentración de biomasa final; la tercera con un 5%, la cuarta con un 7% y la quinta y final con un 10%. Las fermentaciones previas tendrán como único objetivo el aumento de biomasa, por lo que su modalidad de cultivo será por lotes y sólo la fermentación final tendrá la modalidad de lote alimentado como se describió anteriormente.

3.4 RECUPERACIÓN (DOWNSTREAM)

En general, el proceso de recuperación en cualquier proceso es parte relevante, debido a que depende mucho de la operación que se utilice para separar y purificar, de los costos de operación y calidad del producto en cuestión. Los procesos industriales en donde se producen grandes cantidades de volúmenes, están asociados generalmente a altos rendimientos y a niveles de pureza menores, pues la posterior utilización del producto no necesita de esta última en demasía a diferencia de productos asociados a la industria farmacéutica, biomedicina y análisis donde la pureza de éste y su costo están directamente relacionados.

Una vez que fue llevado a cabo el proceso de fermentación se debe proseguir con la recuperación del ácido p-cumárico, el cual se encuentra en el caldo de fermentación debido a que la bacteria la expulsó hacia el medio de cultivo.

3.4.1 Separación de células

Para separar las células, se tienen distintas opciones de separación sólido-líquido: filtro rotatorio a vacío, centrifugación o separación por membrana (ultrafiltración o microfiltración).

Los filtros rotatorios a vacío son comúnmente utilizados para remover micelios filamentosos, bacterias y escombros celulares del caldo de cultivo. La separación se logra utilizando la capacidad de filtración de un queque poroso de ayuda filtrante aplicado previamente al filtro, llamado precapa de filtración. Su uso ha disminuido en el tiempo debido a las siguientes razones: el costo de la precapa, el desarrollo de centrifugas decantadoras redujo las oportunidades de venta, la eficiencia de separación de bacterias puede lograrse también en piloto y gran escala mediante sistemas de separación de membrana de flujo cruzado, entre otras (Asenjo, 1990).

Dentro de la filtración, existen varios procesos que emplean una membrana para lograr la separación dada, pudiéndose caracterizar en base a la fuerza impulsora del proceso, del tipo de membrana que emplean, el rango de tamaño de partícula que retienen las membranas, el gradiente de presión, concentración, etc. Como se dijo anteriormente, dentro de las operaciones utilizadas para la separación sólido-líquido encuentra la Ultrafiltración. Su mayor uso es la separación de células, remoción de impurezas, y concentración del producto, que en el caso de los productos lábiles ofrece una baja temperatura, y procesos sin cambio de fase. Sus mayores desventajas son la vida de la membrana y la necesidad de limpiarla regularmente para remover impurezas.

La centrifugación se basa en el principio de sedimentación de partículas de distinta densidad por efecto de la fuerza centrífuga que se incrementa con las altas velocidades de rotación. Es una de las principales operaciones utilizada para la separación de células de caldos biológicos especialmente cuando los caldos no son fácilmente filtrables. Las ventajas de la centrifugación comparada con los filtros rotatorios a vacío y los sistemas de membrana son las siguientes:

- Tiempos de residencia cortos
- Pequeña área
- Buena capacidad de drenaje
- Separa casi todo el material celular
- Bajos costos de operación
- Posibilidad de operar de manera continua
- Existen algunas multifuncionales (separación líq./líq./sólido)

Sin embargo, existen algunas desventajas como el hecho de que son aparatos mecánicamente complejos, alto costo de capital para la separación, y el hecho de que no se puede lograr una separación del 100% (Asenjo, 1990).

En los equipos de sedimentación centrífuga también llamados de tazón sólido, la suspensión se alimenta a un tazón que se hace girar provocando que los sólidos se colecten sobre una pared y el sobrenadante se recupere por rebosamiento o por acción de un colector de líquido. En relación a la forma de descargarlos sólidos las centrífugas sedimentadoras pueden operar en forma intermitente, semintermitente o continua (Tejeda, Armando, Montesinos, Rosa, & Guzmán, Roberto, 1995).

Las centrífugas tubulares consisten básicamente de un tubo vertical esbelto que gira a altas velocidades por la acción de un motor eléctrico, o una turbina de aire o vapor, ver Figura 3.3. Este tipo de centrífugas es uno de los más eficientes y sencillos, capaz de separar partículas hasta de $0,1 \mu\text{m}$. Conforme se forma la torta el área de flujo se reduce y el tiempo de residencia del líquido disminuye, Esto se traduce en un aumento gradual del contenido de sólidos en el sobrenadante que puede ser determinado por mediciones de turbidez. La torta tiene que ser descargada manualmente por lo que su operación es intermitente. Los modelos industriales típicos cuentan con capacidad entre 500 y 3500 [l/h] y la capacidad de sólidos es de 2 a 4 kg por lote (Tejeda, Armando, Montesinos, Rosa, & Guzmán, Roberto, 1995).

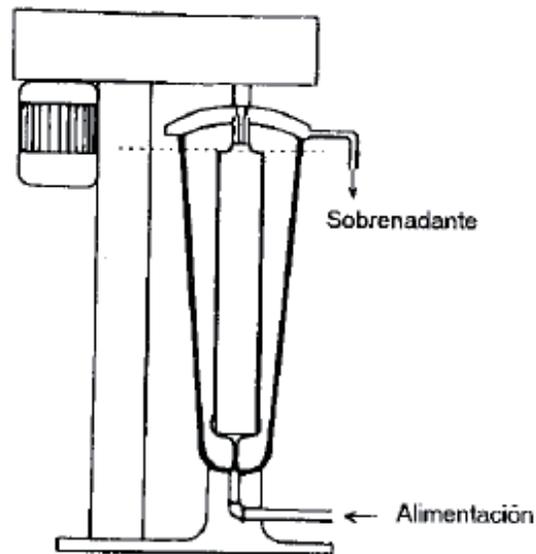


Figura 3.3 Centrífuga tubular

La centrífuga de discos consta de un eje vertical sobre el cual se montan un conjunto de discos en forma de conos truncados, uno sobre otro. El rotor de la centrífuga provoca el giro tanto de los discos como del tazón de la centrífuga, ver Figura 3.4. Entre la pila de discos y el tazón sólido existe un espacio que permite la acumulación de los sólidos. Existen diferentes centrífugas de discos en relación a la forma de descarga de sólidos: las de operación intermitente, también llamadas de retención de sólidos; las de tazón abierto de descarga intermitente de sólidos, las de válvula boquilla de descarga intermitente de sólidos y las de boquilla para la descarga continua. La Tabla 3.6 presenta algunas características de las distintas centrífugas de discos.

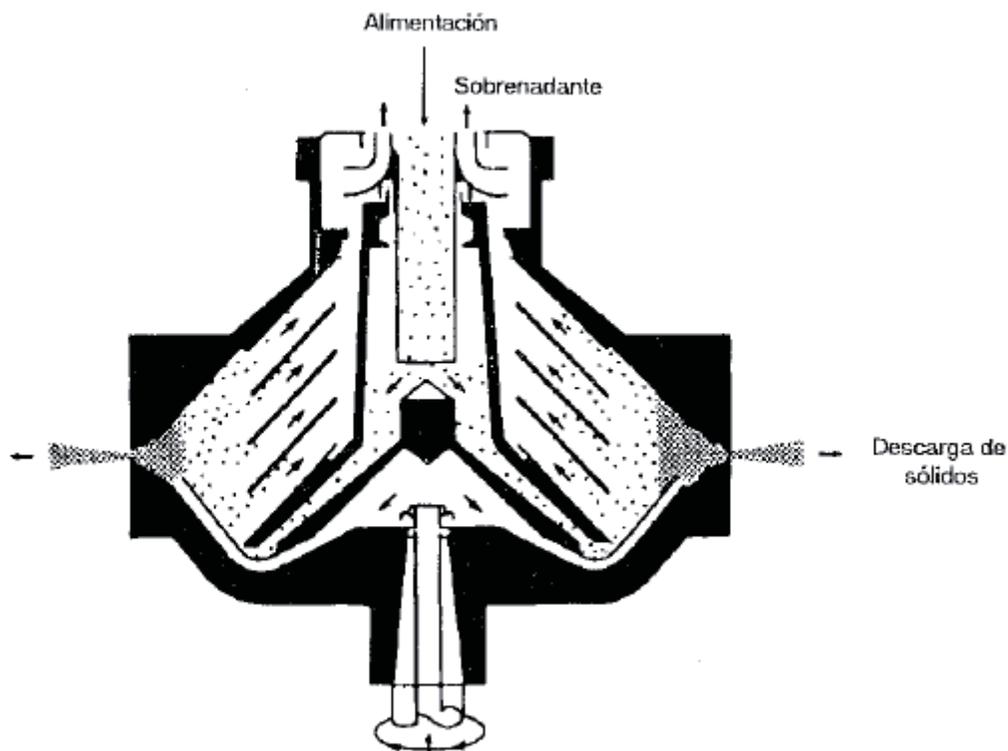


Figura 3.4 Centrífuga de discos de tazón abierto

Tabla 3.6 Centrífugas de discos según forma de descarga

Tipo de centrífuga de discos	Forma de descarga	Volumen de sólidos recomendable	Fuerza centrífuga	Flujo L/min
Retención de sólidos	Intermitente / manual	1%	5000 a 8000 G	0,4 a 1500
Tazón abierto	Intermitente / Sist. Hidráulico	Hasta 10%	5000 a 7000 G	3,8 a 1500
Válvula boquilla	Intermitente / válvula	Hasta 10%	Hasta 15000 G	
Boquilla	Continua	Soluciones más concentradas		

Considerando como factor importante en la elección de la centrífuga el flujo que puede operar, se optará por una centrífuga de discos, cuyo flujo de operación es mayor al de una centrífuga tubular.

Dentro de las centrifugas de discos, se descarta la centrifuga con retención de sólidos porque puede separar solamente caldos muy diluidos. Tampoco se trata de una solución muy concentrada, por lo que no se justifica el uso de una centrifuga de boquilla y descarga continua. La elección entre una centrifuga de válvula boquilla o una centrifuga tazón abierto se detallará posteriormente, cuando se diseñe el equipo.

3.4.2 Purificación

Luego de eliminar las células por centrifugación, el permeado que contiene el ácido p-cumárico debe pasar por una (o más etapas) de purificación. Esto dependerá principalmente del grado de purificación y de la concentración del producto que se logre en cada proceso.

Debido a que se está trabajando con grandes volúmenes de producción y la concentración del ácido p-cumárico es baja (1,7 g/L), se ha escogido como primer paso de purificación una extracción por surfactante en el punto nube (Cloud-Point Extraction, CPE). La CPE es un método que utiliza polímeros termoseparables capaces de formar dos fases (una fase rica en surfactante y una fase acuosa). Esto se logra al aumentar la temperatura por sobre la temperatura del punto nube, o al aumentar la concentración del surfactante por sobre la concentración micelar crítica (CMC) y luego centrifugar. Los surfactantes son moléculas anfífilas y son capaces de formar micelas. Dicha habilidad de solubilizar y extraer el soluto en estas micelas o microemulsiones es utilizada para separar específicos solutos (Dhamole, Demanna, & Desai, 2014).

Existen diversas situaciones en las que soluciones surfactantes logran equilibrio separándose de una fase acuosa. El ejemplo más conocido es la separación de una fase micelar no-iónica por sobre la temperatura del punto nube de soluciones de polioxietilenos. Una característica única de las soluciones acuosas y surfactantes no-iónicos es que, cuando la temperatura se eleva, la solución se vuelve turbia en un estrecho rango de temperatura, lo que se conoce como punto nube (cloud point). Por sobre el punto nube, el sistema se separa en dos fases isotrópicas. Las fases consisten en una fase diluida casi libre de micelas donde la concentración del surfactante es igual a su CMC a aquella temperatura y la fase rica en surfactante aparece solo al superar dicho punto. La separación es reversible y al enfriar, ambas fases forman nuevamente una solución cristalina (Hinze & Pramauro, 1993).

La Figura 3.5 representa los pasos involucrados en la aplicación de un proceso de extracción en dos fases mediado por surfactantes (o Cloud-Point Extraction, CPE). Primero, el surfactante se añade a la solución acuosa que contiene el componente a extraer o concentrar. La cantidad de surfactante debe ser la necesaria para formar micelas, es decir, debe ser igual o superior a la CMC. Luego, las condiciones se alteran (altas o bajas de temperatura, adición de sal u otro surfactante) para asegurar que la solución micelar se separe en la fase rica en surfactante y en la fase acuosa diluida. Si se requiere, se puede utilizar centrifugación para acelerar el proceso de separación de ambas fases (Hinze & Pramauro, 1993). Para acelerar el proceso de formación y separación de ambas fases se utilizará una centrifuga tubular diseñada para separaciones líquido-líquido.

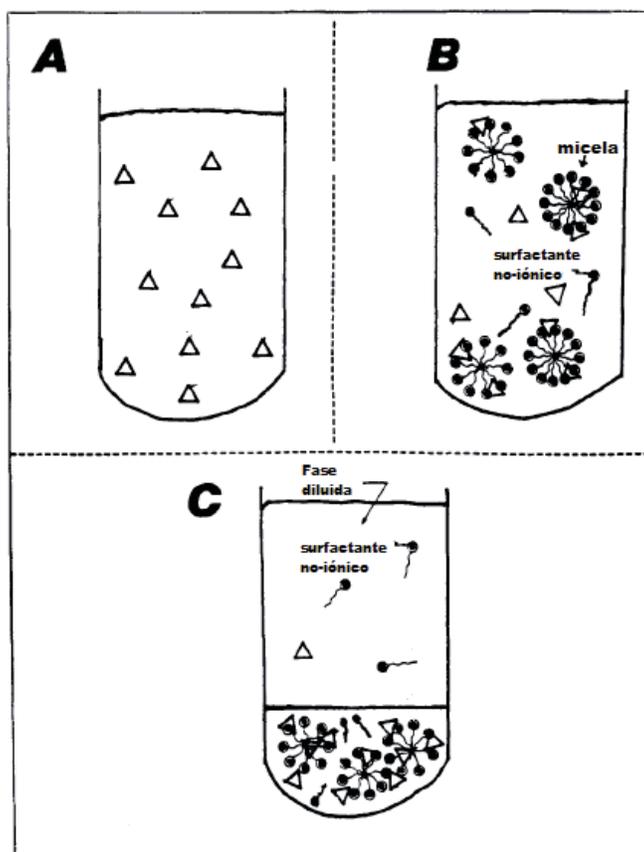


Figura 3.5 Representación esquemática del método de extracción por surfactante

La extracción por surfactante tiene varias ventajas, tales como un alto coeficiente de partición, alto factor de enriquecimiento, biocompatibilidad y una significativa reducción del volumen del proceso (Dhamole, Wang, Liu, Wang, & Feng, 2012), siendo este último punto uno de los más

importantes al optar por este método y no por otro, como la extracción por solvente. La extracción por solvente sufre muchas veces de un problema de toxicidad intrínseco (Zausten, Vaz-Rossell, Maugeri-Filho, & Straathof, 2008) y el volumen del proceso se mantiene igual o incluso puede aumentar en algunos casos, dependiendo de la relación del disolvente a la fase acuosa (Dhamole, Demanna, & Desai, 2014).

Dhamole et al. (2014) realizaron estudios acerca de la extracción de ácido p-cumárico y ácido ferúlico utilizando la extracción por surfactante. Para ello, se evaluó el porcentaje de extracción de 4 surfactantes (Triton X-100, Triton X45, Triton X114 y Pluronic L92) a diversas concentraciones para encontrar una condición óptima de extracción. El surfactante que entregó mejores resultados fue Pluronic L92 y se consideró como óptima una concentración del 5%, ya que a mayor concentración el aumento de extracción no era considerable. La Tabla 3.7 resume los datos de separación de p-cumárico de una fase acuosa en un sistema modelo, donde queda demostrado que Pluronic L92 entrega el más alto factor de enriquecimiento (FE), el mejor coeficiente de partición, además de una alta razón de reducción de volumen (RRV).

Tabla 3.7 Separación de ácido p-cumárico de una fase acuosa en un sistema modelo (volumen inicial $V_0=10,5$ mL; concentración inicial pCA $C_0^{pCA}=0,2$ g/L; concentración del surfactante=5% v/v)

Surfactante	Concentración de pCA en fase rica en surfactante (C_s^{pCA}), g/L	Concentración de pCA en fase acuosa (C_a^{pCA}), g/L	FE (C_s^{pCA}/C_0^{pCA})	Volumen de fase rica en surfactante (V_s), mL	RRV (V_0/V_s)	Coef. Partición (C_s^{pCA}/C_a^{pCA})
Triton X-100	1,1	0,105	5,5	0,9	12	10,5
Triton X-45	1,75	0,079	8,75	0,7	15	22,2
Triton X-114	1,73	0,064	8,7	0,8	13	27,0
Pluronic L92	2,05	0,037	10,3	0,8	13	55,4

Pluronic L92 es un surfactante de copolímeros en bloque terminado en grupos hidroxilos primarios. Es un surfactante no-iónico que es 100% activo y relativamente no tóxico. Pluronic son copolímeros en bloque basados en óxido de etileno y óxido de propileno. Pueden funcionar como

agentes antiespumantes, agentes humectantes, dispersantes, surfactantes, entre otros. La nomenclatura de los Pluronic empieza con una letra que define su forma física a temperatura ambiente (L= líquido, P = pasta, F = escamas (sólido)) seguido de dos o tres dígitos. El primer dígito multiplicado por 300 (o los dos primeros en el caso de un número de tres dígitos) indica un peso molecular aproximado de la zona hidrofóbica, mientras que el último dígito por 10 entrega el porcentaje del contenido de polioxietileno.

Luego de realizar una separación por surfactante o CPE, se necesita remover el surfactante del producto para continuar con la. Probablemente el método más sencillo y común para remover el surfactante del producto en cuestión es la diálisis (Furth, 1980). Es un método simple y efectivo para aquellos surfactantes que tienen un alto valor de CMC (> 1 mM). Sin embargo, la diálisis sólo se puede utilizar para surfactantes zwitteriónicos, pero no para surfactantes no-iónicos debido a los bajos valores de CMC. La alternativa más útil para la remoción de los surfactantes no-iónicos es mediante soportes cromatográficos (Neugebauer, 1988). Tomando en cuenta lo anterior, y considerando los métodos de purificación utilizados en el caso de extracción de p-cumárico por hidrólisis alcalina (Ou, Luo, & Huang, 2009), se optará por una cromatografía de intercambio aniónico.

Este método aprovecha las diferencias de carga entre las micelas producto-surfactante y las micelas libres de producto. Al utilizar surfactantes no-iónicos, se pueden elegir las condiciones para que las micelas que contengan producto sean adsorbidas en la resina de intercambio iónico y el surfactante libre pase a través de la resina. El producto adsorbido es luego lavado con un buffer y puede ser eluido cambiando la fuerza iónica o el pH (Bhairi & Mohan, 1999).

Considerando que los sistemas biológicos son acuosos por naturaleza y ampliamente influenciados por interacciones iónicas, tiene total sentido que el intercambio iónico juegue un rol clave en los procesos de downstream en la biotecnología. Prácticamente cualquier producto de fermentación puede ser concentrado o purificado utilizando intercambio iónico. No sólo puede separar compuestos no iónicos de compuestos iónicos, si no también materiales iónicos entre ellos y mezclas no iónicas. (Asenjo, 1990)

Es importante destacar que los estudios de producción de ácido p-cumárico sólo se han realizado a nivel de laboratorio, sin embargo, la cromatografía de intercambio iónico ha sido utilizada desde 1930 en productos bioquímicos y de fermentación como adenosin trifosfato, alcoholes, alcaloides,

aminoácidos, hormonas, penicilina y vitamina B12. Las cromatografías de intercambio iónico se escalan manteniendo el flujo y la profundidad del lecho constante y aumentando el diámetro de la columna para que coincida con el nuevo rendimiento. La resolución puede permanecer constante si aumentan las velocidades de elución (Berglof & Cooney, 1983). Después de la fermentación, la separación por intercambio iónico puede ser usada para aislar, purificar o concentrar el producto deseado.

3.4.3 Concentración/Secado

El secado es el último paso en la recuperación de ciertos productos biotecnológicos. Consiste básicamente en la reducción del contenido de solvente del producto por medio de una evaporación o una sublimación. Tiene como propósito estabilizar el producto, preservar su actividad, reducir su volumen o recuperar el solvente (Tejeda, Armando, Montesinos, Rosa, & Guzmán, Roberto, 1995).

Dado que el producto aún se encuentra muy diluido, se optará por eliminar gran parte del solvente mediante un evaporador, para luego eliminar la totalidad del solvente en un secador. Debido a que al final del proceso los volúmenes no son muy grandes, se optará por un evaporador rotatorio o un evaporador a escala piloto y así poder recuperar parte del solvente por condensación. No se justifica la inversión de un evaporador industrial para los requerimientos del proceso. Luego de concentrar el producto, se procederá a secarlo.

El método de secado que debe ser utilizado en un bioproceso depende del tipo de producto, sus propiedades físicas, su tolerancia a la temperatura y los requerimientos de proceso en cuanto a la forma de operación ya sea intermitente o continua. Los métodos de secado se pueden clasificar de acuerdo a la forma de transferir calor y eliminar el solvente en dos tipos: método adiabático y método no adiabático.

El método adiabático consiste en adicionar calor por medio de aire caliente. Los equipos que operan de acuerdo a este método son los secadores por aspersión y los secadores flash o de tipo instantáneo. Son utilizados para secar partículas que no toleran altas temperaturas como proteínas unicelulares y enzimas.

En el secado no adiabático el calor se proporciona en forma indirecta por conducción a través de una pared metálica. Generalmente los secadores no adiabáticos operan a presión reducida y se emplean para el secado de cristales y precipitados, donde las temperaturas de secado deben ser menores a 60°C (Tejeda, Armando, Montesinos, Rosa, & Guzmán, Roberto, 1995). Los secadores no adiabáticos requieren un sistema de calentamiento y generalmente trabajan con sistemas de vacío. Los principales secadores no adiabáticos utilizados en biotecnología son: el tipo charola (o bandeja), el de doble cono, el tambor rotatorio y el liofilizador (De Vivo, 1983).

A pesar de que el ácido p-cumárico no es un producto termolábil que vaya a perder actividad con el aumento de la temperatura, se optará por el método adiabático. Esto se debe a que es posible secar soluciones o suspensiones de sólidos.

Los secadores por aspersion son utilizados para secar soluciones o suspensiones de sólidos, rociando éstas en un recipiente a través del cual se hace pasar una corriente de aire caliente. Uno de los componentes claves del secador spray es el atomizador que permite formar pequeñas gotitas de la mezcla, incrementando notablemente el área de secado, de tal manera que el tiempo del secado sea menor que el tiempo que dura la gota en alcanzar la pared del recipiente. La Figura 3.6 ilustra un secador en spray, señalando la entrada de alimentación y la válvula de descarga, además del calentador y el ciclón. Considerando la producción anual (1 ton/año) y las características del producto, se optará por este tipo de secador en tamaño piloto para obtener finalmente ácido p-cumárico en polvo.

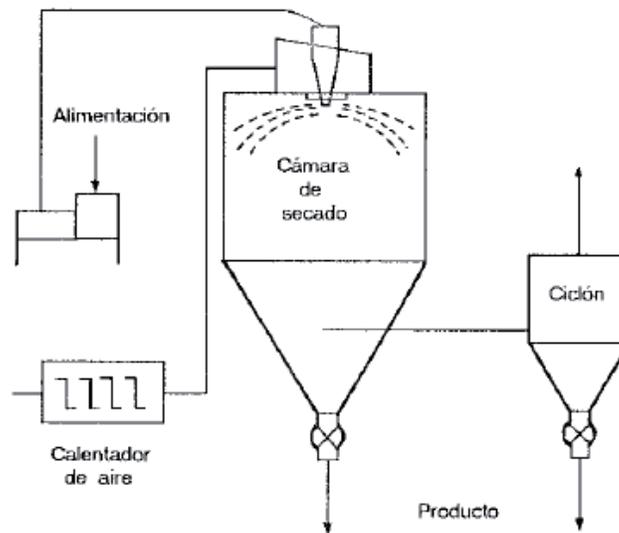


Figura 3.6: Secador en spray

3.5 ESTERILIZACIÓN

La esterilización es un proceso de mucha importancia para las fermentaciones, debido a que es el proceso a través del cual se remueven todas las formas de vida mediante algún mecanismo específico. Los contaminantes biológicos deben ser eliminados, ya que podrían causar distintas alteraciones como el consumo de los nutrientes, disminuyendo el rendimiento; la producción de sustancias inhibitorias al proceso o perjudiciales a la separación del producto o la formación de compuestos que pueden descomponer el producto final (Acevedo *et al.*, 2002).

En este caso, se utilizarán dos mecanismos de esterilización. El primero será a mediante calor húmedo y se ocupará para los fermentadores y el medio de cultivo. El segundo, corresponde a un mecanismo de remoción por filtración y se utilizará, debido a que se requiere esterilizar disoluciones con sustancias termolábiles, las cuales se verían afectadas con un mecanismo que involucre temperaturas altas.

Luego de la esterilización, todo el proceso debe ser realizado en condiciones asépticas.

3.5.1 Esterilización de Bioreactores y medio de cultivo

Este sistema consiste en eliminación de contaminantes mediante la acción de calor húmedo. El empleo requiere de una presión mayor a la atmosférica, de manera que la temperatura se eleve por sobre los 100 [°C]. Así, los tiempos para alcanzar condiciones de asepsia son menores.

La modalidad de esterilización será discontinua. Cada fermentador se someterá a una esterilización por calor húmedo, es decir se les inyectará vapor saturado, que estará en contacto directo con el acero, logrando así las condiciones adecuadas para la eliminación correspondiente de posibles contaminantes en el bioreactor y sus cañerías.

El proceso consta de tres etapas. Primero se llena el fermentador con vapor saturado hasta alcanzar la presión manométrica y temperatura de esterilización de 1 [atm] y 121 [°C]. Luego, se produce la esterilización del fermentador por mantención de la temperatura de pared a 121[°C]. Finalmente, se abren las válvulas de venteo para llevar a cabo la esterilización de cañerías, además del vaciado del fermentador y enfriamiento.

Para la esterilización del medio de cultivo, se hará circular vapor a través del serpentín del bioreactor con el medio en su interior, de manera que se alcancen las condiciones mencionadas anteriormmete para eliminar las posibles contaminaciones. Esta operación también será discontinua y previa a cada proceso de fermentación.

Las disolución de L-fenilalanina será adicionada una vez esterilizada por microfiltración, ya que es una sustancia termosensible.

3.5.2 Esterilización por filtración

Este tipo de esterilización se ocupará para esterilizar la disolución de L-fenilalanina, ya que este es un aminoácido (termosensible). Se utilizará un microfiltro para asegurar la retención de los microorganismos. Se puede observar en bibliografía que los filtros usados para esterilizar medios y otras disoluciones tienen un tamaño de poro de 0,22 [µm], los cuales son capaces de retener todos los microorganismos presentes (teniendo como parámetro a *Pseudomonas diminuta*, que es una de las bacterias conocidas más pequeñas).

3.6 DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

La mayor cantidad de residuos producidos se genera a raíz de la fermentación. Debido a que el producto es extracelular, todo el resto de los sólidos no se ocuparán en las etapas posteriores a la centrifugación. Los desechos de la centrifugación son principalmente células que quedan retenidas en el pellet. Por otro lado, el sobrenadante se sigue procesando en las etapas de downstream, de manera que se pueda concentrar y purificar el ácido *p*-cumárico.

El pellet obtenido por cada lote de producción se desprende de una de las salidas de la centrífuga de discos luego de las fermentaciones principales y es una pasta celular concentrada. Es decir, contiene un contenido de células y agua (medio de cultivo agotado).

Este residuo orgánico es secado mediante bandejas por exposición al medio ambiente y al sol. Una vez que está seco se puede disponer de éste para que sea llevado a un relleno sanitario.

3.7 DIAGRAMA DE FLUJOS

La figura 3.7 presenta el diagrama de flujo del proceso de producción de ácido *p*-cumárico por fermentación. Cabe destacar que las distintas corrientes que ingresan a los fermentadores no ingresan todas simultáneamente. En el caso de los últimos fermentadores (F5), la alimentación de la glucosa empieza cuando se corta la alimentación de L-fenilalanina. En ANEXOS se encuentra una versión de mayor tamaño del diagrama.

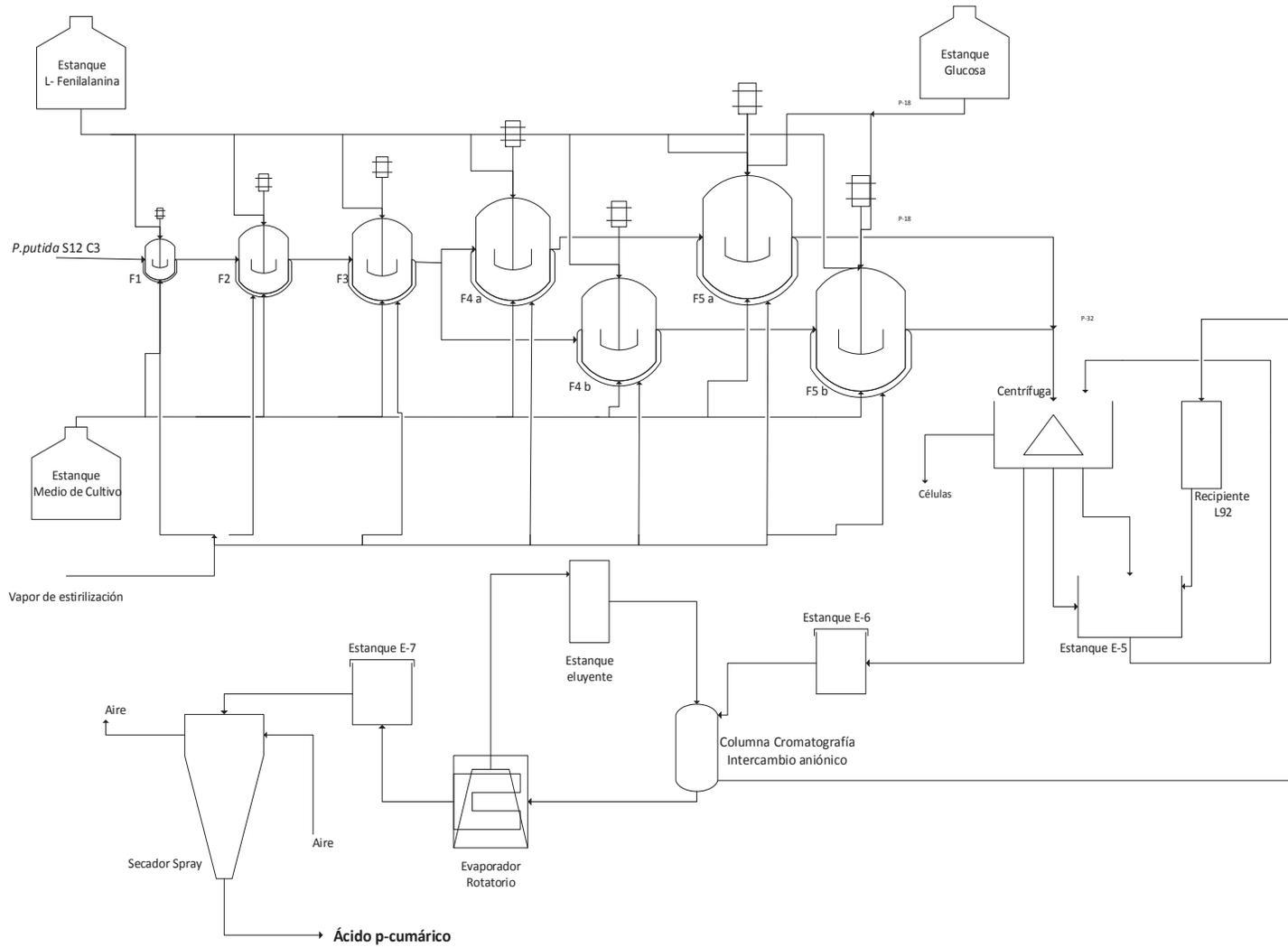


Figura 3.7 Diagrama de flujos del proceso

REFERENCIAS CAPÍTULO 3

- Acevedo, F., Gentina, J., & Illanes, A. (2002). *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. 3ra Edición*. Valparaíso.
- Asenjo, J. (1990). *Separation Processes in Biotechnology*. New York: CRC Press.
- Ben-Bassat, A., & Lowe, D. J. (2008). *USA Patente nº EP 1616017*.
- Berglof, J. H., & Cooney, J. M. (1983). Scale-up of laboratory systems for large scale chromatography. *Proc. Biotech.*, 833-842.
- Bhairi, S., & Mohan, C. (1999). Detergents. A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. *CALBIOCHEM*.
- de Bont, J. A. (1998). Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. *Tibtech*, 493-499.
- De Vivo, J. (1983). Nonadiabatic drying. En H. C. Vogel, *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook. Principles, Process Desing and Equipment* (págs. 317-330). New Jersey: Noyes Publications.
- Dhamole, P., Demanna, D., & Desai, S. (2014). Extraction of p-Coumaric Acid and Ferulic Acid Using Surfactant-Based Aqueous Two Phase System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 564-73.
- Dhamole, P., Wang, Z., Liu, Y., Wang, B., & Feng, H. (2012). Extractive fermentation with non-ionic surfactants to enhance butanol production. *Biomass and Bioenergy*, 112-19.
- Furth, A. J. (1980). Removing unbound detergent from hydrophobic protein. *Anal. Biochem.*, 207-215.
- Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial*. Barcelona.
- Hinze, W. L., & Pramauro, E. (1993). A Critical Review of Surfactant-Mediated Phase Separations (Cloud-Point Extractions): Theory and Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 133-177.
- Koopman, F. W., de Winde, J. H., & Ruijssenaars, H. J. (2009). C1 compounds as auxiliary substrate *Pseudomonas putida* S12. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83, 705-713.

