

**EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL
POLÍMERO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) P3HB OBTENIDO DE LA CEPA
Burkholderia cepacia B27 CON UN SOLVENTE ORGÁNICO NO HALOGENADO**

ORLINDA MELISSA MUÑOZ ARIZA

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERIA QUIMICA
BOGOTA D.C.
2019**

**EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL
POLÍMERO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) P3HB OBTENIDO DE LA CEPA
Burkholderia cepacia B27 CON UN SOLVENTE ORGÁNICO NO HALOGENADO**

ORLINDA MELISSA MUÑOZ ARIZA

**Proyecto integral de grado para optar por el título de
INGENIERO QUIMICO**

**Director
Andrés Felipe Ramos Farfán
Ingeniero Químico**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERIA QUIMICA
BOGOTA D.C.
2019**

NOTA DE ACEPTACION

Ing. Elizabeth Torres Games

Ing. Sandra Liliana Mesa Espitia

Ing. Diana Milena Morales Fonseca

Bogotá D.C. Febrero de 2019

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. Jaime Posada Díaz

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García–Peña

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. Ana Josefa Herrera Vargas

Decano Facultad de Ingeniería

Ing. Julio Cesar Fuentes Arismendi

Director del Programa de Ingeniería Química

Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a mi mamá quien me brindo la fuerza, seguridad y apoyo incondicional para continuar, a mi padre y hermanos por creer en mí, ayudarme en diferentes momentos para la culminación de esta etapa. A Laura Velásquez, por su amistad, colaboración y confianza. El aporte de cada uno de ustedes fue necesario para lograr esta meta.

Melissa Muñoz Ariza

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, por su ejemplo, perseverancia, comprensión y apoyo incondicional.

Quiero agradecerle a mi director de proyecto, el ingeniero ANDRÉS FELIPE RAMOS FARFÁN, por el apoyo, dedicación, orientación, tiempo y confianza depositada a lo largo de la ejecución de este proyecto, también al Ph. D. IVÁN ORLANDO CABEZAS ROJAS, por creer en mis capacidades y depositar su voto de confianza para participar en este proyecto.

Agradezco también a la ingeniera YEIMI GERALDIN MACÍAS CAMACHO por el apoyo y disposición para la ejecución de este proyecto y a la ingeniera MSc. NUBIA MORENO SARMIENTO, por brindarme todos los recursos necesarios para realizar la investigación.

A todas las personas que me acompañaron en el laboratorio de fermentaciones, las cuales estuvieron dispuestas a colaborar e hicieron un ambiente agradable a lo largo del proyecto y para finalizar a la Ing. ELIZABETH TORRES GÁMEZ, por el acompañamiento, orientación e ideas útiles en el proceso de elaboración de este trabajo.

CONTENIDO

	pág.
1. GENERALIDADES	23
1.1 BIOPOLIMEROS	23
1.1.1 Polihidroxicanoatos (PHA)	24
1.1.1.2 Propiedades	28
1.1.1.3 Biosíntesis	28
1.1.1.4 Producción y aplicación industrial	29
1.1.1.5 Métodos de extracción	32
1.1.1.6 Caracterización	33
1.2 DISOLVENTES	36
1.2.1 Clasificación	36
1.2.1.1 Disolventes polares	36
1.2.1.2 Disolventes apolares	38
1.2.1.3 Disolventes orgánicos	38
1.2.1.4 Disolventes alternativos	40
1.2.2 Solubilidad de polímeros	41
1.2.2.1 Parámetro de solubilidad	42
2. MATERIALES Y METODOS	45
2.1 CONDICIONES DE FERMENTACION	45
2.2 MATERIALES Y REACTIVOS	46
2.2.1 Biomasa seca	46
2.2.2 Poli (3-Hidroxiobutirato) P3HB tratado con cloroformo-metanol	46
2.2.3 Reactivos	46
2.2.4 Disolventes	47
2.2.4.1 Selección de disolventes	47
2.3 EQUIPOS	49
2.4 METODOS	50
2.4.1 Obtención de la biomasa seca	51
2.4.2 Recuperación de P3HB con cloroformo – metanol	52
2.4.3 Determinación de la solubilidad del P3HB	53
2.4.4 Método de obtención P3HB con solventes	55
2.4.5 Caracterización de P3HB	56
2.4.5.1 Porcentaje de recuperación	56
2.4.5.2 Peso molecular viscosimétrico (M_v)	56
2.4.5.3 Calorimetría diferencia de barrido (DSC)	57
2.4.5.4 Análisis termogravimétrico (TGA)	57
2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL	57
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	59
3.1 DETERMINACIÓN DE LOS SOLVENTES EMPLEANDO EL PARÁMETRO DE SOLUBILIDAD Y EL CONCEPTO DE QUÍMICA “VERDE”	59

3.1.1	Parámetro de solubilidad (δ)	59
3.1.1.1	Método de 2D para calcular la relación del parámetro de solubilidad	60
3.1.2	Guía sustentable de solventes	63
3.2	DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD PARA EL P3HB EN LOS SOLVENTES ORGÁNICOS EMPLEADOS	64
3.3	RECUPERACIÓN DEL P3HB CON SOLVENTES	70
3.3.1	Recuperación del P3HB con cloroformo	70
3.3.2	Recuperación del P3HB con ácido acético glacial	71
4.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	72
4.1	SELECCIÓN DE SOLVENTES	72
4.1.1	Parámetro de solubilidad	72
4.1.2	Solventes sustentables	73
4.2	SOLUBILIDAD EXPERIMENTAL DEL P3HB TRATADO CON CLOROFORMO - METANOL, EN LOS SOLVENTES ACETATO DE BUTILO, ÁCIDO ACÉTICO, ACETATO DE ETILO, METILETIL CETONA Y CLOROFORMO A DIFERENTES TEMPERATURAS	74
4.2.1	Condiciones óptimas del proceso	83
4.2.2	Análisis de varianza	84
4.3	RECUPERACIÓN DE P3HB CON SOLVENTES	86
4.3.1	Caracterización	87
4.3.1.1	Peso molecular viscosimétrico	87
4.3.1.2	Análisis termogravimétrico (TGA)	88
4.3.1.3	Calorimetría de barrido (DSC)	89
5.	CONCLUSIONES	92
6.	RECOMENDACIONES	93
	BIBLIOGRAFIA	94
	ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Acumulación de polihidroxicanoatos. (a) Esquema de gránulos acumulados intracelular (b) Análisis TEM de gránulos de PHA en células <i>Bacillus cereus</i> MCCB 281 utilizando glucosa como fuente de carbono	25
Figura 2. Estructura química de los PHA	26
Figura 3. Clasificación de los Polihidroxicanoatos (PHA). (a) Según el número de carbonos. (b) Estructura de PHA-scl y (c) Estructura de PHA-mcl	27
Figura 4. la vía metabólica más estudiada para la biosíntesis de PHA	29
Figura 5. Principales aplicaciones de los PHA	31
Figura 6. Método para la obtención de biomasa seca con y sin SDS	51
Figura 7. Método de recuperación de P3HB con cloroformo – metanol	53
Figura 8. Método para determinar la solubilidad del P3HB con diferentes solventes orgánicos	54
Figura 9. Método de obtención de P3HB con solventes	55
Figura 10. Selección de los solventes orgánicos empleando, la clasificación de los solventes, costos y punto de ebullición (°C)	64

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Diferentes microorganismos para la formación de PHA con sus nutrientes limitantes y sustratos	25
Tabla 2. Nomenclatura y símbolo según la longitud y posición de la cadena lateral (R) de los PHA	26
Tabla 3. principales compañías productoras de PHA a gran escala	30
Tabla 4. Reactivos empleados	46
Tabla 5. Porcentaje de recuperación de PHA en diferentes solventes orgánicos no halogenados	47
Tabla 6. Equipos empleados para la ejecución del proyecto	49
Tabla 7. Interacciones del parámetro de solubilidad de Hansen y Beagle para diferentes solventes	59
Tabla 8. Modelo matemático de contribución de grupos de Hoftyzer y Van Krevelen y Fedors para el P3HB	61
Tabla 9. Parámetro de solubilidad de Hansen, Bagley y Hildebrand para el P3HB	61
Tabla 10. Resultados experimentales promedio de la solubilidad porcentual del P3HB para el metiletil cetona y acetato de etilo a diferentes tiempos de agitación, temperatura y concentración	67
Tabla 11. Resultados experimentales promedio de la solubilidad porcentual del P3HB para el acetato de butilo y ácido acético a diferentes tiempos de agitación, temperatura y concentración	68
Tabla 12. Resultados experimentales promedio de la solubilidad porcentual del P3HB para el cloroformo a diferentes tiempos de agitación, temperatura y concentración	69
Tabla 13. Mejores condiciones de solubilidad del P3HB	84
Tabla 14. Peso molecular del PHA obtenido con ácido acético y cloroformo	88

LISTA DE GRAFICAS

pág.

Grafica 1. Modelo bidimensional de Bagley δv vs δh , para la caracterización de disolventes.	62
Grafica 2. Puntos de dispersión de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs temperatura (°C) para los diferentes solventes y concentraciones, cuando se emplea un tiempo de agitación de 1 hora.	76
Grafica 3. Puntos de dispersión para la solubilidad baja de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs temperatura (°C) para los diferentes solventes y concentraciones, cuando se emplea un tiempo de agitación de 1 hora.	76
Grafica 4. Puntos de dispersión de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs temperatura (°C) para los diferentes solventes y concentraciones, cuando se emplea un tiempo de agitación de 3 horas.	77
Grafica 5. Puntos de dispersión para la solubilidad baja de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs temperatura (°C) para los diferentes solventes y concentraciones, cuando se emplea un tiempo de agitación de 3 horas.	78
Grafica 6. Puntos de dispersión de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs concentración (g/mL) para los diferentes solventes y temperatura, cuando se emplea un tiempo de agitación de 1 hora.	78
Grafica 7. Puntos de dispersión para la solubilidad alta de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs concentración (g/mL) para los diferentes solventes y temperatura, cuando se emplea un tiempo de agitación de 1 hora.	79
Grafica 8. Puntos de dispersión de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs concentración (g/mL) para los diferentes solventes y temperatura, cuando se emplea un tiempo de agitación de 3 horas.	79
Grafica 9. Puntos de dispersión para la solubilidad alta de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs concentración (g/mL) para los diferentes solventes y temperatura, cuando se emplea un tiempo de agitación de 3 horas.	80
Grafica 10. Curvas de solubilidad experimental del P3HB en los solventes cloroformo y ácido acético para las concentraciones (0,025, 0,050, 0,100, 0,200) g/mL	83
Grafica 11. Grafica de los efectos principales para la variable respuesta para los factores concentración, tiempo, temperatura y tipo de solvente.	85
Grafica 12. Interacciones de la variable respuesta para los factores de concentración, tiempo, temperatura y tipo de solvente.	86
Grafica 13. Diagrama termogravimétrico del P3HB tratado con y sin SDS para Cloroformo y ácido acético	89

