

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Extracción, purificación y
modificación de un biopolímero del
tipo poli (3-hidroxibutirato) obtenido
de la fermentación de ácidos grasos
con *B. cepacia*.**

Andrés Felipe Ramos Farfán

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería – Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá, Colombia
2019

Extracción, purificación y modificación de un biopolímero del tipo poli (3-hidroxibutirato) obtenido de la fermentación de ácidos grasos con *B. cepacia*.

Andrés Felipe Ramos Farfán

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ingeniería Química

Director (a):

Armando Espinosa Hernández

Codirector (a):

Iván Orlando Cabeza

Línea de Investigación:

Biopolímeros - Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Bioprospección

Universidad Nacional de Colombia
Facultad, Departamento (Escuela, etc.)
Ciudad, Colombia
Año

*A mis padres que hicieron esto posible, y a los
valiosos amigos que conocí durante el proceso.*

Agradecimientos

Deseo presentar mis agradecimientos al instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, que ofreció sus instalaciones y recursos para el desarrollo de este trabajo de maestría, especialmente a todo el personal, investigadores y pasantes del laboratorio de fermentaciones que fueron mi familia por más de un año y sin duda alguna un apoyo muy valioso, sin su experiencia e ideas, hubiera sido imposible sacar este proyecto adelante. Un agradecimiento muy especial a la Ingeniera Nubia Moreno y al Ingeniero Armando Espinosa, quienes pusieron a mi disposición su tiempo, experiencia y paciencia para guiarme en el desarrollo de este proyecto, que me enseñaron invaluable lecciones sobre la perseverancia y el trabajo duro, y de quienes me llevo una muy buena imagen y un ejemplo a seguir.

A todos los colegas que conocí durante el proceso, que con sus formas diversas de pensar me enseñaron a ver el mundo de una manera diferente, contemplar muchas alternativas que no hubiera contemplado por mí mismo e interesarme por muchos campos de la ingeniería química y de la ciencia que no conocía con anterioridad. A la empresa Biopolab y sus directores, al departamento de Ingeniería Química por ofrecerme la oportunidad de ser un aspirante a grado de la maestría en Ingeniería Química, y a la Universidad Nacional de Colombia, que se convirtió y será por siempre mi segundo hogar.

Finalmente, a mis padres, hermanos y amigos, quienes siempre fueron un apoyo muy valioso y una parte fundamental en el desarrollo de este arduo proceso.

Resumen

Este trabajo tiene como objetivo estudiar la extracción, purificación y modificación del biopolímero poli(3-hidroxiбутирато) producido mediante la fermentación de ácidos grasos con la cepa mutante *Burkholderia cepacia* B27 con el fin de obtener un proceso novedoso y ambientalmente sostenible para un eventual escalamiento del proceso, y un material con propiedades mecánicas y térmicas que le permitan ser procesado con mayor facilidad y así obtener más salidas en el mercado de los materiales poliméricos. En el trabajo se propone un método novedoso y eficiente para la extracción del polímero usando ácido acético en vez de cloroformo, siendo la nueva metodología más segura para quien la desarrolle debido a la naturaleza de los solventes usados, y ambientalmente más sostenible debido a la significativa reducción de solventes halogenados en el proceso. Por otro lado, se modificó el polímero purificado usando diferentes aditivos, para evaluar el efecto de estos sobre las propiedades mecánicas del material final, y se determinó que las mezclas P3HB/PEG/PLA en diferentes rangos de concentraciones, presentan propiedades mecánicas significativamente mejores a las del P3HB puro que permiten ampliar su espectro de aplicaciones. Este trabajo fue desarrollado con el patrocinio de Colciencias, Biopolab y el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, y se desarrolló en el laboratorio de Fermentaciones del IBUN bajo la dirección de Armando Espinosa, Iván Cabeza y Nubia Moreno.

Palabras clave: Poli(3-hidroxiбутирато), *Burkholderia cepacia*, extracción con solvente, ácido poliláctico, biopolímeros, mezclas poliméricas.

Abstract

The objective of this work was to study the extraction, purification and modification of poly(3-hydroxybutyrate), a biopolymer produced by the fermentation of fatty acids with the mutant strain *Burkholderia cepacia* B27 in order to obtain a novel and environmentally sustainable process for an eventual scale - up, and a material with mechanical and thermal properties that allow it to be processed more easily and thus be more competitive in the polymeric materials market. The work proposes a novel and efficient method for the extraction of the polymer using acetic acid instead of chloroform, being a safer methodology for those who develop it due to the nature of the solvents used, and environmentally more sustainable due to the significant reduction of halogenated solvents in the process. On the other hand, the purified polymer was modified using different additives to evaluate the effect of these on the mechanical properties of the final material, and it was determined that P3HB/PEG/PLA mixtures in different concentration ranges have significantly better mechanical properties than pure P3HB that allow to broaden their spectrum of applications. This work was developed with the sponsorship of Colciencias, Biopolab and the Institute of Biotechnology of the National University, and it was developed in the fermentation's laboratory of the IBUN under the direction of Armando Espinosa, Iván Cabeza and Nubia Moreno.

Keywords: Poly(3-hydroxybutyrate), *Burkholderia cepacia*, solvent extraction, polylactic acid, biopolymers, polymer mixtures

Contenido

1	Capítulo 1: Generalidades de los polihidroxicanoatos.....	5
1.1	Polihidroxicanoatos (PHAs)	5
1.1.1	Historia de los PHAs	5
1.1.2	Biosíntesis de Polihidroxicanoatos	6
1.1.3	Poli(3-hidroxicbutirato).....	9
1.2	Producción de P3HB	11
1.2.1	Fermentación.....	11
1.2.2	Extracción y Purificación de PHAs.....	14
1.3	Modificación del P3HB y sus copolímeros	23
1.3.1	Blendas o mezclas poliméricas.....	23
1.3.2	Refuerzos y Rellenos.....	30
1.4	Producción de P3HB en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN).....	31
2	Capítulo 2: Evaluación de diferentes técnicas de Extracción y Purificación.....	37
2.1	Metodología	37
2.1.1	Proceso Fermentativo.....	37
2.1.2	Digestión química con SDS	38
2.1.3	Proceso estándar para la extracción y purificación del P3HB usando cloroformo,	39
2.1.4	Determinación de la cantidad óptima de cloroformo para la purificación	40
2.1.5	Evaluación de diferentes solventes orgánicos para eliminar residuos.....	40
2.1.6	Evaluación de la precipitación de la biomasa con la adición de un anti-solvente.....	41
2.1.7	Evaluación de la solubilidad del P3HB en diferentes solventes.....	42
2.1.8	Evaluación del proceso de extracción del P3HB con solventes alternativos ..	45
2.1.9	Comparación de diferentes rutas de extracción y purificación.....	46
2.2	Resultados y Análisis	47
2.2.1	Proceso estándar para la extracción y purificación del P3HB usando cloroformo.	47
2.2.2	Determinación de la cantidad óptima de cloroformo para la purificación.	49
2.2.3	Evaluación de diferentes solventes orgánicos para eliminar residuos.....	52
2.2.4	Evaluación del proceso de extracción de P3HB con solventes alternativos. ..	57
2.2.5	Evaluación del proceso de extracción con solventes alternativos	66
2.2.6	Evaluación de la precipitación del polímero con etanol	71
2.2.7	Formulación de un proceso de extracción y purificación	73
3	Capítulo 3: Caracterización del P3HB producido por <i>Burkholderia cepacia</i> B27	77

3.1	Metodología.....	77
3.1.1	Purificación del P3HB.....	77
3.1.2	Análisis Térmico.....	78
3.1.3	Ensayo de Biodegradabilidad.....	78
3.1.4	Tensión de Rotura.....	81
3.1.5	Peso Molecular Viscoso.....	81
3.1.6	FTIR – Espectrometría Infrarroja Con Transformada de Fourier.....	84
3.2	Análisis y Resultados.....	84
3.2.1	TGA – Análisis Termogravimétrico.....	84
3.2.2	DSC – Calorimetría Diferencial de Barrido.....	87
3.2.3	Ensayo de Biodegradabilidad.....	89
3.2.4	Tensión de Rotura.....	96
3.2.5	Peso molecular Viscoso.....	98
3.2.6	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier.....	100
3.3	Conclusiones.....	101
4	Capítulo 4: Modificación del P3HB.....	103
4.1	Metodología.....	103
4.1.1	Diseño experimental.....	103
4.1.2	Preparación de las mezclas poliméricas.....	105
4.1.3	Caracterización térmica de los materiales obtenidos (TGA & DSC).....	105
4.1.4	Caracterización mecánica de los materiales obtenidos.....	106
4.2	Resultados.....	106
4.2.1	Caracterización térmica de las materias primas.....	106
4.2.2	Análisis de la caracterización térmica.....	108
4.2.3	Análisis de la caracterización mecánica.....	121
5	Conclusiones y recomendaciones.....	125
5.1	Conclusiones.....	125
	TGA – Análisis Termogravimétrico.....	133
	DSC – Calorimetría Diferencial de Barrido.....	134

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Esquema general de las rutas metabólicas para la producción de PHAs con diferentes fuentes de carbono en células bacterianas (Adaptado [20]).....	7
Figura 1-2 Modelo de la estructura de los gránulos de PHA en el citoplasma bacteriano (Adaptado [20]).....	8
Figura 1-3 Estructura general de los polihidroxicanoatos.....	8
Figura 1-4 Estructura química del P3HB.....	9
Figura 1-5: Estructura molecular del ácido poliláctico.....	25
Figura 1-6: Estructura química de la amilosa y la amilopectina, principales componentes del almidón [89].....	27
Figura 1-7: Estructura química del polietilenglicol.....	29
Figura 1-8: Diagrama de flujo de las rutas de extracción y purificación evaluados.....	33
Figura 1-9: Polímero obtenido después del tratamiento con SDS/Cloroformo/Hipoclorito [106]......	34
Figura 1-10: Material extraído usando extracción con SDS y purificación con cloroformo.	35
Figura 2-1: Proceso para la evaluación de solventes alternativos.....	45
Figura 2-2: Diagrama del proceso de extracción usando el solvente alternativo.....	46
Figura 2-3: Resumen de todas las rutas de extracción y purificación evaluadas, Solvente A. hace referencia al solvente alternativo seleccionado después de la evaluación de solventes. Y SPO hace referencia al solvente polar orgánico usado para remover los residuos lípidos.	47
Figura 2-4: Material de partida para la evaluación del proceso estándar de extracción con cloroformo.....	48
Figura 2-5: Apariencia del polímero después del proceso de purificación (Lote A).....	49
Figura 2-6: Apariencia del material de los Lotes A (Derecha) y B (Izquierda) después de la purificación.....	51
Figura 2-7: Pérdida de masa de la biomasa seca al ser tratada con diferentes solventes a diferentes concentraciones.....	53
Figura 2-8: TGA para las muestras de biomasa purificadas con los 3 tipos de solvente a una concentración de 0.1 g/mL.....	55
Figura 2-9 Zoom de las curvas de TGA entre 50°C y 250°C.....	56
Figura 2-10: TGA de las muestras tratadas con diferentes solventes y posteriormente purificadas con cloroformo.	56
Figura 2-11: Diagrama de solubilidad de Bagley para el P3HB y los solventes seleccionados,.....	58

Figura 2-12 Grafica de efectos principales para la evaluación de la solubilidad del P3HB en diferentes solventes	61
Figura 2-13 Grafica de intervalos para la solubilidad del P3HB con respecto al tipo de solvente y la temperatura con intervalos de confianza del 95% para la media de la solubilidad.....	62
Figura 2-14: Grafica de intervalos para la solubilidad del P3HB con respecto al tipo de solvente y la concentración con intervalos de confianza del 95% para la media de la solubilidad.....	63
Figura 2-15: Gráficas de contorno para la solubilidad del P3HB en ácido acético, concentración vs temperatura vs solubilidad. Izq t=1h, Der t=3h.....	64
Figura 2-16: Gráficas de contorno para la solubilidad del P3HB en acetato de butilo, concentración vs temperatura vs solubilidad. Izq t=1h, Der t=3h.....	65
Figura 2-17: Gráficas de contorno para la solubilidad del P3HB en acetato de etilo, concentración vs temperatura vs solubilidad. Izq t=1h, Der t=3h.....	65
Figura 2-18: Gráficas de contorno para la solubilidad del P3HB en cloroformo, concentración vs temperatura vs solubilidad. Izq t=1h, Der t=3h.....	66
Figura 2-19: Gráficas de contorno para la solubilidad del P3HB en metil etil cetona, concentración vs temperatura vs solubilidad. Izq t=1h, Der t=3h.....	66
Figura 2-20: TGA para las muestras de polímero purificado con los diferentes tratamientos	69
Figura 2-21: DSC para las muestras de polímero purificado con los diferentes tratamientos, Izquierda (Cristalización), Derecha (Fusión)	70
Figura 2-22: (Izq.) Película polimérica obtenida con ácido acético y solvent casting. (Der.) Polímero extraído con ácido acético y precipitado con metanol.	71
Figura 2-23: Resultados del experimento de precipitación de biomasa con etanol.....	72
Figura 3-1: Diagrama ilustrativo de la estimación de la viscosidad intrínseca mediante la metodología de Huggins y la metodología de Kramer	83
Figura 3-2: (Izq.) Comparación entre el análisis termogravimétrico obtenido para una muestra comercial (Sigma Aldrich) y la muestra obtenida en laboratorio. (Der.) Derivada del análisis termogravimétrico para la muestra comercial de Sigma Aldrich y la producida en laboratorio	85
Figura 3-5: (Izq.) DSC (segundo enfriamiento) de la muestra de P3HB comercial y la producida en laboratorio. (Der.) DSC (segundo calentamiento) de la muestra de P3HB comercial y la producida en laboratorio.	88
Figura 3-6: Evolución de la producción de CO ₂ promedio con respecto al tiempo en las pruebas de biodegradabilidad para muestras control (sin polímero), muestras con polímero en polvo y muestras con polímero en películas hechas por compresión.	93
Figura 3-7: Evolución de la producción neta promedio de CO ₂ en los ensayos de biodegradabilidad.....	94
Figura 3-8: Evolución del porcentaje de degradación del polímero con respecto al tiempo.....	95
Figura 3-9: Comparación entre la película de P3HB antes de iniciar el ensayo, y la película después del ensayo. Se puede evidenciar claramente la degradación del material	96

Figura 3-10: Curvas de carga vs alargamiento para los 3 ensayos ASTM882 con probetas de P3HB y el promedio de estos.....	97
Figura 3-11: Viscosidad reducida vs concentración de la solución polimérica con su regresión lineal y el intercepto con el eje y que corresponde a la viscosidad intrínseca.	99
Figura 3-12: Espectro infrarrojo de la muestra comercial y de la muestra producida en laboratorio.	100
Figura 4-1: TGA de los aditivos para la modificación del P3HB	107
Figura 4-2: DSC para los aditivos de modificación del P3HB.....	108
Figura 4-3 Análisis TGA de las mezclas P3HB/PLA a diferentes concentraciones y hechas a diferentes temperaturas.	109
Figura 4-4: DSC para las mezclas P3HB/PLA a diferentes temperaturas, (Izq.) calentamiento, se pueden ver los picos de fusión de los materiales evaluados. (Der.) Enfriamiento, se pueden ver los picos de cristalización de los materiales evaluados. ...	110
Figura 4-5: Análisis TGA de las mezclas P3HB/PEG 400 a diferentes concentraciones y hechas a diferentes temperaturas.	112
Figura 4-6: DSC para las mezclas P3HB/PEG400 a diferentes temperaturas, (Izq.) calentamiento, se pueden ver los picos de fusión de los materiales evaluados. (Der.) Enfriamiento, se pueden ver los picos de cristalización de los materiales evaluados. ...	112
Figura 4-7: Materiales a base de P3HB con diferentes concentraciones de PEG y PLA, se nota claramente la diferencia en la calidad.	113
Figura 4-8: Análisis TGA de las mezclas P3HB/CNC a diferentes concentraciones y hechas a diferentes temperaturas.	114
Figura 4-9: DSC para las mezclas P3HB/PEG400 a diferentes temperaturas, (Izq.) calentamiento, se pueden ver los picos de fusión de los materiales evaluados. (Der.) Enfriamiento, se pueden ver los picos de cristalización de los materiales evaluados. ...	115
Figura 4-10: Resultados de TGA para las mezclas ternarias P3HB/PLA/PEG.....	116
Figura 4-11: Resultados de DSC para las mezclas ternarias P3HB/PLA/PEG.....	117
Figura 4-12: Resultados de TGA para las mezclas ternarias P3HB/PLA/CNC.....	118
Figura 4-13: Resultados de DSC para las mezclas ternarias P3HB/PLA/CNC	119
Figura 4-14: Resultados de TGA para las mezclas ternarias P3HB/PEG/CNC.....	120
Figura 4-15: Resultados de DSC para las mezclas ternarias P3HB/PEG/CNC.....	121
Figura 4-16: Resultados de los ensayos mecánicos de elongación para los 3 materiales seleccionados	122
Figura 5-1: Perfil de temperatura usado para los ensayos de TGA.....	134
Figura 5-2: Perfil de temperatura para los ensayos de DSC	135

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1 Diferentes tipos de polihidroxicanoatos según su estructura química.....	9
Tabla 1-2 Comparación de las principales propiedades fisicoquímicas entre el P3HB y otros polímeros.	10
Tabla 1-3 Comparación entre diferentes solventes usados para la extracción del P3HB..	16
Tabla 2-1: Composición del medio de cultivo para la producción de P3HB con <i>Burkholderia cepacia</i> B27	38
Tabla 2-2: Factores y niveles propuestos para la evaluación de los solventes polares orgánicos.	41
Tabla 2-3: Contribuciones a cada de cada grupo funcional a los parámetros de solubilidad [108].....	43
Tabla 2-4: Resultados del procedimiento estándar de purificación con cloroformo.....	48
Tabla 2-5: Resultados obtenidos para la purificación del P3HB usando diferentes concentraciones cloroformo/biomasa.....	50
Tabla 2-6: Resultados de la evaluación de diferentes solventes polares orgánicos para remover residuos lípidos del polímero.....	52
Tabla 2-7: Propiedades térmicas de las muestras determinadas con TGA.....	57
Tabla 2-8: Solventes utilizados por otros investigadores para la solubilización del P3HB	57
Tabla 2-9: Calificación según GSK de los solventes según diferentes parámetros [116]	59
Tabla 2-10: Factores y niveles del diseño experimental para la evaluación de la solubilidad del P3HB.	60
Tabla 2-11: Valores de los niveles de temperatura para cada solvente	60
Tabla 2-12: Comparación entre la extracción con ácido acético precipitado con metanol (AA – MetOH), ácido acético y solvent casting (AA-S.C.) y cloroformo	67
Tabla 2-13: Peso molecular viscoso del polímero obtenido con ácido acético precipitado con metanol (AA – MetOH), ácido acético y solvent casting (AA-S.C.) y cloroformo	68
Tabla 2-14: Propiedades térmicas del P3HB según su tratamiento	70
Tabla 2-15: Resultados de la evaluación de la precipitación de la biomasa con etanol. .	71
Tabla 2-16: Resultado de la evaluación de diferentes rutas de proceso.	73
Tabla 3-1: Parámetros de Mark - Houwink - Sakurada para soluciones P3HB - Cloroformo a 30°C	81
Tabla 3-2: Frecuencias características de absorción infrarroja del P3HB [120]	84
Tabla 3-3: Resultados obtenidos de los ensayos de TGA para ambas muestras	86

Tabla 3-4: Temperatura de degradación obtenida en otros estudios para la separación del P3HB de biomasa bacteriana	87
Tabla 3-5: Resultados obtenidos del análisis DSC para la muestra comercial y la producida en laboratorio.....	88
Tabla 3-6: Valores de humedad obtenidos para el compost inicial.....	89
Tabla 3-7: Determinación del CO ₂ producido por el compost	90
Tabla 3-8: Características de los ensayos de biodegradabilidad montados	91
Tabla 3-9: Resultados del balance de masa de carbono para las pruebas de biodegradabilidad.....	94
Tabla 3-10: Resultados de las pruebas mecánicas de elongación con la norma ASTM 882.....	98
Tabla 3-11: Comparación de las propiedades mecánicas del P3HB producido y datos reportados por otros autores	98
Tabla 3-12: Tiempos de elusión para soluciones poliméricas a diferentes concentraciones y para el solvente (cloroformo) puro a 25°C.....	98
Tabla 4-1: Niveles del diseño experimental para la evaluación de mezclas poliméricas a base de P3HB	104
Tabla 4-2: Formulación de las mezclas ternarias.....	104
Tabla 4-3: Detalle de la caracterización con TGA de las materias primas usadas como aditivo para el P3HB.....	108
Tabla 4-4: Mezclas ternarias seleccionadas para la caracterización térmica	115
Tabla 4-5: Resultados de la caracterización térmica para las mezclas ternarias P3HB/PLA/PEG.....	118
Tabla 4-6: Resultados de la caracterización térmica para las mezclas ternarias P3HB/PLA/PEG.....	119
Tabla 4-7: Resultados de la caracterización térmica para las mezclas ternarias P3HB/PEG/CNC.....	121
Tabla 4-8: Promedio de los resultados obtenidos de los ensayos de elongación para cada una de las muestras analizadas.....	122

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
T_g	Temperatura de transición vítrea	°C
T_m	Temperatura de fusión	°C
T_c	Temperatura de cristalización	°C
T_{dmax}	Temperatura de degradación máxima	°C
T_d	Temperatura de degradación	°C
T_{d0}	Temperatura inicial de degradación	°C
$I.C$	Índice de cristalinidad	%
ΔH_m	Entalpía de fusión	$J g^{-1}$
ΔH_c	Entalpía de cristalización	$J g^{-1}$
δ_d	Parámetro de solubilidad de Hansen	$(MJ m^{-3})^{0.5}$
δ_h	Parámetro de solubilidad de Hansen	$(MJ m^{-3})^{0.5}$
δ_p	Parámetro de solubilidad de Hansen	$(MJ m^{-3})^{0.5}$
δ_v	Parámetro de solubilidad de Bagley	$(MJ m^{-3})^{0.5}$
$wt\%$	Porcentaje en peso	%
$[\eta]$	Viscosidad Intrínseca	$dL g^{-1}$
K	Constante de M-H-S	$dL g^{-1}$
a	Constante de M -H-S	<i>Adimensional</i>
M_w	Peso molecular promedio peso	<i>Da</i>
M_v	Peso molecular Viscoso	<i>Da</i>

Abreviaturas

Abreviatura	Término
TGA	Análisis termogravimétrico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
P3HB	Poli(3-hidroxibutirato)
PLA	Ácido Poliláctico
PEG	Polietilenglicol
CNC	Celulosa Nanocristalina
AA	Ácido Acético
MEK	Metil etil cetona
ACBT	Acetato de Butilo
ACET	Acetato de Etilo
CLO	Cloroformo
DMSO	Dimetil Sulfoxido
MIK	Metil Isobutil Cetona

Abreviatura	Término
<i>CAET</i>	Carbonato de etileno
<i>CAEP</i>	Carbonato de propileno
<i>CHN</i>	Ciclohexanona

Introducción

El consumo mundial de plásticos sintéticos está por encima de los 200 millones de toneladas por año y ha crecido aproximadamente un 5% anualmente convirtiendo estos materiales en una de las principales aplicaciones del petróleo. Los plásticos como el polietilentereftalato (PET), el polivinilo de cloruro (PVC), el polietileno (PE), el polipropileno (PP), el poliestireno (PS) y la poliamida (PA) son los más utilizados para empaques y envases alimenticios debido a su bajo costo de producción y a sus buenas propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera. Lamentablemente, estos materiales tardan muchos años en degradarse en el medio ambiente y la mayoría de las veces terminan contaminados con residuos alimenticios o biológicos que hacen que su reciclaje sea complicado y económicamente ineficiente. Esto tiene como consecuencia la acumulación de millones de toneladas de polímeros sintéticos en rellenos sanitarios o inclusive en el océano [1]. En Colombia, existen aproximadamente 228 municipios con rellenos sanitarios a cielo abierto, adicionalmente 7 ciudades se encuentran en riesgo ambiental por el término de la vida útil de los rellenos sanitarios y solo el 15% de los residuos producidos son reutilizados, reciclados o aprovechados de alguna manera [2], adicionalmente, la cantidad de residuos presentes en estos rellenos sanitarios ha ido aumentando anualmente, por ejemplo en el año 2004 se produjeron aproximadamente 8 millones de toneladas de residuos sólidos Colombia mientras que en el 2013 se produjeron casi 10 millones de toneladas de las cuales aproximadamente un 18% corresponden a plásticos sintéticos [3]. Por estas razones, en las últimas décadas ha crecido rápidamente el interés en la comunidad científica por la síntesis de materiales que tengan las mismas características fisicoquímicas, pero no los problemas mencionados anteriormente.

Los biopolímeros y los polímeros bio-basados son los materiales con mayor potencial para reemplazar a los polímeros sintéticos en el mercado por su buena capacidad de biodegradación, sin embargo, aún existen varias desventajas, principalmente relacionadas con su costo de producción y con sus características fisicoquímicas y mecánicas. Los PHAs o polihidroxicanoatos son una familia de poliésteres termoplásticos producidos por

una gran variedad de bacterias para almacenar energía en situaciones de estrés (limitación de nutrientes) y de exceso de carbono, y constituyen adicionalmente, son uno de los biopolímeros más prometedores debido a su compatibilidad ambiental, pues son completamente biodegradables y se producen a partir de fuentes renovables. El poli (3 – hidroxibutirato) o P3HB es el PHA más estudiado y caracterizado hasta el momento, y posee propiedades bastante interesantes que no poseen otros biopolímeros como su insolubilidad en agua y su resistencia a la degradación hidrolítica, las cuales son absolutamente necesarias para la producción de empaques. Sin embargo, posee características que se deben mejorar significativamente para que al biopolímero se le pueda dar el uso deseado y son como su tensión de rotura (que es relativamente baja comparada con otros polímeros sintéticos), su alta cristalinidad [4], su ventana de procesamiento y su costo de producción.

Las mezclas o blendas poliméricas son opciones atractivas para la modificación y síntesis de nuevos materiales a partir de biopolímeros por su bajo costo de procesamiento y por la gran cantidad de combinaciones posibles que se pueden hacer entre polímeros y aditivos para obtener las características deseadas [5], sin embargo, no todas las mezclas son termodinámicamente compatibles y no es posible predecir con exactitud la compatibilidad entre polímeros. Uno de los objetivos de este estudio es evaluar diferentes mezclas polímero-polímero y aditivo-polímero utilizando como base el P3HB producido en el laboratorio de fermentaciones del IBUN como producto del escalamiento a nivel de planta piloto de la producción de dicho biopolímero. El poliéster se obtiene a través de la fermentación de aceite de maíz con la cepa bacteriana mutante *Burkholderia cepacia* B27, la cual fue modificada genéticamente para aumentar su tasa de producción de polímero. El P3HB efluente del fermentador viene con residuos de aceite de maíz y biomasa, por lo que la primera etapa del proceso consiste en purificarlo para finalmente modificarlo con aditivos u otros polímeros buscando mejorar sus características sin afectar su biodegradabilidad.

Para obtener un buen material de partida para realizar las mezclas, es fundamental necesario obtener un P3HB de la mejor calidad posible, las características del polímero producido dependen de la eficiencia de los procesos de extracción y purificación. Normalmente, se lleva a cabo una lisis celular para que el polímero quede libre en el medio, después se trata el material con solventes levemente polares como el etanol, el metanol o

la acetona para remover lípidos, proteínas y otros metabolitos secundarios de la biomasa y obtener un polímero inodoro e incoloro, finalmente, se solubiliza el polímero en algún solvente (comúnmente un solvente clorado como el cloroformo) para retirar los excesos de biomasa. Adicionalmente, se llevan a cabo varios procesos de secado y filtración entre las diferentes etapas mencionadas anteriormente. Para obtener un polímero de alta pureza y evitar que se presente algún tipo de degradación. La secuencia El orden del proceso, los tipos de agentes químicos utilizados y las condiciones a las que se lleva a cabo cada etapa deberán ser evaluadas n ser optimizadas [6].

En estudios anteriores en el IBUN se diseñó un medio de cultivo que promoviera la producción del biopolímero con *B. cepacia* B27, se evaluaron varios medios con diferentes concentraciones de nutrientes, relaciones C/N y fuentes de carbono, adicionalmente, se crearon bancos de trabajo y bancos madre de la bacteria y se optimizó el tren de inoculación previo a la fermentación. Estos ensayos se hicieron a escala matraz y en fermentadores de 5 litros [7], posteriormente se llevó el proceso a escalas de 100 L y 2000 L usando el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kL_a) como variable de escalado [8] para determinar las condiciones óptimas de aireación, agitación y temperatura de la fermentación las escalas mencionadas anteriormente. Hasta este punto la investigación realizada se enfocado prioritariamente a maximizar el crecimiento de biomasa y la acumulación de polímero en poco tiempo, se logró obtener producciones de biomasa cercanas a los 30 g/L en 72 horas de fermentación y una acumulación del polímero del 80% de la masa en peso seco. Para la extracción del polímero se estudió la digestión de la biomasa con SDS y la purificación con cloroformo e hipoclorito de sodio, sin embargo, el material producido no formaba películas uniformes debido a efectos como la pérdida de peso molecular durante los procesos de extracción y purificación.

Por esta razón, se decidió enfocar la nueva etapa del proyecto fundamentalmente en la extracción, purificación y modificación del material obtenido de la fermentación, es decir todo lo que está aguas abajo del reactor, con el objetivo de mejorar la eficiencia del proceso de purificación, eliminar o reducir la utilización de solventes altamente tóxicos como el cloroformo y finalmente elaborar un prototipo con un material bio-basado cuyo componente principal es el P3HB. Para esto es necesario tomar como punto de partida los datos y procedimientos encontrados en la literatura, sin embargo, se requiere una evaluación rigurosa de las variables y los procesos pues no existen publicaciones sobre la extracción

del biopolímero de bacterias de la especie *Burkholderia cepacia*, y aunque se han evaluado varios procesos en sistemas biológicos gram negativos similares como *Cupriavidus necator* o *Escherichia coli* recombinante, las eficiencias y los productos obtenidos al final varían significativamente.

1 Capítulo 1: Generalidades de los polihidroxicanoatos

1.1 Polihidroxicanoatos (PHAs)

1.1.1 Historia de los PHAs

Los polihidroxicanoatos (PHAs) fueron descubiertos en el año 1923 en el Instituto Pasteur en Francia por el biólogo Maurice Lemoigne, quien demostró la producción de diferentes tipos de ácidos hidroxicanoicos por bacterias del género *Bacillus* en suspensiones anaerobias. Posteriormente, Lemoigne logró extraer un compuesto de *Bacillus magneteriun* usando cloroformo y demostró que era un polímero cuya unidad monomérica era el ácido 3-hidroxicanoico [9]. Sin embargo, no fue hasta 1960 que se empezó a explorar la opción de producir polihidroxicanoatos a nivel industrial por la empresa norteamericana W.R. Grace & Co, quienes son autores de varias patentes sobre la producción y purificación de diferentes PHAs, sin embargo, se vieron obligados a abandonar la producción debido a los bajos rendimientos, los altos costos de producción y purificación y la limitación de aplicaciones debido a las malas propiedades mecánicas producto de una baja pureza [10].

Posteriormente, en la década de los 70's, una crisis petrolera generó un interés en la búsqueda de materiales para sustituir a los plásticos convencionales de origen petroquímico, fue así que la empresa británica ICI logró establecer un protocolo de producción de alto rendimiento para producir un tipo de PHA llamado poli(3-hidroxi butirato) (P3HB) a partir de fermentaciones de azúcares con *Alcaligenes latus*, sin embargo el biopolímero era muy frágil y su proceso de purificación seguía siendo significativamente costoso [11]. Años después, en 1991 ICI desarrolló un biopolímero novedoso a base de poli(3-hidroxi butirato) y poli(3-hidroxi valorato) que llamaron BIOPOL, este tenía mejores propiedades, como una baja cristalinidad y una mayor elasticidad. Posteriormente en 1998

ICI vendió los derechos y la tecnología de BIOPOL a Monsanto, quienes desarrollaron un spin off llamado Tepha Inc. cuyo objetivo principal era el desarrollo de dispositivos de uso médico a base de biopolímeros [9].

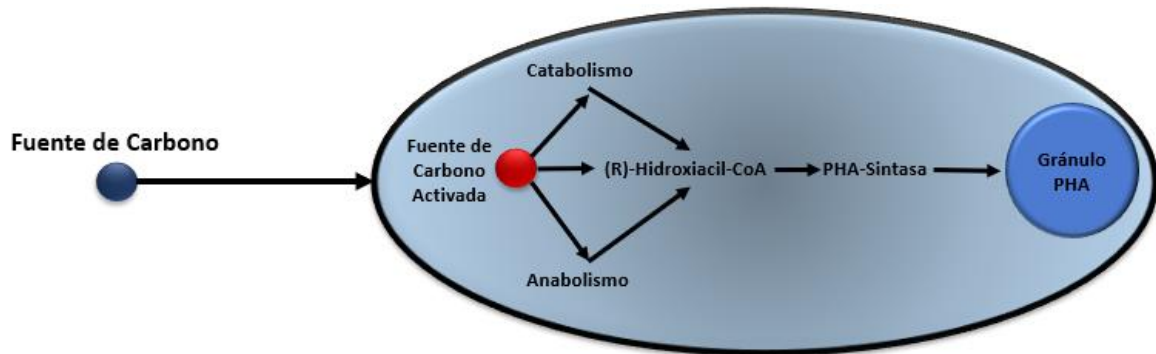
Después de esto, el interés de la comunidad científica se centró en estudiar las propiedades mecánicas y térmicas de diferentes mezclas poliméricas a base del P3HB y P3HBV (poli-(3-hidroxibutirato-hidroxivalerato), usando como aditivo diferentes poliolefinas como el alcohol polivinílico [12], poliéteres como el polietilenglicol [13], poliésteres como la poli caprolactona [14] y poliacrilatos como el poli metilmetacrilato [15] entre muchos otros. Adicionalmente, también se ha evaluado la incorporación de polisacáridos a la matriz polimérica como celulosa [16] y almidón [17], o fibras naturales como trigo y cáñamo [18].

1.1.2 Biosíntesis de Polihidroxialcanoatos

Existen una gran variedad de bacterias Gram negativas y Gram positivas capaces de producir PHAs como *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Ralstonia sp.*, *Aeromonas sp.*, y *Rhodobacter sp.* entre otras. Los PHAs tienen la función de almacenar energía, y se presentan en las células bacterianas como gránulos insolubles en el citoplasma, en algunos casos, bajo condiciones muy específicas, la masa del polímero producido alcanza a ser el 80% de la masa total de la célula. Los PHAs bacterianos se dividen principalmente en dos grandes familias que dependen de la cantidad de carbonos de la unidad monomérica del polímero. Por un lado, se encuentran los PHAs de cadena corta (SCL-PHAs) cuya unidad monomérica posee entre 3 y 5 átomos de carbono, y por otro lado están los de cadena media (MCL-PHAs) que poseen entre 6 y 14 átomos de carbono en su unidad monomérica [19]. Se ha demostrado que los SCL-PHAs tienden a ser más frágiles y cristalinos que los MCL-PHAs.

Las principales etapas en la síntesis de PHAs son la síntesis del monómero y la polimerización de este. El tipo de monómero y por consecuencia de PHA producido depende de la fuente de carbono que se utilice, existen dos tipos de fuente de carbono diferentes, los azúcares y los ácidos grasos, y dependiendo del microorganismo y la fuente de carbono, se pueden dar tres tipos de rutas metabólicas diferentes para la producción de PHAs como se ve en la **Figura 1-1**.

Figura 1-1 Esquema general de las rutas metabólicas para la producción de PHAs con diferentes fuentes de carbono en células bacterianas (Adaptado [20]).

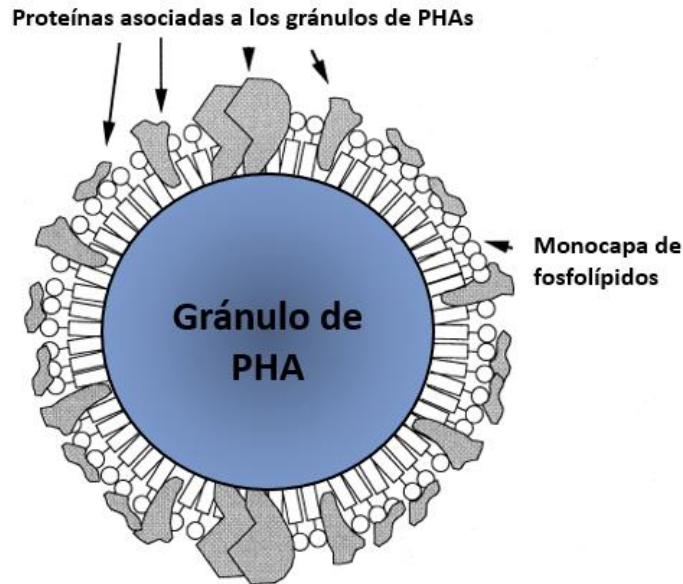


La fuente de carbono ingresa a la célula donde es activada por diferentes procesos enzimáticos, dependiendo de su naturaleza será catabolizada (si es un ácido graso) o anabolizada (si es un azúcar) para posteriormente convertirse en (*R*)-Hidroxiacil-CoA, luego la enzima PHA – Sintasa junta varias unidades monoméricas para producir los gránulos intracelulares de PHA. Estos gránulos intracelulares de PHA están compuestos principalmente de un núcleo de cadenas poliméricas en estado amorfo [21], rodeadas de una membrana fosfolipídica compuesta principalmente de proteínas catabólicas y no catabólicas como se muestra en la **Figura 1-2**. Las proteínas más abundantes en esta membrana son la PHA-sintasa (PhaC) encargada de la polimerización de los monómeros y la PHA-depolimerasa (PhaZ), una enzima capaz de descomponer los polímeros para recuperar la energía almacenada en ellos. Se estima que cada gránulo está compuesto de 97% PHA, 2% proteínas y 1% de lípidos [22].

El peso molecular que tiene el polímero después de la síntesis es de suma importancia para determinar sus posibles aplicaciones, en otras investigaciones se ha reportado la producción de P3HB de hasta 2×10^7 Da usando *E. coli* recombinante [23], sin embargo, los pesos moleculares más comunes son menores, variando desde 1×10^5 Da hasta 1×10^6 Da. Se ha demostrado que el pH durante la fermentación tiene una influencia importante sobre el peso molecular del polímero [24]. Existen 2 métodos usados generalmente para la cuantificación del peso molecular del P3HB, por un lado, están los parámetros de Mark-Houwink-Sakurada para determinar el peso molecular viscoso con la viscosidad intrínseca, también se utiliza la cromatografía de permeación de gel (GPC) usando un estándar de poliestireno de baja polidispersidad. Ambas técnicas pueden llegar

a tener altos niveles de error, sin embargo, son útiles para comparar pesos moleculares de diferentes muestras.

Figura 1-2 Modelo de la estructura de los gránulos de PHA en el citoplasma bacteriano (Adaptado [20])



Son varios los tipos de PHAs que pueden ser sintetizados biológicamente por microorganismos, sin embargo, el más abundante naturalmente es el poli(3-hidroxiбутирато). La **Figura 1-3** muestra la estructura química general de los PHAs, el grupo funcional R y la cantidad de carbonos en m determinan el tipo de PHA, dependiendo de esto puede haber una gran cantidad de propiedades fisicoquímicas y posibles aplicaciones diferentes. En la **Tabla 1-1** se pueden ver todas las combinaciones de grupos funcionales R y cantidad de carbonos m posibles, y el tipo de PHA que corresponde a cada una.

Figura 1-3 Estructura general de los polihidroxiálcanoatos

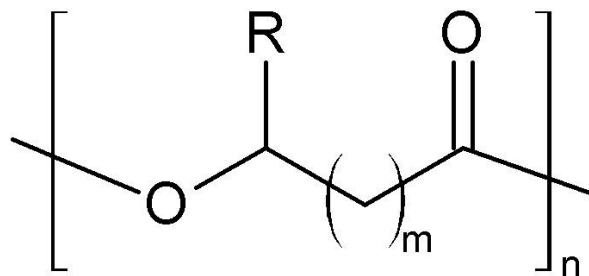
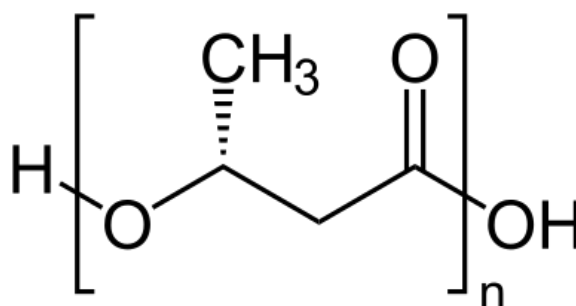


Tabla 1-1 Diferentes tipos de polihidroxicanoatos según su estructura química.

Valor de m	Naturaleza de R	Nombre del PHA	Abreviación
m=1	$R = H$	Poli(3-hidroxiopropionato)	P3HP
	$R = CH_3$	Poli(3-hidroxiobutirato)	P3HB
	$R = C_2H_5$	Poli(3-hidroxivalerato)	P3HV
	$R = C_3H_7$	Poli(3-hidroxihexanoato)	P3HH
	$R = C_5H_{11}$	Poli(3-hidroxiocetanoato)	P3HO
m=2	$R = H$	Poli(4-hidroxiobutirato)	P4HB
	$R = CH_3$	Poli(4-hidroxivalerato)	P4HV
m=3	$R = H$	Poli(5-hidroxivalerato)	P5HV
m=4	$R = H$	Poli(6-hidroxihexanoato)	P6HH

1.1.3 Poli(3-hidroxiobutirato)

Como se mencionó anteriormente, el poli(3-hidroxiobutirato) o P3HB (**Figura 1-4**) es el poliéster de origen biológico más popular producido por varios microorganismos en la naturaleza. Este tiene una estructura completamente isotáctica, es decir que la única configuración posible es la configuración *R*. El P3HB obtenido de bacterias posee generalmente una cristalinidad entre el 55% y el 80% [25], sin embargo, dentro de la célula bacteriana las moléculas se encuentran en estado amorfo, como gránulos insolubles en el citoplasma.

Figura 1-4 Estructura química del P3HB

El peso molecular M_w del P3HB obtenido de forma bacteriana por lo general oscila entre 1×10^4 g/mol y 3×10^6 g/mol con una polidispersidad de 2 [26], la temperatura de transición vítrea es de 4°C, su temperatura de fusión de 180°C y su temperatura de

degradación es aproximadamente 270°C según diferentes análisis calorimétricos reportados por varios investigadores. Las densidades del P3HB cristalino y amorfo son de 1.26 g/cm^3 y 1.18 g/cm^3 respectivamente y sus propiedades mecánicas como el módulo de Young (3.5 GPa) y la tensión de rotura (43 MPa) son similares a las del polipropileno isotáctico, sin embargo su elongación de ruptura es significativamente baja (5%), lo que lo hace un material bastante más rígido y frágil que la mayoría de los polímeros de origen sintético. Se cree que la alta fragilidad se debe a las múltiples grietas que se pueden ver en las esferulitas de P3HB después de su crecimiento [27]. Adicionalmente, otros autores reportan que la fragilización del polímero se da durante el almacenamiento del material después de la primera cristalización, y que una segunda cristalización resulta en una reorganización de los cristales formados durante la primera cristalización, generando estructuras más estables entre las moléculas amorfas y las moléculas cristalinas del polímero [28], también es posible mejorar la estabilidad mecánica del P3HB adicionándole agentes nucleantes o plastificantes [29]. En la **Tabla 1-2** se pueden ver las principales propiedades fisicoquímicas del P3HB y las de los principales polímeros comerciales de origen sintético.

Tabla 1-2 Comparación de las principales propiedades fisicoquímicas entre el P3HB y otros polímeros.

Polímero	Punto de Fusión [°C]	Transición Vítreá [°C]	Módulo de Young [GPa]	Elongación de ruptura [%]	Tensión de ruptura [MPa]
Poli(3-hidroxi-butirato)	175 – 180	4	3.5 – 4	3.5 – 11	10.5 – 40
Polietileno de alta Densidad	112 – 132	-7	0.16	50.1	10.5
Polietileno de baja Densidad	88 – 100	-36	0.05 – 0.2	126 – 600	10.5 – 78
Polipropileno	170 – 176	-10	0.6 – 1.7	400 – 900	27 – 38
Poliestireno	110 – 240	100	3 – 3.1	3.1 – 4	50
Polivinil cloruro	100 - 260	82	3.4	20 - 80	10.2 - 60

Otro de sus principales problemas es la producción a nivel industrial, esto debido al costo de las materias primas utilizadas en el proceso, en especial las fuentes de carbono, que por lo general son carbohidratos como la glucosa o la fructosa que tienen un valor competitivo debido a que son usados como alimentos. Por otro lado, la cantidad de operaciones unitarias y la utilización de grandes volúmenes de solventes para su purificación han hecho que aún no se haya logrado obtener un proceso eficiente a nivel industrial que permita producir el P3HB con un precio competitivo en el mercado. Sin embargo, actualmente, con el objetivo de disminuir los costos de producción, ha crecido el interés en la búsqueda de nuevas fuentes de carbono que incluyen coproductos de procesos industriales o desechos industriales como glicerol o bagazo de caña como fuente de carbono, adicionalmente la investigación en nuevos métodos de extracción y purificación también se ha vuelto una prioridad, orientada a encontrar nuevos procesos para la extracción y purificación del polímero que permitan obtener un producto de calidad de manera ecológica y económicamente sostenible. Otra ruta para reducir el costo y adicionalmente aumentar el rango de aplicaciones es la mezcla del polímero con otros rellenos y aditivos, preferiblemente biodegradables, para no perder esta importante característica que lo diferencia de la mayoría de los materiales poliméricos disponibles en el mercado [30].

1.2 Producción de P3HB

1.2.1 Fermentación

Gran parte de las investigaciones en el área de los polihidroxialcanoatos han estudiado la producción a escala de laboratorio debido a que la escala a nivel industrial aún es un reto por la carencia de un proceso económicamente viable. Uno de los componentes más importantes de la producción es el microorganismo que se va a utilizar, las bacterias que se usan para la producción de PHAs se dividen por lo general en 2 grupos dependiendo de las condiciones de estrés necesarias para inducir la acumulación de PHAs. El primer grupo de bacterias requiere de la limitación de un nutriente esencial como nitrógeno, fósforo, magnesio o azufre, adicionalmente debe haber un exceso de carbono disponible. El segundo grupo incluye a *Alcaligenes lactus*, una sepa mutante de *Azotobacter vinelandii* y a *Escherichia coli* recombinante, las cuales son capaces de producir PHAs sin limitación

de nutrientes [31] [32]. Sin embargo, la producción de PHAs no está limitada a los microorganismos, en los últimos años, varios grupos de investigación han desarrollado procesos que permiten la producción de PHAs usando plantas genéticamente modificadas y usando luz como fuente principal de energía [33].

El proceso de producción del P3HB empieza con la reactivación del microorganismo que va a ser usado para la fermentación, el cuál por lo general siempre estará en un banco microbiológico almacenado a -20°C . Las células bacterianas son inoculadas en un medio de cultivo complejo sin limitación de nutrientes, pues en esta parte del proceso se quiere inducir el crecimiento celular y no la acumulación de polímero. Una vez reactivada la cepa bacteriana, se pasan las células previamente crecidas a un medio de cultivo de mayor volumen con una composición similar a la del medio en el cual se va a llevar la fermentación. Con el objetivo de aumentar el número de células con el cual se dará inicio a la fermentación, se repite el proceso mencionado anteriormente las veces que sea necesario en fermentadores de volúmenes cada vez más grandes usando el mismo medio de cultivo, este proceso se denomina "tren de inoculación". Durante esta parte del proceso es importante garantizar la disponibilidad de los macronutrientes necesarios para el crecimiento celular (Fe, B, Mo, Ni, Cu, Mn, Co, Zn, Mn, sales de calcio, una fuente de fósforo y una fuente de nitrógeno). Esta etapa puede llegar a tomar varios días dependiendo del volumen al que se vaya a llevar a cabo la fermentación, pues cada etapa del tren de inoculación puede tomar entre 6 y 24 horas [34].

Una vez terminado el tren de inoculación se induce la producción y acumulación de los biopolímeros limitando alguno de los nutrientes esenciales para el crecimiento celular (generalmente fósforo o nitrógeno) y suministrando un exceso de fuente de carbono. Existen una gran cantidad de fuentes de carbono diferentes que se ha demostrado que son útiles para la producción de diferentes tipos de PHAs como glucosa, sacarosa, lactosa, almidón, triglicéridos, ácidos grasos, glicerol, grasas animales, grasas vegetales, aceites de freír, metanol, metano y otros hidrocarburos producidos de desechos plásticos entre muchos otros [35]. Durante la fermentación es necesario suministrar buenos niveles de oxígeno disuelto controlando la agitación y la aireación en el reactor, pues en las fermentaciones aerobias la cantidad de oxígeno disuelto tiene una importante influencia en las cinéticas de crecimiento y producción [36].

Existen varios factores que permiten evidenciar cuándo sucede la transición entre la fase de crecimiento celular y la fase de producción y acumulación de polímero durante la fermentación, por lo general la fase de crecimiento celular siempre viene acompañada de cambios significativos en el pH, que deben ser controlados y estabilizados para asegurar un crecimiento celular óptimo [37]. Por otro lado, la acumulación se da durante la fase estacionaria del crecimiento celular, y esta viene acompañada con una reducción significativa de la concentración de la fuente de carbono en el medio, la fuente de carbono por lo general se repone hasta llevar el medio a condiciones similares a las iniciales, haciendo que la fermentación sea un proceso semicontinuo o de lote alimentado. Esta fase de producción y acumulación puede hacer que la cantidad de polímero en cada célula sea hasta de un 80% en masa [38].

Al final de la etapa de producción y acumulación es necesario desactivar los complejos enzimáticos bacterianos, pues de lo contrario, estos se encargarán de consumir el polímero acumulado intracelularmente debido a la ausencia de carbono en el medio, por esta razón, la etapa final de la fermentación por lo general corresponde a un proceso de pasteurización o esterilización, siempre a temperaturas superiores a los 90°C por tiempos superiores a 15 minutos. Finalmente, se lleva el caldo fermentado a las etapas de extracción y purificación, cuyo objetivo principal es separar el polímero de la biomasa bacteriana y de otros contaminantes provenientes del medio de cultivo como sales residuales, fuente de carbono residual o metabolitos secundarios producidos por los microorganismos durante la fermentación [6].

Es posible también producir PHAs usando cultivos microbiológicos mixtos en vez de un solo microorganismo, para esto se usan consorcios microbianos obtenidos naturalmente, que posean la capacidad de almacenar altas cantidades de PHAs [39]. La producción usando este tipo de cultivos presenta varias ventajas con respecto a la producción usando cultivos puros, inicialmente, no es necesario hacer un proceso de esterilización para asegurar la pureza del medio, adicionalmente, en este tipo de fermentaciones es posible usar fuentes de carbono y medios complejos provenientes de diferentes industrias como residuos de la industria de la caña de azúcar [40], residuos de la industria del papel [41], aceite de girasol saponificado [42], residuos de la industria del tomate [43], aguas residuales domésticas [44], aguas residuales industriales [45] y efluentes de la industria del aceite de oliva entre otros [46]. Mediante estas tecnologías es posible activar diferentes

rutas metabólicas en diferentes microorganismos, que dan lugar a la producción de diferentes tipos de polihidroxialcanoatos simultáneamente como PHB, PHH y PHV entre otros.

1.2.2 Extracción y Purificación de PHAs

La extracción y purificación del biopolímero son dos etapas determinantes en el proceso, pues tendrán una gran influencia en el precio final del producto y sus posibles aplicaciones. Se estima que cerca del 70% del precio del polímero puro depende de su proceso de extracción y purificación, y esto se debe principalmente a la cantidad de operaciones necesarias para la obtención de un material de alta calidad.

Inicialmente, se deben separar las células bacterianas del medio de cultivo usado en la fermentación, para esto se pueden usar diferentes procesos como filtración o centrifugación, posteriormente se seca la biomasa obtenida mediante un tratamiento térmico o un proceso de liofilización. Las etapas mencionadas anteriormente son comunes en todos los procesos de purificación de PHAs presentes en la literatura pues resulta más eficiente hacer la extracción de la biomasa seca que del caldo fermentado rico en biomasa debido a la gran diferencia en volúmenes que hay entre las dos partes del proceso.

Posteriormente es necesario extraer el polímero de la matriz celular, separar el polímero de la biomasa no polimérica y retirar los residuos de lípidos y otros metabolitos secundarios producidos en la fermentación. Para lograr esto por lo general se combinan diferentes técnicas de purificación que combinan la purificación con solventes orgánicos polares, la extracción con solventes, la digestión química de la biomasa, los métodos mecánicos para la lisis celular y los métodos enzimáticos entre otros. La selección de los métodos de purificación depende de varios factores:

- La cepa microbiana (diferentes cepas presentan diferentes niveles de fragilidad en la membrana celular)
- El tipo de PHA producido (el tipo de PHA producido determina el solvente óptimo para su extracción y purificación).
- La carga intracelular de PHA (porcentaje en masa)

- La pureza requerida del producto la cuál es determinada por la aplicación final que se le va a dar a este.
- La disposición final de los productos químicos usados en el proceso, principalmente los solventes.
- El impacto del método de purificación en la calidad del polímero (propiedades térmicas, propiedades mecánicas, peso molecular).