- Neugebauer, J. A. (1988). *Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry*. San Diego, CA: Calbiochem Biochemicals.
- Nijkamp, K., van Luijik, N., de Bont, J. A., & Wery, J. (2005). The solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12 as host for the production of cinnamic acid from glucose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 170-177.
- Nijkamp, K., Westerhof, R. M., Ballerstedt, H., de Bont, J. A., & Wery, J. (2007). Optimization of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 as host for the production of p-coumarate from glucose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 617-624.
- Ou, S., Luo, Y., & Huang, C. (2009). Production of coumaric acid from sugarcane bagasse. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 253-259.
- Tejeda, Armando, Montesinos, Rosa, & Guzmán, Roberto. (1995). *Bioseparaciones*. Hermosillo, Sonora: Editorial Unison.
- Zausten, R., Vaz-Rossell, C., Maugeri-Filho, F., & Straathof, A. (2008). Liquid-liquid extraction of fermentation inhibiting compounds in lignocellulose hydrolysate. *Biotechnology and Bioengineering*, 1354-60.

CAPÍTULO 4

BALANCES DE MASA Y ENERGÍA

Según el análisis de mercado, se espera satisfacer una demanda anual de ácido *p*-cumárico de 1 tonelada, a través de un total de 35 lotes.

4.1 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo que se utilizará, tanto para las etapas de *upstream* como para la fermentación final es un medio de sales minerales adaptado y es el mismo que utilizaron Karin Nijkamp *et. al* en su estudio publicado el año 2007 para la etapa de CLA. Este medio está compuesto por las siguientes cantidades por litro: 36g de glucosa, 4g de (NH₄)₂SO₄, 3,88g de K₂HPO₄, 1,63g de NaH₂PO₄ y 20mL de una solución de elementos traza.

4.1.1 Composición del medio de cultivo

A continuación, se detallan las cantidades de cada nutriente del medio de cultivo por cada etapa de fermentación en la tabla 4.1. La nomenclatura usada se debe leer de la siguiente manera. FPi: fermentación previa número i; FF: fermentación final. La información de la solución de elementos traza se especifica en la tabla 4.2.

Tabla 4.1 Cantidad de nutrientes del medio de cultivo por etapa de fermentación en [g]

Nutriente	FP1	FP2	FP3	FP4*	FF*
Glucosa	12,35	174,60	3173,40	39456,00	80762,40
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,37	19,40	352,60	4384,00	8973,60
K ₂ HPO ₄	1,33	18,82	342,02	4252,48	8704,39
NaH ₂ PO ₄	0,56	7,91	143,68	1786,48	3656,74
Total	15,61	220,72	4011,71	49878,96	102097,13

*La masa indicada está referida para los dos fermentadores de la FP4 y FF

Tabla 4.2 Cantidad en [g] de nutrientes en solución traza por etapa de fermentación

Nutriente	FP1	FP2	FP3	FP4*	FF*
Volumen**	$6,86 \cdot 10^{-3}$	0,10	1,76	21,92	44,87
MgCl ₂ 6H ₂ O	$6,86 \cdot 10^{-2}$	0,97	17,63	219,20	448,68
EDTA	$6,86 \cdot 10^{-3}$	0,10	1,76	21,92	44,87
ZnSO ₄ 7H ₂ O	$1,37 \cdot 10^{-3}$	0,02	0,35	4,38	8,97
CaCl ₂ 2H ₂ O	$6,86 \cdot 10^{-4}$	$1,00 \cdot 10^{-3}$	0,18	2,19	4,49
FeSO ₄ 7H ₂ O	$3,43 \cdot 10^{-3}$	0,05	0,88	10,96	22,43
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	$1,37 \cdot 10^{-4}$	$2,00 \cdot 10^{-3}$	0,04	0,44	0,90
CuSO ₄ 5H ₂ O	$1,37 \cdot 10^{-4}$	$2,00 \cdot 10^{-3}$	0,04	0,44	0,90
CoCl ₂ 6H ₂ O	$2,70 \cdot 10^{-4}$	$4,00 \cdot 10^{-3}$	0,07	0,88	1,79
MnCl ₂ 4H ₂ O	$7,00 \cdot 10^{-4}$	$1,00 \cdot 10^{-3}$	0,18	2,19	4,49
Total	0,08	1,16	21,12	262,60	537,52

*Los datos contemplan las cantidades para ambos fermentadores de la etapa respectiva.

**La fila volumen se observa sólo en litros y corresponde al volumen total a agregar en cada fermentación.

4.1.2 Preparación del Medio de Cultivo

Como se puede apreciar en la tabla 4.2 la cantidad total de disolución de elementos traza a preparar son aproximadamente 382 litros. El cálculo utilizado para lograr la concentración adecuada de sales en la disolución se resume en la siguiente tabla 4.3 de propiedades y resultados.

Tabla 4.3 Propiedades de nutrientes traza y volúmenes requeridos

Nutriente	Masa [g]	Solubilidad [g/L]	Agua [L]	Densidad [Kg/L]	Volumen [L]
MgCl ₂ 6H ₂ O	686,48	1160	0,592	2,57	0,267
EDTA	68,65	500	0,137	0,86	0,080
ZnSO ₄ 7H ₂ O	13,73	540	0,025	1,96	0,007
CaCl ₂ 2H ₂ O	6,86	800	0,009	1,38	0,005
FeSO ₄ 7H ₂ O	34,32	400	0,086	1,9	0,018
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1,37	840	0,002	3,28	0,000
CuSO ₄ 5H ₂ O	1,37	203	0,007	2,3	0,001
CoCl ₂ 6H ₂ O	2,75	930	0,003	1,92	0,001
MnCl ₂ 4H ₂ O	6,86	530	0,013	2,01	0,003
Total	822,40				

Se puede observar en la segunda columna de la tabla 4.3 la masa total necesaria de cada sal. Al utilizar la solubilidad según la ecuación 4.1 se determina la cantidad de agua necesaria para disolver cada masa de sal, correspondientemente especificada en la cuarta columna de la tabla

4.3. Al mismo tiempo, se utiliza la densidad para encontrar el volumen ocupado por la cantidad de sal indicada. Este último resultado se muestra en la sexta de la misma tabla.

$$\text{Solubilidad en agua } \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{\text{Masa [g]}}{\text{Volumen de Agua [L]}}$$

Ecuación 4.1

El total de masa de sales ocupa un espacio de 0,38 litros y se disuelve correctamente en aproximadamente 0,88 litros. Asumiendo volúmenes aditivos, la suma de estas cantidades equivale a 1,26 litros. El resto del volumen se completa con agua. Es decir, la cantidad de agua total a utilizar para la solución de elementos traza es 381,62 litros.

Considerando un estanque de disolución de elementos traza llenado al 85% de su capacidad (382 [L]), su volumen total será de:

$$V_{s-T}=450 \text{ [L]}$$

Por otro lado, la preparación del medio de cultivo (sin la solución de elementos traza), se confeccionará según la cantidad de volumen requerida para cada una de las fermentaciones. En sumatoria se requieren aproximadamente 3433 litros de medio para un lote de producción. La tabla 4.4 es homóloga a la tabla 4.3 y describe los resultados de volúmenes que se requieren para disolver los nutrientes principales del medio y el volumen que ocupan *per se*.

La masa total de nutrientes alcanza un total de 156,22 [Kg], los cuales se disuelven correctamente en aproximadamente 190 [L] de agua (Ver ec. 4.1) y ocupan un espacio correspondiente a 95,95 [L]. En total, la disolución de medio de cultivo concentrado tiene un volumen de casi 286 litros. Para lograr las concentraciones necesarias de cada nutriente se aforan estas cantidades a 3433 litros de medio requerido (teniendo en cuenta que también se agrega a esta disolución todo el volumen de solución de elementos traza).

Tabla 4.4 Propiedades de nutrientes del medio de cultivo y volúmenes requeridos

Nutriente	Masa [g]	Solubilidad [g/L]	Agua [L]	Densidad [Kg/L]	Volumen [L]
Glucosa	123578,75	910	135,80	1,54	80,25
(NH ₄) ₂ SO ₄	13730,97	750	18,31	1,77	7,76
K ₂ HPO ₄	13319,04	420	31,71	2,56	5,20
NaH ₂ PO ₄	5595,37	1100	5,09	2,04	2,74
Total	156224,13				95,95

Considerando un estanque llenado al 85% de su capacidad, el volumen del recipiente del medio de cultivo será de:

$$V_{M-C}=4[m^3]$$

A continuación se presenta el diagrama de bloques del proceso de preparación del medio de cultivo.

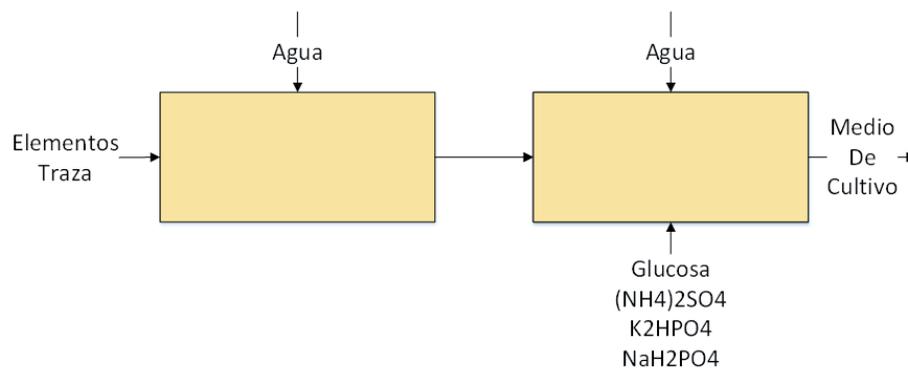


Figura 4.1 Diagrama de bloques de la preparación del medio de cultivo

4.1.4 Fenilalanina

a. Balance de masa

De acuerdo al rendimiento de biomasa sobre fenilalanina, $Y_{x/phe}=75$ [g/g] (Nijkamp *et al.*, 2007), fueron estimadas las masas de aminoácido que deben ser agregadas durante la primera fase de las fermentaciones. Esta cantidad es adicionada, de manera que el crecimiento de las bacterias sea controlado para tener una velocidad de crecimiento óptima que contemple tanto crecimiento como producción de p-cumarato. Según la cantidad de biomasa que se obtiene en cada fermentación y el rendimiento nombrado anteriormente, se estima la masa de fenilalanina para cada fermentación y se indica en la tabla 4.5.

Tabla 4.5 Masa de L-fenilalanina y Δ biomasa para cada etapa de fermentación en [g]

Nutriente	FP1	FP2	FP3	FP4*	FF*	Total
Δ Biomasa	9,09	172,44	3448,98	48219,40	107150,10	
L-fenilalanina	0,12	2,30	45,99	642,93	1428,67	2120,00

*Se contemplan ambos fermentadores de la etapa correspondiente

Los resultados fueron estimados de acuerdo a la ecuación 4.2 y asumiendo un consumo total de la fenilalanina agregada.

$$Y_{\frac{x}{phe}} = \frac{\Delta X \text{ [g]}}{-\Delta phe \text{ [g]}}$$

Ecuación 4.2

La masa total de L-fenilalanina que se muestra en la tabla 4.5 se disolverá correctamente en 4 L de agua y de esta manera se tendrá una disolución del aminoácido de concentración 530 [g/L], según la ecuación 4.3.

$$\text{Concentración} \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{\text{masa} [g]}{\text{volumen} [L]}$$

Ecuación 4.3

De esta manera y asumiendo un estanque lleno al 80% de su capacidad total, el estanque que contendrá la disolución tendrá un contenido máximo de volumen igual a:

$$V_{E-P}=5 [L]$$

A partir de este estanque se sacarán los volúmenes necesarios para cumplir con las masas correspondientes de L-fenilalanina para cada etapa de fermentación. Estos volúmenes son calculados según la ecuación 4.4.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Ecuación 4.4

Donde:

- C_1 : concentración del estanque de disolución de L-fenilalanina (530 [g/L])
- V_1 : volumen a extraer del estanque de disolución de L-fenilalanina
- C_2 : concentración del estanque de alimentación de la etapa de fermentación
- V_2 : volumen del estanque de alimentación de la etapa de fermentación

La única incógnita de la ecuación 4.4 es V_1 y es calculado para todas las fermentaciones previas. Por otro lado, el factor C_2V_2 corresponde a la masa de L-fenilalanina (M_p) de cada etapa y se pueden observar en la tabla 4.5. Los resultados se muestran en la tabla 4.6.

Tabla 4.6 Volúmenes a extraer del estanque de L-fenilalanina para cada etapa

Nutriente	FP1	FP2	FP3	FP4	FF	Total
M_p [g]	0,12	2,30	46,00	642,93	1428,67	2120,00
V_1 [L]	$2,29 \cdot 10^{-4}$	$4,34 \cdot 10^{-3}$	$8,68 \cdot 10^{-2}$	1,21	2,70	4,00

Considerando la densidad de la L-fenilalanina (0,58 [Kg/L]) y según la ecuación 4.5, son calculados los volúmenes que ocupan las masas del aminoácido en cada etapa. Los resultados se pueden observar en la tabla 4.7.

Tabla 4.7 Volumen ocupado por la masa de L-fenilalanina (V_p) en cada etapa

Nutriente	FP1	FP2	FP3	FP4	FF	Total
M_p [g]	0,12	2,30	45,99	642,93	1428,67	2120,00
V_p [L]	$2,09 \cdot 10^{-4}$	$3,96 \cdot 10^{-3}$	$7,93 \cdot 10^{-2}$	1,11	2,46	-

b. Esterilización de disolución de L-fenilalanina

Como se mencionó en capítulo 3, la esterilización de la disolución de L-fenilalanina es realizada mediante microfiltros, ya que el aminoácido es termolábil. La corriente que entra desde el estanque de disolución de L-fenilalanina entra a un equipo de microfiltración con filtro de tamaño de poro de 0,1 [μm]. La masa total del aminoácido es igual tanto en la entrada como en la salida y tiene un valor de 2120 [g].

4.2 FERMENTACIONES PREVIAS (UPSTREAM)

Las fermentaciones previas tienen como fin poder alcanzar la biomasa necesaria, que cumpla con el 10% de la concentración final de células considerada para inocular los dos fermentadores de 10 [m^3]. Para lograr esa cantidad de biomasa se consideran cuatro fermentaciones previas, las cuales

tienen una operación por lote con crecimiento controlado mediante adición constante de fenilalanina.

Tomando en cuenta, que el volumen final de caldo de ambos fermentadores de 10m^3 sumados (17m^3), su concentración final de biomasa esperada ($X_f=6,1\text{ [g/L]}$) y una inoculación con un 10% de la concentración de biomasa se utilizaron las siguientes ecuaciones para estimar el volumen de caldo necesario de las fermentaciones previas.

$$f_i X_f V_t = B_i$$

Ecuación 4.5a

$$V_{n-1} = \frac{B_i}{X_{f,i}}$$

Ecuación 4.5b

Donde:

- f_i : fracción de concentración celular para inocular
- X_f : concentración final de biomasa [g/L]
- V_n : volumen de caldo en fermentador número n [L]
- V_{tn} : volumen total de caldo (cuando hay 2 fermentadores) [L]
- V_{n-1} : volumen de caldo en fermentador número n-1 [L]
- $X_{f,i}$: concentración final de biomasa igual a 5,3 [g/L]
- B_i : biomasa inóculo [g]
- #: cantidad de fermentadores
- F_n : fermentación número n

En la tabla 4.8 se muestran los resultados de la aplicación de las ecuaciones 4.3. La nomenclatura corresponde a la señalada anteriormente.

Tabla 4.8 Resultados de volúmenes de caldo para fermentaciones previas

Fermentación #	V_n	V_t	f_i	X_f	B_i	X_f	V_{n-1}	
F5	2	8500	17000	0,1	6,1	10370,0	5,3	1956,6
F4	2	978,3	1956,6	0,07	5,3	725,9	5,3	137,0
F3	1	137,0	137,0	0,05	5,3	36,3	5,3	6,85
F2	1	6,85	6,85	0,05	5,3	1,8	5,3	0,342
F1	1	0,34	0,34	-	-	-	-	-

Considerando los volúmenes de caldo esperados para cada fermentación, los rendimientos de biomasa obtenidos por Nijkamp, et al., en su publicación del año 2007; detallados en la tabla 4.8 y un porcentaje de humedad del microorganismo utilizado del 80% (Madigan, 2011); se estima la biomasa esperada para cada etapa previa y se muestran los resultados en la tabla 4.9.

Tabla 4.9 Biomasa esperada por etapa cada etapa de fermentación [g]

	FP1	FP2	FP3	FP4	FF	Total
Biomasa	9,09	181,53	3630,50	51849,90	450500,00	506171,01

4.2.1 Fermentación Previa 1

En la fermentación previa 1 (FP1) es preparado el inóculo para la fermentación previa 2 (FP2). Esta etapa consiste en una fermentación por lote y la finalidad es aumentar la biomasa.

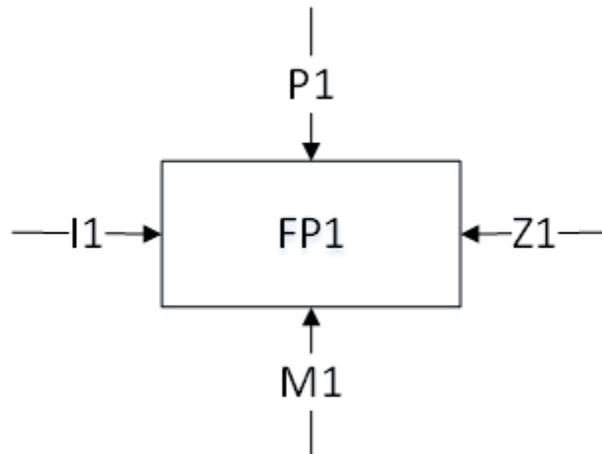


Figura 4.2 Diagrama de bloques de FP1

Donde:

- P1: masa de L-fenilalanina
- I1: masa de inóculo
- M1: masa de medio de cultivo seco s/ trazas
- Z1: masa de trazas

De manera implícita se agrega también agua que viene incorporada en las corrientes P1 y M1. La cantidad de agua presente en I1 es despreciable en comparación a las demás corrientes, así como también la masa de microorganismo que viene en ella.

La masa de medio de cultivo seco y sin solución de elemento traza; la de L-fenilalanina y la de solución traza seca se detallan en las tablas 4.1, 4.5 y 4.2, respectivamente.

La densidad de la mezcla de nutrientes del medio de cultivo sin elementos traza es calculada según la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{\rho_M} = \frac{x_1}{\rho_1} + \frac{x_2}{\rho_2} + \dots + \frac{x_n}{\rho_n}$$

Ecuación 4.6

- Donde:

- ρ_M : densidad mezcla
- ρ_n : densidad de sustancia número n
- x_1 : fracción másica de sustancia n en mezcla

Para FP1 se tienen los siguientes resultados indicados en la tabla 4.10.

Tabla 4.10 Resultados de densidad de mezcla de nutrientes en [Kg/L]

Nutriente	masa [g]	fracción másica	ρ [Kg/L]	x/ρ	ρ mezcla
Glucosa	12,35	0,79	1,54	0,51	
(NH4)2SO4	1,37	0,09	1,77	0,05	
K2HPO4	1,33	0,09	2,56	0,03	
NaH2PO4	0,56	0,04	2,04	0,02	
Total	15,61	1		0,61	1,63

Esta densidad calculada para la mezcla se mantiene para todas las fermentaciones, ya que la concentración usada es la misma en todos los medios de cultivo y por ende, la fracción másica de cada nutriente también.

Así, el volumen de la mezcla de nutrientes está dado por su masa y densidad según:

$$\rho = \frac{M}{V}$$

Ecuación 4.7

Donde:

- ρ : densidad [Kg/L]
- M: masa [Kg]
- V: volumen [L]

Volumen de la mezcla de nutrientes (V_N) $\approx 0,01$ [L]

Luego, asumiendo volúmenes aditivos se tiene la siguiente ecuación:

$$V_{Tn} = V_{Wn} + V_{Nn} + V_{Zn} + V_{Pn} + V_{In}$$

Ecuación 4.8

Donde:

- V_{Tn} : Volumen total en fermentación previa número n
- V_{Nn} : Volumen de nutrientes en fermentación previa número n
- V_{Wn} : Volumen de agua en fermentación previa número n
- V_{Zn} : Volumen de solución traza en fermentación previa número n
- V_{Pn} : Volumen de solución de L-fenilalanina en fermentación previa número n
- V_{In} : Volumen de inóculo en fermentación previa número n

Tabla 4.11 Volúmenes FP1 en [L]

V_{T1}^*	V_{N1}	V_{Z1}	V_{P1}	V_{I1}
0,34	0,01	0,01	$1,33 \cdot 10^{-4}$	0,01

*El volumen hace referencia al volumen final de caldo

Como se ve en la tabla 4.11, el volumen de L-fenilalanina es despreciable. Además se puede considerar que el volumen de solución traza es prácticamente agua (parte de V_{W1}), ya que el

volumen que ocupan los elementos traza son despreciables frente al volumen de solución. En base a estas suposiciones, reemplazando y despejando la ecuación 4.8, se tiene que:

$$V_{w1} = 0,32 [L]$$

Tomando la densidad del agua como 1 [Kg/L] y aplicando la ecuación 4.5, se tiene la masa de agua que entra en FP1 (M_{w1}):

$$M_{w1} = 0,32 [Kg]$$

En la siguiente tabla 4.12 se resumen los resultados del balance de masa de la FP1.

Tabla 4.12 Resultado balance de masa FP1

Corriente	Masa [g]
I1	0,13
P1	0,12
Z1	0,08
M1	15,61
Agua*	0,32

*Esta no es una corriente *per se*, ya que está virtualmente presente en las demás

Por otra parte, se considera en la FP1 una producción de ácido *p*-cumárico (pCA) por parte de los microorganismos. Esta concentración final, se espera análoga a la observada en fermentaciones equivalentes. A las 47 horas de fermentación, que es la duración de la fase uno y de las

fermentaciones previas 1, 2, 3 y 4 se tiene una concentración de pCA ($[pCA]_{47}$) = $4,1 \cdot 10^{-3}$ [M] (Nijkamp et al, 2007). Tomando en cuenta el peso molecular del pCA (164,16 [g/mol]) se obtiene la siguiente concentración para el tiempo final de la primera fase.

$$[pCA]_{47} = 4,1 \cdot 10^{-3} \left[\frac{mol}{L} \right] 164,16 \left[\frac{g}{mol} \right] = 0,67 \left[\frac{g}{L} \right]$$

Considerando esta concentración final de pCA por cada fermentación previa se estima una cantidad de producto para el final de la FP1 como sigue.

$$M_{pCA_n} = M_{pCA_{n-1}} [g] + 0,67 \left[\frac{g}{L} \right] * V_n [L]$$

Ecuación 4.9

Donde:

- M_{pCA_n} : masa de pCA en la fermentación previa número n
- $M_{pCA_{n-1}}$: masa de pCA en la fermentación previa número n-1
- V_n : volumen de caldo de la fermentación previa número n

En consecuencia con la ecuación 4.9, la masa de pCA final conseguida en la FP1 es

$$M_{pCA1} = 0,67 \left[\frac{g}{L} \right] * 0,34 [L] = 0,23 [g]$$

4.2.2 Fermentación Previa 2

a. Balance de masa

En la FP2, es preparado el inóculo para la fermentación previa 3 (FP3). En la figura 4.3 se pueden observar las corrientes de entrada al fermentador. Tácitamente existe una corriente de agua que entra en conjunto con las disoluciones de elementos traza, medio de cultivo y L-fenilalanina, no obstante las corrientes se indican en peso seco. Además, existe una subcorriente másica de pCA que viene desde la FP1. Es necesario destacar que desde el fermentador anterior se traspasa todo el contenido.

A continuación se presenta el diagrama de bloques de la FP2.

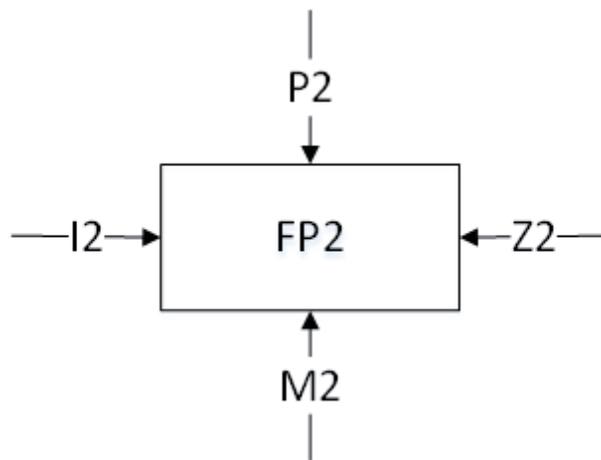


Figura 4.3 Diagrama de bloque FP2

Donde:

- P2: masa de L-fenilalanina
- I2: masa de inóculo
- M2: masa de medio de cultivo seco s/ trazas
- Z2: masa de trazas

Por otro lado, los parámetros de la FP2 se muestran en la tabla 4.13.

Tabla 4.13 Parámetros de FP2

V_2	B_{i2}	B_{f2}	t_2
6,85 [L]	9,09 [g]	181,53 [g]	47 [h]

Donde:

- V_2 : volumen final de caldo de cultivo en FP2
- B_{i2} : biomasa inicial (inóculo) FP2
- B_{f2} : biomasa final FP2
- t_2 : tiempo de FP2

La masa total de L-fenilalanina que se agrega a FP2 son 2,3 [g] (ver tabla 4.5) y según la densidad del aminoácido (0,58 [Kg/L]) y la ecuación 4.5, ocupan un volumen de $\approx 4 \cdot 10^{-3}$ [L]. Éstos son adicionados paulatinamente durante el tiempo que ocurre la fermentación a través de una disolución de volumen igual a 2 [L]. En consecuencia, para efectos de cálculo de agua, esta disolución se considera en su totalidad de agua.

$$Flujo_{volumétrico} \left[\frac{L}{h} \right] = \frac{Volumen [L]}{tiempo[h]}$$

Ecuación 4.10

En consecuencia con la ecuación 4.10

$$F_{v2} = 4,3 \cdot 10^{-2} \text{ [L/h]}$$

$$Flujo_{másico} \left[\frac{g}{h} \right] = \frac{Masa [g]}{tiempo[h]}$$

Ecuación 4.11

Por consiguiente, el flujo másico de fenilalanina que entra a la FP2 es,

$$F_{m2}=4,9*10^{-2} \text{ [g/h]}$$

La masa de nutrientes del medio de cultivo sin los elementos traza se encuentra detallada por etapa en la tabla 4.1. Para la FP2 esta masa tiene un valor de 220,72 [g] de nutrientes, los cuales ocupan un volumen (V_{N2}) total de 0,14 [L] (ver Ec.4.5 y tabla 4.10). Por otro lado, el volumen total del medio de cultivo (V_{MC2}) que se agrega es de 4,5 [L]. Asumiendo esos dos volúmenes aditivos, se tiene que,

$$V_{MCn} = V_{WMCn} + V_{Nn}$$

Ecuación 4.12

Donde:

- V_{MCn} : volumen de medio de cultivo en fermentación previa número n
- V_{WMCn} : volumen de agua en medio de cultivo en fermentación previa número n
- V_{Nn} : volumen de nutrientes en medio de cultivo en fermentación previa número n

Reemplazando en la ecuación 4.12 se obtiene,

$$V_{WMC2} = 4,36 \text{ [L]}$$

El volumen de la disolución de elementos traza que se agrega a esta etapa es 0,10 [L]. El volumen que ocupan las sales de esta disolución es despreciable frente al total, por ende se considera que el volumen de la corriente es en su totalidad agua. La masa de los elementos traza de esta corriente se detalla en la tabla 4.2 y en ella se encuentra el valor de 1,16 [g] para la FP2.

En resumen, se tienen los siguientes volúmenes en la FP2,

Tabla 4.14 Volúmenes de la FP2 en [L]

V_{T2}^*	V_{N2}	V_{Z2}	V_{P2}	V_{I2}
6,85	0,14	0,10	2,00	0,34

Donde:

- V_{T2} : Volumen total en FP2
- V_{N2} : Volumen de nutrientes en FP2
- V_{W2} : Volumen de agua en FP2
- V_{Z2} : Volumen de solución traza en FP2
- V_{P2} : Volumen de solución de L-fenilalanina en FP2
- V_{I2} : Volumen de inóculo en FP2

Asumiendo volúmenes aditivos en la etapa y considerando la ecuación 4.8 despejada, se tiene que,

$$V_{W2} + V_{Z3} + V_{P3} = 6,37 \text{ [L]} = \text{Agua2}$$

Luego, considerando la densidad del agua (1 [Kg/L]) y la ecuación 4.7, la masa de agua que entra en FP2 es,

$$M_{\text{Agua2}} = 6,37 \text{ [Kg]}$$

Así, se detallan continuación los resultados del balance de masa de la FP2 en la tabla 4.15.

Tabla 4.15 Resultado balance de masa FP2

Corriente	Masa [g]
pCA	0,23
I2	9,09
P2	2,30
Z2	1,16
M2	220,72
Agua2*	6370

*Esta no es una corriente *per se*, ya que está virtualmente presente en las demás

La producción esperada de ácido *p*-cumárico para la FP2 es análoga a la de la FP1. Además ésta es sumada a la masa producida en la fermentación anterior. En consecuencia con lo dicho anteriormente y de acuerdo con la ecuación 4.7, se tiene que

$$M_{pCA2} = 0,23[g] + 0,67 \left[\frac{g}{L} \right] * 6,85[L] = 4,82[g]$$

b. Demanda y transferencia de oxígeno

Los balances de masa se realizarán de acuerdo con lo especificado en el capítulo 3.3.2.

Para que el cultivo no limite por oxígeno, se debe cumplir que la velocidad de transferencia de oxígeno al caldo (VTO) sea, al menos, equivalente a la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) por parte de los microorganismos. Es decir, se debe cumplir que:

$$VCO = VTO$$

Ecuación 4.13

Además VCO se puede definir como

$$VCO = q_{O_2} \cdot X$$

Ecuación 4.14

Donde:

- VCO: velocidad de consumo de oxígeno [mol O₂/L/s]
- q_{O₂}: velocidad específica de consumo de oxígeno [mol O₂/g/s]
- X: concentración de biomasa [g/L]

El valor de q_{O₂} que se utilizará para los cálculos se encuentra en bibliografía (Gomez et al, 2006), en cuyo estudio se utilizó una bacteria análoga a la de este estudio, pues es una cepa genéticamente modificada para ser usada en procesos de biodisulfurización, llamada *P. putida* CECT5279. El valor es

$$q_{O_2} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ [mol O}_2\text{/g/s]}$$

Reemplazando este valor en la ecuación 4.14 y tomando como X=26,50 [g/L], el cual es el valor máximo que se aspira a tener en el fermentador y en consecuencia la mayor velocidad de consumo de oxígeno que podría demandar el cultivo; se tiene que

$$VCO=1,33 \cdot 10^{-4} \text{ [mol O}_2\text{/L/s]}$$

En consecuencia y considerando la ecuación 4.13, la VTO tiene un valor de $1,33 \cdot 10^{-4}$ [mol O₂/L/s] y esta es la mínima cantidad para que el cultivo no esté limitado por oxígeno.

Por otro lado, los VVM indican el flujo de aire que se tiene por unidad de volumen de reactor y es directamente dependiente de la demanda de oxígeno que se tenga en el sistema, este valor varía con el tiempo, ya que es dependiente de la demanda de oxígeno que haya en cada biorreactor, la cual obedece a la concentración celular que va aumentando con el tiempo. Por esta razón, la ecuación para el cálculo de VVM obtenida de bibliografía (Acevedo, 2002) se utilizará para la máxima demanda de oxígeno que tendrá el sistema, de manera que los equipos no queden subestimados. La ecuación se observa a continuación.

$$VVM = \frac{N_A \cdot 22,4 \cdot T}{1000 \cdot 0,4 \cdot E \cdot \pi \cdot 60 \cdot 273}$$

Ecuación 4.15

Donde:

- VVM: flujo de aire por volumen de reactor [min⁻¹]
- N_A: demanda de oxígeno [mmol O₂/L/h]
- T: temperatura [K]
- E: eficiencia
- π: presión [atm]
- 0,4: valor estimado para aire enriquecido con O₂ puro.

Considerando correctamente una eficiencia de absorción mínima (3%), ya que varía normalmente entre 3 y 30% (Acevedo et al, 2002) el valor de VVM que se tiene para este caso es

$$VVM = 1,24[\text{min}^{-1}]$$

Valor que se según los mismos autores nombrados anteriormente se ajusta para una fermentación industrial (mayor a 5000 [L]) y otras tamaño piloto. No obstante, los valores que se utilizan en experimentos a nivel de laboratorio con *P. putida* (Nijkamp et al., 2007) y (Gomez et al., 2006) utilizan 1VVM para un volumen de reactor de 2 [L]. Considerando un tamaño de reactor de 10 [L] para esta etapa, se utilizará 1,24 VVM.