Grafica 14. Diagrama de calorimetría de barrido (enfriamiento) del P3HB tratado con y sin SDS recuperado.	90
Grafica 15. Diagrama de calorimetría de barrido (calentamiento) del P3HB tratado con y sin SDS recuperado con los solventes Cloroformo y ácido acético.	91

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Clasificación de los biopolímeros según la fuente de carbono	23
Cuadro 2. Alguno de los métodos de obtención de PHA	32
Cuadro 3. Clasificación de los disolventes orgánicos	38
Cuadro 4. Factores y niveles empleados en el desarrollo experimental para determinar la solubilidad del P3HB	58
Cuadro 5. Resultados experimentales promedio de la cantidad de biomasa empleada y PHA recuperado para el solvente cloroformo	70
Cuadro 6. Resultados experimentales promedio de la cantidad de biomasa empleada y PHA recuperado para el solvente ácido acético	71

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Ecuación de Mark-Houwink-Sakurada	34
Ecuación 2. Ecuación de Hagen-Poiseuille	34
Ecuación 3. Viscosidad reducida	35
Ecuación 4. Ecuación empírica de Huggins	35
Ecuación 5. Energía libre de mezcla.	42
Ecuación 6. Ecuación de Hildebrand.	42
Ecuación 7. Ecuación de Hansen.	43
Ecuación 8. Ecuación bidimensional de Bagley.	43
Ecuación 9. Fuerza de dispersión por contribución de grupos.	44
Ecuación 10. Fuerza de interacciones polares por contribución de grupos.	44
Ecuación 11. Fuerzas de Interacciones moleculares por puentes de hidrogeno por contribución de grupos.	44
Ecuación 12. Ecuación de Fedors	44
Ecuación 13. Porcentaje de recuperación	56
Ecuación 14. Ecuación de Mark-Houwink-Sakurada para el P3HB	56

LISTA DE ANEXOS

pág.

Anexo A. Propiedades fisicoquímicas y especificaciones de los solventes para la experimentación.	103
Anexo B. Solubilidad porcentual experimental del P3HB en los solventes (metiletil cetona, ácido acético, acetato de butilo y acetato de etilo) para los factores de tiempo de agitación, temperatura y concentración realizado por triplicado.	106
Anexo C. Gráficas de curvas de solubilidad entre el P3HB y los solventes metiletil cetona, acetato de etilo, acetato de butilo, ácido acético y cloroformo a diferentes concentraciones (0,025, 0,500, 0,100, 0,200) g/ml empleando 1 hora de agitación.	117
Anexo D. Cálculos de los resultados obtenidos por el programa estadístico minitab 18.1® para el diseño experimental.	125
Anexo E. Resultados del rendimiento de recuperación.	129
Anexo F. Peso molecular viscosimétrico.	130

LISTA DE ABREVIATURAS

CED: densidad de la energía cohesiva

COP: pesos colombianos

COV: compuestos orgánicos volátiles

g: gramos

h: hora

Kg: kilogramos

MEK: metiletil cetona

min: minutos

mL: mililitro

mmHg: milímetros de mercurio

PHA: polihidroxialcanoatos

PHB: polihidroxibutirato

P3HVx: poli(3-hidroxicaprolato)

P3HHx: poli(3-hidroxihexanoato)

P3HB: poli(3-hidroxibutirato)

s: segundos

SDS: dodecilsulfato de sodio

T_g: temperatura de transición

T_m: temperatura de fusión

USD: dólar

V_m: volumen molar

V_{rta}: variable respuesta

mm: milímetro

R_{ij}: radio de interacción

Da: Dalton

M_v: peso molecular viscosimétrico

GLOSARIO

Burkholderia cepacia: es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia de la *Pseudomonadaceae*. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y se aísla del suelo, el agua, las plantas y verduras.

EXTRACCIÓN: proceso de separación de una sustancia que se disuelve en uno o varios disolventes que entran en contacto en una interfaz y presentan un grado de solubilidad diferente.

POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA): poliésteres producidos por microorganismos de forma natural intracelularmente como reserva de energía y carbono.

POLÍMERO: macromolecular formadas por largas cadenas de monómeros que presentan elevada masa molecular.

POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (P3HB): es un biopolímero del grupo de los polihidroxicanoatos de cadena corta, sintetizado por microorganismo.

SOLVENTE: sustancia que puede disolver o diluir un soluto, se presenta en mayor cantidad.

MÉTODO DE PURIFICACIÓN: es un tratamiento que se le realiza a la biomasa o el PHA parcial, se emplean diferentes solventes (metanol, etanol, acetona) para la purificación del polímero, en el cual, se busca eliminar los metabolitos residuales producto de la fermentación.

HALOGENADO: compuesto que contienen elementos químicos del grupo IV de la tabla periódica (flúor, cloro, bromo, yodo, ástato y téneso), son compuestos con una elevada electronegatividad.

CEPA BACTERIANA: colonia de bacterias de una misma especie, Las cepas se pueden mantener en cultivos de agar, en placas de Petri, en medio líquido o crio preservación.

SOLUBILIDAD: es la capacidad de una sustancia (solvente) para disolver otra (soluto). Por lo tanto, concentración hace referencia en la cantidad de soluto y la cantidad de solvente en la disolución.

DODECILSULFATO SÓDICO (SDS): compuesto orgánico y tensioactivo aniónico, empleado en productos de higiene y limpieza.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como propósito llevar a cabo la evaluación del proceso de extracción y purificación del polímero poli(3-hidroxi-butirato) P3HB obtenido de la cepa *Burkholderia cepacia B27* con un solvente orgánico no halogenado el cual se llevó a cabo bajo la dirección del IBUN, en el macroproyecto de COLCIENCIAS titulado “Estudio de los Procesos de Escalamiento para la Producción de Plásticos Verdes” y la línea de investigación llamada “Producción de biopolímeros tipo PHA”.

Se busca obtener un solvente orgánico alternativo para la recuperación del P3HB obtenido de la cepa *B. cepacia B27*, reemplazando al solvente convencional cloroformo, donde se propone el desarrollo de un diseño experimental para evaluar la solubilidad porcentual del P3HB tratado con cloroformo-metanol, variando los factores (concentración, temperatura, tiempo de agitación y tipo de solvente) y conocer las condiciones favorables para la obtención del P3HB.

De los solventes estudiados (metiletil cetona, ácido acético glacial, acetato de butilo y acetato de etilo), la solubilidad porcentual del ácido acético glacial varía con respecto a la temperatura, por lo tanto, se determina que la barrera de interacción (polímero-solvente) se rompe a 90 °C, obteniendo valores similares a los alcanzados con el solvente patrón o blanco (cloroformo). Del desarrollo experimental para determinar la solubilidad del polímero, se establecen las condiciones que maximizan la solubilidad porcentual (0,050 g/mL, 90°C, 1 hora de agitación y ácido acético) que posteriormente se utilizarán para la recuperación del polímero.

Se emplean las curvas de solubilidad para comparar la cantidad de polímero solubilizado (g) por 100 g de solvente, de las cuales se puede determinar que se requiere menor cantidad (g) de ácido acético glacial para solubilizar el P3HB.

Se evalúa el método de obtención del P3HB en cloroformo y ácido acético, para determinar el porcentaje de recuperación (61% y 54%) respectivamente. El polímero recuperado con cloroformo tiene un peso molecular medio de $8,9 \times 10^5$ Da y una temperatura de fusión de 158 °C, por otro lado, el polímero recuperado con ácido acético tiene un peso molecular de $9,4 \times 10^5$ Da y una temperatura de fusión de 143 °C, la temperatura de degradación para ambos polímeros es de 220 °C.

Palabras clave: polihidroxicanoatos (PHA), poli(3-hidroxi-butirato) (P3HB), solventes orgánicos, extracción con solventes.

INTRODUCCIÓN

Los plásticos convencionales tienen diferentes aplicaciones, debido a la versatilidad, resistencia, fácil manipulación y propiedades mecánicas, que son necesarias en la industria y en la cotidianidad. Los productos desechables (plástico) que tienen una vida útil corta, pero un tiempo de degradación mayor a 100 años¹, se han acumulado en los diferentes ecosistemas creando una problemática mundial, en la cual, la flora y fauna es la es directamente perjudicada²; si el consumo de productos plástico continua con la tendencia actual, para el año 2050 se habrán producido 33 mil toneladas de residuos plástico, de los cuales se habrán reciclado el 27,2 %, incinerado 36,4 % y acumulados en el planeta 36,4 %³.

Como solución a esta problemática surgen los polihidroxialcanoatos (PHA), polímeros biodegradables y sintetizados mediante metabolismo microbiano, con características similares a los plásticos convenciones, el PHA más estudiado es el Poli(3-hidroxitirato) (P3HB) por las propiedades mecánicas, térmicas similares al polipropileno⁴. Los principales inconvenientes para la producción a nivel industrial son sus altos costos comparados a los plásticos convencionales que pueden alcanzar hasta 10 veces el valor comercial⁵.

El Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN) ha adelantado investigaciones sobre la síntesis de los PHA a partir de cultivos fermentados, con el fin de obtener un material con propiedades físicas, químicas y mecánicas, que se requieren para la producción de empaques y envases a nivel semi-industrial. Actualmente el IBUN ha centrado la investigación en la obtención de poli(3-hidroxitirato) P3HB a partir de la cepa *Burkholderia cepacia B27*.

Para garantizar un alto porcentaje de recuperación de los PHA, es necesario realizar la evaluación de diferentes técnicas de extracción y purificación. Un método de extracción consiste en emplear solventes para la recuperación de PHA, usualmente involucra cloroformo como reactivo, siendo esta una de las técnicas

¹ COMPROMISOECO.COM. Conoce cuánto tarda en degradarse los materiales. [en línea]. [Consultado: 07 de septiembre de 2018]. Disponible en internet: <http://compromisoeco.com.ar/residuos/conoce-cuanto-tardan-en-degradarse-los-materiales/>

² RPP NOTICIAS. Los desechos plásticos, una grave amenaza para la vida en el mar y en la tierra. [en línea]. [Consultado: 15 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <https://rpp.pe/mundo/medio-ambiente/los-desechos-plasticos-una-grave-amenaza-para-la-vida-en-el-mar-y-en-la-tierra-noticia-1107044>

³ GEYER, Roland, *et al.* Production, use, and fate of all plastics ever made. En: Science Advances, July, 2017, no. 7, vol. 3. 1-5 p.

⁴ ZULFIQAR, Ali, *et al.* Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. En: International Biodeterioration & Biodegradation, 126. 2018. 45-56p.

⁵ GONZALES, Yolanda, *et al.* Síntesis y biodegradación de Polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. En: Revista Internacional De Contaminación Ambiental. Noviembre, 2012, no.1, vol. 29. 77-115 p

más sencillas y utilizadas a nivel laboratorio, sin embargo, este solvente es volátil, tóxico y perjudicial para la salud de quien lo manipula, por la naturaleza química del solvente⁶. Con este trabajo se busca encontrar una alternativa al solvente convencional que tenga óptimos resultados de extracción y purificación del PHA y se adapte a las necesidades requeridas.