A continuación, se hace una descripción de los principales métodos de extracción y purificación usados para el tratamiento de los PHAs producidos mediante fermentaciones bacterianas.

1.2.2.1 Extracción con solvente

A temperatura ambiente, existen varios solventes que han sido ampliamente utilizados para la purificación de PHAs de cadena corta y de cadena media como el cloroformo [47] [48], el diclorometano [47] [49] y el dicloroetano [48]. La popularidad de estos solventes halogenados para la extracción de PHAs se debe principalmente a que permiten obtener altos niveles de recuperación y pureza debido a que estos solo solubilizan el polímero, y algunas impurezas lípidas de la biomasa restante, las cuales se pueden remover fácilmente usando tratamientos relativamente sencillos. Después de la extracción la solubilidad del polímero es disminuida drásticamente añadiendo un “anti-solvente” que por lo general es un alcohol de bajo peso molecular (principalmente etanol y metanol) [50], lo que genera la precipitación del polímero disuelto en el solvente. Adicionalmente, es posible disminuir la solubilidad del polímero disminuyendo drásticamente la temperatura de la solución [51].

La principal desventaja de este método es que los solventes halogenados son altamente tóxicos para la salud humana y para el medio ambiente, adicionalmente, se necesitan grandes cantidades de solvente tanto para la extracción como para la precipitación del polímero. A nivel de laboratorio es posible solucionar estos problemas mediante una extracción Soxhlet que permite recircular el solvente utilizado, pero a nivel industrial este método se vuelve poco práctico y costoso [52]. Además, la mezcla entre cloroformo y etanol (o metanol) debía ser descartada debido a las cantidades de energía necesarias para la separación y posterior reutilización de los solventes, lo que va en contradicción con

el intento de generar una tecnología ambientalmente sostenible, sin embargo, recientemente investigadores descubrieron que agregando la cantidad justa de agua se generan dos fases que se pueden separar fácilmente mediante un proceso de decantación [53].

Debido al alto impacto ambiental del proceso de extracción usando solventes halogenados como el cloroformo, el estudio de nuevas rutas de extracción y purificación usando solventes más ambientalmente amigables ha sido de gran interés en el campo de los PHAs. Se ha demostrado que a condiciones adecuadas de presión y temperatura los PHAs de cadena corta y de cadena media son solubles en varios solventes no halogenados, sin embargo, los procesos de extracción a altas temperaturas tienden a degradar el polímero debido a la ruptura de las cadenas poliméricas generando una reducción del peso molecular [6]. Entre los solventes no halogenados más prometedores se encuentran el lactato de metilo, el ácido acético, el tetrahidrofurano y el carbonato de propileno entre otros. La efectividad de un solvente para la extracción del polímero depende de varios factores, como el peso molecular, el tipo de PHA, la cristalinidad, las impurezas que lo rodean, la temperatura y la presión [54]. En la **Tabla 1-3** se muestran diferentes solventes usados para la extracción del P3HB.

Tabla 1-3 Comparación entre diferentes solventes usados para la extracción del P3HB

Solvente	Condiciones	Resultado	Fuente
Acetato de etilo $C_4H_8O_2$	25°C – 60 min	Pureza: 86.3% Recuperación: 87.4%	[55]
Acetato de butilo $C_6H_{12}O_2$	103°C – 30 min	Pureza: 99.1% Recuperación: 96.0%	[55]
Metil Etil Cetona C_4H_8O	60°C - 60 min	Pureza: >80% Recuperación: >90%	[56]
Carbonato de Etileno $C_3H_4O_3$	150°C – 60 min	Pureza: 98% Recuperación: 98.6%	[57]
Metanol CH_3OH	100°C – 60 min	Pureza: 97.1% Recuperación: 72.6%	[57]
Ácido Acético CH_3COOH	100°C – 60 min	Pureza: 97% Recuperación: 36.7%	[57]

Dimetil Sulfóxido CH_3SOCH_3	150°C – 60 min	Pureza 95% Recuperación 60.6%	[57]
Hexano C_6H_{14}	50°C – 60 min	Pureza 89.4% Recuperación 2.6%	[57]

La selección de un solvente adecuado para la purificación depende de varios factores como su toxicidad, su punto de ebullición, su precio, su disposición final y su capacidad de solubilizar el polímero. Es posible hacer aproximaciones teóricas entre la compatibilidad de un solvente con el polímero usando los parámetros de solubilidad de Hansen o las correlaciones de Hilderbrand.

1.2.2.1 1.2.2.2 Digestión química de la biomasa

Otra estrategia ampliamente estudiada para la purificación de los biopolímeros de tipo PHA consiste en la solubilización de la masa no polimérica, es decir la biomasa mediante la adición de un agente químico al medio de cultivo una vez es terminada la fermentación, que convierte las partes hidrofílicas e hidrofóbicas de la membrana celular en sustancias solubles en agua. De esta manera, los gránulos de PHA son liberados en el medio para que posteriormente sean separados por filtración, flotación o centrifugación. Por lo general, esta estrategia funciona mejor para los PHAs de cadena corta pues estos tienen una densidad alta de aproximadamente 1.2 g/mL [58] que les permite precipitarse con rapidez en soluciones acuosas, mientras que los PHAs de cadena media tienen densidades similares a la del agua, es decir que para obtener una separación eficiente es necesario usar metodologías más sofisticadas como la ultrafiltración [59].

Generalmente, para que estas metodologías sean efectivas, es recomendable que el porcentaje de masa de la célula que corresponde al biopolímero sea superior al 60% [60], de lo contrario, los procesos de recuperación pueden volverse más complicados. Adicionalmente, es preferible usar microorganismos Gram-negativos, debido a que estos presentan una membrana celular más frágil, lo que facilita significativamente el proceso de extracción. Bajo las condiciones adecuadas, es posible llegar a obtener purezas y porcentajes de recuperación superiores al 90%, sin embargo, los agentes químicos usados

para la extracción pueden llegar a generar pérdidas importantes de peso molecular en el producto final, limitando sus aplicaciones comerciales.

Una de las mejores alternativas para la digestión química de la biomasa es la adición de SDS al medio de cultivo cuando finaliza la fermentación seguido de un proceso de mezclado y un tratamiento térmico generalmente en autoclave. Usando relaciones de P3HB/SDS superiores a 0.4 en *Ralstonia eutropha* fue posible obtener una pureza superior al 95% y una recuperación superior al 90%, con una disminución despreciable del peso molecular. Se cree que la barrera fosfolipídica que rodea los gránulos de PHA los protege de una posible degradación química ocasionada por el agente químico usado para la digestión de la biomasa no polimérica [61]. Sin embargo, es posible obtener rendimientos y purzas más altas utilizando *Escherichia coli* genéticamente modificada pues su membrana es muy fácil de romper cuándo hay un alto grado de acumulación polimérica debido a que no está diseñada para esto [62]. En sus estudios, Choi y Lee evaluaron diferentes agentes químicos a diferentes condiciones de operación para efectuar la digestión química de la biomasa en *Escherichia coli* recombinante, y obtuvieron resultados prometedores para la digestión con hidróxido de sodio $NaOH$, hidróxido de potasio KOH y SDS. Se logró demostrar que el tratamiento con SDS permite obtener purzas más altas mientras que los tratamientos con $NaOH$ y KOH que permiten obtener recuperaciones más altas, adicionalmente son más económicos y generan un menor impacto ambiental en comparación con el SDS [62].

Por lo general, altos porcentajes de acumulación de PHA facilitan la liberación de los gránulos poliméricos debido a la alta fragilidad de las células, este fenómeno también ha sido estudiado en otras cepas bacterianas diferentes a *Escherichia coli* como *Azotobacter vinelandii*, con la cual se evaluó la digestión química usando una solución acuosa de 1M de NH_3 a 45°C y se logró digerir el 10% de la biomasa no polimérica, obteniendo una pureza final del 94% y un polímero con alto peso molecular [63].

Otro método de alta popularidad es la digestión química usando hipoclorito de sodio $NaClO$ a pH alto debido a que es posible obtener purzas altas que permiten hacer una buena caracterización del material o usarlo para aplicaciones clínicas. Es común ver estudios en los que se combina la técnica de extracción con solvente usando cloroformo, y posteriormente tratamiento con hipoclorito de sodio para obtener un producto final de muy

alta pureza (>99.5%). Con este procedimiento la mayoría de los componentes de las células bacterianas son oxidados por el *NaClO* y se vuelven solubles en agua, sin embargo, este método pese a su sencillez posee una gran desventaja y es que se ha reportado por varios investigadores que el peso molecular del polímero puede llegar a disminuir hasta el 50%, adicionalmente, el uso de hipoclorito de sodio a la posibilidad de que se formen compuestos halogenados y también resulta difícil remover la totalidad de los sus residuos de la matriz polimérica [64], por esta razón esta técnica se encuentra descartada para la extracción y purificación a escala industrial.

1.2.2.2 Métodos enzimáticos

Existen algunos tipos de enzimas como las proteasas, nucleasas, lisosomas y lipasas que tienen efectos hidrolíticos importantes en las proteínas de la membrana bacteriana, y son capaces de generar lisis celular sin generar efectos significativos en los gránulos de PHA. En 1964 Merrick y su equipo de trabajo fueron los primeros en usar lisosomas y desoxirribonucleasas con efectividad para recuperar PHAs de la matriz celular [65], posteriormente, Holmes y Lim desarrollaron un nuevo proceso para la purificación de P(3HB-co-3HV) en *Ralstonia eutropha* aplicando una primera etapa de calentamiento, una etapa de tratamiento enzimático y finalmente un tratamiento con un surfactante que dio lugar a un polímero de alta pureza y con un buen porcentaje de recuperación, sin embargo, la utilización de enzimas para la purificación genera sobrecostos importantes en el proceso. Este proceso fue posteriormente patentado por “Imperial Chemical Industries” (ICI) en el Reino Unido [66]. Neves y Müller compararon diferentes tipos de proteasas disponibles comercialmente y lograron obtener purzas superiores al 93% después de 14 horas de tratamiento enzimático.

Adicionalmente, han sido evaluados varias metodologías que mezclan la digestión enzimática con la digestión química de la biomasa, usando SDS, hipoclorito de sodio e hidróxido de sodio, se ha reportado la disrupción de celular de *Pseudomona putida* usando un choque térmico para desnaturalizar las proteínas celulares y un tratamiento enzimático con alcalasa para hidrolizar las proteínas desnaturalizadas. Posteriormente, se utiliza SDS y EDTA para solubilizar la biomasa residual y lisozima para digerir los residuos de pared celular que no fueron digeridos anteriormente, compuestos en su mayoría por

peptidoglicano. Mediante este método, Yosotha y sus colaboradores demostraron que el peso molecular del PHA obtenido no variaba, y lograron obtener purezas cercanas al 93% y un porcentaje de recuperación de aproximadamente 90% [67].

1.2.2.3 Métodos mecánicos

Existen varios tratamientos mecánicos estandarizados y ampliamente estudiados para liberar proteínas de biomasa celular, estos métodos también pueden ser usados para extraer PHAs de las células bacterianas, sin embargo, son más que todo utilizados a nivel de laboratorio. Entre los más populares se encuentran la lisis con molino de bolas, la homogenización a alta presión y la ultrasonificación.

Los molinos de bolas están compuestos de cámaras cilíndricas giratorias concéntricas, que contienen esferas de diámetros iguales, las cuáles son capaces de lisar las células a altas velocidades de rotación debido a los esfuerzos cortantes generados en la membrana celular. Los molinos de bolas deben tener un sistema de refrigeración acoplados, pues se genera una cantidad importante de energía térmica debido a la fricción entre las esferas del molino. Mediante esta técnica fue posible lograr una completa disrupción celular y una disminución uniforme del tamaño de partícula a una escala micrométrica después de pasar el caldo fermentado 8 veces por un molino de bolas a 52800 rpm con una carga total del 85%, el microorganismo usado para este proceso fue *Alcaligenes lactus* [68]. La eficiencia del proceso no depende de la densidad celular de la suspensión, adicionalmente, el método es altamente reproducible, lo puede facilitar su implementación a escalas industriales.

El proceso de homogenización a alta presión o HPH por sus siglas en inglés es un método ampliamente para la desintegración y homogenización de células microbianas, el equipo consta de una bomba de alta presión que bombea el caldo fermentado a través de dos aberturas paralelas, las dos corrientes generadas llegan a una placa, colisionan y se vuelven a unir. Finalmente, el material homogenizado es expulsado del equipo, todo el proceso se lleva a temperatura ambiente. La eficiencia depende fuertemente de la concentración de biomasa en el caldo fermentado, si la concentración es baja los resultados no son los mejores. Usando HPH en un caldo fermentado de *Methylobacterium* sp. con 5% de SDS a una presión de 400 kg/cm^2 fue posible obtener una recuperación de

gránulos de PHB del 98% y una pureza de 95% [69]. Adicionalmente, fue posible obtener una recuperación cercana al 99% usando un caldo fermentado con una concentración celular de *Cupriavidus necator* de 6% con NaOH y SDS a una presión de 800 kg/cm^2 [6]. La lisis por ultrasonificación es otro método que ha sido usado con efectividad para la extracción de gránulos de PHA de células bacterianas. Hwang logró extraer PHB producidas por *Haloferax mediterranei* [70], sin embargo, los resultados obtenidos no fueron tan prometedores como los de los otros métodos mecánicos. Por lo general, la sonicación resulta más útil como pretratamiento de la biomasa, antes de una extracción con solvente o de una digestión química como lo demostró Lu en su investigación para *Escherichia coli*, *Cupriavidus taiwanensis* y *Burkholderia sp.* [71]. En general esta técnica se aplica para extracción y purificación a nivel de laboratorio.

1.2.2.4 Purificación del material después de la extracción.

Por lo general, no es posible retirar la totalidad de las impurezas presentes en el polímero aplicando alguno de los métodos usados anteriormente, y dependiendo de la aplicación que se le vaya a dar al material, un solo proceso de purificación puede ser suficiente o no. Es por esta razón, que es necesario combinar diferentes procesos para lograr obtener un material de alta pureza. Las principales purezas que se encuentran en el polímero después de un proceso de extracción con solvente son lípidos, proteínas, endotoxinas y ADN, debido a que también son solubles en los solventes usados para la extracción. Estas impurezas tienden a darle al polímero un color amarillento y un olor desagradable, limitando significativamente su aplicación comercial. Se ha demostrado que una manera eficiente de retirar estas impurezas es efectuando lavados con solventes orgánicos polares como etanol, metanol y acetona, pues estos son capaces de solubilizar los residuos de lípidos y proteínas, y de esta manera se obtiene un material incoloro e inodoro [72].

Por otro lado, cuando el proceso de extracción se hace mediante la digestión química de la biomasa usando hipoclorito de sodio, se obtiene un polímero incoloro e inodoro, pero con residuos importantes de hipoclorito de sodio que aceleran significativamente la degradación y la pérdida de peso molecular del material. Retirar los residuos del hipoclorito de sodio ha sido posible disolviendo el material en un solvente halogenado como el cloroformo, sin embargo, el aumento en costos del proceso al añadir esta etapa de purificación es importante [73].

1.2.2.5 1.2.2.6 Otros métodos

Existen otros métodos utilizados para la obtención de PHAs de células microbianas como la extracción con fluidos supercríticos, especialmente CO_2 que se podría clasificar como una rama de la extracción con solvente. Este método presenta ventajas importantes en comparación con los métodos convencionales, inicialmente, el solvente (CO_2) a sus condiciones supercríticas (30°C y 75 atm) presenta una alta densidad y una baja viscosidad lo que lo hace un solvente eficiente para la extracción de PHAs. Adicionalmente, su disponibilidad es alta y es de baja toxicidad y reactividad. Usando esta metodología ha sido posible obtener una recuperación del 89% para la extracción de P3HB de *Ralstonia eutropha* con un tiempo de exposición de 100 minutos, a 200 atm y 40°C [74]. Otros autores han reportado buenos resultados al combinar el método de la extracción supercrítica con la utilización de agentes de digestión química como el NaOH y el NaCl [75].

Otra técnica usada para facilitar la lisis celular para la posterior extracción y purificación del P3HB es el debilitamiento de la membrana celular del microorganismo mediante ingeniería genética. Esta metodología ha sido implementada con éxito en *Escherichia coli* recombinante, la cual fue modificada para inducir la producción de P3HB y adicionalmente se le adicionó un sistema de lisis basado en la producción de bacteriófagos, lo que permite una liberación eficiente y sin impacto sobre el peso molecular del polímero. Este método es por lo general usado en combinación con la digestión química con NaOH, SDS o EDTA, pero a en contraste con las metodologías mencionadas anteriormente, la concentración del agente químico para una extracción eficiente es más baja [76]. Este mismo sistema de lisis generado para *Escherichia coli* basado en bacteriófagos λ fue implementado con éxito en otros sistemas biológicos como *Ralstonia eutropha* y *Bacillus magnetarium* [77]. Hasta el momento no hay reportes en la literatura de la utilización de esta metodología para la extracción de PHAs a nivel industrial, sin embargo, se cree que es una de las maneras más eficientes de facilitar significativamente las operaciones aguas abajo de la fermentación.

1.3 Modificación del P3HB y sus copolímeros

Debido a las debilidades mecánicas y térmicas que posee el P3HB con respecto a otros polímeros presentes en el mercado, es beneficioso hacer modificaciones, por lo general mediante la incorporación de aditivos, que permiten obtener un material con mejores propiedades fisicoquímicas, un espectro más amplio de aplicaciones e incluso un precio más competitivo en el mercado. Estas modificaciones tienen como objetivo principal reducir la cristalinidad del material, ampliar la ventana de procesamiento (mejorar temperatura de fusión y de degradación), reducir la rigidez, reducir la fragilidad y disminuir el precio. Los tipos de modificación por aditivos se pueden dividir en tres grupos principales, las mezclas poliméricas, la adición de agentes nucleantes y la incorporación de refuerzos (fibras naturales).

1.3.1 Blendas o mezclas poliméricas

Las mezclas poliméricas son netamente físicas, es decir que no hay enlaces químicos entre los componentes, esta técnica permite combinar uno o más polímeros diferentes para obtener un nuevo material cuyas características físicas y mecánicas son una combinación de las de los polímeros originales. Esta opción es muy ventajosa pues permite reducir el costo de un material (una de las principales desventajas de los polihidroxicanoatos) sin alterar significativamente sus propiedades fisicoquímicas, no es necesario pasar por un proceso de polimerización como en las técnicas convencionales de síntesis polimérica, y puede mejorar significativamente las características mecánicas y la procesabilidad de los materiales. Las mezclas poliméricas pueden ser miscibles o inmiscibles, la miscibilidad está asociada con la homogeneidad de la mezcla a determinada temperatura y se puede ver afectada por la morfología del polímero, su cristalinidad, la reducción de la tensión superficial y las interacciones intermoleculares entre los polímeros. Esta miscibilidad está directamente relacionada con el cambio en la energía libre de Gibbs del proceso de mezclado a presión y temperatura constantes:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

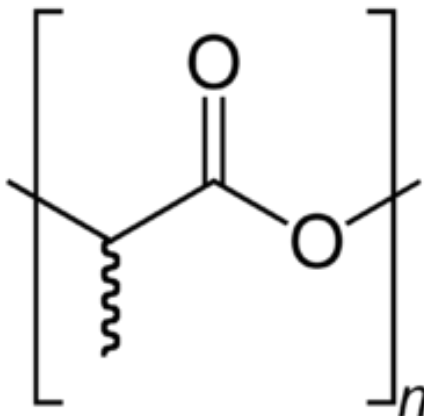
Ecuación 1-1

Dónde ΔG es el cambio en la energía libre de Gibbs, ΔH es el cambio en la entalpía, T es la temperatura absoluta y ΔS el cambio en la entropía. Para que una mezcla polimérica sea miscible el cambio de la energía libre de Gibbs debe ser negativo, para polímeros de alto

peso molecular el cambio de entropía de mezcla es poco significativo, de tal manera que la única opción que queda para que el cambio en la energía libre sea negativo es que el cambio en la entalpía sea negativo, esto significa que la mezcla debe ser exotérmica [78], para que esto suceda debe existir alguna interacción molecular entre los polímeros de la mezcla como la formación de puentes de hidrógeno o fuerzas ion – dipolo y dipolo – dipolo. Estas mezclas son relativamente fáciles de realizar, solo basta con disolver los polímeros en un solvente para luego evaporarlo, funciona muy bien a escala de laboratorio, pero a escala industrial puede llegar a ser muy costoso por las altas cantidades requeridas de solvente y por el impacto ambiental que produce su evaporación. Para mezclas de polímeros miscibles a gran escala estos se llevan a una temperatura superior a su temperatura de transición vítrea y se mezclan hasta obtener homogeneidad. Es posible también generar nuevos materiales a partir de mezclas de polímeros inmiscibles, son más complicadas de lograr, pero por lo general poseen propiedades interesantes, en estas existe una fase continua y una fase dispersa y se logran utilizando compatibilizantes químicos que generan algún tipo de interacción molecular entre las cadenas poliméricas, de la misma manera que actúa un surfactante en una emulsión. Existen varias mezclas poliméricas a base de P3HB reportadas en la literatura, tanto con polímeros sintéticos como caucho etileno-propileno (EPR), polivinil-acetato (PVA) y etilvinil-acetato (EVAL) entre otros [79] [80], como con polímeros biodegradables como ácido poli láctico (PLA) [81], policaprolactona (PCL) [82], polietilenglicol [78], almidón [83] y otros PHAs. Los materiales obtenidos de las mezclas por lo general tienen propiedades físicas y mecánicas mejoradas, pero son pocos los materiales que se han desarrollado a escala industrial.

1.3.1.1 Mezclas P3HB/PLA

El ácido poliláctico o PLA es un biopolímero termoplástico cuya unidad monomérica es el ácido láctico. Este tiene propiedades mecánicas similares a las del PET o tereftalato de polietileno, sin embargo, el PLA es biodegradable y soluble en agua. Este se produce a partir de almidón de maíz, almidón de yuca o caña de azúcar y es uno de los biopolímeros más producidos a nivel mundial debido a sus aplicaciones en la industria de los empaques y la impresión 3D. La **Figura 1-5** muestra la estructura molecular del PLA.

Figura 1-5: Estructura molecular del ácido poliláctico

La mezcla P3HB/PLA es una de las más estudiadas, pues presenta propiedades mecánicas interesantes que resultan ser una combinación entre las propiedades mecánicas del P3HB puro y el PLA puro. Estas mezclas empezaron a ser estudiadas en la década de los 90, con el objetivo de entender más a fondo la miscibilidad entre los dos polímeros, la cristalización, la morfología, las propiedades mecánicas y la biodegradación del material, las mezclas fueron preparadas usando la técnica de “solvent casting” con cloroformo a temperatura ambiente y también mediante mezcla fundida. El estudio demostró que la miscibilidad de los polímeros es significativamente mejor mediante la preparación por mezcla fundida usando PLA amorfo, adicionalmente, en ambos casos, el PLA tuvo un efecto positivo sobre la cristalización de P3HB, disminuyendo significativamente el tamaño de las esferulitas de P3HB en especial cuando el contenido de PLA de la mezcla era superior al 40%. La tensión de rotura y la elongación máxima mejoraron significativamente, sin embargo, las mezclas eran susceptibles a la degradación hidrolítica, característica que no tiene el P3HB en su estado puro [84].

En otro estudio, Koyama y Doi reportaron que la miscibilidad de la mezcla P3HB/PLA depende fuertemente del peso molecular del PLA, a pesos moleculares bajos (menores a 20kDa, la miscibilidad es óptima para mezclas de los polímeros fundidos, sin embargo, cuando el peso molecular del PLA es superior a 20kDa la mezcla se vuelve inmiscible [85]. Vogel estudió la separación de fases en las mezclas mediante espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) y reportó que las mezclas P3HB/PLA 50/50 wt% se separan mientras que las mezclas 30/70 wt% se mantienen en una sola fase usando un

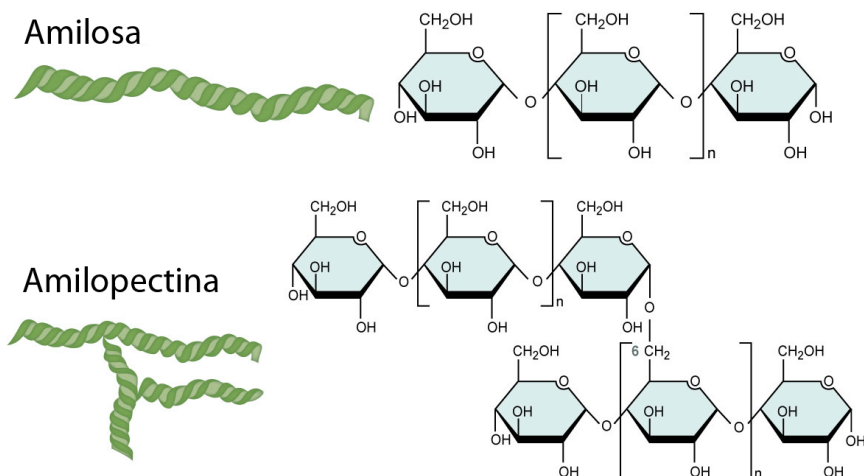
PLA de alto peso molecular [86]. Zhang investigó el fenómeno de cristalización en mezclas PHB/PLA miscibles e inmiscibles a una concentración de 50/50 wt% mediante espectroscopía infrarroja, la miscibilidad de las mezclas se ajustó variando el peso molecular del PLA, en las mezcla inmiscible el PLA se cristalizó primero a 120°C, indicando que su mecanismo de cristalización no se vio afectado por la presencia del P3HB, sin embargo, la cristalización del P3HB se dio a una temperatura más baja de lo habitual, cercana a los 90°C. Por otro lado, las mezclas miscibles mostraron una cristalización simultánea a 110°C [87].

Furukawa y su equipo de trabajo prepararon cuatro tipos diferentes de mezcla P3HB/PLA con contenidos de PLA de 20, 40, 60 y 80 wt% usando la técnica de “solvent casting” con cloroformo con el objetivo de estudiar los fenómenos de cristalización usando micro-espectroscopia IR y DSC. El espectro IR de todas las mezclas fue muy similar al del P3HB puro exceptuando la mezcla 20/80, adicionalmente los análisis de DSC mostraron que la entalpía de cristalización del PHA varía significativamente dependiendo de la cantidad de PLA en la mezcla. Para la mezcla 20/80 la temperatura de cristalización fue de 88.2°C, significativamente más baja que la del PLA puro (106°C), lo cual se debe principalmente a que los cristales de PHB en la mezcla sirven como centros de nucleación para el crecimiento de los cristales de PLA, adicionalmente, todas las mezclas obtenidas presentaban mejores propiedades mecánicas que el PHB puro [88].

1.3.1.2 Mezclas P3HB/Almidón

El almidón es un recurso renovable compuesto por un polímero lineal (amilosa) y un polímero ramificado (amilopectina). Es un biopolímero atractivo debido a su bajo costo, su baja densidad y su biodegradabilidad. Se obtiene fácilmente de varias fuentes naturales como el maíz, la papa, la yuca, el arroz y la avena, y es ampliamente usado en aplicaciones alimenticias y no alimenticias. Su naturaleza hidrofílica lo limita para el desarrollo de materiales cuyo mayor componente es el almidón, por esta razón por lo general se usa como aditivo para otros polímeros. En la **Figura 1-6** se puede ver la estructura química de los polímeros que componen el almidón.

Figura 1-6: Estructura química de la amilosa y la amilopectina, principales componentes del almidón [89]



La principal razón para mezclar almidón con PHB es para reducir su precio, pues debido a la naturaleza hidrofílica del almidón y a la naturaleza altamente hidrofóbica del PHB, la adhesión entre los dos polímeros es mala, y en la mayoría de las ocasiones puede generar un empeoramiento de las propiedades mecánicas [90], sin embargo, se puede mejorar significativamente la compatibilidad entre ambos polímeros funcionalizando químicamente el almidón. Las mezclas P3HB/Almidón son preparadas principalmente por dos métodos, “solvent casting” con cloroformo y mediante el procesamiento de los polímeros fundidos como moldeo por inyección y moldeo por compresión.

Según Zhang y sus colaboradores, la temperatura de transición T_g vítrea del P3HB al ser mezclado con acetato de almidón (SA) en concentraciones de 40 y 60 wt% es cercana a 9°C, la cuál es prácticamente la misma que el P3HB puro, indicando que la adición del SA al P3HB no afecta el T_g . Las interacciones entre las cadenas poliméricas fueron estudiadas usando FT-IR, el cual mostró absorción de grupos hidroxilos tanto en el P3HB como en el SA, lo cual demuestra la existencia de puentes de hidrógeno intramoleculares, sin embargo, los picos característicos de cada polímero se mantuvieron constantes, demostrando la ausencia de interacciones específicas entre ambos materiales. Adicionalmente, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se demostró que la dispersión del SA en la mezcla era muy poco uniforme, indicando separación de fases entre el P3HB y el SA. Finalmente, basado en lo mencionado anteriormente y en ensayos

de DSC se concluyó que las mezclas P3HB/SA a las condiciones estudiadas son inmiscibles [91].

La adición de compatibilizadores y plastificantes a las mezclas P3HB/Almidón han demostrado ser de gran utilidad para la obtención de mejores morfologías en el material, generando una mejora significativa en las propiedades mecánicas. Cuando la concentración de almidón es inferior al 10 wt%, las propiedades de la mezcla son mejores a las del P3HB puro, especialmente la elongación de rotura, sin embargo, la adición de cantidades superior a 10 wt% de almidón genera un empeoramiento en las propiedades mecánicas de la mezcla debido a la poca adhesión entre las dos partes. Adicionalmente, se ha demostrado que la biodegradación de las mezclas P3HB/Almidón es mayor a medida que aumenta la cantidad de almidón en ella, esto se debe a la naturaleza hidrofílica del almidón, la cual genera que la humedad de la muestra aumente rápidamente, generando condiciones óptimas para la degradación hidrolítica y la colonización bacteriana [92].

Zhang también investigó las diferencias entre las mezclas de P3HB con almidones ricos en amilosa (70% amilosa) y con almidones ricos en amilopectina (72% amilopectina). Los resultados revelaron que las mezclas con el almidón rico en amilosa presentan enlaces de hidrógeno intramoleculares más fuertes comparados con el otro almidón, esto se debe principalmente a la naturaleza lineal de la amilosa. Estos enlaces de hidrógeno entre el P3HB y el almidón rico en amilosa pueden llegar a inhibir la degradación del material debido a la ruptura aleatoria de las cadenas, es decir que el material tiene una mayor temperatura de degradación que a su vez genera una mejora en su procesamiento. Él estudió concluyó que las mezclas con almidones ricos en amilosa tienen mejores propiedades mecánicas y mejor estabilidad que las mezclas con almidones ricos en amilopectina [93].

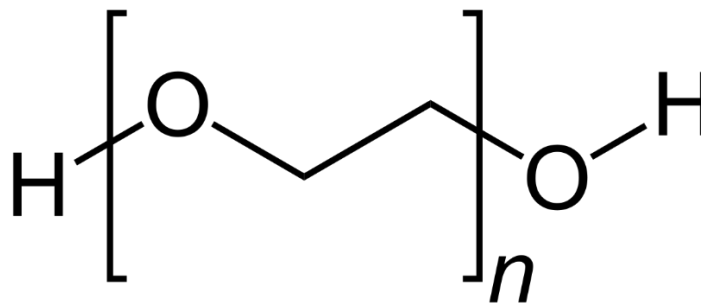
1.3.1.3 Mezclas P3HB/PEG

El polietilenglicol (PEG), también conocido óxido de polietileno (PEO) o polioxietileno (POE) es un poliéter biodegradable de origen sintético ampliamente utilizado en la industria debido a su baja toxicidad y sus propiedades hidrofílicas. Cuando se mezcla con otros polímeros actúa como plastificante, específicamente mejorando la flexibilidad de la mezcla. Existen diferentes tipos de PEG en el mercado dependiendo de su peso molecular, y aquellos con pesos moleculares menores, son los que tienen un mayor grado de

miscibilidad con el PHB. El PEG de bajo peso molecular posee un punto de fusión mucho menor que el de otros polímeros (entre 10°C y 50°C), lo que es un indicio de que las mezclas P3HB/PEG pueden tener una temperatura de procesamiento menor a la del P3HB puro, disminuyendo la degradación térmica durante el proceso [94]. La **Figura 1-7** muestra la estructura química del PEG.

Parra y colaboradores evaluaron las propiedades térmicas, mecánicas, morfológicas y de biodegradación de mezclas PHB/PEG en las siguientes proporciones; 100/0, 98/2, 95/5, 90/10, 80/20 y 60/40 wt%, las mezclas fueron preparadas por “solvent casting” con cloroformo a 60°C. Los resultados de la caracterización térmica (TGA y DSC) mostraron que la presencia de PEG no tiene ninguna influencia sobre la estabilidad térmica del PHB pues la temperatura de degradación se mantuvo relativamente constante para todas las muestras. Adicionalmente, se demostró que la temperatura de fusión de las mezclas disminuía a medida que aumentaba la concentración de PEG, debido a que el plastificante debilitó las fuerzas intermoleculares entre las cadenas poliméricas, reduciendo el volumen libre y a su vez la temperatura de fusión. Por otro lado, la temperatura de cristalización de la mezcla era menor a medida que aumentaba la cantidad de PEG en ella. En cuanto a las propiedades mecánicas, la tensión de rotura disminuyó a medida que aumentaba la concentración de PEG en la mezcla, pasando de 28 MPa para el P3HB puro a 13 MPa para la mezcla P3HB 60/40 wt%, la tensión de rotura aumentó a medida que aumentaba la concentración de PEG en la muestra, pasando de 9% para el P3HB puro, hasta 31% para la mezcla 40/60 wt% [95] y la permeabilidad de vapor de agua, aumentó proporcionalmente a la concentración de PEG en la muestra, debido principalmente al carácter hidrofílico del PEG.

Figura 1-7: Estructura química del polietilenglicol



1.3.2 Refuerzos y Rellenos

Otra técnica usada para mejorar las propiedades fisicoquímicas de los polímeros es la adición de rellenos o refuerzos. Estos son partículas o fibras orgánicas o inorgánicas que actúan como agentes nucleantes, generando núcleos de cristalización, o como refuerzos, mejorando la interacción molecular entre las cadenas poliméricas. Los compuestos naturales usados presentan varias ventajas como su alta disponibilidad, su bajo costo y sus buenas propiedades mecánicas, incluso, algunos de estos materiales pueden ser residuos de otros procesos industriales. La incorporación de estos aditivos a la matriz polimérica se hace generalmente por “solvent casting” o mezclado con el polímero fundido. La mayoría de los estudios utilizan fibras o refuerzos naturales, pues de esta manera evitan afectar la biodegradabilidad del P3HB, que es una de las características que lo hace interesante. Entre los aditivos estudiados que han mejorado de alguna manera las propiedades mecánicas o térmicas del P3HB se encuentran fibras de lino [96], fibras de yute [97], cascarilla de arroz [98] y nano cristales de celulosa (CNC) [99] entre muchos otros.

1.3.2.1 Mezclas P3HB/CNC

Los nanocristales de celulosa son uno de los aditivos más estudiados para la creación de materiales compuestos a partir de P3HB, especialmente para la formulación de nuevos materiales para empaques, su popularidad se debe a que son de origen biológico, biodegradables y no tóxicos. Existen varias técnicas que han sido usadas eficientemente para la síntesis de materiales micro-estructurados a base de PHB y CNC como extrusión, mezcla fundida, moldeo por compresión y “solvent casting”, por ejemplo Ten y colaboradores reportaron la fabricación de películas de PHB-CNC generando una dispersión de partículas de CNC (5 wt%) en una solución de PHB en DMF mediante ultrasonicación, sin embargo la sonicación tiende a disminuir el peso molecular del PHB debido a la degradación de las cadenas poliméricas afectando directamente las propiedades mecánicas del polímero [100]. Por otro lado, Stitthep reportó la formación de materiales compuestos a partir de P3HB/CNC mediante la extrusión de una mezcla de P3HB y CNC congelada en polvo, el proceso se llevó a cabo a 180°C, y aunque se hicieron esfuerzos para mantener el tiempo de operación y de mezcla corto, se obtuvo una degradación significativa del peso molecular del P3HB, limitando sus posibles aplicaciones [101]. Un método eficiente para la síntesis de materiales compuestos a base de P3HB y

CNC sin degradación polimérica fue propuesto por Bhardwaj, en este el P3HB se disuelve en cloroformo a 90°C en condiciones de reflujo durante 2 horas, posteriormente se prepara una dispersión de nanocristales de celulosa en cloroformo usando centrifugación a 10000 rpm. Finalmente, se mezcla la dispersión de CNC con la solución de P3HB durante 20 minutos a 60°C, se sirve en placas de vidrio y se deja evaporar el solvente, obteniendo como resultado una película de P3HB/CNC estable, sin embargo, esta técnica solo permite crear mezclas con cantidades de celulosa menores a 3 wt%, pues por encima de esta concentración, los cristales de celulosa empiezan a aglomerarse, lo cual puede llegar a afectar negativamente la estabilidad de la mezcla y sus propiedades mecánicas. [102]

Mediante análisis con FTIR se determinó que la máxima compatibilidad o interacción entre los nanocristales de célula y el P3HB se da cuándo la concentración de celulosa está entre 1 y 3 wt%, adicionalmente, el adelgazamiento de la banda C=O a 1750 cm^{-1} y la ausencia de picos OH a 3656 cm^{-1} indican la presencia de puentes de hidrógeno entre el polímero y los nanocristales de celulosa. Los materiales a base de P3HB y CNC con una carga de CNC del 2 wt% presentan un aumento significativo en la tensión de rotura, pasando de 36 MPa para el P3HB puro a 57.1 MPa, adicionalmente, la elongación máxima pasa de 3% a 6.3%. El módulo de Young también disminuye significativamente para materiales con una carga de CNC del 2%, indicando que el material presenta un comportamiento más elástico en las películas poliméricas. Finalmente, los análisis térmicos muestran que los nanocristales de celulosa no tienen efecto alguno sobre la estabilidad térmica del P3HB [102].

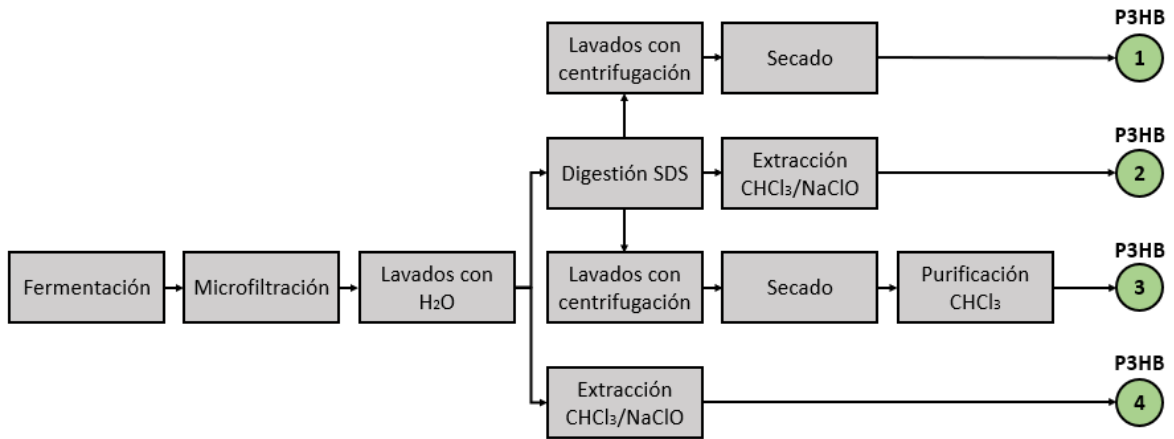
1.4 Producción de P3HB en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN)

En el laboratorio de fermentaciones del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN) se ha venido desarrollando un proyecto para la producción del biopolímero P3HB por más de 8 años. La producción se lleva a cabo con la cepa bacteriana mutante y gram-negativa *Burkholderia cepacia* B27, la cual fue aislada de suelos colombianos y seleccionada para el trabajo debido a su capacidad para producir PHAs usando ácidos grasos como fuente de carbono. Partiendo de la cepa nativa, *Burkholderia cepacia* 2G57 se hicieron varias mutaciones aleatorias usando el transposón mini-Tn5 con el objetivo de

crear cepas hiperproductoras de PHAs, de las cuales se seleccionó la mutante B27 debido a su capacidad de acumular más del 80% de su masa seca en PHAs [103].

Posteriormente, se llevaron a cabo varios proyectos de investigación que permitieron formular un medio de cultivo y diseñar un proceso a escala de laboratorio que favorecía la producción de P3HB por *Burkholderia cepacia* B27 mediante la fermentación tipo batch de ácidos grasos a escalas de 1L y 5L, llegando a obtener concentraciones de biomasa cercanas a 10 g/L en 72 horas de fermentación, con una acumulación de polímero cercana al 80% en masa. Una vez optimizado el proceso a nivel de laboratorio, se desarrolló un modelo matemático para llevar el proceso a escalas de 100L y 2000L usando como parámetro de escalamiento el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno $K_L a$ [7]. Después, se hicieron estudios para optimizar la producción a escala de 100L, obteniendo como resultado un protocolo de producción que permitía llegar a concentraciones de biomasa de 12 g/L en 72 h para operación por lotes [104], adicionalmente, se optimizó un proceso de producción semi-continuo, en el cual se reponían los nutrientes y la fuente de carbono consumida después de 24 horas iniciada la fermentación, obteniendo un aumento importante en la producción de biomasa, llegando a los 23 g/L en 72 horas en fermentaciones de 100L .

Hasta el momento la investigación se había basado principalmente en la optimización y el escalamiento de la fermentación, sin embargo, se hicieron algunas aproximaciones a la purificación del material usando extracción con solvente (cloroformo) y SDS [105], sin embargo, el material obtenido presentaba un color y un aroma desagradable debido a impurezas provenientes de la fermentación que también afectaban significativamente sus propiedades mecánicas limitando su aplicación. Para eliminar el olor y el aroma se evaluó la extracción y purificación con hipoclorito de sodio, que permitió obtener un material blanco y sin olor, pero con malas propiedades mecánicas debido a una evidente pérdida de peso molecular generada por la degradación de las cadenas poliméricas al entrar en contacto con el hipoclorito de sodio. La **Figura 1-8** muestra un diagrama de flujo de las cuatro diferentes rutas que se habían evaluado hasta el momento para la extracción y purificación del polímero.

Figura 1-8: Diagrama de flujo de las rutas de extracción y purificación evaluados

Todas las rutas de extracción y purificación empiezan con un proceso de microfiltración, usando un filtro tangencial con una membrana polimérica de $0.45 \mu m$ para concentrar la biomasa, durante el proceso se debía hacer un monitoreo constante de la presión en la membrana, la cual no podía superar los 30 psi. Cuando la presión llegaba al límite, era necesario detener la operación para hacer una limpieza del equipo, la cual podía llegar a tardar hasta un día completo, ralentizando significativamente el proceso. Para realizar el lavado, el producto concentrado de la etapa de microfiltración es diluido en agua hasta su volumen inicial, luego se agita para homogenizar la suspensión, y posteriormente se vuelve a filtrar usando la metodología mencionada anteriormente.

La primera ruta de extracción consiste solo en hacer una digestión de la biomasa con SDS usando la metodología optimizada previamente por Fonseca [105], la cual consiste en adicionar a la solución concentrada 0.55 mL de SDS al 20% por cada gramo de biomasa, llevar la temperatura a $80^{\circ}C$ y dejar actuar durante una hora. Posteriormente se deja enfriar hasta que llegue a temperatura ambiente, se centrifuga a 6000 rpm por 15 minutos, se retira el sobrenadante, se reconstituyen los sólidos en agua hasta su volumen original y se centrifuga nuevamente a las mismas condiciones para eliminar los residuos de SDS en el polímero. Finalmente se seca el material obtenido en un horno de bandejas. El polímero obtenido de esta ruta de purificación relativamente sencilla posee un color marrón oscuro, debido a que tiene residuos de biomasa, adicionalmente, es muy frágil, tiene un olor desagradable y se evidencia claramente la presencia de residuos lípidos, provenientes de la fermentación [106].

La segunda ruta de extracción consiste en efectuar una extracción con cloroformo – hipoclorito de sodio para purificar el material después de la digestión con SDS. Para esto se prepara una solución cloroformo – hipoclorito de sodio (5%) 1:1 v/v, y se le adiciona al caldo fermentado después de la digestión con SDS en una relación de 100 mL de solución por gramo de biomasa. La mezcla se lleva a 30°C con agitación magnética durante una hora, y después se deja decantar por 12 horas para obtener dos fases, la fase más densa principalmente compuesta por una solución de polímero en cloroformo, y la fase menos densa compuesta principalmente de hipoclorito de sodio con residuos de biomasa disueltos. La fase rica en polímero se sirve en cajas de Petri para posteriormente evaporar el cloroformo y obtener películas poliméricas. Como lo muestra la **Figura 1-9**, esta ruta de extracción permite obtener un material completamente blanco e inodoro. Sin embargo, sus propiedades mecánicas son muy malas, debido principalmente a la degradación de las cadenas poliméricas por acción de la digestión con hipoclorito de sodio [106].

Figura 1-9: Polímero obtenido después del tratamiento con SDS/Cloroformo/Hipoclorito [106].



El tercer procedimiento consiste en la purificación del material obtenido después de la digestión con SDS, la centrifugación y el secado, lo que da como resultado un polvo marrón rico en biomasa y polímero. Este sólido se disuelve en cloroformo usando una relación de

3 ml de cloroformo por gramo de material sólido, posteriormente la mezcla se filtra en un sistema de filtro-prensa, dónde se separa la solución de polímero y cloroformo de la biomasa residual. La viscosidad de la solución polimérica era bastante alta, lo que dificultaba significativamente la separación de las dos fases por filtración. El material obtenido presentaba mejores propiedades mecánicas que los obtenidos por los otros métodos mencionados anteriormente, sin embargo, era evidente la presencia de contaminantes que le daban un color y un olor desagradable como se ve en la **Figura 1-10**. Esto se debe, a que los lípidos y otras macromoléculas obtenidas en la fermentación, también son solubles en cloroformo [106].

La cuarta ruta de extracción consiste solo en la digestión con cloroformo e hipoclorito, usando la misma metodología que se describió anteriormente, solo que esta vez se usa como material de partida la suspensión de biomasa obtenida después de la microfiltración y sus lavados. El material obtenido mediante este método presenta un color blanco, adicionalmente es inodoro, sin embargo, es muy frágil y se quiebra al tacto, muy similar al obtenido por la segunda ruta de extracción [106].

Figura 1-10: Material extraído usando extracción con SDS y purificación con cloroformo.



Se puede concluir que ninguno de los métodos evaluados hasta el momento daba como resultado un material con las características adecuadas para un posible uso comercial. Es por esta razón que se decidió iniciar una investigación más rigurosa en cuanto la extracción y purificación del material, con el objetivo de obtener un producto con posibles aplicaciones en el mercado. Adicionalmente, en el estudio de Garzón y Villamizar se demostró que almacenar el material sin tratar por periodos de tiempo superiores a 2 semanas en frío (4°C) y una semana a temperatura ambiente, generaba una disminución importante en la calidad del material [106].

2 Capítulo 2: Evaluación de diferentes técnicas de Extracción y Purificación

En este capítulo se estudian diferentes técnicas para la extracción y purificación del P3HB obtenido mediante la fermentación de ácidos grasos con *Burkholderia cepacia* B27. Las técnicas evaluadas se seleccionaron de acuerdo con los resultados obtenidos de la vigilancia tecnológica y la experiencia de los investigadores que habían trabajado previamente en el proyecto. El objetivo principal era encontrar una técnica que permita la extracción y purificación del biopolímero evitando la utilización de solventes halogenados como el cloroformo que generan un impacto ambiental importante. Se evaluó la extracción con diferentes solventes no halogenados a diferentes temperaturas y en diferentes concentraciones, adicionalmente, se tantearon otras técnicas como la precipitación. Una vez seleccionada la mejor técnica para la extracción, se evaluaron varias rutas diferentes de proceso, desde la fermentación hasta la obtención del polímero purificado, modificando el orden y las condiciones de operación de las operaciones unitarias involucradas hasta obtener la óptima.

2.1 Metodología

2.1.1 Proceso Fermentativo

El polímero se produce a partir de la fermentación de ácidos grasos usando la cepa mutante *Burkholderia cepacia* B27 en reactores de 5L y 100L con un volumen efectivo de 4L y 60L respectivamente. El medio de cultivo (medio PHA) usado fue diseñado en estudios anteriores y su composición se muestra en la **Tabla 2-1**.

El proceso empieza con la inoculación de 50 mL de caldo LB con 500 uL de la suspensión de células provenientes del banco de trabajo, este proceso se lleva a cabo en un matraz de 250 mL. El medio inoculado se deja a 30°C con agitación constante (250 rpm) en un shaker por 24 horas. Posteriormente, se inoculan 500 mL de medio PHA en un matraz de 2 L con los 50 mL de LB mencionados anteriormente. El nuevo inóculo se deja a las mismas condiciones que el anterior por 24 horas. Después se preparan 4.5 L de medio PHA en el reactor de 7L y se inocula con los 500 mL de medio PHA mencionados anteriormente, en el reactor la agitación se ajusta a 500 rpm, el aire a 2 vvm y la temperatura a 30°C.

Adicionalmente, se configura el control de pH para que mantenga el medio a pH 6 usando NaOH 3M. Finalmente, después de 24 horas, se inoculan 55 L de medio PHA en el reactor de 100 L con los 5 L provenientes del reactor de 7L. Las condiciones de operación del reactor de 100 L son 2 vvm de aireación, 30°C y 400 rpm. El pH se monitorea cada 12 horas y se ajusta con NaOH 3M hasta llegar a pH 6, la fermentación dura 72 H. Antes de cada proceso de inoculación, el medio de cultivo es esterilizado a 121°C por 1 hora en una autoclave, el reactor de 100L es esterilizado con vapor a 121°C proveniente de una caldera.

Tabla 2-1: Composición del medio de cultivo para la producción de P3HB con *Burkholderia cepacia* B27

COMPONENTE	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN
Fosfato monopotásico	KH_2PO_4	2.65 g/L
Fosfato disódico	Na_2HPO_4	3.39 g/L
Sulfato de Amonio	$(NH_4)_2SO_4$	2.80 g/L
Sulfato de Magnesio	$MgSO_4$	0.30 g/L
Micronutrientes	-	2 ml/L
Aceite Vegetal	-	20 g/L
Antiespumante	-	2.6 mL/L

Una vez terminada la fermentación, el reactor es esterilizado con vapor a 121°C durante 40 minutos. Finalmente, se enfría el reactor y se almacena el caldo fermentado a 4°C para su posterior tratamiento. La cepa bacteriana usada (*Burkholderia cepacia* B27) se encuentra almacenada en viales de 1 mL en medio LB – Glicerol 40%, con una concentración de 1×10^7 UFC/mL.

2.1.2 Digestión química con SDS

En estudios anteriores en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN), se desarrolló un procedimiento para la extracción del polímero de la matriz celular usando SDS [105]. El estudio utiliza 3 variables de operación que deben ser ajustadas hasta obtener un proceso óptimo. Estos procedimientos no se pueden replicar de los estudios encontrados en la literatura, porque la composición química de las membranas celulares bacterianas varía significativamente, y no existen estudios disponibles para la extracción de PHAs con SDS usando *Burkholderia cepacia* B27.

En dicho estudio se encontró que para que el proceso de digestión química sea eficiente, se debe llevar a cabo a 80°C por 1 hora utilizando una relación biomasa/SDS de 0.55 mL SDS 20%/g biomasa. Con estas condiciones de operación es posible obtener una recuperación del 60% en masa del polímero. Sin embargo, la calidad del material obtenido era baja, debido a la presencia de impurezas (principalmente residuos de biomasa y aceite).

2.1.3 Proceso estándar para la extracción y purificación del P3HB usando cloroformo,

Se utilizó el proceso descrito por Rosengart [107] y colaboradores para la extracción de P3HB de *Burkholderia sacchari*. El estudio demostró que mediante esta metodología es posible extraer aproximadamente el 98% del polímero con una pureza superior al 95%. Los resultados de este proceso se usan como estándar para evaluar el porcentaje de recuperación obtenido mediante los otros métodos a evaluar, sin embargo, no es recomendable para la extracción a nivel semi industrial, debido a las grandes cantidades de cloroformo y etanol requeridas en el proceso.