Como se mencionó en 3.3.3 la tensión de oxígeno disuelto se intentará mantener en 15%. De acuerdo con esto y con el valor de VTO estimado, es posible obtener un valor de k_La según la ecuación 4.16.

$$VTO = k_La (C^* - C_L)$$

Ecuación 4.16

Dónde:

- k_La : coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno [h^{-1}]
- C^* : solubilidad del oxígeno puro [mmol/L]
- C_L : oxígeno disuelto [mmol/L]

La solubilidad del oxígeno a 30 [°C] se calcula a partir de la tabla 4.16

Luego, la máxima concentración de oxígeno en agua a 30 [°C] es $C_{30}^* = 1,16$ [mmol O_2/L]. Por otro lado, despejando la ecuación 4.16 se tiene que

$$k_La = 486 [\text{h}^{-1}]$$

Tabla 4.16 Solubilidad de O₂ a 1 atm en agua a varias temperaturas, (Bailey & Ollis, 1986)

Temp [°C]	Agua, [mmol O ₂ /L]
25	1,26
30	1,16
35	1,09
40	1,03

Por otra parte, el flujo de aire se calcula según la siguiente ecuación.

$$F = V \cdot VVM$$

Ecuación 4.17

De acuerdo a la ecuación 4.17, el máximo flujo de aire enriquecido que se requiere para la FP2 es

$$F = 8,5 \left[\frac{L}{min} \right]$$

La tabla 4.17 resume los resultados obtenidos con respecto a la demanda y transferencia de oxígeno.

Tabla 4.17 Demanda y transferencia de oxígeno para FP2

Variable	Valor
VCO [mmol O ₂ /L/h]	479
VVM [min ⁻¹]	1,24
C _L [mmol O ₂ /L]	0,17
C* [mmol O ₂ /L]	1,16
k _L a [h ⁻¹]	486
F [L/min]	8,5

c. Balance de energía

Los fermentadores deben ser operados isotérmicamente, con una temperatura T=30 [°C]. Para poder lograr mantener esta temperatura se debe considerar que la fermentación es un proceso exotérmico, el cual genera el mayor de los calores a considerar en el proceso. La ecuación de energía que resume los calores involucrados en la fermentación se detalla a continuación.

$$Q_F + Q_A = Q_C + Q_E + Q_S + Q_I + Q_P$$

Ecuación 4.18a

Donde:

- Q_F: calor de fermentación = 0,12*V*N_A [Kcal/h]
- Q_A: calor de agitación = 0,1*Q_F [Kcal/h]
- Q_C: calor acumulado [Kcal/h]

- Q_E : calor perdido por evaporación de agua del medio de cultivo [Kcal/h]
- Q_S : calor sensible en la corriente de entrada y salida [kcal/h]
- Q_i : calor intercambiado, transferido = $U \cdot A \cdot \Delta T$ [kcal/h]
- Q_P : calor disipado en los alrededores = $h \cdot \pi \cdot T \cdot H_L \cdot (T_f - T_a)$ [Kcal/h]

Sin embargo, se tomarán las siguientes consideraciones. El calor sensible es mucho menor que el calor de fermentaciones, por lo tanto es despreciable. También son despreciables el calor de evaporación, si se utiliza aire saturado con agua durante la fermentación y el calor de acumulación, si se mantienen condiciones controladas de temperatura. En consecuencia, el balance de energía queda como sigue.

$$Q_F + Q_A = Q_P + Q_I$$

Ecuación 4.18b

Las variables a utilizar y sus valores se detallan en la siguiente tabla 4.18.

Tabla 4.18 Valores a utilizar en el balance de energía de la FP2

Variable	Valor
N_A [mmol O_2 /L/h]	479
Volumen líquido [L]	6,85
Altura [m]	0,317
Diámetro [m]	0,185
T Reactor [°C]	30
T ambiente [°C]	20
T agua enfriamiento [°C]	10

Coef. Convección [kcal/m ² /h]	17,5
Coef. Global de transferencia [kcal/(m ² *h*°C)]	400

Reemplazando en la ecuación 4.18b

$$Q_F = 0,12 \cdot 6,85 \cdot 479 = 393,7 \left[\frac{kcal}{h} \right]$$

El 10% del calor de fermentación corresponde al valor del calor de agitación.

$$Q_A = 0,1 \cdot Q_F = 39,4 \left[\frac{kcal}{h} \right]$$

El valor del calor por pérdida en los alrededores es, reemplazando

$$Q_P = h \cdot \pi \cdot T \cdot H_L \cdot (T_f - T_a) = 17,5 \cdot \pi \cdot 0,2 \cdot 0,22 \cdot (30 - 20) = 24,2 \left[\frac{kcal}{h} \right]$$

Por lo tanto, despejando la ecuación 4.18b

$$Q_I = 393,7 + 39,4 - 24,2 = 408,9 \left[\frac{kcal}{h} \right]$$

La tabla 4.19 resume los resultados del balance de energía (B.E.).

Tabla 4.19 Resumen de resultados del B.E.

Variable	Valor
$Q_F \left[\frac{kcal}{h} \right]$	393,7
$Q_A \left[\frac{kcal}{h} \right]$	39,4
$Q_P \left[\frac{kcal}{h} \right]$	24,2
$Q_I \left[\frac{kcal}{h} \right]$	408,9

4.2.3 Fermentación Previa 3

a. Balance de masa

En la FP3, es preparado el inóculo para la fermentación previa 4 (FP4). En la figura 4.4 se pueden observar las corrientes de entrada al fermentador. Virtualmente existe una corriente de agua que entra en conjunto con las disoluciones de elementos traza, medio de cultivo y L-fenilalanina, no obstante las corrientes se indican en peso seco. Sólo la corriente de inóculo se encuentra como peso húmedo e incluye además la masa de pCA generada en la FP2.

A continuación se presenta el diagrama de bloques de la FP2.

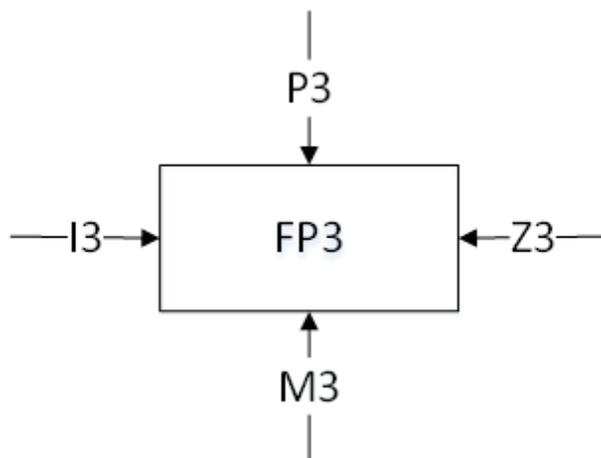


Figura 4.4 Diagrama de bloques de FP3

Donde:

- P3: masa de L-fenilalanina
- I3: masa de inóculo
- M3: masa de medio de cultivo seco s/ trazas
- Z3: masa de trazas

Por otro lado, los parámetros de la FP3 se muestran en la tabla 4.20.

Tabla 4.20 Parámetros de FP3

V_3	B_{i3}	B_{f3}	t_3
137 [L]	181,53 [g]	3630,50 [g]	47 [h]

Donde:

- V_3 : volumen final de caldo de cultivo en FP3
- B_{i3} : biomasa inicial (inóculo) FP3
- B_{f3} : biomasa final FP3
- t_3 : tiempo de FP3

La masa de L-fenilalanina que entra en esta fermentación se detalla en la tabla 4.5. El valor corresponde a $\approx 46,00$ [g] y según la densidad del aminoácido ($0,58$ [Kg/L]) y la ecuación 4.5, ocupa un volumen de $\approx 8,00 \cdot 10^{-2}$ [L]. Éstos son adicionados de forma gradual durante el tiempo que ocurre la fermentación a través de una disolución de volumen igual a 42 [L]. En consecuencia, para efectos de cálculo de agua, esta disolución se considera en su totalidad como agua.

Luego, considerando las ecuaciones 4.7 y 4.8, el flujo volumétrico y másico de L-fenilalanina en la FP3 son, respectivamente,

$$F_{v3}=9,0*10^{-1} \text{ [L/h]}$$

$$F_{m3}=9,8*10^{-1} \text{ [g/h]}$$

La masa total de los nutrientes del medio de cultivo sin los elementos traza se indica en la tabla 4.1. Para esta etapa el valor corresponde a 4011,71 [g] de nutrientes. Acorde con la ecuación 4.5 y la tabla 4.10, esta masa de nutrientes ocupa un volumen (V_{N3}) de 2,46 [L]. Además el volumen de medio de cultivo a agregar (V_{MC3}) son 88,15 [L]. Considerando estos volúmenes correctamente aditivos y utilizando la ecuación 4.9 se tiene que,

$$V_{WMC3} = 82,69 \text{ [L]}$$

El volumen total de la disolución de elementos traza que se agrega a la FP3 es de 1,76 [L]. El volumen que ocupan las sales de esta disolución es de 0,01 [L] (cálculo no mostrado, pero resuelto según las ecuaciones 4.4 y 4.5), el cual es despreciable frente al total, en consecuencia se considera para efectos prácticos de cálculo que el volumen de la corriente es en su totalidad agua. La masa de los elementos traza de esta corriente se detalla en la tabla 4.2 y en ella se halla el valor de 21,12 [g] para la FP3.

En síntesis, se tienen los siguientes volúmenes para la FP3 mostrados en la tabla 4.21

Tabla 4.21 Volúmenes de la FP3 en [L]

V_{T3}^*	V_{N3}	V_{Z3}	V_{P3}	V_{I3}
137,00	2,46	1,76	42,00	6,85

Donde:

- V_{T3} : Volumen total en FP3

- V_{N3} : Volumen de nutrientes en FP3
- V_{W3} : Volumen de agua en FP3
- V_{Z3} : Volumen de solución traza en FP3
- V_{P3} : Volumen de solución de L-fenilalanina en FP3
- V_{I3} : Volumen de inóculo en FP3

Asumiendo volúmenes aditivos en la etapa y considerando la ecuación 4.8 despejada, se tiene que,

$$V_{W2} + V_{Z3} + V_{P3} = 127,69 \text{ [L]} = \text{Agua3}$$

Luego, considerando la densidad del agua (1 [Kg/L]) y la Ec. 4.7 la masa de agua que entra en FP3 es,

$$M_{\text{Agua3}} = 127,69 \text{ [Kg]}$$

De esta manera, se detallan continuación los resultados del balance de masa de la FP3 en la tabla 4.22.

Tabla 4.22 Resultado balance de masa FP3

Corriente	Masa [g]
pCA	4,82
I3	181,53
P3	46,00

Z3	21,12
M3	4011,71
Agua3*	127690

*Esta no es una corriente *per se*, ya que está virtualmente presente en las demás

La producción esperada de ácido *p*-cumárico para la FP3 es equivalente (en cuanto a concentración) a la de la FP2. Además, ésta es agregada a la masa producida en la fermentación anterior. En consecuencia con lo dicho anteriormente y de acuerdo con la ecuación 4.7, se tiene que

$$M_{pCA3} = 4,82[g] + 0,67 \left[\frac{g}{L} \right] * 137[L] = 96,61[g]$$

b. Transferencia y demanda de oxígeno

Las ecuaciones son las mismas que para la FP2, así como también se mantienen la velocidad específica de consumo de oxígeno. Sobre esta base, los resultados se muestran en la tabla 4.23.

Tabla 4.23 Demanda y transferencia de oxígeno para FP3

Variable	Valor
VCO [mmol O ₂ /L/h]	479
VVM [min ⁻¹]	1,24
C _l [mmol O ₂ /L]	0,17

C^* [mmol O₂/L] 1,16

k_{La} [h⁻¹] 486

Por otro lado, considerando la ecuación 4.17.

$$F = 169,8 \left[\frac{L}{min} \right]$$

c. Balance de energía

Las ecuaciones y balances de energía de la FP2 se mantienen para la FP3. Además, las temperaturas también son las mismas. La tabla 4.24 muestra los valores que se han usado para el balance de energía de la FP3 y mientras que la tabla 4.15 indica los resultados del balance.

Tabla 4.24 Valores a utilizar en el balance de energía de la FP3

Variable	Valor
N_A [mmol O ₂ /L/h]	479
Volumen líquido [L]	137
Altura líquido [m]	0,57
Diámetro [m]	0,56
T Reactor [°C]	30
T ambiente [°C]	20
T agua enfriamiento [°C]	10
Coef. Convección [kcal/m ² /h]	17,5
Coef. Global de transferencia [kcal/(m ² *h*°C)]	600

Tabla 4.25 Resumen de resultados del B.E. de FP3

Variable	Valor
$Q_F \left[\frac{kcal}{h} \right]$	7874,8
$Q_A \left[\frac{kcal}{h} \right]$	787,5
$Q_P \left[\frac{kcal}{h} \right]$	192,4
$Q_I \left[\frac{kcal}{h} \right]$	8469,9

4.2.4 Fermentación Previa 4

a. Balance de masa

De forma análoga a las otras fermentaciones previas, la FP4, es la preparación del inóculo para la fermentación final (FF). A diferencia de las otras etapas antecedentes, la FP4 consta de dos fermentadores, los cuales son inoculados cada uno con la mitad del caldo de cultivo de la FP3. En la figura 4.5 se pueden observar las corrientes de entrada a uno de los dos fermentadores. Virtualmente existe una corriente de agua que entra en conjunto con las disoluciones de elementos traza, medio de cultivo y L-fenilalanina, sin embargo, al igual que en los casos anteriores las corrientes se indican en peso seco, con excepción de la corriente de inóculo.

A continuación se presenta el diagrama de bloques de la FP4.

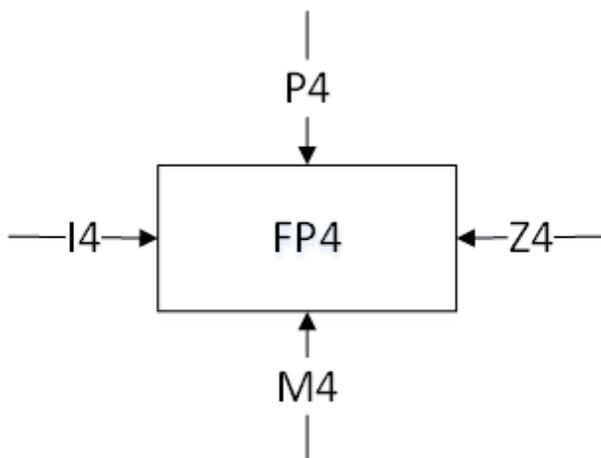


Figura 4.5 Diagrama de bloques de FP4

Donde:

- P4: masa de L-fenilalanina
- I4: masa de inóculo
- M4: masa de medio de cultivo seco s/ trazas
- Z4: masa de trazas

Los parámetros de la FP4 se muestran en la tabla 4.26 y corresponden al total de ambos fermentadores, con excepción del tiempo que corresponde al de la etapa *per se*.

Tabla 4.26 Parámetros de FP4

V_4	B_{i4}	B_{f4}	t_4^*
1956,60 [L]	3630,50 [g]	51849,90 [g]	47 [h]

*El tiempo corresponde a una fermentación de la FP4

Donde:

- V_4 : volumen final de caldo de cultivo en FP4
- B_{i4} : biomasa inicial (inóculo) FP4

- B_{f4} : biomasa final FP4
- t_4 : tiempo de FP4

La masa de L-fenilalanina que entra en esta fermentación se detalla en la tabla 4.5. El valor corresponde a $\approx 643,00$ [g] y según la densidad del aminoácido ($0,58$ [Kg/L]) y la ecuación 4.5, ocupa un volumen de $\approx 1,1$ [L]. Éstos son adicionados de forma gradual durante el tiempo que ocurre la fermentación, a través de una disolución de volumen igual a $293,3$ [L]. Asumiendo volúmenes aditivos, se tiene la siguiente ecuación de balance.

$$V_{Pn} = V_{PSn} + V_{WPn}$$

Ecuación 4.19

Donde:

- V_{Pn} : volumen de solución de L-fenilalanina en etapa previa número n
- V_{PSn} : volumen de L-fenilalanina seca en etapa previa número n
- V_{WPn} : volumen de agua de la disolución de L-fenilalanina en etapa previa número n

Resolviendo la ecuación 4.19,

$$V_{WP4}: 292,20 \text{ [L]}$$

Por otra parte, considerando la ecuación 4.9, el flujo volumétrico de L-fenilalanina en la FP4 es para cada uno de los fermentadores es

$$F_{v4} = 6,24 \text{ [L/h]}$$

Además, el flujo másico del aminoácido en la FP4 para cada uno de los fermentadores, según la ecuación 4.11 es

$$F_{m4} = 6,84 \text{ [g/h]}$$

La masa total de los nutrientes del medio de cultivo sin los elementos traza se indica en la tabla 4.1. Para esta etapa el valor corresponde a 49878,96 [g] de nutrientes. Acorde con la ecuación 4.7 y la tabla 4.10, esta masa de nutrientes ocupa un volumen (V_{N4}) de 30,63 [L]. Asimismo, el volumen de medio de cultivo a agregar (V_{MC4}) son 548,00 [L]. Tomando en cuenta estos volúmenes correctamente sumables y utilizando la ecuación 4.12 se tiene que

$$V_{WMC4} = 517,37 \text{ [L]}$$

La masa de los elementos traza de esta corriente se detalla en la tabla 4.2 y en ella se halla el valor de 262,60 [g] para la FP3. El volumen total de la disolución de elementos traza que se agrega a la FP4 es de 21,92 [L]. El volumen que ocupan las sales de esta disolución es de 0,12 [L] (cálculo no mostrado, pero resuelto según las ecuaciones 4.4 y 4.5). Tomando en consideración estos volúmenes como aditivos se genera la siguiente ecuación.

$$V_{Zn} = V_{ZS4} + V_{WZ4}$$

Ecuación 4.20

Donde:

- V_{zn} : volumen de solución de elementos traza en etapa previa número n
- V_{zsn} : volumen de elementos traza seco en etapa previa número n
- V_{wn} : volumen de agua de la disolución de elementos traza en etapa previa número n

Resolviendo la ecuación anterior,

$$V_{WZ4} = 21,80 \text{ [L]}$$

En síntesis, se tienen los siguientes volúmenes para ambos fermentadores para la FP4 indicados en la tabla 4.27.

Tabla 4.27 Volúmenes de la FP4 en [L]

V_{T4}^*	V_{N4}	V_{WZ4}	V_{WP4}	V_{I4}
1956,60	30,63	21,80	292,20	137,00

Donde:

- V_{T4} : Volumen total en FP4
- V_{N4} : Volumen de nutrientes en FP4
- V_{W4} : Volumen de agua en FP4 aportada por la disolución de medio de cultivo
- V_{WZ4} : Volumen de agua de la disolución de elementos traza en FP4
- V_{WP4} : Volumen de agua de la disolución de L-fenilalanina en FP4
- V_{I4} : Volumen de inóculo en FP4

Asumiendo volúmenes aditivos en la etapa y considerando la ecuación 4.8 despejada, se tiene que,

$$V_{W4} + V_{WZ4} + V_{WP4} = 1788,97 \text{ [L]} = \text{Agua4}$$

En seguida, considerando la densidad del agua (1 [Kg/L]) y la Ec. 4.7, la masa de agua que entra en FP4 es,

$$M_{\text{Agua4}} = 1788,97 \text{ [Kg]}$$

Mientras que la masa de agua que entra a cada fermentador de la etapa 4 es

$$\frac{M_{\text{Agua4}}}{2} = \frac{1788,97}{2} = 894,49 \text{ [Kg]}$$

De esta manera, se detallan continuación los resultados del balance de masa de la FP3 en la tabla 4.28.

Tabla 4.28 Resultado balance de masa FP4

Corriente	Masa [g]	A cada Fermentador
pCA	96,61	48,31
I2	3630,50	1815,25
P2	642,93	321,47
Z2	262,60	131,30
M2	49878,96	24939,48
Agua4*	1,79*10 ⁶	8,94*10 ⁵

*Esta no es una corriente *per se*, ya que está virtualmente presente en las demás

La concentración final esperada de ácido *p*-cumárico para la FP4 es paralela a la de la FP3. Además, ésta es sumada a la masa producida en la fermentación anterior. En consecuencia con lo dicho anteriormente y de acuerdo con la ecuación 4.9, se tiene que

$$M_{pCA4} = 96,61[g] + 0,67 \left[\frac{g}{L} \right] * 1956,6[L] = 1407,53[g]$$

b. Transferencia y demanda de oxígeno

Las ecuaciones son las mismas que para la FP3, así como también se mantienen la velocidad específica de consumo de oxígeno. Sobre esta base, los resultados se muestran en la tabla 4.29.

Tabla 4.29 Demanda y transferencia de oxígeno para FP4

Variable	Valor
VCO [mmol O ₂ /L/h]	479
VVM [min ⁻¹]	1,24
C _l [mmol O ₂ /L]	0,17
C* [mmol O ₂ /L]	1,16
k _l a [h ⁻¹]	486

Por otro lado, considerando la ecuación 4.17,

$$F = 1213,1 \left[\frac{L}{min} \right]$$

Tanto el flujo como las demás variables son las iguales para cada uno de los dos fermentadores de la FP4.

c. Balance de energía

Las ecuaciones y balances de energía de las fermentaciones anteriores se mantienen para la FP4. Además, las temperaturas también son las mismas. La tabla 4.30 muestra los valores utilizados para el balance de energía mientras que la tabla 4.31 indica los resultados.

Tabla 4.30 Valores a utilizar en el balance de energía de la FP4 para un fermentador

Variable	Valor
N_A [mmol O_2 /L/h]	479
Volumen líquido [L]	978,3
Altura líquido [m]	1,2
Diámetro [m]	1,05
T Reactor [°C]	30
T ambiente [°C]	20
T agua enfriamiento [°C]	10
Coef. Convección [kcal/m ² /h]	17,5
Coef. Global de transferencia [kcal/(m ² *h*°C)]	600

Tabla 4.31 Resumen de resultados del B.E. de FP4

Variable	Valor
$Q_F \left[\frac{kcal}{h} \right]$	56232,7
$Q_A \left[\frac{kcal}{h} \right]$	5623,3
$Q_P \left[\frac{kcal}{h} \right]$	659,7
$Q_I \left[\frac{kcal}{h} \right]$	61196,3

4.3 FERMENTACIÓN FINAL

La fermentación final es la etapa más importante del proceso de producción, ya que en ella se confecciona la cantidad de ácido *p*-cumárico presupuestada para satisfacer la demanda anual analizada en el capítulo de estudio de mercado. A pesar de que las fermentaciones previas tienen como fin alcanzar la cantidad de biomasa necesaria para inocular los bioreactores de esta etapa final, también se puede apreciar una producción de *p*-cumarato en ellas. Esta producción se complementa con la que existe en esta etapa final y contribuye a amortiguar las pérdidas que son propias de las ineficiencias de los procesos.

La fermentación final también consta de dos bioreactores con funcionamiento en paralelo y su caldo de cultivo es la alimentación del comienzo de los procesos *downstream*.

a. Balance de masa

Por otra parte, la fermentación final está constituida por dos fases claras. La primera trata de una fase de 47 [h] (t_1), la cual es básicamente igual a las otras fermentaciones previas y tiene como fin aumentar la biomasa hasta que se consuma toda la glucosa inicial. Luego, comienza la segunda

fase, la cual tiene una alimentación constante de glucosa y una duración de 124 [h] (t_2). A continuación se presenta el diagrama de bloques de la fermentación final (FF).

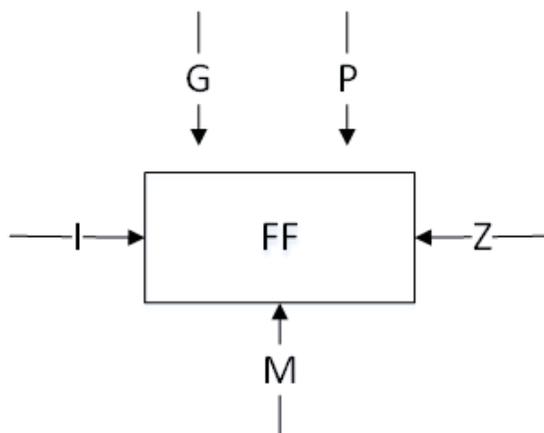


Figura 4.6 Diagrama de bloque de FF

Donde:

- P: masa de L-fenilalanina
- I: masa de inóculo
- M: masa de medio de cultivo seco s/ trazas
- Z: masa de trazas
- G: masa de glucosa

Es importante destacar que la corriente de inóculo contempla todo el volumen de la fermentación anterior. Eso implica que arrastra un contenido de ácido *p*-cumárico importante en cuanto al total que se consigue en esta fermentación final. Para el caso del balance de masa, sólo se tomará en cuenta la masa de células y de producto que viene en la corriente.

Los parámetros de la FP4 se muestran en la siguiente tabla y corresponden al total de ambos fermentadores, con excepción del tiempo que corresponde al de la etapa *per se*.

Tabla 4.32 Parámetros de FF

V_F	B_{iF}	B_{fF}	t_2^*
17000 [L]	51849,90 [g]	518500,00 [g]	124 [h]

* t_2 corresponde al tiempo que demora una fermentación de la etapa

Donde:

- V_F : volumen final de caldo de cultivo en FF
- B_{iF} : biomasa inicial (inóculo) FF
- B_{fF} : biomasa final FF
- t_2 : tiempo de FF

La masa de L-fenilalanina que entra en la FF se detalla en la tabla 4.5. El valor corresponde a $\approx 1429,00$ [g] y según la densidad del aminoácido ($0,58$ [Kg/L]) y la ecuación 4.5, ocupan un volumen de $\approx 2,70$ [L]. Éstos son agregados de manera progresiva durante el tiempo que ocurre la primera fase de la fermentación, a través de una disolución de volumen igual a 900 [L]. Asumiendo volúmenes aditivos y resolviendo la ecuación 4.19, el volumen de agua presente en la disolución de L-fenilalanina es

$$V_{WPF} = 1797,30 \text{ [L]}$$

Por otra parte, considerando la ecuación 4.12, el flujo volumétrico de L-fenilalanina en la FF es para cada uno de los fermentadores durante la primera fase de la fermentación es

$$F_{VF} = 19,15 \text{ [L/h]}$$

Además, el flujo másico del aminoácido en la FF para cada uno de los fermentadores, también para la primera fase de la fermentación, según la ecuación 4.11 es

$$F_{m4} = 15,20 \text{ [g/h]}$$

La masa total de los nutrientes del medio de cultivo sin los elementos traza se indica en la tabla 4.1. Para esta etapa el valor corresponde a 102097,13 [g] de nutrientes. Acorde con la ecuación 4.5 y la tabla 4.10, esta masa de nutrientes ocupa un volumen (V_{NF}) de 62,71 [L]. Por otra parte, el volumen de medio de cultivo a agregar (V_{MCF}) son 2243,4 [L] para la FF. Tomando en cuenta estos volúmenes aditivos y utilizando la ecuación 4.12 se tiene que el volumen de agua que aporta esta corriente para cada fermentador es

$$V_{WMCF} = 2180,69 \text{ [L]}$$

La masa de los elementos traza de esta corriente se detalla en la tabla 4.2 y en ella se halla el valor de 537,52 [g] para la FF. El volumen total de la disolución de elementos traza que se agrega a la FF es de 44,87 [L]. El volumen que ocupan las sales de esta disolución es de 0,25 [L] (cálculo no mostrado, pero resuelto según las ecuaciones 4.6 y 4.7). Tomando en consideración estos volúmenes como aditivos y la ecuación 4.20, se tiene que el volumen de agua que aporta esta corriente es

$$V_{WZF} = 44,62 \text{ [L]}$$

Por otro lado, la corriente de glucosa que se agrega en la segunda fase de la fermentación final se calcula según el rendimiento de producto sobre sustrato ($Y_{p/s}$) obtenido por Nijkamp et al. (2007).

$$Y_{\frac{p}{s}} = 0,038 = \frac{1,06}{20 + glu_2} \left[\frac{Cmol}{Cmol} \right]$$

Ecuación 4.21

Donde:

- 1,06: Cmol de *p*-cumarato por litro obtenido en la fermentación de la publicación
- 20: Cmol de glucosa pertenecientes al medio de cultivo
- glu_2 : Cmol de glucosa alimentados en la fase 2 de la fermentación

Resolviendo la ecuación 4.21 y considerando el peso molecular de la glucosa ($PM_{glu}=180$ [g/mol]), se tiene que

$$glu_2 = 7,9 [Cmol] * \frac{1 [mol]}{100 [Cmol]} * 180 \left[\frac{g}{mol} \right] = 14,22 [g]$$

Tomando en cuenta que estos valores responden a un volumen de 1 [L], la concentración adicionada de glucosa para la fase dos de la fermentación final es

$$glu_2 = 14,22 [g/L]$$

Además, considerando que el volumen final de la primera fase (V_{F1}) son 3000 [L] y el de la segunda son (V_{FII}) 8500 [L] se tiene que (asumiendo volúmenes aditivos) el volumen de glucosa a agregar es

$$V_{glu2} = 8500 - 3000 = 5500 [L]$$

Tomando en cuenta la concentración que tiene esta disolución, la masa de glucosa que se tiene para cada fase dos de cada fermentador de la FF es

$$M_{glu2} = 78210 \text{ [g]}$$

Al mismo tiempo, el t_2 son 124 horas, por ende despejando las ecuaciones 4.10 y 4.11 se obtiene que el flujo volumétrico y másico para cada fermentador son, respectivamente

$$F_{V_{glu2}} = 44.36 \left[\frac{L}{h} \right]$$

Y

$$F_{M_{glu2}} = 630,73 \left[\frac{g}{h} \right]$$

Por otro lado, considerando la masa total de glu_2 de la FF (156420 [g]), la densidad de la glucosa (1,54 [kg/L]) y la ecuación 4.4, el volumen que ocupa esta masa es

$$V_{gluF} = 101,57 \text{ [L]}$$

Asumiendo volúmenes aditivos, se obtiene la siguiente ecuación.

$$V_{glu2T} = V_{glu2F} + V_{WGF}$$

Ecuación 4.22

Donde:

- V_{glu2T} : volumen total de la disolución de glucosa de la FF
- V_{glu2F} : volumen que ocupa la masa de glucosa de la FF
- V_{WGF} : volumen de agua en la disolución de glucosa de la FF

Despejando la ecuación 4.22 se obtiene el siguiente resultado del volumen de agua presente en la disolución.

$$V_{WGF} = V_{glu2T} - V_{glu2F} = 11000[L] - 101,57[L] = 10898,43[L]$$

En síntesis, se tienen los siguientes volúmenes para ambos fermentadores para la FF,

Tabla 4.33 Volúmenes de la FF en [L]

V_{TF}^*	V_{NF}	V_{WMCF}	V_{WZF}	V_{PF}	V_{WPF}	V_{IF}	V_{GF}	V_{WGF}
17000	62,71	2180,69	44,62	2,7	1797,30	1956,6	101,57	10898,43

Donde:

- V_{TF} : Volumen total en FF
- V_{NF} : Volumen de nutrientes en FF
- V_{WMCF} : Volumen de agua en FF aportada por la disolución de medio de cultivo
- V_{WZF} : Volumen de agua de la disolución de elementos traza en FF
- V_{WPF} : Volumen de agua de la disolución de L-fenilalanina en FF

- V_{IF} : Volumen de inóculo en FF
- V_{WGF} : Volumen de agua de la disolución de glucosa en FF

Asumiendo volúmenes aditivos en la etapa y considerando la ecuación 4.8 despejada, se tiene que,

$$V_{WMCF} + V_{WPF} + V_{WGF} = 14876,42 \text{ [L]} = \text{AguaF}$$

En seguida, considerando la densidad del agua (1 [Kg/L]) y la Ec. 4.75, la masa de agua que entra en FF es,

$$M_{\text{Agua4}} = 14876,42 \text{ [Kg]}$$

Mientras que la masa de agua que entra a cada fermentador de la etapa 4 es

$$\frac{M_{\text{Agua4}}}{2} = \frac{14876,42}{2} = 7438,21 \text{ [Kg]}$$

De esta manera, se detallan continuación los resultados del balance de masa de la FF

Tabla 4.34 Resultado balance de masa FF

Corriente	Masa [g]	A cada Fermentador [g]
pCA	1407,53	703,77
I	51849,90	25924,95

P	1428,67	714,34
Z	537,52	268,76
M	49878,96	24939,48
G	156420,00	78210,00
AguaF*	$1,49 \cdot 10^7$	$7,44 \cdot 10^6$

*Esta no es una corriente *per se*, ya que está virtualmente presente en las demás

La concentración final esperada de ácido *p*-cumárico para la FF no es análoga la de la FP4, ya que la FF conlleva una segunda fase, la cual tiene por propósito aumentar la cantidad de *p*-cumarato y no así la biomasa. Después de las 171 horas que dura la FF se espera una concentración final del ácido en cuestión de

$$[pCA]_{171} = 1,02 \cdot 10^{-2} \left[\frac{mol}{L} \right] 164,16 \left[\frac{g}{mol} \right] = 1,67 \left[\frac{g}{L} \right]$$

(Nijkamp et al., 2007).

Así, la masa final de *p*-cumarato esperada luego de la etapa final de fermentación se estima según

$$M_{pCAf} = M_{pCA4} [g] + 1,67 \left[\frac{g}{L} \right] * V_{FF} [L]$$

$$M_{pCAf} = 1407,53 [g] + 1,67 \left[\frac{g}{L} \right] * 17000 [L] = \mathbf{29797,53 [g]}$$

b. Transferencia y demanda de oxígeno

Las ecuaciones son las mismas que se utilizaron para determinar la transferencia y demanda de oxígeno de las demás etapas. Sin embargo, para la FF la contracción final de células cambia ($X_{ff}=30,5$ [g/L]) y por ende la velocidad de consumo de oxígeno se ve afectada según la ecuación 4.14. La velocidad específica de consumo de oxígeno también varía, ya que en la segunda fase de la FF las bacterias ya no están en una fase de crecimiento exponencial, debido a ello, su demanda de oxígeno disminuye (Gomez et al., 2006). No obstante, se usará la q_{O_2} correspondiente a la etapa de mayor demanda, con el fin de evitar cualquier opción de limitación por oxígeno.