En la etapa actual del proyecto, se está evaluando el método de extracción y purificación de los PHA, para busca un proceso amigable con el medio ambiente, con bajos costos y presenten un óptimo rendimiento de recuperación. Por ello se emplea un método para determinar la solubilidad del P3HB en diferentes solventes orgánicos alternativos, para posteriormente evaluar el solvente que obtenga mejores resultados de solubilidad, en el proceso de obtención de PHA y realizar la caracterización del polímero recuperado.

⁶ ZULFIQAR, Ali, *et al.* Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. En: *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126. 2018. 47-48p.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el proceso de extracción y purificación del polímero poli(3-hidroxibutirato) P3HB obtenido de la cepa *Burkholderia cepacia B27* con un solvente orgánico no halogenado

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar los solventes orgánicos partiendo de la técnica de selección de solventes y los parámetros de solubilidad del polímero.
- Determinar la solubilidad del polímero P3HB en los diferentes solventes orgánicos.
- Establecer la eficiencia de extracción y purificación del P3HB obtenido de la cepa *Burkholderia cepacia B27* frente al solvente orgánico seleccionado.

1. GENERALIDADES

En este capítulo se realizará una introducción a los biopolímeros y en especial a los Polihidroxialcanoatos, describiendo la estructura, clasificación, propiedades, biosíntesis, producción, aplicaciones entre otras características importantes. También se mencionará el concepto de disolventes, la clasificación y características importantes.

1.1 BIOPOLIMEROS

Son plásticos biodegradables con propiedades fisicoquímicas y termoplásticas similares a los plásticos derivados del petróleo⁷. Se puede emplear el termino biopolímero para los polímeros naturales que se obtienen de fuentes animales, vegetales o microbiano⁸. La clasificación de los biopolímeros por la fuente de obtención se encuentra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de los biopolímeros según la fuente de carbono.

Clasificación	Fuente del biopolímero	Tipo de estructura	Clases	Ejemplos
Biopolímeros	Biomasa (agro polímeros)	Polisacáridos	Almidones	Trigo, Papa,
			Productos lignocelulósicos	Madera, Paja, Algodón
			Otros	Quitosano, Pectinas, Gomas
		Proteínas y lípidos	Animales	Caseína, Colágeno, Gelatina
			vegetales	Soya, Gluten
	Monómeros sintetizados de recursos agrícolas	ácidos	Ácido Poliláctico (PLA)	
	Producción microbiana	Polihidroxialcanoatos (PHA)	Poli-3hidroxibutirato (P3HB) Poli (3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato) P(3HB-co-3HV)	
Polisacáridos			Dextrano (DX)	

Fuente: VOGELSANG, David. Análisis del flujo de un biopolímero soluble en agua durante el procesamiento por moldeo y análisis de las propiedades de las películas resultantes. (2013). pág. 4

⁷ THARANATHAN, R. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. En: Critical Review in Food Science and Technology. March, 2003 no. 3, vol. 14. 71-78 p.

⁸ ANGARITA, Henry. Estudio de las variables que afectan la procesabilidad bajo condiciones de extrusión de un polímero de glucosa. Tesis de Magister en Ingeniería Química. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2007. 12-17p

Existe un creciente interés en sustituir los plásticos sintéticos, para disminuir el impacto ambiental ocasionado por la acumulación en diferentes ecosistemas. La limitación que se obtiene en la producción de biopolímeros está en el costo de fabricación, para el año 2015 el precio medio del polietileno (PE), polipropileno (PP) estuvo entre 1 USD/Kg, mientras los biopolímeros como el ácido Poliláctico (PLA) y el polihidroxibutirato (PHB) están entre 2,18 USD/Kg y 5 USD/Kg respectivamente⁹. Dentro de los diferentes biopolímeros, los polihidroxialcanoatos (PHA) se encuentran entre los polímeros más investigados, por ser completamente biodegradables y obtenidos a partir de síntesis de diferentes microorganismos. Entre las diferentes investigaciones que se están desarrollando, se busca reducir los costos para lograr un producto competido en el mercado¹⁰.

1.1.1 Polihidroxialcanoatos (PHA). Son biopolímeros o biopoliésteres, sintetizados por diferentes microorganismos (arqueas, microalgas, bacterias) que se almacenan en el citoplasma en forma de gránulos amorfos, rodeados de una monocapa de fosfolípidos y enzimas polimerasas y despolimerasas¹¹ figura 1. (a), se forman por la acción de enzimas intracelulares que polimerización por condensación los ácidos hidroxialcanoatos, formando enlaces éster. Dentro de la estructura celular son material de reserva de carbono y energía, acumulado bajo diferentes condiciones de cultivo¹² figura 1. (b).

Diferentes investigaciones han determinado que la acumulación de PHA depende del microorganismo, fuente de carbono y una limitación en sus nutrientes (nitrógeno, fósforo, oxígeno, magnesio, potasio o azufre) en el medio de cultivo¹³, en la tabla 1 se observan algunos ejemplos. La producción de PHA se puede realizar bajo dos condiciones dependiendo de la cepa bacteriana utilizada, para microorganismos como *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans* y *Pseudomonas putida* donde se requiere la limitación de un nutriente y no acumula PHA en la etapa de crecimiento, en otro caso para la *Escherichia coli* recombinante acumula el PHA en la etapa de crecimiento y no requiere ninguna limitación de nutriente¹⁴.

⁹ BIOPLASTICS.ORG. Bioplásticos. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <http://www.biokunststoffe.de>

¹⁰ VOGELSSANG, David. Análisis del flujo de un biopolímero soluble en agua durante el procesamiento por moldeo y análisis de las propiedades de las películas resultantes. Tesis para magister en Ingeniería química. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 2013.

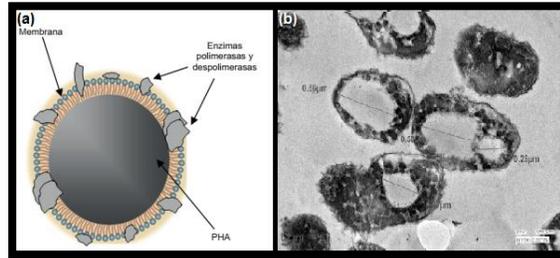
¹¹ KHANNA, Shilpi. y SRIVASTAVA Ashok. A simple structured mathematical model for biopolymer (P3HB). En: Biotechnology Progress. September, 2008, no. 3, vol. 21. 830-838 p. Doi: 10.1021/bp0495769.

¹² GONZALES, Yolanda. et al (2014). Pág. 78-80

¹³ GONZALES, Yolanda. et al (2014). Pág. 80

¹⁴ MUHAMMADI, Shabina.; AFZAL, Muhammad y HAMEED, Shafqat. Bacterial polyhydroxyalkanoates eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. En: Green Chemistry Letters and Reviews. Noviembre, 2015, no. 8. 56–77 p. Doi: 10.1080/17518253.2015.1109715

Figura 1. Acumulación de polihidroxicanoatos. (a) Esquema de gránulos acumulados intracelular (b) Análisis TEM de gránulos de PHA en células *Bacillus cereus* MCCB 281 utilizando glucosa como fuente de carbono.



Fuente: GONZÁLEZ, Yolanda *et al.* Síntesis y biodegradación de Polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano (2012). 77p y DER-SHYAN, Sharma. *et al.* Cultivation temperature modulated the monomer composition and polymer properties of PHA synthesized by *Cupriavidus* sp. L7L from levulinate as sole carbon source. (2018). 14p

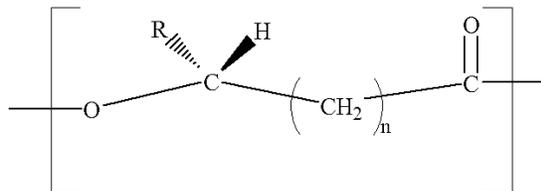
Tabla 1. Diferentes microorganismos para la formación de PHA con sus nutrientes limitantes y sustratos

Microorganismo	Nutriente limitante	Sustrato
<i>Alcaligenes latus</i>	Nitrógeno	Sacarosa Jugo de maple Residuos de malta
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	Oxígeno	Glucosa
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Oxígeno	Sacarosa Melazas
<i>Caulobacter crescentus</i>	Fósforo	Glucosa
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Nitrógeno	-
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Nitrógeno Fósforo	Octano
<i>Pseudomonas</i> sp. K	Magnesio	Metanol
<i>Ralstonia eutropha</i>	Nitrógeno	Fructosa Glucosa Aceite de soya Bagazo caña hidrolizado
<i>Rhizobium</i> ORS57	Oxígeno	-
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Nitrógeno Fósforo	Acético
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Fósforo	-

Fuente: BABEL, Wolfgang y STEINBÜCHEL, Alexander. Biopolyesters. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Alemania: Springer-Verlag., 2001. Vol 1. 342p.

1.1.1.1 Estructura y clasificación. Diferentes investigaciones han identificado hasta 150 monómeros de biopoliésteres, con una masa molecular entre (50 – 1000) x10³ Dalton¹⁵. La estructura general de PHA se observa en la figura 2 donde el valor de n dependerá del grupo R y el microorganismo en el cual se produce el polímero. En la tabla 2 se observan algunas sustituciones comunes del grupo radical (R)¹⁶.

Figura 2. Estructura química de los PHA.



Fuente: Elaboración propia en: ChemSketch ®

Tabla 2. Nomenclatura y símbolo según la longitud y posición de la cadena lateral (R) de los PHA

n	R	Nombre del polímero	Símbolo
1	Hidrogeno	Poli (3-hidroxiopropionato)	PHP
	Metil	Poli (3-hidroxi butirato)	P3HB
	Etil	Poli (3-hidroxi valetaro)	P3HV
	Propil	Poli (3-hidroxi hexanoato)	P3HHx
	Pentil	Poli (3-hidroxi octanoato)	P3HO
	Nonil	Poli (3-hidroxi dodecanoato)	P3HD
2	Hidrogeno	Poli (4-hidroxi butirato)	P4HB
	Metil	Poli (4-hidroxi valerato)	P4HV
3	Hidrogeno	Poli (5-hidroxi valerato)	P5HV

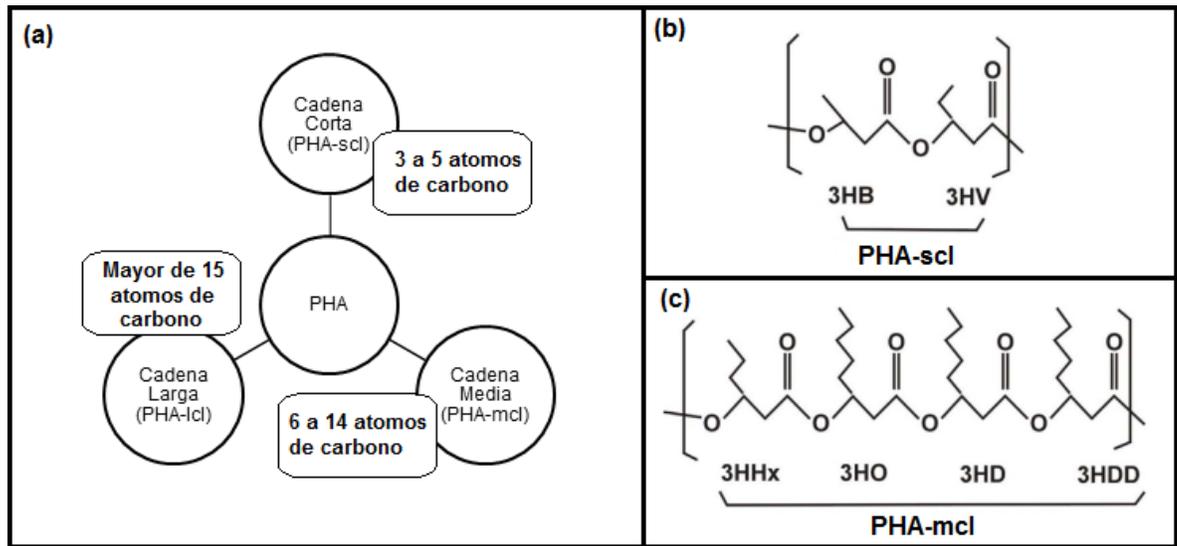
Fuente: Tomado de (GONZÁLEZ, Yolanda *et al.* Síntesis y biodegradación de Polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. (2012). Pág. 74.