Inicialmente, las células obtenidas después del proceso de digestión con SDS y secado son suspendidas en cloroformo de grado analítico usando una relación de 60 mL de solvente por gramo de biomasa. Luego, se dejan en agitación a temperatura ambiente por 24 horas, para posteriormente filtrar la solución obtenida al vacío usando filtros de celulosa. De esta manera se obtienen dos fases diferentes, una fase líquida compuesta principalmente de polímero y cloroformo, y una fase sólida retenida en el filtro, que corresponde a los restos de biomasa. La solución polimérica se vierte lentamente en cajas de Petri y se deja a temperatura ambiente para que se evapore el cloroformo, obteniendo como resultado una película de P3HB. Este material es posteriormente molido y suspendido en acetona (20 mL de acetona por gramo de polímero) a temperatura constante y con agitación magnética durante una hora para remover los residuos de aceite y otras impurezas provenientes de la fermentación, posteriormente se centrifuga 6000 rpm, se remueve el sobrenadante y se deja secar el polímero purificado a 30°C., El rendimiento del proceso se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Polímero obtenido}}{\text{Biomasa Inicial}} \quad \text{Ecuación 2 – 1}$$

En el resto del documento, se asumirá que el P3HB recuperado mediante este método corresponde al 100% del P3HB presente en las células, de esta manera, será posible calcular el porcentaje de recuperación de cada método evaluado usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Rendimiento Método Evaluado}}{\text{Rendimiento Método Estándar}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2 - 2}$$

2.1.4 Determinación de la cantidad óptima de cloroformo para la purificación

Se cuantificó la cantidad de polímero obtenida mediante la purificación con cloroformo de 1 gramo de biomasa previamente digerida con SDS, centrifugada y secada. Esto con el objetivo de encontrar la cantidad óptima de cloroformo para la extracción y reducir al máximo la cantidad de solvente necesaria. Se evaluaron 6 suspensiones biomasa/cloroformo en diferentes concentraciones: 2 mL/g, 5 mL/g, 8 mL/g, 10 mL/g, 15 mL/g y 20 mL/g. La biomasa se suspende en la cantidad indicada de solvente, y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 6 horas. Posteriormente se filtra la solución obtenida al vacío con una membrana de celulosa obteniendo dos fases diferentes, una fase sólida rica en biomasa y una fase líquida, compuesta principalmente por polímero y cloroformo. La solución se sirve en cajas de Petri y se deja evaporar el solvente a temperatura ambiente, las películas obtenidas se muelen y se suspenden en acetona (20 mL de acetona por gramo de polímero) a temperatura constante y con agitación magnética durante una hora para remover los residuos de aceite y otras impurezas provenientes de la fermentación, posteriormente se centrifuga 6000 rpm, se remueve el sobrenadante y se deja secar el polímero purificado a 30°C. En este punto, se evalúa el rendimiento del proceso usando la **Ecuación 2-1**, para finalmente determinar la mejor relación de cloroformo/biomasa para llevar el proceso a una mayor escala.

2.1.5 Evaluación de diferentes solventes orgánicos para eliminar residuos

Con el objetivo de eliminar los excesos de aceite que generan un color amarillento y un olor desagradable en el material después de la purificación con cloroformo se probaron

tres solventes diferentes metanol, etanol y acetona, seleccionados a partir de una revisión bibliográfica [55] [108] [6]. Se evaluaron diferentes relaciones biomasa/solvente por triplicado, para esto se prepararon muestras en tubos de ensayo con la cantidad de biomasa y de solvente que indicaba el diseño experimental y se dejaron en agitación constante en un shaker por 24 horas. Posteriormente, se centrifugan las mezclas y se retira el sobrenadante, es decir el solvente con las impurezas disueltas en él. El pellet sólido se seca a 60°C y finalmente se pesa. La diferencia entre la masa del pellet al finalizar el proceso y la masa inicial de este corresponde a las impurezas retiradas en el experimento.

$$\% \text{ masa retirada} = \left(1 - \frac{\text{masa final}}{\text{masa inicial}}\right) \times 100 \quad \text{Ecuación 2 - 3}$$

Algunos sólidos obtenidos fueron analizados mediante TGA, mediante el cual se puede hacer una buena estimación de las impurezas que quedan en el polímero debido a que su temperatura de degradación es diferente a la del P3HB. La configuración usada para los ensayos de TGA se puede encontrar en el Anexo A. La **Tabla 2-2** muestra los factores y niveles del diseño experimental evaluado. Cada experimento se hizo por triplicado para reportar los resultados junto con su desviación estándar, y evaluar así la repetibilidad de la técnica.

Tabla 2-2: Factores y niveles propuestos para la evaluación de los solventes polares orgánicos.

FACTOR	NÚMERO DE NIVELES	NIVELES
Solvente	3	Etanol, Metanol, Acetona
Biomasa/Solvente [g/mL]	4	0.01 – 0.05 – 0.1 – 0.5

2.1.6 Evaluación de la precipitación de la biomasa con la adición de un anti-solvente.

Se evaluó la precipitación de la biomasa usando un solvente orgánico como alternativa a la centrifugación, el solvente usado fue el etanol, y con este proceso se espera unificar dos pasos del proceso en uno solo, por un lado, la adición de etanol al medio de cultivo después de la digestión con SDS va a inducir a la precipitación de la biomasa. Adicionalmente, el etanol tiende a solubilizar gran parte de las impurezas presentes en la biomasa, que, de no ser retiradas, terminarían en el producto final, afectando sus propiedades fisicoquímicas y sus posibles aplicaciones.

Para evaluar la precipitación de la biomasa, se hicieron mezclas con un volumen total de 250 mL del medio de cultivo fermentado con etanol al 96% en diferentes proporciones, y se dejaron a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, se retiró el sobrenadante de cada una de las muestras, los sólidos precipitados se secaron a 60°C durante 24 horas y posteriormente se cuantificaron. Adicionalmente, se hicieron mezclas del medio de cultivo fermentado con agua destilada a las mismas proporciones que las mezclas de medio de cultivo – solvente, para ser usadas como control negativo.

2.1.7 Evaluación de la solubilidad del P3HB en diferentes solventes

La selección de solventes consta de tres etapas diferentes, inicialmente, se hace una selección a partir de una revisión bibliográfica, posteriormente, se evalúa la solubilidad del polímero P3HB en los solventes seleccionados mediante un método teórico, en este caso, los parámetros de solubilidad de Hansen, y finalmente, se hace una selección final teniendo en cuenta parámetros ambientales y económicos de los solventes seleccionados por el método de Hansen. Al final se obtienen 4 solventes en los cuales se evaluará experimentalmente la solubilidad del P3HB. Una descripción detallada del método de Hansen para la solubilidad de polímeros se puede encontrar en el Anexo B.

2.1.7.1 Estimación de los parámetros de solubilidad de Hansen (HSP) para el P3HB

El cálculo de los HSPs para el P3HB se hizo de acuerdo con el procedimiento descrito por Van Krevelen y Hoftyzer en 1976 [109] mediante el cual se estiman los 3 parámetros con contribuciones de grupos funcionales y las siguientes ecuaciones:

$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{V} \quad \delta_p = \sqrt{\frac{\sum F_{pi}^2}{V}} \quad \delta_h = \sqrt{\frac{\sum E_{hi}}{V}} \quad \text{Ecuación 2 - 4}$$

Dónde el subíndice i hace referencia a cada grupo funcional y V es el volumen molar calculado de la siguiente manera:

$$V = \frac{\rho_{P3HB}}{MW_{P3HB}} \quad \text{Ecuación 2 - 5}$$

Los parámetros F_d , F_p y E_h para cada grupo funcional fueron reportados por Van Krevelen y Hoftyzer en 1976. En la **Tabla 2-3** se muestran los más representativos

Tabla 2-3: Contribuciones a cada de cada grupo funcional a los parámetros de solubilidad [109]

Grupo Funcional	$F_d \left[(MJ/m^3)^{0.5} mol^{-1} \right]$	$F_p \left[(MJ/m^3)^{0.5} mol^{-1} \right]$	$E_h \text{ [J/mol]}$
-CH ₃	420	0	0
-CH ₂ -	270	0	0
>CH-	80	0	0
>C<	-70	0	0
=CH ₂	400	0	0
=CH-	200	0	0
<=C<	70	0	0
-COO-	390	490	7000
-COOH	530	420	10000
-OH	210	500	20000

2.1.7.2 Ajuste de los parámetros de solubilidad a diferentes temperaturas

La temperatura es un parámetro que afecta significativamente las interacciones polímero-solvente, es posible que un polímero deje de ser soluble, o se vuelva soluble en un solvente, solo con modificar la temperatura. Por esta razón, es necesario hacer una corrección de los HSPs como se muestra a continuación:

$$\frac{d\delta_d}{dT} = -1.25\alpha\delta_d \rightarrow \delta_d(T) = \delta_d(1 - 1.25\alpha\Delta T) \quad \text{Ecuación 2 - 6}$$

$$\frac{d\delta_p}{dT} = -0.5\alpha\delta_p \rightarrow \delta_p(T) = \delta_p(1 - 0.5\alpha\Delta T) \quad \text{Ecuación 2 - 7}$$

$$\begin{aligned} \frac{d\delta_h}{dT} &= -\delta_h(1.22 \times 10^{-3} + 0.5\alpha) \rightarrow \delta_h(T) \\ &= \delta_h(1 - \Delta T(1.22 \times 10^{-3} + 0.5\alpha)) \quad \text{Ecuación 2 - 8} \end{aligned}$$

Dónde α es el coeficiente de expansión térmica en K^{-1} . Para calcular el valor de ΔT se utiliza el valor de la temperatura que se desea estudiar, y el valor de la temperatura a la que fueron calculados los parámetros de solubilidad inicialmente, es decir $25^\circ C$, entonces $\Delta T = T - 25^\circ C$.

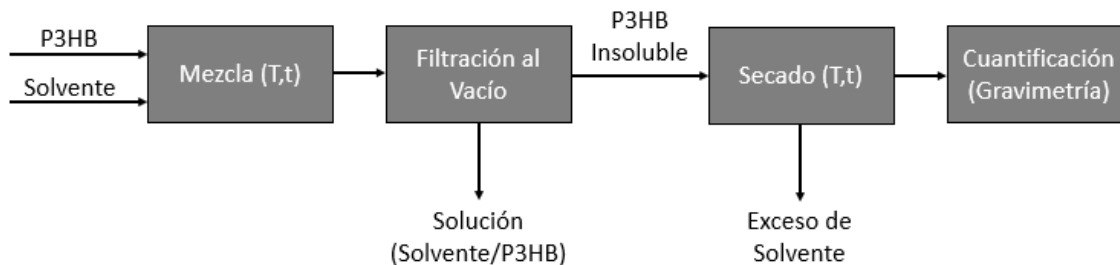
2.1.7.3 Evaluación de la solubilidad experimental del polímero en los solventes seleccionados

El biopolímero utilizado para evaluar la solubilidad en los 4 solventes seleccionados fue producido mediante la fermentación de ácidos grasos con *Burkholderia cepacia* B27 en una fermentación de 100 L y fue purificado usando el método de mejor rendimiento según las etapas experimentales hechas previamente. Se planteó un diseño experimental central compuesto en el cual se evaluaron 4 factores, la temperatura del proceso, el tiempo, la relación polímero/solvente y el tipo de solvente, adicionalmente, se añade al diseño el cloroformo como quinto solvente, para tener una referencia en cuánto a la solubilidad y la calidad del material obtenido, y de esta manera poder hacer comparaciones de manera cuantitativa.

El polímero y el solvente se mezclan con agitación magnética (500 rpm) en viales de vidrio de 30 mL en las cantidades y a las condiciones especificadas en el diseño de experimentos. Posteriormente, se filtra al vacío la solución obtenida usando papel de celulosa de poro medio para separar los residuos insolubles de la solución polímero/solvente, finalmente, se secan los residuos sólidos que quedaron en el filtro para eliminar el exceso de solvente y se pesan en una balanza analítica. El porcentaje de polímero solubilizado se calcula comparando la masa de polímero retenida en el filtro con la masa inicial:

$$\%Solubilidad = \left(1 - \frac{P3HB\ Insoluble\ [g]}{P3HB\ Inicial\ [g]}\right) \times 100 \quad \text{Ecuación 2 - 9}$$

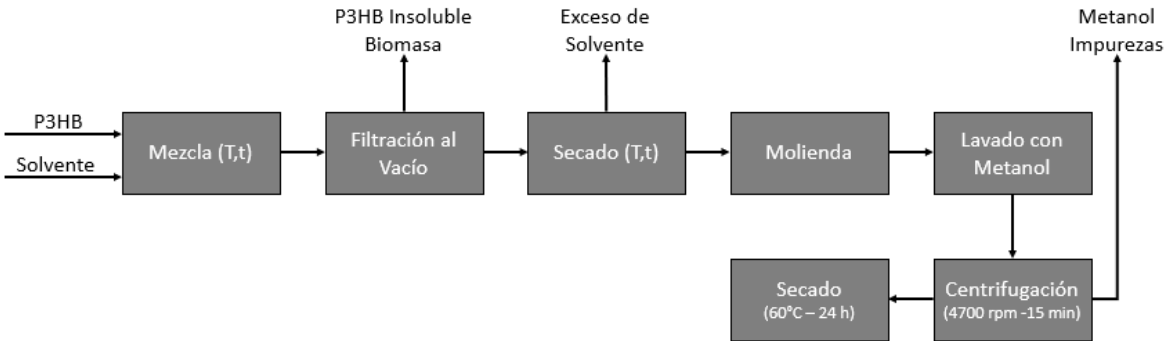
La **Figura 2-1** ilustra el proceso utilizado para la evaluación de la solubilidad del polímero. Una vez obtenidos todos los datos, se hace un análisis para determinar cuál de los solventes es más apto para ser usado como sustituto del cloroformo en el proceso de purificación. Adicionalmente, se hace un análisis estadístico para determinar de qué manera influyen los diferentes factores evaluados en la solubilidad del P3HB.

Figura 2-1: Proceso para la evaluación de solventes alternativos.

2.1.8 Evaluación del proceso de extracción del P3HB con solventes alternativos

Una vez identificado el solvente con mayor capacidad de solubilizar el P3HB para evaluarlo como sustituto del cloroformo en el proceso de purificación del material. Para esto, se debe modificar el proceso usado convencionalmente, para ajustarlo a las condiciones de operación necesarias (temperatura, tiempo de agitación, proporción polímero/solvente) para que haya una buena solubilidad del polímero.

Inicialmente, se mezcla la biomasa seca después de la digestión con SDS con el solvente a las condiciones de operación óptimas para la solubilización según los resultados del diseño experimental. Posteriormente se filtra la solución al vacío para eliminar los residuos insolubles, la solución obtenida se sirve en cajas de Petri y se deja secar hasta evaporar el solvente, las condiciones de esta etapa de secado dependerán del solvente que se haya seleccionado. Una vez obtenidas las películas poliméricas, se muelen y se mezclan por una hora con metanol a una tasa de $10 \text{ ml MetOH/g P3HB}$ durante una hora, por último, se centrifuga la mezcla a 4700 rpm por 15 minutos, se retira el sobrenadante rico en metanol y el polímero purificado se lava con agua y se deja secando a 60°C durante 24 horas como se muestra en la **Figura 2-2**.

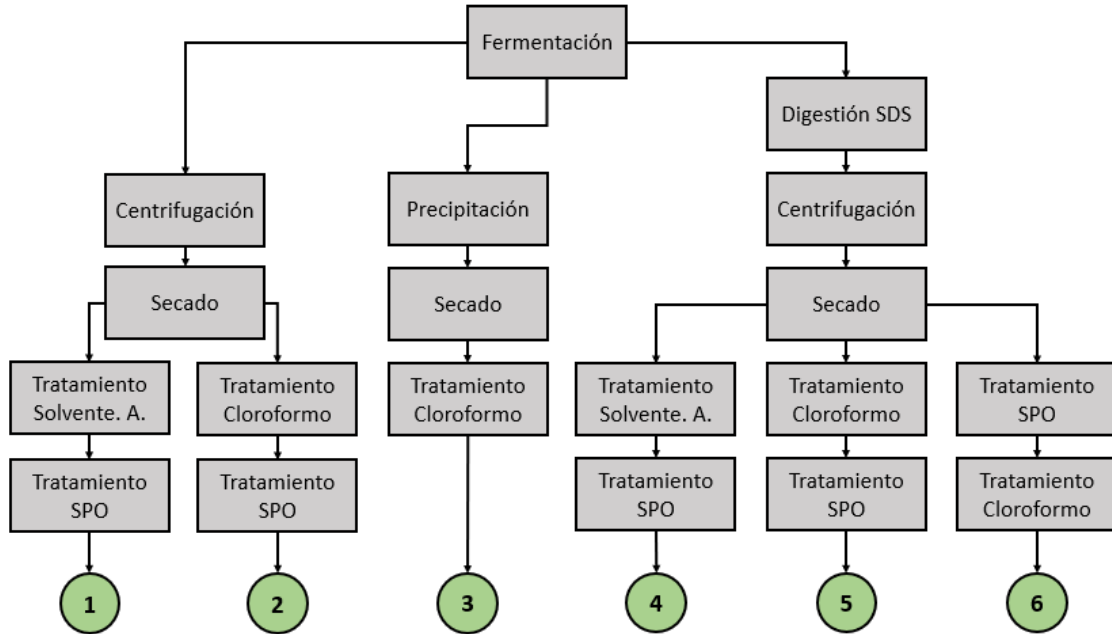
Figura 2-2: Diagrama del proceso de extracción usando el solvente alternativo

El material obtenido es posteriormente caracterizado (TGA, DSC y FTIR) para ver si hay diferencias significativas en la estructura química y las propiedades térmicas del material después del proceso de extracción con el solvente alternativo.

2.1.9 Comparación de diferentes rutas de extracción y purificación.

Con el objetivo de obtener un protocolo eficiente para la extracción y purificación del material que permitiera hacer una caracterización rigurosa de este, se evaluaron diferentes rutas de proceso diferentes tomando como punto de partida los procesos disponibles en la literatura y las experiencias y recomendaciones de los investigadores del IBUN que habían trabajado anteriormente en el proyecto. Como modificación inicial a las rutas de proceso descritas en la sección 1.4 de este documento, se decidió no usar la operación de filtración tangencial, debido a que constituye un cuello de botella en el proceso, aumentando significativamente los tiempos necesarios para el tratamiento. Entonces, para hacer la concentración de la biomasa se evaluaron dos técnicas, la centrifugación y la precipitación. Después de la etapa de concentración va una etapa de secado, donde se obtiene un material sólido que posteriormente es tratado con diferentes tipos y combinaciones de solventes para obtener un polímero de alta pureza. Para mejorar la pureza del polímero, se utilizó un tratamiento adicional con solventes orgánicos polares, que tiene como objetivo eliminar residuos de aceite y lípidos productos del metabolismo bacteriano, que suelen ser los responsables del color amarillento y el olor desagradable del polímero. Adicionalmente, se decidió no usar hipoclorito de sodio en la purificación, pues se ha reportado en varias investigaciones que tiene un efecto negativo sobre el peso molecular del material [64]. En la **Figura 2-3** se puede ver un resumen de todas las rutas de proceso evaluadas.

Figura 2-3: Resumen de todas las rutas de extracción y purificación evaluadas, Solvente A. hace referencia al solvente alternativo seleccionado después de la evaluación de solventes. Y SPO hace referencia al solvente polar orgánico usado para remover los residuos lípidos.



Las diferentes rutas de extracción se usa el porcentaje de recuperación del proceso (**Ecuación 2-2**). Adicionalmente, en el capítulo 3 se presenta la caracterización térmica del material obtenido de las rutas más interesantes.

2.2 Resultados y Análisis

2.2.1 Proceso estándar para la extracción y purificación del P3HB usando cloroformo.

La purificación del material usando la metodología estandarizada se llevó a cabo con 2 lotes de polímero diferentes, ambos producidos en el biorreactor de 5 L en fermentaciones a pH 6 durante 72 horas. Cada procedimiento se realizó por triplicado para evaluar la repetibilidad del proceso, adicionalmente, cada réplica se hizo con 1 g de polvo seco obtenido después de la digestión con SDS, la centrifugación y el secado. La **Figura 2-4** muestra la apariencia del material de partida para la purificación.

Figura 2-4: Material de partida para la evaluación del proceso estándar de extracción con cloroformo



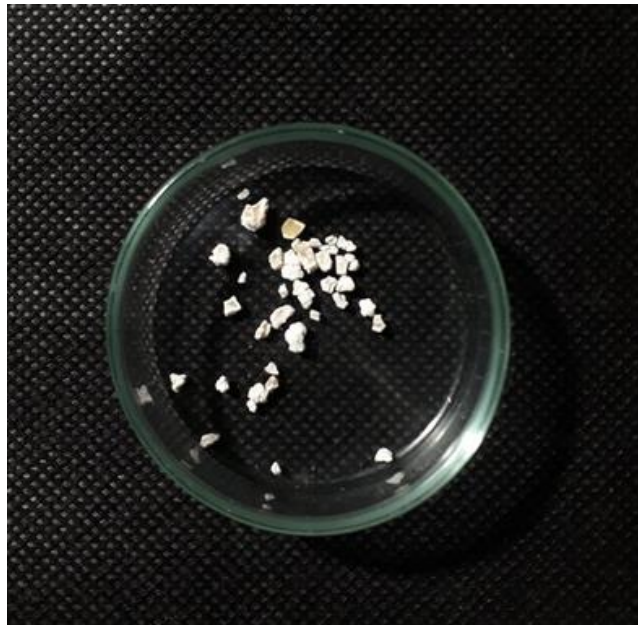
Tabla 2-4: Resultados del procedimiento estándar de purificación con cloroformo

Lote	Réplica	Biomasa Inicial [g]	Polímero Purificado [g]	%R [%]	Promedio %R [%]
Lote A	1	1,026	0,603	58,79%	58.73%
	2	1,017	0,604	59,42%	
	3	1,006	0,583	57,97%	
Lote B	1	1,031	0,612	61,23%	61.24%
	2	1,028	0,606	60,59%	
	3	1,010	0,619	61,89%	

Los resultados del porcentaje de recuperación obtenido para cada ensayo se muestran en la tabla **Tabla 2-4**, el porcentaje de recuperación promedio para las tres réplicas de Lote A fue de 58,73%, mientras que para el Lote B fue de 61,24%. Al analizar los resultados obtenidos para cada replica individualmente se puede ver que la repetibilidad del proceso es buena, adicionalmente, el material obtenido tiene una buena apariencia y carece del color amarillo y el olor característico del material obtenido en un mal proceso de purificación. Sin embargo, la cantidad de solventes usada para tratar 1 g de biomasa con este método es significativamente alta, lo que significa un costo alto al escalar el proceso de extracción y purificación mediante esta metodología. En la **Figura 2-5** se puede ver la apariencia del material después del proceso.

Es importante mencionar que el porcentaje de recuperación para cada lote depende de las diferencias inevitables en el proceso de fermentación, principalmente asociadas al crecimiento del microorganismo, tanto en el tren de inoculación como en la fermentación. Debido a esto, es recomendable efectuar un proceso de extracción y purificación estandarizado para cada lote para poder hacer una comparación cuantitativa entre los procesos evaluados con el proceso estándar.

Figura 2-5: Apariencia del polímero después del proceso de purificación (Lote A)



2.2.2 Determinación de la cantidad óptima de cloroformo para la purificación.

La **Tabla 2-5** muestra el porcentaje de recuperación obtenido para cada uno de los experimentos realizados, para esto se utilizó el Lote A, del cual fue posible extraer el 58,73% en masa de polímero como se demostró en la sección anterior de este documento (**Tabla 2-4**). El rendimiento obtenido para las muestras tratadas con 5 ml de solvente por gramo de biomasa y 2 mL de solvente por gramo de biomasa es significativamente bajo comparado con los resultados obtenidos a otras concentraciones. Esto se debe principalmente a alta viscosidad que adquiere la solución P3HB/cloroformo, lo que dificulta significativamente su paso a través de la membrana de filtración al vacío, adicionalmente, la alta volatilidad del cloroformo hace que este se evapore rápidamente, generando la cristalización del polímero en el filtro antes de que este pase a través de él, la cantidad de

polímero que se cristaliza en el filtro debido a la evaporación del cloroformo es proporcional a la concentración de la solución polimérica, es decir que entre menor sea la relación $CHCl_3$ /biomasa, mayor será la cantidad de polímero que se quede en el filtro debido a este fenómeno. Adicionalmente, como es de esperar, menores volúmenes de cloroformo son capaces de solubilizar menores cantidades de P3HB.

Tabla 2-5: Resultados obtenidos para la purificación del P3HB usando diferentes concentraciones cloroformo/biomasa

$CHCl_3$ /Biomasa [mL/g]	Biomasa Inicial [g]	Polímero [g]	Rendimiento [%]	Promedio [%]	Desv. Est
2	1,095	0,131	11,96%	14,84%	0,020
2	1,036	0,168	16,22%		
2	1,009	0,165	16,35%		
5	1,106	0,376	34,00%	33,43%	0,032
5	1,075	0,398	37,02%		
5	1,209	0,354	29,28%		
8	1,001	0,539	53,85%	52,82%	0,008
8	1,057	0,558	52,79%		
8	1,044	0,541	51,82%		
10	1,086	0,563	51,84%	54,89%	0,022
10	1,039	0,584	56,21%		
10	1,005	0,569	56,62%		
15	1,021	0,589	57,69%	57,40%	0,014
15	1,020	0,602	59,02%		
15	1,081	0,600	55,50%		
20	1,011	0,597	59,05%	58,41%	0,011
20	1,009	0,599	59,37%		
20	1,063	0,604	56,82%		

Por otro lado, los experimentos con una relación $CHCl_3$ /biomasa iguales o superiores a 8 mL/g presentaron rendimiento significativamente mayor, sin embargo, se puede evidenciar claramente que el rendimiento se va acercando cada vez más a su límite, disminuyendo la eficiencia del proceso debido a que el aumento en la relación $CHCl_3$ /biomasa no es proporcional al aumento del rendimiento. Por ejemplo, de 8 mL/g a 20 mL/g hay un aumento del 150% en el volumen de solvente que se utiliza, pero solo un aumento del 5,9% en el rendimiento, este aumento tan importante en el volumen de solvente a utilizar no se justifica desde el punto de vista económico comparado con el rendimiento obtenido. Es por esta razón, que se selecciona 8 mL/g como la relación $CHCl_3$ /biomasa más

favorable, pues se obtiene rendimiento del 52,82%, lo cual corresponde a un porcentaje de recuperación del 90% según los resultados obtenidos para el proceso estándar, adicionalmente, la cantidad de solvente a utilizar es razonable para llevar el proceso a una escala superior.

Figura 2-6: Apariencia del material de los Lotes A (Derecha) y B (Izquierda) después de la purificación



Teniendo en cuenta lo anterior, se hicieron las purificaciones de la biomasa restante del Lote A (32,3 g) y el Lote B (39,7 g) usando 8 mL/g de $CHCl_3$ /biomasa. La cantidad de polímero obtenido fue de 16,08 g para el Lote A y 20,16 g para el Lote B, lo que corresponde a un rendimiento de 49,78% y 50,80% respectivamente. Hubo una disminución del 3% en el resultado, lo cual es una consecuencia inevitable de llevar el proceso a mayor escala. Adicionalmente, hubo un aumento significativo en el tiempo de la purificación, debido principalmente a la operación de filtración al vacío, la filtración de las soluciones poliméricas obtenidas para los ensayos hechos con 1 g de biomasa no tardaban más de 2 minutos debido a los bajos volúmenes de solvente y de sólidos insolubles, sin embargo, al purificar el resto de la biomasa disponible se disponía de más de 250 mL de solución polimérica por lote, cuya filtración llegó a tardar más de 4 horas debido al taponamiento de la membrana de filtración por la acumulación de la biomasa insoluble en cloroformo, fenómeno que no había sucedido en las purificaciones a menor escala. Esto indica que la filtración como se plantea no es la manera más efectiva de separar la biomasa

insoluble de la solución polimérica a mayores escalas, y que se debe modificar el proceso, en especial a la hora de purificar el material producido en fermentaciones de 100L. La **Figura 2-6** muestra la apariencia de las películas poliméricas obtenidas después del proceso de purificación.

2.2.3 Evaluación de diferentes solventes orgánicos para eliminar residuos

Los polihidroxicanoatos de origen bacteriano vienen normalmente rodeados de varios tipos de macromoléculas de origen biológico que disminuyen la calidad del polímero como ácidos nucleicos, lípidos, fosfolípidos y peptidoglicano entre otros [110]. Adicionalmente, el hecho de que la fuente de carbono usada para las fermentaciones sea aceite vegetal, hace que la cantidad de lípidos en el material al final sea mayor, pues la fuente de carbono está en exceso y no es completamente consumida en la fermentación. Varios autores han demostrado que, para reducir la cantidad de estas impurezas en el polímero, los lavados con solventes orgánicos levemente polares como el etanol, el metanol o la acetona son muy eficientes [6] debido a su naturaleza anfipática, lo que les permite solubilizar lípidos y proteínas.

Tabla 2-6: Resultados de la evaluación de diferentes solventes polares orgánicos para remover residuos lípidos del polímero.

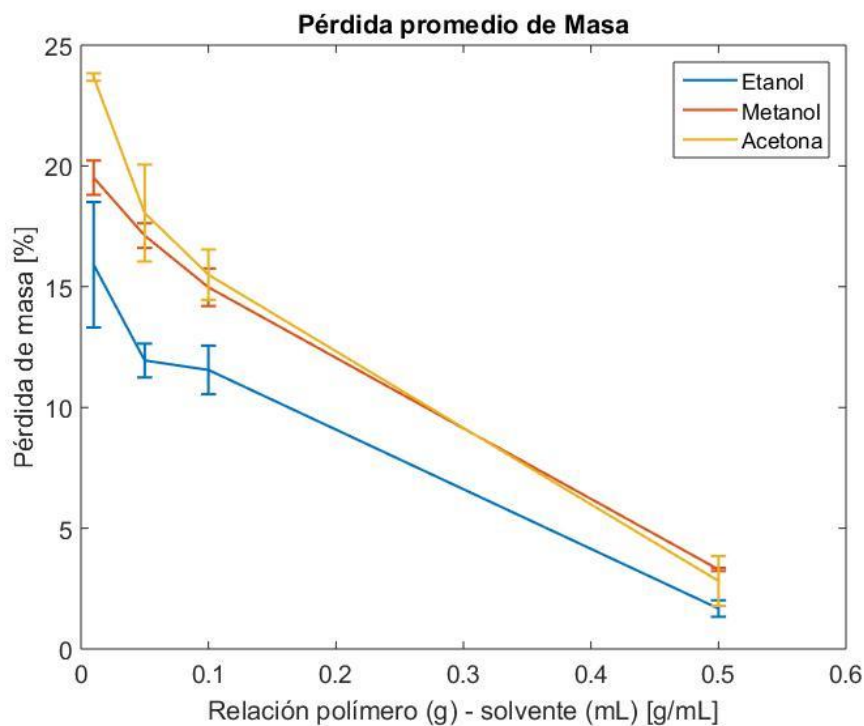
Solvente	Concentración [g/mL]	Pérdida de masa promedio [%]	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación [%]
Etanol	0.01	15.91	2.60	16.33
	0.05	11.94	0.70	5.86
	0.1	11.55	1.01	8.74
	0.5	1.67	0.34	20.51
Metanol	0.01	19.51	0.71	3.65
	0.05	17.12	0.51	2.99
	0.1	14.98	0.78	5.20
	0.5	3.29	0.06	1.90
Acetona	0.01	23.68	0.15	0.65
	0.05	18.05	2.01	11.12
	0.1	15.49	1.04	6.71
	0.5	2.81	1.03	36.57

Se realizaron en total 36 experimentos, variando la relación P3HB/solvente y el tipo de solvente y con 3 réplicas de cada experimento. En la **Tabla 2-6** se pueden ver los

resultados obtenidos para cada solvente y cada concentración, junto con el promedio de las tres replicas y su desviación estándar.

Se puede ver claramente que las muestras tratadas con metanol mostraron una alta reproducibilidad en los resultados en comparación con los otros solventes. En la tabla también se encuentra el coeficiente de variación, igual a la relación entre el tamaño de la media y la variabilidad de la variable estudiada, este parámetro estadístico por lo general muestra una mejor interpretación del grado de variabilidad que la desviación estándar, y valores bajos indican buena reproducibilidad de los experimentos.

Figura 2-7: Pérdida de masa de la biomasa seca al ser tratada con diferentes solventes a diferentes concentraciones.



En la **Figura 2-7** se resume la información de la **Tabla 2-6**, se evidencia que el metanol y la acetona retiran una cantidad significativamente mayor de impurezas que el etanol, igualmente se muestra que la acetona retira un 23.68% de impurezas cuando la relación polímero solvente es de 0.01 g/mL , sin embargo, como la cantidad de solvente es muy alta, el proceso es muy costoso y poco viable. Una relación polímero/solvente de 0,1 g/mL

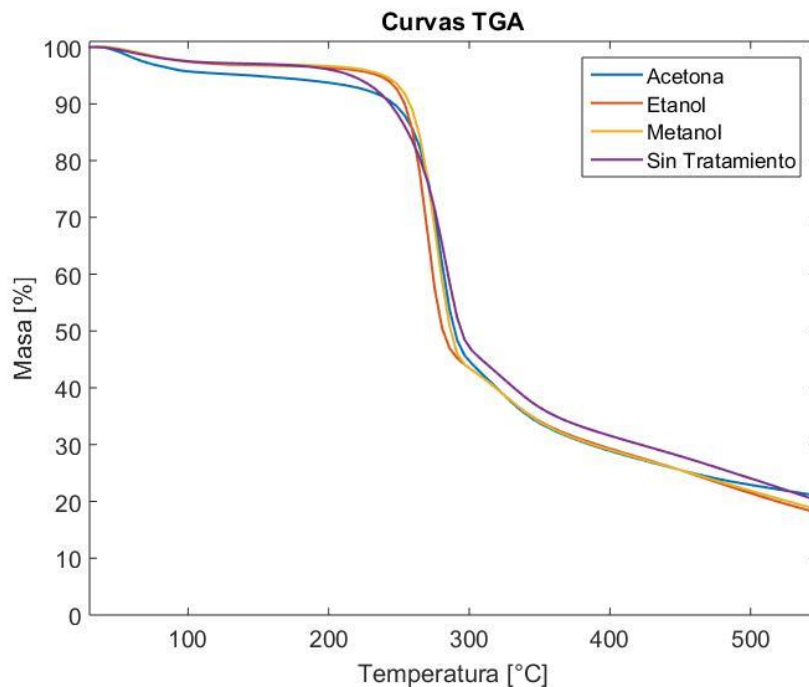
es mejor opción para purificar grandes cantidades de material. Para esta concentración, la masa retirada por la acetona (15.49%) es similar a la retirada por el metanol (14.98%).

Se hizo un análisis termogravimétrico de la biomasa con polímero tratada con cada solvente para evaluar si había diferencias significativas en el perfil térmico del material después del tratamiento con cada solvente. Los resultados se muestran en la **Figura 2-8** se puede ver que el perfil obtenido para el etanol y el metanol es muy similar, mientras que el de la acetona y el del polímero sin tratamiento presentan diferencias significativas, especialmente por debajo de los 250°C, la biomasa tratada con acetona presenta una disminución de masa temprana en comparación con las demás muestras, pues esta pierde el 5% de su masa cerca de los 140°C, mientras que el resto de las muestras solo llegan a perder el 5% de su masa por encima de los 210°C. La **Figura 2-9** muestra con mayor detalle lo mencionado anteriormente, se puede ver que la muestra sin tratamiento no presenta la disminución de masa a baja temperatura que presenta la muestra tratada con acetona, indicando que este comportamiento se debe específicamente al tratamiento, y que la masa perdida corresponde a residuos de acetona que no fueron removidos en la operación de secado posterior al tratamiento. Por otro lado, se puede ver que el cambio de pendiente correspondiente a la degradación del polímero se da a una temperatura más baja para la muestra sin tratamiento con respecto a las muestras tratadas con solvente, indicando que la eliminación de residuos tiende a mejorar la estabilidad térmica del material. Como se puede ver en las gráficas del TGA, la masa baja desde aproximadamente el 95% hasta cerca del 45% en el intervalo de temperatura comprendido entre 250°C y 300°C, el cuál es el intervalo de temperatura en el que se degrada el P3HB, indicando que los sólidos obtenidos después de los diferentes tratamientos tenían una composición de polímero cercana al 50% en masa.

El material obtenido después de la purificación con los solventes polares se evaluó usando el tratamiento con cloroformo descrito en la sección anterior de este capítulo, con el objetivo de determinar el contenido de P3HB. Para esto se cuantifica el porcentaje de masa que se degrada entre los dos cambios importantes de pendiente de cada curva de la **Figura 2-10**. Por ejemplo, la muestra sin tratamiento tiene el cambio de pendiente correspondiente al inicio de la degradación del P3HB a 252°C, dónde la masa de la muestra corresponde al 96.60% de la masa original, adicionalmente, el segundo cambio de pendiente, que corresponde con el final de la degradación del P3HB se da a los 315,2°C, cuándo la masa restante es de 6.78%. De esta manera, se puede decir que la

cantidad de P3HB que tenía la muestra inicialmente corresponde a 96.60% - 6.78%, es decir 89.83%. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se pueden ver las temperaturas iniciales y finales de la degradación, la masa restante para cada temperatura y la masa total de P3HB en la muestra para cada tratamiento. Adicionalmente se adicionó la caracterización de una muestra comercial de P3HB de Sigma Aldrich.

Figura 2-8: TGA para las muestras de biomasa purificadas con los 3 tipos de solvente a una concentración de 0.1 g/mL



Como se puede ver en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, la muestra con metanol es la que mayor porcentaje de P3HB, seguida de la muestra tratada con etanol y por último la muestra tratada con acetona. Cabe resaltar que la cantidad de P3HB en la muestra tratada con acetona es incluso menor a la muestra sin tratamiento, lo que puede ser un indicio de que la acetona es capaz de solubilizar pequeñas concentraciones de polímero, lo cual explicaría el hecho de que en la **Figura 2-7** el mayor porcentaje de masa retirada sea de la muestra tratada con acetona. Teniendo en cuenta lo anterior, y los resultados obtenidos en la primera parte del experimento, se selecciona el metanol como el solvente más apropiado para retirar impurezas del polímero.

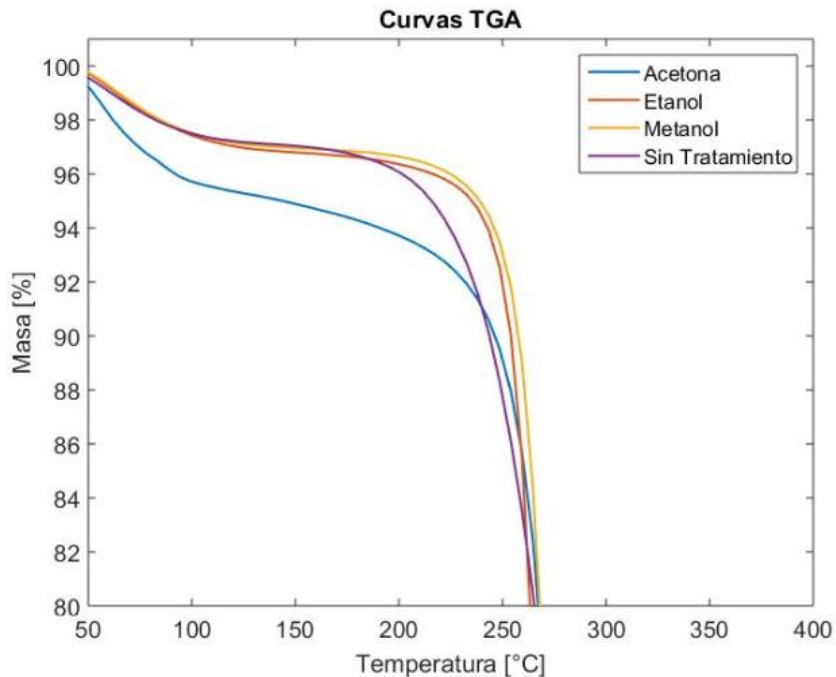
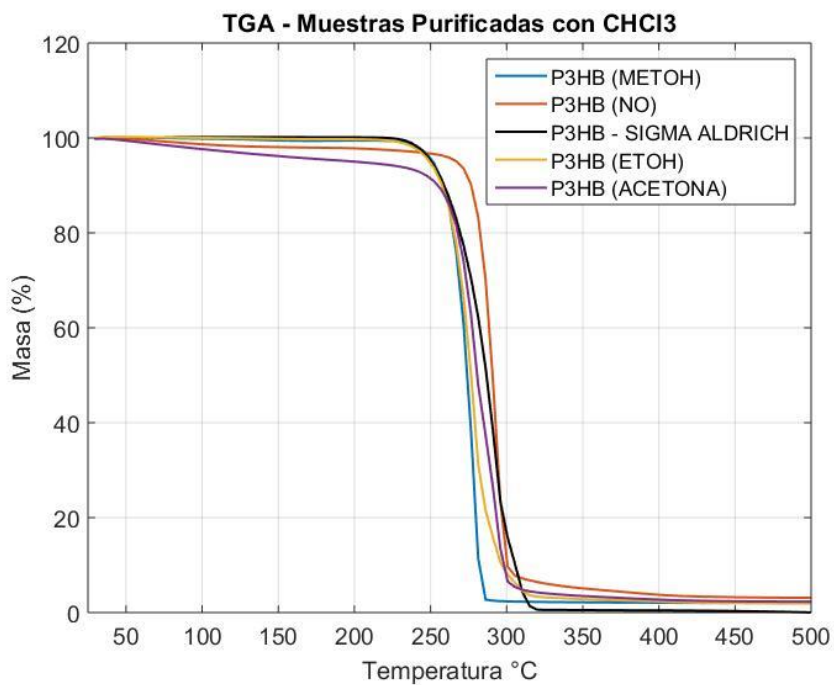
Figura 2-9 Zoom de las curvas de TGA entre 50°C y 250°C.**Figura 2-10:** TGA de las muestras tratadas con diferentes solventes y posteriormente purificadas con cloroformo.

Tabla 2-7: Propiedades térmicas de las muestras determinadas con TGA

Tratamiento	T1 [°C]	Masa(T1) [%]	T2 [°C]	Masa(T2) [%]	Masa P3HB [%]
Metanol	233,0	99,00	286,2	2,72	96,28
Sin Tratamiento	252,0	96,60	315,2	6,78	89,83
Sigma Aldrich	233,0	99,48	320,0	0,61	98,87
Etanol	233,0	98,80	315,2	3,64	95,16
Acetona	233,0	93,77	310,3	4,81	88,96

2.2.4 Evaluación del proceso de extracción de P3HB con solventes alternativos.

La **Tabla 2-8** muestra los solventes con los cuales se ha reportado un proceso de extracción y purificación exitoso para el P3HB o alguno de sus copolímeros, sin embargo, varios autores reportan que el éxito del proceso está fuertemente ligado al microorganismo productor debido a que la composición química de la membrana que envuelve los gránulos de P3HB dentro de las células varía dependiendo de la especie.

Tabla 2-8: Solventes utilizados por otros investigadores para la solubilización del P3HB

Solvente	PHA	Microorganismo	Recuperación [%]	Referencia
Acetato de Butilo	P(3HB-co-3HHx)	<i>R. eutropha</i>	41 ± 0.1 a 50°C	[111]
Acetato de Etilo	P(3HB-co-3HHx)	<i>R. eutropha</i>	99 ± 0 a 100°C	[111]
Ácido Acético	P3HB	<i>C. necátor</i>	37 ± 2 a 100°C	[112]
Anisol	P3HB	<i>B. sacchari</i>	97 a 120°C	[113]
Carbonato de Etileno	P3HB	<i>C. necátor</i>	98 ± 2.0	[112]
Carbonato de Propileno	P3HB	<i>C. necátor</i>	85 a 145°C	[108]
Ciclohexanona	P3HB	<i>B. sacchari</i>	93 a 130°C	[113]
Dimetil Sulfóxido	P3HB	<i>C. necátor</i>	61 ± 2 a 150°C	[112]
Heptano	P3HB	<i>R. eutropha</i>	99 a 90°C	[114]
Metil Isobutil Cetona	P(3HB-co-3HVx)	<i>R. eutropha</i>	55 ± 2 a 100°C	[111]
Metil Etil Cetona	P(3HB-co-3HHx)	<i>E. coli</i>	94 ± 0.6 a 60°C	[111]

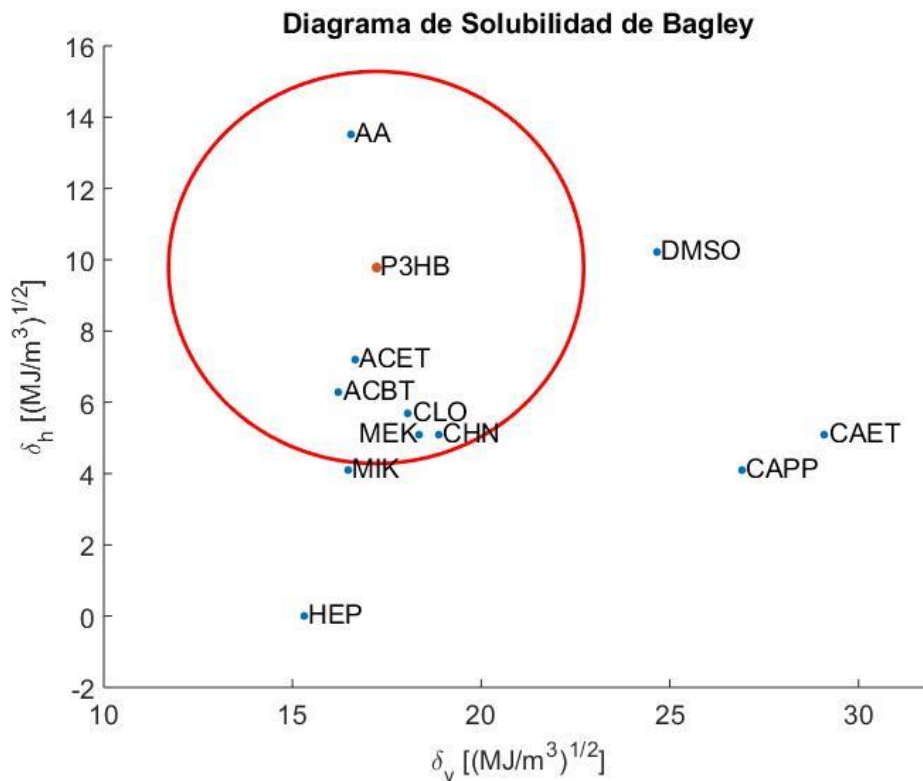
Los parámetros de solubilidad de los solventes de la **Tabla 2-8** fueron obtenidos del apéndice A del libro de Hansen y se presentan en el anexo B de este documento. Con el

objetivo de visualizar los datos de solubilidad en un plano, se utilizó la modificación propuesta por Bagley [115] quien concluyó que los efectos de los parámetros δ_d y δ_p en la solubilidad de sistemas polímero-solvente son similares, mientras que δ_h tiene una naturaleza diferente, por tal razón, Bagley propuso la unificación de los términos similares en un nuevo parámetro (Ecuación 2-10) .

$$\delta_v = (\delta_d^2 + \delta_p^2)^{0.5} \quad \text{Ecuación 2 - 10}$$

Figura 2-11: Diagrama de solubilidad de Bagley para el P3HB y los solventes seleccionados,

AA (Ácido acético), DMSO (Dimetil Sulfoxido), CAET (Carbonato de etileno), CAPP (Carbonato de propileno), HEP (Heptano), MIK (Metil Isobutil cetona), MEK (Metil etil cetona), MEK (Metil etil cetona), CHN (Ciclohexanona), CLO (Cloroformo), ACBT (Acetato de butilo) y ACET (Acetato de etilo)



La **Figura 2-11** muestra el diagrama de solubilidad $\delta_v - \delta_h$ de Bagley para el P3HB y los solventes seleccionados, la frontera de solubilidad se define en función de un círculo con un radio de 5δ , el centro del círculo está representado por los parámetros de δ_v y δ_h del P3HB, $17.22 \text{ MPa}^{0.5}$ y $9.78 \text{ MPa}^{0.5}$, respectivamente (Ver Anexo B para detalle sobre el cálculo de los parámetros de solubilidad). Son seis los solventes que caen en el área de

solubilidad, el ácido acético, el acetato de butilo, el acetato de etilo, el cloroformo, la metil etil cetona y la ciclohexanona. Los parámetros de solubilidad utilizados se encuentran a 25°C, al hacer la corrección por temperatura y generar los diagramas, se puede evidenciar que el cambio en los parámetros de solubilidad es leve, y que en la zona de solubilidad se ubican los mismos solventes que a 25°C. En la sección de anexos se puede encontrar el diagrama de solubilidad $\delta_v - \delta_h$ a 50 °C, 80°C y 100°C.

Finalmente, entre los solventes ubicados en la región de solubilidad del P3HB se seleccionaron cuatro de acuerdo con los criterios definidos en la guía para selección de solventes de GSK (Glaxo-Smith-Kline) [116], donde se clasifican los solventes en diferentes categorías dependiendo de 4 características principales, su disposición final, su impacto sobre el medio ambiente, su impacto en la salud humana y sus parámetros de seguridad. Adicionalmente, se añadió al análisis el punto de ebullición y el precio de cada solvente. En la **Tabla 2-9** se pueden ver los puntajes obtenidos para cada solvente según la clasificación mencionada. Entre los solventes seleccionados el cloroformo es el que presenta el promedio más bajo debido a su calificación en cuanto a los riesgos en la salud humana, por otro lado, el anisol y la ciclohexanona tienen buenos puntajes en todas las categorías, sin embargo, ambos solventes tienen puntos de ebullición demasiado altos, lo que se vería reflejado en un gasto energético importante para recuperarlos. Adicionalmente son relativamente costosos en comparación con los otros solventes de la tabla. Teniendo en cuenta lo anterior, se seleccionaron 4 solventes para hacer las pruebas el acetato de etilo, el acetato de butilo, la metil etil cetona y el ácido acético.

Tabla 2-9: Calificación según GSK de los solventes según diferentes parámetros [116]

Solvente	Punto de Ebullición	Disposición Final	Impacto Ambiental	Impacto a la Salud	Seguridad
Ácido Acético	118	4.75	6	6	7
Acetato de Etilo	77	5	7	8.5	7.5
Acetato de Butilo	126	7.5	7.5	8	9
Cloroformo	61	5	6	2.5	7.5
Ciclohexanona	155	7.5	7.5	6.5	9
Metil etil Cetona	80	4.25	6	8	7
Anisol	154	8	6.5	7.5	8

2.2.4.1 Evaluación de la solubilidad experimental

Para evaluar la solubilidad experimental del P3HB en los solventes seleccionados se usó un diseño experimental factorial completo con 4 factores. En la **Tabla 2-10** se pueden ver los factores usados, el número de factores por nivel y los correspondientes niveles de cada factor.

Tabla 2-10: Factores y niveles del diseño experimental para la evaluación de la solubilidad del P3HB.

(MEK = Metil etil cetona, AE = Acetato de Etilo, AA = Ácido Acético, AB = Acetato de Butilo, CLO = Cloroformo)

Factor	Número de Niveles	Niveles
Solvente	5	MEK – AE – AA – AB – CLO
Concentración [g/mL]	4	25 – 50 – 100 – 200
Temperatura [°C]	4	T1 – T2 – T3 – T4
Tiempo [h]	2	1 - 3

El valor de las temperaturas usadas para cada solvente varía dependiendo de su punto de ebullición como lo muestra la **Tabla 2-11**.

Tabla 2-11: Valores de los niveles de temperatura para cada solvente

Solvente	T1 [°C]	T2 [°C]	T3 [°C]	T4 [°C]
Metil etil cetona	25	40	55	70
Acetato de Etilo	25	40	55	70
Ácido Acético	25	60	90	110
Acetato de Butilo	25	60	90	110
Cloroformo	25	30	40	50

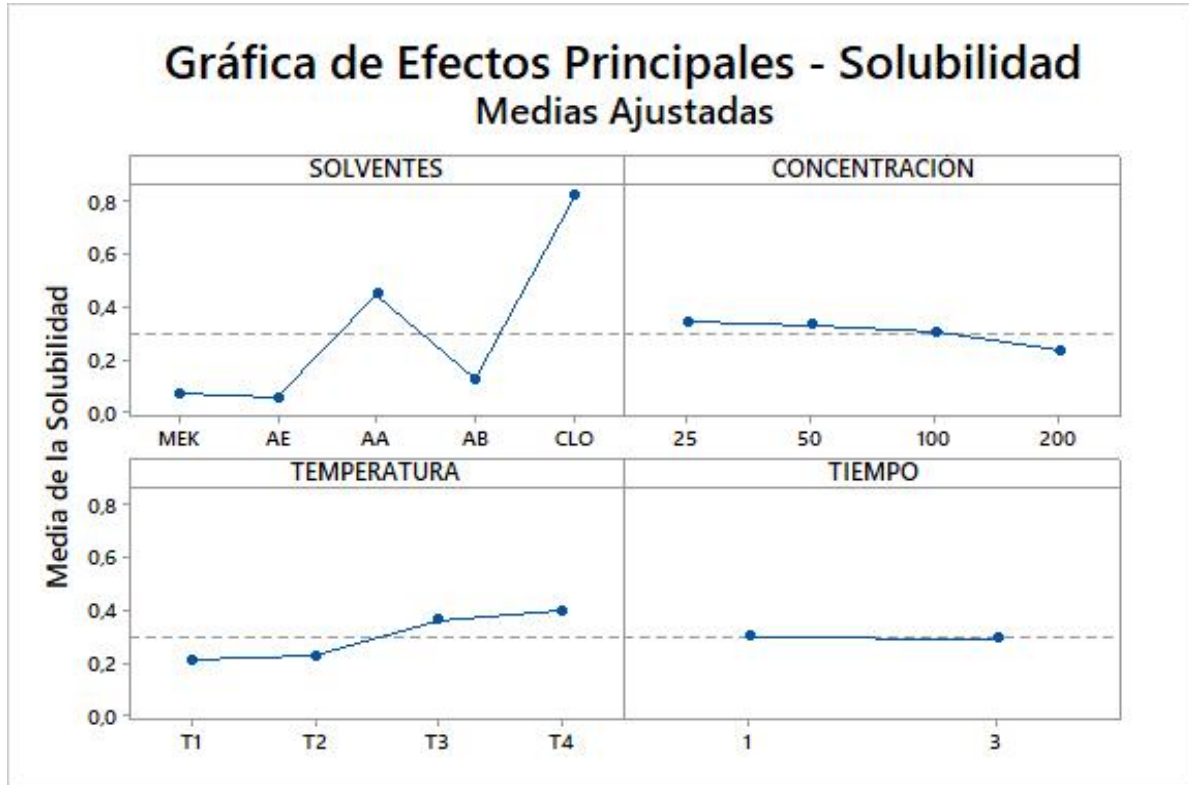
Teniendo en cuenta que en el diseño se incluyeron 3 réplicas de cada experimento, se obtuvieron un total de 480 experimentos necesarios para evaluar la solubilidad del polímero. En el Anexo C se pueden ver todos los experimentos realizados y el valor de solubilidad obtenido para cada uno de ellos. Los datos de solubilidad fueron analizados con el software estadístico Minitab, de esta manera se determinó que tan significativa era la influencia de cada uno de los factores evaluados sobre la variable respuesta, es decir la solubilidad. Fue posible determinar, que el tiempo del ensayo es la variable que menos influye de las evaluadas, debido a que los resultados obtenidos para los experimentos hechos con $t = 1h$ fueron muy similares a los hechos con $t = 3h$ como se muestra en la **Figura 2-12**. De esta gráfica también se puede concluir que en general, la solubilidad del P3HB en cualquier solvente aumenta al aumentar la temperatura o al disminuir la concentración de la solución. Adicionalmente, se puede ver que los valores más altos de

solubilidad fueron obtenidos para el cloroformo, seguido del ácido acético, luego el acetato de butilo, luego la metil etil cetona y por último el acetato de etilo.