Por otra parte, tomando en cuenta la ecuación 4.13, la velocidad de transferencia de oxígeno para la FF debe ser

$$VTO = VCO = 549 \left[\frac{\text{mmol } O_2}{L \cdot h} \right]$$

Entonces, acorde con la ecuación 4.15, la FF operará a

$$VVM \approx 1,42 [\text{min}^{-1}]$$

Los siguientes cálculos son análogos a los realizados en las etapas anteriores y se muestran sintetizados en la siguiente tabla.

Tabla 4.35 Demanda y transferencia de oxígeno para FF

Variable	Valor
VCO [mmol O ₂ /L/h]	549
VVM [min ⁻¹]	1,42
C _L [mmol O ₂ /L]	0,17
C* [mmol O ₂ /L]	1,16
k _L a [h ⁻¹]	541

Por otro lado, considerando la ecuación 4.17.

$$F = 8500 \cdot 1,42 = 12000 \left[\frac{L}{min} \right]$$

c. Balance de energía

Las ecuaciones y balances de energía de las fermentaciones anteriores se mantienen para la FP4. Además, las temperaturas también son las mismas.

En la tabla 4.36 se indican los valores utilizados para el balance de energía de la FF, mientras que en la tabla 4.37 se pueden observar los resultados de este.

Tabla 4.36 Valores a utilizar en el balance de energía de la FF para un fermentador

Variable	Valor
N_A [mmol O ₂ /L/h]	549
Volumen líquido [L]	8500
Altura líquido [m]	4,2
Diámetro [m]	2,12
T Reactor [°C]	30
T ambiente [°C]	20
T agua enfriamiento [°C]	10
Coef. Convección [kcal/m ² /h]	17,5
Coef. Global de transferencia [kcal/(m ² *h*°C)]	600

Tabla 4.37 Resumen de resultados del B.E. de FP4

Variable	Valor
$Q_F \left[\frac{kcal}{h} \right]$	560000
$Q_A \left[\frac{kcal}{h} \right]$	56000
$Q_P \left[\frac{kcal}{h} \right]$	3693
$Q_I \left[\frac{kcal}{h} \right]$	612307

4.4 ESTERILIZACIÓN DE EQUIPOS Y MEDIO DE CULTIVO

Como se nombró en la sección 3.5, la modalidad de esterilización será discontinua. Cada fermentador se someterá a una esterilización por calor húmedo, sin embargo el calor húmedo se administrará de distintas maneras dependiendo del tamaño del reactor. Los fermentadores de 1 y 10 L se esterilizarán con su respectivo medio de cultivo dentro en un autoclave. Por otro lado, los fermentadores más grandes (de 180, 1200 y 10000 litros) se esterilizarán cargándolos con vapor proveniente desde la caldera. Los medios de cultivo de los fermentadores grandes se esterilizarán estando dentro de los fermentadores estériles, haciendo pasar el vapor a través de los serpentines a las condiciones adecuadas.

Para realizar el cálculo de la masa de vapor requerida para el proceso, se tomarán las siguientes suposiciones. Por una parte, el tiempo de calentamiento de la pared es despreciable, ya que tiene un coeficiente de transferencia de calor muy alto y es una pared delgada. Por otra parte, la esterilización comienza cuando se alcanza la presión de esterilización y finaliza cuando se abren las válvulas de venteo para el vaciado del fermentador.

El tiempo de esterilización está dado por la siguiente ecuación (Bailey & Ollis, 1986).

$$\ln \frac{N}{N_0} = -K \cdot t$$

Ecuación 4.23

Donde:

- N: número de microorganismos finales
- N_0 : número de microorganismos iniciales
- K: constante cinética de destrucción por calor [min^{-1}]
- t: tiempo [min]

Considerando $K=0.77$ [min^{-1}] a 121 [$^{\circ}\text{C}$], el cual corresponde a *Bacillus Stearothermophilus*, que es la forma de vida microbiana más resistente a la destrucción térmica que se ha identificado (Gentina, 2013). Además, teniendo en cuenta un criterio de esterilización de una célula sobreviviente por mil operaciones de esterilización y que existe una cantidad de 10^9 microorganismos por litro, se calculan los tiempos de esterilización por vapor para cada volumen de medio de cultivo, según la ecuación 4.23.

Tabla 4.38 Tiempos de esterilización de cada fermentador

Variable	F3	F4	F5
Volumen medio [L]	88,15	548	1122
N/N_0	$1,13 \cdot 10^{-14}$	$1,82 \cdot 10^{-15}$	$8,91 \cdot 10^{-16}$
t [min]	42	44	45

Los fermentadores 1 y 2 deben estar 35 y 38 minutos con su respectivo medio de cultivo en el autoclave luego de alcanzar la temperatura y presión necesarios. En los demás fermentadores se debe mantener la temperatura de la pared de acero mediante un flujo de vapor. En la tabla 4.38 se indican los tiempos de mantención, ya que los tiempos de calentamiento son despreciables para el del biorreactor.

Balance de energía

La ecuación que define la cantidad de vapor a utilizar para calentar el área de las paredes con las que entra en contacto es la siguiente.

$$M_{acero} \cdot C_{p_{acero}} \cdot (T_v - T_p) = \lambda \cdot M_{vapor}$$

Ecuación 4.24

Donde:

- M_{acero} : masa de acero estimada para un espesor de pared de 1 [pulg]
- $C_{p_{acero}}$: capacidad calorífica del acero a temperatura promedio (71,6 [°C]= 445,94 [J/Kg/°C] (Kern, 2001)
- T_v : temperatura del vapor (121°C)
- T_p : temperatura de pared (22°C)
- λ : calor de vaporización del vapor saturado a 121 [°C] (2199400 [J/Kg]) (Smith, 1996)
- M_{vapor} : masa de vapor

Reemplazando los valores en la ecuación 4.24 y usando la masa de acero de cada uno de los fermentadores se obtienen los resultados de masa de vapor para calentar la superficie interna de cada biorreactor, los cuales se muestran en la tabla 4.39

Para determinar el volumen de condensado generado en cada operación se tiene la siguiente ecuación.

$$V_{CO} = \frac{M_v}{\rho_L}$$

Ecuación 4.25

Donde:

- V_{CO} : volumen condensado [L]
- M_v : masa vapor [kg]
- ρ_L : densidad del líquido saturado (943,04 [kg/m³])

Reemplazando en la ecuación 4.25, se obtienen los resultados del volumen de condensado que se detallan en la tabla 4.39

Tabla 4.39 Resumen resultados de vapor para esterilización fermentadores F3, F4 Y F5

Fermentador	F3	F4	F5
Masa de Vapor [Kg]	11,61	41,12	169,00
Volumen de condensado [L]	12,31	43,60	179,21

El flujo de vapor necesario para mantener la temperatura de pared a 121 °C está dado por la ecuación 4.26

$$Q_p = \lambda \cdot F_V$$

Ecuación 4.26

Por otro lado, el calor se puede calcular mediante la ecuación 4.27 (Acevedo, 2002)

$$Q_p = h \cdot \pi \cdot T \cdot H_L (T_f - T_a)$$

Ecuación 4.27

Dónde:

- Q_p : calor paredes [J/s]
- λ : calor de vaporización = 2199,4 [kJ/kg]
- F_v : flujo de vapor [kg/h]
- h : coef. de transferencia de calor = 20 [kcal/h m² °C]
- T : diámetro [m]
- H_L : altura de fermentador [m]
- T_f : temperatura de fermentación = 121 [°C]
- T_a : temperatura ambiente = 22 [°C]

Con ambas ecuaciones se obtienen los flujos de vapor para mantener la temperatura de pared los fermentadores F3, F4 y F5 a las condiciones de esterilización.

Se estima que para la zona de mantención de la esterilización se requerirá una cantidad de vapor equivalente a la que se necesita para llevar el reactor a la temperatura de esterilización (zona de calentamiento).

Al multiplicar estos flujos por el tiempo requerido para la esterilización de cada biorreactor de acuerdo con la ecuación 4.25, se obtiene la masa de vapor necesaria para la mantención de las paredes a la temperatura y tiempos necesarios. Este resultado se indica en la tabla 4.40.

Tabla 4.40 Vapor para mantenimiento de temperatura de pared

Fermentador	F3	F4	F5
Flujo de Vapor [kg/h]	11,02	38,85	159,13
Masa de vapor [kg]	7,71	28,48	114,35

Para la esterilización del medio de cultivo, se calcula el calor necesario para llevar la masa de medio de cultivo a la temperatura de esterilización según la ecuación 4.28 y se iguala a la ecuación

4.29 para conocer la masa de vapor necesaria. Esta masa de vapor corresponde a la necesaria para la zona de calentamiento. Se estima que para la zona de mantención se requerirá la misma masa de vapor que para la zona de calentamiento. La tabla 4.41 indica las características del medio de cultivo y el requerimiento de calor para su esterilización.

$$M_{medio} \cdot C_{P_{medio}} \cdot (T_s - T_e) = Q_c$$

Ecuación 4.28

Donde:

- M_{medio} : masa medio de cultivo
- C_p : capacidad calorífica medio de cultivo
- T_s : temperatura de salida = 121[°C]
- T_e : temperatura de entrada = 15[°C]
- Q_c : calor de calentamiento

$$Q_c = \lambda \cdot M_{vapor}$$

Ecuación 4.29

Donde:

- Q_c : calor de calentamiento
- λ : calor de vaporización = 2199,4 [kJ/kg]
- M_{vapor} : masa de vapor

Tabla 4.41 Características de medio de cultivo en zona de calentamiento

Parámetro	F3	F4	F5
C_p [kJ/kg/°C]	4,18	4,18	4,18

$T_e; T_s$ [°C]	15; 121	15; 121	15; 121
Masa [kg]	150,7	1075,8	9350
$Q_{\text{calentamiento}}$ [kJ]	66772,2	476665,5	4142798,1

En la tabla 4.42 se pueden observar los resultados de las masas de vapor requeridas para la esterilización del medio de cultivo.

Tabla 4.42 Cantidades requeridas de vapor para esterilización

Parámetro	F3	F4	F5
Masa de vapor calentamiento [kg]	30,4	216,8	1884,0
Masa de vapor mantención [kg]	30,4	216,8	1884,0

4.5 RECUPERACIÓN (DOWNSTREAM)

Las operaciones para la recuperación serán centrifugación para la separación de células; extracción por surfactante (CPE) acompañado de una centrifugación para acelerar el proceso de formación de dos fases y cromatografía de intercambio aniónico para la purificación; y finalmente evaporación y secado para el acabado.

4.5.1 Balance de masa en la centrifugación (C-1)

Las condiciones iniciales de la centrifugación serán las finales provenientes de la fermentación por cultivo por lote alimentado. En la figura 4.7 se puede apreciar las corrientes de entrada y de salida

correspondientes a la centrifuga 1, en donde la corriente por tope es la corriente de sólidos retenidos (M14) mientras que la corriente por fondo corresponde al líquido clarificado (M15).

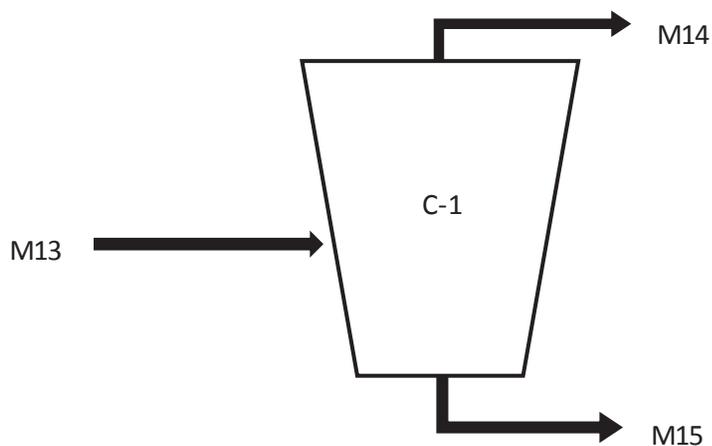


Figura 4.7 Esquema para C-1

Donde:

- M13: Caldo de cultivo proveniente de la fermentación;
- M14: Biomasa
- M15: Caldo clarificado

Considerando una retención de células de un 99,5%, la ecuación 4.30 permite obtener la cantidad de células al final de la centrifugación en la corriente de clarificado.

$$c_{13} \cdot V_{13} \cdot 0,005 = c_{14} \cdot V_{14}$$

Ecuación 4.30

Donde:

- c_{13} : Concentración celular en la alimentación; 6,1 [g/L]
- V_{13} : Volumen de la alimentación; 850 [L]
- c_{14} : Concentración celular en la corriente de biomasa; [g/L]

- V_{14} : Volumen de la corriente de biomasa; [L]

Asumiendo que el líquido clarificado es un 95% del volumen inicial y que la concentración de ácido p-cumárico permanece constante a la entrada y a las salidas, la tabla 4.43 muestra el resultado de lo expresado anteriormente.

Tabla 4.43 Condiciones iniciales y finales de la biomasa en la centrifugación 1

Parámetros	M13	M14	M15
Volumen [L]	425	21,25	403,5
Masa total [kg]	467,5	64	403,5
Células [g]	2592,5	2579,5	13
Concentración celular [g/L]	6,1	121,32	0,032
Ácido p-cumárico [g]	744,94	37,24	707,69

4.5.2 Balance de Energía en la centrifugación (C-1)

Durante esta operación además se genera un aumento de la temperatura, que viene dado por:

$$Q = m_{F3} \cdot \overline{Cp}_{F3} \cdot (T_{F3} - T_{ref}) - m_{F1} \cdot \overline{Cp}_{F1} \cdot (T_{F1} - T_{ref})$$

Ecuación 4.31

Donde:

- Q : Calor generado en el equipo, equivalente a su consumo; 3,7 [kW]
- m_{F1}, m_{F3} : Flujo másico de la corriente de entrada y salida del equipo; [kg/s]
- $\overline{Cp}_{F1}, \overline{Cp}_{F3}$: Capacidad calorífica promedio de las corrientes de entrada y salida; [kJ/kg °C]

- T_{F1}, T_{F3}, T_{ref} : Temperatura de la corriente de entrada, salida y referencia [°C]

Si se considera la temperatura de referencia como 0 [°C] y como aproximación las mismas capacidades caloríficas con un valor de 4,18 [kJ/kg °C] se puede calcular de acuerdo a la Ecuación 4.31 como:

$$3,7 [kW] = 0,118 \cdot 4,18 \cdot (T_{F3} - 0) - 0,1298 \cdot 4,18 \cdot (30 - 0)$$

$$T_{F3} = 40,5 [°C]$$

4.5.3 Condiciones para la CPE (Cloud-Point Extraction)

En esta etapa se agrega el surfactante Pluronic L92 al líquido clarificado. La mezcla se centrifuga para acelerar el proceso de formación de dos fases, una fase acuosa y una rica en surfactante. Esta última es también la fase rica en p-cumárico. La figura 4.8 ilustra las corrientes de entrada y salida para la CPE.

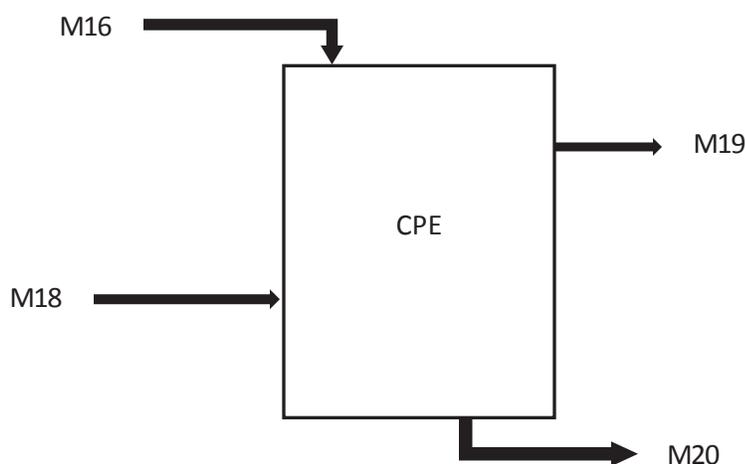


Figura 4.8 Diagrama de bloque de la CPE

Donde:

- M16: Líquido clarificado
- M18: Pluronic L92
- M19: Fase acuosa
- M20: Fase rica en surfactante

El balance de masa global y el balance de masa al ácido p-cumárico se presentan en las siguientes ecuaciones:

$$M16 + M18 = M19 + M20$$

Ecuación 4.32

$$V16 \cdot c_{16} = V19 \cdot c_{19} + V20 \cdot c_{20}$$

Ecuación 4.33

Donde:

- V16, V19 y V20: volúmenes de cada corriente [L]
- c_{16} , c_{19} y c_{20} : concentraciones de p-cumárico en cada corriente [g/L]

Para facilitar la presentación de los datos del balance en la CPE, se modificará la nomenclatura como se muestra a continuación:

- M16, V16, $c_{16} = M_0, V_0, c_0$
- M18, V18, $c_{18} = M_{L92}, V_{L92}, c_{L92}$
- M19, V19, $c_{19} = M_a, V_a, c_a$
- M20, V20, $c_{20} = M_s, V_s, c_s$

De acuerdo a los datos presentados en la tabla 3.6 para la extracción de ácido p-cumárico mediante distintos surfactantes (Dhamole, Demanna, & Desai, 2014), es posible realizar los

cálculos de balance de masa para la extracción. La tabla 4.44 resume los parámetros fundamentales para realizar el balance con el surfactante elegido.

Tabla 4.44 Parámetros de extracción de ácido p-cumárico utilizando Pluronic L92 al 5% v/v

Parámetros	Valor
Factor de Enriquecimiento $FE = (c_s/c_0)$	10,3
Razón de Reducción de Volumen $RRV = (V_0/V_s)$	13
Coefficiente de Partición = (c_s/c_a)	55,4

Las condiciones iniciales son conocidas, debido a que son las finales de la centrífuga ($V_0 = 807,5$ L y $C_0 = 1,7$ g/L). La ecuación 4.34 y 4.35 ilustran cómo calcular las condiciones de la fase rica en surfactante, basados en los parámetros de la tabla anterior.

$$c_s = FE \cdot c_0 = 10,3 \cdot 1,7 \left[\frac{g}{L} \right] = 17,51 \left[\frac{g}{L} \right]$$

Ecuación 4.34

$$V_s = \frac{V_0}{VRR} = \frac{807,5 [L]}{13} = 62,11 [L]$$

Ecuación 4.35

Para calcular la concentración de ácido p-cumárico remanente en la fase acuosa, se utilizará la ecuación 4.36.

$$c_a = \frac{c_s}{Coef.P} = \frac{17,51 \left[\frac{g}{L} \right]}{55,4} = 0,316 \left[\frac{g}{L} \right]$$

Ecuación 4.36

Para calcular el volumen de dicha fase se recurrirá a la ecuación 4.33, el balance de masa al producto.

$$807,5 [L] \cdot 1,7 \left[\frac{g}{L}\right] = V19 [L] \cdot 0,316 \left[\frac{g}{L}\right] + 62,11[L] \cdot 17,51\left[\frac{g}{L}\right]$$

$$1372,75[g] = V19 [L] \cdot 0,316 \left[\frac{g}{L}\right] + 1087,64[g]$$

$$V19 = 902,06 [L]$$

La cantidad de ácido p-cumárico en la fase acuosa es posible calcularla por simple resta del balance al producto o multiplicando la concentración por el volumen anteriormente calculado. Dicha cantidad de producto es demasiada como para descartarla (285 g), por lo que se harán sucesivas CPE recirculando la corriente de la fase acuosa hasta que la cantidad de producto en la fase acuosa sea menor a 5 g. La tabla 4.45 presenta las condiciones de entrada y salida para cada extracción, mientras que la tabla 4.46 presenta la cantidad de producto por cada extracción.

Tabla 4.45 Condiciones de entrada y salida de los flujos por cada CPE

Extracción	V_0 [L]	c_0 [g/L]	V_s [L]	c_s [g/L]	V_a [L]	c_a [g/L]
CPE 1	807,5	1,7	62,11	17,51	902,06	0,316
CPE 2	902,06	0,316	69,38	3,255	1007,69	0,058
CPE 3	1007,69	0,058	77,51	0,605	1125,69	0,010
CPE 4	1125,69	0,010	86,59	0,112	1257,51	0,002

Tabla 4.46 Masa de producto por cada CPE

Extracción	pCA_0 [g]	pCA_s [g]	pCA_a [g]
CPE 1	1372,75	1087,64	285,10
CPE 2	285,10	225,89	59,21
CPE 3	59,21	46,91	12,29

CPE 4	12,29	9,74	2,55
-------	-------	------	------

Por lo tanto, para cada ciclo de CPE se realizan 4 extracciones, ya que en la última extracción la cantidad de producto (2,55 [g]) es menor a los 5 [g]. La fase rica en surfactante se acumula en un estanque hasta completar el ciclo de 4 extracciones, llegando así a un volumen de 295,6 [L] y una concentración de producto de 4,635 [g/L], lo que equivale a 1370,19 [g] de ácido p-cumárico.

Dado que las corrientes poseen una densidad igual a 1000 [kg/m³], los requerimientos de surfactante es posible calcularlos mediante el balance global presentado en la ecuación 4.32. La figura 4.9 resume el proceso, ilustrando las 4 extracciones que componen un ciclo de CPE para alcanzar un 99,81% de eficiencia, entendiendo ésta como la razón entre la masa del producto final y la masa de producto inicial. La tabla 4.47 resume los flujos másicos del proceso de CPE.

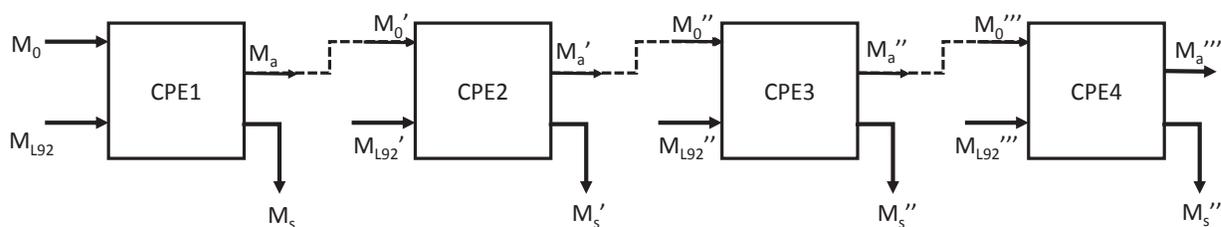


Figura 4.9 Representación gráfica de un ciclo de CPE con 4 extracciones

Tabla 4.47 Flujos másicos de un ciclo de CPE

Extracción	M_0 [kg]	M_{L92} [kg]	M_s [kg]	M_a [kg]
CPE 1	807,5	156,67	62,11	902,06
CPE 2	902,06	175,02	69,38	1007,69
CPE 3	1007,69	195,51	77,51	1125,69

CPE 4	1125,69	218,41	86,59	1257,51
-------	---------	--------	-------	---------

4.5.4 Balance de Energía a la CPE

Si bien la mezcla de alimentación más L92 debe elevar su temperatura por sobre el punto nube del surfactante para luego pasara la centrífuga con el fin de acelerar el proceso de separación en dos fases, el balance de energía a la CPE se hará sólo en la centrífuga. Esto se debe a que la temperatura de punto nube del surfactante es 26 [°C] y la temperatura del líquido clarificado a la salida de la centrífuga es de aproximadamente 40 [°C]. Por lo tanto, no hay necesidad de calentar la mezcla antes de alimentar la centrífuga y separar ambas fases.

De acuerdo a lo anterior, se utilizará la ecuación 4.31 para el balance de energía a la centrífuga. Se considera nuevamente la temperatura de referencia como 0 [°C] y como aproximación las mismas capacidades caloríficas con un valor de 4,18 [kJ/kg °C]. La temperatura de la alimentación será de 36 [°C], realizando un cálculo de acuerdo a las proporciones volumétricas entre el líquido clarificado y el surfactante y sus respectivas temperaturas, asumiendo que el surfactante se mantiene a una temperatura de 20 [°C].

Al reemplazar los datos en la ecuación 4.31 se tiene:

$$3,7 [kW] = 0,158 \cdot 4,18 \cdot (T_{F3} - 0) - 0,1741 \cdot 4,18 \cdot (36 - 0)$$

$$T_{F3} = 45,2 [°C]$$

A pesar de que no se necesita elevar la temperatura para llegar al punto nube y formar la micela que retiene el ácido p-cumárico y formar dos fases, es necesario posteriormente bajar la temperatura para romper la micela. Previo a realizar la cromatografía de intercambio iónico para recuperar el ácido p-cumárico, se debe disminuir la temperatura de la fase rica en surfactante hasta llegar a 22 [°C].

El estanque que recibe la fase rica en surfactante contará con un serpentín con agua a 10 [°C] que enfriará la solución en la que se encuentra el producto. Para calcular el calor transferido (Q) se utiliza la ecuación 4.37:

$$Q = cp_1 \cdot m_1 \cdot (T_1 - T_2) = cp_2 \cdot m_2 \cdot (t_2 - t_1)$$

Ecuación 4.37

Donde:

- cp_1 : capacidad calorífica corriente caliente, [kcal/kg °C]
- m_1 : masa corriente caliente, [kg]
- T_1 : Temperatura inicial corriente caliente, [°C]
- T_2 : Temperatura final corriente caliente, [°C]
- Análogo para cp_2 , m_2 , t_1 y t_2 .

Asumiendo una capacidad calorífica de 1 [kcal/kg °C] para la corriente caliente y reemplazando los valores, se tiene:

$$Q = 1 \text{ [kcal/kg °C]} \cdot 295,6 \text{ [kg]} \cdot (45 - 22) \text{ [°C]} = 6798 \text{ [kcal]}$$

4.5.5 Balance de masa a la cromatografía de intercambio aniónico (C-IA)

El proceso de purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico se basó en la cromatografía utilizada en el caso de extracción de p-cumárico por hidrólisis alcalina (Ou, Luo, & Huang, 2009), por lo tanto, algunos de los cálculos y balances están en directa relación y proporción a la información entregada en dicho estudio.

Debido a que ésta es una operación por lotes y las cantidades y los flujos de entrada son independientes el uno del otro, el balance se hará en base a las masas totales y no a los flujos másicos. La figura 4.10 representa un esquema de la cromatografía de intercambio aniónico.

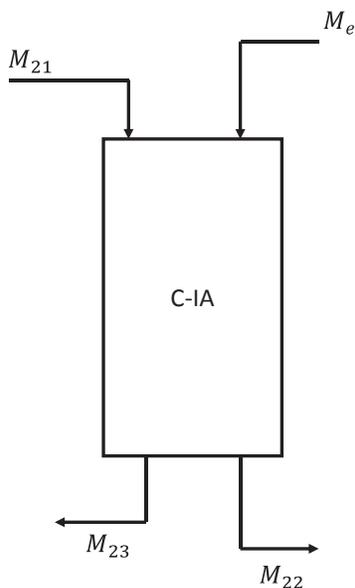


Figura 4.10 Esquema para C-IA

Donde:

- M_{21} : Masa a alimentar, proveniente del estanque E-5; 295,6 [kg]
- M_e : Masa del eluyente; [kg]
- M_{22} : Masa de eluyente + p-cumárico; [kg]
- M_{23} : Masa de solución con L92; [kg]

4.5.6 Determinación de la masa de resina (C-IA)

A pesar de que la capacidad de intercambio teórica es de 3,6 [mmol/mL], la máxima capacidad de intercambio para el ácido p-cumárico utilizando la resina 717 fue de 138,5 [mg/mL] (0,84 [mmol/mL]). Mediante las ecuaciones 4.38 y 4.39 es posible determinar la cantidad de resina necesaria para retener el ácido p-cumárico proveniente de la alimentación.

$$V_r = \frac{n_{pCA}}{C. Int. molar} \quad o \quad V_r = \frac{M_{pCA}}{C. Int. másica}$$

Ecuación 4.38

$$M_r = V_r \cdot \rho$$

Donde:

- n_{pCA} : moles de ácido p-cumárico en la corriente de alimentación; 8,35 [mol]
- C. Int. Molar: capacidad de intercambio molar; 0,84 [mmol/mL]
- MpCA: gramos de ácido p-cumárico en la corriente de alimentación; 1370,11 [g]
- C. Int. Másica: capacidad de intercambio másica; 138,5 [mg/mL]
- ρ : Densidad de la resina; 1,1 [g/mL]

Reemplazando los valores en la ecuación se tiene,

$$V_r = \frac{8350 \text{ [mmol]}}{0,84 \left[\frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \right]} = \frac{1370,11 \text{ [g]}}{0,1385 \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right]} = 9940,5 \text{ [mL]} = 9,94 \text{ [L]}$$

$$M_r = 9940,5 \text{ [mL]} \cdot 1,1 \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right] = 10934 \text{ [g]} = 10,93 \text{ [kg]}$$

4.5.7 Determinación del flujo de alimentación (C-IA)

El flujo de alimentación a través de la resina aniónica afecta significativamente la adsorción del producto. Cuando el flujo aumentó de 0,1 a 0,5 mL por mL de resina por minuto, la razón de intercambio disminuyó en un 22,1% (Ou, Luo, & Huang, 2009). Es por esto que se alimentará con un flujo de $0,1 \frac{[\text{mL}]}{[\text{mL resina}][\text{min}]}$. Conociendo el volumen de la resina, se tiene que el flujo de alimentación es de 0,994 [L/min], es decir; 56,64 [L/h]. Considerando que la alimentación corresponde a 295,6 [L], dicha operación se completará en 5,2 [h].

Se asume una razón de intercambio de un 90% (razón entre p-cumárico adsorbido y p-cumárico en la alimentación), por lo que al finalizar dicha etapa, el surfactante no iónico L92 habrá pasado a través de la columna y podrá utilizarse nuevamente en la etapa de CPE, junto a un 10% del producto.

4.5.8 Determinación del flujo de eluyente (C-IA)

Para eluir el producto, se escogió una mezcla de H₂O/etanol/HCl (36:60:4). Esto se debe a que luego de probar con distintas mezclas de ácidos y etanol, dicha proporción fue la que brindó el mayor porcentaje de recuperación (99,01%), entendiendo éste como la razón entre el ácido p-cumárico [mg] en el eluyente y el ácido p-cumárico adsorbido [mg] (Ou, Luo, & Huang, 2009). Guardando la proporción de 6 [mL] de eluyente por [mL] de resina, se necesitarán 59,64 [L] de eluyente, los que se aproximan a 60 [L] para efecto de facilitar los cálculos. El flujo de eluyente será alimentado a una razón de 0,4 [L/min], completando dicha operación en 2,5 [h].

Para determinar el flujo másico de eluyente se utilizará la ecuación 4.40.

$$M_e = V_e \cdot \rho$$

Ecuación 4.40

Donde:

- V_e : Volumen de eluyente; 0,06 [m³]
- ρ : Densidad del eluyente; [kg/m³]

Considerando que el eluyente es una mezcla de soluciones, se debe calcular su densidad mediante la ecuación 4.41.

$$\frac{1}{\rho} = \frac{x_{HCl}}{\rho_{HCl}} + \frac{x_{H_2O}}{\rho_{H_2O}} + \frac{x_{etanol}}{\rho_{etanol}}$$

Ecuación 4.41

Donde:

- x_{HCl} : Fracción de HCl; 0,04
- ρ_{HCl} : Densidad del HCl; 1190 [kg/m³]

- x_{H_2O} : Fracción de H₂O; 0,36
- ρ_{H_2O} : Densidad del H₂O; 1000 [kg/m³]
- x_{etanol} : Fracción de etanol; 0,6
- ρ_{etanol} : Densidad de etanol; 789 [kg/m³]

Reemplazando los datos se tiene una densidad del eluyente de 866,5 [kg/m³] y multiplicándola por el volumen de eluyente se puede obtener la masa.

$$M_e = 0,06 [m^3] \cdot 866,5 \left[\frac{kg}{m^3} \right] = 51,99 [kg]$$

La figura 4.11 muestra el comportamiento de la curva de elución a nivel de laboratorio del ácido p-cumárico en la resina aniónica eluída con 150 [mL]. El producto pudo ser detectado a los 30 [mL] y el *peak* apareció a los 50 [mL]. Después de 80 [mL] de eluyente, 87% del ácido p-cumárico adsorbido fue lavado (Ou, Luo, & Huang, 2009).

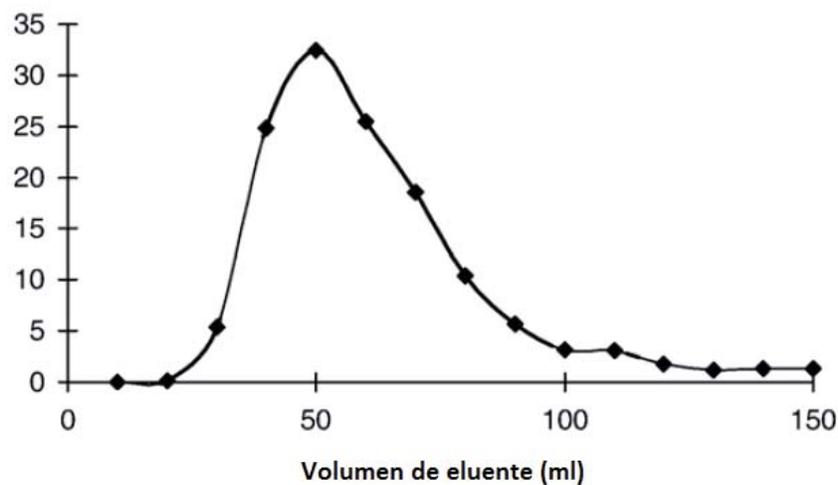


Figura 4.11 Curva de elución de ácido p-cumárico en la resina aniónica 717

Asumiendo un comportamiento similar en la columna a pequeña escala industrial, ésta se lavará con 60 [L], de los cuales se descartarán los primeros 8 [L]. Los 52 [L] restantes serán secados posteriormente.