¹⁵ GONZALES, Yolanda. *et al* (2014). Pág. 74-79

¹⁶ ZHANG, Bo, CARLSON, Ross y SRIENC, Friedrich. Engineering the monomer composition of polyhydroxyalkanoates synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. En: Applied and Environmental Microbiology. January, 2006, vol. 72, 536–543 p. Doi: 10.1128/AEM.72.1.536-543.2006.

La clasificación de los PHA depende según el número de carbonos que conforman el monómero, actualmente existen tres clases (figura 3.a), los PHA de cadena corta (PHA-scl) que están conformados de 3 – 5 carbonos (figura 3. b), los PHA de cadena media (PHA-mcl) de 6-14 carbonos (figura 3.c), y los PHA de cadena larga (PHA-lcl) que tienen más de 14 carbonos¹⁷. También se pueden dividir en dos grupos, homopolímero y copolímeros¹⁸.

Figura 3. Clasificación de los Polihidroxialcanoatos (PHA). (a) Según el número de carbonos. (b) Estructura de PHA-scl y (c) Estructura de PHA-mcl¹⁹.



Fuente: ZULFIQAR, Ali *et al.* Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. (2018). pág. 46.

Cuando 3HB: 3-hidroxibutirato, 3HV: 3-hidroxivalerato; 3HHx: 3-Hidroxihexanoato; 3HO: 3-Hidroxioctanoato; 3HD: 3-Hidroxidecanoato; 3HDD: 3-Hidroxidodecanoato.

¹⁷ KUNASUNDARI, B., SUDESH, K., 2011. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. En: Express Polymer Letters. 2011, no. 7, vol. 5. 620–634 p. <http://dx.doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>.

¹⁸ ANDERSON, Alistair y DAWES, Edwin. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. En: Microbiology Reviews. December, 1990, no. 4, vol. 54. 450-472 p.

¹⁹ ZULFIQAR, Ali *et al.* (2018). 46p

1.1.1.2 Propiedades. Dependiendo de la estructura o composición monomérica el polímero presenta diferentes propiedades fisicoquímicas²⁰. Los PHA se caracterizan por ser poliésteres biodegradables, biocompatibles, insolubles en agua y resistentes a los rayos UV. La mayoría de estos poliésteres son parcialmente cristalinos y sus propiedades térmicas y mecánicas usualmente se representan en términos de la temperatura de fusión (T_m) o temperatura de transición (T_g). Para los PHA-scl son típicamente polímeros termoplásticos, que pueden ser moldeables arriba del punto de fusión, donde la T_m es relativamente alta (180°C) y los PHA-mcl son altamente amorfos, elastómeros, con una temperatura de transición (-62 a -26 °C) y temperatura de fusión (42 – 58 °C)²¹. El peso molecular está influenciado por el método de recuperación y condiciones de producción (tipo de microorganismo y fuente de carbono usada), actualmente existe una variación de esta información para los diferentes PHA²². La degradación del PHA está influenciada por el área superficial del polímero, pH, temperatura, humedad, actividad microbiana y la composición monomérica. Para polímeros con bajo peso molecular y menor cristalinidad se degradan en el menor tiempo²³. La degradación de los PHA por los diferentes microorganismos en condiciones anaeróbicas producción de dióxido de carbono o aeróbicas agua o metanol²⁴.

1.1.1.3 Biosíntesis. La biosíntesis simplificada del P3HB se observa en la Figura 4, para la formación del polímero se inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por β -ketotiolasa (PhaA) para forma Acetoacetil-CoA. Después Acetoacetil-CoA reductasa depende de NADPH (PhaA) cataliza la reducción de Acetoacetil-CoA al isómero (R) de 3-Hidroxi butiril-CoA, que se polimeriza en P3HB mediante la sintasa (PhaC)²⁵. Hasta el momento se han encontrado más de 75 géneros diferentes de bacterias que almacenan los gránulos en el citoplasma de la célula bacteriana, las bacterias más estudiadas son *Cupriavidus necator*, *Ralstonia eutropha* y *Alcaligenes eutropha*²⁶.

²⁰ BUGNICOURT, Elodie.; CINELLI, Patrizia.; LAZZERI, Andrea y ALVAREZ, Vera. Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. En: Express Polymer. Letters. June, 2014, no. 11, vol. 8. 791–808 p. Doi: 10.3144/expresspolymlett.2014.82

²¹ Anderson A. *et al* (1990). Pág. 460

²² BABEL, Wolfgang y STEINBÜCHEL, Alexander. Biopolyesters. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Alemania: Springer-Verlag., 2001. Vol 1. 342 p.

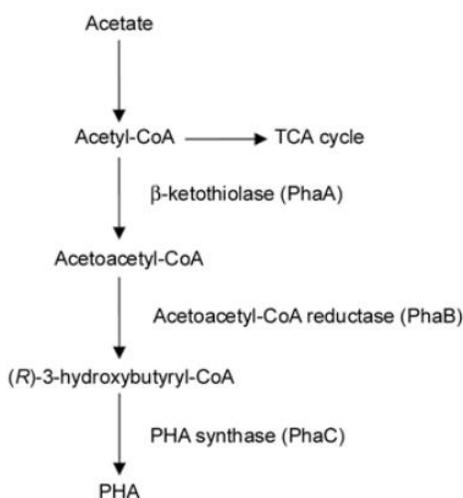
²³ JENDROSSEK Dieter. y HANDRICK Rene. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. En: Annual Review of Microbiology. February, 2002, no. 1, vol. 56. 403-432 p.

²⁴ LEMOS, Carolina. y CORDOBA, Alexis. Polihidroxi alcanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. En: Informador técnico (Colombia). Mayo, 2015 no. 1, vol. 79. 93-101 p.

²⁵ Kunasundari, B. *et al* (2011). Pág 625

²⁶ Lemos, C. *et al* (2015). Pág 95

Figura 4. la vía metabólica más estudiada para la biosíntesis de PHA.



Fuente: Kunasundari, B. et al. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. (2001) pág. 622

1.1.1.4 Producción y aplicación industrial. Los plásticos microbianos tienen una superioridad sobre los plásticos convencionales, debido a la biodegradabilidad que les otorga un valor agregado en el mercado, pero los altos costos en la fabricación es una desventaja para realizar la producción a nivel industrial²⁷. Existen diferentes factores (selección del microorganismo, tipo de fuente de carbono, productividad del proceso, el contenido del polímero, método de extracción y purificación, generación de subproductos, entre otros) que influyen en el precio final²⁸. Los costos actuales pueden oscilar entre 2,5 a 7,0 USD/kg según el método efectuado, las nuevas investigaciones buscan reducir los costos de producción, para obtener un producto rentable comercialmente, por ejemplo, para la producción y recuperación de PHA con el método ATPE (Extracción acuosa en dos fases) tiene un costo promedio de 5,77 USD/kg²⁹.

En la década de 1980 se registraron las primeras patentes para la producción, extracción y procesado de biopolíesteres, por la empresa (Imperial Chemical Industries) ICI, donde emplea la bacteria *Ralstonia eutropha* con un porcentaje de acumulación del polímero del 80% para el año 1988 se registra una producción de 800 toneladas. Existen diferentes empresas productoras de PHA (tabla 3).³⁰ En Brasil, el grupo Pedra agroindustrial SA productor de azúcar, etanol y energía

²⁷ ZULFIQAR, Ali *et al.* (2018). 46-50p

²⁸ LEE, Gi Na y NA, Jonguk. Future of microbial polyesters. En: Microbial Cell Factories. Mayo, 2013, no. 54, vol. 12. 1- 4 p. Doi: 10.1186/1475-2859-12-54

²⁹ KIT, Yoong.; SHOW, Pau.; LAN, Chi-Wei y LOH, Hwei-San. Economic and environmental analysis of PHAs production process. En: Clean Technologies and Environmental Policy. September, 2017, no. 7, vol. 19. 1941–1953 p. Doi: 10.1007/s10098-017-1377-2

³⁰ Gonzales, Yolanda. *et al* (2014). 89p

eléctrica, dentro de sus instalaciones tienen una planta productora de P3HB a partir de los residuos de la extracción de azúcar de caña, bajo el nombre comercial de Biocycle empleando *Burkholderia sp*, que le otorga una reducción en el precio final del producto hasta 5 veces, comparado con otros procesos de producción³¹.

Tabla 3. principales compañías productoras de PHA a gran escala³².

Compañía	País	Tipo de PHA	Producción (Ton/año)	Aplicación
ICI	Inglaterra	P3HBV	300	Material de empaque
Chemical Linz	Austria	P3HB	20-100	Material de empaque, liberación de fármacos
BTF	Austria	P3HB	20-100	Material de empaque, liberación de fármacos
Biomers	Alemania	P3HB	1000	Material de empaque, liberación de fármacos
BASF	Alemania	P3HB, P3HBV	Piloto	Mezcla con ECOFLEX
Metabolix	EUA	Varios	*	Material de empaque
Tepha Inc.	EUA	Varios	*	Implantes biomédicos
ADM	EUA	Varios	50000	Materia prima
P&G	EUA	Varios	Variable	Material de empaque
Monsanto	EUA	P3HB, P3HBV	*	Materia prima
Meridian	EUA	Varios	10000	Materia prima
Kaneka	Japón	Varios	1000	Material de empaque
Mitsubishi	Japón	P3HB	10	Material de empaque
Biocycle	Brasil	PHA	100	Materia prima
Bio-on	Italia	Varios	10000	Materia prima
Zhejiang Tian An	China	P3HBV	2000	Materia prima
Jiangmen Biotech	China	P3HBcoH3Hx	*	Materia prima
Yikeman	China	PHA	3000	Materia prima
Tianjin Northern	China	P3HB	10000	Materia prima
Shantou Lianyi Biotech	China	Varios	Piloto	Materia prima, uso biomédico
Jiangsu Nan	China	P3HB	Piloto	Materia prima
Tianjing Green Bioscience	China	P3HBco4HB	10000	Materia prima, material de empaque
Shangdong Lukang	China	Varios	Piloto	Materia prima, uso biomédico

*Información no disponible

Fuente: (GONZÁLEZ, Yolanda et al. Síntesis y biodegradación de Polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. (2012). Pág. 84.