La Por otra parte, se realizó una gráfica de intervalos para la solubilidad con respecto al tipo de solvente y concentración de la solución polimérica (**Figura 2-14**), en esta se puede ver que entre menor sea la concentración de la solución, mayor es la solubilidad obtenida. Las barras de error de las muestras con cloroformo son bajas debido a que la solubilidad del P3HB en el cloroformo no variaba significativamente con el cambio de la temperatura, mientras que las muestras tratadas con ácido acético y acetato de butilo si presentan errores aparentemente altos, pero esto se debe a que se hicieron evaluaciones a diferentes temperaturas, y en algunas se tuvo una alta solubilidad y en otras no. Adicionalmente, las barras de error de las muestras tratadas con acetato de etilo y de metil etil cetona son bajas, debido a que a ninguna temperatura se obtuvo una solubilidad mayor al 10%.

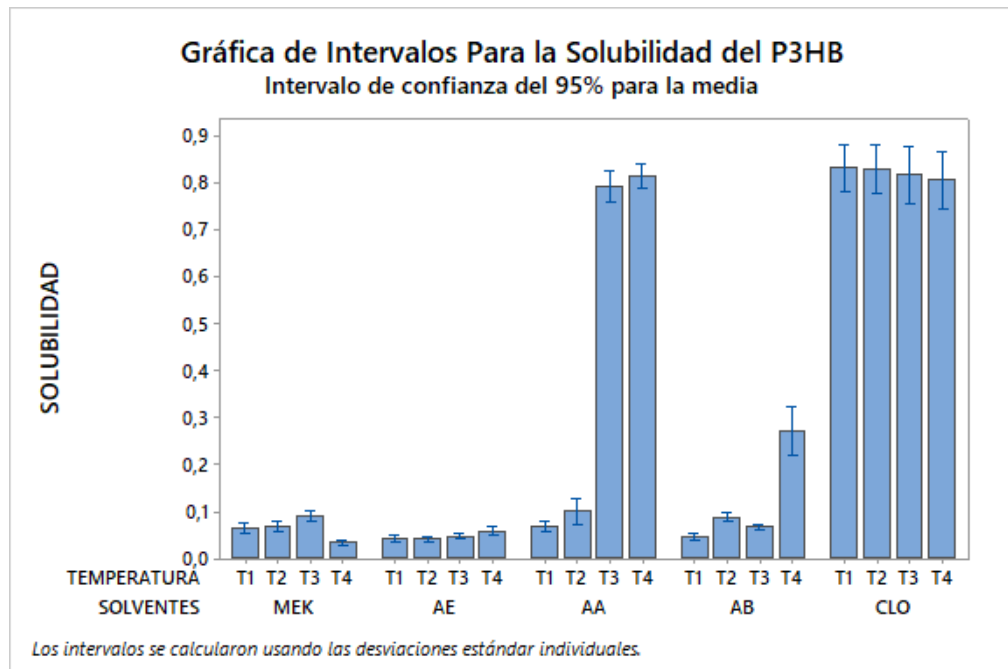
Figura 2-13 muestra las solubilidades obtenidas para cada solvente a cada temperatura, se puede ver que el ácido acético presenta una solubilidad similar a la del cloroformo en T3 y T4 (90°C y 110°C respectivamente), lo cual lo posiciona como un buen candidato para sustituir al cloroformo en el proceso de purificación. Adicionalmente, se puede apreciar que, a 110°C, el P3HB también es levemente soluble en el acetato de butilo, de resto, las demás combinaciones solvente/temperatura evaluadas obtuvieron valores de solubilidad cercanos o inferiores al 10%. También se puede concluir que la solubilidad del P3HB en el cloroformo no se ve muy afectada por la temperatura, pues a todas las temperaturas evaluadas esta se mantuvo cercana al 80%.

Figura 2-12 Grafica de efectos principales para la evaluación de la solubilidad del P3HB en diferentes solventes



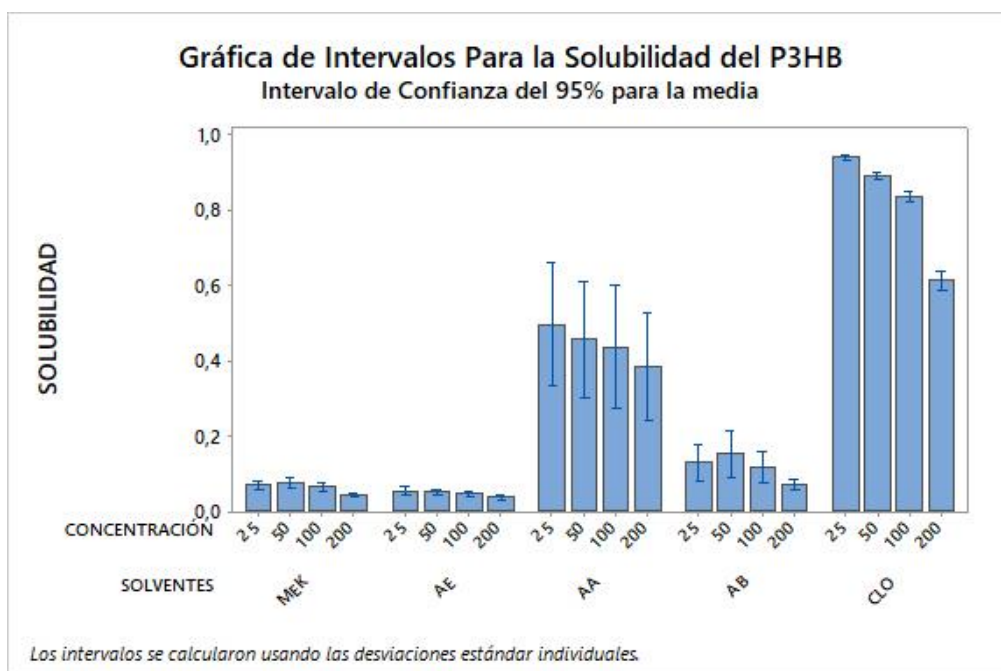
Por otra parte, se realizó una gráfica de intervalos para la solubilidad con respecto al tipo de solvente y concentración de la solución polimérica (**Figura 2-14**), en esta se puede ver que entre menor sea la concentración de la solución, mayor es la solubilidad obtenida. Las barras de error de las muestras con cloroformo son bajas debido a que la solubilidad del P3HB en el cloroformo no variaba significativamente con el cambio de la temperatura, mientras que las muestras tratadas con ácido acético y acetato de butilo si presentan errores aparentemente altos, pero esto se debe a que se hicieron evaluaciones a diferentes temperaturas, y en algunas se tuvo una alta solubilidad y en otras no. Adicionalmente, las barras de error de las muestras tratadas con acetato de tilo y de metil etil cetona son bajas, debido a que a ninguna temperatura se obtuvo una solubilidad mayor al 10%.

Figura 2-13 Gráfica de intervalos para la solubilidad del P3HB con respecto al tipo de solvente y la temperatura con intervalos de confianza del 95% para la media de la solubilidad.



Adicionalmente, se generaron graficas de contorno para la solubilidad del polímero en cada solvente teniendo en cuenta solo los factores de mayor influencia en la solubilidad, es decir la temperatura y la concentración. En estas gráficas es posible visualizar la combinación de concentración y temperatura que da como resultado una mayor solubilidad para cada solvente. Las regiones amarillas son las de mayor solubilidad.

Figura 2-14: Grafica de intervalos para la solubilidad del P3HB con respecto al tipo de solvente y la concentración con intervalos de confianza del 95% para la media de la solubilidad.



En la

Figura 2-15 se puede ver que la solubilidad del polímero en el ácido acético es de 80% por encima de los 90°C, y a concentraciones entre 25 y 100 g/L. Adicionalmente, se ve que el resultado para el ensayo de 1 hora es ligeramente mejor al ensayo de 3 horas pues en el de 1 hora la región de máxima solubilidad tiene un área mayor a la de 3 horas. El punto óptimo para la solubilización del polímero en P3HB es a 90°C, 100 g/L y 1 hora de incubación, pues es el que requiere menos tiempo, energía y materia prima de los puntos que estuvieron cercanos al 80% de solubilidad. La

Figura 2-16 muestra que el punto óptimo para el acetato de butilo es a 110°C y 50 g/L con una solubilidad del 45%. Para el acetato de etilo, la

Figura 2-17 muestra que a 70°C y 25 g/L se llega a la solubilidad máxima de 9%. La

Figura 2-18 muestra que el comportamiento del cloroformo es diferente al de los demás solventes pues la solubilidad no tiene una dependencia de la temperatura tan marcada como los otros solventes, la gráfica que permite concluir que en el cloroformo la solubilidad depende solo de la concentración de la solución, y que los puntos óptimos se encuentran a 25 y 50 g/L. Sin embargo, usar estas condiciones significaría un gasto de grandes cantidades de solvente, haciendo el proceso económicamente poco viable. Sin embargo, trabajando a 100 g/L se pueden llegar a obtener concentraciones de 80% o 85% dependiendo del tiempo de incubación. Por último, la **Figura 2-19** muestra que el punto óptimo de la metil etil cetona es a 60°C y 50g/L de concentración, cabe resaltar, la diferencia entre las áreas de las zonas de máxima solubilidad para este solvente, pues la gráfica muestra que cuándo el tiempo de incubación es de 3 horas, es posible obtener solubilidades altas a condiciones de menor temperatura y menor concentración.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyó que el mejor candidato para reemplazar al cloroformo en el proceso de extracción y purificación del biopolímero es el ácido acético a 90°C y 100 g/L con un periodo de incubación de 1 hora. Cabe resaltar, que cuándo la temperatura de la solución P3HB/AA cae por debajo de los 80°C, se forma un gel bastante estable que dificulta significativamente el proceso de filtración posterior a la extracción, por esta razón se recomienda llevar a cabo el proceso de filtración lo más rápido posible después de la extracción, para evitar que la solución se enfríe y se pueda procesar fácilmente.

Figura 2-15: Gráficas de contorno para la solubilidad del P3HB en ácido acético, concentración vs temperatura vs solubilidad. Izq. t=1h, Der t=3h

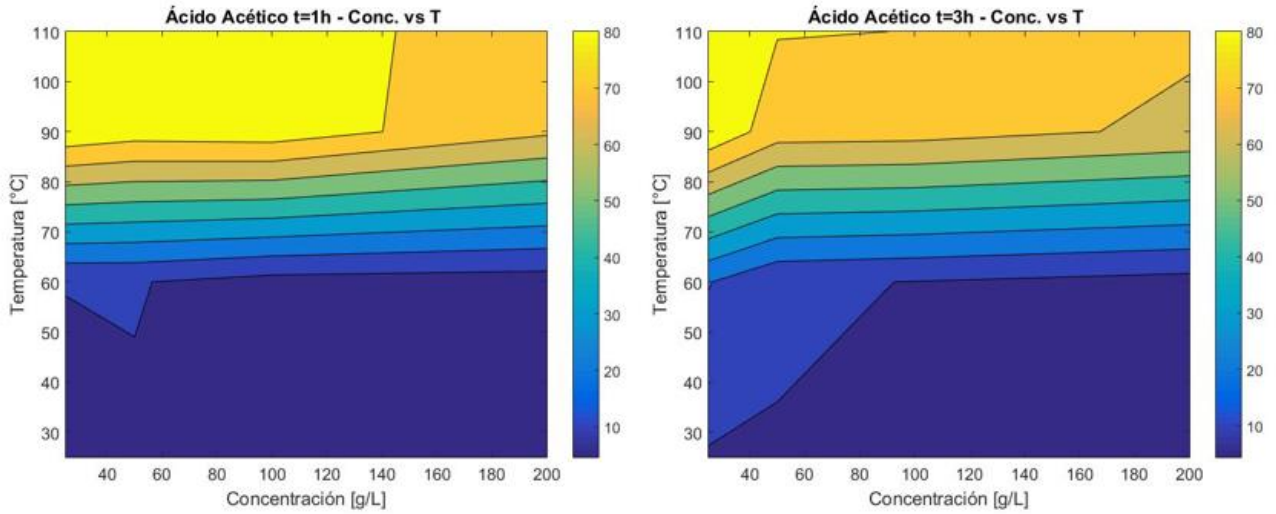


Figura 2-16: Gráficas de contorno para la solubilidad del P3HB en acetato de butilo, concentración vs temperatura vs solubilidad. Izq. t=1h, Der t=3h.

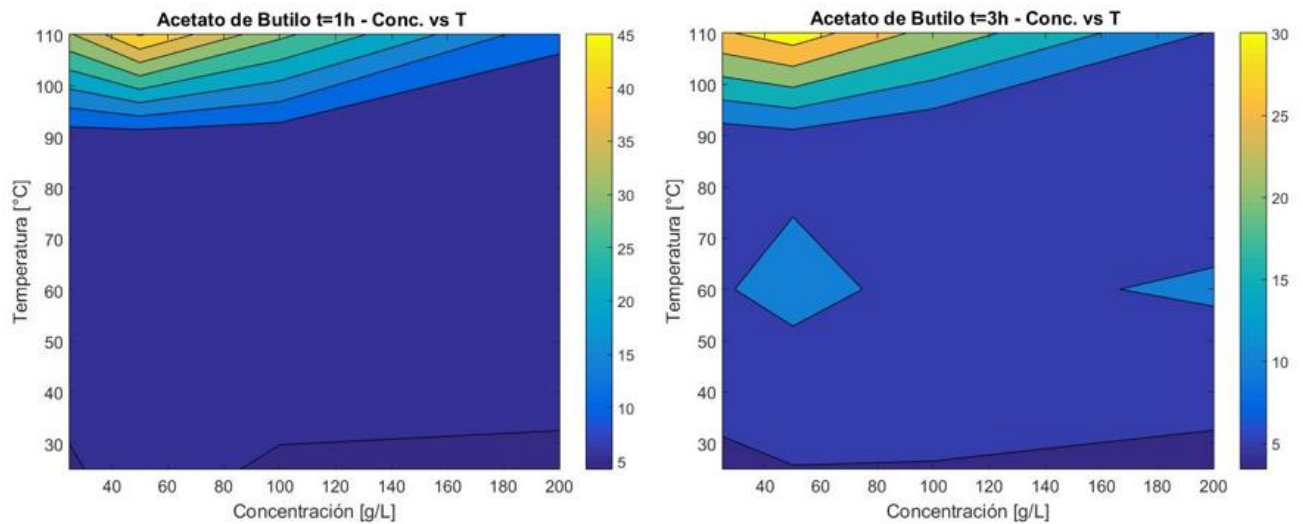


Figura 2-17: Gráficas de contorno para la solubilidad del P3HB en acetato de etilo, concentración vs temperatura vs solubilidad. Izq. t=1h, Der t=3h.

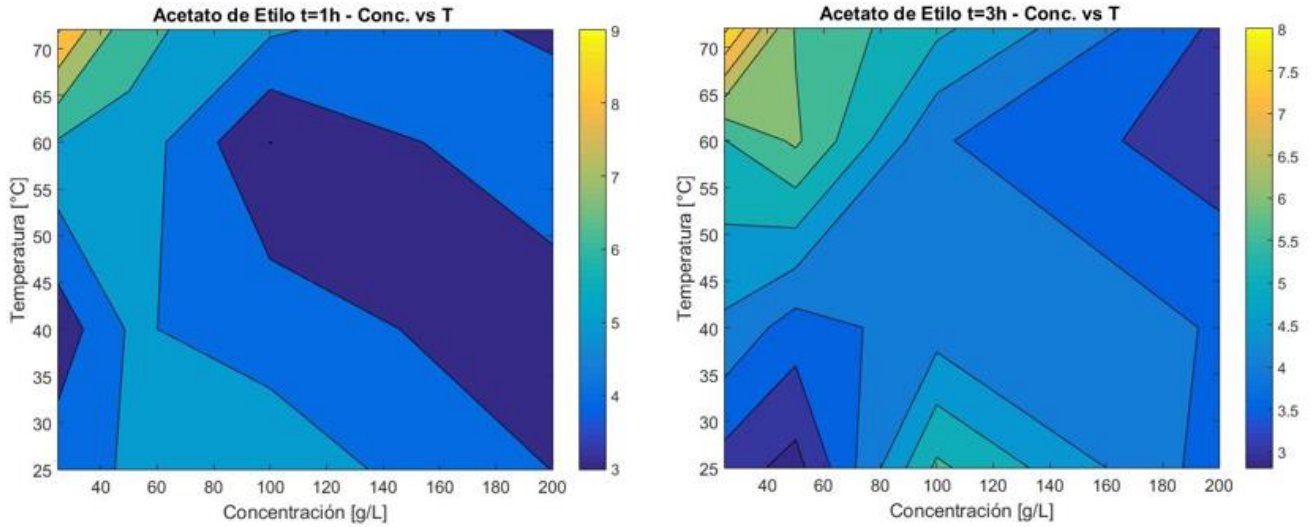


Figura 2-18: Gráficas de contorno para la solubilidad del P3HB en cloroformo, concentración vs temperatura vs solubilidad. Izq. t=1h, Der t=3h

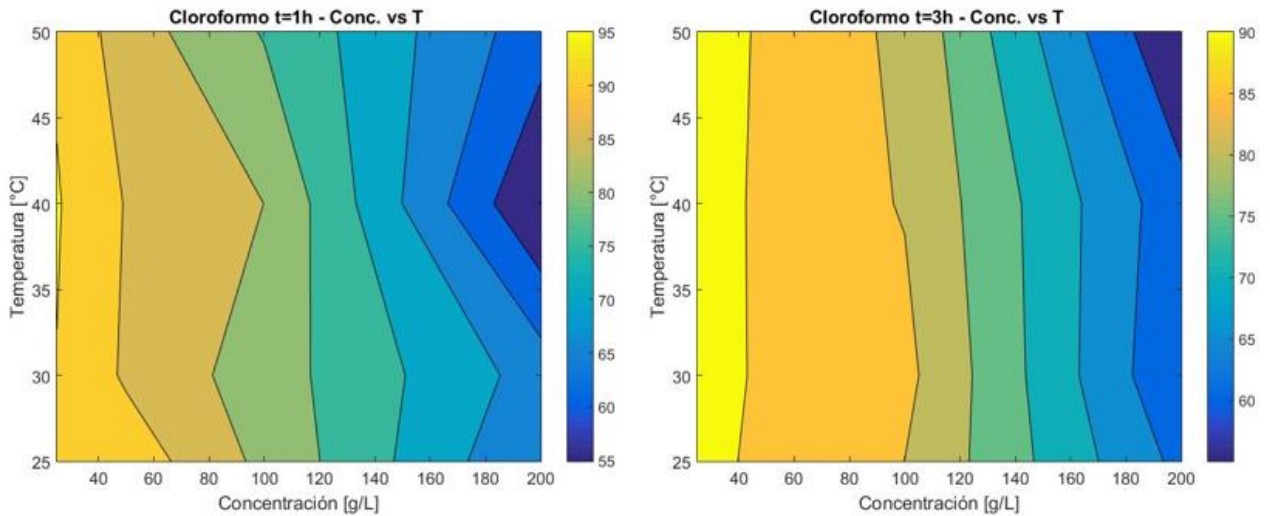
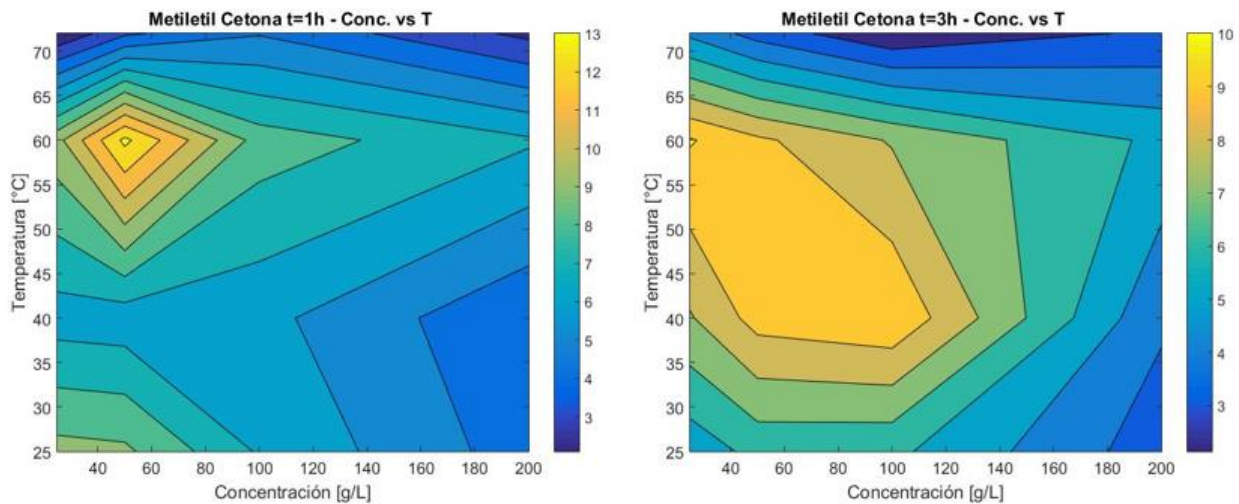


Figura 2-19: Gráficas de contorno para la solubilidad del P3HB en metil etil cetona, concentración vs temperatura vs solubilidad. Izq. t=1h, Der t=3h



2.2.5 Evaluación del proceso de extracción con solventes alternativos

Para evaluar el ácido acético como solvente para la extracción de P3HB se llevó a cabo el mismo procedimiento que se usa normalmente para la extracción con cloroformo a la temperatura y concentración determinadas como óptimas según los resultados obtenidos en el diseño experimental. Debido a la alta temperatura de ebullición del ácido acético (108.6°C a 570 mmHg) en comparación con la del cloroformo (47°C a 570 mmHg), se evaluó adicionalmente una técnica diferente al solvent casting para la recuperación del polímero, esta consiste en diluir la solución polimérica en un volumen igual de metanol, lo cual genera la rápida precipitación del polímero, y adicionalmente, evita el paso final del lavado con metanol. Después de la precipitación el material se seca a 60°C por 24 horas para eliminar los excesos de solvente, adicionalmente el metanol que queda en el sobrenadante se puede recuperar fácilmente mediante un proceso de destilación, lo cual requiere de un menor suministro energético que la evaporación del ácido acético para la purificación del polímero por solvent casting, debido a la diferencia en los puntos de ebullición de ambos solventes. El material de partida fue la biomasa seca de una fermentación de 100 L la cuál había sido previamente tratada con SDS, en la **Tabla 2-12** se ven los resultados obtenidos para la purificación del material con cloroformo, con ácido acético y metanol, y con ácido acético por solvent casting.

Tabla 2-12: Comparación entre la extracción con ácido acético precipitado con metanol (AA – MetOH), ácido acético y solvent casting (AA-S.C.) y cloroformo

	Cloroformo		AA – S.C.		AA-MetOH	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Biomasa Seca Inicial [g]	4.0060	4.0003	4.0080	4.0062	4.0127	4.0069
Polímero Obtenido [g]	2.4509	2.3347	2.1785	2.2131	2.0986	2.1877
Rendimiento [%]	61.2	58.4	54.4	55.2	52.3	54.6
Promedio [%]	59.8		54.8		53.4	
Recuperación [%]	100		91.6%		89.3%	

La diferencia obtenida entre las extracciones con cloroformo y ácido acético es de tan solo 6.4 puntos porcentuales para el tratamiento con metanol y 5 puntos porcentuales para el tratamiento con solvent casting, adicionalmente, el porcentaje de recuperación obtenido para las muestras tratadas con ácido acético es muy superior al reportado en la literatura de tan solo 36.7% para el P3HB obtenido mediante la fermentación de azúcares con *Cupriavidus necátor* [112], lo cual es un indicio de que el tipo de microorganismo usado en la fermentación es determinante a la hora de hacer la extracción. Asumiendo que la cantidad de polímero obtenido con el cloroformo es el 100% del polímero presente en la biomasa, se puede decir que el porcentaje de recuperación de P3HB obtenido mediante la extracción con ácido acético y metanol es de 89.3%, y la extracción con ácido acético por solvent casting de 91.6%.

Los materiales obtenidos fueron caracterizados para evaluar si había diferencias significativas en sus propiedades más importantes, en la **Tabla 2-13** se puede ver el peso molecular viscoso del polímero obtenido con cada uno de los tratamientos, el procedimiento para el cálculo del peso molecular se describe en el Anexo B. Los pesos moleculares obtenidos muestran que el tratamiento con ácido acético y solvent casting generan una degradación significativa del peso molecular viscoso, debido al contacto prolongado con la fuente de calor para la evaporación del solvente. Sin embargo, se puede evidenciar que la muestra tratada con ácido acético y metanol presenta un peso molecular viscoso ligeramente menor a la muestra obtenida con el cloroformo, lo que indica que los materiales tienen una calidad similar. La leve disminución en el peso molecular se puede deber a la temperatura a la cual se lleva a cabo el proceso de solubilización del polímero en el ácido acético (90°C) y a la duración del proceso (1 hora).

Tabla 2-13: Peso molecular viscoso del polímero obtenido con ácido acético precipitado con metanol (AA – MetOH), ácido acético y solvent casting (AA-S.C.) y cloroformo

SOLVENTE	PESO MOLECULAR VISCOSO [Da]
Cloroformo	8.97×10^5
AA-MetOH	8.31×10^5
AA-S.C	7.02×10^5

Estas muestras fueron caracterizadas térmicamente, la

Figura 2-20 muestra los resultados del análisis de TGA, se puede evidenciar que la muestra que presenta una mayor resistencia a la degradación térmica es la obtenida mediante el tratamiento con cloroformo, esto se debe a que es la que presenta un mayor peso molecular, adicionalmente, se puede ver que la muestra tratada con ácido acético y solvent casting presenta una degradación temprana y tiene un residuo de cerca del 7% de la masa inicial, indicando que la muestra solo estaba compuesta en aproximadamente un 93% por P3HB, el 7% restante corresponde a algún residuo o impureza. Los valores puntuales de la temperatura de degradación y el residuo final de cada muestra se encuentran en la **Tabla 2-14**.

La **Figura 2-21 - Derecha**, corresponde a la etapa de calentamiento del DSC, el pico que se ve corresponde al calor latente de fusión y la amplitud de este está directamente relacionada con la cristalinidad del polímero. Se puede evidenciar que en todas las muestras el fenómeno de fusión empieza y termina casi a la misma temperatura, indicando que no hay cambios significativos relacionados con el tratamiento, sin embargo, la amplitud de los picos si es diferente, indicando diferencias en los índices de cristalinidad de las muestras. En la **Figura 2-21 – Derecha** se ve que la muestra tratada con ácido acético y solvent casting presenta un comportamiento anómalo, correspondiente a un proceso endotérmico que con seguridad está relacionado con el residuo que reveló el ensayo de TGA. Adicionalmente, se estimó la temperatura de transición vítrea evaluando la temperatura a la cual se da un ligero cambio negativo de pendiente entre -2°C y 10°C . Por otro lado, la **Figura 2-21 – Izquierda** muestra que si existe una diferencia importante relacionada con la temperatura de cristalización entre las muestras tratadas con ácido acético y la tratada con cloroformo. La **Tabla 2-14** muestra las temperaturas de degradación, de fusión, de cristalización, de transición vítrea y la ventana de procesamiento de los materiales obtenidos de cada uno de los tratamientos evaluados.

Figura 2-20: TGA para las muestras de polímero purificado con los diferentes tratamientos

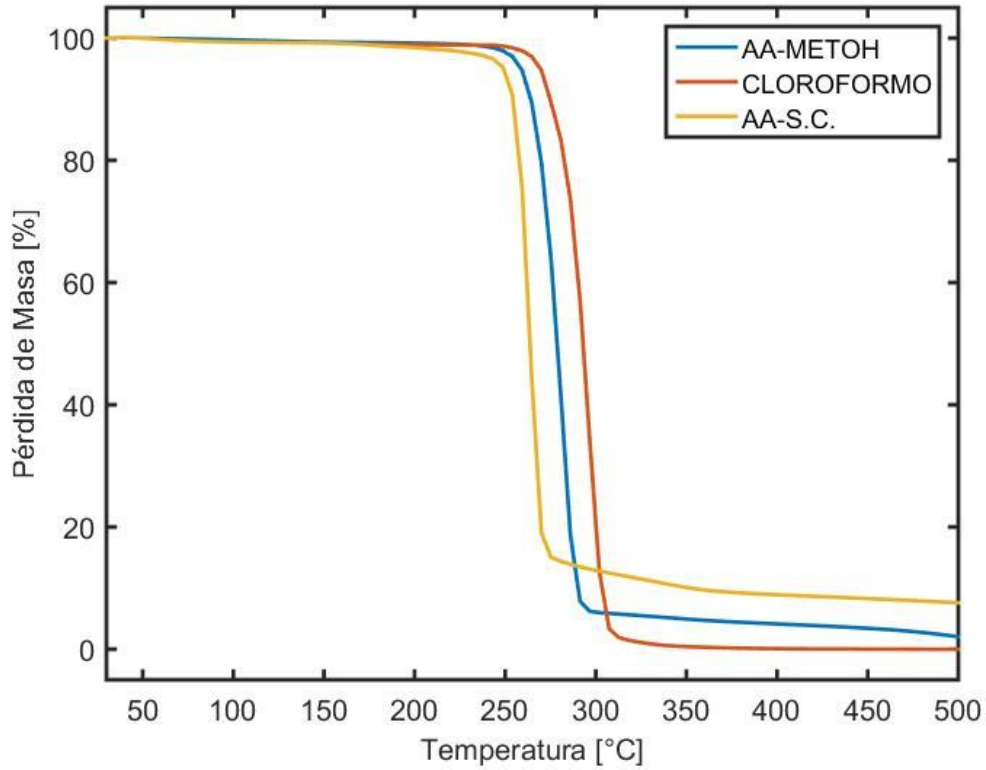


Figura 2-21: DSC para las muestras de polímero purificado con los diferentes tratamientos, Izquierda (Cristalización), Derecha (Fusión)

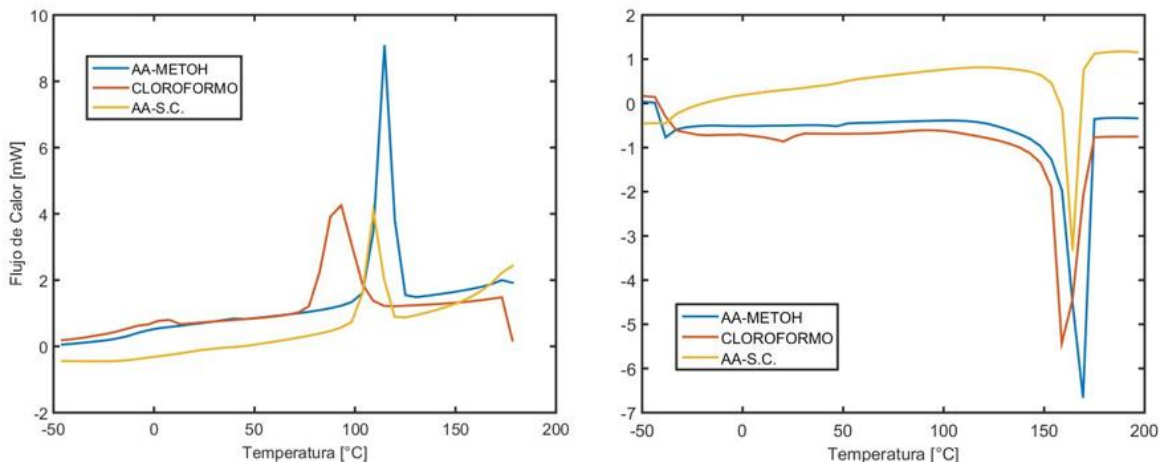


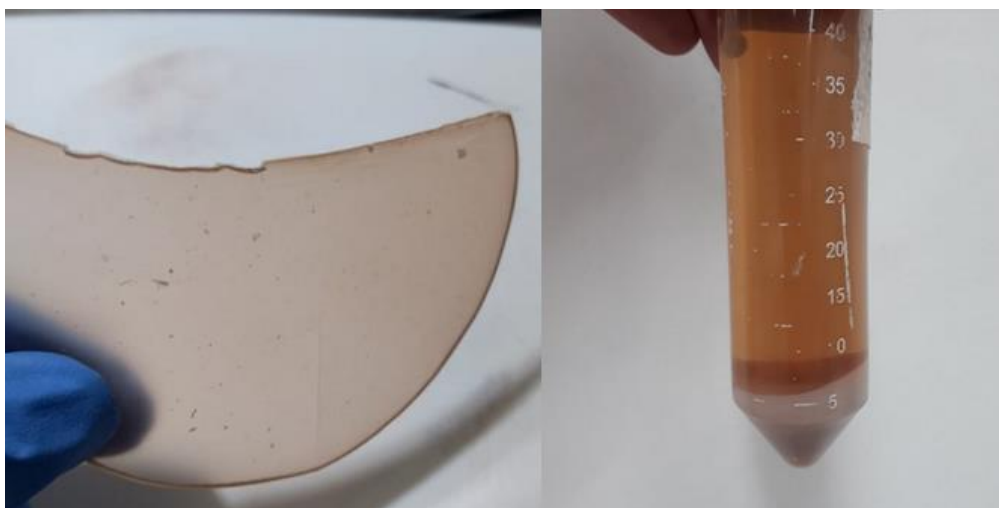
Tabla 2-14: Propiedades térmicas del P3HB según su tratamiento

T_d (temperatura de degradación), T_m (temperatura de fusión), T_g (temperatura de transición vítrea), T_c (temperatura de cristalización) y I.C (índice de cristalinidad)

SOLVENTE	T_d [°C]	Residuo [%]	T_m [°C]	T_g [°C]	T_c [°C]	I.C [%]
Cloroformo	264	0.011	143 -175	4.317	77.04 – 109.1	43.17
AA-MetOH	259	2.064	143 - 175	4.322	103.7-125.1	49.88
AA-S.C.	248.7	7.611	153.7-175.1	-	98.4 – 119.7	32.75

Los rangos de temperatura de fusión y cristalización presentados en la tabla son aquellos dónde empieza y termina el cambio significativo de la pendiente de cada pico, no fue posible determinar la temperatura de transición vítrea de la muestra tratada con ácido acético y solvent casting, debido a que la presencia de la impureza no permite evidenciar el cambio de la pendiente que se debe dar entre -3°C y 7°C. Sin duda alguna, el producto de peor tratamiento es el obtenido con el ácido acético con solvent casting, la temperatura de degradación es baja debido a la pérdida de peso molecular y el porcentaje de residuo es alto. La muestra obtenida mediante el tratamiento con ácido acético y precipitación con metanol presenta propiedades similares a las de la muestra obtenida con cloroformo, lo que demuestra que es posible obtener polímero con buena calidad y en un rendimiento similar sin usar solventes halogenados de alta toxicidad como el cloroformo. El tratamiento con ácido acético y metanol es una muy buena opción para la purificación del polímero a escala semi industrial. En la **Figura 2-22** se pueden ver una película obtenida por solvent casting con ácido acético y el polímero precipitado con metanol.

Figura 2-22: (Izq.) Película polimérica obtenida con ácido acético y solvent casting. (Der.) Polímero extraído con ácido acético y precipitado con metanol.



2.2.6 Evaluación de la precipitación del polímero con etanol

Cuando se agrega un solvente orgánico y levemente polar como el etanol o la acetona a una solución acuosa de proteínas, como el medio de cultivo, se producen agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar.

Tabla 2-15: Resultados de la evaluación de la precipitación de la biomasa con etanol.

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
%EtOH (v/v)	0	0	0	0	0	10	30	50	70	90
%Agua (v/v)	10	30	50	70	90	0	0	0	0	0
% PHB caldo (v/v)	90	70	50	30	10	90	70	50	30	10
Sólidos secos (gr)	0,139	0,084	0,194	0,125	0,058	0,196	0,246	0,626	0,558	0,202
Sólidos precipitados (%)	6,64	5,12	16,6	17,9	24,8	9,3	15	53,5	79,5	86,3

Este efecto se debe principalmente a que el solvente presenta una constante dieléctrica menor a la del agua, lo cual produce un incremento de atracción entre las cargas opuestas, una reducción en el grado de ionización de los radicales de la proteína y en consecuencia una disminución de la solubilidad de esta [117]. Como la biomasa que contiene el polímero presenta una membrana celular rica en proteínas, es posible precipitarla utilizando este tipo de solventes. La **Tabla 2-15** Cuando se agrega un solvente orgánico y levemente polar como el etanol o la acetona a una solución acuosa de proteínas, como el medio de cultivo, se producen agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar.

Tabla 2-15 muestra las diferentes relaciones solvente/medio de cultivo estudiadas, y la cantidad de sólidos precipitados en cada uno de los experimentos. La **Figura 2-23** muestra el fenómeno de precipitación en cada uno de los experimentos.

Figura 2-23: Resultados del experimento de precipitación de biomasa con etanol

El porcentaje de sólidos precipitados se calculó usando la cantidad total de sólidos en el medio de cultivo, igual a 11.7 g/L. La precipitación con etanol es significativamente más efectiva que la precipitación con agua, durante el proceso se puede observar como el solvente toma una coloración amarillenta, lo cual es una prueba de que las impurezas presentes en la biomasa se solubilizan en el etanol. Los resultados obtenidos para los experimentos con concentración de etanol de 70% y 90% muestran buenos niveles de precipitación de 79.5% y 86.3% respectivamente. Sin embargo, la cantidad de solvente requerida es muy alta, por ejemplo, para precipitar la biomasa de una fermentación de 60 L se necesitarán 140 L de etanol para llegar a una relación 30/70 y 540 L para una relación 10/90. La recuperación del solvente, por las cantidades involucradas, requiere de una energía significativa lo cual afecta negativamente la viabilidad económica del proceso.

2.2.7 Formulación de un proceso de extracción y purificación

A continuación, se hace una breve descripción de las seis rutas de proceso evaluadas, las cuales se pueden ver en la **Figura 2-3**. La ruta 3 (precipitación con etanol) se descartó debido a los altos volúmenes de solventes necesarios para la purificación.

- **Ruta 1: Centrifugación/Secado/Ácido Acético/Metanol**
- **Ruta 2: Centrifugación/Secado/Cloroformo/Metanol**
- **Ruta 4: SDS/ Centrifugación/Secado/Ácido Acético/Metanol**
- **Ruta 5: SDS/ Centrifugación/Secado/Cloroformo/Metanol**

- **Ruta 6: SDS/ Centrifugación/Secado/Metanol/Cloroformo**

La **Tabla 2-16** muestra los resultados obtenidos para los tratamientos mencionados, las rutas de proceso 1 y 2 demuestran que la digestión con SDS cumple un papel muy importante en el proceso, pues sin esta el rendimiento disminuye hasta 20 puntos porcentuales.

Tabla 2-16: Resultado de la evaluación de diferentes rutas de proceso.

Ruta de Proceso	Ensayo	Biomasa Inicial	Polímero Obtenido	Rendimiento
1	1	4,0580	1,606	39,57%
	2	4,015	1,679	41,81%
	PROMEDIO			40,69%
2	1	4,0328	1,382	34,26%
	2	4,0271	1,417	35,20%
	PROMEDIO			34,73%
4	1	4,0127	2,099	52,30%
	2	4,0069	2,188	54,60%
	PROMEDIO			53,45%
5	1	4,0060	2,451	61,20%
	2	4,0003	2,335	58,40%
	PROMEDIO			59,80%
6	1	4,0320	1,842	45,69%
	2	4,0270	1,736	43,12%
	PROMEDIO			44,41%

Adicionalmente, los materiales obtenidos por estos métodos poseían un color amarillento aún después de haber sido tratados con el metanol, indicando la presencia de algún tipo de residuo proveniente de la fermentación. Por otro lado, en la ruta de proceso 6 se evaluó realizar primero la limpieza con metanol y posteriormente la purificación con cloroformo; se puede ver que el rendimiento también se redujo con respecto al procedimiento convencional (ruta 5), lo que puede significar que el tratamiento con metanol reduce de alguna manera la solubilidad del polímero en el cloroformo o que una fracción de polímero es retirada por el metanol. El metanol cumple con la función de eliminar la capa lipídica que recubre los gránulos de P3HB, es posible que la presencia de esta membrana esté relacionada con una alta solubilidad del polímero en el cloroformo, y que eliminarla antes

del proceso de purificación sea contraproducente pues la solubilidad del polímero se ve reducida.

Sin duda alguna, las rutas de procesamiento más prometedoras para la extracción son la ruta 4 y la ruta 5. En el futuro será necesario hacer un estudio sobre el escalamiento de ambos procesos evaluando las ventajas y desventajas de cada uno. La ruta 5 tiene una ventaja importante y es que tiene un mayor rendimiento, y el polímero obtenido con esta presenta las mejores propiedades térmicas, sin embargo, es necesario usar volúmenes importantes de cloroformo, el cuál es costoso y altamente tóxico, sin embargo, al llevar a cabo esta ruta de proceso fue posible recuperar cerca del 80% del cloroformo usado mediante un proceso de destilación a 50°C. Por otro lado, la ruta 6 presenta la ventaja de que no es necesario usar cloroformo en el proceso, en vez de este se usa ácido acético, el cuál es un solvente con una toxicidad significativamente inferior, haciendo el proceso ambientalmente más sostenible y seguro para el ser humano. Sin embargo, la recuperación del solvente requiere de altas cantidades de energía debido al alto punto de ebullición del ácido acético, de hecho, se puede dar el escenario en el cuál la ventaja económica obtenida al usar ácido acético en vez de cloroformo se vea opacada debido a la energía necesaria para la recuperación del solvente.

Con ambos procesos se hizo una aproximación inicial al tratamiento de grandes cantidades de biomasa (más de 100 gr) y en ambos casos el rendimiento del proceso disminuyó cerca de 10 puntos porcentuales. Al llevar el proceso a una escala superior las etapas de filtración se vuelven un cuello de botella debido a que el embudo de filtración y la bomba de vacío no tienen las dimensiones adecuadas para tratar tales volúmenes de material, haciendo que se pierdan cantidades importantes de material en el proceso, y que aumente significativamente el tiempo de la operación. Para solucionar el problema es necesario adquirir un filtro de mayor capacidad, o inclusive un sistema de filtración completamente diferente como un filtro de hojas. Sin embargo, para la ruta de proceso número 5 se reemplazó el proceso de filtración por un proceso de decantación, entonces, la solución polimérica con la biomasa suspendida se deja decantar por 6 horas en un decantador obteniendo dos fases bien diferenciadas, una fase líquida compuesta de la solución P3HB/cloroformo, y una fase sólida compuesta principalmente por biomasa. De esta manera fue posible tratar grandes cantidades de material de una manera sencilla. Esta modificación al proceso no se puede aplicar a la ruta que usa ácido acético en vez de

cloroformo, debido a que cuando la solución ácido acético / P3HB se enfría por debajo de 70°C, sus características reológicas cambian significativamente, convirtiéndose en un gel semisólido incapaz de fluir a través de un decantador, para poder hacer purificaciones con esta metodología en una escala superior, es necesario adquirir un sistema de filtración rápido y eficiente, que permita filtrar la solución antes de que esta se enfríe.

3 Capítulo 3: Caracterización del P3HB producido por *Burkholderia cepacia* B27

Con el objetivo de conocer a fondo las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del material y así sus posibles aplicaciones, se hizo una caracterización completa del biopolímero producido por *Burkholderia cepacia* B27 en fermentaciones de 100 L. El material fue purificado usando el procedimiento estandarizado con SDS y Cloroformo mostrado en el capítulo anterior, se determinó el índice de cristalinidad, la temperatura de fusión, la temperatura de degradación, el peso molecular viscoso, la biodegradabilidad y la elongación máxima y la tensión de rotura del biopolímero. Por lo general, es necesario mezclar el P3HB con algún aditivo para obtener un material con propiedades funcionales, pero partir de un P3HB con buenas propiedades mecánicas y fisicoquímicas es esencial.

3.1 Metodología

3.1.1 Purificación del P3HB

El P3HB fue producido en un biorreactor de 100L con un volumen efectivo de 60L con *Burkholderia cepacia* B27 y usando ácidos grasos como fuente de carbono durante 72 horas. Después de las 72 horas el reactor se esterilizó con vapor, llevándolo a 121°C por 1 hora, posteriormente se enfrió hasta 80°C y se añadieron 0.55 mL de SDS al 20% por gramo de biomasa para la digestión química, la temperatura se mantuvo a 80°C por una hora para finalmente llevarlo a temperatura ambiente. El caldo fermentado se extrajo del reactor y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos para concentrar la biomasa, posteriormente, la solución concentrada y altamente viscosa se secó en un horno de bandejas a 60°C por 24 horas y luego se molió para obtener un polvo marrón con un tamaño de partícula medianamente homogéneo.

La biomasa seca se mezcló con cloroformo usando una relación de 8 ml de solvente por gramo de biomasa, y se dejó en agitación a temperatura ambiente por 1 hora, posteriormente se decantó y se obtuvieron dos fases, una fase sólida y menos densa, rica en biomasa y una solución P3HB – cloroformo de alta densidad. La solución polimérica se destiló a 50°C para recuperar el cloroformo. El polímero obtenido se lavó con metanol para remover los residuos de aceite usando 10 mL de solvente por gramo de biomasa y finalmente se secó a 60°C por 24 horas para obtener un polímero de alta pureza.

3.1.2 Análisis Térmico

Las metodologías empleadas para el análisis térmico se encuentran en el **Anexo A**, para este caso en particular, se caracterizó el P3HB purificado usando cloroformo y metanol, y se compararon los resultados con los obtenidos de la muestra comercial de Sigma Aldrich.

3.1.3 Ensayo de Biodegradabilidad

3.1.3.1 Ajuste de la humedad del compost.

Los ensayos de biodegradabilidad se realizaron con base en la norma ASTM D5988 (Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in Soil). El ensayo consiste en enterrar el polímero en un suelo biológicamente activo y determinar la cantidad de CO₂ que este libera producto de la biodegradación del material. Para esto es necesario ajustar la humedad del compost como lo indica la norma y posteriormente determinar la cantidad de CO₂ producido por este en ausencia de polímero para determinar la concentración del KOH que se usará para capturar el CO₂ liberado.

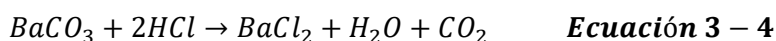
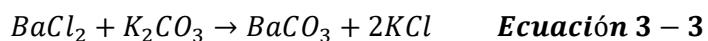
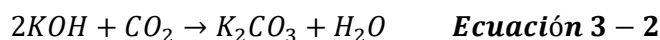
Inicialmente se tamizó el compost usando una malla de cribado para retirar sólidos de gran tamaño y grumos. Se dejaron 6 tubos de ensayo secados en un horno a 60°C por 24 horas, posteriormente, se pesaron en la balanza analítica y se les agregó aproximadamente 1g de compost previamente tamizado a cada uno. Se pesaron nuevamente y la diferencia entre el peso inicial del tubo y el nuevo peso, es la cantidad de compost que se le agregó. Los tubos con compost se dejaron en el horno a 60°C, y se monitoreó el peso cada 24 horas hasta llegar a peso constante. Se asume que el peso es constante cuando la diferencia de masa entre la última medición y la anterior es menor a 20 mg. La diferencia de masa entre el tubo con compost antes del secado en el horno, y el tubo con compost después del secado es la cantidad de humedad retirada del compost:

$$\%H = \frac{m_{humeda} - m_{seca}}{m_{humeda}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3 - 1}$$

La humedad total del compost se tomó como el promedio de la humedad de los 6 ensayos. Posteriormente, fue necesario llevar la humedad del compost hasta 90% para cumplir con los requerimientos de la norma ASTM D5988, para esto se estableció una relación entre la masa de compost y la masa de agua, y se determinó la masa de agua necesaria para llegar a un 90% de humedad usando agua destilada.

3.1.3.2 Determinación del dióxido de carbono producido por el compost.

Una vez determinada y ajustada la humedad del compost, se debe evaluar la cantidad de CO₂ producida por este sin polímero para determinar la concentración de la solución de KOH que se va a usar, con el fin de evitar que esta se sature rápidamente, y que se puedan hacer las mediciones de CO₂ cada 3 días aproximadamente. Para esto inicialmente se tamizó el compost con una malla gruesa, de esta manera se obtiene un compost homogéneo sin sólidos grandes. Posteriormente, se pusieron 90 gramos del compost tamizado en frascos de vidrio iguales, se prepararon 3 soluciones de KOH a 0.01 M, 0.05 M y 0.1 M, se llenaron 9 viales con 10 mL de la solución, 3 por cada concentración, se introdujeron en los frascos y se dejaron a 30°C por 3 días. Posteriormente, se añade 1 mL de una solución 0.1M de cloruro de bario (BaCl₂) para precipitar el carbonato de potasio que se formó por el dióxido de carbono liberado. Finalmente, se titula la solución de KOH con HCL 0.01 M usando fenolftaleína como indicador hasta llegar al punto de equilibrio. A continuación, se pueden ver las reacciones químicas involucradas en el ensayo.



3.1.3.3 Montaje de los ensayos de biodegradación.

Finalmente, Se montaron 19 ensayos diferentes en recipientes de vidrio con tapa metálica. Cada recipiente lleva 90 gramos de compost y 320 mg de polímero (en polvo o en película), según la norma se deben agregar 1000 mg de carbono por cada 500 g de compost, la cantidad de carbono se calculó usando la fórmula estructural del P3HB, y estableciendo

una relación entre la masa total de la muestra y su contenido de carbono como se muestra en la **Ecuación 3 – 5**:

$$P3HB = (C_4H_6O_2)_n \rightarrow M_w = 86 \times n \quad \text{Ecuación 3 – 5}$$

El peso molecular de la unidad monomérica del P3HB es de 86 g/mol, de este el 55% aproximadamente corresponde a los 4 carbonos, de esta manera se puede decir que el 55% en masa de cada muestra corresponde al carbono de esta. De esta manera, si se sabe que por cada 500 g de compost se deben agregar 1000 mg de carbono, se determina que para 90 g de compost que es lo que lleva cada recipiente, se deben agregar 180 mg de carbono, es decir 320 mg de muestra.

Todos los recipientes contaban además con un vial de 30 mL lleno con 20 mL de una solución de KOH, la concentración del KOH usada inicialmente fue de 0.15M. Cada recipiente se dejó en el cuarto de 30°C. Cada 3 días se monitorea la cantidad de CO₂ producido titulando la solución de KOH con HCl 0.06 M hasta el punto de viraje con fenolftaleína. La solución es antes mezclada con una solución 0.1M de BaCl₂ con el objetivo de precipitar especies químicas que pueden llegar a afectar la medición. Las soluciones usadas para la titulación y para los ensayos son estandarizadas usando el potenciómetro o un patrón primario como el biftalato de potasio.

Una vez se hace la titulación de la solución de KOH de una de las muestras, se deja destapada durante 10 minutos, se renueva la solución de KOH y se vuelve a dejar el recipiente a 30°C por otros 3 días. El proceso continúa hasta llegar a los 180 días de ensayo. La cantidad de CO₂ producido se calcula teniendo en cuenta las relaciones estequiométricas mostradas anteriormente.