Con los cálculos realizados, es posible completar el balance presentado en la figura 4.10. En la tabla 4.48 se resumen las condiciones de entrada y de salida de las distintas corrientes.

Tabla 4.48 Condiciones iniciales y finales de C-IA

Parámetros	M_{21}	M_e	$M_{22'}$	M_{22}	M_{23}
Masa total [kg]	295,6	51,99	6,93	46,29*	294,37
Ácido p-cumárico [kg]	1,370	0	0	1,2331	0,1369
L92 [kg]	38,35	0	0	0	38,35
pCA [% p/p]	0,463	0	0	2,66	0,046

*Considerando que se descartan los primeros 6,93 [kg] (8 [L])

4.4.9 Balance de masa a la Evaporación EV-01

Para la evaporación se utilizará un evaporador rotatorio con una capacidad máxima de 100 [L]. En la sección 5.10 se explica la razón de la elección con los respectivos argumentos. El objetivo del rotavapor en este caso no es realizar una destilación fraccionada de los solventes, sino que evaporar la mezcla de solventes. La tabla 4.49 detalla la composición del eluyente, incluyendo además los puntos de ebullición de cada componente.

Tabla 4.49 Condiciones iniciales de la solución a evaporar

	Volumen [L]	Densidad [kg/m^3]	Punto de ebullición [$^{\circ}\text{C}$]
Total	52	866,5	
Etanol	31,2	789	78,37

Agua	18,72	1000	99,97
HCl	2.08	1190	48

La figura 4.12 representa un esquema del evaporador y sus corrientes.

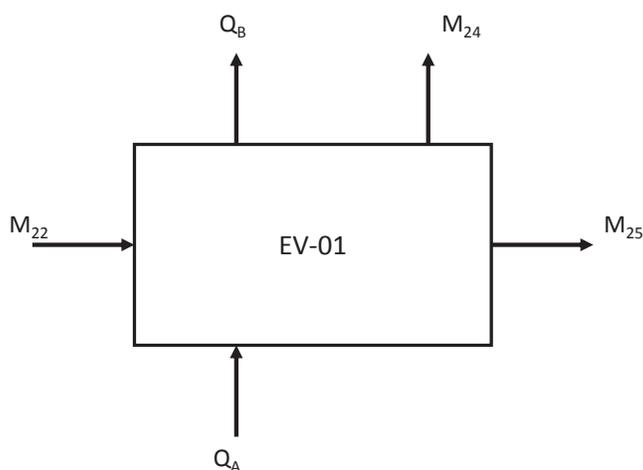


Figura 4.12 Esquema de evaporador EV-01

Para el balance de masa global se tiene

$$M_{22} = M_{24} + M_{25}$$

Ecuación 4.42

Y para el balance de masa al producto se tiene

$$M_{22} \cdot x_{22}^{pCA} = M_{25} \cdot x_{25}^{pCA}$$

Ecuación 4.43

Donde:

- M_{22} : Corriente de alimentación al evaporador; 46,29 [kg]
- x_{22}^{pCA} : Porcentaje en peso del ácido p-cumárico en la corriente de alimentación; 2,66 [% p/p]

- M_{24} : Corriente de solventes evaporados; [kg]
- M_{25} : Corriente de producto concentrado; [kg]
- x_{25}^{pCA} : Porcentaje en peso del ácido p-cumárico en la corriente de salida; [% p/p]

Asumiendo una eficiencia del 90%, entendiendo ésta como la razón entre la cantidad de solución evaporada y la cantidad de solución inicial, se logra concentrar el producto de un 2,66 [% p/p] a un 26,63 [% p/p]. Es importante considerar que los componentes de la mezcla poseen distinto punto de ebullición, por lo que unos se evaporarán antes que otros. La tabla 4.50 presenta las condiciones de salida del evaporador, estimando el comportamiento de la solución. Se asume que se evapora todo el HCl, un 99% del etanol y aproximadamente un 19% del agua.

Tabla 4.50 Condiciones finales de las corrientes del evaporador EV-01

Parámetros	M_{22}	M_{24}	M_{25}
Ácido p-cumárico [kg]	1,2331	0	1,2331
pCA [% p/p]	2,66	0	26,63
Etanol	27,05	26,78	0,27
Agua	16,22	13,0941	3,1259
HCl	1,8	1,8	0
Total [kg]	46,29	41,661	4,629

4.4.10 Balance de energía a la Evaporación EV-01

Considerando que la operación en el evaporador rotario ocurre por lotes, para realizar un balance de energía se calculará la energía necesaria para evaporar la corriente M_{24} y el tiempo aproximado que esto requeriría en el evaporador.

La cantidad de calor necesario para evaporar la corriente M_{24} viene dado por la ecuación 4.44:

$$Q = M \cdot \lambda$$

Ecuación 4.44

Donde:

- Q: Calor necesario para evaporar la corriente; [kJ]
- M: Masa a evaporar; [kg]
- λ : Calor de vaporización; [kJ/kg]

Debido a que la corriente a evaporar es una solución compuesta por tres compuestos, se calculará un calor de vaporización de la solución a partir del calor de vaporización de cada compuesto y de su porcentaje en la corriente. La tabla 4.51 presenta los calores de vaporización de cada compuesto y el calor de vaporización de la corriente.

Tabla 4.51 Calores de vaporización

Compuesto	Calor de vaporización [kJ/kg]	Fracción másica	Calor de vaporización parcial [kJ/kg]
Etanol	841	0,64	709,54
Agua	2257	0,31	540,48
HCl	448,7	0,04	19,38
Total			1269,4

De acuerdo a lo anterior y reemplazando en la ecuación 4.44 se tiene:

$$Q = 41,67 \text{ [kg]} \cdot 1269,4 \left[\frac{\text{kJ}}{\text{kg}} \right] = 52895,5 \text{ [kJ]}$$

Para calcular el tiempo que durará el lote de evaporación, es necesario saber la potencia con que se operará el evaporador. Según las características del equipo escogido, la potencia del evaporador es de 9 [kW]. Mediante la ecuación 4.45 es posible calcular el tiempo del lote.

$$t = \frac{Q}{P}$$

Ecuación 4.45

Reemplazando los datos se tiene:

$$t = \frac{52895,5 \text{ [kJ]}}{9 \text{ [} \frac{\text{kJ}}{\text{s}} \text{]}} \cdot \frac{1 \text{ [h]}}{3600 \text{ [s]}} = 1,63 \text{ [h]}$$

4.4.11 Balance de masa al secador

En esta operación se desea obtener un concentrado de p-cumárico en polvo, por lo que se requiere retirar toda la humedad del producto. Debido a que los flujos son muy pequeños y el evaporador opera por lotes, se acumulará el flujo de salida del evaporador en un estanque hasta que haya un volumen considerable para operar el secador. Por lo tanto, se acumularán 10 lotes en el estanque y luego se operará el secador. La figura 4.13 ilustra el diagrama de bloques de la operación.

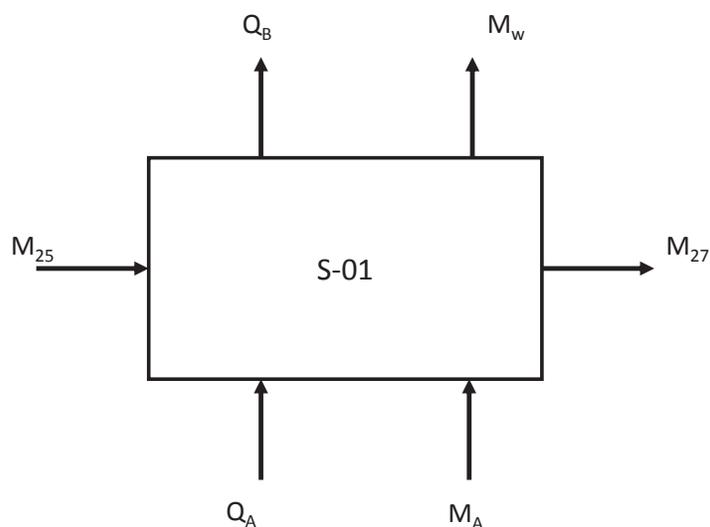


Figura 4.13 Diagrama de bloques del secador

Para el balance de masa global se tiene

$$M_{25} = M_w + M_{27}$$

Ecuación 4.46

Y para el balance de masa al producto se tiene

$$M_{25} \cdot x_{25}^{pCA} = M_{27} \cdot x_{27}^{pCA}$$

Ecuación 4.47

Donde:

- M_{25} : Corriente de alimentación al evaporador; 46,29 [kg]
- x_{25}^{pCA} : Porcentaje en peso del ácido p-cumárico en la corriente de alimentación; 26,63 [% p/p]
- M_w : Corriente de solventes evaporados; [kg]
- M_{27} : Corriente de producto concentrado; [kg]
- x_{27}^{pCA} : Porcentaje en peso del ácido p-cumárico en la corriente de salida; 100 [% p/p]

Con los datos que se tienen es posible resolver ambas ecuaciones del balance de masa. El flujo de entrada al evaporador será de 2,72 [kg/h] por lo que se seleccionará un evaporador cuya capacidad de evaporación sea de 2 [L/h]. La tabla 4.52 resume las condiciones de entrada y salida del secador.

Tabla 4.52 Balance de masa al secador S-1

Compuesto	M_{25} [kg/h]	M_{25} [%p/p]	M_{27} [kg/h]	M_{27} [%p/p]
Agua	1,837	67,6	0	0
Etanol	0,159	5,8	0	0
Ácido p-cumárico	0,724	26,6	0,724	100
Total	2,72		0,724	

El agua por su parte se traspasa al aire de acuerdo a la ecuación 4.48

$$M_{af} = M_{ai} + M_w$$

Ecuación 4.48

Donde:

- M_{af} : Flujo másico de aire a la salida del secador; [kg/h]

- M_{ai} : Flujo másico de aire a la entrada del secador; [kg/h]
- M_w : Flujo másico de agua evaporada; [kg/h]

Para el balance de masa al aire utilizado en esta operación se utilizan las propiedades del aire promedio de la Región de Valparaíso. Como se menciona en la sección 5.9, el aire es calentado hasta 170 [°C], saliendo luego a 80 [°C] del proceso. Si bien se conocen las características del equipo, es necesario saber la cantidad de aire que se debe alimentar para obtener el secado deseado. Considerando que el secador escogido opera a un flujo recomendado de aire de 80 [kg/h], se realiza el balance de masa al aire como:

$$M_{a0} = 80 \left[\frac{kg \text{ aire}}{hr} \right] + 80 \left[\frac{kg \text{ aire}}{hr} \right] \cdot 0,01 \left[\frac{kg \text{ agua}}{kg \text{ aire seco}} \right] = 80,8 \left[\frac{kg}{h} \right]$$

$$M_{af} = 80,8 \left[\frac{kg}{h} \right] + 2 \left[\frac{kg}{h} \right] = 82,8 \left[\frac{kg}{h} \right]$$

La ecuación 4.49 representa el balance de masa al aire. Se considera que en esta operación solamente el aire cambia su temperatura, siendo constante la temperatura del producto. Mediante dicha ecuación es posible calcular la humedad absoluta del agua a la salida.

$$G \cdot (Y_2 - Y_1) = F_{ss} \cdot (m_1 - m_2)$$

Ecuación 4.49

Donde:

- G : Flujo másico de aire seco; [kg/h]
- F_{ss} : Flujo másico de sólidos secos en el producto; [kg/h]
- m_1, m_2 : Humedad absoluta de los sólidos a la entrada y salida respectivamente; [kg agua/Kg sólido seco]

- Y_1, Y_2 : Humedad absoluta del aire a la entrada y salida respectivamente; [kg agua/kg aire seco]

Al reemplazar los datos en la ecuación se tiene:

$$80 \left[\frac{kg}{h} \right] \cdot (Y_2 - 0,01) = 0,72 \left[\frac{kg}{h} \right] \cdot (2,48 - 0)$$

$$Y_2 = 0,032 \left[\frac{kg \text{ agua}}{kg \text{ aire seco}} \right]$$

4.6 Secado en bandejas de la biomasa

El tratamiento del desecho de la centrifugación del caldo de cultivo consiste en un secado en bandejas del pellet.

4.6.1 Balance de masa del secado

Se considerará, que tanto las células como el caldo se deshidratarán un 90%. Además, la entrada al secado es la acumulación de un lote de funcionamiento de la salida de la centrifugación 1, por lo que se utilizarán los valores de la corriente M14 de la figura 4.7.

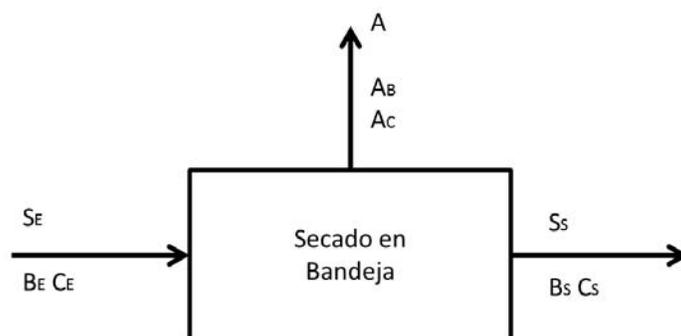


Figura 4.14 Diagrama de bloques secado en bandejas

Donde:

- S_E : masa total entrada secado = 2560 [kg]
- B_E : biomasa entrada = 515,9 [kg]
- C_E : masa de líquido sin células
- A : masa de agua evaporada
- A_B : masa de agua evaporada de biomasa
- A_C : masa de agua evaporada de líquido sin células
- S_S : masa salida secado
- B_S : biomasa salida secado
- C_S : masa de líquido salida

Los balances de masa a considerar son los siguientes:

$$A = A_B + A_C$$

Ecuación 4.50

$$S_E = B_E + C_E$$

Ecuación 4.51

$$C_E = A_C + C_S$$

Ecuación 4.52

$$B_E = A_B + B_S$$

Ecuación 4.53

$$A = A_B + A_C$$

Ecuación 4.54

$$S_E = A + S_S$$

Ecuación 4.55

Los resultados del balance de masa se detallan en la tabla 4.53

Tabla 4.53 Resultados de balance de masa secado de residuos

Corriente	Masa [kg]
C _E	2044,10
C _S	204,41
B _S	51,59
A	2304
S _S	256

REFERENCIAS CAPÍTULO 4

- Acevedo, F., Gentina, J. C., & Illanes, A. (2002). *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica*. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Bailey, J. E., & Ollis, D. F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill.
- Gentina, J. C. (2013). Curso Ingeniería en Procesos de Fermentación, EIB, PUCV. Valparaíso.
- Gomez, E., Santos, V. E., Alcon, A., Martin, A. B., & Garcia-Ochoa, F. (2006). Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: Influence on Biodesulfurization (BDS) Capability. *Energy & Fuels*, 1565-1571.
- Kern, D. (2001). *Procesos de Transferencia de Calor*. Delegación Azcapotzalco.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2011). *Brock Biology of Microorganisms*.
- Ou, S., Luo, Y., & Huang, C. (2009). Production of coumaric acid from sugarcane bagasse. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 253-259.
- Smith, J., Van Ness, H., & Abbot, M. (1996). *Introducción a la Termodinámica en la Ingeniería Química*. Asturias (México): McGraw-Hill.

CAPÍTULO 5

DISEÑO Y SELECCIÓN DE EQUIPOS

5.1 ESTANQUES PARA MEDIO DE CULTIVO

Los estanques que se requieren para las distintas disoluciones de medio de cultivo tienen como fin realizar una mezcla homogénea entre los nutrientes y el agua. Para este ítem se tienen los siguientes estanques a diseñar. Estanque de elementos de disolución de elementos traza, de medio de cultivo, de L-fenilalanina y de glucosa.

Con el fin de tener los mismos parámetros a considerar para todos los estanques, se tomará en cuenta la figura 5.1; en la cual se detallan las nomenclaturas que se utilizarán en el diseño de los equipos para el proceso.

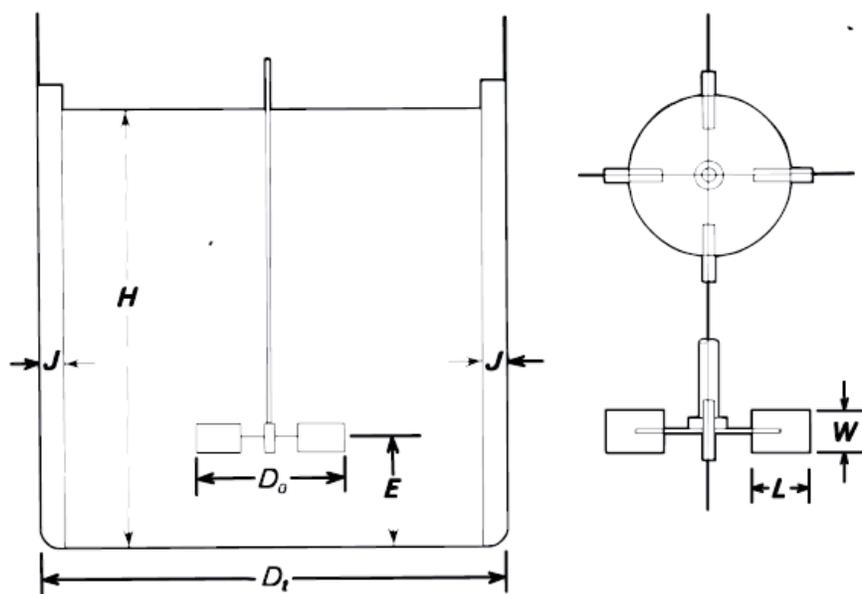


Figura 5.1: Nomenclatura normalizada para estanques de agitación

Donde:

- H: altura de estanque [m]
- D_t : diámetro de estanque [m]
- D_a : diámetro de agitador [m]
- E: altura entre agitador y fondo [m]
- J: largo de bafle [m]
- W: alto de pala de turbina [m]
- L: largo de pala de turbina [m]

Por otro lado, las dimensiones del estanque se consideraran según las proporciones aconsejadas en bibliografía y se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 5.1 Razones geométricas recomendadas para el diseño de mezclador

Razón	Valor
H/D_t	1
D_t/D_a	3
E/D_a	1
W/D_a	0,2
L/D_a	0,25
D_t/J	12

Por otra parte, el volumen de los estanques está considerado para ser ocupado a aproximadamente un 85% de su capacidad. Los volúmenes de cada una de las disoluciones se detallan en el capítulo 4 de balance de masa. Para efectos de diseño, se considerará el cálculo del volumen del equipo ya realizado, para que el volumen de disolución ocupe el 85% del volumen del equipo. Luego el volumen del equipo está dado por

$$V = \pi \cdot \frac{T^2}{4} \cdot H$$

Ecuación 5.1a

Reemplazando la razón de altura/diámetro, se tiene que

$$V = \pi \cdot \frac{T^3}{4}$$

Ecuación 5.1b

A partir de la ecuación 5.1b se determina el diámetro del estanque según el volumen y con esto el resto de los parámetros.

Con respecto a la agitación, los estanques funcionarán a distintas velocidades de agitación según sea su volumen y el régimen de flujo que se requiera. Con la velocidad de agitación se verificará el régimen turbulento para luego calcular la potencia. Se tendrá en cuenta, que mientras más grande sea el diámetro del agitador, menor será la velocidad de agitación para una misma potencia.

5.1.1 Estanques de disolución de elementos traza y de L-fenilalanina

Como se estipuló en el capítulo de balance de masa, se requiere de un estanque de 450 [L]. Utilizando las razones geométricas recomendadas para el diseño de un mezclador detalladas en la tabla 5.1 y la ecuación 5.1b se llegan a los siguientes resultados, que se observan en la tabla 5.2.

Tabla 5.2 Valores de parámetros para mezclador disolución elementos traza y L-fenilalanina

Parámetro [m]	Valor
D_t	0,83
H	0,83
D_a	0,28
E	0,28
W	0,06
L	0,21
J	0,07

Luego, considerando un valor de velocidad de agitación de 150 [rpm] el valor adimensional de Reynolds se define como sigue.

$$Re = \frac{N \cdot D_a^2 \cdot \rho}{\mu}$$

Ecuación 5.2

Donde:

- Re: número de Reynolds
- N: velocidad de agitación [s^{-1}]
- D_a : diámetro agitador [m]
- μ : viscosidad del líquido [Kg/m/s]
- ρ : densidad del fluido [Kg/m³]

Para efectos de simplificación de cálculos, se asumirá el valor de la viscosidad y densidad igual a la del agua ($1 \cdot 10^{-3}$ [kg/m/s] y 1000 [kg/m³], correspondientemente). El número de Reynolds en este caso es

$$Re = 196000 \text{ (Flujo turbulento)}$$

Con esto, la potencia requerida está dada por la siguiente ecuación.

$$P = N_p \cdot \rho \cdot D_i^5 \cdot N^3$$

Ecuación 5.3

Donde:

- P: potencia de agitación [kW]
- N_p : número de potencia = 5

El número de potencia esta entre 5-6 para un flujo turbulento si se eligen turbinas Rushton (Acevedo et al., 2002).

A continuación se resumen los resultados correspondientes a la agitación.

Tabla 5.3 Resultados agitación estanque disolución traza y L-fenilalanina

Variable	Valor
Volumen de medio [m ³]	0,450
Velocidad de agitación [rps]	2,500
Diámetro agitador [m]	0,28
Densidad del fluido [kg/m ³]	1000

Viscosidad del fluido	0,001
Reynolds	196000
Número de potencia	5
Potencia de agitación [kW]	0,134
Potencia del motor [kW]	0,402
Número de impulsos	3

5.1.2 Estanque de disolución de medio de cultivo

El estanque de medio de cultivo tiene por función mezclar los nutrientes elementales para todas las fermentaciones y quedar como estanque de alimentación. Los cálculos de las dimensiones son homólogos a los realizados para el estanque de disolución de elementos traza. Es importante destacar que este estanque tiene un volumen de 4 [m³]. Los resultados se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 5.4 Valores de parámetros para mezclador disolución medio de cultivo

Parámetro [m]	Valor
D_t	1,72
H	1,72
D_a	0,57
E	0,57
W	0,11
L	0,43

J 0,14

Tabla 5.5 Resultados agitación estanque disolución medio de cultivo

Variable	Valor
Volumen de medio [m ³]	4,000
Velocidad de agitación [rps]	0,83
Diámetro agitador [m]	0,57
Densidad del fluido [kg/m ³]	1000
Viscosidad del fluido	0,001
Reynolds	269667
Número de potencia	5
Potencia de agitación [kW]	0,172
Potencia del motor [kW]	0,516
Número de impulsores	3

5.1.3 Estanque de disolución de glucosa

Para esta disolución de volumen igual a 11000 [L] se considerarán dos estanques agitadores de 6500 [L] cada uno. Así, cada uno estará aproximadamente a un 85% de su capacidad. Estos estanques tienen la función de alimentar a los fermentadores de 10 [m³] en su etapa de lote alimentado. Los cálculos de las dimensiones y agitación son análogos a los anteriormente mostrados. A continuación se muestran los resultados de un estanque agitador.

Tabla 5.6 Valores de parámetros para mezclador disolución de glucosa

Parámetro [m]	Valor
D_t	2,02
H	2,02
D_a	0,67
E	0,67
W	0,13
L	0,51
J	0,17

Tabla 5.7 Resultados agitación estanque disolución de glucosa

Variable	Valor
Volumen [m ³]	6,50
Velocidad de agitación [rps]	0,66
Diámetro agitador [m]	0,67
Densidad del fluido [kg/m ³]	1000
Viscosidad del fluido	0,001
Reynolds	296274
Número de potencia	5

Potencia de agitación [kW]	0,194
Potencia del motor [kW]	0,582
Número de impulsores	3

Los resultados de potencia de ambos estanques se detallan en la tabla 5.10

Tabla 5.8 Resultados agitación estanque disolución de L-fenilalanina

Variable	Total (ambos agitadores)
Potencia de agitación [kW]	0,388
Potencia del motor [kW]	1,164

5.2 BIOREACTORES

Al igual que en el diseño de agitadores, los parámetros que se calcularán según razones recomendadas para el diseño de fermentadores, pueden ser observados en la figura 5.2.

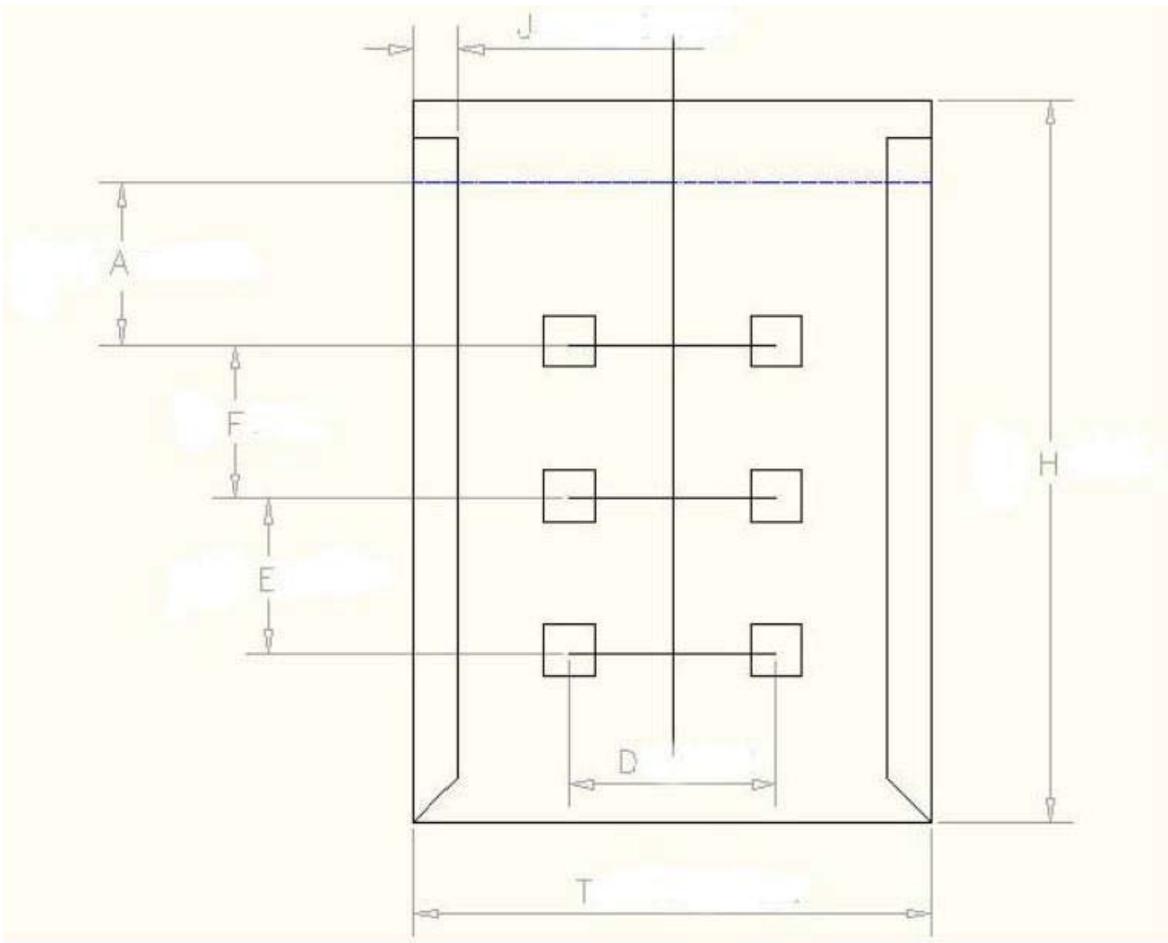


Figura 5.2 Nomenclatura normalizada para estanques (González & Salinas, 2011)

Donde:

- H : altura de estanque [m]
- T : diámetro de estanque [m]
- D : diámetro de agitador [m]
- A : altura entre primer agitador a la superficie [m]
- E : altura entre segundo y tercer agitador [m]
- F : altura entre primer y segundo agitador [m]
- J : largo de baffle [m]

Por otra parte, las razones recomendadas para la confección de los fermentadores de este tipo son detalladas según bibliografía y se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5.9 Razones geométricas recomendadas para el diseño de fermentador
(Acevedo *et al.*, 2002)

Razón	Valor
H/T	1 - 3
D/T	0,3 - 0,6
A/D	0,5 - 3
E/D, F/D	1 - 2
C/D*	0,8 - 1,5
J/T	0,08 - 0,1

*C no aparece como nomenclatura, pero es la distancia entre el tercer agitador y el fondo del fermentador

5.2.1 Bioreactor para FP1

Para esta fermentación, se utiliza un biorreactor pequeño de 1 [L] de marca New Brunswick™ BioFlo®. En consecuencia, no se utilizan las razones geométricas recomendadas ni la nomenclatura detallada en la figura 5.2.

5.2.2 Bioreactores para FP2, FP3, FP4 y FF

Correspondientemente con la figura 5.2 y las razones geométricas recomendadas para el diseño de fermentadores señaladas en la tabla 5.11, se resumen a continuación las dimensiones para los fermentadores de las distintas etapas. Cabe destacar, que también se detallan sus respectivos volúmenes.

Tabla 5.10 Resultados de dimensiones de fermentadores

Variable	Ferm.2	Ferm.3	Ferm.4	Ferm.5
V [L]	10	180	1200	10000
H [m]	0,317	1,67	3,14	6,37
T [m]	0,185	0,56	1,05	2,12
D [m]	0,074	0,22	0,42	0,85
A	0,111	0,33	0,63	1,27
E,F	0,074	0,22	0,42	0,85
C	0,074	0,22	0,42	0,85
J	0,019	0,06	0,10	0,21

Donde desde Ferm.2 hasta Ferm.5 corresponden a los fermentadores de las etapas previas hasta la final. Siendo dos fermentadores en las etapas FP4 y FF.

Para los cálculos de potencia de cada fermentador se utilizarán las ecuaciones 5.2 y 5.3 para determinar el número de Reynolds y la potencia no gaseada, respectivamente. Además, se considerarán las propiedades del agua para fines de simplificación y semejanza de cálculos. Por otro lado, la velocidad de agitación estimará dentro de los rangos recomendados en bibliografía (Acevedo et al., 2002); dónde se especifica que para fermentadores de laboratorio fluctúa entre los 200 y 1000 [rpm], mientras que para fermentadores industriales varía entre 50 y 300 [rpm].

La potencia de agitación con aireación será calculada mediante la ecuación de (Michel & Miller, 1962).

$$P_g = K \cdot \left(\frac{P^2 \cdot N \cdot D^3}{F^{0,56}} \right)^{0,45}$$

Ecuación 5.4

Donde:

- P_g : potencia gaseada [W]
- K: 1 para volúmenes de fermentación mayores a 1000 [L] y 0,72 para menores
- P: potencia no gaseada [W]
- N: velocidad de agitación [s^{-1}]
- D: diámetro del agitador [m]
- F: flujo de aire [m^3/s]

El flujo de aire necesario para cada fermentador fue determinado en el capítulo de balance de masa.

Tabla 5.11 Resultados de aireación de fermentadores

Variable	Ferm.2	Ferm.3	Ferm.4	Ferm.5
rps [s^{-1}]	3,33	2,50	1,67	1,33
Re	18253	121000	294000	963333
D [m]	0,074	0,22	0,42	0,85
N_p	5	5	5	5
P [kW]	$4,11 \cdot 10^{-4}$	$4,03 \cdot 10^{-2}$	0,303	5,259
K	0,72	0,72	1	1
F [m^3/s]	$1,14 \cdot 10^{-4}$	$7,30 \cdot 10^{-4}$	$5,21 \cdot 10^{-3}$	$5,67 \cdot 10^{-2}$

P_g [kW]	$1,63 \cdot 10^{-4}$	$2,42 \cdot 10^{-2}$	0,251	4,206
------------	----------------------	----------------------	-------	-------

5.2.3 Diseño de serpentines

El diseño de los serpentines de los distintos fermentadores se realizará según el método que presenta Acevedo et al. (2002). Para determinar el largo del serpentín y sus vueltas dentro del biorreactor se requiere saber el calor intercambiado, transferido (Q_i), el cual fue determinado en el capítulo 4 en la sección de balance de energía.

Al mismo tiempo, Q_i se puede definir según la siguiente ecuación.

$$Q_i = U \cdot A_s \cdot \Delta T$$

Ecuación 5.5

Donde:

- Q_i : calor transferido, intercambiado [kcal/h]
- U : coeficiente global de transferencia ($600 \left[\frac{\text{kcal}}{\text{h} \cdot \text{m}^2 \cdot ^\circ\text{C}} \right]$)
- A_s : área superficial de transferencia del serpentín
- ΔT : medio logarítmica entre $(T_f - T_2)$ y $(T_f - T_1)$
- T_f , T_2 , T_1 : temperatura fermentación (30[°C]), temperatura salida agua (30[°C]), temperatura ingreso agua (10[°C]); respectivamente.

Luego, con el área superficial requerida para cada fermentador y por ende con el largo del serpentín requerido, es posible calcular el número de vueltas del serpentín según la siguiente ecuación.

$$n = \frac{l}{p}$$

Ecuación 5.6

Donde:

- n: número de vueltas del serpentín
- l: longitud del serpentín [m]
- P: perímetro de la circunferencia que describe el serpentín [m]

Los diámetros externos considerados para los tubos de los serpentines son 0,010287 [m] y 0,033528 [m] para los fermentadores 2, 3 y 4, 5; respectivamente.