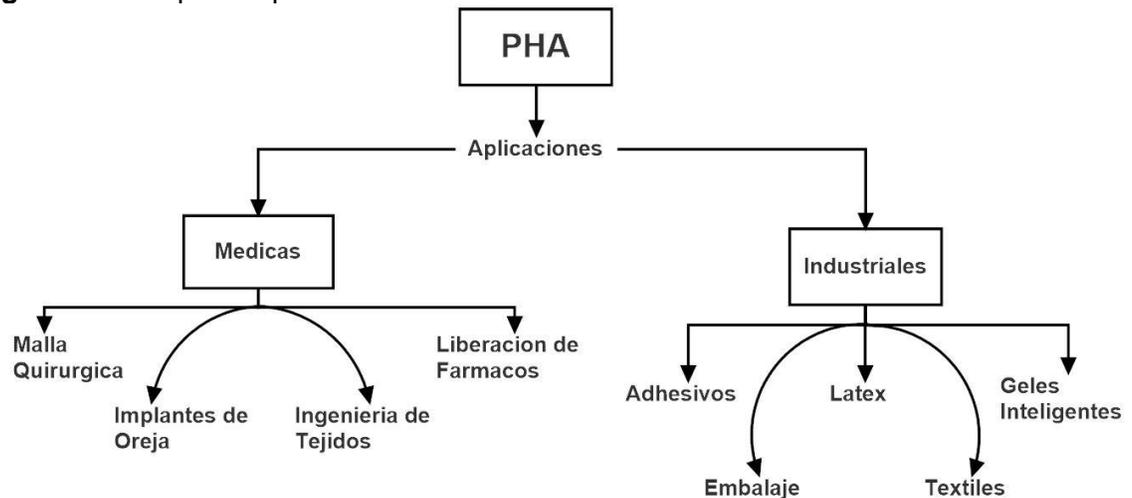
³¹ CHEN, Guo-Qiang. A microbial polyhydroxyalkanoates based bio- and materials industry. En: Chemical Society Reviews. Mayo, 2009, no. 8, vol. 38. 2434–2446 p. Doi:10.1039/B812677C 38

³² CHEN, Guo-Qiang. Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications. 1 ed. Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010. Vol 4. 450 p.

Por las diferentes propiedades fisicoquímicas y mecánicas, los PHA tienen diferentes aplicaciones, se pueden clasificar en dos grandes grupos de aplicaciones: médicas e industriales (figura 5)³³.

Las aplicaciones médicas son diversas por ser biocompatibles con el tejido humano, células óseas y tejidos epiteliales, tiene aplicaciones como hilo para sutura, sistema de liberación de medicamentos entre otros³⁴. Se han realizado diferentes investigaciones en animales e incluso en humanos para el tratamiento de la gingivitis como portadores de fármacos, las micro y nano esferas de PHA actúan como capa externa en la que el fármaco se libera cuando el polímero comienza a degradarse³⁵. Una de las aplicaciones industriales, es en la agricultura, porque se emplean para la liberación controlada de pesticidas y herbicidas, no requieren un producto con un grado alto de pureza, el cual puede hacer más rentable el proceso³⁶.

Figura 5. Principales aplicaciones de los PHA



Fuente: Pakalapati, H., et al., Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. (2018). 8p

³³ PAKALAPATI, Harshini.; CHANG, Chih.; SHOW, Pau.; ARUMUGASAMY, Kumar y LAN, Jhon. Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. September, 2018, no. 3, vol. 126. 282 - 292 p

³⁴ Babel W. y Steinbüchel A. (2001). 342p

³⁵ VALAPPIL, S., BOCCACCINI, A., BUCKE, C. y ROY, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera Bacillus and Streptomyces. En: Ant. Van Leeuwenhoek. 2006, vol. 91. 1–17p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-006-9095-5>.

³⁶ Babel W. y Steinbüchel A. (2001). 342p

1.1.1.5 Métodos de extracción. Se pueden encontrar diferentes métodos para la recuperación de PHA, en los cuales se extrae el polímero almacenado en el microorganismo, en el cuadro 2 se observan los métodos más empleados y sus ventajas y desventajas.

Cuadro 2. Alguno de los métodos de obtención de PHA³⁷³⁸

Método	Descripción	Ventajas	Desventajas	Ref.
Digestión Química	Se suele emplear Hipoclorito de sodio (NaClO) o tensoactivos para la extracción del PHA	Método económico, simple y fácil.	Degradación del polímero. Bajo rendimiento de recuperación. No es amigable con el medio ambiente	Zulfiqar, A. (2018)
Digestión Enzimática	Se divide en tres pasos: (1) Tratamiento térmico. (2) Hidrolisis enzimática (3) Lavado con surfactante	Amigable con el medio ambiente.	Proceso complejo. Alto costo de enzimas	Kunasundari, B. (2011)
Extracción con solventes.	Está dividido en tres pasos: (1) Pretratamiento para romper las células, normalmente se emplea NaOH o SDS. (2) Solubilizar los gránulos en un disolvente. Los disolventes más empleados son cloroformo, 1,2-dicloroetano, acetona y carbonato de etileno. (3) Precipitar el polímero con un no disolvente, comúnmente se emplea metanol o etanol frío	Método simple y fácil. Se obtiene un polímero con alta pureza. Mayor peso molecular	No es amigable con el medio ambiente. Se necesita altas cantidades de solvente.	Zulfiqar, A. (2018)
Flotación	Se Realiza en dos pasos: (1) Extracción con disolvente. Las células se mezclan con cloroformo por 72 horas y los residuos flotan (2) Autodestrucción de los restos celulares	Se obtienen un polímero con alta pureza. Diminución de los residuos extraídos	No es amigable con el medio ambiente.	Zulfiqar, A. (2018)

³⁷ ZULFIQAR, Ali *et al.* (2018). 46-50p

³⁸ KUNASUNDARI, B., SUDESH, K., 2011. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. En: Express Polymer Letters. 2011, no. 7, vol. 5. 620–634 p

Cuadro 2. (Continuación)

Fluidos supercríticos	Comúnmente se emplea dióxido de carbono en condiciones supercríticas.	Amigable con el medio ambiente. Se obtiene un polímero con alta pureza.	Elevadas Condiciones de temperatura y presión. Dificultad en la extracción del polímero. Alto costo	Kunasundari, B. (2011)
Extracción acuosa en dos fases (ATPE)	El sistema utiliza agua para aislar, purificar y recuperar	Amigable con el medio ambiente. Elimina las impurezas	Bajo porcentaje de recuperación.	Raza, Z. (2018)

Fuente: KUNASUNDARI, B. y SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. (2011). Pag 627–629 y ZULFIQAR, Ali *et al.* Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. (2018). Pag 47-50.

1.1.1.6 Caracterización. Existe diferentes técnicas para determinar la composición monomérica, peso molecular y propiedades térmicas de los PHA, algunas de las más empleadas son:

➤ **Peso molecular (M_w).** Para determina el peso molecular y estructura de los PHA, se emplean diferentes técnicas y métodos que permite determinar la composición del polímero y la distribución de las unidades monomérica algunas de las más empleadas son: Cromatografía de gases acoplada a masas y la resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de filtración en gel y peso molecular viscosimétrico³⁹. El peso molecular promedio para P3HB producido por bacterias silvestres está en un rango de 1×10^4 a 3×10^6 g/mol. El peso molecular depende de los factores de la fermentación y el microorganismo empleado, para la célula *R. eutropha* tiene un peso molecular entre ($93,9 \times 10^4$ a $14,0 \times 10^5$) g/mol, mientras otras bacterias pueden reportar un valor menor o mayor⁴⁰.

○ **El peso molecular viscosimétrico (M_v).** El peso molecular viscosimétrico es un método que permite calcular el peso molecular promedio (M_w) de los polímeros por medida de la viscosidad de las disoluciones, conociendo la viscosidad intrínseca $[\eta]$. La viscosidad de las disoluciones, no es una medida directamente proporcional al peso molecular, pero se puede relacionar empíricamente⁴¹.

³⁹ Gonzales, Yolanda. *et al* (2014). 85p

⁴⁰ Gonzales, Yolanda. *et al* (2014). 80p

⁴¹ BILL MEYER, Fred. Ciencia de los polímeros. Reverte. Madrid, España. 2009. 20-365p

El M_v de un polímero se puede calcular con la viscosidad intrínseca a partir de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada⁴², ecuación 1.

Ecuación 1. Ecuación de Mark-Houwink-Sakurada

$$[\eta] = KM_v^\alpha$$

Donde:

K y α : son constantes que dependen de la naturaleza del solvente, del polímero y de la temperatura.

○ **Viscosidad intrínseca $[\eta]$**

La viscosidad es una técnica importante para la caracterización de polímeros, los polímeros en solución dependen de las variaciones del peso molecular (estructura, interacción con el disolvente, concentración y la temperatura del medio). La viscosidad intrínseca $[\eta]$, es una de las magnitudes más consideradas, puesto que está directamente relacionada con los parámetros de la macromolécula e independiente a la concentración por medio de las disoluciones⁴³.

La ecuación de Hagen-Poiseuille (ecuación 2), que establece que el tiempo de flujo de una solución polimérica a través de un capilar delgado es proporcional a la viscosidad de la solución, por lo tanto, la relación del tiempo de flujo del solvente puro y de la solución polimérica será proporcional a la viscosidad⁴⁴. Donde $[\eta]$ es la extrapolación a concentración cero de la viscosidad reducida (η_{red}), según la siguiente expresión⁴⁵:

Ecuación 2. Ecuación de Hagen-Poiseuille

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red}$$

Donde:

$[\eta]$: viscosidad intrínseca

η_{red} : viscosidad reducida

⁴² DE BUSTURIA, Ignacio. Estudio de la influencia de los cationes de Pb^{2+} y Cs^+ en la conformación de la polivinilpirrolidona. Título para doctorado. España: Universidad Complutense de Madrid. 1992.

⁴³ De Busturia, *et al.* (1992). Pág 52

⁴⁴ ARMELIN, Elaine. Síntesis y caracterización de nuevas poliesteramidas: estudio de sus propiedades. Título para doctorado de Química. Cataluña: Universidad Politécnica de Cataluña. 2002. 37 p.

⁴⁵ SALDÍVAR-GUERRA, Enrique y VIVALDO-LIMA, Eduardo. Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing, 1 ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc. 2013. 363 – 364 p.