De cada muestra se hacen 2 réplicas de 1 o 2 mL dependiendo de la disponibilidad de ácido clorhídrico, después se hace un promedio del volumen de HCL usado para las 2 titulaciones de cada réplica. Con este volumen promedio y la concentración de HCL se hallan las moles necesarias para llevar la solución de KOH al punto de viraje de la fenolftaleína, y finalmente, conociendo la concentración inicial del KOH y sabiendo que la relación entre las moles de HCl y KOH es de 1:1, se pueden calcular las moles de KOH consumidas y posteriormente las moles de CO₂ que se disolvieron en la solución alcalina.

3.1.4 Tensión de Rotura

Los ensayos mecánicos para determinar la tensión de rotura del material se hicieron de acuerdo con la norma ASTM 882 (“Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting”), en la cual se determina la tensión de rotura y la elongación máxima de un polímero usando probetas rectangulares hechas por moldeo de compresión de 12 cm x 1 cm. Las películas se condicionaron para los ensayos de acuerdo con la norma, y se dejaron a 25°C durante 40 horas.

Los ensayos se hicieron en una máquina universal SHIDMADZU AG-IS 250kN en el laboratorio de polímeros de la universidad nacional de Colombia, y los datos fueron obtenidos y analizados usando el software TRAPEZIUM. La separación de las pinzas fue de 7 cm, y la velocidad de desplazamiento de estas fue de 0.5mm/min. Se hicieron 3 ensayos en total y el resultado obtenido es el promedio de estos.

3.1.5 Peso Molecular Viscoso

El peso molecular viscoso (M_v) se calcula usando la correlación de Mark-Howink-Sakurada (MHK) en la cual se relaciona la viscosidad intrínseca del polímero en solución con su peso molecular como se muestra en la **Ecuación 3 – 6**:

$$[\eta] = K(M_v)^a \quad \text{Ecuación 3 – 6}$$

Dónde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca y K y a son los parámetros MHK los cuales se determinan experimentalmente y dependen de la temperatura y del sistema polímero – solvente que se está estudiando. En la se muestran los parámetros MHK para el P3HB en cloroformo a 30°C obtenido experimentalmente por diferentes autores.

Tabla 3-1: Parámetros de Mark - Houwink - Sakurada para soluciones P3HB - Cloroformo a 30°C

$K \times 10^3 [mL g^{-1}]$	a	Referencia
7,7	0,82	[118]
11,8	0,78	[119]
16,6	0,76	[119]

La determinación de la viscosidad intrínseca para el cálculo del peso molecular viscoso se hace midiendo el tiempo de elución de soluciones poliméricas a distintas concentraciones a través de un capilar de vidrio. Este tipo de mediciones por lo general se hacen en viscosímetros tipo Ubbelohde o Cannon-Fenske, y son metodologías más económicas y sencillas para la determinación del peso molecular de un polímero que aquellas usadas convencionalmente como la cromatografía de permeación de gel (GPC).

El principio detrás de esta metodología de medición de peso molecular es la ley de Poiseuille, que dice que el tiempo de elución de una solución a través del capilar es proporcional a la viscosidad de esta. Adicionalmente, la viscosidad aumenta a medida que aumenta la concentración de la solución. Teniendo esto en cuenta, el tiempo de flujo de la solución polimérica será proporcional a la viscosidad de la solución e inversamente proporcional a la densidad de esta como lo muestran las ecuaciones 3 – 7 y 3 – 8:

$$t_{sol} = \frac{\eta_{solv}}{\rho_{solv}} \quad \text{Ecuación 3 – 7}$$

$$t_{sp} = \frac{\eta_{sp}}{\rho_{sp}} \quad \text{Ecuación 3 – 8}$$

Dónde el subíndice *solv* hace referencia al solvente puro y el subíndice *ps* a una solución polimérica. Adicionalmente, se definen las siguientes relaciones que son de gran utilidad para la determinación de la viscosidad intrínseca:

$$\eta_r = \text{Viscosidad Relativa} = \frac{\eta_{ps}}{\eta_{solv}} \quad \text{Ecuación 3 – 9}$$

$$\eta_{sp} = \text{Viscosidad Específica} = \frac{\eta_{ps} - \eta_{solv}}{\eta_{solv}} = \eta_r - 1 \quad \text{Ecuación 3 – 10}$$

$$\eta_{red} = \text{Viscosidad Reducida} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad c \rightarrow \text{Concentración de la solución} \quad \text{Ecuación 3 – 11}$$

Cuando la concentración de las soluciones poliméricas es baja se puede asumir que $\rho_{ps} \approx \rho_{solv}$, y se puede obtener la siguiente relación:

$$\eta_r = \frac{t_{ps}}{t_{solv}} \quad \text{Ecuación 3 – 12}$$

Existen dos métodos principales para la obtención la viscosidad intrínseca, el de Huggins que consiste en extrapolar la viscosidad reducida a una concentración de 0 como muestra la **Ecuación 3 – 13**:

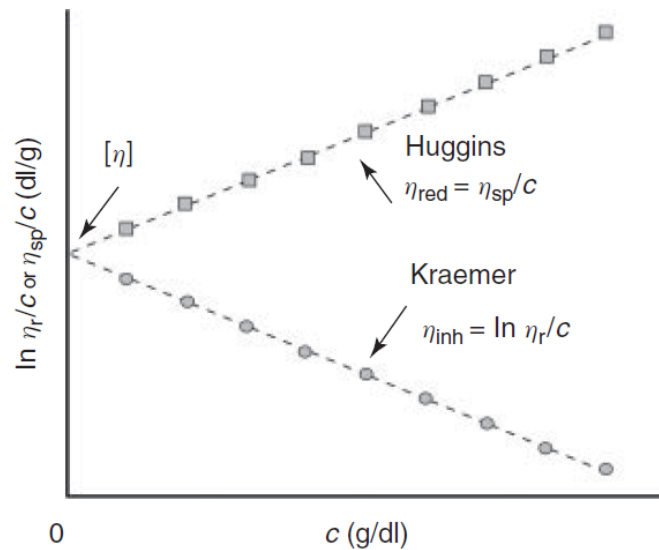
$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red} \quad \text{Ecuación 3 – 13}$$

La segunda aproximación es la de Kramer, el cual define un nuevo término llamado viscosidad inherente, y la viscosidad intrínseca es el límite de esta cuándo la concentración tiende a 0.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \ln \frac{\eta_r}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \ln \eta_{inh} \quad \text{Ecuación 3 – 14}$$

La **Figura 3-1** muestra gráficamente como se hace el cálculo de la viscosidad intrínseca usando las dos aproximaciones mencionadas anteriormente.

Figura 3-1: Diagrama ilustrativo de la estimación de la viscosidad intrínseca mediante la metodología de Huggins y la metodología de Kramer



Para que se pueda calcular el peso molecular por este método es necesario que las soluciones poliméricas se encuentren a concentraciones muy bajas, pues de lo contrario el comportamiento no sería lineal.

Las soluciones se preparan diluyendo pequeñas cantidades de polímero en cloroformo mediante agitación magnética por al menos una hora, se deben preparar 4 soluciones

diferentes con una concentración máxima de 3 mg/mL, sin embargo, este valor puede variar dependiendo del polímero que se vaya a estudiar. Una vez preparada la solución, se hace pasar por el capilar y se mide el tiempo que tarda la columna de líquido en pasar desde una marquilla hasta otra. Todo el proceso debe hacerse en un baño temperado para mantener la temperatura constante durante todas las mediciones pues la viscosidad de las soluciones es dependiente de la temperatura y un cambio de temperatura entre dos muestras puede afectar significativamente el resultado obtenido.

3.1.6 FTIR – Espectrometría Infrarroja Con Transformada de Fourier

La espectrometría infrarroja se usa para obtener el espectro infrarrojo de absorción de un sólido un líquido o un gas. En la técnica se envía un haz de radiación infrarroja a una muestra, parte de esta radiación es absorbida y otra parte es transmitida a un receptor, de esta manera se construye la huella digital de la muestra y permite identificarla debido a la señal obtenida. En la señal se obtienen varios picos con diferentes amplitudes y a diferentes longitudes de onda dependiendo de los grupos funcionales y la cantidad de estos en la muestra. El espectro infrarrojo del P3HB tiene varios picos característicos y se muestran en la **Tabla 3-2** [120].

Tabla 3-2: Frecuencias características de absorción infrarroja del P3HB [120]

Frecuencia [cm^{-1}]	Intensidad Relativa	Interpretación	Polaridad
2990	Baja	CH_3	\perp
2960	Media	CH_2	\perp
2930	Media	CH_3	\perp
2860	Baja	CH_2	—
1730	Alta	$C = O$	\parallel
975	Media	—	\perp

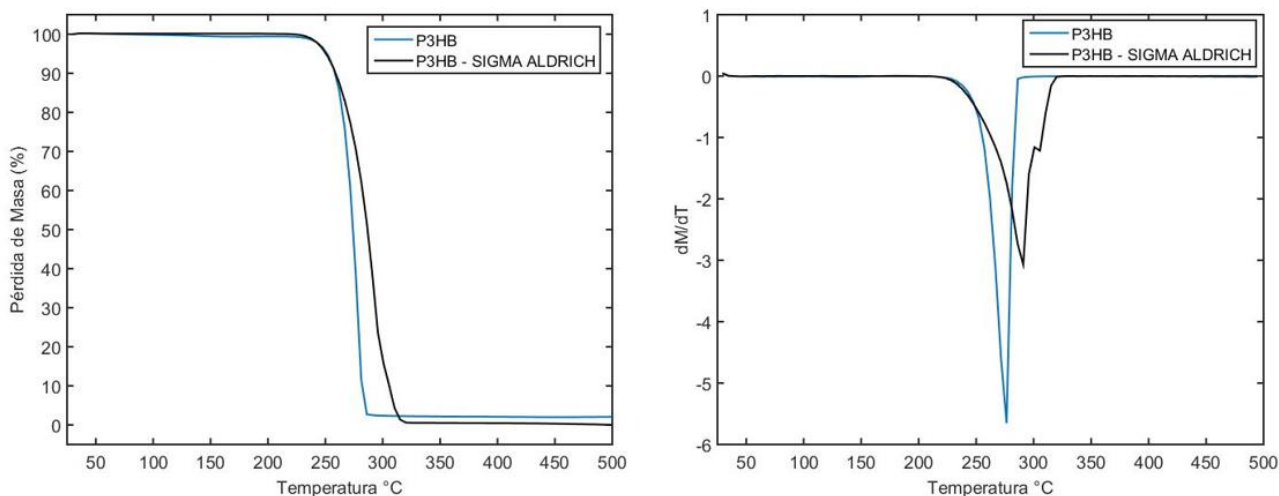
3.2 Análisis y Resultados

3.2.1 TGA – Análisis Termogravimétrico

La **Figura 3-2** (Izq.) muestra las curvas de degradación termogravimétrica (TGA) obtenidas para la muestra de P3HB producida en laboratorio y la producida por Sigma Aldrich. El perfil de degradación obtenido es similar para ambas muestras, se puede ver claramente que la degradación en ambos casos empieza a la misma temperatura, sin embargo,

terminan a temperaturas diferentes debido a una diferencia en las pendientes de pérdida de masa. Este fenómeno se puede ver claramente en la **Figura 3-2** (Der.), la cual muestra la derivada de las curvas de degradación termogravimétrica (DGA), dónde los picos representan las temperaturas de mayor pérdida de masa, para el caso de la muestra de P3HB producida en el laboratorio se puede ver que el pico tiene una amplitud mayor, pero se da en un rango de temperatura menor que la muestra comercial. Para la muestra producida en laboratorio la degradación se da entre 233°C y 286°C, con un punto de degradación máxima en 276°C, por otro lado, la degradación de la muestra comercial se da entre 233°C y 315°C, y el punto de degradación máxima se da a 291°C. Es decir que el rango de temperatura de degradación de la muestra producida en laboratorio es de 53°C, mientras que el de la muestra comercial es de 82°C, indicando que existe una diferencia significativa en la energía necesaria para la degradación de cada una de las muestras, la cuál puede ser producto de un mayor peso molecular promedio en la muestra de Sigma Aldrich o de la presencia de impurezas en la muestra producida en laboratorio, lo que genera una disminución en la estabilidad térmica [121].

Figura 3-2: (Izq.) Comparación entre el análisis termogravimétrico obtenido para una muestra comercial (Sigma Aldrich) y la muestra obtenida en laboratorio. (Der.) Derivada del análisis termogravimétrico para la muestra comercial de Sigma Aldrich y la producida en laboratorio



Esto se puede corroborar analizando el residuo de masa después del proceso de degradación, el cuál es del 2.07% de la masa total para la muestra producida en laboratorio contra 0.03% para la muestra de Sigma Aldrich, la **Figura 3-2** (Der.) muestra que para ambas muestras solo hay un evento de degradación, indicando la presencia mayoritaria

de solo una especie química en ambas muestras, entonces se concluye que toda la masa perdida durante el evento de degradación corresponde al polímero P3HB cuya pureza se puede calcular restando a la masa total el porcentaje de masa residual después de la degradación obteniendo una pureza de aproximadamente el 97.93% y 99.97% para la muestra producida en laboratorio y la muestra comercial respectivamente, la **Tabla 3-3** muestra los resultados obtenidos de los ensayos de TGA para las dos muestras evaluadas.

Tabla 3-3: Resultados obtenidos de los ensayos de TGA para ambas muestras

Muestra	Temperatura de Degradación			Residuo %	DTG [°C]
	T 10% [°C]	T 50% [°C]	T 90% [°C]		
P3HB - Producido	257,16	273,12	281,33	2,07	276,50
P3HB – Sigma Aldrich	257,16	286,16	305,50	0,03	291,03

Otros investigadores han obtenido perfiles de degradación térmica similares al purificar P3HB de origen bacteriano usando cloroformo, Rosengart y su equipo de trabajo obtuvieron P3HB de *Burkholderia sacchari* en fermentadores con una temperatura de degradación de 278.92 °C en fermentaciones de 2L [107], Akdogan y Celik obtuvieron un P3HB con temperatura de degradación de 281.4 °C mediante la fermentación de glucosa con *Bacillus megaterium* en matraces de 250 mL [122]. En otro estudio se obtuvo una temperatura de degradación de 284 °C para el P3HB producido mediante un cultivo aerobio mixto en plantas piloto de tratamiento de agua residual [123]. La **Tabla 3-4** muestra un resumen de las temperaturas de degradación del P3HB obtenidas por otros investigadores usando técnicas que involucran cloroformo. La principal diferencia que existe entre los resultados obtenidos por otros investigadores y el obtenido en este estudio es la escala a la que se llevó a cabo la fermentación y el posterior proceso de purificación, por lo general, en la literatura todos las fermentaciones se llevan a cabo a escala de laboratorio, en biorreactores con volúmenes inferiores a 5 L, adicionalmente, la biomasa que se usa para la purificación no supera 1 g, mientras que para este trabajo las fermentaciones se hicieron en un biorreactor de 100 L con un volumen de trabajo de 60 L y la cantidad de biomasa purificada estaba entre los 400 y 500 gramos, indicando que escalar el proceso de purificación a escalas semi industriales permite obtener un material con un perfil de degradación térmica similar al obtenido a escala de laboratorio.

Muchos autores han dedicado sus investigaciones al estudio de la degradación térmica de los polihidroxicanoatos de cadena media y cadena corta como el P3HB [127] [128] [129], y todos coinciden en que la degradación del biopolímero se da casi exclusivamente

mediante el mecanismo de ruptura aleatoria de las cadenas (random chain scission), mediante el cual se forma un anillo temporal de 6 miembros en un lugar aleatorio de la cadena polimérica y posteriormente ocurre una reacción de eliminación de hidrógeno dando paso a una ruptura que tiene como consecuencia una disminución significativa en el peso molecular [130].

Tabla 3-4: Temperatura de degradación obtenida en otros estudios para la separación del P3HB de biomasa bacteriana

Microorganismo	DTG [°C]	Volumen de Producción [L]	Referencia
<i>Burkholderia Saccahari</i>	278.9	2	[107]
<i>Bacillus megaterium</i>	281.4	0.25	[122]
Cultivo Mixto	284.0	-	[123]
<i>Vibrio harveyi</i> MCBB 284	265.7	0.2	[124]
<i>Bacillus licheniformis</i>	268.0	1	[125]
<i>Escherichia coli</i> JM109 (recombinante)	270.0	3	[126]

3.2.2 DSC – Calorimetría Diferencial de Barrido

Mediante la técnica de DSC es posible cuantificar la energía necesaria para generar cambios de temperatura y de fase en el material, los picos que se ven en la **Figura 3-3** Izq. y Der. corresponden a eventos de cristalización y fusión respectivamente. Inicialmente la muestra se sometió a un aumento de temperatura rápido (30°C/min) desde temperatura ambiente hasta 200°C para eliminar residuos de solventes y borrar la huella térmica generada en el material durante el proceso de extracción y purificación [131], posteriormente un enfriamiento rápido de (-20°C/min) desde 180°C hasta -50°C y finalmente un nuevo calentamiento desde -50°C hasta 200°C. El área bajo la curva de cada uno de los picos representa las entalpías de cristalización (Izq.) y fusión (Der.) respectivamente, se puede ver claramente, que tanto el pico de fusión como el de cristalización se presentan a temperaturas muy similares para ambas muestras, indicando que el proceso de purificación empleado dio como resultado un material con propiedades térmicas muy similares a la muestra comercial, tal como lo mostraron los resultados obtenidos mediante TGA. La **Tabla 3-5** muestra la temperatura de fusión T_m , la temperatura de cristalización T_c , la entalpía de fusión ΔH_m , la entalpía de cristalización ΔH_c y el índice de cristalinidad de ambas muestras.

Figura 3-3: (Izq.) DSC (segundo enfriamiento) de la muestra de P3HB comercial y la producida en laboratorio. (Der.) DSC (segundo calentamiento) de la muestra de P3HB comercial y la producida en laboratorio.

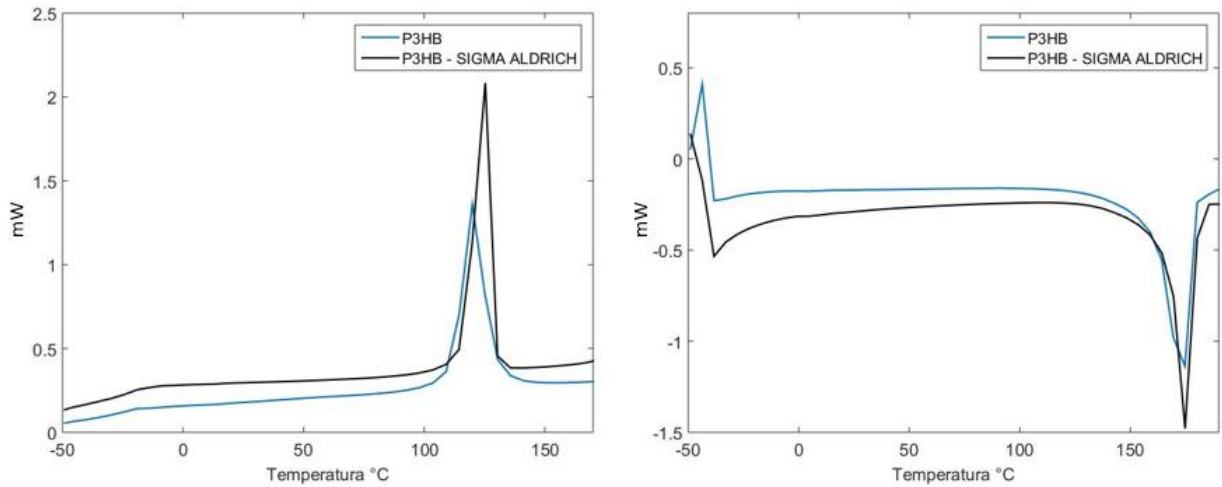


Tabla 3-5: Resultados obtenidos del análisis DSC para la muestra comercial y la producida en laboratorio.

Muestra	T_m [°C]	T_c [°C]	ΔH_m [Jg^{-1}]	ΔH_c [Jg^{-1}]	X_c [%]
P3HB - Producido	174.7	119.9	35.5	29.3	24.31
P3HB – Sigma Aldrich	174.8	125.3	36.9	31.6	25.27

Las entalpías de fusión ΔH_m y de cristalización ΔH_c se calcularon hallando el área bajo la curva de los picos de fusión y cristalización de la **Figura 3-3** respectivamente. El área de los picos se encuentra en unidades de potencia por temperatura $mW\ ^\circ C$ que equivalen a $mJ\ ^\circ C\ s^{-1}$. Posteriormente se divide el valor del área por la velocidad de cambio de temperatura que está en $^\circ C\ s^{-1}$, finalmente, se divide el valor obtenido por la masa de la muestra que se encuentra en mg , y se obtiene el valor de la entalpia en $J\ g^{-1}$. Por otro lado, el índice de cristalinidad se halla usando una entalpía de fusión teórica de referencia para el P3HB 100% cristalino, reportada por varios investigadores como $\Delta H_m^\circ = 146\ J\ g^{-1}$ [132] [133], y la **Ecuación 3 – 15**:

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\omega \Delta H_m^\circ} \times 100 \quad \text{Ecuación 3 – 15}$$

Dónde ΔH_m es la entalpía de fusión de la muestra analizada y ω la fracción másica de P3HB en la muestra, que para este caso es 1. Los resultados de la **Tabla 3-5** muestran

que el proceso empleado para la extracción y purificación del P3HB da como resultado un material con propiedades térmicas similares a las de la muestra comercial.

3.2.3 Ensayo de Biodegradabilidad

3.2.3.1 Ajuste de la humedad del compost

En la **Tabla 3-6** se encuentran los valores de humedad obtenidos para las 6 muestras de compost analizadas. Se determinó que, en promedio, la humedad relativa del compost utilizado es de 44.23%, sabiendo esto, se determinó la cantidad de agua necesaria para llevar el compost de cada uno de los recipientes de las pruebas de biodegradabilidad hasta una humedad relativa del 90%, primero se calculó la cantidad de agua en cada uno de los recipientes multiplicando la humedad relativa por la masa de compost como muestra la **Ecuación 3-16**:

$$M_{agua} = M_{compost} \times \%H = 90g \times 44.23\% = 39.81g \quad \text{Ecuación 3 - 16}$$

Tabla 3-6: Valores de humedad obtenidos para el compost inicial

Muestra	Masa Inicial	Masa Final	Diferencia	%H
1	1,098	0,625	0,473	43,07%
2	0,988	0,549	0,439	44,40%
3	1,157	0,612	0,545	47,10%
4	1,181	0,709	0,473	40,01%
5	1,076	0,579	0,497	46,23%
6	1,751	0,970	0,781	44,60%
Promedio				44,23%

Posteriormente, se hace una regla de tres para determinar la cantidad de agua que debería haber en la muestra para que la humedad relativa de esta sea del 90%, y se agrega la cantidad restante como se muestra en la **Ecuación 3-17**:

$$M_{agua90\%} = \frac{90\% \times 39.81g}{44.23\%} = 81.00g \quad \text{Ecuación 3 - 17}$$

Finalmente, se agrega a cada uno de los recipientes de las pruebas de biodegradabilidad la cantidad de agua necesaria para obtener una humedad relativa del 90%, es decir 41.19 g de agua destilada.

3.2.3.2 Cálculo de la producción de CO_2 del compost

De las 3 concentraciones de KOH probadas sólo hubo una que no se neutralizó por completo después de dos días. Las demás quedaron completamente neutralizadas por el CO_2 producido pues al agregar la fenolftaleína no hubo el viraje esperado de la muestra a un color violeta, característico de las soluciones alcalinas. Esto significa que en los dos días se produjo la cantidad suficiente de CO_2 para neutralizar completamente las soluciones de KOH a 0.01 M y 0.05M. En la **Tabla 3-7** se pueden encontrar los datos obtenidos.

Tabla 3-7: Determinación del CO_2 producido por el compost

[KOH] día 0	[KOH] día 2	$ \Delta[KOH] $	mol CO_2 generadas	mol CO_2 /Día
0,01 M	0	0,01M	-	-
0,05 M	0	0,05 M	-	-
0,1 M	0,006 M	0,094 M	0,0004767	0,0001589

Para calcular la concentración del KOH se hicieron titulaciones con una solución 0,048 M de HCl. En promedio, se necesitaron 1.2mL para llevar las soluciones que originalmente tenían una concentración de 0.1M al punto de equilibrio. Entonces:

$$1.2 \text{ mL HCL} \times 0.048 \frac{\text{moles}}{\text{L}} \times \frac{1\text{L}}{1000 \text{ mL}} = 0.0000576 \text{ mol de HCL} \quad \text{Ecuación 3 – 18}$$

Como la relación estequiométrica entre el HCl y el KOH es 1:1, la cantidad de moles de HCl necesarias para neutralizar la solución son la misma cantidad de moles de KOH que había en esta. Es decir que quedaban 0.0000576 moles de KOH en la solución de 10 mL. Entonces, la concentración de la solución al día 2 será de:

$$\frac{0,0000576 \text{ moles de KOH}}{0.01 \text{ L}} = 0.00576 \text{ M} \quad \text{Ecuación 3 – 19}$$

Para calcular la cantidad de moles que se consumieron se parte de la concentración inicial del KOH que es 0.1011 M en 10 mL, entonces:

$$\text{Moles Iniciales KOH} = \frac{0.1011 \text{ mol KOH}}{L} \times 0.01L = 0.001011 \text{ moles} \quad \text{Ecuación 3 - 20}$$

Entonces la cantidad de moles consumidas es:

$$\begin{aligned} \text{Moles Consumidas} &= \text{Moles Iniciales} - \text{Moles Finales} = 0.001011 - 0.0000576 \\ &= 0.0009535 \text{ mol de KOH} \quad \text{Ecuación 3 - 21} \end{aligned}$$

La reacción entre el KOH y el CO₂ es de 2:1, entonces la cantidad de moles de CO₂ producido en los dos días es de:

$$\frac{0.0009535 \text{ mol KOH}}{2 \text{ mol KOH por mol de CO}_2} = 0.0004767 \text{ mol de CO}_2 \quad \text{Ecuación 3 - 22}$$

Si la solución se hubiera dejado medio día más se hubiera saturado por completo, es decir que la concentración de las soluciones de KOH que se usen en el ensayo deben ser al menos de 0.1 M si se va a titular cada 2 días.

3.2.3.3 Biodegradabilidad del P3HB

En la **Tabla 3-8** se puede ver la cantidad de polímero que tenía cada uno de los ensayos y el estado de este:

Tabla 3-8: Características de los ensayos de biodegradabilidad montados

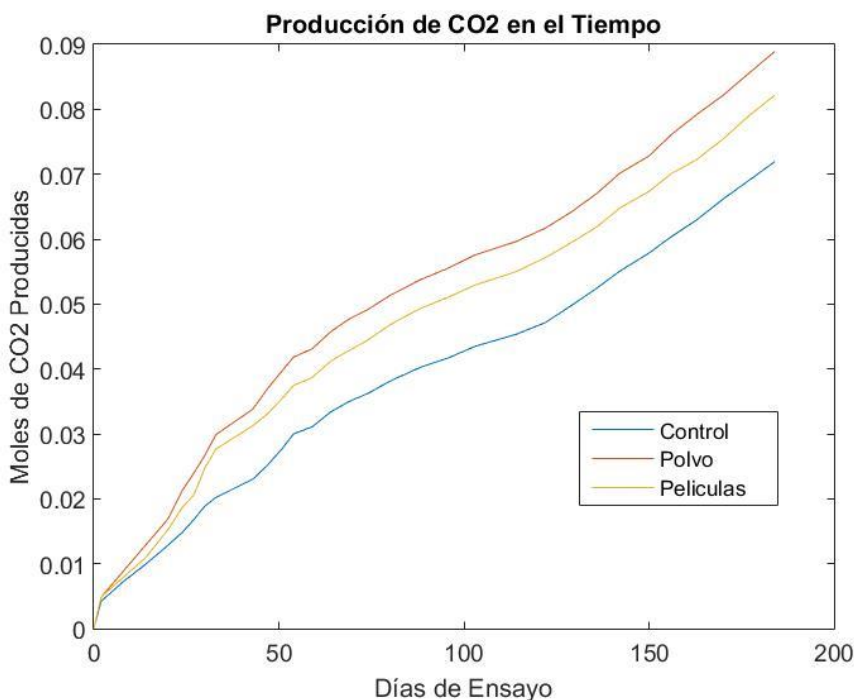
Experimento	Masa P3HB [mg]	Estado
1	403,6	Polvo
2	0	-
3	413,5	Polvo
4	406,8	Polvo
5	0	-
6	407,9	Polvo
7	406,8	Polvo
8	0	-
9	409,3	Polvo

10	404,3	Polvo
11	0	-
12	421,2	Película
13	449,3	Película
14 (15)	410,2	Película
15 (16)	423	Película
16 (18)	413,2	Película
17 (20)	482,4	Película

Los experimentos 2, 5, 8 y 11 son blancos, y serán usados para medir la cantidad de dióxido de carbono producido solo por la respiración del compost. Las películas usadas fueron hechas mediante la técnica de prensado caliente en la universidad Jorge Tadeo Lozano, con éstas, además de determinar la cantidad de dióxido de carbono producido mediante la degradación de las cadenas poliméricas, será posible determinar la pérdida de masa mediante gravimetría después de que termine el ensayo. El experimento 11 tuvo que ser retirado después de 1 semana de ensayo debido a una contaminación fúngica.

En la **Figura 3-4** se puede ver cómo evolucionó en promedio la liberación de CO_2 durante los 6 meses de ensayo, como es de esperarse, las muestras con material polimérico muestran una liberación más alta de CO_2 que el control. El material en polvo mostró una liberación mayor de CO_2 , es decir una descomposición más rápida debido a que el área superficial del material en polvo es mayor al del material en películas.

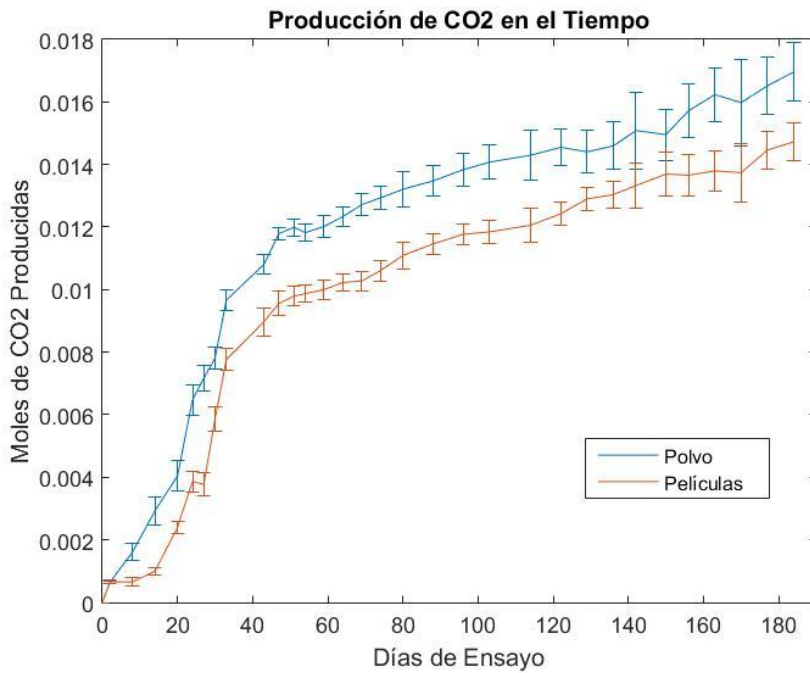
Figura 3-4: Evolución de la producción de CO_2 promedio con respecto al tiempo en las pruebas de biodegradabilidad para muestras control (sin polímero), muestras con polímero en polvo y muestras con polímero en películas hechas por compresión.



Al restar la cantidad de CO_2 producido naturalmente por el compost (blancos) a la cantidad de CO_2 de los experimentos con polímero, se obtiene la producción neta de CO_2 producto de la biodegradación del material como se puede ver en la **Figura 3-5**. Se puede ver que la mayor parte de CO_2 es producida durante los primeros 2 meses del ensayo, al final, se produjeron 0,01692 moles de CO_2 en los ensayos con polímero en polvo y 0,01023 en los ensayos con películas poliméricas. Con estos resultados y teniendo en cuenta que cada mol de CO_2 producida, es un mol de carbono orgánico degradada del polímero, es posible conocer el porcentaje de biodegradación del P3HB calculando las moles de carbono orgánico al inicio de las pruebas como se hace en la norma ASTM 5988. En promedio, las pruebas de biodegradabilidad hechas con material en polvo tenían 407,45 mg de polímero, y las hechas con películas 433,21 mg. Se sabe que las unidades monoméricas del polímero ($C_4H_6O_2$) tienen un peso molecular de 86 g/mol, de los cuales 48 g/mol corresponden al carbono, es decir que el 55,814% de la masa molecular del polímero corresponde a carbono orgánico. En la **Figura 3-6** se puede ver la evolución de la degradación, pero en porcentaje de masa degradada con respecto al tiempo. En ambas gráficas se ve claramente un aumento progresivo de las barras de error, esto se debe a

que en cada nueva medición se va acumulando el error de las anteriores, debido a que el cálculo de las moles totales de CO_2 producidas se calcula teniendo en cuenta todas las mediciones anteriores. Sin embargo, a pesar de los errores relativamente altos, se pueden notar tendencias definidas, una mayor degradación en los primeros 60 días y una degradación más rápida para el material en polvo.

Figura 3-5: Evolución de la producción neta promedio de CO_2 en los ensayos de biodegradabilidad.

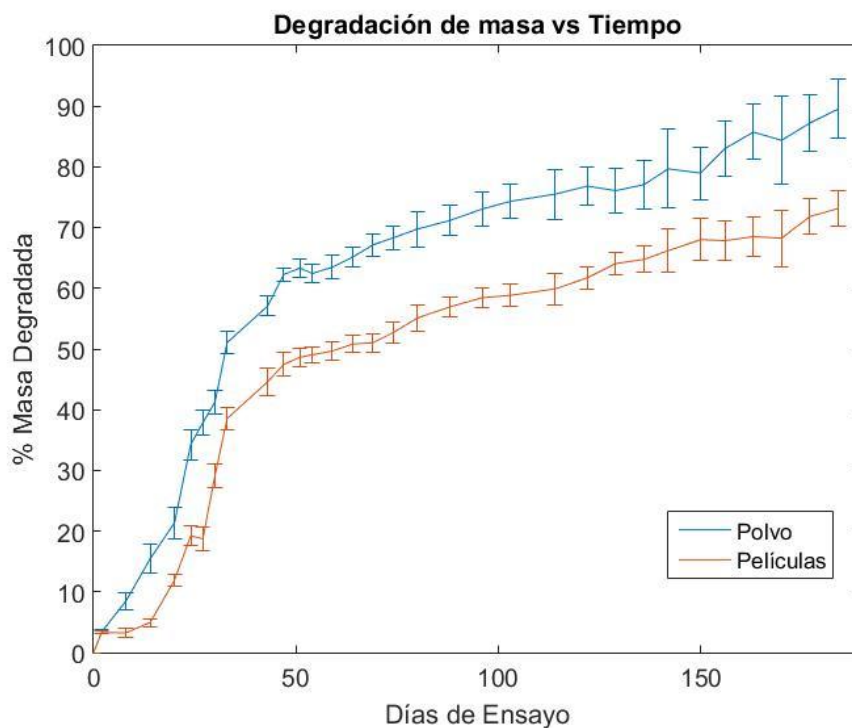


En la **Tabla 3-9** se puede ver el valor promedio de las moles de carbono iniciales para los ensayos de biodegradabilidad, la cantidad de carbono orgánico liberado mediante la biodegradación y el porcentaje de la masa total que se degradó de acuerdo con el balance de masa del carbono:

Tabla 3-9: Resultados del balance de masa de carbono para las pruebas de biodegradabilidad.

Tipo de Carbono	P3HB (Polvo)	P3HB (Películas)
Carbono orgánico inicial [mg]	227,41	241,79
Carbono orgánico degradado [mg]	203,52	122,76
Carbono orgánico restante [mg]	23,89	119,03
Porcentaje de degradación [%]	89,5	50,7

Figura 3-6: Evolución del porcentaje de degradación del polímero con respecto al tiempo.

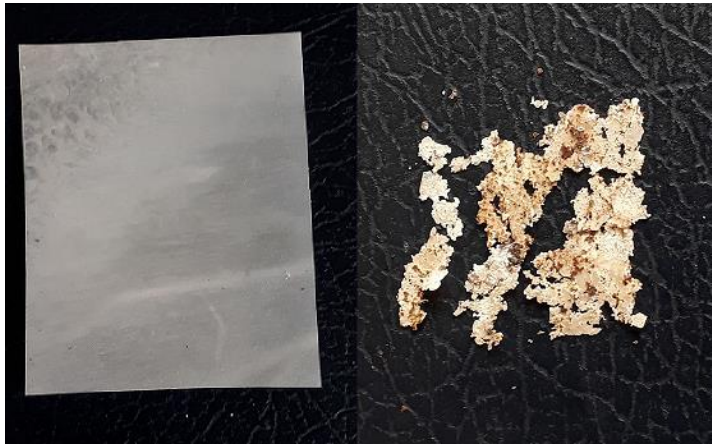


Finalmente, en la **Figura 3-7** se puede ver la apariencia de una película polimérica antes de iniciar el ensayo, y la apariencia de esta misma 6 meses después de que inició el ensayo. Se evidencia claramente el proceso de degradación, el material es mucho más frágil que al inicio de los ensayos y se quiebra con facilidad. Otros autores han reportado una degradación similar al usar la misma técnica, en dónde la mayor parte del material (más del 80%) se degrada en los primeros 60 días para una muestra en polvo [134], sin embargo, en otros trabajos han sido necesarios hasta 360 días para obtener un nivel de degradación similar [135], esto se debe a que los suelos usados en los ensayos tiene orígenes diferentes, y por lo tanto diferentes poblaciones y actividades microbianas.

La biodegradación se da debido a la acción de enzimas o deterioro químico asociado a microorganismos. La degradación se da en dos pasos principalmente, primero hay una fragmentación de las cadenas poliméricas en especies de menor peso molecular gracias a la acción de reacciones abióticas como oxidación, foto-degradación, hidrólisis, o reacciones bióticas provocadas por microorganismos. Posteriormente se da una bio-

asimilación de los fragmentos poliméricos de bajo peso molecular por parte de los microorganismos presentes en el suelo. La velocidad de degradación de los polímeros de tipo PHA depende de varios factores, principalmente, de su microtacticidad, debido a que solo los polímeros con orientación (*R*) pueden ser hidrolizados por las depolimerasas, adicionalmente, la velocidad de degradación disminuye cuando aumenta la cristalinidad del polímero o su peso molecular [135].

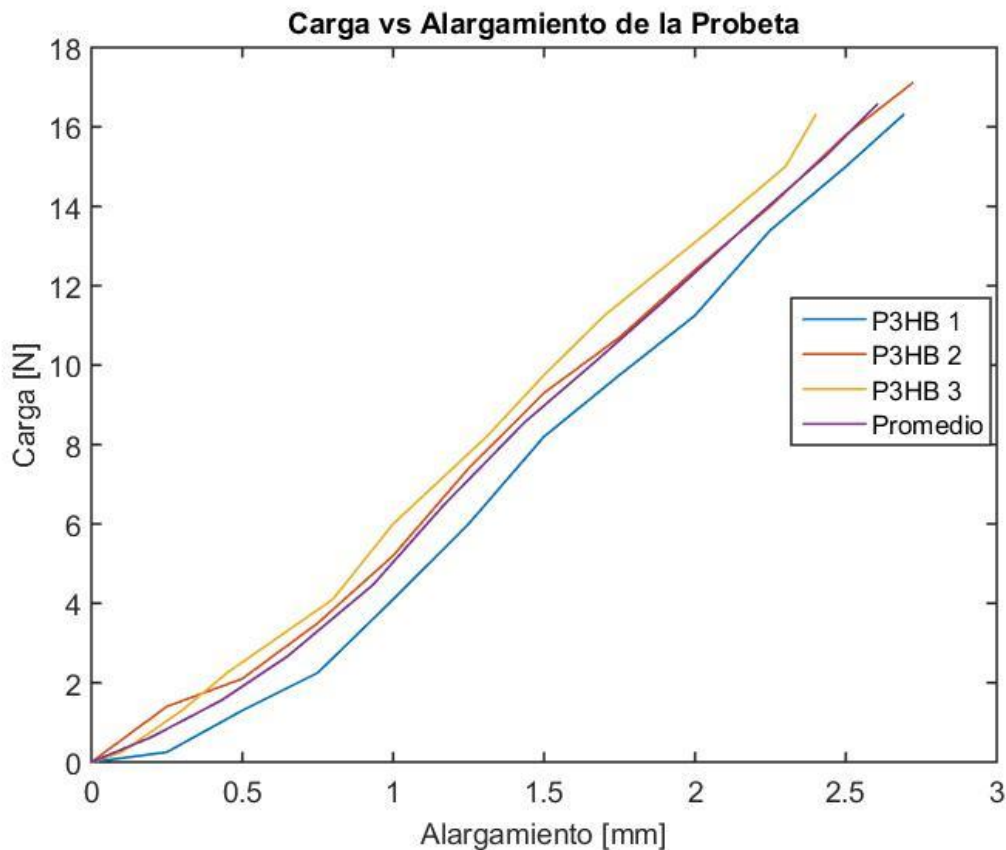
Figura 3-7: Comparación entre la película de P3HB antes de iniciar el ensayo, y la película después del ensayo. Se puede evidenciar claramente la degradación del material



3.2.4 Tensión de Rotura

Los ensayos mecánicos se hicieron usando probetas en forma de lámina, como lo describe la norma ASTM 882, el material usado en estos ensayos fue producido mediante una fermentación de 100 L y purificado con cloroformo y metanol. Las probetas se hicieron con moldeo por compresión, en una prensa hidráulica a una temperatura de 170°C y con una presión de 60 toneladas. El ensayo consiste en poner las probetas entre dos pinzas, las cuales empiezan a separarse a una velocidad de terminada hasta que la probeta falle, de esta manera es posible determinar el porcentaje de elongación del material y la cantidad de energía necesaria para que este falle, la **Figura 3-8** muestra la curva carga alargamiento de cada uno de los ensayos hechos y el promedio de estos.

Figura 3-8: Curvas de carga vs alargamiento para los 3 ensayos ASTM882 con probetas de P3HB y el promedio de estos



Se puede ver que el comportamiento de las 3 probetas evaluadas es bastante similar, indicando una buena repetibilidad del ensayo y unos resultados consistentes. En promedio, la carga máxima soportada por las probetas fue de 16.43 N y el alargamiento máximo promedio de 2.6 mm, lo que corresponde a 3.71% teniendo en cuenta que las probetas tenían una longitud de 12 cm y que las pinzas de la maquina universal estaban situadas a 2.5 cm del borde, es decir que la longitud de trabajo de la probeta era de 7 cm. La tensión de rotura se calcula dividiendo la carga máxima por área perpendicular a la dirección de la fuerza, en este caso el área transversal de la probeta que es aproximadamente de 0.2 mm^2 . La **Tabla 3-10** muestra los resultados obtenidos para cada uno de los ensayos y el promedio.

Tabla 3-10: Resultados de las pruebas mecánicas de elongación con la norma ASTM 882

Muestra	Deformación [mm]	Carga de Falla [N]	Área Transversal [mm ²]	Tensión de Rotura [MPa]	Elongación máxima [%]
1	2,69	16,390	0,211	7,767	3,84
2	2,72	17,091	0,203	8.419	3,88
3	2,42	16,321	0,206	7,992	3,45
Promedio	2.61	16.601	0.207	8.059	3.72

Adicionalmente, se hizo una comparación de los valores obtenidos con los reportados en la literatura **Tabla 3-11**. El valor de la elongación máxima es similar al reportado en la literatura, sin embargo, la tensión de rotura es menor, indicando que el material es más frágil. Esto se puede deber a varios factores, como el peso molecular del polímero, el índice de cristalinidad, impurezas restantes en la matriz polimérica, e inclusive, degradación debido al tratamiento térmico usado para la fabricación de las probetas usadas en los ensayos.

Tabla 3-11: Comparación de las propiedades mecánicas del P3HB producido y datos reportados por otros autores

Material	Tensión de Rotura [MPa]	Elongación Máxima	Referencia
P3HB	7,50	3,8	-
P3HB	25	5	[136]
P3HB	20	4,1	[137]
P3HB	28,7	4,2	[138]

3.2.5 Peso molecular Viscoso

El peso molecular viscoso se determinó usando la correlación de Mark – Houwink – Sakurada, la cual tiene como parámetro la viscosidad intrínseca $[\eta]$, la cuál se midió usando el viscosímetro de Ubbelohde. La **Tabla 3-12** continuación muestra los tiempos de elusión en segundos obtenidos para soluciones poliméricas (P3HB/cloroformo) a diferentes concentraciones y para el solvente puro.

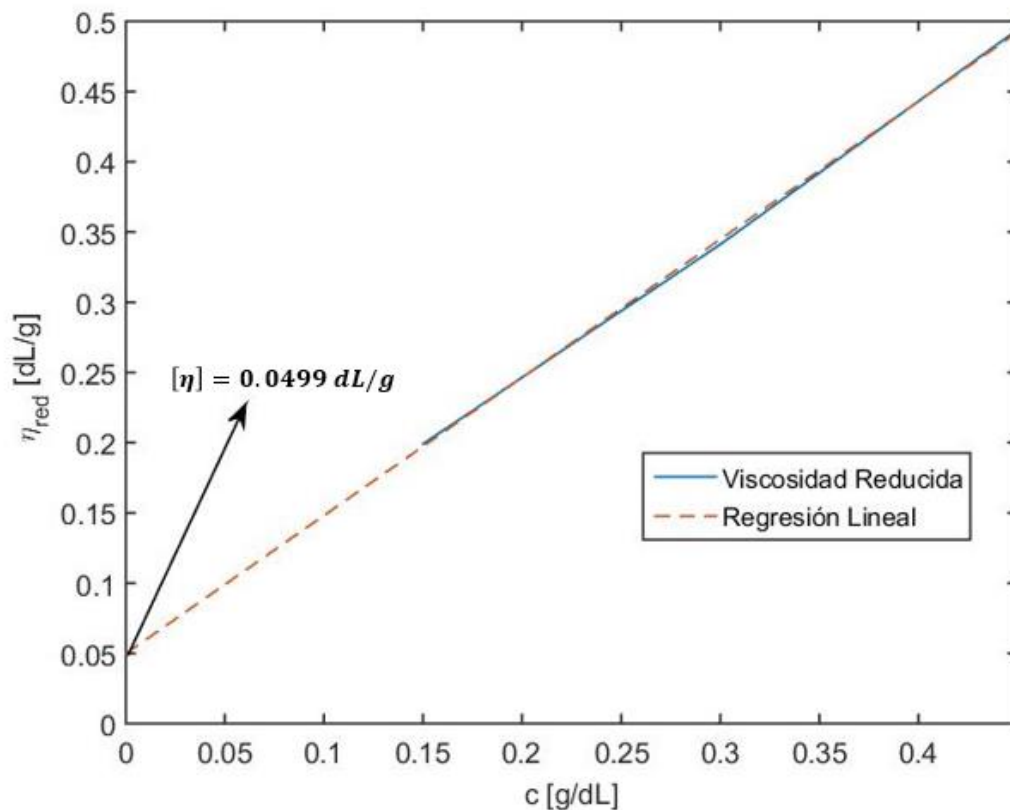
Tabla 3-12: Tiempos de elusión para soluciones poliméricas a diferentes concentraciones y para el solvente (cloroformo) puro a 25°C

	Tiempo de elusión [s]			
	Cloroformo Puro	0.15 [g dl ⁻¹]	0.3 [g ml ⁻¹]	0.45 [g ml ⁻¹]
Replica # 1	234.18	272.81	327.61	395.92

Replica # 2	234.48	272.27	327.83	395.78
Replica # 3	234.8	272.18	327.77	395.78
Promedio	248.11	272.42	327.73	395.82

Con los tiempos de elusión y aplicando las ecuaciones descritas en la metodología (**Ecuaciones 3-9, 3-10 y 3-11**) se obtuvo la viscosidad reducida η_{red} del P3HB, posteriormente se la viscosidad reducida promedio de cada muestra con su respectiva concentración y se proyectó la viscosidad reducida a una concentración cercana a 0 mediante una regresión lineal como se muestra en la **Figura 3-9**, esta viscosidad cuando la concentración tiende a 0 corresponde a la viscosidad intrínseca $[\eta]$ del polímero, en este caso en particular $[\eta] = 0.0499 \text{ dL g}^{-1}$.

Figura 3-9: Viscosidad reducida vs concentración de la solución polimérica con su regresión lineal y el intercepto con el eje y que corresponde a la viscosidad intrínseca.



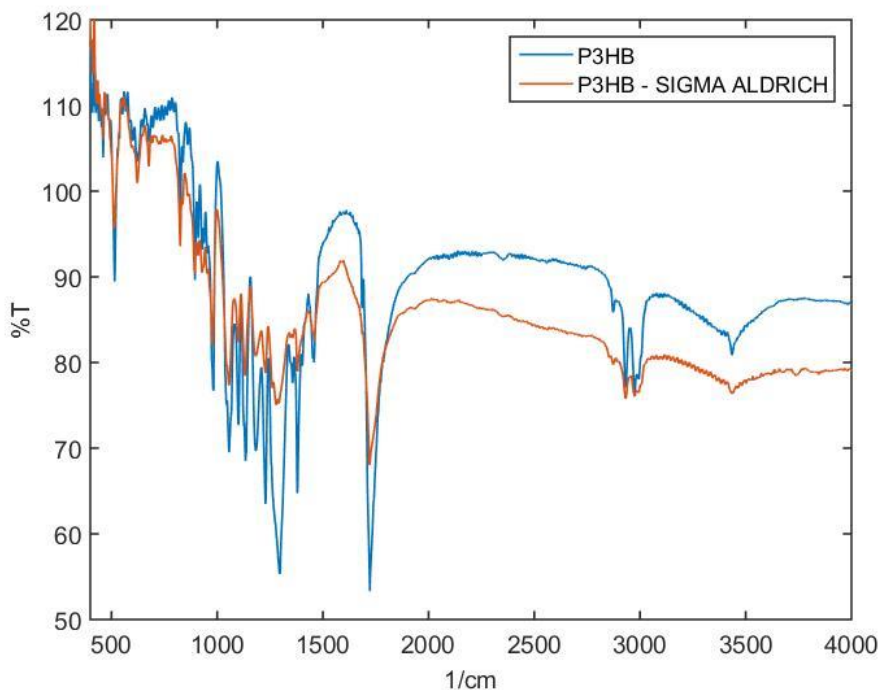
Con la viscosidad intrínseca calculada, se estimó el peso molecular viscoso del polímero despejándolo de la ecuación de Mark -Houwink – Sakurada (**Ecuación 3-6**) obteniendo la siguiente ecuación:

$$M_v = \left(\frac{[\eta]}{k} \right)^{\frac{1}{a}} \quad \text{Ecuación 3 - 23}$$

Los valores de a y k son 0.78 y $11.8 \times 10^3 \text{ mL g}^{-1}$ [119] como se muestra en la **Tabla 3-1**, al solucionar la **Ecuación 3 - 23** con estos parámetros se obtiene un valor de peso molecular viscoso de $8.5 \times 10^5 \text{ Da}$. El peso molecular viscoso obtenido se encuentra entre el rango de pesos moleculares (de $1.7 \times 10^5 \text{ Da}$ hasta $1.4 \times 10^6 \text{ Da}$) esperados para P3HB producido mediante fermentaciones bacterianas según la revisión hecha por Kim y Lenz [139].

3.2.6 Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier

Figura 3-10: Espectro infrarrojo de la muestra comercial y de la muestra producida en laboratorio.



La **Figura 3-10** muestra el espectro infrarrojo obtenido para la muestra comercial y para el P3HB producido en laboratorio. Ambas muestras presentan los picos de absorción característicos del P3HB, a 2928 cm^{-1} debido a la vibración del enlace metileno C-H, la vibración del complejo -C-O-C- entre 800 y 975 cm^{-1} y la vibración del grupo C=O a 1722 cm^{-1} [140]. La semejanza entre ambos espectros indica que ambas sustancias son

químicamente muy similares, la amplitud de los picos es un indicio de la cantidad de enlaces de cada tipo presentes en la muestra, la diferencia en las amplitudes se debe a la concentración de la muestra después de haber sido diluida en el KBr.

3.3 Conclusiones

- Las caracterizaciones hechas mostraron que la calidad del P3HB purificado por la técnica convencional con cloroformo y metanol es muy similar a la de la muestra comercial de Sigma – Aldrich, indicando que el proceso de fermentación efectuado con *Burkholderia cepacia* B27 da como resultado un material con características fisicoquímicas similares a las que tiene el P3HB disponible actualmente en el mercado.
- La característica más débil del P3HB producido es su tensión de rotura, significativamente inferior a las reportadas en la literatura. Es necesario modificar el material para mejorar sus propiedades mecánicas pues estas tienen un impacto directo sobre las aplicaciones del material en el mercado. La incorporación de aditivos o rellenos es la opción más viable para mejorar las propiedades mecánicas del P3HB, y esta es la razón por la cual el siguiente capítulo de este trabajo está dedicado a la incorporación de aditivos a la matriz polimérica para mejorar sus propiedades mecánicas.
- La principal ventaja del P3HB con respecto a otros polímeros es su biodegradabilidad, se demostró que el polímero pierde hasta el 90% de su masa en condiciones de compostaje en un periodo de aproximadamente 6 meses, mientras que el PET, el PP, el PVC y el PE que son los polímeros más consumidos a nivel mundial, pueden tardar hasta 50 años en perder el 90% de su masa en condiciones óptimas.
- El P3HB es un candidato interesante para sustituir algunas de las aplicaciones de los polímeros convencionales, sin embargo, es necesario modificarlo para mejorar sus propiedades mecánicas significativamente, de lo contrario, no será competitivo en el mercado de los empaques y los envases.