Los resultados del número de vueltas y largo de los serpentines de cada fermentador se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 5.12 Resultados del diseño de serpentines

Variable	Ferm.2	Ferm.3	Ferm.4	Ferm.5
Q_i [kcal/h]	408,9	8469,9	61196,3	612307
A_s [m ²]	0,034	0,706	5,100	51,026
l [m]	1,055	21,851	48,440	484,675
n	2	14	18	82

5.3 ESTERILIZACIÓN DE EQUIPOS

5.3.1 Autoclave

Para seleccionar el tamaño del autoclave se requiere saber la dimensión del equipo más grande que se esterilizará en él. Este es el fermentador 2 de 10[L]. En la tabla 5.15 se detallan las características del autoclave.

Tabla 5.13 Características del autoclave seleccionado

Modelo	Volumen [L]	Potencia [kW]	Dimensiones [mm]
LX-C35	35	2,5	480x480x940

5.3.4 Caldera

Para determinar el tamaño de la caldera es necesario conocer el flujo másico máximo de vapor que se requerirá en el proceso. Este corresponde a la esterilización del medio de cultivo del biorreactor de 10[m³]. El flujo requerido para satisfacer esta etapa es de 5022[kg/h] de vapor.

En la tabla 5.16 se resumen las características principales de la caldera escogida.

Tabla 5.14 Características de la caldera seleccionada

Modelo	Vapor [kg/h]	Potencia [kW]	Dimensiones [mm]
UL-S 6000	6000	20	6715x2674x3222

5.4 CENTRIFUGACIÓN

El proceso de centrifugación tiene por objetivo la eliminación de la biomasa, para obtener como resultado un líquido clarificado libre de células, pero que contenga el ácido p-cumárico. En una etapa posterior, para acelerar el proceso de extracción por surfactante (CPE), también se debe centrifugar. Sin embargo, la centrifugación para CPE consiste en una separación líquido-líquido, mientras que la centrifugación que viene inmediatamente después de la fermentación consiste en una separación sólido-líquido. Lo ideal es utilizar la misma centrífuga para ambos procesos y sólo tener la necesidad de cambiar un rotor o programarla para el tipo de separación, para ahorrar costos en adquisición de equipos. Bajo esta premisa, se escogió la centrífuga CLARA 20, de Alfa

Laval, ya que su módulo separador fue diseñado tanto para clarificar líquidos de sólidos, como para separar dos fases líquidas (Alfa Laval, 2014).

La centrífuga CLARA 20 de Alfa Laval fue diseñada para ser una unidad multipropósito en industrias como la industria alimentaria y de fermentación. Su capacidad y tamaño la hace ideal para escala piloto o para producciones en pequeña y mediana escala y, al ser una unidad de separación móvil, el área que ocupa es pequeña. Como se mencionó anteriormente, el separador se puede configurar ya sea como un clarificador para separar sólidos de un líquido o como un concentrador o purificador con el fin de separar dos fases líquidas, y posiblemente también partículas sólidas. La tabla 5.15 presenta las especificaciones técnicas de la centrífuga descrita (Alfa Laval, 2014).

Tabla 5.15 Especificaciones técnicas de la Centrífuga CLARA 20

Característica	Valor
Capacidad de rendimiento [m ³ /h]	1
Velocidad del tazón [rpm]	9 512
Fuerza centrífuga [g]	11 130
Volumen de líquido en el tazón [L]	2,2
Volumen de espacio de lodos [L]	Aprox. 1,1
Volumen de descarga fija [L]	1,1
Potencia del motor [kW]	3,7
Tiempo de inicio (puesta en marcha) [min]	3,5 - 4,5
Tiempo de parada, con freno [min]	3 - 4

Para el diseño del equipo se puede utilizar la Ecuación 5.7, la que determina la velocidad terminal de la partícula.

$$F = 2 \cdot v_g \cdot \Sigma$$

Ecuación 5.7

Donde:

- F : Flujo de operación de la centrífuga; 0,000118 [m³/s]
- v_g : Velocidad terminal de la partícula, [m/s]
- Σ : Factor de diseño, que corresponde al área equivalente de un sedimentador de altura H, que realiza igual trabajo que la centrífuga, [m²]

La velocidad terminal de la partícula a separar se calcula a su vez mediante la Ecuación 5.8:

$$v_g = \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot Dp^2 \cdot g}{18 \cdot \mu_l}$$

Ecuación 5.8

Donde:

- ρ_s : Densidad de la biomasa, 1100 [kg/m³]
- ρ_l : Densidad del caldo de cultivo, 1000 [kg/m³]
- Dp : Diámetro de la partícula; aproximadamente $1 \cdot 10^{-6}$ [m] para la *Pseudomonas putida*
- g : Aceleración de gravedad; 9,8 [m/s²]
- μ_l : Viscosidad del caldo de cultivo; 0,001 [kg/m·s]

Al reemplazar estos valores en la Ecuación 5.8 se obtiene:

$$v_g = \frac{(1100 - 1000) \cdot (1 \cdot 10^{-6})^2 \cdot 9,8}{18 \cdot 0,001} = 5,44 \cdot 10^{-8} \left[\frac{m}{s} \right]$$

Este valor de velocidad terminal se reemplaza luego en la ecuación 5.7, obteniéndose:

$$\Sigma = \frac{F}{2 \cdot v_g} = \frac{0,000118}{2 \cdot 5,44 \cdot 10^{-8}} = 1085,07 [m^2]$$

5.5 CPE (CLOUD POINT EXTRACTION)

5.5.1 Diseño del estanque E-5

El estanque E-5 será el que recibe el líquido clarificado que viene de la centrífuga y el surfactante no iónico Pluronic L92. Como se explicó en la sección 4.4, no es necesario aumentar la temperatura de la mezcla ya que ésta sobrepasa la del punto nube del surfactante (BASF, 2004). Por lo tanto, el único parámetro relevante del estanque de mezcla es su capacidad, puesto que la centrífuga cumplirá la función de mezclar ambas corrientes y acelerar el proceso de separación de las dos fases.

Dado que el máximo volumen que se tendrá en el estanque es de 1300 [L] en la última extracción de un ciclo de CPE, se escogerá un estanque de acero de 1500 [L] de capacidad. La tabla 5.16 presenta las dimensiones del equipo.

Tabla 5.16 Dimensiones estanque E-5

Característica	Valor
Diámetro [mm]	1200
Altura [mm]	1350

5.5.2 Diseño de la centrífuga

Como se mencionó en el apartado 5.5, se escogió una centrífuga que pueda suplir tanto la necesidad de separación de biomasa, como la separación líquido-líquido. Debido a que la separación líquido-líquido se realiza por elevación de la temperatura por sobre el punto nube (Cloud-Point) y la centrifugación se utiliza para acelerar el proceso, es que la centrífuga se diseñó en base a la separación de biomasa y se asume que podrá funcionar sin problemas en la CPE al *setear* en el panel de control de la centrífuga CLARA20.

5.5.3 Diseño del estanque E-6

El estanque E-6 es un estanque de recepción de la fase rica en surfactante. Para esto se escogió un estanque vertical de acero con un volumen total de 650 [L]. De esta manera se pueden albergar un máximo de 2 ciclos de CPE que corresponden a 591,2 [L]. La tabla 5.17 presenta las características de estanque.

Tabla 5.17 Características del Estanque de recepción E-6

Característica	Valor
Volumen total [L]	650
Altura [mm]	960
Diámetro superior [mm]	923

5.5.4 Diseño del serpentín del estanque E-6

La fase rica en surfactante contiene el ácido p-cumárico dentro de micelas que deben romperse para liberar el producto y luego poder separarlo en la siguiente etapa (cromatografía de intercambio iónico). Para romper la micela se debe bajar la temperatura por debajo del punto nube del surfactante (22°C) y se utilizará un serpentín en el estanque E-6.

Para determinar el largo del serpentín y sus vueltas dentro del estanque se requiere saber el calor intercambiado, el cual fue determinado en el capítulo 4 en la sección de balance de energía. Se utilizarán además las ecuaciones 5.5 y 5.6 para determinar el área del serpentín y el número de vueltas, respectivamente.

La tabla 5.18 resume los valores del número de vueltas y las dimensiones del serpentín para el estanque.

Tabla 5.18 Características del Estanque de recepción E-6

Variable	Valor
----------	-------

Q [kcal/h]	6798
A_s [m ²]	0,785
Diámetro [m]	0,010287
Longitud [m]	24,32
n	10

5.6 DISEÑO DE LA CROMATOGRAFÍA INTERCAMBIO ANIÓNICO (C-IA)

Esta operación tiene la característica de ser una operación por lotes, de manera que para hacerlo continuo se requieren de al menos dos unidades de intercambio iónico como mínimo, para que de esta manera cuando se alcance la saturación de la resina con iones en uno de los equipos se continúe operando con el otro. Durante este tiempo de inactividad de la resina saturada se realiza la regeneración de ésta para remover los iones presentes. Las columnas de intercambio iónico tienen por lo tanto un funcionamiento alternado.

Como se mencionó anteriormente en el capítulo 4, el proceso de purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico se basó en la cromatografía utilizada en el caso de extracción de p-cumárico por hidrólisis alcalina del bagazo de la caña de azúcar (Ou, Luo, & Huang, 2009). El diseño del equipo y la elección de la resina también fueron basadas en dicho estudio, por lo que algunos de los cálculos de diseño están en directa relación y proporción a la información entregada en dicho estudio.

Para realizar el diseño de esta columna es necesario en primer lugar elegir el tipo de resina a utilizar. Para esto se escogió la resina de intercambio aniónico de estireno 201*7(717), la cual es fuertemente alcalina, con una capacidad de intercambio de 3,6 [mmol/g]. Sus características se presentan en la Tabla 5.19 y los rangos de operación recomendados para la resina en la Tabla 5.20.

Tabla 5.19 Características de la Resina 201*7(717)

Característica	Valor
Forma final	Cl ⁻
Capacidad de intercambio en peso [mmol/g]	≥ 3,6
Capacidad de intercambio en volumen [mmol/ml]	≥ 1,35
Humedad contenida %	42-48
Diámetro partícula [mm]	0,400-0,700
Gravedad Específica [g/ml]	1.07-1,10

Tabla 5.20 Rangos de operación recomendados para la Resina 201*7(717)

Característica	Valor
Máxima Temperatura de operación [°C]	OH ⁻ : 40, Cl ⁻ : 100
Rango pH	1 - 14
Capacidad de intercambio [mmol/L]	≥ 450
Flujo operacional por unidad de área [m ³ /m ² ·h]	15 - 30
Flujo de Regeneración por unidad de área [m ³ /m ² ·h]	4 - 6

5.6.1 Área y diámetro por de la columna de Intercambio aniónico

El área de la columna se define según la siguiente ecuación:

$$A_{IA} = \frac{M_e / \rho}{v_t}$$

Ecuación 5.9

Donde:

- M_e : Flujo de alimentación del líquido a tratar en la resina proveniente del estanque E-6; 295,6 [kg/h]
- ρ : Densidad de la corriente de alimentación; 1000 [kg/m³]
- v_t : Velocidad de flujo por unidad de área; 15 [m³/m² h]

Además,

$$A_{IA} = \frac{\pi \cdot d^2}{4}$$

Ecuación 5.10

Reemplazando los valores obtenidos anteriormente se obtiene:

$$A_{IA} = \frac{M_e/\rho}{v_t} = \frac{295,6/1000}{15} = 0,019707 \text{ [m}^2\text{]}; \quad d = 0,1584 \text{ [m]}$$

5.6.2 Altura de la columna de intercambio aniónico

La altura se calculará tomando en cuenta las relaciones geométricas a partir de la cantidad de resina necesaria para tratar la corriente de alimentación. La resina necesaria se calculó manteniendo la relación de 0,125 [L] de resina 717 por litro de alimentación (Ou, Luo, & Huang, 2009). La altura de la columna que albergará la resina 717 se calcula con la siguiente ecuación:

$$h_{IA} = \frac{V_r}{A_{IA}}$$

Ecuación 5.11

Donde:

- V_r : Volumen de la resina; 0,00994 [m³]

Reemplazando el resultado anterior en la ecuación 5.xx se tiene:

$$h_{IA} = \frac{0,00994 [m^3]}{0,01970 [m^2]} = 0,5045 [m]$$

5.7 EVAPORACIÓN

Para la evaporación se utilizará un evaporador rotatorio de 100 [L]. Esto se debe a que los volúmenes no son tan grandes como para considerar un evaporador a nivel industrial. Para utilizar un evaporador de nivel industrial habría que acumular varios lotes y no se justificaría el gasto de un gran equipo para tenerlo sin operar gran parte del mes/año.

Se escogió el evaporador rotario GRFE 100J de GOEL, debido a que es un evaporador rotatorio de película que posee una forma cilíndrica. El estanque cilíndrico posee mayor área superficial que un estanque esférico, y la tasa de evaporación puede mejorar hasta en un 20% comparada con la de un evaporador esférico. Si se compara el diámetro de un frasco cilíndrico con el de un frasco esférico para un volumen en particular, se tiene que el diámetro de la unidad cilíndrica es menor. Esto es un factor crítico para el vidrio ya que la presión nominal baja drásticamente con el aumento del diámetro (Goel Scientific Glass Works Ltd., 2012).

Otra ventaja es la estabilidad mecánica de un evaporador cilíndrico, superior a la de una unidad inclinada de un evaporador rotatorio convencional, en la que la botella está sujeta sólo por el cuello. Eso es altamente inestable, tanto mecánicamente hablando, como para el mismo tamaño del cuello del frasco; tensiones superiores se desarrollan en el cuello del matraz en comparación con una unidad horizontal simplemente apoyada, como en el caso de un evaporador cilíndrico. Si bien el frasco del evaporador cilíndrico también está sujeto por el cuello del frasco, la línea central es horizontal, por consiguiente, más estable. Además, el matraz giratorio está soportado axialmente a dos secciones transversales de la circunferencia de la en toda su longitud (Goel Scientific Glass Works Ltd., 2012).

La remoción del material y la limpieza se hacen más sencillas, ya que basta con abrir un acoplamiento de un extremo. El material puede ser fácilmente removido, a diferencia de un evaporador esférico se debe extraer el frasco completo para la limpieza y remoción del material.

Por todas estas razones, se escoge el evaporador de película rotatorio GRFE 100J de GOEL. La tabla 5.21 presenta datos técnicos del evaporador.

Tabla 5.21 Especificaciones técnicas del evaporador rotatorio GRFE 100 J

Unidad	Característica	Valor
Frasco cilíndrico	Volumen [L]	100
Baño de Calentamiento	Material	SS 304
	Potencia [kW]	9
	Temperatura [°C]	0 - 100
Motor	Potencia [HP]	2
	Frecuencia [Hz]	50
	Velocidad de rotación [rpm]	2-50
Dimensiones (aprox.)	Largo [m]	2
	Ancho [m]	1
	Alto [m]	2

5.8 DISEÑO ESTANQUE E-7

Como se mencionó en el apartado 4.4, el estanque E-7 es un estanque pulmón en el que se acumulará la corriente de salida del evaporador. Para esto se escogió un estanque vertical de acero con un volumen total de 80 [L]. De esta manera se pueden albergar un máximo 10 lotes de evaporación que corresponden a 52 [L]. La tabla 5.22 presenta las características de estanque.

Tabla 5.22 Características del Estanque de recepción E-7

Característica	Valor
Volumen total [L]	80
Altura [mm]	600
Diámetro superior [mm]	420

5.9 SECADO

Para realizar la selección del equipo se eligió este dentro de una lista de proveedores de acuerdo al que sea capaz de satisfacer las necesidades del proceso presentadas en el balance de masa. Como se tiene un requerimiento de flujo de agua a evaporar de 2 [kg/h] según la sección 4.4 se selecciona un equipo capaz de satisfacer esta cantidad, cuyas características se indican en la tabla 5.23 (GEA Process Engineering Inc.).

Tabla 5.23 Características del Secador spray seleccionado

Característica	Valor
Nombre	MOBILE MINOR™ Spray Dryer
T° entrada aire [°C]	170
T° salida aire [°C]	80
Agua evaporada [L/h]	2
Potencia Calentador [kW]	7,5
Dimensiones cámara secado [Ømm, mm]	800, 620
Dimensión ciclón [Ømm]	140
Espacio requerido [m x m x m]	2,5 x 2 x 2,3

5.10 EQUIPOS AUXILIARES

5.10.1 Bombas

Las bombas utilizadas fueron escogidas de acuerdo al flujo requerido para cada línea de proceso donde es necesitado el transporte de algún fluido mediante energía mecánica. Los flujos donde se requieren bombas tanto centrífugas como de desplazamiento positivo se detallan junto con las bombas a utilizar y la línea de proceso donde operan en la tabla 5.24.

Tabla 5.24 Bombas necesarias según flujos de líneas de operación

Bombas	Flujo [L/h]	Línea	Modelo	Presión máx. [bar]	Potencia
B8	0,9	8	J 1.6 a 36/5	50	0,55
B11	6,24	11	J 1.6 a 36/5	50	0,55
B14	6,24	14	J 1.6 a 36/5	50	0,55
B17	19	17	J 1.6 a 36/5	50	0,55
B21	19	21	J 1.6 a 36/5	50	0,55
B19	45	19	J 1.6 a 36/5	50	0,55
B22	45	22	J 1.6 a 36/5	50	0,55
B33	56,6	33	J 1.6 a 36/5	50	0,55
B37	24	37	J 1.6 a 36/5	50	0,55
B26	425	26	PKM 100	8	1,1
B30	482	30	PKM 100	8	1,1
B39	3	39	QBK-25	6,9	0,4
B10	200	10 y 13	PKM 100	8	1,1
B16	1000	16 y 20	PKM 100	8	1,1
B18	500	18	PKM 100	8	1,1

5.10.2 Soplador

Para determinar el soplador necesario para satisfacer los requerimientos máximos de aire que pueden haber. Como se puede ver en la carta Gantt (sección 6.3.2), el máximo flujo de aire requerido se produce cuando funcionan en paralelo los dos biorreactores de 10[m³] y el de 180[L]. Al sumar estos caudales (especificados en el capítulo 4.2), se obtiene el máximo flujo de aire requerido igual a 1458,6 [m³/h]. En la tabla 5.25 se resumen las características del soplador seleccionado.

Tabla 5.25 Características de los sopladores seleccionados

Modelo	Flujo [m ³ /h]	Presión [bar]	Potencia [kW]
GM 30	1509	1,5	30

REFERENCIAS CAPÍTULO 5

- Acevedo, F., Gentina, J. C., & Illanes, A. (2002). *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica*. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Alfa Laval. (2014). *CLARA, Separators, Alfa Laval*. Obtenido de <http://www.alfalaval.com/solution-finder/products/clara/Documents/PCHS00013EN%20Clara%2020%20leaflet.pdf>
- BASF. (2004). *Performance Chemicals Catalog BASF*. Obtenido de http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/ChemicalsNAFTA/doc4/BASF/PRD/30088619/.pdf?title=&asset_type=pi/pdf&language=EN&urn=urn:documentum:eCommerce_sol_EU:09007bb28001f712.pdf
- GEA Process Engineering Inc. (s.f.). *GEA Niro spray drying*. Obtenido de Small-scale solutions for R&D and production: http://www.niroinc.com/html/chemical/cpdfs/small_scale_spray_drying_US.pdf
- Goel Scientific Glass Works Ltd. (2012). *Rotary Film Evaporator | Borosilicate Glass*. Obtenido de <http://goelscientific.com/DownloadPDF/JumboRotaryFilmEvaporatorMain.pdf>
- González, S., & Salinas, V. (2011). *Factibilidad técnica económica de una planta productora de *Piscirickettsia Salmonis* en cultivo puro*. 262 pp.: Tesis Ingeniero Civil Bioquímico. Valparaíso, Chile. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Escuela de IngenieríaBioquímica.
- Guitart, J. (Diciembre de 2014). Sub-gerente. *Cotización de Terreno*.
- Michel, B. J., & Miller, S. (1962). Power requirements of gas-liquid agitated systems. *A.I.Ch.E. Journal*.
- Ou, S., Luo, Y., & Huang, C. (2009). Production of coumaric acid from sugarcane bagasse. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 253-259.
- Streeter, V. L., & Benjamin, W. E. (1994). *Mecánica de los Fluidos*. Naucalpan de Juárez: McGraw-Hill.

CAPÍTULO 6

ADMINISTRACIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LA PLANTA

El modelo organizacional de una planta de producción debe responder a la capacidad de administrar sus recursos disponibles en función de una correcta operación entre las distintas áreas de la empresa, con el fin de integrarlas funciones técnicas, comerciales, financieras, contable, y de seguridad a través de técnicas de planificación, organización, dirección, coordinación y de control (Chiavenato, 2007).

La organización de los diversos aspectos involucrados en la producción y manufactura de un determinado producto, adquiere especial relevancia si se entiende como el acto de organizar, estructurar y destinar los recursos, definir los órganos encargados de la administración y fijar sus atribuciones e interrelaciones (Chiavenato, 2007).

Dadas las características de la planta diseñada, es que se propone un modelo de organización funcional, el cual incluye la creación de puestos, equipos y departamentos con base en las actividades especializadas. El agrupamiento funcional de los empleados es la forma de más amplio uso y aceptación de dividir por departamentos. Dentro de las ventajas que presenta este modelo se pueden destacar principalmente dos. La primera está relacionada con la autoridad funcional que se presenta en este modelo, la cual está basada en el conocimiento, por lo que la autoridad de los superiores es más bien de carácter parcial y relativa, pudiendo generarse un clima de comunicación directa, poseyendo una mayor fluidez y rapidez la comunicación entre los distintos niveles de jerarquía. La otra ventaja que se presenta en este modelo es la descentralización en la toma de decisiones, pudiendo tomarse éstas por los cargos u organismos especializados en la planta, dándole de esta forma un especial énfasis a la especialización de cada sector (Illanes, 1991).

Es necesario hacer énfasis en que el éxito de un modelo de organización radica en las personas, identificando a los recursos humanos como uno de los más importantes para el desarrollo de cualquier empresa o sistema productivo. Teniendo esto en cuenta, es que a lo largo de este

capítulo se detalla la forma en que se organizan los recursos de la planta de producción para cumplir con la función administrativa, organizando a los trabajadores, las tareas a realizar y especificando la distribución espacial de la planta.

6.1 ORGANIZACIÓN ADMINISTRATIVA

El objetivo de este proyecto es diseñar una planta productora de ácido p-cumárico, el cual será vendido a algún laboratorio farmacéutico ya existente que pueda formular un comprimido en base al ácido p-cumárico para comercializarlo a nivel nacional. Los distintos departamentos que se requieren dentro de la empresa están dentro del marco clásico de la organización funcional. La gerencia se encarga de la dirección de la planta, mientras que ésta se separa en cuatro áreas principales: finanzas, producción, compras y ventas e investigación y desarrollo. La Figura 6.1 detalla el organigrama general de la empresa por departamentos.

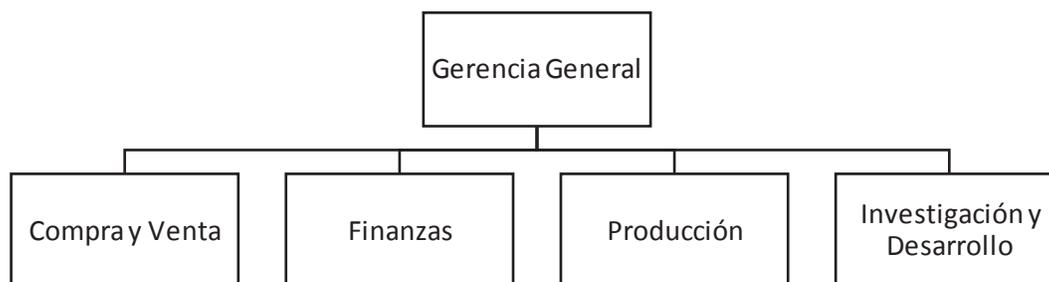


Figura 6.1 Organigrama de la empresa

6.1.1 Secciones de trabajo

A continuación se explicará brevemente la estructura y funciones de cada área o sección de la planta.

Gerencia General

Como se mencionó anteriormente, la gerencia se encarga de la dirección de la planta. Para ello se dispondrá de un Ingeniero Civil Bioquímico con un Máster en Administración y Negocios (MBA), con el fin de tener en dicho cargo a un profesional con conocimientos sobre cada uno de los departamentos. A su cargo tendrá además a un secretario o secretaria.

Compra y Venta

Este departamento deberá cumplir con ciertas funciones administrativas de la planta, coordinando los requerimientos y órdenes de compra de materias primas, insumos y equipos; además de las ventas al laboratorio farmacéutico. Para dicho departamento se requiere un Ingeniero Comercial y un Técnico Comercial como ayudante.

Finanzas

Este departamento tiene como finalidad la planificación y organización de los flujos de caja de la planta, además de encargarse de pagar las remuneraciones al personal de manera responsable. Para dicho departamento se requiere un Contador Auditor y un Técnico Comercial como ayudante.

Producción

En este departamento se desarrollará el producto que será comercializado, abarcando desde la recepción y preparación de la materia prima, proceso de propagación de la línea celular y su posterior cultivo, incluyendo además todo el proceso de purificación. Este departamento estará a cargo de un Ingeniero Civil Bioquímico; profesional preparado para la aplicación del conocimiento tecnológico a procesos caracterizados por la participación de agentes biológicos. Sus principales funciones se relacionan con el montaje, puesta en marcha, operación y mantenimiento de los equipos y procesos; debiendo ejecutar, administrar, fiscalizar y emitir juicios técnicos independientes y asumir responsabilidad personal por tareas en el campo de la ingeniería. Se considerarán además tres Ingenieros de Ejecución en Bioprocesos con responsabilidad de supervisión de la planta, repartidos en 3 turnos.

Investigación y Desarrollo

Este departamento tiene el objetivo de estudiar y analizar posibles mejoras u optimizaciones del proceso productivo, ya sea mejoras para el medio de cultivo, para el funcionamiento de equipos o para la línea productiva en general. El profesional a cargo de este departamento debe ser un profesional con sólidos conocimientos en procesos bioquímicos y sistemas productivos, capaz de unir la visión científica sobre un hecho con la mirada ingenieril necesaria para aumentar la productividad y la eficiencia de la planta. El departamento estará a cargo de un Ingeniero Civil

Bioquímico, acompañado de un equipo multidisciplinario conformado por un bioquímico y un químico farmacéutico.

En consideración a los departamentos de trabajo establecidos para el correcto funcionamiento de la planta de producción, y tomando en cuenta el perfil profesional necesario en cada uno de los procesos involucrados, es que se determinan los cargos a disponer para la contratación del personal. La tabla 6.1 resume los cargos necesarios para cada sección de la planta.

Tabla 6.1 Cargos de trabajo por sección	
Sección	Cargo
Gerencia General	Ingeniero Civil Bioquímico (MBA)
	Secretario(a)
Compra y Venta	Ingeniero Comercial
	Técnico Comercial
Finanzas	Contador Auditor
	Técnico Comercial
Producción	Ingeniero Civil Bioquímico
	Ingeniero de Ejecución en Bioprocesos
	Operarios
Investigación y Desarrollo	Ingeniero Civil Bioquímico
	Bioquímico
	Químico Farmacéutico

6.2 ORGANIZACIÓN DE PERSONAS

6.2.1 Requerimientos de Personal

Dependiendo de las tareas que se deban realizar en cada sección de trabajo, será el número de personas que se contraten para dicha labor. En el caso de una planta de producción farmacéutica y de baja escala, utilizar las aproximaciones convencionales para determinar el número de operarios en función de las horas hombre y la producción diaria no se ajusta a la realidad.

Se tomará como ejemplo el modelo para determinar las necesidades del personal propuesto por Wessel(Zomosa, 1983). Primero es necesario calcular el número de horas-hombre (HH) que se necesitan para llevar a cabo la producción requerida. La ecuación 6.1 corresponde al modelo para plantas pequeñas, de tipo batch.

$$HH = 10,4 \cdot P^{0,25}$$

Ecuación 6.1

Donde:

HH: Horas-hombre por día y por etapa

P: Producción diaria de producto [Ton/d]

Reemplazando la productividad anual en la ecuación 6.1 se tiene:

$$HH = 10,4 \cdot \left(1 \left(\frac{\text{Ton}}{\text{año}} \right) \cdot \frac{1}{365} \left(\frac{\text{año}}{d} \right) \right)^{0,25}$$

$$HH = 2,37 \left[\frac{\text{hora hombre}}{d \cdot \text{etapa}} \right]$$

El número de operarios e puede calcular de acuerdo a la ecuación 6.2:

$$NO = \frac{HH \cdot n_e}{n_t \cdot t}$$

Ecuación 6.2

Donde:

- NO: Número de operarios
- HH: $\left[\frac{\text{hora hombre}}{d \cdot \text{etapa}} \right]$
- n_e : Número de etapas que involucran la producción
- n_t : Número de turnos
- t: tiempo de cada turno; [h]

El número de etapas está determinado por cada proceso, sin embargo, algunas etapas se pueden asociar entre ellas, reduciendo el número de etapas. Se considerarán 5 etapas que se detallan en la tabla 6.2.

Tabla 6.2 Etapas de producción

Número	Etapas	Proceso que involucra
1	Preparación medio de cultivo	Preparación de todas las soluciones para la fermentación
2	Fermentación	Fermentación
3	Concentración	Centrifugación CPE
4	Purificación	Cromatografía IA
5	Secado	Evaporación

La planta se considera operativa durante las 24 [h] del día; para lograr esto se dispone de un total de 3 turnos, cada uno de 8 [h]. De acuerdo a lo anterior y reemplazando en la ecuación 6.2 se tiene:

$$NO = \frac{2,73 \cdot 5}{3 \cdot 8} = 0,49 \approx 1 \text{ operario}$$

No es posible llevar a la práctica dicho método ni operar la planta con un solo operario, por lo que la determinación del número de operarios necesarios fue pensada en función de la organización del trabajo y de las tareas que se deben realizar junto a la revisión de la información técnica y comercial de los principales equipos a utilizar en la línea de producción. Se tendrán 3 operarios y un jefe de turno trabajando en turnos de 8 horas, lo que da un total de 12 trabajadores, excluyendo de esto al jefe del departamento que contará con un horario de oficina. La Tabla 6.3 resume lo planteado.

Tabla 6.3 Trabajadores del Departamento de Producción

Cargo	Número de Personas	Modalidad de Trabajo	Total de trabajadores
Jefe del Departamento	1	Oficina	1
Jefe de Turno	1	Turno	3
Operario de Fermentación	1	Turno	3
Operario <i>Downstream</i>	2	Turno	6

El número de jefes de turno y de operarios necesarios para la producción queda justificado de acuerdo a las exigencias del Código del Trabajo según la normativa vigente y de acuerdo a la planificación de las tareas que deben realizarse, explicadas en las secciones 6.2.3 y 6.3, respectivamente.

Los cargos mencionados son los que representan la operación de línea de la planta, sin embargo, se deben incluir además los cargos que no son de línea o bien auxiliares. Dentro de estos requerimientos se encuentran: porteros, auxiliares de limpieza, entre otros, que se detallan en la tabla 6.4.

Tabla 6.4 Personal Auxiliar necesario en la organización de la planta

Cargo	Número de Personas	Modalidad de Trabajo
Guardia	1	Turno
Auxiliar de limpieza	2	Oficina
Capataz de Mantención	1	Turno

6.2.3 Jornadas de Trabajo

En el DFL N°1 de 2002, que fija el texto refundido, coordinado y sistematizado del Código del Trabajo, en el Artículo 22 del párrafo primero del mismo, se fija la jornada ordinaria de trabajo con un máximo de cuarenta y cinco horas semanales que, según el artículo 28, deberán distribuirse en un mínimo de 5 días y en un máximo de 6 días, con un límite de hasta 10 horas de trabajo en un mismo día. En el inciso segundo del Artículo 22 se excluyen de esta jornada a los gerentes, administradores y todos aquellos que trabajen sin fiscalización inmediata, a menos que sea acordada en el contrato de trabajo (Dirección del Trabajo: Gobierno de Chile, 2014).

Para la producción de ácido p-cumárico se necesita operar la planta las 24 horas del día. Sin embargo, la planificación del trabajo hace posible la coordinación de turnos de trabajo sobre tareas específicas que requieren atención continua y otras que pueden ajustarse a un turno diario. Dadas las características de la planta, se elevará una solicitud a la Dirección del Trabajo para ser considerados bajo el inciso segundo del Artículo 38 y así ser excluidos del descanso dominical.

6.3 ORGANIZACIÓN DE LAS TAREAS DE PRODUCCIÓN

6.3.1 Plan de Producción

De acuerdo a lo planteado en el capítulo 2 para dimensionar la capacidad de la planta, es que se propone producir 1000 [kg/año] y aumentar progresivamente hasta llegar a 1290 [kg/año] al año 10. La tabla 6.5 presenta la producción anual y el número de lotes necesarios a realizar. 45 lotes es la cantidad máxima que se pueden realizar con los equipos diseñados.

Tabla 6.5 Estimación del número de lotes a producir de acuerdo a la demanda proyectada

Año	Demanda de ácido p-cumárico	Número de Lotes
2015	1000	35
2016	1029	36
2017	1058	37
2018	1087	38
2019	1116	39
2020	1145	40
2021	1174	41
2022	1203	42
2023	1232	43
2024	1261	44
2025	1290	45

6.3.2 Carta Gantt

La figura 7.2 ilustra la Carta Gantt de los primeros dos meses de trabajo. El tercer mes y los siguientes son iguales al segundo, es decir, se realizarán 3 lotes, mientras que en el primero se realizarán sólo 2, ya que las primeras semanas son de puesta en marcha y de realización de las fermentaciones previas.