Y la viscosidad reducida se define como:

Ecuación 3. Viscosidad reducida

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} = \frac{t}{t_0} - 1$$

Donde:

η_{sp} : viscosidad específica

c: concentración de la disolución (g/dL)

t: tiempo de caída de la disolución

t_0 : tiempo de caída del solvente puro

La ecuación empírica de Huggins (1943), permite la relación de la viscosidad intrínseca y la concentración, como se observa en la ecuación 4:

Ecuación 4. Ecuación empírica de Huggins

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k[\eta]^2 c$$

Donde:

k: constante de Huggins

➤ **Propiedades térmicas.** Para determinar las propiedades térmicas de los PHA se emplea la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA).

○ **Calorimetría diferencial de barrido (DSC).** Es una técnica ideal de caracterización, empleada para estudiar el comportamiento de un polímero cuando se le suministra energía calorífica, se utiliza para calcular la temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de fusión (T_m) y cristalinidad (X_c) de un polímero. Se emplean dos muestras una de objeto de estudio y otra de referencia, ambas muestras se exponen al mismo programa térmico, para medir la diferencia entre el flujo de calor suministrado⁴⁶.

⁴⁶ CORTEZ, Maira. Síntesis y caracterización de polímeros vía radicales libres usando xantatos. Título para licenciado. Mexico: Universidad autónoma del estado de Hidalgo, 2006. 16 - 20p

- **Análisis termogravimétrico (TGA).** Es una técnica que permite determinar la pérdida de masa que experimenta una muestra a ser sometida a un programa térmico, se emplea una balanza sensible para conocer la variación del peso en función del tiempo o temperatura, y la medición se lleva a cabo en atmosfera controlada.

El TGA aporta información como, la pureza de la muestra, retención del disolvente, velocidad de reacción y energía de activación⁴⁷.

1.2 DISOLVENTES

Son sustancias que permiten la dispersión de otra sustancia en el seno, obteniendo una solución homogénea, se caracterizan por poseer unas determinadas propiedades fisicoquímicas que les confieren una aptitud para el uso industrial⁴⁸. Las reacciones se clasifican en solvólisis e hidrólisis, la solvólisis es cuando en la reacción, el disolvente se encuentra en exceso de uno de los reactivos y la hidrólisis cuando el reactivo es el agua⁴⁹.

Los solventes representan un papel importante en la industria, debido a las ventajas que otorgan, pero estos también están vinculados a una serie de impedimentos, debido a la toxicidad, impacto ambiental y riesgo a la salud humana, por estos motivos actualmente se están buscando la sustitución de disolventes convencionales (clorados e hidrocarburos) por el uso de alcoholes y sus derivados. Actualmente la industria de solventes vende 5 millones de toneladas anualmente⁵⁰

1.2.1 Clasificación. Los disolventes se pueden clasificar según la naturaleza química, tipo de solvente, estructura química, polaridad, entre otras características. A continuación, se mencionan algunas de sus clasificaciones⁵¹.

1.2.1.1 Disolventes polares. Son sustancias que en cuyas moléculas la distribución de la nube electrónica es asimétrica, poseen uno o más enlaces polares y tiene un momento dipolar. Estos también se clasifican en:

⁴⁷CORTEZ, Maira. (2006). 17-18 p

⁴⁸ UNIVERSIDAD DE BARCELONA. Técnicas y operaciones avanzadas en el laboratorio químico (TALQ). [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <http://www.ub.edu/talq/es/node/194>

⁴⁹ LAFUENTE, Luis.; BURGUETE, Maria y ALTAVA, Benito. Introducción a la química orgánica. Castellón de la plana. España: Publicaciones de la Universitat Jaume I. 1997. 89-91 p.

⁵⁰ EUROPEAN SOLVENTS INDUSTRY GROUP (ESIG). The solvents industry. [en línea]. [Consultado: 21 de julio de 2018]. Disponible en internet: <http://www.esig.org/>

⁵¹ MORALES, Xochitl. Los disolventes en la química verde. Tesis de pregrado para Ingeniero químico industrial. México: Instituto Politécnico Nacional. 2013. 12- 24 p

➤ **Polares próticos.** Son aquellos que tienen un enlace O-H o N-H, elevada polaridad y constante dieléctrica, así como hidrógenos capaces de participar en la formación de puentes de hidrogeno, Son capaces de disolver sustancias polares o de carácter iónico, por ejemplo, es el ácido acético.

○ **Ácido acético.** Es un disolvente polar prótico con fórmula molecular $C_2H_4O_2$ de alta pureza hasta 100%. Es un ácido orgánico volátil de cadena corta, que se encuentra en el vinagre, responsable del sabor y olor. Se caracteriza por el bajo costo de adquisición y un compuesto de bajo riesgo para humanos, animales y ambiente. Se emplea para obtener rangos de pH, como neutralizador, productos de limpieza y en la industria de caucho y textil⁵².

➤ **Polares apróticos.** Son aquellos que tienen una elevada polaridad, pero no hidrógenos capaces de participar en la formación de puentes de hidrogeno, son aquellos solventes que no aceptan ni dan protones. Por ejemplo:

○ **Metiletil cetona (MEK).** También conocido como butanona, con fórmula molecular C_4H_8O . Es un líquido incoloro, inflamable, altamente volátil, con olor dulce y estructura similar a la acetona. El MEK es irritante para los ojos y el tracto respiratorio; la exposición a altas concentraciones puede generar náuseas, mareo, falta de coordinación y confusión⁵³. En la industria se emplea como solvente, fabricación de plásticos, textiles y pinturas⁵⁴.

○ **Acetato de butilo.** Con la fórmula molecular $C_6H_{12}O_2$ es un disolvente con volatilidad media. Es un líquido transparente e incoloro con un olor a fruta característico. Es miscible con un número de disolvente orgánico⁵⁵. El acetato de butilo puede ser fácilmente hidrolizado en presencia de ácidos o soluciones alcalinas. Es usado como disolvente, la extracción de aromas naturales y esencias de frutas y perfumes⁵⁶.

○ **Acetato de etilo.** Es un éster de fórmula molecular $C_4H_8O_2$. El acetato de etilo es un líquido incoloro, con olor aromático característico, muy volátil y con un punto de ebullición de $77^\circ C$. Es un compuesto miscible con diferentes

⁵² TARDIFF, Richard. Health Effects of Organics: Risk and Hazard Assessment of Ingested Chloroform. En: American Water Works Association. December, 1977, no.12, vol. 69. 658–661 p. Doi: 10.1002/j.1551-8833.1977.tb06845.x

⁵³ RECURSO NACIONAL CANADIENSE DE SEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL (CCSSO). Metiletilcetona (MEK). [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: http://www.ccsso.ca/oshanswers/chemicals/chem_profiles/mek/basic_mek.html

⁵⁴ DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS PARA PERSONAS MAYORES DE NEW JERSEY. Hoja informativa para sustancias peligrosas, Metiletil cetona. [en línea]. [Consultado: 21 de julio de 2018]. Disponible en internet: <https://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1258sp.pdf>

⁵⁵ SUCROAL SA. Productos industriales, acetato de butilo. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <https://sucroal.com.co/products/acetato-de-butilo/>

⁵⁶ DMITRIEVSKY. La planta química, Acetato de butilo. [en línea]. [Consultado: 21 de julio de 2018]. Disponible en internet: <https://www.dcpt.ru/es/acetato-de-butilo/>

hidrocarburos, cetonas, alcoholes y éteres, que tiene diferentes aplicaciones en la industria química, textil, farmacéutica entre otras⁵⁷. Es empleado en la producción de tintas de impresión, solventes de pintura y la elaboración de compuestos explosivos⁵⁸.

1.2.1.2 Disolventes apolares. Son sustancias que en cuyas moléculas la distribución de la nube electrónica es simétrica, de tipo orgánico, capaces de disolver sustancias no hidrosolubles, en general son sustancias que carecen de polo positivo o negativo en sus moléculas.

1.2.1.3 Disolventes orgánicos. Los disolventes orgánicos son compuestos orgánicos volátiles (COV), cuya estructura química tiene de base el elemento carbono, que se utilizan solos o en combinación con otros agentes, para disolver materias primas, productos o materiales residuales, formando una mezcla homogénea, modificando alguna de sus propiedades, viscosidad, agente tensoactivo o como portador de otras sustancias, que después de ser depositadas, quedan fijas y el disolvente se evapora⁵⁹. El uso de estos disolventes libera compuestos orgánicos volátiles a la atmosfera que generan problemas en el entorno. Se pueden clasificar según la estructura química, como se observa en el cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación de los disolventes orgánicos⁶⁰.

Grupo		Algunos Solventes empleados en la industria
Hidrocarburos	Alifáticos	Pentano, hexano, heptano
	Aromáticos	Benceno, tolueno, xileno, etilbenceno, estireno
	Cíclicos	Ciclohexano, metilciclohexano
	Halogenado	Cloruro de metileno, cloroformo, tricloroetileno, tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano, freones, 1,1,1-tricloroetano, tetracloroetileno

⁵⁷ UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN, CHILE. Ficha de seguridad para diferentes reactivos: Acetato de etilo. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <http://www2.udec.cl/sqrt/fich/ACETATO.htm>

⁵⁸ SUCROAL SA. Productos industriales, acetato de etilo. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <https://sucroal.com.co/products/acetato-de-etilo/>

⁵⁹ INSTITUTO SINDICAL DE TRABAJO, AMBIENTE Y SALUD (ISTAS). Disolventes. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: http://www.istas.net/risctox/gestion/estructuras/_3085.pdf

⁶⁰ INSTITUTO SINDICAL DE TRABAJO AMBIENTE Y SALUD. Clasificación de los disolventes. [en línea]. [Consultado: 01 de julio de 2018]. Disponible en internet: <http://www.istas.net>

Cuadro 3. (Continuación).

Oxigenados	Alcoholes	Metanol, etanol, i-propanol, n-propanol, butanol
	Cetonas	Acetona, butanona-2, 4-Metil-pentanona-2, hexanona-, ciclohexanona
	Esteres	Acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de i-propilo, acetato de n-butilo, acetato de i-butilo
	Éter	2-metoxietanol, etoxietanol, butoxietanol, p-dioxano
	Glicoles	Etilenglicol, dietilenglicol

Fuente: (ISTAS). Clasificación de los disolventes. Recuperado el 15 de agosto de 2018 de: http://www.istas.net/risctox/gestion/estructuras/_3085.pdf

Los disolventes más utilizados son los disolventes orgánicos, en el sector industrial y comercial, en la industria son empleados en procesos de producción, separación y extracción, también en la formulación de productos como pinturas y recubrimientos o productos intermedios como resinas, aditivos y polímeros. Se emplean por diferentes motivos, como⁶¹:

- Obtención de dispersiones homogéneas.
- Un eficiente transporte de masa y energía.
- Disolver sustancias
- Modificar la reactividad (velocidad y selectividad) en reacciones químicas
- Separación de sólidos

➤ **Disolventes orgánicos halogenado.** Se entiende por los productos líquidos orgánicos que contienen más del 2% e algún halógeno. Se trata de productos muy tóxicos e irritantes y en algunos casos cancerígenos. Se incluye en este grupo también las mezclas de disolventes halogenados y no halogenados, con un contenido sea superior al 2% del halógeno⁶².