4 Capítulo 4: Modificación del P3HB

Se hizo una revisión bibliográfica para identificar los aditivos que tienen un mejor efecto en las propiedades fisicoquímicas del P3HB y posteriormente hacer una evaluación experimental de los aditivos seleccionados con el objetivo de formular un nuevo material a base de P3HB que presente propiedades mecánicas y físicas adecuadas para una aplicación en la industria de los empaques y envases. Una técnica ampliamente usada para mejorar las propiedades de un polímero a un costo relativamente bajo son las mezclas poliméricas. Uno de los principales criterios para la selección de los aditivos era que se pudieran hacer las mezclas poliméricas usando la técnica de “solvent casting”, es decir que el aditivo debía ser soluble en el mismo solvente que el P3HB, en este caso el cloroformo. Teniendo en cuenta lo anterior, se seleccionaron el PEG (polietilenglicol), PLA (ácido poliláctico) y CNC (celulosa nano cristalina) como los aditivos para la modificación del P3HB (ver secciones **1.3.1 Blendas o mezclas poliméricas** y **1.3.2 Refuerzos y Rellenos**). Se hicieron varias mezclas variando la concentración del aditivo y la temperatura de mezclado y se evaluaron térmica y mecánicamente para determinar cuáles presentaban las mejores propiedades mecánicas y fisicoquímicas.

4.1 Metodología

4.1.1 Diseño experimental

El diseño experimental tenía como objetivo evaluar diferentes concentraciones y temperaturas de incubación en la formación de las mezclas a base de P3HB, es decir que los factores del diseño experimental son la temperatura de incubación, el tipo de aditivo y la concentración másica de este en la mezcla. Los niveles de cada factor fueron determinados mediante la revisión bibliográfica hecha previamente y se pueden ver en la **Tabla 4-1**.

Tabla 4-1: Niveles del diseño experimental para la evaluación de mezclas poliméricas a base de P3HB

Aditivo	Concentración másica [%]	Temperaturas [°C]
CNC (Celulosa nano cristalina)	2 – 4 – 10	25 – 42.5 – 60
PLA (Ácido poliláctico)	5 – 30 – 50	25 – 42.5 – 60
PEG (Polietilenglicol)	5 – 30 – 50	25 – 42.5 – 60

Se hizo un diseño factorial completo obteniendo como resultado 27 experimentos diferentes que contemplan todas las posibles combinaciones entre aditivos concentraciones y temperaturas. De cada experimento se hicieron 2 réplicas obteniendo al final 81 ensayos. Las muestras fueron caracterizadas usando TGA y DSC, y aquellas muestras que presentaron propiedades más interesantes fueron caracterizadas mecánicamente.

Posteriormente, se hicieron mezclas ternarias, combinando 2 aditivos en concentraciones diferentes con P3HB, estas mezclas se hicieron a una sola temperatura, la cual se seleccionó después de evaluar los resultados de la temperatura de incubación sobre las propiedades térmicas de las muestras binarias. La **Tabla 4-2** muestra cómo se formularon las mezclas ternarias:

Tabla 4-2: Formulación de las mezclas ternarias

Experimento	COMPOSICIÓN MÁSCICA [%]				Experimento	COMPOSICIÓN MÁSCICA [%]			
	P3HB	CNC	PEG	PLA		P3HB	CNC	PEG	PLA
1	50	0	25	25	10	70	10	0	20
2	50	0	35	15	11	70	6	0	24
3	50	0	15	35	12	70	2	0	28
4	70	0	15	15	13	50	10	40	0
5	70	0	25	5	14	50	6	44	0
6	70	0	5	25	15	50	2	48	0
7	50	10	0	40	16	70	10	20	0
8	50	6	0	44	17	70	6	24	0
9	50	2	0	48	18	70	2	28	0

Las muestras ternarias que dieron como resultado un material interesante después de un análisis cualitativo (resistencia a la flexión) fueron caracterizados térmica y mecánicamente para evaluar sus propiedades de manera cuantitativa.

4.1.2 Preparación de las mezclas poliméricas

Inicialmente, se prepararon soluciones de cada aditivo en cloroformo en viales de vidrio de 20 mL, la concentración aditivo/cloroformo que se usó para todos los casos fue de 10 mL de solvente por gramo de aditivo. Los viales se dejaron por 1 hora en sonicación a temperatura ambiente y con una frecuencia de 20 kHz para obtener como resultado una solución homogénea.

Posteriormente, se mezclan las soluciones obtenidas para formar las mezclas con las concentraciones determinadas en el diseño experimental, para esto se vierten las soluciones de P3HB y el o las soluciones de aditivos que se van a incorporar en un vial de vidrio de 20 mL y se dejan en el sonicador con una frecuencia de 20 kHz y a la temperatura especificada en el diseño. Una vez mezcladas las soluciones en el sonicador, se obtiene una solución homogénea de P3HB, aditivos y cloroformo, esta se sirve en cajas de Petri y se evapora el exceso de cloroformo a temperatura ambiente para obtener una película seca de la mezcla polimérica.

Para todas las mezclas se utilizó PEG 400 de grado analítico suministrado por Sigma Aldrich, celulosa microcristalina 101 de calidad industrial, PLA en pellets de calidad industrial y cloroformo 99.9%. El P3HB usado fue producido mediante la fermentación de ácidos grasos con B cepacia B 27 en un biorreactor de 100 L, cabe resaltar que el material utilizado para estos experimentos corresponde a un lote diferente al usado en los capítulos anteriores, fue purificado usando la técnica estandarizada de cloroformo y metanol que se describe en el capítulo 2, sin embargo, también se hicieron pruebas con el P3HB purificado con ácido acético para determinar si existen diferencias significativas entre las propiedades térmicas de las mezclas producidas con P3HB purificado con cloroformo y P3HB purificado con ácido acético.

4.1.3 Caracterización térmica de los materiales obtenidos (TGA & DSC)

Los análisis de TGA y DSC se hicieron usando el mismo procedimiento descrito en el capítulo 3 (**Figura 5-1**: Perfil de temperatura usado para los ensayos de TGA, **Figura 5-2**: Perfil de temperatura para los ensayos de DSC), para el primer diseño experimental de las mezclas binarias se hizo la caracterización térmica de todas las muestras para poder

determinar cómo afecta térmicamente la incorporación de cada tipo de aditivo a la matriz polimérica en diferentes concentraciones, sin embargo, no se hicieron réplicas debido a la disponibilidad de los equipos y la cantidad de insumos necesarios. Por otro lado, se seleccionaron las mejores mezclas ternarias de manera cualitativa para el análisis térmico, esto gracias a que la apariencia de las películas obtenidas tanto para las mezclas ternarias como para las mezclas secundarias, permitía conocer de manera general su calidad. Adicionalmente, fueron caracterizados térmicamente los materiales de partida (P3HB, CNC, PLA y PEG).

4.1.4 Caracterización mecánica de los materiales obtenidos

4.1.4.1 Preparación de las probetas para el ensayo

Las probetas se prepararon usando la técnica de solvent casting, para esto se preparan 60 mL de la solución P3HB/Aditivo/Cloroformo seleccionada (teniendo en cuenta que la concentración cloroformo/aditivo es de 10 mL/g) en el sonicador usando la misma metodología mencionada anteriormente. La mezcla ya homogenizada se vierte en láminas de vidrio con ayuda de un aplicador de aluminio que asegura que el espesor de cada película sea de 0.4 mL. Posteriormente se deja secar la solución servida sobre el vidrio para obtener una película de tamaño uniforme. Las películas son posteriormente cortadas para asegurar que tengas las dimensiones que especifica la norma ASTM 882 para ensayos de elongación de películas poliméricas.

4.1.4.2 Ensayos mecánicos

Los ensayos mecánicos se llevaron a cabo en el laboratorio de ingeniería química de la Universidad de América usando una velocidad de estiramiento de 0.1 in/min, se hicieron 4 réplicas de cada una de las mezclas evaluadas para asegurar una buena calidad en los datos obtenidos. Los datos fueron extraídos y analizados usando el software Trapezium X.

4.2 Resultados

4.2.1 Caracterización térmica de las materias primas

A continuación, se muestran las caracterizaciones térmicas de los aditivos, la **Figura 4-1** muestra la curva TGA del PLA, el PEG y la CNC, la **Tabla 4-3** muestra el detalle de la

caracterización con TGA para cada aditivo, se puede ver claramente como la calidad de los reactivos se ve reflejada en el residuo final, el cual es un indicador directo de la pureza del reactivo, el PEG 400 de calidad analítica presenta una pureza muy cercana al 100%, lo que se corrobora al ver que el residuo es de 0%, mientras que los otros dos reactivos de calidad industrial poseen residuos más altos indicando un menor nivel de pureza.

Se analizaron los 3 polímeros usados como aditivos con DSC para conocer sus características de cristalización, la **Figura 4-2** muestra el resultado del análisis, se puede ver que el PEG 400 presenta una temperatura de fusión $T_m = 4.13^\circ\text{C}$ y una temperatura de cristalización $T_c = 18.8^\circ\text{C}$, la amplitud de los picos sugiere un índice de cristalinidad significativamente mayor al de los otros aditivos, otros investigadores han reportado un índice de cristalinidad $C.I. = 43\%$ para PEG del mismo peso molecular y con temperatura de fusión y cristalización similares [141]. Por otro lado, el PLA muestra una temperatura de fusión $T_m = 148.2^\circ\text{C}$, sin embargo, la amplitud del pico es muy baja, representando un índice de cristalinidad $C.I. < 5\%$, es decir que la naturaleza del PLA usado es principalmente amorfa. Finalmente, la celulosa (CNC) no muestra picos de fusión ni cristalización en el rango de temperaturas evaluadas, no obstante, en otras investigaciones se reporta que la celulosa nano cristalina presenta una temperatura de fusión T_m muy similar a su temperatura de degradación, aproximadamente 360°C [142].

Figura 4-1: TGA de los aditivos para la modificación del P3HB

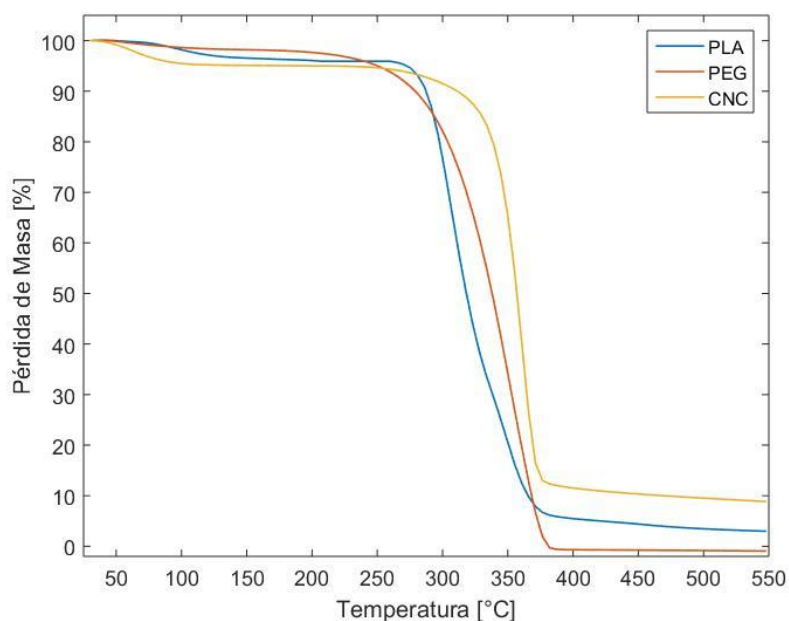
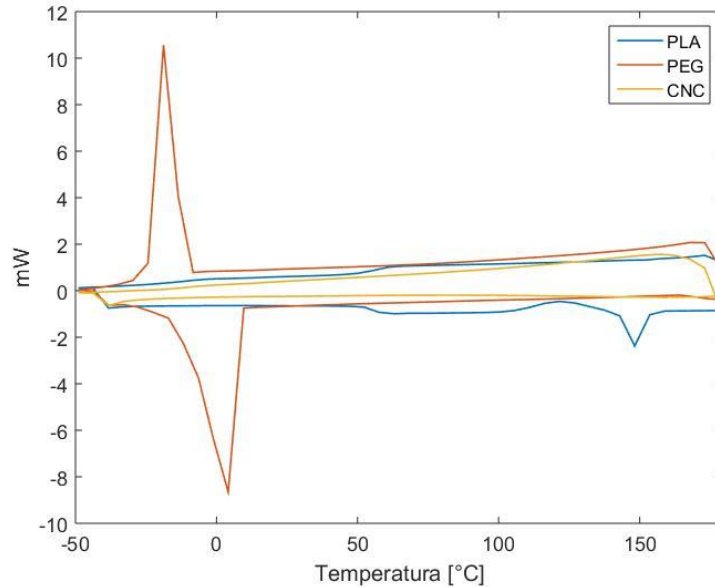


Tabla 4-3: Detalle de la caracterización con TGA de las materias primas usadas como aditivo para el P3HB.

Aditivo	T_D [°C]	Residuo [%]
PLA	302	2.98
PEG	350	0.00
CNC	360	8.86

Figura 4-2: DSC para los aditivos de modificación del P3HB



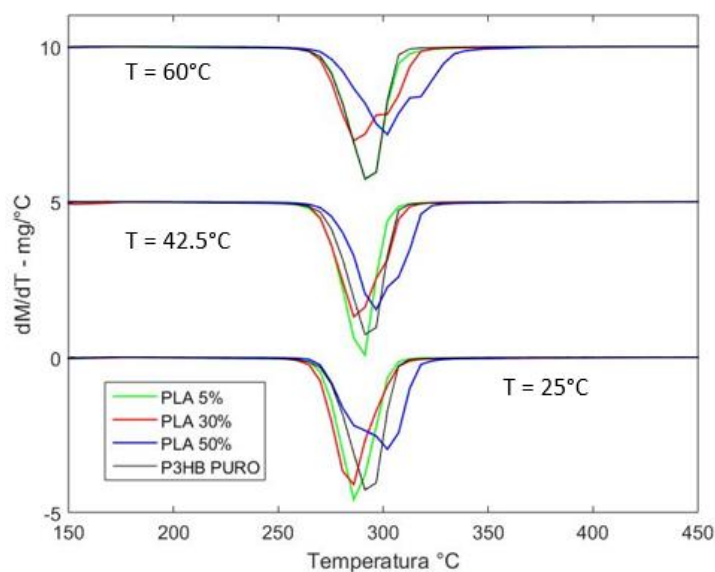
4.2.2 Análisis de la caracterización térmica

4.2.2.1 Mezclas P3HB – PLA

La **Figura 4-3** muestra los resultados obtenidos para el análisis de las mezclas P3HB/PLA a las 3 temperaturas de incubación evaluadas y su comparación con el perfil de TGA obtenido para el P3HB puro. Se puede ver como aumentar la concentración de PLA en la mezcla retrasa la velocidad de la degradación térmica de los materiales, los picos azules, que representan las mezclas 50/50 P3HB/PEG wt% tienen una amplitud menor, indicando una disminución en la pendiente de caída de la masa, y, por consiguiente, un mayor rango de temperatura antes de la degradación, para estas muestras, la temperatura de degradación es de 302°C, mientras que para el P3HB puro es de 291. Por otro lado, la temperatura de incubación a la cual se hizo cada muestra tiene un ligero efecto sobre la estabilidad térmica también, este fenómeno se puede ver claramente al comparar el perfil obtenido para el P3HB puro con el obtenido para la mezcla P3HB/PLA 70/30 wt% (líneas

rojas en la gráfica), a medida que aumenta la temperatura de incubación disminuye levemente la amplitud del pico y aumenta su rango temperatura, indicando que hacer la mezcla a altas temperaturas favorece la estabilidad térmica del material al final, esto se debe a que las altas temperaturas favorecen la miscibilidad entre los dos polímeros. Este resultado concuerda con los resultados reportados por otros investigadores, en los que mejora la estabilidad térmica del P3HB al adicionarle PLA como aditivo usando la técnica de solvent casting [143].

Figura 4-3 Análisis TGA de las mezclas P3HB/PLA a diferentes concentraciones y hechas a diferentes temperaturas.

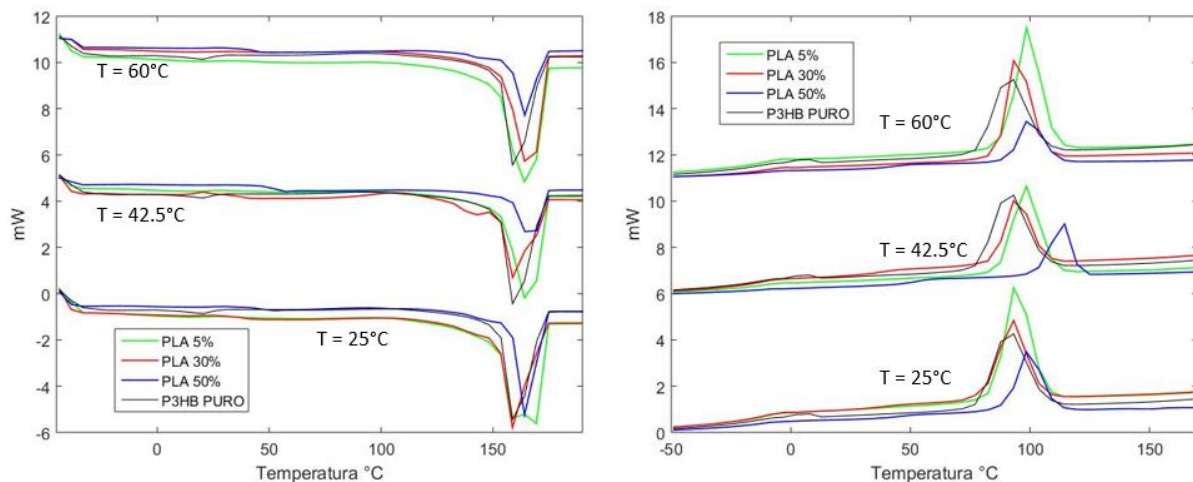


Por otro lado la **Figura 4-4** muestra los resultados obtenidos para el análisis DSC de las mezclas, inicialmente se puede ver que a medida que aumenta el porcentaje de PLA en la mezcla, disminuye la amplitud de los picos tanto de fusión (**Figura 4-4 Der.**) como de cristalización (**Figura 4-4 Izq.**), lo cuál es el resultado a esperar debido a que la naturaleza amorfa del PLA usado tiende a disminuir la cristalinidad de la mezcla, haciendo que la energía necesaria para la fusión y la cristalización sea menor [144], sin embargo para el caso en el que la concentración de PLA es de 5% se puede ver que la entalpía de cristalización es mayor que la del P3HB puro. La temperatura de incubación también tiene influencia sobre el perfil térmico obtenido mediante DSC para las mezclas P3HB/PLA, la **Figura 4-4 Izq.** muestra que los picos de fusión tienden a disminuir a medida que aumenta la temperatura de incubación, lo que significa que el índice de cristalinidad del material obtenido es inversamente proporcional a la temperatura a la que este se sintetiza, en

especial cuándo la concentración de PLA en la mezcla es de 50%. Este resultado concuerda con el obtenido mediante el TGA pues es un indicio de que el aumento en la temperatura influye positivamente en la miscibilidad de los polímeros involucrados en la mezcla, posiblemente debido a que un aumento de temperatura promueve la movilidad de las cadenas poliméricas y así mismo su entrecruzamiento.

Sin embargo, un indicio de que dos polímeros son miscibles entre si es que el material obtenido al final es posee una mezcla de las propiedades de los materiales de partida, en especial la temperatura de transición vítrea, en la **Figura 4-2** se puede ver claramente la temperatura de transición vítrea del PLA, que es ese cambio de pendiente que se da a 52.3°C, adicionalmente en la **Figura 4-4 Der.** se puede ver que el P3HB puro presenta un comportamiento similar a los 20.3°C. Las mezclas P3HB/PLA 50/50 wt% presentan el cambio de pendiente correspondiente a la transición vítrea a 52.3°C, al igual que el PLA puro, indicando que la mezcla a estas proporciones es inmisible, sin embargo, las mezclas P3HB/PLA 70/30 wt% y 95/5 wt% muestran un ligero desplazamiento de la temperatura de transición vítrea, indicando que a estas concentraciones la mezcla es miscible [145]. Es necesario tener en cuenta que es posible obtener un material de buena calidad a partir de una mezcla inmisible, la miscibilidad solo describe la manera en la que interactúan entre si las cadenas de los dos polímeros.

Figura 4-4: DSC para las mezclas P3HB/PLA a diferentes temperaturas, (Izq.) calentamiento, se pueden ver los picos de fusión de los materiales evaluados. (Der.) Enfriamiento, se pueden ver los picos de cristalización de los materiales evaluados.



Los materiales con concentraciones de PLA de 50% y 30% presentaban sin duda características mecánicas superiores a las del P3HB puro desde un punto de vista

cualitativo, las películas obtenidas con P3HB puro y con P3HB/PLA 95/5 wt% se quebraban fácilmente al aplicarles la menor fuerza, mientras que las que tenían alto contenido de PLA eran significativamente más resistentes a la flexión.

4.2.2.2 Mezclas P3HB – PEG

La figura **Figura 4-5** muestra el resultado del análisis TGA para las mezclas P3HB/PEG 400 a diferentes concentraciones y con diferentes temperaturas de incubación, se puede evidenciar como aumentar la concentración del PEG 400 en la mezcla disminuye la amplitud del pico relacionado con la pérdida de masa y aumenta el rango de temperatura de este al igual que las mezclas P3HB/PLA, sin embargo, en este caso se puede ver que la degradación térmica se da en dos etapas diferentes, especialmente para las mezclas con un 30% y 50% de PEG 400, esto es un indicio de la baja compatibilidad entre los dos polímeros a estas concentraciones pues aparentemente cada uno de los polímeros se degrada en etapas separadas, la etapa que se da a menor temperatura corresponde a la degradación del P3HB y la que se da mayor temperatura corresponde a la degradación del PEG 400, adicionalmente, las mezclas con 50% PEG 400 disminuyeron la temperatura de degradación del P3HB significativamente cuando las mezclas fueron realizadas a 25°C y 42.5°C, indicando un aumento en la inestabilidad térmica del material. Por otro lado, las mezclas P3HB/PEG 400 95/5 % parecen tener propiedades interesantes, pues generan aumento en la estabilidad térmica del material retardando levemente la degradación de la mezcla sin afectar su temperatura de degradación y adicionalmente, la degradación se da en una sola etapa debido a la baja concentración de PEG.

La **Figura 4-6** muestra los resultados obtenidos para los ensayos DSC de las mezclas P3HB/PEG 400 a diferentes concentraciones y diferentes temperaturas. La **Figura 4-6 (Izq.)** muestra la etapa de calentamiento, las muestras que contienen una concentración de PEG de 50% muestran dos eventos de fusión muy definidos, uno cerca de los 0°C, que corresponde a la temperatura de fusión del PEG y otro cerca de los 150°C que corresponde a la temperatura de fusión del P3HB, adicionalmente, se puede evidenciar que la amplitud del pico de fusión del PEG 400 es directamente proporcional a la temperatura de incubación y varía significativamente con esta. Las muestras con concentraciones de 30% y 50% de PEG presentan un punto de fusión más bajo, esto se debe al efecto plastificante del PEG400 sobre el P3HB el cuál debilita las fuerzas intramoleculares entre las cadenas

poliméricas, generando un cambio en el volumen libre del polímero que se ve reflejado en una disminución en la temperatura de fusión del material, este mismo fenómeno fue observado por Parra y su equipo de trabajo al caracterizar térmicamente mezclas P3HB/PEG [95]. Adicionalmente, el PEG que se cristaliza antes que el P3HB ($-5^{\circ}\text{C} < T_c < 5^{\circ}\text{C}$) genera cristales que reducen la movilidad de las cadenas de P3HB y retrasan la formación de lamelas (estructuras cristalinas), lo cual también se ve reflejado en una disminución en el punto de fusión del polímero [146].

Figura 4-5: Análisis TGA de las mezclas P3HB/PEG 400 a diferentes concentraciones y hechas a diferentes temperaturas.

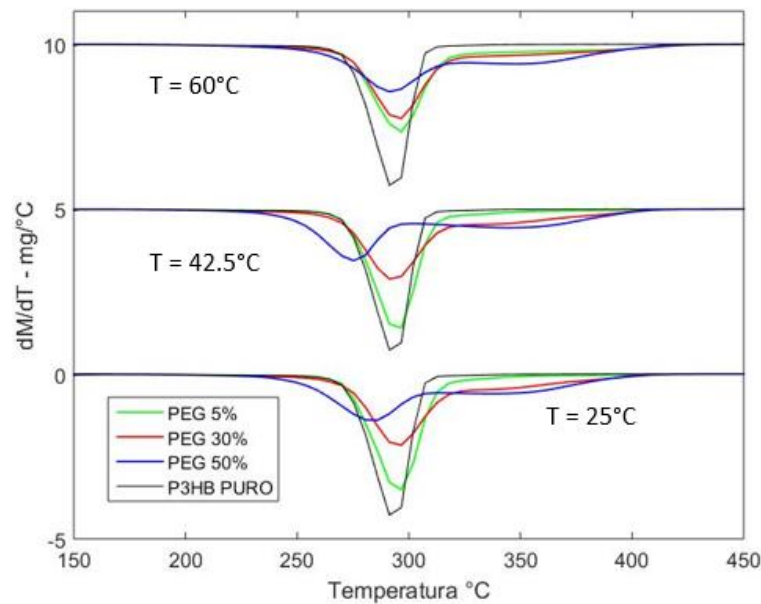
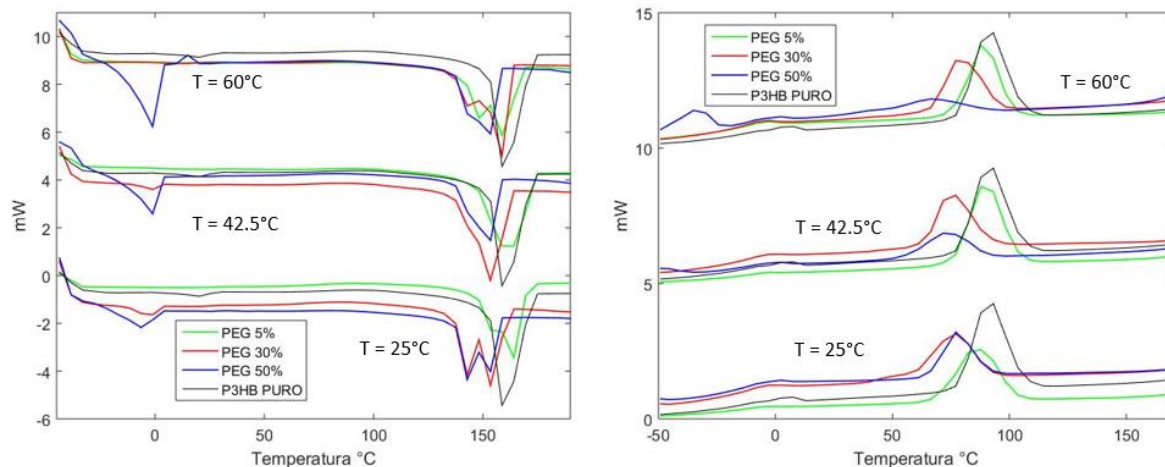


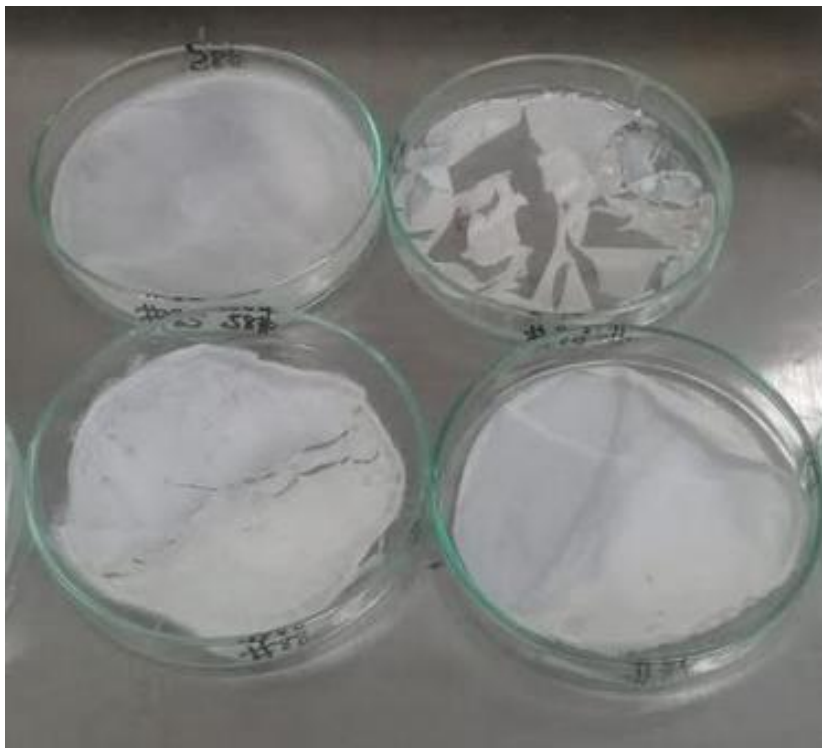
Figura 4-6: DSC para las mezclas P3HB/PEG400 a diferentes temperaturas, (Izq.) calentamiento, se pueden ver los picos de fusión de los materiales evaluados. (Der.) Enfriamiento, se pueden ver los picos de cristalización de los materiales evaluados.



Adicionalmente, la temperatura y entalpía de cristalización también disminuyó significativamente para todas las mezclas P3HB/PEG 400, en especial aquellas que presentaban las concentraciones más altas (50% y 30%), lo que es un indicio de la disminución del índice de cristalinidad del P3HB en la mezcla. En algunas de las gráficas de calentamiento se pueden ver 2 picos de fusión, se ha demostrado por otros investigadores que esto se debe a la presencia de P3HB con diferentes pesos moleculares en la muestra [147], producto de una degradación temprana del polímero durante la primera etapa de calentamiento del análisis con DSC.

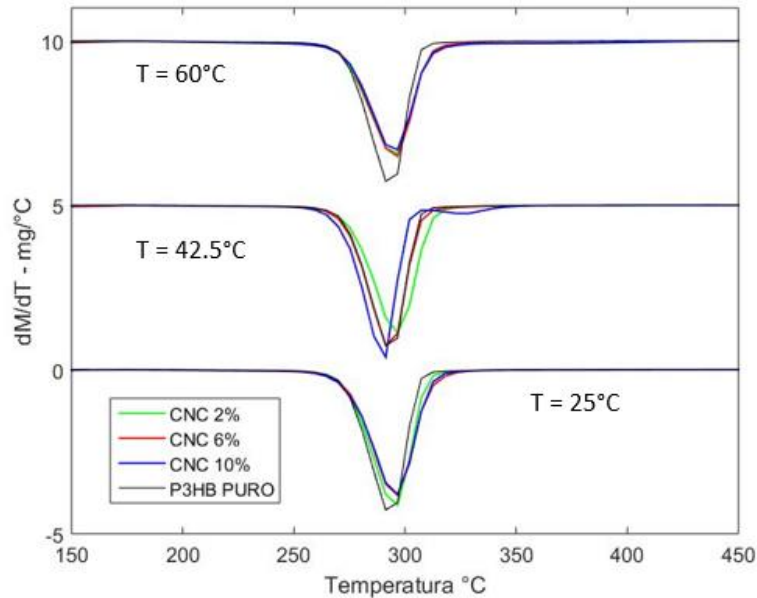
Todos los materiales obtenidos de las mezclas con PEG 400 son mecánicamente superiores que el P3HB puro, las mezclas con 5% y 30% mostraron mayor resistencia a la flexión, sin embargo, las películas con una concentración de 50% de PEG 400 presentaban mayor fragilidad, la **Figura 4-7** muestra la gama de calidades que se podían obtener al variar la concentración de los aditivos, demostrando lo fácil que era seleccionar las mejores combinaciones a través de un análisis cualitativo.

Figura 4-7: Materiales a base de P3HB con diferentes concentraciones de PEG y PLA, se nota claramente la diferencia en la calidad.



4.2.2.3 Mezclas P3HB – CNC

Figura 4-8: Análisis TGA de las mezclas P3HB/CNC a diferentes concentraciones y hechas a diferentes temperaturas.

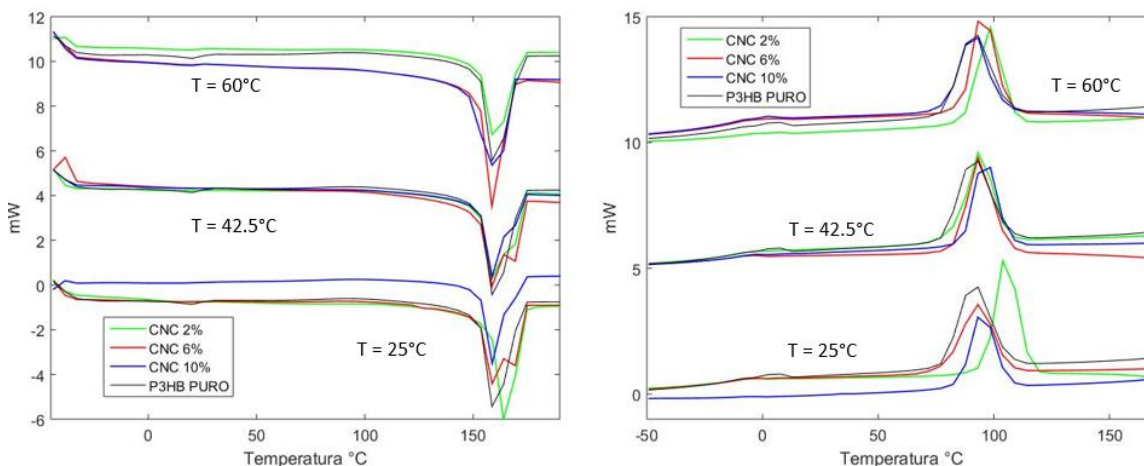


En comparación con los otros aditivos evaluados en este estudio, la adición de CNC es la que menos cambios genera en el perfil de degradación del P3HB, en la **Figura 4-8** se aprecia una ligera disminución en la amplitud del pico de degradación térmica y un aumento en el rango de temperatura, lo que es señal de una disminución en la velocidad de degradación del material, este fenómeno se puede ver con mayor claridad en el perfil térmico de las muestras obtenidas a una temperatura de incubación de 60°C. Adicionalmente, se ve un solo pico o evento de degradación en todos los análisis, indicando que el proceso de degradación se sigue llevando a cabo en una sola etapa a pesar de la incorporación de la celulosa [148].

La **Figura 4-9** muestra los resultados obtenidos del análisis con DSC de los materiales obtenidos al mezclar P3HB con CNC, no se aprecian diferencias significativas en la temperatura de fusión de los materiales obtenidos, los materiales con concentraciones de 6% y 10% de CNC presentan picos de fusión dobles o cambios significativos en la pendiente de fusión, lo cual se da debido a una baja homogeneidad en el tamaño de los cristales poliméricos o una amplia distribución de pesos moleculares producto de una degradación temprana durante la primera etapa de calentamiento del proceso de DSC. Con respecto a la temperatura de cristalización, se aprecia que tampoco existen

diferencias significativas entre las temperaturas y amplitudes de los picos reportados a excepción del obtenido con 2% de CNC a 25°C, esta muestra en particular presenta una temperatura y entalpía de cristalización más alta que las demás muestras, la ausencia de este comportamiento en el resto de los materiales obtenidos es un indicio de que existió algún error en la medición o en la preparación de esta muestra.

Figura 4-9: DSC para las mezclas P3HB/CNC a diferentes temperaturas, (Izq.) calentamiento, se pueden ver los picos de fusión de los materiales evaluados. (Der.) Enfriamiento, se pueden ver los picos de cristalización de los materiales evaluados.



Los materiales obtenidos de las mezclas con CNC parecían ser muy similares al P3HB de partida, no se evidenciaron cambios mecánicos ni de apariencia significativos en los materiales obtenidos después de un análisis cualitativo.

4.2.2.4 Mezclas Ternarias

Se prepararon las mezclas ternarias con las composiciones que se muestran en la **Tabla 4-2**, posteriormente, se evaluaron sus propiedades mecánicas de manera cualitativa y se seleccionaron las más interesantes para una caracterización térmica con TGA y DSC, la tabla x muestra las mezclas seleccionadas y su composición:

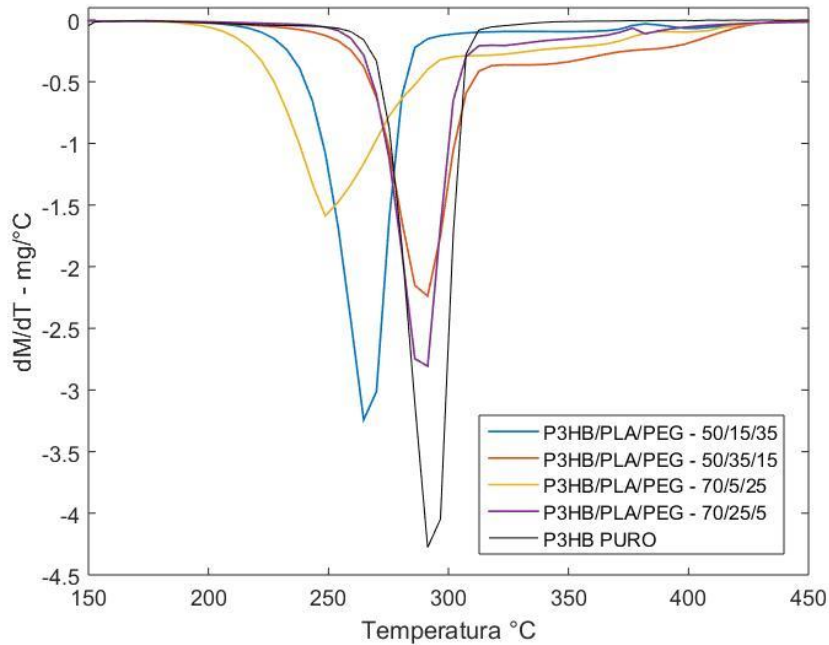
Tabla 4-4: Mezclas ternarias seleccionadas para la caracterización térmica

Número de Experimento	Componentes	Composición [wt%]
38	P3HB/PLA/PEG	50/15/35
39	P3HB/PLA/PEG	50/35/15
41	P3HB/PLA/PEG	70/5/25
42	P3HB/PLA/PEG	70/25/5
87	P3HB/PLA/CNC	50/48/2

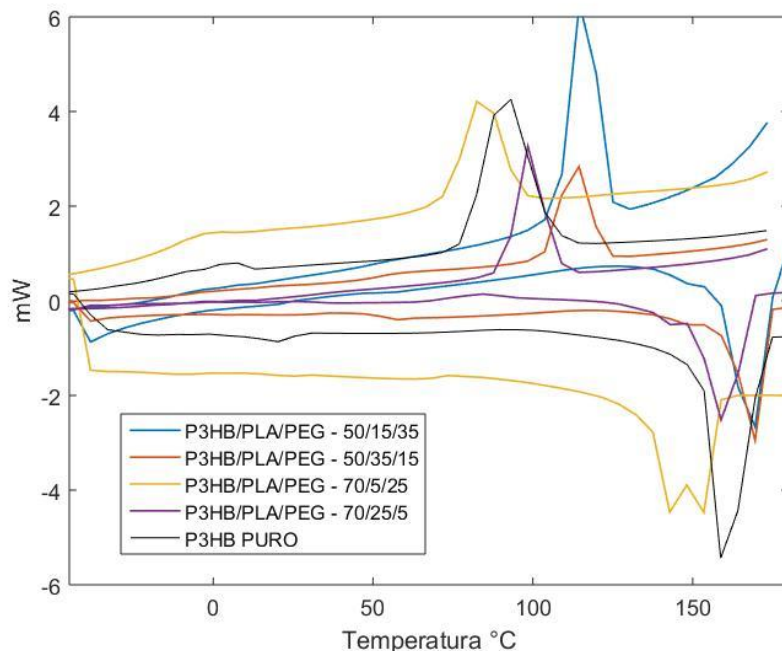
90	P3HB/PLA/CNC	50/40/10
133	P3HB/PEG/CNC	50/40/10
135	P3HB/PEG/CNC	50/48/2
138	P3HB/PEG/CNC	70/28/2

4.2.2.4.1 Mezclas P3HB/PLA/PEG

Figura 4-10: Resultados de TGA para las mezclas ternarias P3HB/PLA/PEG



Las mezclas P3HB/PLA/PEG son sin duda las más interesantes de todas debido a su alta resistencia a la flexión en comparación con el P3HB puro y la mayoría de las mezclas binarias. La **Figura 4-10** muestra el resultado obtenido de la caracterización con TGA para las mezclas P3HB/PLA/PEG, se puede ver que aquellas mezclas que poseen una proporción de PEG mayor a la de PLA presentan una disminución significativa en la temperatura de degradación, 248.7°C para el experimento 41 (P3HB/PLA/PEG 70/5/25 wt%) y 264.7°C para el experimento 38 (P3HB/PLA/PEG 50/15/35 wt%) contra una temperatura de degradación de 291°C para el P3HB puro y las otras mezclas P3HB/PLA/PEG, indicando una mayor inestabilidad térmica, este fenómeno se había visto en las mezclas P3HB/PEG con una concentración de PEG del 50%, esto quiere decir la incorporación de PLA a una mezcla P3HB/PEG es capaz de generar una desestabilización térmica así la concentración de PEG sea inferior al 50%.

Figura 4-11: Resultados de DSC para las mezclas ternarias P3HB/PLA/PEG

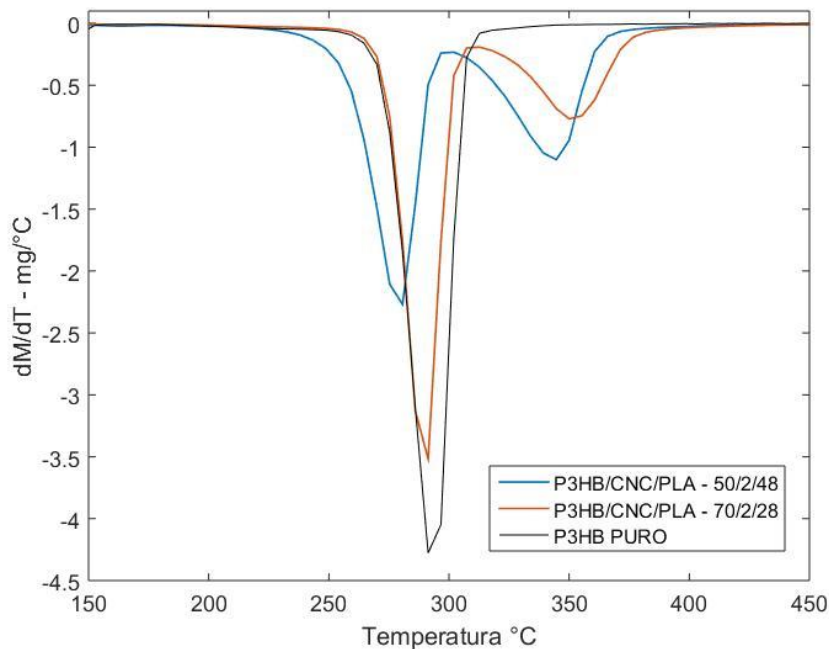
Por otro lado, las mezclas ternarias P3HB/PLA/PEG que poseen una cantidad mayor de PLA muestran una temperatura de degradación de 291°C, indicando que la incorporación de los aditivos no genera una pérdida de la estabilidad térmica. La **Figura 4-11** muestra el resultado obtenido para las mezclas ternarias P3HB/PLA/PEG del análisis DSC, las mezclas con mayor proporción de PLA no presentaron cambios importantes en la temperatura de fusión, sin embargo, la amplitud de los picos es significativamente menor, indicando una reducción significativa en el índice de cristalinidad del P3HB en la mezcla. La **Tabla 4-5** muestra los resultados obtenidos de la caracterización térmica de todas las mezclas ternarias P3HB/PLA/PEG, los mejores materiales obtenidos son aquellos que presentan un índice de cristalinidad (I.C.) bajo y una temperatura de degradación máxima (T_{dmax}) y temperatura de inicio de degradación (T_{d0}) altas, en este caso, las mezclas P3HB/PLA/PEG con concentraciones de 50/35/15 y 70/25/5 son los mejores materiales obtenidos.

Tabla 4-5: Resultados de la caracterización térmica para las mezclas ternarias P3HB/PLA/PEG

P3HB/PLA/PEG	T_m [°C]	T_c [°C]	ΔH_m [J/g]	I.C. [%]	T_{dmax} [°C]	T_{d0} [°C]
50/15/35	169.5	114.6	37.89	51.91	264.7	216.7
50/35/15	169.5	114.4	26.25	35.95	291.3	232.7
70/5/25	142.8	98.5	36.42	35.63	248.7	200.7
70/25/5	158.9	82.5	36.20	35.42	291.3	248.7
100/0/0	158.8	93.2	76.483	52.38	291.3	248.7

4.2.2.4.2 Mezclas Ternarias P3HB/PLA/CNC

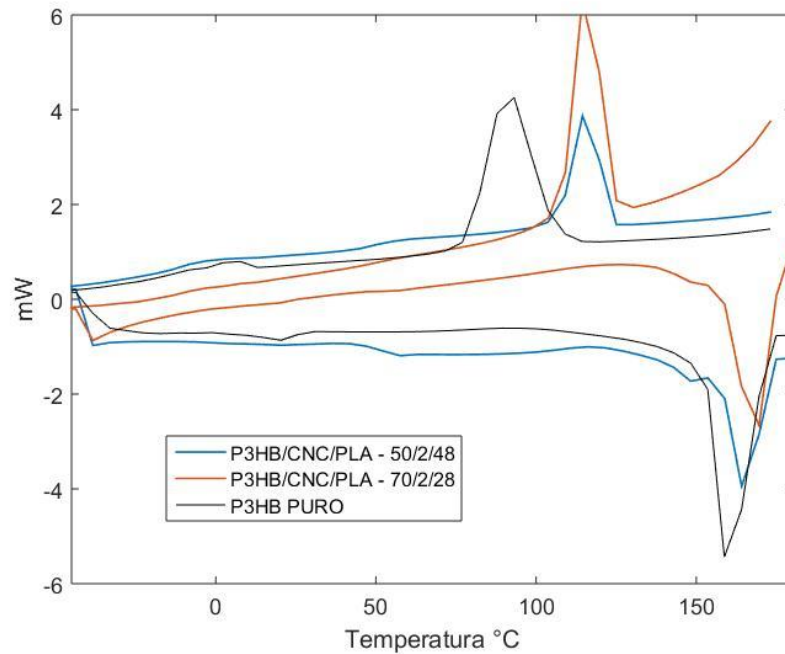
Figura 4-12: Resultados de TGA para las mezclas ternarias P3HB/PLA/CNC



Las mezclas P3HB/PLA/CNC no mostraron tan buenos resultados como las P3HB/PLA/PEG, de hecho, en comparación con las mezclas binarias P3HB/PLA tampoco son mejores, la incorporación de CNC a una matriz P3HB/PLA disminuye la compatibilidad entre el P3HB y el PLA, esto se puede ver claramente en los resultados obtenidos del análisis TGA (**Figura 4-12**) donde se ven dos eventos de degradación diferentes bien definidos, el primero (el de menor temperatura) corresponde a la degradación del P3HB y

el segundo a la degradación del PLA, mientras que los resultados de TGA obtenidos para las mezclas binarias P3HB/PLA muestran un solo evento de degradación.

Figura 4-13: Resultados de DSC para las mezclas ternarias P3HB/PLA/CNC



Adicionalmente, el análisis DSC revela el mismo resultado, pues los materiales obtenidos muestran un índice de cristalinidad para el P3HB muy similar al del material puro, mientras que, en las muestras binarias, las que tenían una concentración de PLA del 50% presentaban una disminución significativa en el índice de cristalinidad. Los dos materiales analizados presentan un aumento en la temperatura de fusión y de cristalización, lo cual es un comportamiento no deseado pues disminuye la ventana de procesamiento del material. Aunque los materiales obtenidos tienen propiedades mecánicas superiores a las del P3HB puro, no superan a los obtenidos con las mezclas P3HB/PLA/PEG.

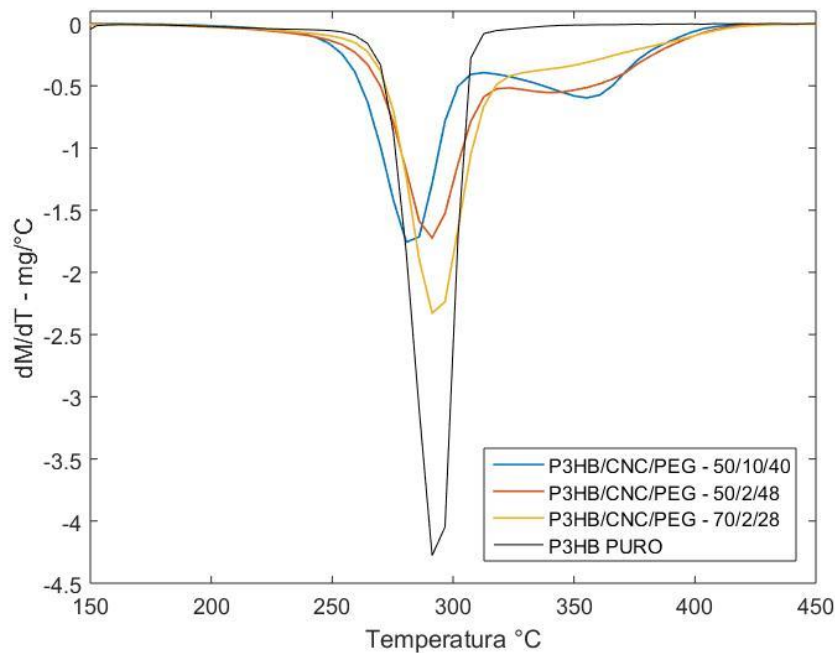
Tabla 4-6: Resultados de la caracterización térmica para las mezclas ternarias P3HB/PLA/PEG

P3HB/PLA/CNC	T_m [°C]	T_c [°C]	ΔH_m [J/g]	I.C. [%]	T_{dax} [°C]	T_{d0} [°C]
50/48/2	164.2	114.5	36.62	50.16	280.7	232.7
70/28/2	169.6	116.4	53.32	52.18	291.3	248.7
100/0/0	158.8	93.2	76.483	52.38	291.3	248.7

4.2.2.4.3 Mezclas Ternarias P3HB/PEG/CNC

La adición de CNC a la matriz P3HB/PEG genera un efecto similar al que genera en las matrices P3HB/PLA. Aunque los resultados de TGA obtenidos para las muestras binarias P3HB/PEG mostraban una degradación en dos etapas diferentes, el fenómeno es significativamente más notorio al agregar CNC a la formulación como lo muestra la **Figura 4-14**. Adicionalmente, se puede ver que la amplitud del segundo pico de degradación está relacionada con la cantidad de CNC en la muestra, el material cuya composición de P3HB/CNC/PEG es de 50/10/40 wt% posee un segundo pico con una mayor amplitud que el material con 50/2/48, indicando que entre mayor sea la concentración de CNC en el material, peor es la compatibilidad entre el P3HB y el PEG.

Figura 4-14: Resultados de TGA para las mezclas ternarias P3HB/PEG/CNC



La **Figura 4-15** muestra los resultados obtenidos para el análisis DSC de las mezclas ternarias P3HB/PEG/CNC, se puede ver que las muestras con 2% de CNC presentan doble pico de fusión, lo que es señal de una degradación temprana durante la primera etapa de calentamiento del DSC, adicionalmente, presentan temperaturas de fusión y de cristalización más bajas que el P3HB puro que es el efecto que se busca, pero la cristalinidad tiende a aumentar incluso más que la del P3HB puro, indicando que el material es mecánicamente inferior al P3HB puro como se muestra en la **Tabla 4-7**.