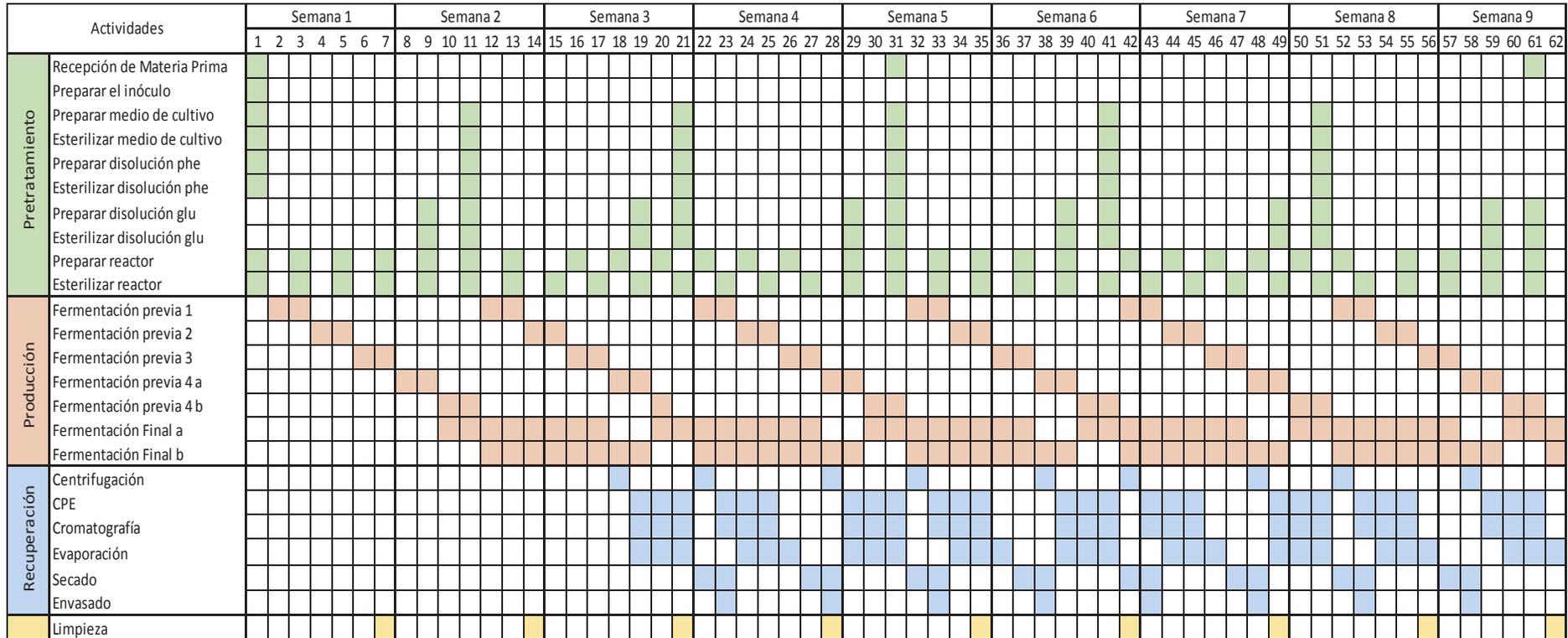


Figura 6.2 Carta Gantt

6.4 LAY-OUT DE LA PLANTA

La planta de ácido p-cumárico consta de un solo edificio, en el que están separadas el área administrativa (recepción, oficinas, sala de reuniones y casino), del área de producción (laboratorios, área de fermentación, downstream y almacenamiento). Cada área cuenta con baños y salidas de emergencia; además de camarines en el caso del área de producción.

En la figura 6.3 se muestra una representación a escala de la planta, donde se puede apreciar a la izquierda el área administrativa y a la derecha el área de producción. En los anexos se adjunta un plano con escala 1:100.

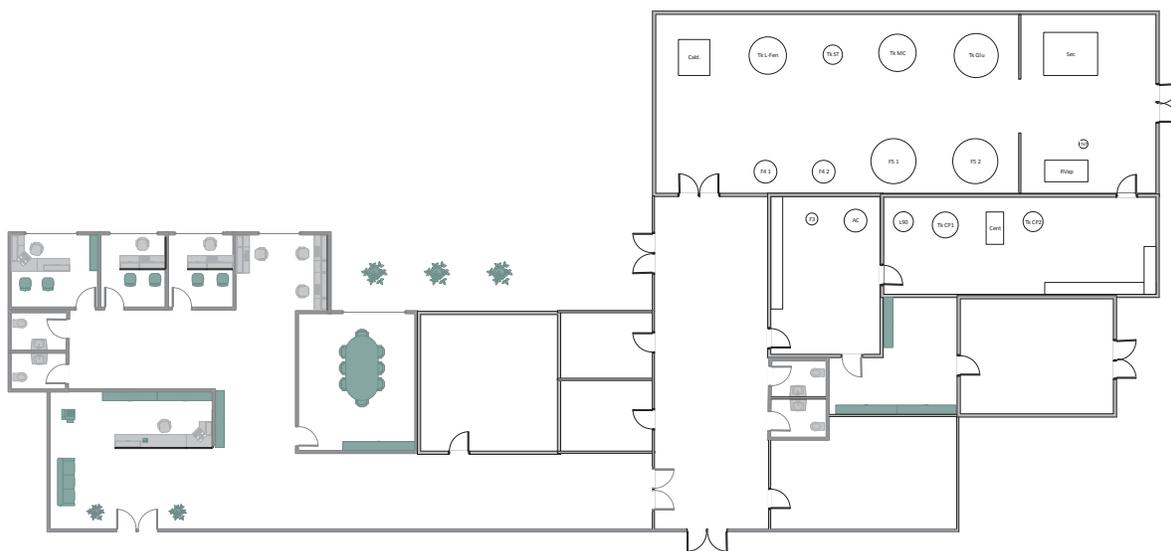


Figura 6.3 Lay-out de la Planta

REFERENCIAS CAPÍTULO 6

Chiavenato, I. (2007). *Introducción a la Teoría General de la Administración*. Ciudad de México: McGraw-Hill.

Dirección del Trabajo: Gobierno de Chile. (2014). *Código del Trabajo*. Santiago, Chile.

Illanes, P. (1991). *La administración del sistema empresa: un enfoque integral de la administración de empresas*. Santiago: Leeds Impresores.

Zomosa, A. (1983). Evaluación Económica. En *Manual de Proyectos en Ingeniería Química* (págs. 405-408). Santiago: Universidad de Chile.

CAPÍTULO 7

EVALUACIÓN ECONÓMICA

Este capítulo tiene como objetivo ordenar y sintetizar la información monetaria para elaborar un análisis financiero que permita evaluar la rentabilidad del proyecto. En una primera instancia se sistematizará la información financiera, definiendo la inversión financiera, costos de producción e ingresos; para luego realizar la evaluación económica sobre el flujo de caja y determinar la rentabilidad del proyecto.

Cabe destacar que la unidad monetaria a utilizar será la unidad de fomento (UF), calculada en cada caso utilizando los indicadores económicos del día 9 de diciembre de 2014 presentados en la tabla 7.1 (Banco Central de Chile, 2014).

Tabla 7.1 Indicadores económicos utilizados

Indicador Económico	Valor
Unidad de Fomento [UF]	24.627,1
Dólar Estadounidense [USD]	611,4
Euro [€]	751,57

7.1 CAPITAL DE INVERSIÓN O COSTOS DE CAPITAL

El capital de inversión se separa en capital fijo, destinado a suplir los gastos de las instalaciones de la planta y equipos de fabricación; y el capital de trabajo, requerido para operar la planta en un inicio. A la vez, el capital fijo se subdivide en directo o de producción (equipos instalados, tuberías, instrumentación, preparación de terreno, etc.) e indirecto o no asociado a producción (edificación, oficinas administrativas, transporte, envío, etc.) (Peters & Timmerhaus, 1991).

7.1.1 Costo del Terreno

El costo del terreno a comprar es relativo. Existen una cantidad importante de factores a considerar al momento de cotizar un metro cuadrado de terreno. Por lo general, el costo del terreno varía según las condiciones de éste (si tiene árboles, si está limpio, si está edificado), su ubicación (central, periférico, orilla de carretera), la factibilidad (acceso a agua, electricidad, fibra óptica), etc. (Guitart, Subgerente Kaufen Propiedades, 2014).

Como se vio en el capítulo 2, la localización de la planta es Quinta Región. Según esto, los valores de los terrenos encontrados en esta región se dividieron en dos. Las primeras cotizaciones son según referencias encontradas en internet. La segunda son referencias relativas facilitadas por el sub-gerente de la empresa Kaufen Propiedades.

A continuación se detallan en las tablas los valores de terrenos posibles para la ubicación de la empresa.

Tabla 7.2 Referencias de cotizaciones de terrenos de internet (Locanto, 2014)

Precio [UF]	Área [m ²]	Precio/Área [UF/m ²]	Sector
48,73	500	0,1	A
1258,78	400	3,1	B
1300,00	620	2,1	B
1949,00	500	3,9	C

Tabla 7.3 Referencias de cotizaciones de terrenos de Sub-gerente de Kaufen Propiedades

Precio/Área [UF/m ²]	Sector
8	D
3,5	E
0,5	F
50-60	G
2-4	H

Donde:

- A: Laguna Verde, periférico sin factibilidad
- B: Villa Alemana, central, con factibilidad
- C: Quilpué, central, con factibilidad
- D: Viña del Mar, El Salto, orilla de carretera, con factibilidad
- E: Limache, esquina Palmiro Romano con Eastman, con factibilidad
- F: Olmué, Granizo, sin factibilidad
- G: Viña del Mar, sector Ponientes, con factibilidad
- H: Limache, orilla carretera, con factibilidad

Al analizar ambas tablas, se puede concluir que un terreno, en un lugar central de la comuna de Villa Alemana, Quilpué o Limache, con factibilidad tiene un precio que varía entre los 2 y los 4 [UF/m²]. Este valor es el que se utilizará para los costos de un terreno de aproximadamente 500 [m²], área suficiente para albergar la planta según el tamaño de los equipos y la complejidad del proceso. Por lo tanto, se estima que el costo del terreno será de aproximadamente 1500 [UF].

7.1.2 Capital Fijo Directo

Costo de equipos instalados

Para el desarrollo de la evaluación económica es necesario contar con el valor de los equipos considerando su entrega y la instalación de los mismos. Los costos de instalación incluyen los costos asociados a montaje del equipo en la planta, mano de obra necesaria, construcción de cimientos soportes en el equipo y otros gastos generales. Estos datos pueden ser estimados de acuerdo a porcentajes típicos del costo inicial de cada equipo. Para conocer el valor del equipo entregado (CEE) e instalado (CEI) se utilizan las ecuaciones 7.1 y 7.2, respectivamente.

$$CEE = CE \cdot (1 + 0,1)$$

Ecuación 7.1

$$CEI = CE \cdot F_i$$

Ecuación 7.2

Donde:

CE: Costo del equipo

F_i: Factor de instalación que varía según el tipo de equipo

El costo de los equipos se obtiene de acuerdo a los diseños y requerimientos del proceso realizados en los capítulos anteriores. Algunos equipos pudieron ser cotizados de manera directa, sin embargo, hubo otros fueron calculados por relaciones y algoritmos realizados por Matches, compañía de ingeniería que provee costos estimados para equipos de procesos de manera conceptual (según orden de magnitud) (Matches, 2014). La tabla 7.4 resume los costos de los equipos.

Línea Celular

Dentro del capital fijo directo se debe incluir el valor de la línea celular de *Pseudomonas putida* S12 C3 que será adquirida en un inicio, propagada y almacenada en frío. La mayoría de las cepas que se compran de colecciones extranjeras para investigación valen entre 200 y 600 [USD]. Si son

licenciamientos, el valor es distinto y muy variable (Calderón, 2014). Como la cepa está genéticamente modificada y su valor se desconoce, se opta por pagar un 1% de las utilidades al creador de la línea celular. Esto también, porque el creador de la cepa puede crear posteriormente una más eficiente y la línea celular comprada puede quedar obsoleta.

Tabla 7.4 Costos de equipos del proceso productivo

Equipo	CE Neto [UF]	Cantidad Material	CEE [UF]	Fi	CEI [UF]
Estanque agitado glucosa	297,91	1	300,89	1,3	391,16
Estanque agitado medio	235,84	1	238,20	1,3	309,67
Estanque agitado L-Fenilalanina	119,16	1	120,35	1,3	156,46
Estanque agitado E. traza	119,16	1	120,35	1,3	156,46
Fermentador 1 [L]	211,02	1	213,13	1	213,13
Fermentador 10 [L]	253,22	1	255,76	1	255,76
Fermentador 180 [L]	93,09	1	94,03	1,3	122,2
Fermentador 1200 [L]	203,57	2	411,22	1,3	534,58
Fermentador 10000 [L]	713,75	2	1441,78	1,3	1874,32
Clara20	854,50	1	863,05	1,3	1121,95
Estanque CPE	173,78	1	175,52	1,25	219,40
Estanque CPE 2	44,68	1	45,13	1,25	56,41
Columna cromatografía	265,68	2	536,67	1	536,67
Evaporador rotatorio	726,90	1	734,17	1,25	917,71
Estanque pulmón	14,64	1	14,79	1,25	18,49
Secador spray	1092,06	1	1102,98	1,5	1654,47
Microfiltro de 0,1 µm	8,07	1	8,07	1	8,07
Bombas J1.6	12,41	9	112,83	1	112,83
Bomba PKM 1000	11,42	5	57,67	1	57,67
Bomba QBK 25	6,20	1	6,26	1	6,26
Soplador	327,65	1	330,92	1	330,92
Caldera	1241,31	1	1253,72	1,3	1629,84
Autoclave	12,41	1	12,53	1,2	15,04
TOTAL					10691,53

Otros costos fijos directos

El resto de los costos fijos directos involucran mejoramientos de terreno, servicios incluidos en la construcción, instrumentación y control (I&C), tuberías, instalaciones eléctricas y de servicios. Los porcentajes de costos asociados se resumen en la tabla 7.5 de acuerdo a recomendaciones bibliográficas (Peters & Timmerhaus, 1991).

Tabla 7.5 Porcentaje de costos asociados al Capital Fijo Directo

Costo	%CEE
Mejoramientos de terreno	10
Servicios de Construcción	15
I&C	50
Tuberías	15
Instalaciones eléctricas	12
Instalaciones de servicios	40

Capital Fijo Directo (CFD)

El total del capital fijo directo se presenta en la tabla 7.6

Tabla 7.6 Capital Fijo Directo	
Ítem del CFI	Valor [UF]
Equipos Instalados (CEI)	10.691
Mejoramientos de terreno	1.069
Construcción	1.603
I&C	5.345
Tuberías	1.603

Instalaciones eléctricas	1.282
Instalaciones de servicios	4.276
Capital Fijo Directo Total	25.869

7.1.3 Capital Fijo Indirecto

Ingeniería y Supervisión

Corresponden a los costos de diseño e ingeniería de la construcción de la planta, incluyendo transporte, comunicaciones, gastos de oficina, etc. Y se le atribuye típicamente un valor del 10% del CFD (Peters & Timmerhaus, 1991).

Gastos de construcción: Pago de contratistas y contingencias

El costo asociado al contratista varía desde 2 a 8% del CFD; mientras que los gastos de contingencia que cubren eventos impredecibles (tormentas, inundaciones, variaciones de precio, cambios de diseño pequeños, errores de estimación y otros gastos imprevistos) fluctúan entre el 5 y el 15% del CFD (Peters & Timmerhaus, 1991). Se considerará un costo asociado al contratista de un 8% del CFD y un gasto de contingencia de un 15%, tomando en cuenta que puede haber errores en la estimación.

Capital Fijo Indirecto (CFI)

La tabla 7.7 presenta los porcentajes y valores finales de cada uno de los ítems considerados y el valor final del capital fijo indirecto.

Tabla 7.7 Capital Fijo Indirecto

Ítem del CFI	%CFD	Valor [UF]
Ingeniería y Supervisión	10	2.587

Pago de Contratistas	8	2.069,5
Contingencia	15	3880,4
Capital Fijo Indirecto Total		8.536,9

7.1.4 Capital de Trabajo

El capital de trabajo consiste en la cantidad total de dinero invertida en materia prima y provisiones, producto terminado y en proceso de fabricación, cuentas por cobrar, dinero mantenido a mano para el pago mensual de gastos de operación como remuneraciones, adquisiciones de materia primera, pago de impuestos y cuentas. La razón inicial típica de capital de trabajo a capital total de inversión para plantas químicas varía de 10 a 20 (Peters & Timmerhaus, 1991); de acuerdo a ello y considerando que se cuenta con el valor de algunas provisiones en el capital fijo directo, se utilizará una razón del 15% del capital total de inversión.

7.1.5 Capital de Inversión Total

Habiendo calculado el capital fijo total, y considerando que la sumatoria de dicho valor y el capital de trabajo corresponde al capital total de inversión; y que el capital de trabajo corresponde al 15% de este último, se obtienen los valores de inversión finales. La tabla 7.8 resume los costos de capital o capital de inversión.

Tabla 7.8 Capital total de Inversión

Tipo de Capital	Valor [UF]
Costo del Terreno	1.500
Capital Fijo Directo	25.869
Capital Fijo Indirecto	8.536

Capital de Trabajo	6.336
Capital Total de Inversión	42.242

7.2 COSTO TOTAL DE PRODUCCIÓN (CP)

Estos costos corresponden a un estimado para operar la planta y vender el producto y están subdivididos en costos de manufactura y costos generales de producción. Se trabajará en base anual para estimar el total de costos, ya que se suavizan los efectos de las variaciones de temporada, se considera el tiempo de reacción de la planta, permite calcular de forma más rápida los costos operacionales a menor capacidad y provee un forma conveniente de considerar grandes gastos poco frecuentes (por ejemplo cambios de tendencia) (Peters & Timmerhaus, 1991). Este es uno de los factores de mayor influencia dentro del análisis económico y representa todos los egresos relativos a la operación en planta, administración, entre otros.

7.2.1 Costos de Manufactura

Los costos de manufactura, de producción o de operación, contemplan todos los gastos que tienen relación con la operación o el equipamiento de la planta y son sub-clasificados en costos directos de producción, cargos fijos y costos generales de planta (Peters & Timmerhaus, 1991).

Materia Prima

Se considera como materia prima el costo del medio de cultivo, la fenilalanina, el surfactante Pluronic L92 y los reactivos necesarios para lavar y eluir la resina. La línea celular no se considera materia prima ya que, como se mencionó en el apartado 7.1, ésta será adquirida en un inicio y se llegará a un acuerdo de pagar un porcentaje de las ganancias al creador de la cepa.

Los costos de las materias primas para la fermentación (Medio de Cultivo, Solución Traza y L-Fenilalanina) son variables año a año debido a que, por un lado aumentan progresivamente los lotes de producción y, por otro lado algunos compuestos son comprados a granel por lo que no es

necesario comprar la misma cantidad año a año. La tabla 7.9 muestra el cálculo realizado para el año 1 de las materias primas para la fermentación, tomando en cuenta el precio y el tamaño de la orden anual por reactivo y también el restante de ella, para considerarla en el año 2. En el Anexo B se puede apreciar el análisis de la compra de reactivos año a año.

En el caso de los reactivos utilizados en el downstream, éstos también varían año a año debido al aumento de los lotes de producción, pero no se compran a granel, por lo que el aumento de ellos será lineal. Se llegó a un resultado de 21,37 [UF/lote]. La tabla 7.10 resume los costos de los reactivos downstream en el primer año. Cabe destacar que no fue posible cotizar el valor del surfactante no-iónico Pluronic L92, pero se tomó como referencia valores de otros compuestos similares que también se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente (Sigma-Aldrich Co., 2014).

Tabla 7.10 Costo año 1 de Reactivos Downstream

Materia Prima	Valor [UF]
Pluronic L92	422,3
Reactivos Cromatografía	325,7
Total	748

Tabla 7.9: Costo Materias Primas Fermentación año 1

Nutriente	kg/Lote	Kg/año1	Precio USD/Kg		Unidades a comprar	USD a pagar	UF	Restante año 1
Medio de Cultivo								
Glucosa	279,999	9799,97	720	1000	10	7200,00	178,75	0,200
(NH4)2SO4	13,731	480,59	180	1000	1	180,00	4,47	0,519
K2HPO4	13,32	466,20	1500	1000	1	1500,00	37,24	0,534
NaH2PO4	5,596	195,86	1100	1000	1	1100,00	27,31	0,804
						SUBTOTAL	247,77	
L-Fenilalanina								
L-Fen	2,12	74,20	2000	100	1	2000,00	49,65	0,258
						SUBTOTAL	49,65	
Solución Traza								
MgCl2 6H2O	0,687	24,05	600	10	3	1800,00	44,69	0,596
EDTA	0,069	2,42	73	0,5	5	365,00	9,06	0,170
ZnSO4 7H2O	0,014	0,49	43,18	0,5	1	43,18	1,07	0,020
CaCl2 2H2O	0,007	0,25	72	0,5	1	72,00	1,79	0,510
FeSO4 7H2O	0,035	1,23	67	0,5	3	201,00	4,99	0,550
Na2MoO4 2H2O	0,002	0,07	58,95	0,1	1	58,95	1,46	0,300
CuSO4 5H2O	0,002	0,0700	19	0,34	1	19,00	0,47	0,794
CoCl2 6H2O	0,003	0,11	12,95	0,125	1	12,95	0,32	0,160
MnCl2 4H2O	0,007	0,25	44	0,5	1	44,00	1,09	0,510
						SUBTOTAL	64,95	
TOTAL							362,37	

Suministros Básicos

Tanto en el balance de masa como en el diseño de los equipos se hacen presentes suministros que deben considerarse en la evaluación económica. Los más importantes son el agua y la electricidad y su costo se resume en la tabla 7.11. Las tarifas de agua (ESVAL, 2014) y electricidad (Chilquinta Energía S.A., 2014) fueron obtenidas suponiendo que la planta se ubica en la región de Valparaíso. En el anexo C se encuentra el cálculo para el consumo anual de agua y electricidad.

Tabla 7.11 Costos anual de Suministros Básicos

Suministro	Consumo anual	Valor por unidad de consumo [CLP]	Total Anual [UF]
Agua [m ³]	595,53	668,2	16,5
Electricidad [kW]	536.112	64,657	1407,3
Total			1423,8

Mano de Obra

Según lo desarrollado en el Capítulo 6, los requerimientos de mano de obra y el costo asociado corresponden a lo presentado en la tabla 7.12 y el valor total se presenta en la tabla 7.13. Pese a existir correlaciones para calcular la remuneración a los trabajadores (como por ejemplo en Peters & Timmerhaus, 1991), éstas no se ajustan a la realidad nacional, por lo que para la determinación de estos valores se obtuvo un estimado del sueldo líquido para cada cargo por medio de una base de datos pública del Gobierno de Chile (Ministerio de Educación, Gobierno de Chile, 2014).

Para la determinación del costo anual se consideró un total de 13 meses, correspondiendo al año de trabajo y al mes de indemnización asociado a ese año de trabajo.

Tabla 7.12 Costo en Mano de Obra

Cargo	Número	Salario [CLP/mes]	Total [UF/mes]	Total [UF/año]
Gerencia				
Ingeniero Civil Bioquímico (MBA)	1	2.500.000	101,51	1319,68
Secretario(a)	1	330.000	13,39	174,19
SUBTOTAL				1493,87
Compra Venta				
Ingeniero Comercial	1	1.300.000	52,78	686,23
Técnico Comercial	1	550.000	22,33	290,33
SUBTOTAL				976,56
Finanzas				
Contador Auditor	1	800.000	32,48	422,29
Técnico Comercial	1	550.000	22,33	290,33
SUBTOTAL				712,62
Producción				
Ingeniero Civil Bioquímico	1	1.300.000	52,78	686,23
Ingeniero de Ejecución en Bioprocesos	3	850.000	103,54	1346,07
Operarios	9	500.000	182,72	2375,43
SUBTOTAL				4407,73
Investigación y Desarrollo				
Ingeniero Civil Bioquímico	1	1.300.000	52,78	686,23
Bioquímicos	1	750.000	30,45	395,85
Químico Farmacéutico	1	800.000	32,48	422,29
SUBTOTAL				1504,37
Auxiliares				
Auxiliar de Limpieza	2	250.000	20,30	263,93
Guardia	3	250.000	30,45	395,90
Capataz de Mantenición	3	320.000	38,98	506,75
SUBTOTAL				1166,60
TOTAL				<u>10.261,7</u>

Mantenimientos y reparaciones

Para procesos promedio con condiciones de operación normales se estima que este tipo de costos varía entre un 5% a un 9% del capital fijo de inversión (Peters & Timmerhaus, 1991). Considerando

que se trata de un proceso más bien sencillo y no se requieren tantos equipos se opta por considerar un 5% del capital fijo de inversión.

Suministros de Operación

Se consideran los gastos relacionados a todos los suministros necesarios para mantener un funcionamiento eficiente y que no pueden ser considerados como materia prima o materiales de mantenimiento y reparación (por ejemplo: lubricantes, ensayos químicos, etc.); ascendiendo a un 15% del total de gastos de mantención y reparaciones (Peters & Timmerhaus, 1991).

Costos de Laboratorio

Este costo considera los gastos de testeo para control de las operaciones y calidad del producto; y puede estimarse de forma rápida como un 10 a 20% del costo de mano de operación (producción) (Peters & Timmerhaus, 1991). Dado que parte del proyecto consiste en laboratorio y se tendrá además laboratorios de investigación y desarrollo, se decide considerar un 20%.

Depreciación

Existen diversos métodos de cálculo de la depreciación, definidos según la vida útil y valor residual establecidos para cada uno de los bienes; una de estas metodologías muy utilizadas en proyectos de ingeniería es la depreciación lineal que considera la diferencia del costo inicial y el valor residual dividido en la cantidad de años de la vida útil del bien, donde la maquinaria se deprecia a una tasa anual del 10% del capital invertido y los inmuebles a una tasa del 3% (Peters & Timmerhaus, 1991). Sin embargo, el SII de Chile fijó en la "Nueva Tabla de Vida Útil" vigente desde 2003 que la depreciación para la maquinaria general tienen una vida útil de 15 años y se deprecia de forma acelerada en 5 años (Servicio de Impuestos Internos, 2003). Este tipo de depreciación se calcula de la misma forma que la depreciación lineal pero dividiendo por la cantidad de años de depreciación, ver Ecuación 7.3.

$$d = \frac{V_0 - V_R}{n}$$

Ecuación 7.3

Donde:

- d: Depreciación
- V_0 : Valor inicial
- V_R : Valor residual
- n: Período de depreciación

Se consideró un valor residual equivalente al 10% del valor inicial y se decide considerar el inmueble, los equipos de acuerdo a lo fijado por el SII. La depreciación no se presentará en esta sección, sino que como parte del flujo de caja.

Impuestos

Tal como en el caso de la depreciación los impuestos no son incorporados en esta sección sino que forman parte del flujo de caja; donde se considera el impuesto a la utilidad y el impuesto a la ganancia de capital. El primero se establece como impuesto de primera categoría correspondiendo a una tasa del 20% desde el año 2011 (Servicio de Impuestos Internos, 2014); por otro lado, la ganancia de capital se considera como renta normal, por lo que grava con impuesto de primera categoría e impuesto global complementario o adicional según sea el caso (Servicio de Impuestos Internos, 2014) (en este caso se aplica el impuesto de primera categoría).

Costos totales de Manufactura

La tabla 7.13 resume los costos de manufactura, incorporando los ítems anteriormente mencionados, a excepción de la depreciación y los impuestos, que serán incluidos en el flujo de caja.

Tabla 7.13 Costos de Manufactura

Tipo de Capital	Valor [UF]
Materia Prima	1.110,37
Suministros básicos	1.423,8
Mano de Obra	10.261,7
Mantenimiento y reparaciones	2.112,1
Suministros de Operación	422,4
Costos de Laboratorio	881,54
Total	16.211,91

7.2.2 Costos Generales de Producción

Estos costos generales no están asociados directamente a la manufactura pero consideran otros gastos de producción, como por ejemplo administrativos, distribución y marketing, investigación y desarrollo, entre otros (Peters & Timmerhaus, 1991).

Costos administrativos

Se consideran los costos de salarios de administradores, secretarias, contadores, costos de suministros de oficina y equipamiento, edificios administrativos, comunicaciones y otros costos adicionales relacionados con la administración; variando entre un 20 y 30% del costo de mano de obra de producción (Peters & Timmerhaus, 1991). Se decide utilizar una tasa del 20%.

Distribución y marketing

Los costos de distribución y marketing varían desde un 2 a un 20% del total de costo de producción según la locación de la planta, el tipo de producto a comercializar, otros productos vendidos por la compañía, y según las políticas de la empresa (Peters & Timmerhaus, 1991). Se decide considerar el 12% del costo total de producto.

Investigación y Desarrollo (I+D)

Este ítem incluye los salarios para el personal involucrado, costos fijos y de operación de la maquinaria y equipamiento, costos de materiales y suministros, y costos varios; lo que varía entre un 2 a 5% de las ventas (Peters & Timmerhaus, 1991). Sin embargo, como el departamento de Investigación y Desarrollo cumple un rol importante en el rubro, se destinará un valor del 20% del costo de mano de obra a dicho departamento.

7.2.3 Costos de Producción

En la tabla 7.14 se presentan los costos asociados a la producción de este proyecto.

Tipo de Costo	Valor [UF]
Manufactura	16.211,91
Costos Generales:	
Administración	2.131,54
Distribución y Marketing	2.781,24
I+D	2.052,34
Total	23.177,03

7.3 INGRESOS

Los ingresos anuales corresponderán a las ventas del ácido p-cumárico. Se establece un precio de venta de 55 [UF/kg] para vendérselo a un laboratorio farmacéutico que tenga la experiencia, infraestructura, licencias, equipos necesarios para elaborar fármacos. Tomando en cuenta que el ácido p-cumárico se desea vender en cápsulas de 500 mg que se consuman a diario, se hizo un cálculo del valor mínimo que costaría un frasco de 30 cápsulas de concentrado de ácido p-cumárico.

Las 55 UF equivalen a 1.354.485 pesos chilenos el kg, lo cual son equivalente a 677,24 CLP los 500 mg de p-cumárico, por lo que el frasco o caja de 30 cápsulas debería tener en el mercado un valor de mínimo 20.317 pesos. Es el valor mínimo ya que se le debe sumar porcentaje de ganancia del laboratorio que, si se asume como un 20%, el producto se vendería a 24.380 pesos. Con el precio de venta establecido es posible asegurar una ganancia tanto para los productores como para el laboratorio y la farmacia, ya que es un valor de compra accesible para el sector al cual se apunta.

De acuerdo a ello y según lo estimado en el capítulo 6 respecto al plan de producción, la producción anual será variable, por lo que los ingresos también lo serán. En la tabla 7.15 se presentan los ingresos asociados a las ventas anuales de ácido p-cumárico según la programación estimada.

7.4 FLUJO DE CAJA

Para el desarrollo del flujo de caja, se considerarán como costos fijos la mano de obra, los costos de mantenimiento y reparaciones, suministros de operación, costos de laboratorio y los costos generales de producción. La mano de obra se mantiene constante durante todos los años del estudio y cualquier reajuste económico ya es considerado por la unidad monetaria utilizada (UF); el resto de los costos se estiman relativamente constantes en el período a evaluar el proyecto.

Los costos variables corresponderían a los costos de materia prima, reactivos downstream y suministros básicos, ya que éstos fueron calculados para 35 lotes, y al final del año 10 se tienen 45 lotes, llegando así a la capacidad máxima de la planta. La tabla 7.16 presenta la sumatoria de los costos variables año a año.

Tabla 7.15 Ingresos anuales por venta de ácido p-cumárico

Año	Producción	Ingresos por venta
	[kg ácido p-cumárico]	[UF]
2014	-	-
2015	1000	55000,00
2016	1029	56595,00
2017	1058	58190,00
2018	1087	59785,00
2019	1116	61380,00
2020	1145	62975,00
2021	1174	64570,00
2022	1203	66165,00
2023	1232	67760,00
2024	1261	69355,00

Tabla 7.16: Costos Variables

año	Materias Primas	Reactivos Downstream	Suministros Básicos	TOTAL
1	362,37	747,95	1423,8	2534,12
2	273,44	769,32	1464,48	2507,24
3	353,53	790,69	1505,16	2649,38
4	297,70	812,06	1545,83	2655,59
5	306,68	833,43	1586,52	2726,63
6	317,03	854,8	1627,2	2799,03
7	362,99	876,17	1667,88	2907,04
8	372,15	897,54	1708,56	2978,25
9	328,03	918,91	1749,24	2996,18
10	399,07	940,28	1789,92	3129,27

A los costos variables mencionados se le incorpora el costo por compra de renovación de material que no es realizado de forma anual. Este costo corresponde a la resina para la cromatografía de intercambio aniónico que tiene una vida útil de 2 años y su costo corresponde a 9,68 [UF].

La tabla 7.17 presenta el flujo de caja del proyecto.