○ **Cloroformo.** También conocido como triclorometano, con fórmula molecular CHCl_3 . Es un compuesto orgánico halogenado, un líquido incoloro, volátil, con un característico olor dulzón, ligeramente soluble en agua, miscible con alcohol, éter, benceno y otros. Se emplea como materia prima en la industria química (fabricación resinas y plásticos) y como disolvente en procesos industriales y

⁶¹ MORALES, Xóchitl. Los disolventes en la química verde. Tesis de pregrado para Ingeniero químico industrial. México: Instituto Politécnico Nacional. 2013. 12- 24 p

⁶² CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA MOLECULAR & MEDICINA REGENERATIVA (CABIMER). Unidad de Isotopos, Seguridad química y biológica. [en línea]. [Consultado: 15 de julio de 2018]. Disponible en internet: https://www.cabimer.es/web/docs/isotopos/gestion_de_residuos.pdf

laboratorios⁶³. El cloroformo puede entrar al cuerpo al inhalar aire, ingerir alimentos o agua y se introduce fácilmente por la piel, es un depresor del sistema nervioso central y produce efectos tóxicos sobre el hígado y los riñones, si la piel entra en contacto con altas concentraciones puede ocasionar llagas⁶⁴.

➤ **Disolventes orgánicos no halogenado.** Son los líquidos orgánicos inflamables que contengan menos de un 2% en halógenos, son productos en algunos casos tóxicos y entre ellos, se pueden encontrar alcoholes, aldehídos, amidas, cetonas, ésteres, glicoles, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos y nitrilos⁶⁵.

1.2.1.4 Disolventes alternativos. Son compuestos que buscan remplazar las sustancias actuales y disminuir el impacto ocasionado por el empleo de disolventes orgánicos, donde se caracterizan por la baja toxicidad y volatilidad, no son corrosivos, y el riesgo al medio ambiente y la salud humana es mínimo, algunos de los más comunes son⁶⁶.

➤ **Disolventes reactivos.** Son aquellos que tienen baja volatilidad relativa y la capacidad de reaccionar con otros componentes, no forman parte de los COV.

➤ **Disolventes neotéricos.** Son los disolventes nuevos, contemporáneos y modernos, comparándolos con los disolventes convencionales, tienen menor toxicidad, más seguros y menos contaminantes. Entre las nuevas investigaciones son disolventes con un gran potencial, debido a que son sustentables. Entre ellos se encuentran, los líquidos iónicos, fluidos supercríticos y el agua

⁶³ CENTRE FOR ECOLOGICAL SCIENCES (CES). Environmental Information System, Cloroformo. [en línea]. [Consultado: 01 de julio de 2018]. Disponible en internet: <http://wgbis.ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/ENV/envsp/Vol315.htm>

⁶⁴ INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO. Cloroformo. [en línea]. [Consultado: 28 de agosto de 2018]. Disponible en internet: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valores_Limite/Doc_Toxicologica/FicherosSerie2/DLEP%2026.pdf

⁶⁵ (CABIMER). [en línea]. Disponible en internet: https://www.cabimer.es/web/docs/isotopos/gestion_de_residuos.pdf

⁶⁶ PEREZ, Sofia. Elaboración de pintura a partir de residuos sólidos urbanos metálicos. Anexo C. disolventes alternativos. Tesis de pregrado. México: 2012. [en línea]. [Consultado: 05 de agosto de 2018]. Disponible en internet: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqi/perez_j_s/apendiceC.pdf

➤ **Líquidos iónicos (LI).** Son sales compuestas por iones, que existen en estado líquido a temperatura ambiente, estos compuestos poseen propiedades físicas y químicas únicas, como bajos punto de fusión, presión de vapor tan baja que se considera nula y una alta estabilidad térmica. Tiene la capacidad de disolver tanto solutos polares como no polares⁶⁷.

➤ **Fluidos supercríticos (FSC).** Son aquellos fluidos sometidos a condiciones por encima de la presión y temperatura crítica, esto implica la formación de una sola fase en el fluido tiene propiedades intermedias entre las de un líquido y las de un gas⁶⁸. El fluido adquiere una gran difusividad y alta densidad, estas propiedades le permite disolver solutos⁶⁹.

1.2.2 Solubilidad de polímeros. La solubilidad es un concepto físico de dos componentes que se mezclan formando una fase homogénea, que mide la capacidad máxima para disolver un soluto en un disolvente a una temperatura determinada. Se pueden clasificar en soluciones saturadas, diluidas y sobresaturada. La solubilidad depende de la temperatura, naturaleza del disolvente y soluto y de la presión⁷⁰.

La solubilidad de los polímeros depende de la estructura química y del peso molecular, se emplea en disoluciones como pinturas, recubrimientos, adhesivos, donde los polímeros se encuentran en solución. Debido al tamaño molecular de los polímeros, la solubilidad es más compleja, por ejemplo, para polímeros termoplásticos, se forma un gel cuando el solvente penetra al polímero y en caso de polímeros termoestables solo llegan a disolver pequeñas cantidades del polímero. Los polímeros son solubles en determinados solventes debido a las interacciones intermoleculares y efectos energéticos⁷¹.

⁶⁷ FRANCO-VEGA, Avelina.; PALOU, Enrique.; RAMÍREZ-CORONA, Nelly. y LÓPEZ-MALO, Aurelio. Líquidos iónicos: una alternativa “verde” para procesos de extracción en la industria de alimentos. En: Temas selectos de ingeniería de alimentos. 2014, no. 1, vol. 8. 15-26 p.

⁶⁸ MONTERO-SANCHEZ, J. Disolventes Orgánicos, Fluidos supercríticos y Líquidos iónicos. Facultad de farmacia. Universidad Católica de Manizales (UCM). [Archivo PDF]. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: http://webs.ucm.es/info/btg/personales/jmsanchez/TEMA%204_03.pdf

⁶⁹ CARDONA, Carlos. y ORREGO Carlos. Avances investigativos en la producción de biocombustible. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Manizales. 2012.

⁷⁰ BROWN, Theodore, *et al.* Química: La ciencia central. 9 ed. México: Pearson Educación, 2004. Cap. 13. 484-524 p.

⁷¹ GONZALES-PROLONGO, M. Propiedades químicas y físicas de polímeros. Capítulo I. Introducción. España: Universidad politécnica de Madrid. 1997. 65-94 p. ISBN: 84-89694-35-4

1.2.2.1 Parámetro de solubilidad. La disolución de un polímero en diferentes solventes está determinada por la energía libre de mezcla (ecuación 5) en este proceso la contribución entrópica siempre es negativa y el valor de la entalpia marca el signo de la energía libre de Gibbs. Hildebrand y Scott (1950) relacionaron la entalpia con la densidad de energía cohesiva (CED), que es la energía necesaria para romper los enlaces intermoleculares por unidad de volumen (ecuación 6). Se estableció que la relación que los líquidos con parámetro de solubilidad similares tienen un $\Delta G < 0$ ⁷².

La similitud estructural favorece la solubilidad, cuando los parámetros de solubilidad son similares la solubilidad entre el polímero y solvente es favorable. La aproximación de Hildebrand es válida para disoluciones ideales, pero las moléculas no cuentan con puentes de hidrogeno o enlaces polares, ni otras interacciones específicas. Para determinar el parámetro de solubilidad de los solventes y polímero, se utiliza el método de Hansen, que amplió el concepto y propuso que este es el resultado de la contribución de los enlaces intermoleculares que componen la molécula⁷³. Es decir que el parámetro de solubilidad se divide en tres interacciones, así: (δd) fuerza de dispersión o fuerzas no polares, (δp) interacciones polares, producidas por dipolos permanentes y (δh) interacciones moleculares por puentes de hidrogeno (ecuación 7) creando un modelo tridimensional. Para simplificar el modelo tridimensional de Hansen se emplea un modelo bidimensional de Bagley (1971), en donde relacionan los términos (δd y δp) por la similitud termodinámica, con el nuevo parámetro (δv), como se observa en la ecuación 8⁷⁴. El valor normalmente se expresa en unidades de $\text{MPa}^{1/2}$ para el sistema internacional (SI)⁷⁵.

Ecuación 5. Energía libre de mezcla.

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T \cdot \Delta S_m$$

Ecuación 6. Ecuación de Hildebrand.

$$\delta^2 = CED = \frac{\Delta E}{V_m} = \frac{\Delta H_{vap} - R \cdot T}{V_m}$$

⁷² HANSEN, Charles. Hansen solubility parameters. 2 ed. Estados Unidos: CRC press. 2007. 26 – 69p.

⁷³ GUTIÉRREZ, C., *et al.* Una aproximación practica para el diseño de un proceso reciclado de polímeros mediante disoluciones. En: AFINIDAD. Junio, 2011, no. 553, vol. 68. 181-188 p

⁷⁴ BELLAS, María. Formulación y Caracterización de Materiales Compuestos Integrados por una Matriz de Caucho Estireno-Butadieno (SBR) Reforzada con Nanoarcilla. Tesis para título de doctora. Coruña: Universidade da Coruña, 2012.

⁷⁵ SMALLWOOD, Ian. Handbook of organic solvent properties. Great Britain: Hodder Headline Group. 1996.

Ecuación 7. Ecuación de Hansen.

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2$$

Ecuación 8. Ecuación bidimensional de Bagley.

$$\delta_v^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2$$

Donde:

ΔG_m : Energía libre de Gibbs de mezcla

ΔH_m : Entalpía de mezcla

ΔS_m : Entropía de mezcla

T: temperatura

δ : parámetro de solubilidad

CED: Densidad de la energía cohesiva

δ_d : fuerza de dispersión o fuerzas no polares

δ_p : interacciones polares, producidas por dipolos permanentes

δ_h : interacciones moleculares por puentes de hidrogeno

V_m : volumen molar

ΔH_{vap} : Entalpía de vaporización

R: constante de los gases

➤ **Método de contribución de grupos de Hoftyzer y Van Krevelen.** El parámetro de solubilidad no está disponible para todos los disolventes o polímeros métodos para determinar el parámetro de solubilidad uno de los más empleados es el método de contribución de grupos de Hoftyzer y Van Krevelen (1976), donde las variables son determinadas experimentalmente por los distintos grupos funcionales⁷⁶.

El método de Hoftyzer y Van Krevelen estima el parámetro de solubilidad a partir de valores de F_i para la contribución de átomos y efectos constitucionales (doble o triple enlace) utilizando las siguientes ecuaciones⁷⁷:

⁷⁶ Gutiérrez, C. *et al.* (2011). 185p

⁷⁷ Bellas, Maria. *et al* (2012). 29p

Ecuación 9. Fuerza de dispersión por contribución de grupos.