Figura 4-15: Resultados de DSC para las mezclas ternarias P3HB/PEG/CNC

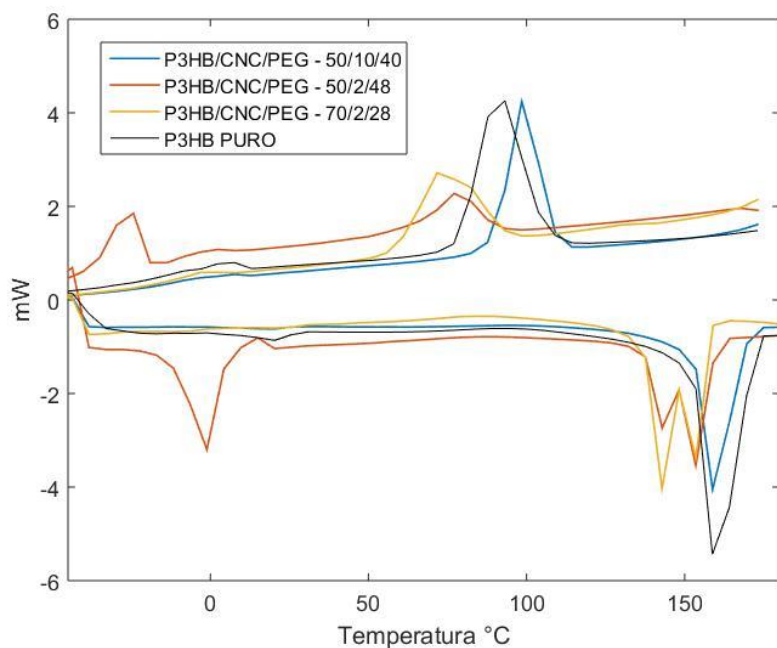


Tabla 4-7: Resultados de la caracterización térmica para las mezclas ternarias P3HB/PEG/CNC

P3HB/PEG/CNC	T_m [°C]	T_c [°C]	ΔH_m [J/g]	I.C. [%]	T_{dmax} [°C]	T_{d0} [°C]
50/40/10	158.8	98.5	42.18	57.78	280.7	222
50/48/2	153.5	77.08	40.67	55.71	291.3	216.7
70/28/2	142.8	71.76	43.80	60.01	291.3	227.3
100/0/0	158.8	93.2	76.483	52.38	291.3	248.7

4.2.3 Análisis de la caracterización mecánica

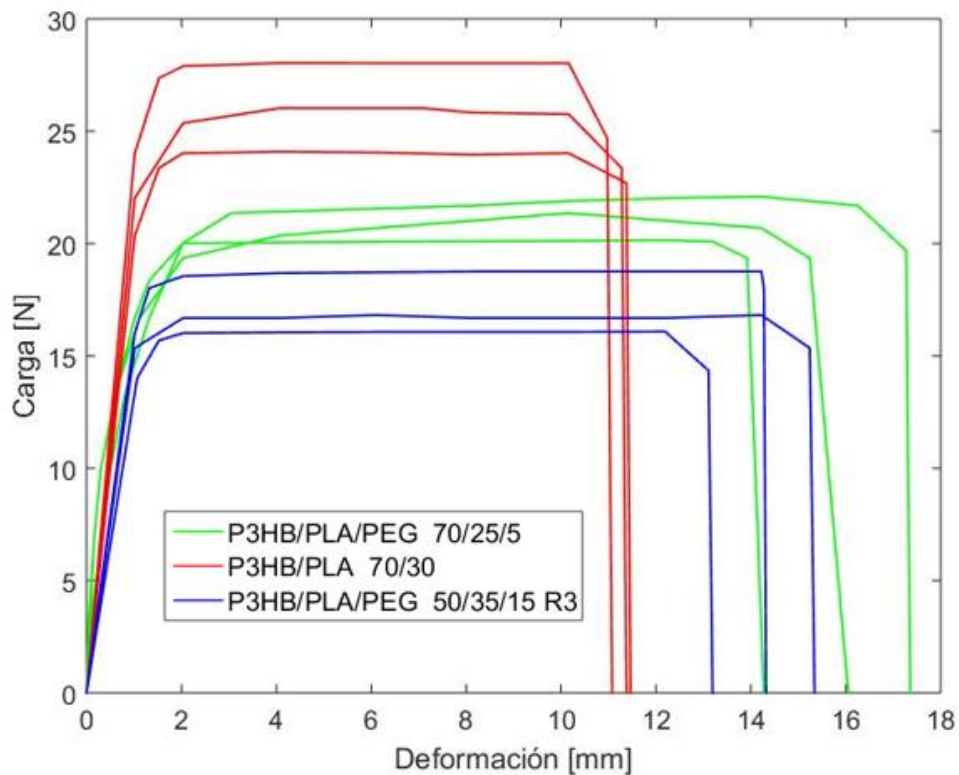
Se seleccionaron 3 materiales diferentes para la evaluación mecánica de acuerdo con los resultados obtenidos de la caracterización térmica y a sus propiedades mecánicas aparentes, la mezcla binaria P3HB/PLA 70/30 wt%, la mezcla ternaria P3HB/PLA/PEG 70/25/5 wt% y la mezcla ternaria P3HB/PLA/PEG 50/35/15 wt%. Para cada mezcla se hicieron 5 ensayos según la norma ASTM 882, y se seleccionaron los 3 mejores para hacer el análisis de cada material, la **Figura 4-16** muestra los resultados obtenidos, se puede ver que la repetibilidad de los experimentos es buena, y que cada material tiene una tendencia

en cuanto a la carga máxima que soporta y la elongación máxima que se genera a esta carga.

Tabla 4-8: Promedio de los resultados obtenidos de los ensayos de elongación para cada una de las muestras analizadas.

Muestra	Deformación [mm]	Carga [N]	Tensión de Rotura [MPa]	Elongación Máxima [%]
P3HB/PLA/PEG 70/25/5	15.90	21.20	10.05	15.90
P3HB/PLA/PEG 50/35/15	14.29	17.22	8.16	14.29
P3HB/PLA 70/30	11.31	26.05	12.35	11.31

Figura 4-16: Resultados de los ensayos mecánicos de elongación para los 3 materiales seleccionados



La **Tabla 4-8** muestra el promedio de los resultados obtenidos, si se comparan los resultados obtenidos para las mezclas con los obtenidos para el P3HB puro (**Tabla 3-10**),

evidencia una importante mejora en las propiedades mecánicas del material, especialmente en la elongación máxima. La mezcla binaria P3HB/PLA 70/30 wt% presenta la mayor tensión de rotura con un valor de 12.35 MPa, indicando que esta formulación es la que tiene menor fragilidad, y es capaz de soportar una mayor fuerza antes de fallar, al comparar este resultado con el obtenido para la formulación ternaria P3HB/PLA/PEG 70/25/5 wt% (cuya concentración composición es bastante similar a la de la mezcla binaria) se encuentra un aumento significativo en la elongación máxima pero una disminución en la tensión de rotura, el cuál es un efecto común de los plastificantes y ha sido reportado por otros investigadores al evaluar las propiedades mecánicas de mezclas P3HB/PEG [137] [95]. Aumentar más de 5% la cantidad del plastificante (PEG 400) en la formulación generó una disminución en la tensión de rotura como es de esperarse, pero adicionalmente generó una disminución en la elongación máxima, indicando que existe un límite en la concentración de PEG en la mezcla para que este favorezca la elongación máxima, una vez sobrepasado el límite, esta decrece probablemente por la baja compatibilidad entre los polímeros y el plastificante que puede generar una separación parcial de fases [149].

Los resultados obtenidos de la caracterización mecánica y la caracterización térmica demuestran que es posible mejorar las propiedades del P3HB usando diferentes aditivos, con la adición de PLA y PEG se logró disminuir el índice de cristalinidad del polímero en la mezcla y retardar levemente su velocidad de degradación térmica amentando su ventana de procesamiento, adicionalmente la elongación de ruptura mejoró hasta un 150% en comparación con la del P3HB puro, lo cual resulta muy beneficioso a la hora de moldear el material usando técnicas como el soplado. La tensión de rotura también aumento en aproximadamente un 50%, lo que significa que los nuevos materiales formulados son significativamente menos frágiles que el P3HB puro. Las mejoras mencionadas anteriormente abren una nueva gama de posibilidades para las aplicaciones de estos materiales a base de P3HB en la industria de los empaques y en la industria biomédica principalmente porque estas mejoras facilitan el procesamiento del material.

5 Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- La selección inicial de solventes mediante el modelo empírico desarrollado por Hansen es de gran utilidad para reducir significativamente la cantidad de opciones a tener en cuenta, sin embargo, el estudio encontró que la proximidad entre el parámetro de solubilidad de un polímero y un solvente no permite llegar a un veredicto concluyente sobre la solubilidad entre estos. Por ejemplo, según el análisis del diagrama de solubilidad de Bagley, el P3HB posee una solubilidad mayor en el acetato de butilo que en el cloroformo debido a la distancia entre este y los solventes en el diagrama, sin embargo, se demostró que la solubilidad del P3HB en el cloroformo es significativamente mayor en todas las temperaturas y concentraciones evaluadas, indicando que es necesario corroborar los resultados experimentalmente o implementar aproximaciones teóricas más robustas, pues de los 4 solventes evaluados experimentalmente, solo dos fueron capaces de solubilizar el P3HB, el ácido acético y el acetato de butilo.
- Mediante la evaluación experimental de la solubilidad del P3HB en varios solventes se demostró que a las condiciones de temperatura y relación polímero/solvente adecuadas el P3HB es altamente soluble en el ácido acético y levemente soluble en el acetato de butilo. La solubilidad del P3HB en ácido acético a temperaturas superiores a los 90°C es de aproximadamente 0.08 g/mL comparada contra 0.085 g/mL para el cloroformo a temperatura ambiente (25°C), demostrando que es un solvente capaz de generar una eficiencia similar al cloroformo a la hora de solubilizar el P3HB. Adicionalmente, el acetato de butilo también demostró una capacidad de solubilizar el P3HB significativamente mayor a los otros

solventes evaluados llegando a valores de 0.03 g/mL a temperaturas superiores a los 100°C. De resto, los otros solventes evaluados no superaron los 0.01 g/mL en ninguna de las temperaturas ni relaciones polímero solvente evaluadas. Este hallazgo sitúa al ácido acético como un solvente viable para la extracción y purificación del P3HB. Adicionalmente, el análisis ANOVA demostró que los factores más influyentes sobre la solubilidad del P3HB en los solventes evaluados son la relación polímero solvente y la temperatura, el tiempo de incubación demostró no tener efectos significativos en los niveles evaluados.

- El proceso de extracción del P3HB de la matriz celular de *Burkholderia cepacia* B27, con ácido acético, resultó tener una eficiencia similar a la obtenida en la extracción con cloroformo. En promedio, el cloroformo tiene un rendimiento de 59.8% en la extracción, es decir que, de la biomasa tratada con cloroformo, se extrae una cantidad de polímero equivalente al 59.8% de la biomasa inicial. Con el ácido acético el rendimiento es de 54.8%, es decir el 91.6% del rendimiento del cloroformo. Este resultado es mayor a los reportadores por otros investigadores. Adicionalmente el polímero obtenido usando la extracción con ácido acético presenta unas propiedades térmicas y un peso molecular muy similares a obtenido con cloroformo, indicando que la calidad del material no se ve seriamente afectada durante el proceso, que es uno de los problemas principales reportados para la extracción de polihidroxialcanoatos de origen bacteriano con procedimientos alternativos.
- El proceso óptimo para la extracción del P3HB de la matriz celular de *Burkholderia cepacia* B27 usando extracción con solvente con ácido acético o cloroformo está compuesto de varias operaciones unitarias cuyo orden en el proceso afecta significativamente el rendimiento final de este. Después de evaluar varias rutas diferentes seleccionadas a partir de una revisión bibliografía y de la experiencia previa de otros investigadores que han trabajado en el proyecto, se concluyó que el orden óptimo de las operaciones para una extracción eficiente es el siguiente:

1. Digestión química con SDS.
 2. Centrifugación para concentración de la biomasa rica en polímero.
 3. Secado de la biomasa concentrada en un horno de bandejas.
 4. Extracción con solvente (ya sea ácido acético o cloroformo).
 5. Lavados finales con metanol para remover residuos de aceite que no fueron removidos durante el proceso de extracción.
- La precipitación con etanol resultó ser una técnica eficiente para la concentración del material, fue posible precipitar una gran cantidad de sólidos del medio de cultivo y adicionalmente retirar una parte de las impurezas presentes en la biomasa, lo cual se pudo evidenciar por la coloración del etanol después del proceso de precipitación. Sin embargo, la cantidad de solvente necesaria para que el proceso sea eficiente es muy alta, y hace que llevar esta técnica a una escala más grande sea económicamente inviable debido a los grandes volúmenes de etanol que serían necesarios para la precipitación.
 - Se hizo una caracterización completa del P3HB producido por *Burkholderia cepacia* B27 en un biorreactor de 100 L y purificado usando la técnica con cloroformo y metanol debido a la calidad del material obtenido. La caracterización térmica mostró resultados muy similares a la muestra comercial de Sigma Aldrich en cuanto a la temperatura de fusión, de cristalización y el perfil de degradación térmica. El espectro infrarrojo también se comparó con el de la muestra comercial y se concluyó que ambas muestras pertenecen a la misma especie química, poli(3-hidroxibutirato). El peso molecular viscoso obtenido para el P3HB es $8.5 \times 10^5 Da$ y concuerda con los resultados obtenidos por otros investigadores usando la misma técnica.
 - El ensayo de compostaje demostró que, bajo las condiciones de humedad y actividad microbiana adecuadas, el P3HB es capaz de degradarse en un 90% en tan solo 6 meses, su degradación es significativamente más rápida que la de los polímeros convencionales. Sin embargo, las propiedades mecánicas del polímero

obtenido son inferiores a las reportadas en la literatura, lo cuál puede ser efecto del microorganismo utilizado, la escala a la que se hacen las fermentaciones o alguna etapa del proceso de purificación. Estas características mecánicas, principalmente la tensión de rotura, son la razón para que el P3HB puro no tenga muchas aplicaciones comerciales, y sea necesario modificarlo mediante la incorporación de aditivos

- Varias de las mezclas evaluadas a base de P3HB muestran mejoras en las propiedades del P3HB que se pueden evidenciar claramente al hacer un análisis cuantitativo a los materiales obtenidos, en general, las muestras preparadas a mayores temperaturas (42.5°C y 60°C) presentaron efectos más notorios sobre las propiedades térmicas de los materiales finales. Las mezclas P3HB/PLA con concentraciones de PLA del 50% muestran una reducción significativa sobre el índice de cristalinidad del material obtenido, está se evidencia en la disminución de los picos de fusión y de cristalización, adicionalmente, los materiales con concentraciones de PLA superiores a 30% muestran una reducción en la velocidad de degradación térmica comparada con la del P3HB puro. Se encontró que las mezclas P3HB/PLA 50/50 wt% son inmiscibles. Las muestras P3HB/PEG400 tienen propiedades térmicas notoriamente diferentes a las del P3HB puro, los materiales obtenidos con 5% y 30% PEG presentan un retraso en la degradación térmica similar al obtenido con 50% PLA, sin embargo, cuándo la composición de PEG 400 en la mezcla es de 50% la temperatura de degradación térmica disminuye significativamente reduciendo la estabilidad térmica del material y su ventana de proceso. Los análisis de DSC demostraron que el PEG tiende a disminuir el índice de cristalinidad de la muestra gracias a su efecto plastificante, en algunos casos se presentaron picos dobles de fusión que son una señal de degradación térmica prematura del P3HB. Finalmente, los materiales obtenidos al mezclar P3HB y CNC no mostraron cambios significativos en sus propiedades térmicas con respecto al P3HB puro, demostrando una baja compatibilidad entre los dos materiales probablemente generada por impurezas provenientes de la celulosa de grado industrial utilizada para los experimentos.
- Las mezclas ternarias resultaron ser una alternativa bastante interesante pues con estas es posible combinar un poco de las propiedades de cada una de las materias

primas para obtener un material funcional. Las muestras ternarias con CNC presentaron una compatibilidad más baja que sus homólogos binarios sin celulosa. Esta disminución en la compatibilidad se evidenció con la presencia de múltiples etapas de degradación en los resultados obtenidos para el TGA. Las mezclas ternarias P3HB/PLA/PEG con concentraciones de PEG superiores a las de PLA mostraron una disminución en la temperatura de degradación, resultado que concuerda con el obtenido para las muestras binarias P3HB/PEG, las muestras ternarias con mayor concentración de PLA que de PEG mostraron una buena estabilidad térmica, un índice de cristalinidad reducido y las mejores propiedades mecánicas después de un análisis cualitativo, es por esta razón que fueron seleccionadas para el análisis mecánico de tensión.

- Los ensayos de tensión demostraron que los materiales con concentraciones mayores de PLA tienden a tener mayor tensión de rotura mientras que los materiales con concentraciones mayores de PEG 400 pierden tensión de rotura y ganan elongación máxima. En todos los materiales evaluados mecánicamente se encontró una mejora significativa en las propiedades mecánicas con respecto al P3HB puro que les permiten tener una ventana de procesamiento más amplia, facilitando su moldeo por las técnicas convencionales como la extrusión la inyección y el soplado y así lograr un mayor rango de aplicaciones. Las características mecánicas de la mezcla P3HB/PLA 70/30 wt%, que presenta un valor alto de tensión de rotura, la sitúan como una posible candidata para aplicaciones estructurales, empaques que requieran rigidez y dureza, mientras que la mezcla P3HB/PLA/PEG 50/35/15 que presenta una mayor elongación de rotura, puede ser usada para aplicaciones que requieran de una mayor flexibilidad como recubrimientos y películas.

5.2 Recomendaciones

- El proceso evaluado para la extracción y purificación del P3HB utilizando ácido acético evita la utilización de cloroformo, disminuyendo significativamente el impacto ambiental y a la salud generado por los grandes volúmenes de solventes halogenados utilizados, sin embargo, este nuevo proceso requiere de grandes cantidades de energía para elevar la temperatura del ácido acético a su

temperatura óptima de extracción que es de 90°C. En futuras investigaciones es importante evaluar los costos energéticos del proceso para determinar si el proceso permite obtener un material competitivo en el mercado. Adicionalmente se requiere evaluar diferentes formas de integración energética que permitan reducir el costo del proceso, por ejemplo, las altas temperaturas requeridas para la esterilización de los equipos necesarios para la fermentación podrían ser utilizadas para precalentar el ácido acético y así reducir el costo energético del proceso.

- Se recomienda evaluar técnicas que permitan facilitar la extracción y purificación del polímero, en la literatura se habla de la aplicación de enzimas o inclusive de la modificación genética de las cepas bacterianas para facilitar la lisis celular al final del proceso. Esta mejora podría tener un impacto positivo sobre los volúmenes de solventes usados durante la extracción y purificación del P3HB y más globalmente sobre la eficiencia del proceso en general.
- La precipitación de los sólidos del caldo fermentado es una opción bastante interesante para la separación de la biomasa en la primera etapa del proceso. Se han reportado en otras investigaciones que para la purificación de macromoléculas de origen biológico es posible utilizar técnicas de precipitación que tienen como principio la modificación del pH de la solución para generar la precipitación isoelectrica de las macromoléculas-, en este caso la biomasa y el biopolímero.
- Durante el desarrollo de la investigación, uno de los cuellos de botella fue el proceso de filtración para separar la biomasa insoluble de las soluciones polímero solvente, esta etapa en general podía tardar varios días si se estaba purificando el material obtenido de una fermentación de 100L. Se recomienda encontrar una manera más eficiente de llevar a cabo el proceso de filtración para esta escala de trabajo, con el fin de disminuir significativamente el tiempo necesario para precipitar un lote, como una filtración por prensado en un filtro de hojas.
- Todas las mezclas poliméricas estudiadas se realizaron mediante la metodología de solvent casting, la cual es inviable a gran escala debido a los volúmenes de

solvente necesarios. En futuras investigaciones se pueden investigar las propiedades mecánicas y térmicas de las mezclas sintetizadas usando otro tipo de técnicas como la extrusión o la mezcla fundida, que son los procedimientos usualmente utilizados a nivel industrial

A. Anexo: Condiciones de operación para la caracterización de biopolímeros de tipo PHA y sus mezclas usando TGA y DSC.

TGA – Análisis Termogravimétrico

Mediante la técnica de TGA se cuantifica el cambio de masa de una muestra a medida que aumenta la temperatura en una atmosfera controlada. En el caso del P3HB se hace un barrido de temperatura desde 30°C hasta 500°C con una rampa de 10°C/min (ver **Figura 5-1**), adicionalmente, en la cámara entra un flujo de 50 mL/min de N₂ para evitar reacciones de combustión. El ensayo se lleva a cabo en el equipo TGA/DSC 1 STAR System de Mettler Toledo del laboratorio de polímeros de Ingeniería Química de la Universidad Nacional. Después de llegar a los 500°C es necesario llevar la cámara a 1000°C y dejarla a esta temperatura por 10 minutos, esto con el objetivo de degradar los residuos de masa que queden en el crisol dónde inicialmente estaba la muestra, para agilizar el proceso, este último aumento de temperatura se lleva a cabo a 50°C/min. Las muestras deben pesar entre 5 y 15 mg, y se ponen en un crisol de alúmina que es posteriormente introducido en la cámara del equipo. Después de llegar a los 1000°C, es necesario esperar a que la temperatura de la cámara vuelva a bajar hasta 30°C para iniciar una nueva réplica, esto puede tardar entre 40 y 50 minutos.

DSC – Calorimetría Diferencial de Barrido

El ensayo se realiza mediante una rampa de temperatura desde 30°C hasta 200°C a 30°C/min, para borrar la huella térmica del material, posteriormente se reduce la temperatura desde 200°C hasta -50°C a -20°C/min y finalmente, se genera un nuevo aumento de temperatura hasta 200°C con una rampa de 10°C/min. Las muestras se ponen en crisoles de alúmina de 40 μg y se sellan con un dispositivo especial. Las muestras deben pesar entre 2 y 4 mg y cada ensayo dura aproximadamente 55 minutos. Se hicieron pruebas con el polímero purificado con una muestra de P3HB comercial de Sigma Aldrich.

Figura 5-1: Perfil de temperatura usado para los ensayos de TGA

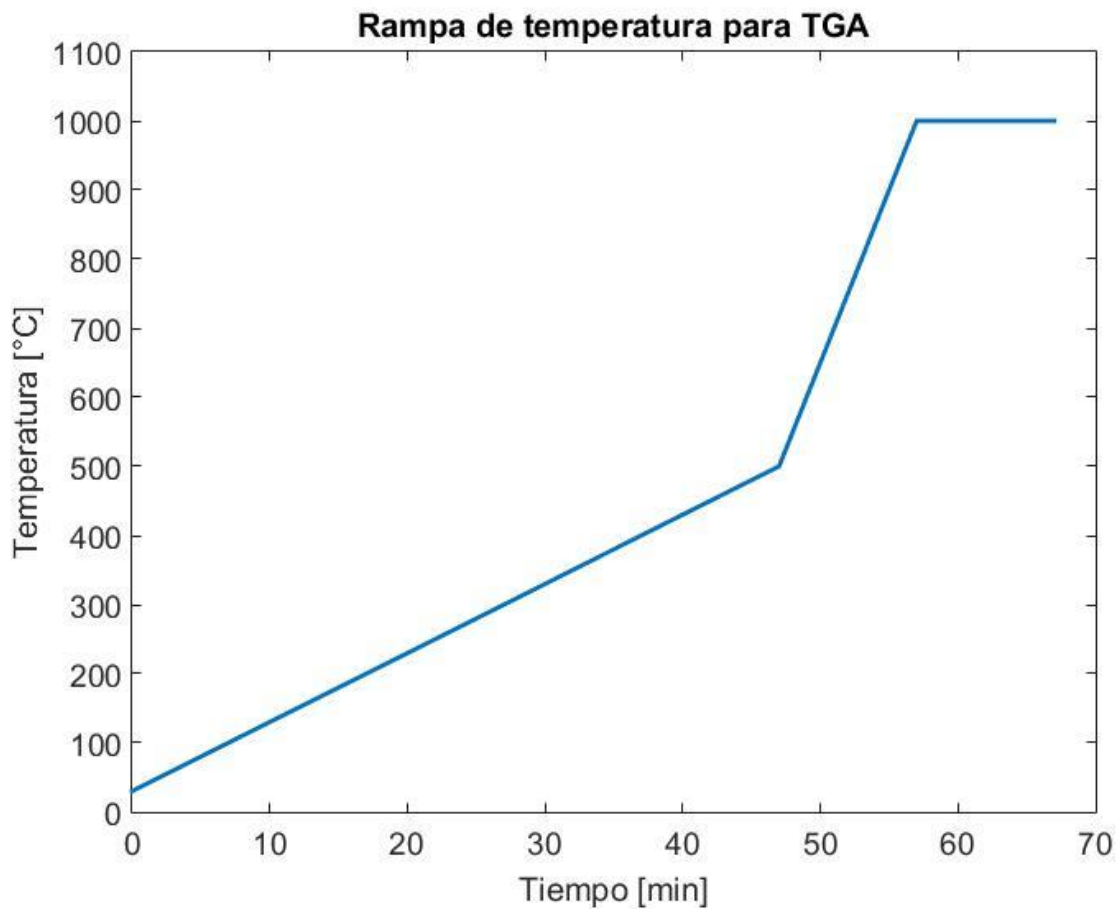
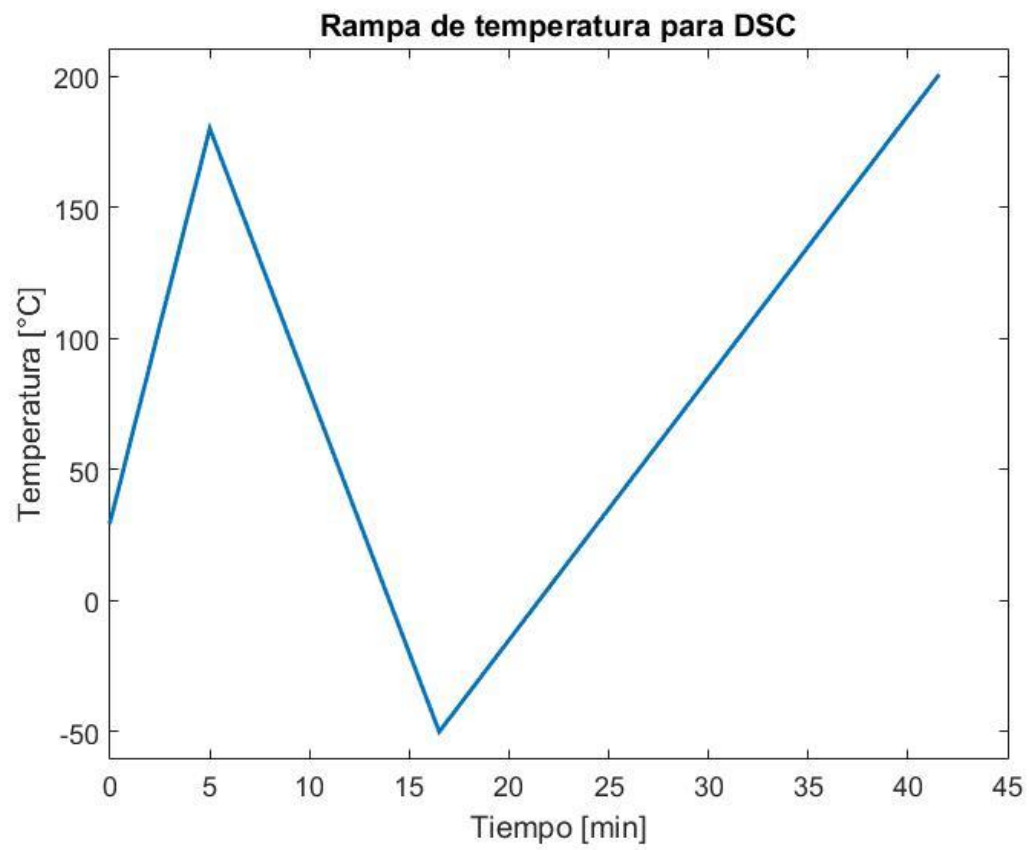


Figura 5-2: Perfil de temperatura para los ensayos de DSC

B. Anexo: Profundización sobre la utilización de los parámetros de solubilidad de Hansen

El concepto de parámetro de solubilidad (δ) fue inicialmente propuesto por Hildebrand y Scott en 1950 [150], este se define como la raíz cuadrada de la densidad de energía cohesiva de un solvente como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\delta = \sqrt{E/V}$$

Dónde E es la energía de vaporización del solvente, y V su volumen molar. La aproximación de Hildebrand y Scott estaba limitada solo a soluciones regulares, y no tenía en cuenta la asociación entre moléculas como las interacciones polares y los puentes de hidrógeno, los cuales sin duda alguna afectan la solubilidad de un soluto en un solvente. Por esta razón, Charles Hansen propuso en su tesis doctoral en 1967 una nueva manera de estimar la solubilidad, la cual se basa en que la energía de vaporización de un solvente está compuesta de varias partes individuales, las fuerzas de dispersión (atómicas), las fuerzas dipolo – dipolo (moleculares), y los puentes de hidrógeno (intercambio de electrones) [151]. De esta manera, Hansen dividió el parámetro de solubilidad de Hildebrand en 3 parámetros diferentes, uno para cada tipo de interacción molecular:

$$\delta^2 = \delta_D^2 + \delta_P^2 + \delta_H^2$$

Dónde δ_D , δ_P y δ_H son los parámetros de solubilidad de Hansen (HSPs) para las interacciones de dispersión, las interacciones polares y las interacciones debido a la presencia de puentes de hidrógeno respectivamente. La teoría de Hansen dice que para que un polímero y un solvente tengan afinidad entre si (sean solubles) deben tener

parámetros de solubilidad similares, adicionalmente, se pueden usar los tres parámetros de solubilidad como las coordenadas de un punto en un plano tridimensional, y de esta manera, evaluar la cercanía que existe entre los HSPs de un solvente y un soluto. Por lo general, el punto generado por los HSPs de un polímero, es usado como centro de una esfera de radio R_0 , adicionalmente, se grafican los puntos de los solventes que se desean evaluar, aquellos que caigan dentro de la esfera, son los que tienen una mayor afinidad por el polímero en cuestión, es decir que para que haya la afinidad necesaria para que un polímero se solubilice en un solvente, se debe cumplir que al graficar sus HSPs en un plano tridimensional, la distancia entre los puntos sea menor a R_0 . Teniendo en cuenta lo anterior, Hansen estableció que para que haya solubilidad en sistema polímero-solvente, se debe cumplir el siguiente criterio [152]:

$$R_0 = \sqrt{4(\delta_{DP} - \delta_{DS})^2 + (\delta_{PP} - \delta_{PS})^2 + (\delta_{HP} - \delta_{HS})^2} \leq R_a$$

Dónde R_0 es la distancia modificada entre un polímero y un solvente, el valor de esta distancia siempre debe ser menor al radio de afinidad de la esfera R_a para que haya afinidad entre el polímero y el solvente. El valor de R_a puede variar dependiendo del sistema analizado, pero por lo general se toma como 5.

Teniendo en cuenta lo anterior, se calcularon los parámetros de solubilidad del P3HB y se compararon con los de los solventes seleccionados. Los parámetros de solubilidad usados se obtuvieron del libro “*Hansen solubility parameters: A user’s Handbook*” escrito por Charles Hansen [152].

Estimación de los parámetros de solubilidad de Hansen (HSP) para el P3HB

Los parámetros de solubilidad fueron calculados usando el método de contribución de grupos propuesto por Hoftyzer y Van Krevelen. Inicialmente, se debe hacer la división de la molécula monomérica del P3HB en sus grupos funcionales como se muestra en la **Ilustración 1**. Adicionalmente, es necesario calcular el valor del volumen molar del polímero, para esto se asume una densidad $\rho_{P3HB} = 1.177 \text{ g/cm}^3$ y una masa molar de $MW_{P3HB} = 86.09 \text{ g/mol}$ [153], entonces:

$$V_{P3HB} = \frac{MW_{P3HB}}{\rho_{P3HB}} = \frac{86.09 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{1.177 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}} = 73.1436 \frac{\text{cm}^3}{\text{mol}}$$

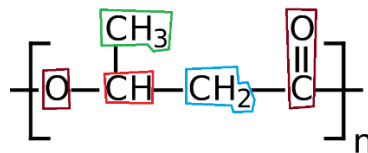


Ilustración 1 División de la unidad monomérica del P3HB en sus 4 grupos funcionales: CH_3- , $CH <$, $-CH_2-$, $-COO-$

Usando el volumen molar, los valores de la **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y las ecuaciones de Hoftzyer y Van Krevelen, se calcularon los 3 parámetros de solubilidad de Hansen como se muestra a continuación:

$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{V} = \frac{390 + 420 + 270 + 80}{73.1436} = 15.859 \text{ MPa}^{\frac{1}{2}}$$

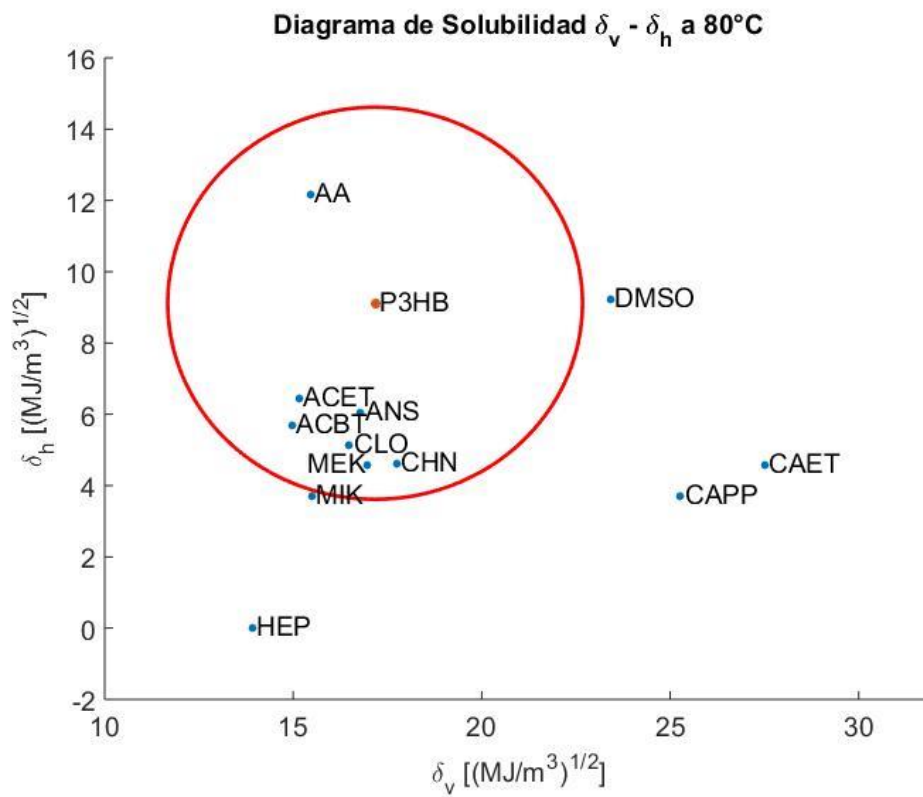
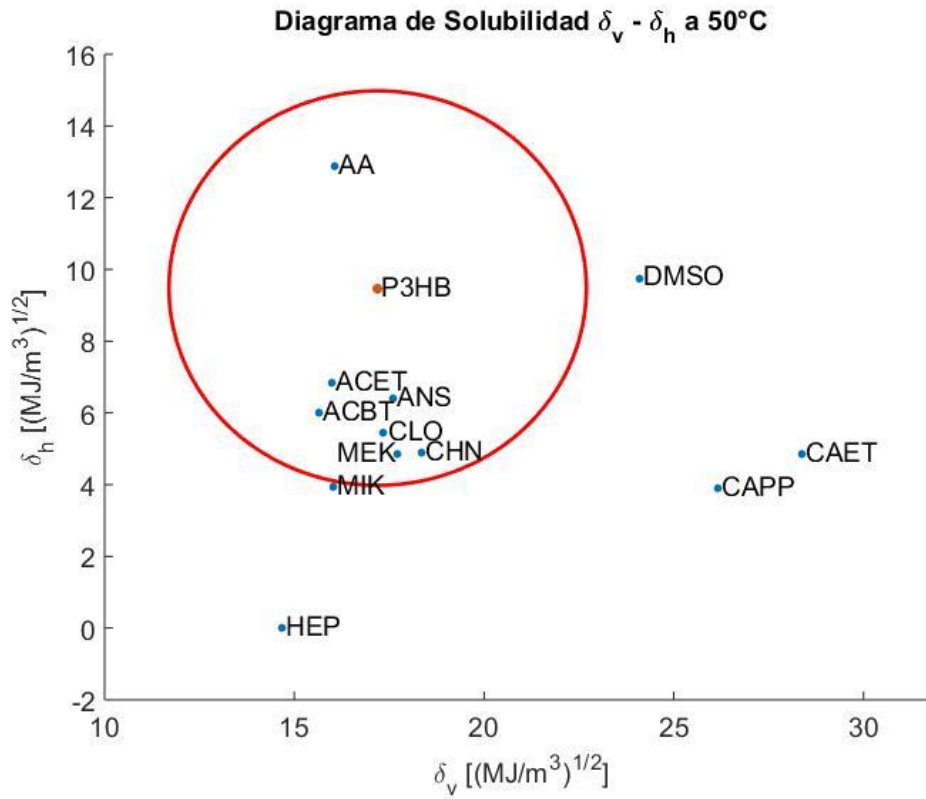
$$\delta_p = \frac{\sqrt{\sum F_{pi}^2}}{V} = \frac{\sqrt{490^2 + 0^2 + 0^2 + 0^2}}{73.1436} = 6.699 \text{ MPa}^{\frac{1}{2}}$$

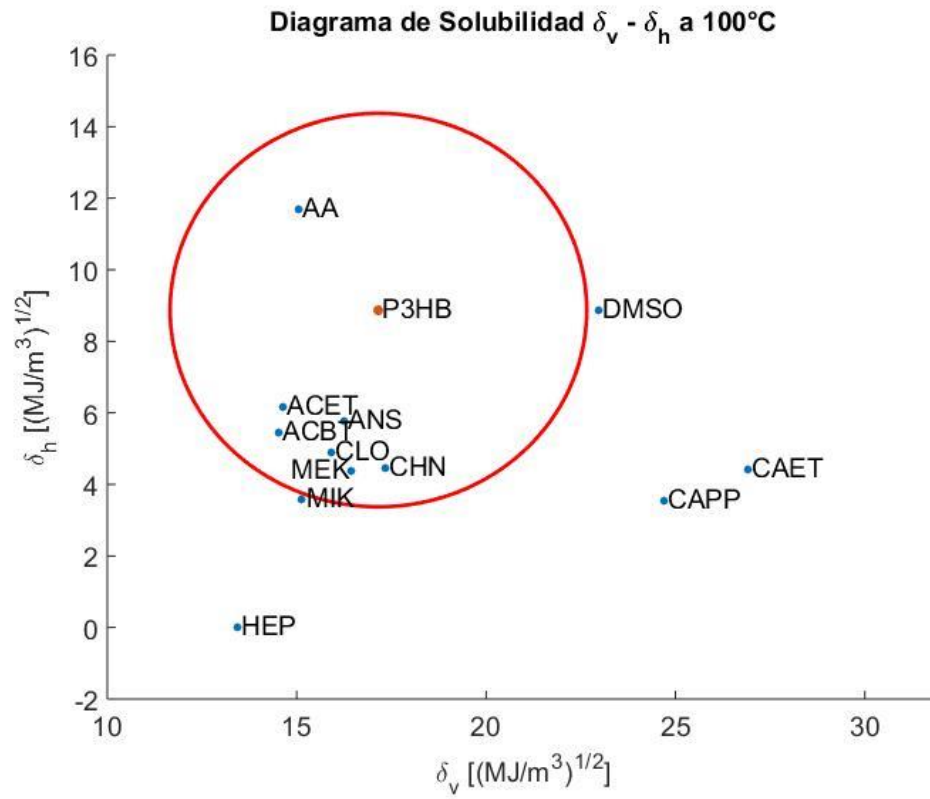
$$\delta_h = \frac{\sqrt{\sum E_{hi}}}{V} = \frac{\sqrt{7000 + 0 + 0 + 0}}{73.1436} = 9.783 \text{ MPa}^{\frac{1}{2}}$$

Parámetros de solubilidad de Hansen, parámetro de solubilidad de Bagley y volumen específico para los solventes seleccionados [152].

Solventes	δ_d [MPa ^{0.5}]	δ_p [MPa ^{0.5}]	δ_h [MPa ^{0.5}]	δ_v [MPa ^{0.5}]	V [cm ³ /mol]
Acetato de Butilo	15,80	3,70	6,30	16,23	132,50
Acetato de Etilo	15,80	5,30	7,20	16,67	98,50
Acetona	15,50	10,40	7,00	18,67	74,00
Ácido Acético	14,50	8,00	13,50	16,56	57,10
Anisol	17,80	4,10	6,70	18,27	119,10
Carbonato de Etileno	19,40	21,70	5,10	29,11	66,00
Carbonato de Propileno	20,00	18,00	4,10	26,91	85,00
Ciclohexanona	17,80	6,30	5,10	18,88	104,00
Cloroformo	17,80	3,10	5,70	18,07	80,70
Dimetil Sulfóxido	18,40	16,40	10,20	24,65	71,30
Metanol	15,10	12,30	22,30	19,48	40,70
Metil Etil Cetona	16,00	9,00	5,10	18,36	90,10
Metil Isobutil Cetona	15,30	6,10	4,10	16,47	125,80

1. Diagramas $\delta_v - \delta_h$ para el P3HB a diferentes temperaturas





C. Anexo: Resultados de los ensayos de solubilidad

A continuación, se muestran los valores de solubilidad experimental obtenidos para cada uno de los 480 experimentos.

Experimento	Índice	Solvente	Conc. [g/L]	Temp. [°C]	Tiemp [h]	Solubilidad
1	1	Metil Etil Cetona (MEK)	25,01	25	1	0,0820
2	13	Metil Etil Cetona (MEK)	25,05	25	3	0,0563
3	25	Metil Etil Cetona (MEK)	25,01	40	1	0,0644
4	37	Metil Etil Cetona (MEK)	25,00	40	3	0,0756
5	49	Metil Etil Cetona (MEK)	25,03	55	1	0,0971
6	61	Metil Etil Cetona (MEK)	25,02	55	3	0,0987
7	73	Metil Etil Cetona (MEK)	25,05	70	1	0,0092
8	85	Metil Etil Cetona (MEK)	25,05	70	3	0,0519
9	4	Metil Etil Cetona (MEK)	50,06	25	1	0,0803
10	16	Metil Etil Cetona (MEK)	50,02	25	3	0,0684
11	28	Metil Etil Cetona (MEK)	50,1	40	1	0,0651
12	40	Metil Etil Cetona (MEK)	50,04	40	3	0,1059
13	52	Metil Etil Cetona (MEK)	50,06	55	1	0,1003
14	64	Metil Etil Cetona (MEK)	50,04	55	3	0,1007
15	76	Metil Etil Cetona (MEK)	50,04	70	1	0,0432
16	88	Metil Etil Cetona (MEK)	50,1	70	3	0,0319
17	7	Metil Etil Cetona (MEK)	100,04	25	1	0,0980
18	19	Metil Etil Cetona (MEK)	100,1	25	3	0,0825
19	31	Metil Etil Cetona (MEK)	100	40	1	0,0584
20	43	Metil Etil Cetona (MEK)	100	40	3	0,1226
21	55	Metil Etil Cetona (MEK)	100	55	1	0,0872
22	67	Metil Etil Cetona (MEK)	100,02	55	3	0,0744
23	79	Metil Etil Cetona (MEK)	100,1	70	1	0,0555
24	91	Metil Etil Cetona (MEK)	100	70	3	0,0262
25	10	Metil Etil Cetona (MEK)	200,12	25	1	0,0396
26	22	Metil Etil Cetona (MEK)	200,04	25	3	0,0388
27	34	Metil Etil Cetona (MEK)	200	40	1	0,0366
28	46	Metil Etil Cetona (MEK)	200,16	40	3	0,0452
29	58	Metil Etil Cetona (MEK)	200,04	55	1	0,0864
30	70	Metil Etil Cetona (MEK)	200,12	55	3	0,0564
31	82	Metil Etil Cetona (MEK)	200,04	70	1	0,0278

32	94	Metil Etil Cetona (MEK)	200,16	70	3	0,0362
33	97	Acetato de Etilo	25,01	25	1	0,0396
34	109	Acetato de Etilo	25,01	25	3	0,0184
35	121	Acetato de Etilo	25,01	40	1	0,0252
36	133	Acetato de Etilo	25,04	40	3	0,0587
37	145	Acetato de Etilo	25,01	55	1	0,0504
38	157	Acetato de Etilo	25,01	55	3	0,0424
39	169	Acetato de Etilo	25,04	70	1	0,0974
40	181	Acetato de Etilo	25,02	70	3	0,0795
41	100	Acetato de Etilo	50,04	25	1	0,0751
42	112	Acetato de Etilo	50,08	25	3	0,0359
43	124	Acetato de Etilo	50,1	40	1	0,0519
44	136	Acetato de Etilo	50,02	40	3	0,0336
45	148	Acetato de Etilo	50,02	55	1	0,0792
46	160	Acetato de Etilo	50	55	3	0,0744
47	172	Acetato de Etilo	50,04	70	1	0,0592
48	184	Acetato de Etilo	50	70	3	0,0548
49	103	Acetato de Etilo	100,02	25	1	0,0484
50	115	Acetato de Etilo	100,02	25	3	0,0426
51	127	Acetato de Etilo	100,02	40	1	0,0330
52	139	Acetato de Etilo	100,02	40	3	0,0308
53	151	Acetato de Etilo	100,02	55	1	0,0310
54	163	Acetato de Etilo	100,02	55	3	0,0430
55	175	Acetato de Etilo	100,04	70	1	0,0412
56	187	Acetato de Etilo	100,02	70	3	0,0314
57	106	Acetato de Etilo	200,12	25	1	0,0236
58	118	Acetato de Etilo	200,2	25	3	0,0292
59	130	Acetato de Etilo	200,08	40	1	0,0208
60	142	Acetato de Etilo	200,08	40	3	0,0356
61	154	Acetato de Etilo	200,08	55	1	0,0486
62	166	Acetato de Etilo	200,12	55	3	0,0234
63	178	Acetato de Etilo	200	70	1	0,0156
64	190	Acetato de Etilo	200,04	70	3	0,0320
65	193	Acido acetico	25	25	1	0,0524
66	205	Acido acetico	25,01	25	3	0,0888
67	217	Acido acetico	25,01	60	1	0,0788
68	229	Acido acetico	25,02	60	3	0,0707
69	241	Acido acetico	25,09	90	1	0,8721
70	253	Acido acetico	25,05	90	3	0,9014
71	265	Acido acetico	25,01	110	1	0,8848
72	277	Acido acetico	25,01	110	3	0,8808

73	196	Acido acetico	50,02	25	1	0,0900
74	208	Acido acetico	50,06	25	3	0,1175
75	220	Acido acetico	50,06	60	1	0,1087
76	232	Acido acetico	50,02	60	3	0,1311
77	244	Acido acetico	50,12	90	1	0,9098
78	256	Acido acetico	50	90	3	0,7652
79	268	Acido acetico	50,1	110	1	0,8802
80	280	Acido acetico	50,02	110	3	0,8221
81	199	Acido acetico	100	25	1	0,0502
82	211	Acido acetico	100,02	25	3	0,0316
83	223	Acido acetico	100,02	60	1	0,0882
84	235	Acido acetico	100,06	60	3	0,1107
85	247	Acido acetico	100,1	90	1	0,8609
86	259	Acido acetico	100,1	90	3	0,7443
87	271	Acido acetico	100,02	110	1	0,8622
88	283	Acido acetico	100,1	110	3	0,7780
89	202	Acido acetico	200,12	25	1	0,0662
90	214	Acido acetico	200,08	25	3	0,0770
91	226	Acido acetico	200,16	60	1	0,0418
92	238	Acido acetico	200,12	60	3	0,0712
93	250	Acido acetico	200,08	90	1	0,6953
94	262	Acido acetico	200,16	90	3	0,6942
95	274	Acido acetico	200,04	110	1	0,7516
96	286	Acido acetico	200,12	110	3	0,6734
97	289	Acetato de Butilo	25,01	25	1	0,0712
98	301	Acetato de Butilo	25,01	25	3	0,0644
99	313	Acetato de Butilo	25,02	60	1	0,0951
100	325	Acetato de Butilo	25,02	60	3	0,1223
101	337	Acetato de Butilo	25,01	90	1	0,0736
102	349	Acetato de Butilo	25,04	90	3	0,0891
103	361	Acetato de Butilo	25,05	110	1	0,3409
104	373	Acetato de Butilo	25	110	3	0,3080
105	292	Acetato de Butilo	50,08	25	1	0,0547
106	304	Acetato de Butilo	50,1	25	3	0,0671
107	316	Acetato de Butilo	50,06	60	1	0,0659
108	328	Acetato de Butilo	50	60	3	0,0996
109	340	Acetato de Butilo	50	90	1	0,0712
110	352	Acetato de Butilo	50,02	90	3	0,0824
111	364	Acetato de Butilo	50	110	1	0,5276
112	376	Acetato de Butilo	50,04	110	3	0,3157
113	295	Acetato de Butilo	100,02	25	1	0,0278

114	307	Acetato de Butilo	100,02	25	3	0,0712
115	319	Acetato de Butilo	100,02	60	1	0,0878
116	331	Acetato de Butilo	100,04	60	3	0,0686
117	343	Acetato de Butilo	100,02	90	1	0,0802
118	355	Acetato de Butilo	100,02	90	3	0,0422
119	367	Acetato de Butilo	100	110	1	0,3098
120	379	Acetato de Butilo	100,02	110	3	0,2226
121	298	Acetato de Butilo	200,08	25	1	0,0588
122	310	Acetato de Butilo	200	25	3	0,0318
123	322	Acetato de Butilo	200,16	60	1	0,0829
124	334	Acetato de Butilo	200,08	60	3	0,0940
125	346	Acetato de Butilo	200,2	90	1	0,0438
126	358	Acetato de Butilo	200,16	90	3	0,0392
127	370	Acetato de Butilo	200,12	110	1	0,1535
128	382	Acetato de Butilo	200	110	3	0,0782
129	385	Cloroformo	25,01	25	1	0,9220
130	397	Cloroformo	25,12	25	3	0,9347
131	409	Cloroformo	25,01	30	1	0,9732
132	421	Cloroformo	25,03	30	3	0,9648
133	433	Cloroformo	25	40	1	0,9676
134	445	Cloroformo	25,01	40	3	0,9472
135	457	Cloroformo	25	50	1	0,9380
136	469	Cloroformo	25	50	3	0,9512
137	388	Cloroformo	50,02	25	1	0,8920
138	400	Cloroformo	50,1	25	3	0,8758
139	412	Cloroformo	50,06	30	1	0,9237
140	424	Cloroformo	50,04	30	3	0,8677
141	436	Cloroformo	50,04	40	1	0,9013
142	448	Cloroformo	50	40	3	0,8748
143	460	Cloroformo	50,04	50	1	0,8589
144	472	Cloroformo	50,1	50	3	0,8782
145	391	Cloroformo	100,02	25	1	0,8556
146	403	Cloroformo	100,1	25	3	0,8539
147	415	Cloroformo	100,02	30	1	0,8452
148	427	Cloroformo	100,06	30	3	0,8501
149	439	Cloroformo	100,02	40	1	0,8458
150	451	Cloroformo	100	40	3	0,8246
151	463	Cloroformo	100,04	50	1	0,8427
152	475	Cloroformo	100,02	50	3	0,8094
153	394	Cloroformo	200,12	25	1	0,6608
154	406	Cloroformo	200,28	25	3	0,6629

155	418	Cloroformo	200,12	30	1	0,6846
156	430	Cloroformo	200,2	30	3	0,6138
157	442	Cloroformo	200	40	1	0,5932
158	454	Cloroformo	200	40	3	0,6100
159	466	Cloroformo	200	50	1	0,5332
160	478	Cloroformo	200	50	3	0,6206
161	2	Metil Etil Cetona (MEK)	25,01	25	1	0,1056
162	14	Metil Etil Cetona (MEK)	25,03	25	3	0,0623
163	26	Metil Etil Cetona (MEK)	25,05	40	1	0,0579
164	38	Metil Etil Cetona (MEK)	25,1	40	3	0,0861
165	50	Metil Etil Cetona (MEK)	25	55	1	0,1112
166	62	Metil Etil Cetona (MEK)	25,02	55	3	0,1247
167	74	Metil Etil Cetona (MEK)	25,01	70	1	0,0264
168	86	Metil Etil Cetona (MEK)	25	70	3	0,0444
169	5	Metil Etil Cetona (MEK)	50,04	25	1	0,0887
170	17	Metil Etil Cetona (MEK)	50,02	25	3	0,0680
171	29	Metil Etil Cetona (MEK)	50,1	40	1	0,0647
172	41	Metil Etil Cetona (MEK)	50,02	40	3	0,1124
173	53	Metil Etil Cetona (MEK)	50,1	55	1	0,1425
174	65	Metil Etil Cetona (MEK)	50,06	55	3	0,0719
175	77	Metil Etil Cetona (MEK)	50,1	70	1	0,0212
176	89	Metil Etil Cetona (MEK)	50	70	3	0,0480
177	8	Metil Etil Cetona (MEK)	100,02	25	1	0,0398
178	20	Metil Etil Cetona (MEK)	100,04	25	3	0,0456
179	32	Metil Etil Cetona (MEK)	100	40	1	0,0684
180	44	Metil Etil Cetona (MEK)	100,1	40	3	0,1165
181	56	Metil Etil Cetona (MEK)	100,18	55	1	0,0711
182	68	Metil Etil Cetona (MEK)	100,1	55	3	0,0805
183	80	Metil Etil Cetona (MEK)	100,04	70	1	0,0406
184	92	Metil Etil Cetona (MEK)	100,1	70	3	0,0198
185	11	Metil Etil Cetona (MEK)	200,12	25	1	0,0458
186	23	Metil Etil Cetona (MEK)	200,16	25	3	0,0208
187	35	Metil Etil Cetona (MEK)	200,16	40	1	0,0460
188	47	Metil Etil Cetona (MEK)	200,4	40	3	0,0359
189	59	Metil Etil Cetona (MEK)	200,2	55	1	0,0723
190	71	Metil Etil Cetona (MEK)	200	55	3	0,0654
191	83	Metil Etil Cetona (MEK)	200	70	1	0,0368
192	95	Metil Etil Cetona (MEK)	200,16	70	3	0,0248
193	98	Acetato de Etilo	25,01	25	1	0,0532
194	110	Acetato de Etilo	25,01	25	3	0,0492
195	122	Acetato de Etilo	25,01	40	1	0,0436