Tabla 7.17 Flujo de caja del proyecto

Año	Ingresos [UF]	Inversión [UF]	Costos Fijos [UF]	Costos Variables [UF]			FAI [UF]	Depreciación Equipos	Depreciación Inmueble	FSI [UF]	Impuestos	FDI [UF]
0		42242					-42242					-42242
1	55000,00		20642,9	2750	2534,12	9,68	29063,3	1924,47	570	26568,83	5313,766	21255,064
2	56595,00		20642,9	2829,8	2507,24		30615,11	1924,47	570	28120,64	5624,128	22496,512
3	58190,00		20642,9	2909,5	2649,38	9,68	31978,54	1924,47	570	29484,07	5896,814	23587,256
4	59785,00		20642,9	2989,3	2655,59		33497,26	1924,47	570	31002,79	6200,558	24802,232
5	61380,00		20642,9	3069	2726,63	9,68	34931,79	1924,47	570	32437,32	6487,464	25949,856
6	62975,00		20642,9	3148,8	2799,03		36384,32		570	35814,32	7162,864	28651,456
7	64570,00		20642,9	3228,5	2907,04	9,68	37781,88		570	37211,88	7442,376	29769,504
8	66165,00		20642,9	3308,3	2978,25		39235,6		570	38665,6	7733,12	30932,48
9	67760,00		20642,9	3388	2996,18	9,68	40723,24		570	40153,24	8030,648	32122,592
10	69355,00		20642,9	3467,8	3129,27		42115,08		570	41545,08	8309,016	33236,064

7.5 RENTABILIDAD ECONÓMICA

Como primera observación, es importante destacar que los valores utilizados en el flujo de caja corresponden a valores netos (sin IVA), ya que el manejo del IVA está regulado por las disposiciones contables emitidas por el Servicio de Impuestos Internos (SII) del Gobierno de Chile y no tiene mayor efecto en el proyecto sino que en el consumidor final. Por lo tanto, para determinación del capital total de inversión se debe incluir un 19% adicional correspondiente al IVA al que estarán sujetos los precios y que no están considerados en el flujo de caja.

Para este análisis se escoge una tasa mínima de retorno aceptable (TRMA) de un 20%, considerándose pertinente para el interés de un inversionista.

De acuerdo a lo anterior y basándose en el flujo de caja de la tabla 7.15 se obtiene un Valor Actual Neto (VAN) positivo de 63.823 [UF] y una Tasa Interna de Retorno (TIR) de un 55% como se puede observar en la figura 7.1. De esta manera, el proyecto entrega una rentabilidad mayor a la mínima aceptada (20%), pudiendo establecer que con un precio de venta neto de 55 [UF/kg] se obtendría un proyecto rentable.

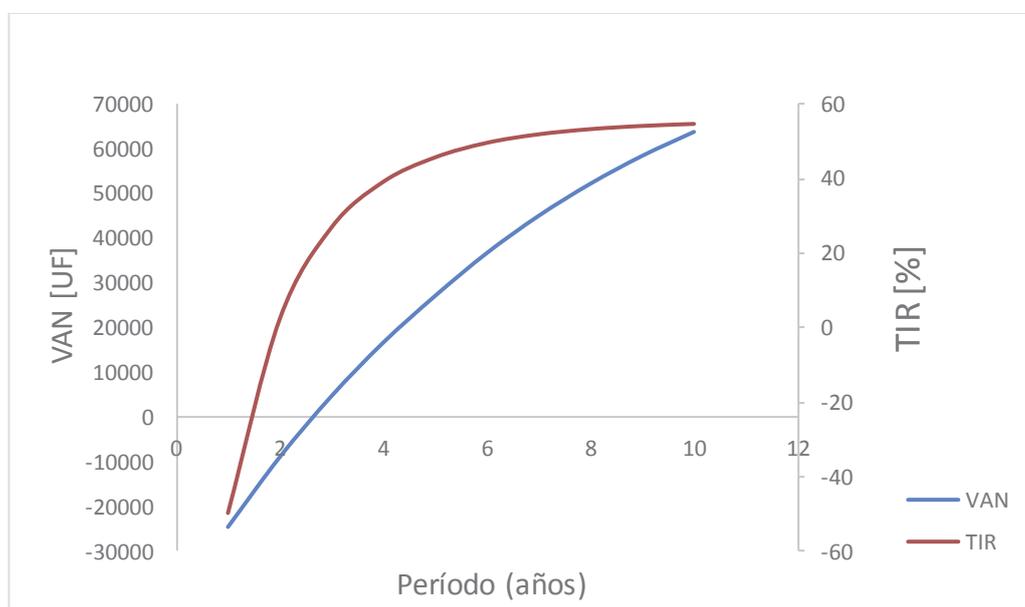


Figura 7.1 Representación gráfica de VAN y TIR del proyecto

7.6 ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD ECONÓMICA

En esta sección se busca analizar la variación de los indicadores económicos seleccionados (TIR y VAN) frente a escenarios diferentes al actual. La selección de las variables de análisis de sensibilidad se realizó considerando principalmente aquellas variables que no pueden ser controladas y que son afectadas sustancialmente por el mercado y aquellas que, según se estima, podrían tener asociados los mayores errores en la valorización realizada. Para el análisis de sensibilización se consideró el costo de las materias primas, el costo de la inversión inicial y el precio de venta del producto.

7.6.1 Variación en la materia prima

Para el caso de las materias primas, se analizaron variaciones progresivas del 10% y 35% anual en el precio de éstas. Los resultados se observan en la tabla 7.18 y serían favorables, ya que los valores cumplen con los criterios de un TIR mayor a la TRMA y un VAN mayor a cero. El precio de la materia prima no es un factor que afecte considerablemente los indicadores económicos del proyecto, ya que al aumentar progresivamente los precios de la materia prima en un 35%, el TIR sólo disminuye en un 3%.

7.6.2 Variación en la inversión inicial

Para la variación del costo de la inversión inicial, se consideró un caso desfavorable, en el cual se halla un aumento del 100%. Aun cuando se haya tenido un error en la estimación de la inversión inicial del 100%, el proyecto seguiría siendo rentable. Los resultados serían favorables y se indican en la tabla 7.18. El TIR en este caso es mayor que el TRMA establecido inicialmente y el VAN mayor a cero.

7.6.3 Variación en el precio de venta del ácido *p*-cumárico

Por último se analizó una variación en el precio venta del producto. Una disminución de un 40% en el precio implicaría un TIR inferior a la TRMA y un VAN menor a cero, por lo que la rentabilidad del proyecto no sería aceptable. Por otro lado, un aumento del precio de venta de un 50% afectaría positivamente las rentas, dejando el proyecto aceptado según los criterios de indicadores utilizados. Los resultados están indicados en la tabla 7.18.

Tabla 7.18 Resultados de sensibilización

Variable	Valor base	Variación	VAN [UF]	TIR [%]
Precio de Venta	55 [UF/kg]	+40%	138603,0	94%
		-40%	-14089,6	11%
Materias Primas	1110,32 [UF]	+10%	62257,2	54%
		+35%	53178,7	52%
Inversión Inicial	42242 [UF]	+100%	21581,5	27%

REFERENCIAS CAPÍTULO 7

- Banco Central de Chile. (Diciembre de 2014). *Indicadores Diarios*. Obtenido de <http://si3.bcentral.cl/Indicadoresiete/secure/Indicadoresdiarios.aspx>
- Calderón, C. (Diciembre de 2014). Gerente I+D Neotecnos. *Cotización líneas celulares*.
- Chilquinta Energía S.A. (2014). *Valor Tarifa - Chilquinta Energía*. Obtenido de <http://www.chilquinta.cl/mi-hogar/hogar/seccion/21/valor-tarifa.html>
- ESVAL. (2014). *Tarifas de Agua Potable y Alcantarillado*. Obtenido de <http://portal.esval.cl/oficina-virtual/tarifas/>
- Guitart, J. (diciembre de 2014). Subgerente Kaufen Propiedades. *Cotización terrenos Quinta Región*.
- Matches. (2014). *Index of Process Equipment*. Obtenido de <http://www.matche.com/equipcost/EquipmentIndex.html>
- Ministerio de Educación, Gobierno de Chile. (2014). *Buscador de Empleabilidad e Ingresos: mifuturo.cl*. Obtenido de <http://mifuturo.cl>
- Peters, M., & Timmerhaus, K. (1991). Cost Estimation. En M. Peters, & K. Timmerhaus, *Plant Design and Economics for Chemical Engineers* (págs. 150-216). McGraw-Hill.
- Servicio de Impuestos Internos. (2003). *Nueva Tabla de Vida Útil de los bienes activos inmovilizados*. Obtenido de http://www.sii.cl/pagina/valores/bienes/tabla_vida_enero.htm
- Servicio de Impuestos Internos. (2014). *Impuesto a las Utilidades*. Obtenido de http://www.sii.cl/portales/inversionistas/imp_chile/impuesto_primera.htm
- Sigma-Aldrich Co. (2014). *Chile | Sigma-Aldrich*. Obtenido de <http://www.sigmaaldrich.com/chile.html>

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN, CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

Se logró establecer un mercado en Chile para una determinada comunidad objetivo relativamente pequeña. Si bien se cumplió el objetivo de establecer un mercador para el ácido *p*-cumárico, presentada la información y estableciendo el estado del arte del proyecto; se concluye que es necesario seguir indagando información que pudiera publicarse en los próximos años para determinar con mayor precisión el mercado y evaluar la factibilidad de incorporar las enfermedades asociadas al cáncer dentro del mercado consumidor. La nueva información podría ser fundamental para la realización del proyecto, ya que indicaría si el producto sigue siendo de interés médico o no.

En cuanto a la perspectiva técnica, es totalmente factible instalar una planta productora de ácido *p*-cumárico por vía fermentativa, tanto tecnológica como operacionalmente. La tecnología actual es aceptable para la correcta realización del proyecto. Sin embargo, la necesidad de recabar más información no solo influye en lo que son las propiedades del producto en cuestión, sino también en los métodos de fermentación, recuperación y purificación, los cuales son críticos en el rendimiento del proceso.

Por otro lado, la evaluación económica del proyecto concluyó en resultados positivos, siendo el proyecto rentable según los indicadores utilizados (TIR y VAN). Es decir, que en términos económicos el proyecto es realizable.

Es importante concluir, que según el mercado establecido existe una cuota de incertidumbre de acuerdo al precio de venta que podría tener el producto, debido a que no existe actualmente una venta de algún medicamento a base de ácido *p*-cumárico. El análisis de sensibilidad indicó que el proyecto es muy sensible al parámetro del precio de venta y por ende la evaluación se puede ver limitada.

Con respecto a las recomendaciones. En primer lugar, es conveniente realizar constantes investigaciones acerca de las condiciones de producción, recuperación, purificación y propiedades del producto, con el objetivo de proporcionar alguna innovación que resulte interesante. La constante revisión de nuevas o inválidas aplicaciones del ácido *p*-cumárico

podría ayudar a corregir algún error en la estimación de la demanda y por ende en la producción.

Por otro lado, se recomienda analizar un posible mercado en otros países, en los cuales exista incidencia de enfermedades cardiovasculares con posible tratamiento con ácido *p*-cumárico. Luego, la demanda aumentaría y existiría la implementación de una nueva planta o sucursal.

APÉNDICE

ANEXO A

ESTIMACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LA PLANTA

La producción de ácido p-cumárico tendrá dos fines, pre y post tratamiento de IAM (infarto al miocardio), por lo que la estimación se realizará para cada caso y luego se sumará para saber la capacidad total de la planta.

P-CUMÁRICO PARA TRATAMIENTO

Para determinar la cantidad de kilogramos destinados al tratamiento de los infartos se utilizará la siguiente ecuación:

$$n \cdot d = m$$

Donde:

- m = masa de p-cumárico, [kg]
- n = número de consumidores, [persona]
- d = dosis de p-cumárico, 0,36 [kg/persona]

El número de personas o consumidores que utilizarían ácido p-cumárico para tratar el infarto al miocardio se ha definido de la siguiente forma:

$$I \cdot x_{ABC1} \cdot x_r = n$$

Donde:

- I = infartados anuales que sobreviven al IAM; 10.000 [personas]
- x_{ABC1} = fracción de la población que pertenece al sector ABC1; 0,054
- x_r = fracción que se asume de consumidores reales; 0,2

Entonces,

$$n = 10.000 [personas] \cdot 0,054 \cdot 0,2 = 108 [personas]$$

Reemplazando el valor en la ecuación anterior se tiene

$$108 \text{ [personas]} \cdot 0,36 \left[\frac{\text{kg}}{\text{persona}} \right] = 38,9 \text{ [kg]}$$

P-CUMÁRICO PARA PREVENCIÓN

Para estimar la cantidad de personas que consumirían ácido p-cumárico para prevenir un IAM se utilizará la siguiente ecuación:

$$P \cdot x_{AM} \cdot x_{ABC1} \cdot x_r = n$$

Donde:

- P = población chilena estimada, 17.900.000
- x_{AM} = fracción de adultos mayores, 0,13
- x_{ABC1} = fracción de los adultos mayores que pertenece al sector ABC1; 0,05
- x_r = fracción que se asume de consumidores reales; 0,023

Entonces,

$$n = 17.900.000 \cdot 0,13 \cdot 0,05 \cdot 0,023 = 2675 \text{ [personas]}$$

Análogo al caso anterior, se reemplaza el valor de n para obtener la masa de p-cumárico.

$$2675 \text{ [personas]} \cdot 0,36 \left[\frac{\text{kg}}{\text{persona}} \right] = 963 \text{ [kg]}$$

ANEXO B

MATERIAS PRIMAS

La cantidad de fermentaciones anuales irá aumentando con los años, partiendo con 35 fermentaciones anuales y llegando a 45 en el año 10, por lo tanto, el costo anual de suministros básicos será variable. Además, muchos de los reactivos utilizados en el medio de cultivo son comprados a granel, en lotes mayores a lo necesario para abaratar costos por lo que éste es un factor que también varía año a año. Las siguientes tablas describen el análisis realizado para cada reactivo, tomando en cuenta el remanente de cada año.

Tabla B1: Costo anual de materias primas año 1

Nutriente	kg/Lote	Kg/año1	Precio USD/Kg		Unidades a comprar	USD a pagar	UF	Restante año 1
Medio de Cultivo								
Glucosa	279,999	9799,97	720	1000	10	7200,00	178,75	0,200
(NH4)2SO4	13,731	480,59	180	1000	1	180,00	4,47	0,519
K2HPO4	13,32	466,20	1500	1000	1	1500,00	37,24	0,534
NaH2PO4	5,596	195,86	1100	1000	1	1100,00	27,31	0,804
						SUBTOTAL	247,77	
L-Fenilalanina								
L-Fen	2,12	74,20	2000	100	1	2000,00	49,65	0,258
						SUBTOTAL	49,65	
Solución Traza								
MgCl2 6H2O	0,687	24,05	600	10	3	1800,00	44,69	0,596
EDTA	0,069	2,42	73	0,5	5	365,00	9,06	0,170
ZnSO4 7H2O	0,014	0,49	43,18	0,5	1	43,18	1,07	0,020
CaCl2 2H2O	0,007	0,25	72	0,5	1	72,00	1,79	0,510
FeSO4 7H2O	0,035	1,23	67	0,5	3	201,00	4,99	0,550
Na2MoO4 2H2O	0,002	0,07	58,95	0,1	1	58,95	1,46	0,300
CuSO4 5H2O	0,002	0,0700	19	0,34	1	19,00	0,47	0,794
CoCl2 6H2O	0,003	0,11	12,95	0,125	1	12,95	0,32	0,160
MnCl2 4H2O	0,007	0,25	44	0,5	1	44,00	1,09	0,510
						SUBTOTAL	64,95	
TOTAL							362,37	

Tabla B2: Costo anual de materias primas año 2

Nutriente	kg/Lote	Kg/año2	Precio USD/Kg		Unidades a comprar	USD a pagar	UF	Restante año 1	Restante año 2
Medio de Cultivo									
Glucosa	279,999	10079,96	720	1000	10	7200,00	178,75	0,200	0,120
(NH4)2SO4	13,731	494,32	180	1000	0	0,00	0,00	0,519	0,025
K2HPO4	13,32	479,52	1500	1000	0	0,00	0,00	0,534	0,054
NaH2PO4	5,596	201,46	1100	1000	0	0,00	0,00	0,804	0,603
						SUBTOTAL	178,75		
L-Fenilalanina									
L-Fen	2,12	76,32	2000	100	1	2000,00	49,65	0,258	0,495
						SUBTOTAL	49,65		
Solución Traza									
MgCl2 6H2O	0,687	24,73	600	10	2	1200,00	29,79	0,596	0,123
EDTA	0,069	2,48	73	0,5	5	365,00	9,06	0,170	0,202
ZnSO4 7H2O	0,014	0,50	43,18	0,5	1	43,18	1,07	0,020	0,012
CaCl2 2H2O	0,007	0,25	72	0,5	0	0,00	0,00	0,510	0,006
FeSO4 7H2O	0,035	1,26	67	0,5	2	134,00	3,33	0,550	0,030
Na2MoO4 2H2O	0,002	0,07	58,95	0,1	1	58,95	1,46	0,300	0,580
CuSO4 5H2O	0,002	0,07	19	0,34	0	0,00	0,00	0,794	0,582
CoCl2 6H2O	0,003	0,11	12,95	0,125	1	12,95	0,32	0,160	0,296
MnCl2 4H2O	0,007	0,25	44	0,5	0	0,00	0,00	0,510	0,006
						SUBTOTAL	45,04		
TOTAL							273,44		

Tabla B3: Costo anual de materias primas año 3

Nutriente	kg/Lote	Kg/año3	Precio USD/Kg		Unidades a comprar	USD a pagar	UF	Restante año2	Restante año3
Medio de Cultivo									
Glucosa	279,999	10359,96	720	1000	11	7920,00	196,62	0,120	0,760
(NH4)2SO4	13,731	508,05	180	1000	1	180,00	4,47	0,025	0,517
K2HPO4	13,32	492,84	1500	1000	1	1500,00	37,24	0,054	0,561
NaH2PO4	5,596	207,05	1100	1000	0	0,00	0,00	0,603	0,396
						SUBTOTAL	238,33		
L-Fenilalanina									
L-Fen	2,12	78,44	2000	100	1	2000,00	49,65	0,495	0,711
						SUBTOTAL	49,65		
Solución Traza									
MgCl2 6H2O	0,687	25,42	600	10	3	1800,00	44,69	0,123	0,581
EDTA	0,069	2,55	73	0,5	5	365,00	9,06	0,202	0,096
ZnSO4 7H2O	0,014	0,52	43,18	0,5	2	86,36	2,14	0,012	0,976
CaCl2 2H2O	0,007	0,26	72	0,5	1	72,00	1,79	0,006	0,488
FeSO4 7H2O	0,035	1,30	67	0,5	3	201,00	4,99	0,030	0,440
Na2MoO4 2H2O	0,002	0,07	58,95	0,1	1	58,95	1,46	0,580	0,840
CuSO4 5H2O	0,002	0,07	19	0,34	0	0,00	0,00	0,582	0,364
CoCl2 6H2O	0,003	0,11	12,95	0,125	1	12,95	0,32	0,296	0,408
MnCl2 4H2O	0,007	0,26	44	0,5	1	44,00	1,09	0,006	0,488
						SUBTOTAL	65,55		
TOTAL							353,53		

Tabla B4: Costo anual de materias primas año 4

Nutriente	kg/Lote	Kg/año4	Precio USD/Kg		Unidades a comprar	USD a pagar	UF	Restante año3	Restante año 4
Medio de Cultivo									
Glucosa	279,999	10639,96	720	1000	10	7200,00	178,75	0,760	0,120
(NH4)2SO4	13,731	521,78	180	1000	1	180,00	4,47	0,517	0,995
K2HPO4	13,32	506,16	1500	1000	0	0,00	0,00	0,561	0,055
NaH2PO4	5,596	212,65	1100	1000	0	0,00	0,00	0,396	0,183
						SUBTOTAL	183,22		
L-Fenilalanina									
L-Fen	2,12	80,56	2000	100	1	2000,00	49,65	0,711	0,905
						SUBTOTAL	49,65		
Solución Traza									
MgCl2 6H2O	0,687	26,11	600	10	3	1800,00	44,69	0,581	0,970
EDTA	0,069	2,62	73	0,5	6	438,00	10,87	0,096	0,852
ZnSO4 7H2O	0,014	0,53	43,18	0,5	1	43,18	1,07	0,976	0,912
CaCl2 2H2O	0,007	0,27	72	0,5	1	72,00	1,79	0,488	0,956
FeSO4 7H2O	0,035	1,33	67	0,5	3	201,00	4,99	0,440	0,780
Na2MoO4 2H2O	0,002	0,08	58,95	0,1	0	0,00	0,00	0,840	0,080
CuSO4 5H2O	0,002	0,08	19	0,34	0	0,00	0,00	0,364	0,140
CoCl2 6H2O	0,003	0,11	12,95	0,125	1	12,95	0,32	0,408	0,496
MnCl2 4H2O	0,007	0,27	44	0,5	1	44,00	1,09	0,488	0,956
						SUBTOTAL	64,82		
						TOTAL	297,70		

Tabla B5: Costo anual de materias primas año 5

Nutriente	kg/Lote	Kg/año5	Precio USD/Kg		Unidades a comprar	USD a pagar	UF	Restante año4	Restante año 5
Medio de Cultivo									
Glucosa	279,999	10919,96	720	1000	11	7920,00	196,62	0,120	0,200
(NH4)2SO4	13,731	535,51	180	1000	0	0,00	0,00	0,995	0,459
K2HPO4	13,32	519,48	1500	1000	1	1500,00	37,24	0,055	0,536
NaH2PO4	5,596	218,24	1100	1000	1	1100,00	27,31	0,183	0,965
						SUBTOTAL	261,17		
L-Fenilalanina									
L-Fen	2,12	82,68	2000	100	0	0,00	0,00	0,905	0,078
						SUBTOTAL	0,00		
Solución Traza									
MgCl2 6H2O	0,687	26,79	600	10	2	1200,00	29,79	0,970	0,291
EDTA	0,069	2,69	73	0,5	5	365,00	9,06	0,852	0,470
ZnSO4 7H2O	0,014	0,55	43,18	0,5	1	43,18	1,07	0,912	0,820
CaCl2 2H2O	0,007	0,27	72	0,5	0	0,00	0,00	0,956	0,410
FeSO4 7H2O	0,035	1,37	67	0,5	2	134,00	3,33	0,780	0,050
Na2MoO4 2H2O	0,002	0,08	58,95	0,1	1	58,95	1,46	0,080	0,300
CuSO4 5H2O	0,002	0,08	19	0,34	1	19,00	0,47	0,140	0,911
CoCl2 6H2O	0,003	0,12	12,95	0,125	1	12,95	0,32	0,496	0,560
MnCl2 4H2O	0,007	0,27	44	0,5	0	0,00	0,00	0,956	0,410
						SUBTOTAL	45,51		
TOTAL							306,68		

Tabla B6: Costo anual de materias primas año 6

Nutriente	kg/Lote	Kg/año6	Precio USD/Kg		Unidades a comprar	USD a pagar	UF	Restante año5	Restante año6
Medio de Cultivo									
Glucosa	279,999	11199,96	720	1000	11	7920,00	196,62	0,200	0,000
(NH4)2SO4	13,731	549,24	180	1000	1	180,00	4,47	0,459	0,910
K2HPO4	13,32	532,80	1500	1000	0	0,00	0,00	0,536	0,003
NaH2PO4	5,596	223,84	1100	1000	0	0,00	0,00	0,965	0,741
						SUBTOTAL	201,09		
L-Fenilalanina									
L-Fen	2,12	84,80	2000	100	1	2000,00	49,65	0,078	0,230
						SUBTOTAL	49,65		
Solución Traza									
MgCl2 6H2O	0,687	27,48	600	10	3	1800,00	44,69	0,291	0,543
EDTA	0,069	2,76	73	0,5	6	438,00	10,87	0,470	0,950
ZnSO4 7H2O	0,014	0,56	43,18	0,5	1	43,18	1,07	0,820	0,700
CaCl2 2H2O	0,007	0,28	72	0,5	1	72,00	1,79	0,410	0,850
FeSO4 7H2O	0,035	1,40	67	0,5	3	201,00	4,99	0,050	0,250
Na2MoO4 2H2O	0,002	0,08	58,95	0,1	1	58,95	1,46	0,300	0,500
CuSO4 5H2O	0,002	0,08	19	0,34	0	0,00	0,00	0,911	0,676
CoCl2 6H2O	0,003	0,12	12,95	0,125	1	12,95	0,32	0,560	0,600
MnCl2 4H2O	0,007	0,28	44	0,5	1	44,00	1,09	0,410	0,850
						SUBTOTAL	66,29		
TOTAL							317,03		

Tabla B7: Costo anual de materias primas año 7

Nutriente	kg/Lote	Kg/año7	Precio USD/Kg		Unidades a comprar	USD a pagar	UF	Restante año 6	Restante año 7	
Medio de Cultivo										
Glucosa	279,999	11479,96	720	1000	12	8640,00	214,50	0,000	0,520	
(NH4)2SO4	13,731	562,97	180	1000	0	0,00	0,00	0,910	0,347	
K2HPO4	13,32	546,12	1500	1000	1	1500,00	37,24	0,003	0,457	
NaH2PO4	5,596	229,44	1100	1000	0	0,00	0,00	0,741	0,512	
						SUBTOTAL	251,74			
L-Fenilalanina										
L-Fen	2,12	86,92	2000	100	1	2000,00	49,65	0,230	0,361	
						SUBTOTAL	49,65			
Solución Traza										
MgCl2 6H2O	0,687	28,17	600	10	3	1800,00	44,69	0,543	0,726	
EDTA	0,069	2,83	73	0,5	5	365,00	9,06	0,950	0,292	
ZnSO4 7H2O	0,014	0,57	43,18	0,5	1	43,18	1,07	0,700	0,552	
CaCl2 2H2O	0,007	0,29	72	0,5	0	0,00	0,00	0,850	0,276	
FeSO4 7H2O	0,035	1,44	67	0,5	3	201,00	4,99	0,250	0,380	
Na2MoO4 2H2O	0,002	0,08	58,95	0,1	1	58,95	1,46	0,500	0,680	
CuSO4 5H2O	0,002	0,08	19	0,34	0	0,00	0,00	0,676	0,435	
CoCl2 6H2O	0,003	0,12	12,95	0,125	1	12,95	0,32	0,600	0,616	
MnCl2 4H2O	0,007	0,29	44	0,5	0	0,00	0,00	0,850	0,276	
						SUBTOTAL	61,60			
							TOTAL	362,99		

Tabla B8: Costo anual de materias primas año 8

Nutriente	kg/Lote	Kg/año8	Precio USD/Kg		Unidades a comprar	USD a pagar	UF	Restante año 7	Restante año 8	
Medio de Cultivo										
Glucosa	279,999	11759,96	720	1000	12	8640,00	214,50	0,520	0,760	
(NH4)2SO4	13,731	576,70	180	1000	1	180,00	4,47	0,347	0,770	
K2HPO4	13,32	559,44	1500	1000	1	1500,00	37,24	0,457	0,898	
NaH2PO4	5,596	235,03	1100	1000	0	0,00	0,00	0,512	0,277	
						SUBTOTAL	256,21			
L-Fenilalanina										
L-Fen	2,12	89,04	2000	100	1	2000,00	49,65	0,361	0,471	
						SUBTOTAL	49,65			
Solución Traza										
MgCl2 6H2O	0,687	28,85	600	10	3	1800,00	44,69	0,726	0,841	
EDTA	0,069	2,90	73	0,5	6	438,00	10,87	0,292	0,496	
ZnSO4 7H2O	0,014	0,59	43,18	0,5	1	43,18	1,07	0,552	0,376	
CaCl2 2H2O	0,007	0,29	72	0,5	1	72,00	1,79	0,276	0,688	
FeSO4 7H2O	0,035	1,47	67	0,5	3	201,00	4,99	0,380	0,440	
Na2MoO4 2H2O	0,002	0,08	58,95	0,1	1	58,95	1,46	0,680	0,840	
CuSO4 5H2O	0,002	0,08	19	0,34	0	0,00	0,00	0,435	0,188	
CoCl2 6H2O	0,003	0,13	12,95	0,125	1	12,95	0,32	0,616	0,608	
MnCl2 4H2O	0,007	0,29	44	0,5	1	44,00	1,09	0,276	0,688	
						SUBTOTAL	66,29			
							TOTAL	372,15		

Tabla B9: Costo anual de materias primas año 9

Nutriente	kg/Lote	Kg/año9	Precio USD/Kg		Unidades a comprar	USD a pagar	UF	Restante año 8	Restante año 9	
Medio de Cultivo										
Glucosa	279,999	12039,96	720	1000	12	8640,00	214,50	0,760	0,720	
(NH4)2SO4	13,731	590,43	180	1000	0	0,00	0,00	0,770	0,180	
K2HPO4	13,32	572,76	1500	1000	0	0,00	0,00	0,898	0,325	
NaH2PO4	5,596	240,63	1100	1000	0	0,00	0,00	0,277	0,036	
						SUBTOTAL	214,50			
L-Fenilalanina										
L-Fen	2,12	91,16	2000	100	1	2000,00	49,65	0,471	0,559	
						SUBTOTAL	49,65			
Solución Traza										
MgCl2 6H2O	0,687	29,54	600	10	3	1800,00	44,69	0,841	0,887	
EDTA	0,069	2,97	73	0,5	6	438,00	10,87	0,496	0,562	
ZnSO4 7H2O	0,014	0,60	43,18	0,5	1	43,18	1,07	0,376	0,172	
CaCl2 2H2O	0,007	0,30	72	0,5	0	0,00	0,00	0,688	0,086	
FeSO4 7H2O	0,035	1,51	67	0,5	3	201,00	4,99	0,440	0,430	
Na2MoO4 2H2O	0,002	0,09	58,95	0,1	1	58,95	1,46	0,840	0,980	
CuSO4 5H2O	0,002	0,09	19	0,34	1	19,00	0,47	0,188	0,935	
CoCl2 6H2O	0,003	0,13	12,95	0,125	1	12,95	0,32	0,608	0,576	
MnCl2 4H2O	0,007	0,30	44	0,5	0	0,00	0,00	0,688	0,086	
						SUBTOTAL	63,88			
							TOTAL	328,03		

Tabla B10: Costo anual de materias primas año 10

Nutriente	kg/Lote	Kg/año10	Precio USD/Kg		Unidades a comprar	USD a pagar	UF	Restante año 9	Restante año 10	
Medio de Cultivo										
Glucosa	279,999	12319,96	720	1000	12	8640,00	214,50	0,720	0,400	
(NH4)2SO4	13,731	604,16	180	1000	1	180,00	4,47	0,180	0,576	
K2HPO4	13,32	586,08	1500	1000	1	1500,00	37,24	0,325	0,739	
NaH2PO4	5,596	246,22	1100	1000	1	1100,00	27,31	0,036	0,790	
						SUBTOTAL	283,52			
L-Fenilalanina										
L-Fen	2,12	93,28	2000	100	1	2000,00	49,65	0,559	0,626	
						SUBTOTAL	49,65			
Solución Traza										
MgCl2 6H2O	0,687	30,23	600	10	3	1800,00	44,69	0,887	0,864	
EDTA	0,069	3,04	73	0,5	6	438,00	10,87	0,562	0,490	
ZnSO4 7H2O	0,014	0,62	43,18	0,5	2	86,36	2,14	0,172	0,940	
CaCl2 2H2O	0,007	0,31	72	0,5	1	72,00	1,79	0,086	0,470	
FeSO4 7H2O	0,035	1,54	67	0,5	3	201,00	4,99	0,430	0,350	
Na2MoO4 2H2O	0,002	0,09	58,95	0,1	0	0,00	0,00	0,980	0,100	
CuSO4 5H2O	0,002	0,09	19	0,34	0	0,00	0,00	0,935	0,676	
CoCl2 6H2O	0,003	0,13	12,95	0,125	1	12,95	0,32	0,576	0,520	
MnCl2 4H2O	0,007	0,31	44	0,5	1	44,00	1,09	0,086	0,470	
						SUBTOTAL	65,90			
							TOTAL	399,07		

ANEXOC

SUMINISTROS BÁSICOS

La cantidad de fermentaciones anuales irá aumentando con los años, partiendo con 35 fermentaciones anuales y llegando a 45 en el año 10, por lo tanto, el costo anual de suministros básicos será variable. Las tablas C1 y C2 resumen el consumo de agua y energía por fermentación, de manera de luego multiplicar dicho costo unitario por la cantidad de fermentaciones anuales.

Tabla C1: Consumo de Agua por Lote de Fermentación

Equipo	Unidad	Agua por Equipo [L]	Agua por fermentación [L]
F1	1	0,32	0,32
F2	1	6,37	6,37
F3	1	127,69	127,69
F4	2	894,485	1788,97
F5	2	7438	14876
Cromatografía	10	21,6	216
TOTAL			17015,35

Tabla C2: Consumo de Electricidad por Lote de Fermentación

Equipo	Unidad	Potencia por Equipo [kW]	Energía por Fermentación [kW*h]
Tk Trazas	1	0,536	128,64
Tk Medio Cultivo	1	0,688	165,12
Tk L-Fenilalanina	1	0,536	0,1632
Tk Glucosa	1	0,776	186,24
F2	1	$4,11 * 10^{-4}$	0,0193
F3	1	$4,03 * 10^{-2}$	1,8941
F4	2	0,303	108,24
F5	2	5,259	1248,54
Centrífuga	1	3,7	710,4
Evaporador	1	10,491	629,46
Secador	1	7,5	150
Bomba J1.6	9	0,55	308
Bomba PK 100	5	1,11	129,8
Bomba QBK-25	1	0,4	6
Soplador	1	30	5760
Autoclave	1	2,5	25
Caldera	1	20	5760
TOTAL			15317,53

Teniendo los consumos de agua y energía por lote, es posible calcular el consumo anual y el aumento de éste conforme aumenta la producción anual. La Tabla C3 presenta los resultados de la proyección del consumo anual de suministros básicos.

Tabla C3: Consumo Anual de agua y energía

Año	Lotes	Consumo Agua [m ³]	Consumo Energía [kW*h]
1	35	595,53	536.025
2	36	612,55	551.340
3	37	629,56	566.655
4	38	646,58	581.970
5	39	663,59	597.285
6	40	680,61	612.600
7	41	697,63	627.915
8	42	714,64	643.230
9	43	731,66	658.545
10	44	748,67	673.860