196	134	Acetato de Etilo	25,02	40	3	0,0400
197	146	Acetato de Etilo	25,02	55	1	0,0799
198	158	Acetato de Etilo	25,03	55	3	0,0515
199	170	Acetato de Etilo	25,02	70	1	0,0827
200	182	Acetato de Etilo	25,01	70	3	0,0896
201	101	Acetato de Etilo	50,08	25	1	0,0467
202	113	Acetato de Etilo	50,02	25	3	0,0296
203	125	Acetato de Etilo	50,08	40	1	0,0587
204	137	Acetato de Etilo	50,06	40	3	0,0511
205	149	Acetato de Etilo	50,06	55	1	0,0376
206	161	Acetato de Etilo	50,02	55	3	0,0604
207	173	Acetato de Etilo	50,1	70	1	0,0774
208	185	Acetato de Etilo	50,08	70	3	0,0779
209	104	Acetato de Etilo	100,02	25	1	0,0584
210	116	Acetato de Etilo	100	25	3	0,0622
211	128	Acetato de Etilo	100	40	1	0,0478
212	140	Acetato de Etilo	100	40	3	0,0408
213	152	Acetato de Etilo	100,06	55	1	0,0434
214	164	Acetato de Etilo	100,1	55	3	0,0513
215	176	Acetato de Etilo	100	70	1	0,0582
216	188	Acetato de Etilo	100,06	70	3	0,0512
217	107	Acetato de Etilo	200,16	25	1	0,0318
218	119	Acetato de Etilo	200,08	25	3	0,0362
219	131	Acetato de Etilo	200,12	40	1	0,0298
220	143	Acetato de Etilo	200	40	3	0,0520
221	155	Acetato de Etilo	200,08	55	1	0,0400
222	167	Acetato de Etilo	200,04	55	3	0,0282
223	179	Acetato de Etilo	200	70	1	0,0430
224	191	Acetato de Etilo	200,08	70	3	0,0542
225	194	Acido acetico	25,04	25	1	0,1006
226	206	Acido acetico	25	25	3	0,0832
227	218	Acido acetico	25,02	60	1	0,0831
228	230	Acido acetico	25,01	60	3	0,1859
229	242	Acido acetico	25,04	90	1	0,8642
230	254	Acido acetico	25	90	3	0,8696
231	266	Acido acetico	25,03	110	1	0,8542
232	278	Acido acetico	25,01	110	3	0,8589
233	197	Acido acetico	50,04	25	1	0,1115
234	209	Acido acetico	50,04	25	3	0,0979
235	221	Acido acetico	50,02	60	1	0,0816
236	233	Acido acetico	50	60	3	0,1136

237	245	Acido acetico	50,08	90	1	0,8159
238	257	Acido acetico	50,04	90	3	0,7330
239	269	Acido acetico	50,02	110	1	0,8213
240	281	Acido acetico	50,06	110	3	0,8002
241	200	Acido acetico	100,02	25	1	0,0376
242	212	Acido acetico	100,04	25	3	0,0588
243	224	Acido acetico	100,04	60	1	0,0436
244	236	Acido acetico	100,06	60	3	0,0943
245	248	Acido acetico	100,08	90	1	0,8235
246	260	Acido acetico	100	90	3	0,7398
247	272	Acido acetico	100,02	110	1	0,8548
248	284	Acido acetico	100,02	110	3	0,8242
249	203	Acido acetico	200,08	25	1	0,0472
250	215	Acido acetico	200,12	25	3	0,0432
251	227	Acido acetico	200,08	60	1	0,0528
252	239	Acido acetico	200,04	60	3	0,0602
253	251	Acido acetico	200,2	90	1	0,7369
254	263	Acido acetico	200,2	90	3	0,6769
255	275	Acido acetico	200,08	110	1	0,7339
256	287	Acido acetico	200,08	110	3	0,7289
257	290	Acetato de Butilo	25,01	25	1	0,0256
258	302	Acetato de Butilo	25,01	25	3	0,0172
259	314	Acetato de Butilo	25,02	60	1	0,0388
260	326	Acetato de Butilo	25,02	60	3	0,0815
261	338	Acetato de Butilo	25,02	90	1	0,0695
262	350	Acetato de Butilo	25,01	90	3	0,0680
263	362	Acetato de Butilo	25,05	110	1	0,3294
264	374	Acetato de Butilo	25,01	110	3	0,2835
265	293	Acetato de Butilo	50,02	25	1	0,0844
266	305	Acetato de Butilo	50	25	3	0,0280
267	317	Acetato de Butilo	50,06	60	1	0,0767
268	329	Acetato de Butilo	50	60	3	0,1184
269	341	Acetato de Butilo	50	90	1	0,0600
270	353	Acetato de Butilo	50,02	90	3	0,0764
271	365	Acetato de Butilo	50	110	1	0,4568
272	377	Acetato de Butilo	50	110	3	0,3792
273	296	Acetato de Butilo	100,08	25	1	0,0785
274	308	Acetato de Butilo	100,02	25	3	0,0418
275	320	Acetato de Butilo	100,06	60	1	0,0820
276	332	Acetato de Butilo	100,1	60	3	0,0883
277	344	Acetato de Butilo	100,06	90	1	0,0504

278	356	Acetato de Butilo	100,08	90	3	0,0486
279	368	Acetato de Butilo	100,08	110	1	0,3451
280	380	Acetato de Butilo	100,06	110	3	0,2596
281	299	Acetato de Butilo	200,08	25	1	0,0452
282	311	Acetato de Butilo	200,08	25	3	0,0538
283	323	Acetato de Butilo	200,12	60	1	0,0700
284	335	Acetato de Butilo	200	60	3	0,1140
285	347	Acetato de Butilo	200,08	90	1	0,0590
286	359	Acetato de Butilo	200,12	90	3	0,0614
287	371	Acetato de Butilo	200	110	1	0,0742
288	383	Acetato de Butilo	200,04	110	3	0,0974
289	386	Cloroformo	25	25	1	0,9644
290	398	Cloroformo	25,02	25	3	0,9145
291	410	Cloroformo	25,01	30	1	0,9632
292	422	Cloroformo	25,04	30	3	0,9429
293	434	Cloroformo	25,05	40	1	0,9473
294	446	Cloroformo	25,02	40	3	0,9313
295	458	Cloroformo	25	50	1	0,9512
296	470	Cloroformo	25,02	50	3	0,9428
297	389	Cloroformo	50,1	25	1	0,9605
298	401	Cloroformo	50,2	25	3	0,8793
299	413	Cloroformo	50,02	30	1	0,8880
300	425	Cloroformo	50,1	30	3	0,8966
301	437	Cloroformo	50,1	40	1	0,8878
302	449	Cloroformo	50	40	3	0,8868
303	461	Cloroformo	50,06	50	1	0,8833
304	473	Cloroformo	50	50	3	0,9004
305	392	Cloroformo	100	25	1	0,8336
306	404	Cloroformo	100,18	25	3	0,8399
307	416	Cloroformo	100,02	30	1	0,8256
308	428	Cloroformo	100	30	3	0,8584
309	440	Cloroformo	100,06	40	1	0,8553
310	452	Cloroformo	100,04	40	3	0,8469
311	464	Cloroformo	100,02	50	1	0,7019
312	476	Cloroformo	100	50	3	0,8528
313	395	Cloroformo	200,08	25	1	0,6437
314	407	Cloroformo	200,2	25	3	0,6292
315	419	Cloroformo	200,2	30	1	0,6877
316	431	Cloroformo	200,16	30	3	0,6747
317	443	Cloroformo	200	40	1	0,5680
318	455	Cloroformo	200,04	40	3	0,6851

319	467	Cloroformo	200,12	50	1	0,6090
320	479	Cloroformo	200	50	3	0,5030
321	3	Metil Etil Cetona (MEK)	25,05	25	1	0,0926
322	15	Metil Etil Cetona (MEK)	25,05	25	3	0,0427
323	27	Metil Etil Cetona (MEK)	25,05	40	1	0,0739
324	39	Metil Etil Cetona (MEK)	25	40	3	0,0756
325	51	Metil Etil Cetona (MEK)	25,01	55	1	0,0824
326	63	Metil Etil Cetona (MEK)	25	55	3	0,0792
327	75	Metil Etil Cetona (MEK)	25,01	70	1	0,0272
328	87	Metil Etil Cetona (MEK)	25	70	3	0,0472
329	6	Metil Etil Cetona (MEK)	50,04	25	1	0,1067
330	18	Metil Etil Cetona (MEK)	50,02	25	3	0,0532
331	30	Metil Etil Cetona (MEK)	50,18	40	1	0,0626
332	42	Metil Etil Cetona (MEK)	50,1	40	3	0,0635
333	54	Metil Etil Cetona (MEK)	50,1	55	1	0,1545
334	66	Metil Etil Cetona (MEK)	50,08	55	3	0,1030
335	78	Metil Etil Cetona (MEK)	50,06	70	1	0,0503
336	90	Metil Etil Cetona (MEK)	50	70	3	0,0280
337	9	Metil Etil Cetona (MEK)	100,08	25	1	0,0687
338	21	Metil Etil Cetona (MEK)	100,06	25	3	0,0586
339	33	Metil Etil Cetona (MEK)	100,04	40	1	0,0620
340	45	Metil Etil Cetona (MEK)	100,1	40	3	0,0553
341	57	Metil Etil Cetona (MEK)	100	55	1	0,0974
342	69	Metil Etil Cetona (MEK)	100,04	55	3	0,0824
343	81	Metil Etil Cetona (MEK)	100,1	70	1	0,0515
344	93	Metil Etil Cetona (MEK)	100	70	3	0,0182
345	12	Metil Etil Cetona (MEK)	200,04	25	1	0,0494
346	24	Metil Etil Cetona (MEK)	200,04	25	3	0,0442
347	36	Metil Etil Cetona (MEK)	200,12	40	1	0,0408
348	48	Metil Etil Cetona (MEK)	200	40	3	0,0436
349	60	Metil Etil Cetona (MEK)	200,2	55	1	0,0553
350	72	Metil Etil Cetona (MEK)	200,04	55	3	0,0512
351	84	Metil Etil Cetona (MEK)	200	70	1	0,0176
352	96	Metil Etil Cetona (MEK)	200,04	70	3	0,0348
353	99	Acetato de Etilo	25	25	1	0,0448
354	111	Acetato de Etilo	25,03	25	3	0,0308
355	123	Acetato de Etilo	25,02	40	1	0,0332
356	135	Acetato de Etilo	25,04	40	3	0,0331
357	147	Acetato de Etilo	25,02	55	1	0,0468
358	159	Acetato de Etilo	25,01	55	3	0,0708
359	171	Acetato de Etilo	25,01	70	1	0,0916

360	183	Acetato de Etilo	25	70	3	0,0736
361	102	Acetato de Etilo	50,06	25	1	0,0312
362	114	Acetato de Etilo	50,02	25	3	0,0188
363	126	Acetato de Etilo	50	40	1	0,0424
364	138	Acetato de Etilo	50,02	40	3	0,0280
365	150	Acetato de Etilo	50	55	1	0,0548
366	162	Acetato de Etilo	50,08	55	3	0,0479
367	174	Acetato de Etilo	50,08	70	1	0,0535
368	186	Acetato de Etilo	50,04	70	3	0,0460
369	105	Acetato de Etilo	100,04	25	1	0,0594
370	117	Acetato de Etilo	100,02	25	3	0,0632
371	129	Acetato de Etilo	100,04	40	1	0,0574
372	141	Acetato de Etilo	100,02	40	3	0,0564
373	153	Acetato de Etilo	100,02	55	1	0,0152
374	165	Acetato de Etilo	100,02	55	3	0,0272
375	177	Acetato de Etilo	100,1	70	1	0,0547
376	189	Acetato de Etilo	100,04	70	3	0,0710
377	108	Acetato de Etilo	200,08	25	1	0,0642
378	120	Acetato de Etilo	200,12	25	3	0,0476
379	132	Acetato de Etilo	200,16	40	1	0,0480
380	144	Acetato de Etilo	200,16	40	3	0,0318
381	156	Acetato de Etilo	200,12	55	1	0,0572
382	168	Acetato de Etilo	200,04	55	3	0,0448
383	180	Acetato de Etilo	200	70	1	0,0542
384	192	Acetato de Etilo	200,12	70	3	0,0156
385	195	Acido acetico	25,03	25	1	0,0763
386	207	Acido acetico	25,01	25	3	0,1056
387	219	Acido acetico	25,01	60	1	0,1443
388	231	Acido acetico	25,03	60	3	0,3584
389	243	Acido acetico	25	90	1	0,8964
390	255	Acido acetico	25	90	3	0,8788
391	267	Acido acetico	25,02	110	1	0,8689
392	279	Acido acetico	25	110	3	0,8892
393	198	Acido acetico	50,02	25	1	0,0640
394	210	Acido acetico	50,02	25	3	0,0652
395	222	Acido acetico	50,02	60	1	0,1255
396	234	Acido acetico	50,06	60	3	0,0975
397	246	Acido acetico	50,1	90	1	0,8132
398	258	Acido acetico	50,1	90	3	0,7401
399	270	Acido acetico	50,1	110	1	0,8782
400	282	Acido acetico	50,02	110	3	0,7921

401	201	Acido acetico	100,04	25	1	0,0518
402	213	Acido acetico	100	25	3	0,0410
403	225	Acido acetico	100,02	60	1	0,0592
404	237	Acido acetico	100,08	60	3	0,0875
405	249	Acido acetico	100,1	90	1	0,8849
406	261	Acido acetico	100,1	90	3	0,7341
407	273	Acido acetico	100,04	110	1	0,8389
408	285	Acido acetico	100,04	110	3	0,7943
409	204	Acido acetico	200,04	25	1	0,0362
410	216	Acido acetico	200,08	25	3	0,0554
411	228	Acido acetico	200,04	60	1	0,0624
412	240	Acido acetico	200,12	60	3	0,0656
413	252	Acido acetico	200,16	90	1	0,7172
414	264	Acido acetico	200,16	90	3	0,6721
415	276	Acido acetico	200,04	110	1	0,7243
416	288	Acido acetico	200,2	110	3	0,7405
417	291	Acetato de Butilo	25,03	25	1	0,0412
418	303	Acetato de Butilo	25	25	3	0,0376
419	315	Acetato de Butilo	25,01	60	1	0,0944
420	327	Acetato de Butilo	25	60	3	0,0880
421	339	Acetato de Butilo	25,02	90	1	0,0787
422	351	Acetato de Butilo	25,01	90	3	0,0644
423	363	Acetato de Butilo	25	110	1	0,3620
424	375	Acetato de Butilo	25,02	110	3	0,2886
425	294	Acetato de Butilo	50	25	1	0,0572
426	306	Acetato de Butilo	50,02	25	3	0,0512
427	318	Acetato de Butilo	50	60	1	0,0520
428	330	Acetato de Butilo	50,08	60	3	0,1218
429	342	Acetato de Butilo	50,02	90	1	0,0876
430	354	Acetato de Butilo	50,08	90	3	0,0966
431	366	Acetato de Butilo	50,04	110	1	0,3789
432	378	Acetato de Butilo	50,06	110	3	0,2920
433	297	Acetato de Butilo	100,02	25	1	0,0264
434	309	Acetato de Butilo	100	25	3	0,0322
435	321	Acetato de Butilo	100,08	60	1	0,0921
436	333	Acetato de Butilo	100	60	3	0,1024
437	345	Acetato de Butilo	100,08	90	1	0,0679
438	357	Acetato de Butilo	100,02	90	3	0,0702
439	369	Acetato de Butilo	100,1	110	1	0,2795
440	381	Acetato de Butilo	100,06	110	3	0,2105
441	300	Acetato de Butilo	200,04	25	1	0,0238

442	312	Acetato de Butilo	200,2	25	3	0,0182
443	324	Acetato de Butilo	200,16	60	1	0,0791
444	336	Acetato de Butilo	200,04	60	3	0,1124
445	348	Acetato de Butilo	200,08	90	1	0,0482
446	360	Acetato de Butilo	200,16	90	3	0,0763
447	372	Acetato de Butilo	200,2	110	1	0,1073
448	384	Acetato de Butilo	200,08	110	3	0,1098
449	387	Cloroformo	25,02	25	1	0,9357
450	399	Cloroformo	25,07	25	3	0,9390
451	411	Cloroformo	25,05	30	1	0,9094
452	423	Cloroformo	25	30	3	0,9352
453	435	Cloroformo	25,05	40	1	0,9465
454	447	Cloroformo	25,04	40	3	0,9441
455	459	Cloroformo	25,02	50	1	0,9400
456	471	Cloroformo	25,02	50	3	0,9197
457	390	Cloroformo	50,06	25	1	0,9377
458	402	Cloroformo	50,14	25	3	0,8827
459	414	Cloroformo	50,02	30	1	0,8669
460	426	Cloroformo	50,08	30	3	0,8806
461	438	Cloroformo	50,04	40	1	0,9033
462	450	Cloroformo	50	40	3	0,8860
463	462	Cloroformo	50	50	1	0,8804
464	474	Cloroformo	50,02	50	3	0,8876
465	393	Cloroformo	100,04	25	1	0,8235
466	405	Cloroformo	100	25	3	0,8554
467	417	Cloroformo	100,1	30	1	0,8022
468	429	Cloroformo	100,04	30	3	0,8812
469	441	Cloroformo	100,1	40	1	0,8482
470	453	Cloroformo	100	40	3	0,8698
471	465	Cloroformo	100,04	50	1	0,8441
472	477	Cloroformo	100	50	3	0,8576
473	396	Cloroformo	200,04	25	1	0,6479
474	408	Cloroformo	200,36	25	3	0,6163
475	420	Cloroformo	200,12	30	1	0,6634
476	432	Cloroformo	200,2	30	3	0,5243
477	444	Cloroformo	200,16	40	1	0,4856
478	456	Cloroformo	200	40	3	0,5562
479	468	Cloroformo	200,2	50	1	0,7225
480	480	Cloroformo	200	50	3	0,5266

6 Bibliografía

- [1] V. Siracusa, P. Rocculi, S. Romani y M. Dalla Rosa, «Biodegradable polymers for food packaging: A review»,» *Food Science & Technology* vol 19, pp. 634 - 643, 2008.
- [2] Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios, *Presente y Futuro de la Disposición Final de Residuos en Colombia*, Bogotá, Colombia, 2013.
- [3] E. Avendaño y B. Albarracín, *Panorama actual de la situación mundial, nacional y distrital de los residuos sólidos*, Bogotá: Universidad Santo Tomás, 2015.
- [4] A. Anjum, M. Zuber, K. Mahmood, A. Noreen, M. Naveed y S. Tabsum, «Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements»,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 89, pp. 161 - 174 , 2016.
- [5] S. Ahmad, A. Hassan y M. Uzir, «Materials for food packaging applications based on bio-based polymer nanocomposites: A review»,» *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, pp. 1 - 32, 2015.
- [6] M. Koller, H. Niebelschütz y G. Braunegg, «Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass.,» *Engineering in Life Sciences* 13, pp. 549 - 562, 2013.
- [7] D. A. Mendez, I. O. Cabeza, N. C. Moreno y C. A. Martinez, «Mathematical Modelling and Scale-up of Batch Fermentation with *Burkholderia cepacia* B27 Using Vegetal Oil as Carbon Source to Produce Polyhydroxyalkanoates,» *Chemical Engineering Transactions*, vol. 46, pp. 277 - 282, 2016.
- [8] S. Syairah, M. Nurhezreen y K. Sudesh, «"Enhanced Recovery and Purification of P(3HB-co-HHx) from recombinant *Cupriavidus necator* using alkaline digestion method,» *Biochemistry and Biotechnology*, pp. 524 - 535, 2012.

- [9] S. Philip, T. Keshavarz y I. Roy, «Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications,» *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 82, pp. 233 - 247, 2007.
- [10] R. M. Macrae y J. F. Wilkinson, «Poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cerus* and *Bacillus megaterium*,» *Journal of Genetic and Microbiology*, vol. 19, pp. 210 - 222, 1958.
- [11] E. R. Howells, «Opportunities in biotechnology for the chemical industry,» *Chemical Industry*, vol. 8, pp. 508 - 511, 1982.
- [12] P. Greco y E. Martuscelli, «Crystallization behaviour of poly (ethylene oxide) from poly (3-hydroxybutyrate)/poly (ethylene oxide) blends: phase structuring, morphology and thermal behaviour.,» *Polymer*, vol. 32, nº 9, pp. 1647 - 1653, 1991.
- [13] M. Avella y E. Martuscelli, «Poly-D(3-hydroxybutyrate)/poly (ethylene oxide) blends: phase diagram, thermal and cristalization behaviour.,» *Polymer*, vol. 29, pp. 1731 - 1737, 1988.
- [14] K. Y. y Y. Doi, «Enzymatic degradation and morphologies of binary blends of microbial poly(3-hydroxybutyrate) with poly(e-caprolactone), poly(1,4-butylene adipate) and poly(vinyl acetate.,» *Polymer Degradation and Stability Journal*, vol. 36, pp. 241 - 248, 1992.
- [15] N. Lotti, M. Pizzoli, G. Ceccorulli y M. Scandola, «Binary blends of microbial poly(3-hydroxybutyrate) with polymethacrylates.,» *Polymer*, vol. 34, pp. 4935 - 4940, 1993.
- [16] N. Lotti y M. Scandola, «Miscibility of bacterial poly(3hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with ester substituted celluloses,» *Polymer Bulletin*, vol. 29, pp. 407 - 413, 1992.
- [17] N. Shogren, «Starch-poly(hydroxyalkanoate) composites and blends,» de *Biodegradable polymer blends and composites from renewable resources*, Hoboken, Wiley, 2009.
- [18] T. Paramasivan y A. Abdul Kamal, «On the study of indigenous natural-fibe composites,» *Fibre Science and Technology*, vol. 7, pp. 85 - 88, 1974.
- [19] A. Anderson y Dawers EA, «Ocurrance, metabolism, metabolic role and industrial use of bacterial polyhydroxyalkanoates.,» *Microbiology Reviews*, vol. 54, pp. 450 - 472, 1990.

- [20] K. Sudesh, Abe H. y Y. Doi, «Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters,» *Progress In Polymer Science*, vol. 25, pp. 1503 - 1555, 2000.
- [21] G. Barnard y J. Sanders, «The poly-beta-hydroxybutyrate granule in vivo. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 6, pp. 3286 - 3291, 1989.
- [22] R. Gabriel, Z. Smith y J. Merrick, «Metabolism of poly-b-hydroxybutyrate. I. Purification, composition and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*,» *Biochemistry*, vol. 7, pp. 3676 - 3681, 1968.
- [23] S. Kusaka, H. Abe, S. Lee y Y. Doi, «Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in recombinant *Escherichia coli*,» *Applied Microbiology and Biotechnology Journal*, vol. 47, pp. 140-143, 1997.
- [24] A. Anderson, D. Williams, B. Taidi, E. Dawes y D. Ewing, «Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and factors influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacterium extroquens* and *Alcaligenes eutrophus*,» *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 103, pp. 93 - 102, 1992.
- [25] P. Holmes, «Biologically produced (R)-3-hydroxyalkanoate polymers and copolymers,» de *Developements in crystalline polymers Vol. 2*, London, 1998, pp. 1 - 65.
- [26] Y. Doi, *Microbial Polyesters*, Nueva York: VCH Publishers, 1990.
- [27] Barham PJ y A. Keller, «Relationships between microstructure and mode of fracture in polyhydroxybutyrate,» *Journal of Polymer Science*, vol. 24, pp. 69 - 77, 1986.
- [28] G. De Koning y P. Lemstra , «Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: 2, Embrittlement and Rejuvenation,» *Polymer*, vol. 34, pp. 4089 - 4094, 1993.
- [29] Bugincourt E, P. Cinelli , Lazzeri A y Alvarez V, «Polyhydroxyalkanoates (PHAS): review of syhtnesis, characteristics, processing and potential applications in packaging,» *Express Polymer Letters*, vol. 8, pp. 791 - 808, 2014.
- [30] S. Angelini, C. Pierfrancesco, B. Immirzi, M. Poskovic, G. Santagata, G. Scarinzi y M. Malinconico, «From Microbial Biopolymers to Bioplastics: Suistainable Additives

- for PHB Processing and Stabilization,» de *Microbial Factories*, India, Springer, 2015, pp. 139 - 160.
- [31] T. Ojum, J. Yu y B. Solomon, «Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer,» *African Journal of Biotechnology*, vol. 3, nº 1, pp. 18 - 24, 2004.
- [32] C. Loo, W. Lee, T. Tsuge, Y. Doi y K. Sudesh, «Biosynthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from Palm Oil Products in a *Wautersia eutropha* Mutant,» *Biotechnology Letters*, vol. 27, nº 18, pp. 1405 - 1410, 2005.
- [33] K. Snell, V. Singh y S. Brumbley, «Production of nove biopolymers in plants: Recent technological advances and future prospects,» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 32, pp. 68 - 75, 2015.
- [34] R. Nonato, P. Mantelatto y C. Rosell, «Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol.,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 57, pp. 1 - 5, 2001.
- [35] G. Jiang, D. Hill, M. Kowalczyk, B. Johnston, G. Adamus, V. Irorere y I. Radecka, «Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, 2016.
- [36] B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker y P. Lant, «The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates,» *Progress in Polymer Science*, vol. 39, pp. 397 - 442 , 2014.
- [37] M. Din, Z. Ujang, M. van Loosdrecht, A. Ahmad y M. Sairan, «Optimization of nitrogen and phosphorus limitation for better biodegradable plastic production and organic removal using single fed-batch mixed cultures and renewable resources.,» *Water Science Technologies*, vol. 53, pp. 15 - 20, 2006.
- [38] C. Du, J. Sabirova, W. Soetaert y S. Ki Carol Lin, «Polyhydroxyalkanoates Production From Low Cost Suistantable Raw Materials,» *Current Chemical Biology*, vol. 6, pp. 14 - 25, 2012.
- [39] J. Beun, K. Dircks, M. Van Loosdrecht y J. Heijnen, «Poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures».
- [40] S. Bengtsson, A. Pisco, M. Reis y P. Lemos, «Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by mixed culture enriched in glycogen

- accumulating organism,» *Journal of Biotechnology*, vol. 145, nº 3, pp. 253 - 263, 2010.
- [41] S. Bengtsson, A. Werker, M. Christensson y T. Welander, «Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater,» *Bioresource Technology*, vol. 99, nº 3, pp. 509 - 516, 2008.
- [42] M. Md Din, Z. Ujang, M. Van Loosdrecht y M. Ahmad, «Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Production from saponified sunflower oil in mixed cultures under aerobic condition,» *Jurnal Teknologi*, vol. 48, pp. 1 - 19, 2008.
- [43] H. Liu, P. Hall, J. Darby, E. Coats, P. Green, D. Thompson y F. Loge, «Production of Polyhydroxyalkanoates During Treatment of Tomato Cannery Wastewater,» *Water Environment Research*, vol. 80, pp. 367 - 372, 2008.
- [44] E. Coats, F. Loge, M. Wolcott, K. Englund y A. McDonald, «Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Municipal Wastewater Treatment,» *Water Environment Research*, vol. 79, nº 12, pp. 2396 - 2403, 2007.
- [45] D. Dionisi, M. Majone, C. Levantesi, A. Bellani y A. Fuoco, «Effect of feed length on settleability, substrate uptake and storage in a sequencing batch reactor treating an industrial wastewater,» *Environmental Technology*, vol. 27, pp. 901 - 908 , 2006.
- [46] D. Dionisi, G. Carucci, M. Petrangeli, C. Riccardi y F. Carrasco, «Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers,» *Water Research*, vol. 39, nº 10, pp. 2076 - 2084, 2005.
- [47] J. Ramsay, E. Berger, R. Voyer, C. Chavarie y B. Ramsay, «Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents,» *Biotechnology Techniques*, vol. 8, pp. 589 - 594, 1994.
- [48] P. Barham y A. Selwood, «Extraction of poly-beta-hydroxybutyric acid». US Patente 4391766, 1983.
- [49] S. Harrison, H. Chase, S. Amor, K. Bonthron y Sanders JK, «Plasticization of poly(hydroxybutyrate) in vivo,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 14, pp. 50 - 56, 1992.
- [50] S. Hu, A. McDonald y E. Coats, «Characterization of polyhydroxybutyrate biosynthesized from crude glycerol waste using mixed microbial consortia.,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 129, pp. 1314 - 1321, 2013.

- [51] B. G., «Sustainable poly(hydroxyalkanoate) (PHA) production,» de *Degradable Polymers: Principles and Applications - 2 Ed*, Dordrecht, Scott G , 2003, pp. 235 - 293.
- [52] J. Xuan, J. Ramsay y B. Ramsay, «Acetone extraction of mcl_PHA from *Pseudomonas putida* KT2440,» *Journal of Microbiology Methods*, vol. 67, pp. 212 - 2199, 2006.
- [53] M. Koller, R. Bona, E. Chiellini y Braunegg G, «Extraction of short-chain-length poly[(R)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the "anti-solvent" acetone under elevated temperature and pressure,» *Biotechnology Letters*, 2013.
- [54] Walsem J, Van Zhong, S. Luhua y S. Simon , «Polymer extraction methods». US Patente Patent US7713720 B2, 2010.
- [55] A. Aramvash, N. Gholami-Banadkuki, F. Moazzeni-Zavareh y T. Hajizadeh, «An Environmentally Friendly and Efficient Method for Extraction of PHB Biopolymer with Non-Halogenated Solvents,» *Journal of Microbiology Technology*, vol. 25, nº 11, pp. 1936 - 1943, 2015.
- [56] Y. Yang, J. Jeon, D. Yi, J. Kim, H. Seo, C. Rha , A. Sinskey y C. Brigham, «Application of non-halogenated solvent, methyl ethyl ketone (MEK) for recovery of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(HB-co-HV)] from bacterial cells,» *Biotechnology and Bioprocess Engineering* , vol. 20, pp. 291 - 297, 2015.
- [57] A. Aramvash, F. Zavareh y N. Banadkuki, «Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*,» *Engineering in Life Sciences*, p. In Press, 2017.
- [58] H. Preusting, J. Kingma, G. Huisman y A. Steinbuchel, «Formation of polyester blends by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*: different poly(3-hydroxyalkanoates) are stored in separate granules.,» *Journal of Polymer Environmental*, vol. 1, pp. 11 - 21, 1993.
- [59] R. Marchessault, F. Morin, S. Wong y I. Saracovan, «Artificial granule suspensions of long side chain poly (3-hydroxyalkanoate),» *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 41, pp. 138 - 142, 1995.
- [60] W. Luzier, «Materials derived from biomass/biodegradable materials,» *Proceedings of the National Academy of Science - USA*, vol. 89, pp. 839 - 842, 1992.

- [61] M. Kim, K. Cho, H. Ryu y E. Lee, «Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulphate,» *Biotechnology Letters*, vol. 25, pp. 55 - 59, 2003.
- [62] J. Choi y S. Lee, «Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals,» *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 62, pp. 546 - 553, 2000.
- [63] W. Page y A. Cornish, «Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly-beta-hydroxybutyrate,» *Applied Environmentak Microbiology*, vol. 53, pp. 4236 - 4244, 1993.
- [64] S. Hahn, Y. Chang, B. Kim y H. Chang, «Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovering using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform,» *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 44, pp. 256 - 261, 1994.
- [65] Merrick J.M y M. Doudoroff, «Depolymerization of poly-beta-hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system,» *Journal of Bacteriology*, vol. 88, pp. 60 - 71, 1964.
- [66] P. Holmes y G. Lim, «Separation Process». US Patente 4910145, 1990.
- [67] K. Yasotha, M. Aroua, Ramachandran K.B. y I. Tan, «Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration.,» *Biochemical Engineering Journal*, vol. 30, pp. 260 - 268, 2006.
- [68] I. Tamer, M. Moo-Young y Y. Chisti, «Disruption of *Alcaligenes latus* for recovery of poly (b-hydroxybutyric acid): Comparison of high-pressure homogenization, bead milling and chemically induced lysis,» *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 37, pp. 1807 - 1814, 1998.
- [69] M. Ghatnekar, J. Pai y M. Ganesh, «Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp. V49,» *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 77, pp. 444 - 448, 2003.
- [70] K. Hwang, S. You y T. Don, «Disruption kinetics of bacterial cells during purification of poly-b-hydroxyalkanoates using ultrasonification,» *Journal of Chinese Institute of Chemical Engineers*, vol. 37, pp. 209 - 216, 2006.
- [71] C. Lu, *Purification and separation of polyhydroxyalkanoates from bacteria.*, Tesis de Maestría - Yuan Ze University - Taiwan, 2006.

- [72] G. Breaunegg, G. Lefebvre y K. Genser, «Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects,» *Journal of Biotechnology*, vol. 65, pp. 127 - 161, 1998.
- [73] J. Teeka, T. Imai, A. Reungsang y X. Cheng, «Characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis by isolated *Novosphingobium* sp THA AIK7 using crude glycerol,» *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp. 1 - 10, 1999.
- [74] P. Hejazi, E. Vasheghani-Farahani y Y. Yamini, «Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly(beta-hydroxybutyrate) Recovery,» *Biotechnology Progress*, vol. 19, pp. 1519 - 1523, 2008.
- [75] K. Khosravi-Darani, E. Vasheghani-Farahani, S. Shojaosadati y Y. Yamini, «Effect of Process Variables on Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* cells for Poly(R-hydroxybutyrate) Recovery,» *Biotechnology Progress*, vol. 20, pp. 1757 - 1765, 2008.
- [76] J. Yin, Y. Xu, H. Yu, P. Zhou y Z. Shen, «Recovery of poly-beta-hydroxybutyrate from recombinant *Escherichia coli* by combined biological-chemical method,» *Progress in Biotechnology*, vol. 16, pp. 213 - 218, 2000.
- [77] G. Schroll, S. Resch, K. Gruber, G. Wanner y W. Lubitz, «Heterologous OX174 gene E-expression in *Ralstonia eutropha*: E-mediated lysis is not restricted to lambda-subclass of proteobacteria,» *Journal of Biotechnology*, vol. 66, pp. 211 - 217, 1998.
- [78] J. Mishra, S. Tiwari, M. Abolhasani, S. Azimi y G. Nayak, «2 - Fundamental of polymer blends and its thermodynamics,» de *Micro and Nano Fibrillar Composites (MFCs and NFCs) for Polymer Blends*, Elsevier, 2017, pp. 27 - 55.
- [79] P. Williams, «Microbial Polyesters: Biosynthesis, Properties, Biodegradation and Applications,» de *Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials*, RSC Polymer Chemistry Series, 2011, p. 357.
- [80] M. Niaounakis, «Blending Biopolymers with Synthetic Non-biodegradable Polymers,» de *Biopolymers: Processing and Products*, Elsevier - PDL Handbook Series, 2014, p. 133.
- [81] P. Viskah, «State of Art, New Challenges and Opportunities,» de *Polyhydroxyalkanoate (PHA) based Blends, Composites and Nanocomposites*, RSC - Green Chemistry Series, 2014, pp. 1 - 17.

- [82] M. Duarte , R. Goulart Hugen, E. Sant'Anna, A. Testa y S. Pezzin, «Thermal and mechanical behaviour of injection molded Poly(3-hydroxybutyrate)/Poly(ϵ -caprolactone) blends,» *Material Research*, vol. 9, 2006.
- [83] S. Godbole, S. Gote, M. Latkar y T. Chakrabarti, «Preparation and characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate-starch blend films,» *Bioresource Technology*, vol. 86, pp. 33 - 37, 2003.
- [84] L. Zhang, C. Xiong y X. Deng, «Miscibility, crystallization and morphology of poly(beta-hydroxybutyrate)/poly(d,l-lactide) blends,» *Polymer*, vol. 36, pp. 235 - 241, 1996.
- [85] N. Koyama y Y. Doi, «Miscibility of binary blends of poly(R-3-hydroxybutyric acid) and poly((s)-lactic acid),» *Polymer*, vol. 38, pp. 1589 - 1593, 1998.
- [86] C. Vogel, E. Wessel y H. W. Siesler, «FT-IR Imaging Spectroscopy of Phase Separation in Blends of Poly(3-hydroxybutyrate) with Poly(L-lactic acid) and Poly(ϵ -caprolactone),» *Biomacromolecules*, vol. 9, pp. 523 - 527, 2007.
- [87] J. Zhang, H. Sato, T. Furukawa, H. Tsuji, I. Noda y Y. Ozaki, «Crystalization behaviors of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(l-lactic acid) in their immiscible and miscible blends.,» *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, pp. 24463 - 24471, 2006.
- [88] T. Furukawa, H. Sato y R. Murakami, «Structure, dispersibility, and crystallinity of poly(hydroxybutyrate)/poly(L-lactic acid) blends studied by FT-IR microspectroscopy and differential scanning calorimetry,» *Macromolecules*, vol. 38, pp. 6445 - 6454, 2005.
- [89] curiosoando.com, «¿Qué es el almidón resistente?,» 29 Agosto 2017. [En línea]. Available: <https://curiosoando.com/que-es-el-almidon-resistente>. [Último acceso: 2019 Marzo 2].
- [90] L. Yu, *Biodegradable polymer blends and composites from renewable resources*, New Jersey: Wiley, 2009.
- [91] L. Zhang, X. Deng, S. Zhao y Z. Huang, «Biodegradable polymer blends of poly(3-hydroxybutyrate) and starch acetate,» *Polymer International*, vol. 44, p. 104, 1997.
- [92] A. M. Ismail y M. A. Gamal, «Water resistance, mechanical properties, and biodegradability of poly(3-hydroxybutyrate)/starch composites,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 115, pp. 2813 - 2819, 2010.

- [93] M. Zhang y N. Thomas, «Preparation and properties of polyhydroxybutyrate blended with different types of starch,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 16, pp. 688 - 694, 2009.
- [94] P. Pan, L. Zhao, B. Zhu, Y. He y Y. Inoue, «Fractionated Crystallization and Self Nucleation Behaviour of Poly(ethylene oxide) in Its Miscible Blends with Poly(3-hydroxybutyrate),» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 117, pp. 3013 - 3021, 2009.
- [95] D. Parra, J. Fusaro, F. Gaboardi y D. Rosa, «Influence of poly(ethylene glycol) on the thermal, mechanical, morphological, physical.chemical and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate),» *Polymer Degradation and Stability*, vol. 91, pp. 1954 - 1959, 2006.
- [96] S. Wong, R. Shanks y A. Hodzic, «Properties of poly(3-hydroxybutyric acid) composites with flax fibers modified by plasticiser absorption,» *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 287, pp. 647 - 655, 2002.
- [97] M. Khan, K. Ali, G. Hinrichsen, C. Kopp y S. Kropke, «Study on physical and mechanical properties of biopol-jute composite,» *Polymer-Plastic Technology and Engineering*, vol. 38, pp. 99 - 112, 1999.
- [98] A. Buzarovska, G. Bogoeva-Gaceva, A. Grozdanov, M. Avella, G. Gentile y M. Errico, «Potencial use of rice straw as filler in eco-composite materials,» *Australian Journal of Crop Science*, vol. 1, pp. 37 - 42, 2008.
- [99] H.-Y. Qin, Z.-Y. Liu, Y.-N. Chen, L. Liu y N. Zhou, «Simultaneous improvement of mechanical properties and thermal stability of bacterial polyester by cellulose nanocrystals,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 89, pp. 971 - 978, 2012.
- [100] E. Ten, L. Jiang y M. Wolcott, «Preparation and properties of aligned poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate)/cellulose nanowhiskers composites,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 92, pp. 206 - 213, 2013.
- [101] Y. Srithep, T. Ellingham, J. Peng, R. Sabo, C. Clemons, L. Turng y S. Pilla, «Melt compounding of poly(3-hydroxybutyrate-co-2hydroxyvalerate)/nanofibrillated cellulose nanocomposites,» *Polymer Degradation and Stability*, vol. 98, pp. 1439 - 1449, 2013.
- [102] U. Bhardwaj, P. Dhar, A. Kumar y V. Katiyar, «Polyhydroxyalkanoates (PHA)-Cellulose Based Nanobiocomposites for Food Packaging Applications,» *Food Additives and Packaging*, pp. 276 - 314, 2014.

- [103] D. Florez, Z. Suarez, N. Merchan, L. Gutierrez, L. Olmos y N. Moreno-Sarmiento, «Mutagenesis studies for enhancement of PHA production by *Burkholderia cepacia* 2G57, isolated from colombian soils,» *Santos Brasil: International Symposium of Biopolymers* , 2014.
- [104] A. Vilorio, K. Ardila, D. Mendez, I. Cabeza y N. Moreno, «Volumetric Oxygen Mass Transfer Coefficient Determination and Hydrodynamic Optimization of Polyhydroxyalkanoate Production with Vegetal Oil as Carbon Source,» *Chemical Engineering Transactions*, vol. 57, 2017.
- [105] F. J., «Extracción de PHAs con SDS,» Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá., 2016.
- [106] A. Garzón y D. Villamizar, «Purificación y caracterización de biopolímero tipo polihidroxialcanoato (PHA) - (Informe de Pasantía),» Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, Bogotá, 2017.
- [107] A. Rosengart, M. Cesário, M. de Almeida, R. Raposo, S. Espert, A. de Apodaca y M. da Fonseca , «Efficient P(3HB) extraction from *Burkholderia sacchari* cells using non-chlorinated solvents,» *Biochemical Engineering Journal*, vol. 103, pp. 39 - 46, 2015.
- [108] T. Fei, «Effective recovery of Poly-b-hydroxybutyrate (PHB) biopolymer from *Cupriavidus necator* using novel and environmentally friendly solvent system.,» *Biotechnology Progress* 32, pp. 678 - 685, 2016.
- [109] P. Hoftyzer y D. W. Van Krevelen, *Properties of polymers - 4 ed*, Amsterdam: ELSEVIER, 2009.
- [110] G. Braunegg, G. Lefebvre y K. F. Genser, «Polyhydroxyalkanoates, biopolyester from renewable resources: Physiological and engineering aspects,» *Journal of Biotechnology* 65, pp. 127 - 161, 1998.
- [111] L. Riedel, C. Brigham, C. Budde, J. Bader, C. Rha, U. Stahl y A. Sinsky, «Recovery of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from *Ralstonia eutropha* cultures with non-halogenated solvents,» *Biotechnology and Bioengineering* 30, pp. 1 - 9, 2012.
- [112] A. Aramvash, Z. Moazzeni y B. Gholami, «Comparision of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*,» *Engineering and Life Sciences - 18* , pp. 20 - 28, 2018.

- [113] A. Rosengart, M. T. Cesario, M. C. de Almeida, R. Raposo, A. Espert, E. Diaz de Apodaca y M. da Fonseca, «Efficient P(3HB) extraction from *Burkholderia sacchari* cells using non-chlorinated solvents,» *Biochemical Engineering Journal*, pp. 39 - 46, 2015.
- [114] K. Kinoshita, F. Osakada, Y. Ueda, K. Narasimhan, A. Cearley, K. Yee y I. Noda. Estados Unidos Patente US7098298B2, 2003.
- [115] E. B. Bagley, T. P. Nelson y J. M. Scigliano, «Three-dimensional solubility parameters and their relationship to internal pressure measurements in polar and hydrogen bonding solvents,» *Journal of Paint Technology*, p. 43, 197.
- [116] J. D. Hayler, A. M. Redman, R. K. Henderson, C. M. Alder, L. Shukla, L. Shuster y H. Sneddon, «Updating and further expanding GSK's solvent sustentability guide,» *Green Chemistry* 18, pp. 3879 - 3890, 2016.
- [117] A. Tejada, R. Montesinos y R. Guzman, *Bioseparaciones 2da Edición*, Ciudad de México: Pearson, 2011.
- [118] R. H. Marchessault, K. Okamura y C. J. Su, «Physical Properties of Poly (b-hidroxybutyrate). II. Conformational Aspects in Solution,» *Macromolecules*, pp. 735-740, 1970.
- [119] S. Akita, Y. Einaga, Y. Miyaki y H. Fujita, «Solution Properties of Poly (D-B-hidroxybutyrate). 1. Biosynthesis and Characterization».
- [120] J. E. Mark, *Polymer Data Handbook*, Oxford: Oxford University, 1999.
- [121] P. Huang, S. Furutate, S. Mizuno y T. Tsuge, «Thermal degradation behavior of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate),» *Polymer Degradation and Stability*, vol. 165, pp. 35 - 42, 2019.
- [122] M. Akodogan y E. Celik, «Purification and characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) from a *Bacillus megaterium* strain using various dehydration techniques,» *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 8, pp. 2292 - 2298, 2018.
- [123] C. Chan, P. Johansson, P. Magnusson, L. - J. Vandi, M. Hernandez, P. Halley, B. Laycock, S. Pratt y A. Werker, «Mixed culture polyhydroxyalkanoate-rich biomass assessment and quality control using thermogravimetric measurement methods,» *Polymer Degradation and Estability*, vol. 17, 2017.

- [124] N. Grassie, E. Murry y P. Holms, «The thermal degradation of poly(-(D)-b-hydroxybutyric acid): part 3- the reaction mechanism.,» *Polymer Degradation and Stability*, vol. 127, nº 34, p. 6, 1984.
- [125] R. Lehrle y R. Williams, «Thermal degradation of bacterial poly(hydroxybutyric acid): mechanism from the dependence of pyrolysis yields on sample thick-ness,» *Macromolecules*, vol. 27, nº 9, 1994.
- [126] R. Lehrle, R. Williams, C. French y T. Hammond, «Thermolysis and methanolysis of poly(b-hydroxybutyrate): random scission assessed by statistical analysis of molecular weight distributions,» *Macromolecules*, vol. 28, nº 14, p. 4408, 1995.
- [127] M. Chan Sin, S. Neon Gan, M. S. Mohd Anuar y I. K. Ping Tan, «Thermodegradation of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas putida* from oleic acid,» *Polymer Degradation and Stability*, vol. 95, pp. 2334 - 2342, 2010.
- [128] S. Mohandas, L. Balan, N. Lekshmi, S. S. Cubelio, R. Philip y I. S. Birght Singh, «Production and characterization of polyhydroxybutyrate from *Vibrio harveyi* MCBB 284 utilizing glycerol as carbon source,» *Journal of Applied Microbiology*, vol. 122, nº 3, pp. 698 - 707, 2017.
- [129] S. Bhattacharya, S. Dubey, P. Singh, A. Shrivastava y S. Mishra, «Biodegradable Polymeric Substances Produced by a Marine Bacterium from Surplus Stream of the Biodiesel Industry,» *Bioengineering*, vol. 3, nº 34, pp. 3 - 11, 2016.
- [130] M. Ganesh, A. Senthamari, S. Shanmughapriya y K. Natarajaseenivasan, «Effective production of low crystallinity Poly(3-hydroxybutyrate) by recombinant *E. coli* strain JM109 using crude glycerol as sole carbon source,» *Bioresource Technology*, vol. 192, pp. 677 - 681, 2015.
- [131] E. Hernández - Nuñez, C. A. Martínez - Gutierrez, A. López - Cortés, M. L. Aguirre - Macedo, C. Tabasco - Novelo, M. O. González - Díaz y J. Q. Garcia Maldonado, «Physico-chemical Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate) Produced by *Halomonas salina*, Isolated from a Hypersaline Microbial Mat,» *Journal of Polymers and the Environment*, 2019.
- [132] N. C. Loureiro, S. Ghosh, J. C. Viana y J. L. Esteves, «Thermal Characterization of Polyhydroxyalkanoates and Poly(lactic acid) Blends Obtained by Injection Molding,» *Polymer Plastics Technology and Engineering*, vol. 54, pp. 350 - 356, 2015.

- [133] L. Wei y A. G. McDonald, «Thermophysical properties of bacterial poly(3-hydroxybutyrate): Characterized by TMA, DSC, and TMDSC,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 42412, pp. 1 - 11, 2015.
- [134] A. Modeli, B. Calcagno y M. Scandola, «Kinetics of Aerobic Polymer Degradation in Soil by Means of the ASTM D 5988-96 Standard Method,» *Journal of Environmental Polymer Degradation*, pp. 109-116, 1999.
- [135] H. Chen, *Assessment of Biodegradation in Different Environmental Compartments of Blends and Composites Based On Microbial Poly(hydroxyalkanoates)*, Pisa: University of Pisa, 2012.
- [136] D. Parra, J. Fusaro, F. Gaboardi y D. Rosa, «Influence of Poly(ethylene glycol) on the thermal, mechanical, morphological, physical-chemical and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate),» *Polymer Degradation and Stability*, pp. 1954-1959, 2006.
- [137] D. Panaitescu, C. Nicolae, A. Frone, I. Chiulan, P. Stanescu, C. Draghici, M. Iorga y M. Mihailescu, «Plasticized P3HB with improved processing and balanced properties,» *Journal of Applied Polymer Science*, 2016.
- [138] D. L. Alberti, O. F. Souza, I. Barcellos y D. Z. Bucci, «Study on Physical and Mechanical Properties of PHB Biocomposites with Rice Hull Ash,» *Materials and Science Forums*, pp. 557 - 561, 2014.
- [139] Y. B. Kim y R. W. Lenz, «Polyesters from Microorganisms,» de *Biopolyesters*, Münster - Alemania, Springer, 2001, pp. 51 - 79.
- [140] K. Hong, S. Sun, W. Tian, G. Chen y W. Huang, «A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 51, pp. 523 - 526, 1999.
- [141] R. Majumdar, K. Alexander y A. Rigia, «Physical characterization of polyethylene glycols by thermal analytical technique and the effect of humidity and molecular weight,» *Pharmazie*, vol. 65, pp. 343 - 347, 2010.
- [142] D. Trache, A. Donnot, K. Khimeche, R. Benelmir y N. Brosse, «Physico-chemical properties and thermal stability of microcrystalline cellulose isolated from Alfa fibres,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 104, pp. 223 - 230, 2014.

- [143] M. A. Abdelwahab, A. Flynn, B. S. Chiou, S. Imam y W. Orts, «Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA - PHB blends,» *Polymer degradation and stability*, vol. 97, pp. 1822 - 1828, 2012.
- [144] J. C. Alzate Marin, S. Rivero , A. Pinotti y H. A. Caravelli, «Microstructural behaviour of matrices based on polylactic acid and polyhydroxyalkanoates,» *Agricultural and food chemistry*, pp. 1 - 34, 2018.
- [145] P. Tri Nguyen, S. Domenek, A. Guinault y C. Sollogub, «Cristalization Behaviour of Poly(lactide)/Poly(b-hydroxybutyrate)/Talc Composites,» *Applied Polymer Science*, vol. 129, pp. 3355 - 3365, 2013.
- [146] N. Yoshie, K. Nakasato, M. Fujiwara , K. Kasuya, H. Abe y Y. Doi, «Effect of low molecular weight additives on enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate),» *Polymer*, vol. 9, pp. 3227 - 3234, 2000.
- [147] G. Uzun y D. Aydemir, «Biocomposites from polyhydroxybutyrate and bio-fillers by solvent casting method,» *Bulletin of Material Science*, 2016.
- [148] U. Bhardwaj, P. Dhar, A. Kumar y V. Katiyar, «Polyhydroxyalkanoates(PHA) - cellulose based nanocomposites for food packaging applications,» de *Food Additives and Packaging* , Washington DC, ASC Symposium Series - American Chemical Society, 2014, pp. 276 - 314.
- [149] V. Jost y C. Langowski, «Effect of different plasticizers on the mechanical and barrier properties of extruded cast PHBV films,» *European Polymer Journal*, vol. 68, pp. 302 - 312, 2015.
- [150] J. Hildebrand y R. Scott, Regular Solutions, NJ: Prentice Hall, 1962.
- [151] C. Hansen, «The three dimensional solubility parameter - key to paint component affinities,» *Journal of Paint Technology*, pp. 1 - 8, 1967.
- [152] C. Hansen, Hansel Solubility Parameters: A user´s Handbook - 2 ed, Londres: CRC Press, 2007.
- [153] I. Noda, R. Marchessault y M. Terada, Polymer Data Handbook, Oxford: Oxford University Press, 1999.
- [154] L. Mortino, M. V. Cruz, A. Scoma, F. Freitas, L. Bertin, M. Scandola y M. A. Reis, «Recovery of amorphous polyhydroxybutyrate granules from *Cupriavidus necator*

cells grown on used cooking oil,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 70, pp. 117 - 123, 2014.

- [155] H. Tsuji y I. Fukui, «Enhanced thermal stability of poly(lactides) in the melt by enantiomeric polymer blending,» *Polymer*, vol. 44, pp. 2891 - 2896, 2003.