$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{V_m}$$

Ecuación 10. Fuerza de interacciones polares por contribución de grupos.

$$\delta_p = \frac{\sqrt{\sum F_{pi}^2}}{V_m}$$

Ecuación 11. Fuerzas de Interacciones moleculares por puentes de hidrogeno por contribución de grupos.

$$\delta_d = \sqrt{\frac{\sum U_{hi}}{V_m}}$$

Donde:

F_{di} , F_{pi} y U_{hi} : contante de Van Krevelen

V_m : volumen molar

➤ **Método de contribución de grupos de Fedors.** Es un modelo matemático, donde Fedors establece que el Volumen molar se puede estimar con la sumatoria de los volúmenes parciales de los grupos funcionales para el compuesto de interés. Como se observa en la ecuación 12.

Ecuación 12. Ecuación de Fedors

$$V_m = \sum_i \Delta v_i$$

Donde:

V_m : volumen molar

v_i : volúmenes parciales de los grupos funcionales

2. MATERIALES Y METODOS

Para el desarrollo del presente trabajo se emplearon diferentes materiales, equipos y reactivos necesarios para la obtención del biopolímero, recuperado de la cepa *B. Cepacia B27*. Las metodologías que se desarrollaron a lo largo del proyecto se ejecutan para: obtener, determinar la solubilidad y realizar la recuperación con el solvente alternativo del biopolímero.

Los materiales y equipos empleados para la ejecución del proyecto fueron suministrados por el instituto de biotecnología de la universidad nacional (IBUN), el grupo de investigación “producción de biopolímeros PHA” que hace parte del macroproyecto de Colciencias “Estudio de los procesos de escalamiento para la producción de plásticos verdes”.

2.1 CONDICIONES DE FERMENTACION

Para el desarrollo de este trabajo se emplea la cepa *Burkholderia sp*, que pertenece a un grupo de bacilos Gram negativos mesófilos, no esporuladores y fermentadores⁷⁸, de metabolismo aeróbico que en situaciones de estrés almacenan PHB intracelularmente⁷⁹. La cepa *Burkholderia cepacia B27*, se obtuvo del proceso mutagénesis de transposón mini-Tn5 a partir cepa *E. coli S17* con un gen producto de *pha B* de la cepa *Ralstonia eutropha H16*, según Flórez *et al*⁸⁰, para que la acumulación intracelular del PHA aumente, alcanzando rangos de (53 – 83) % peso seco, empleando como fuente de carbono (aceite vegetal)⁸¹.

Las condiciones de fermentación determinan características importantes en el polímero como: peso molecular, metabolitos residuales, cantidad de PHA almacenado, por lo tanto, a lo largo de este proyecto se utiliza la biomasa obtenida de la fermentación describirá a continuación:

Para la producción del P3HB se empleó la cepa *Burkholderia cepacia B27* la cual fue obtenida mediante modificación genética en el IBUN. Todos los medios fueron esterilizados a 120 °C por 30 minutos en una autoclave (B-250 – Biolab®). Se realizó una fermentación en lote, todos los componentes esenciales para el

⁷⁸ ARDILA, Kathy y VILORIA, Andrés. Evaluación del escalamiento de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por fermentación a partir de la bacteria mutante *Burkholderia cepacia B27* a nivel semi-industrial. Tesis de pregrado de Ingeniería Química. Bogotá: Universidad de America, 2017. 22 p

⁷⁹ VERLINDEN, Rob.; HILL, David.; WILLIAMS, Craig y RADECKA, IZA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. En: Journal of Applied Microbiology. July, 2007, no. 6, vol.102.1442 – 1449 p.

⁸⁰ FLOREZ, D. *et al*. Mutagenesis studies for enhancement of PHA production by *Burkholderia cepacia 2G57*, isolated from Colombian soils. En: International Symposium on Biopolymers Santos Brazil. 92p.

⁸¹ Ardila, Maria. *et al* (2017). 22p

crecimiento del microorganismo y el inoculo son adicionados al principio del proceso. La fermentación se realizó en un reactor de 100 L. Se adecuo el reactor con 60 L de agua de grifo y el medio de cultivo PHA KH_2PO_4 2,65 g/L; Na_2HPO_4 3,39 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,8 g/L; MgSO_4 0,3 g/L y como fuente de carbono se empleó aceite vegetal (Mazorca de oro-Grasco®) 20 g/L. El pH medio fue mantenido a 6.0, empleando NaOH al 3 N, la temperatura en 30 °C y el flujo de oxígeno en 2 vvm. El periodo de fermentación fue de 72 horas⁸².

Con las condiciones descritas anteriormente se obtiene 500 gramos de biomasa seca.

2.2 MATERIALES Y REACTIVOS

Para la elaboración del presente trabajo se emplearon diferentes materiales y reactivos, tales como: el biopolímero tratado con cloroformo y metanol, que se empleó en el desarrollo experimental, la biomasa seca necesaria para, el proceso de recuperación y los reactivos (acetato de butilo, acetato de etilo, ácido acético glacial, cloroformo, metanol y metiletil cetona). A continuación, se describen con detalle.

2.2.1 Biomasa seca. Se emplean 8 gramos de biomasa seca para este trabajo, el método de obtención se describe posteriormente con detalle y se puede observar en la figura 6.

2.2.2 Poli (3-Hidroxibutirato) P3HB tratado con cloroformo-metanol. Se emplean 180 gramos de P3HB, para determinar la solubilidad del biopolímero frente a los diferentes solventes seleccionados, el método de obtención se describe posteriormente con detalle y se puede observar en la figura 7.

2.2.3 Reactivos. Los reactivos empleados para la ejecución del proyecto se observan en la tabla 4 con los porcentajes de pureza.

Tabla 4. Reactivos empleados

Disolventes	Marca	Pureza (%)
Cloroformo	Mallinckrodt	99,8
Acetato de etilo	PanReac	99

⁸² MÉNDEZ, Daniel. (2016). Modelamiento matemático y optimización del proceso de producción de polihidroxialcanoatos empleando la bacteria Burkholderia cepacia B27 a partir de ácidos grasos. Tesis de maestría. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 21-45 p.

Tabla 4. (Continuación).

Acetato de butilo	Merck	99,6
Ácido acético glacial	PanReac	99,7
Metiletil cetona	Merck	99,7
Metanol	J.T. Baker	99,95

Fuente: Elaboración propia.

2.2.4 Disolventes. En estos momentos existe un gran número de solventes orgánicos que se emplean solos o en combinación con otros agentes, para disolver productos, materiales o materia prima, en diferentes campos de la industria (alimentaria, cosmética, farmacéutica y pinturas). Sus principales aplicaciones son: modificar la viscosidad, portadores de otras sustancias, plastificantes o conservantes⁸³. Debido a la variedad de biopolímeros con estructura y propiedades fisicoquímicas, no se puede establecer un disolvente universal, por esto es necesario realizar una elección de solventes adecuada.

Por lo tanto, se eligen los solventes que previamente se han empleado en diferentes estudios para la recuperación de PHA de cadena corta.

2.2.4.1 Selección de disolventes. La elección de los disolventes se realizó utilizando los diferentes estudios e investigación para la obtención del homopolímero P3HB o PHB y el copolímero P(3HB-co-3HHx) y P(3HB-co-3HVx) por la técnica de extracción con solvente con un porcentaje de recuperación superior al 30 %. En la tabla 5, se observa los 14 solventes recopilados.

Tabla 5. Porcentaje de recuperación de PHA en diferentes solventes orgánicos no halogenados

Solvente Orgánico no halogenado	PHA	Microorganism o	Recuperación (%)	Referencia
Acetato de Butilo	P(3HB-co-3HHx)	<i>Ralstonia eutropha</i>	41,0 ± 1,0 a 50°C	(Riedel, 2012)
Acetato de Etilo	P(3HB-co-3HHx)	<i>Ralstonia eutropha</i>	99,0 ± 0,0 a 100 °C	(Riedel, 2012)

⁸³ Blount Estefania. (1998). Disolventes orgánicos. *Daphnia* 12. Recuperado de: <http://www.daphnia.es/revista/12/articulo/425/Disolventes-organicos>.

Tabla 5. (Continuación).

Acetona	PHB	<i>Cupriavidus necator</i>	85,0 a 145 °C	(Fei, 2016)
Ácido Acético	PHB	<i>Cupriavidus necator</i>	36, 71 ± 2,0 a 100 °C	(Aramvash, 2018)
Anisol	P3HB	<i>Burkholderia sacchari</i>	97,0 a 120 °C	(Rosengarta, 2015)
Carbonato de Etileno	PHB	<i>Cupriavidus necator</i>	98,6 ± 2,0 a 150 °C	(Aramvash, 2018)
Carbonato de Propileno	PHB	<i>Cupriavidus necator</i>	85,0 a 145 °C	(Fei, 2016)
CicloHexanona	P3HB	<i>Burkholderia sacchari</i>	93,0 a 130 °C	(Rosengarta, 2015)
Dimetil sulfóxido	PHB	<i>Cupriavidus necator</i>	60,60 ± 2,0 a 150 °C	(Aramvash, 2018)
Etanol	PHB	<i>Cupriavidus necator</i>	85,0 a 145 °C	(Fei, 2016)
Heptano	PHB	<i>Ralstonia eutropha</i>	99,0 a 90°C	(Kinoshita, 2006)
Metanol	PHB	<i>Cupriavidus necator</i>	81, 16 ± 1,0 a 50 °C	(Aramvash, 2018)

Tabla 5. (Continuación).

Metil Isobutil cetona	P(3HB-co-3HHx)	<i>Ralstonia eutropha</i>	55,0 ± 2,0 a 100 °C	(Riedel, 2012)
Metiletil Cetona	P(3HB-co-3HVx)	<i>Ralstonia eutropha</i> y células recombinantes de <i>Escherichia coli</i>	93,8 ± 0,6 a 60 °C	(Yang, 2015)
	P(3HB-co-3HHx)	<i>Ralstonia eutropha</i>	95,0 ± 1,0 a 75 °C	(Riedel, 2012)

Fuente: elaboración propia.

2.3 EQUIPOS

En las diferentes etapas para el desarrollo del proyecto se emplearon diferentes equipos. En la tabla 6 se observan las especificaciones de los equipos empleados y una breve descripción.

Tabla 6. Equipos empleados para la ejecución del proyecto

Equipos	Marca	Función	Imagen
Bomba de vacío	Gast	Generar una presión de vacío de -1 bar	
Horno	Memmert	Dispositivo que genera calor y lo mantienen a una temperatura.	

Tabla 6. (Continuación)

Balanza analítica	Kern	Instrumento que se utiliza para medir la masa	
Plancha de agitación	Heidolph	Equipo diseñado para agitar (rpm) y calentar	
Termómetro digital	TP-101	Instrumento empleado para medir la temperatura	
Centrifuga	International de equipments co	Equipo empleado para separar las muestras solidas	
Molino ⁸⁴	Cuisinart	Equipo empleado para moler y obtener una muestra homogénea	
Papel filtro de celulosa	CN-0177 50x50 (0,22 micras) LC	Material empleado para filtrar y retener la biomasa seca	

Fuente: elaboración propia.

2.4 METODOS

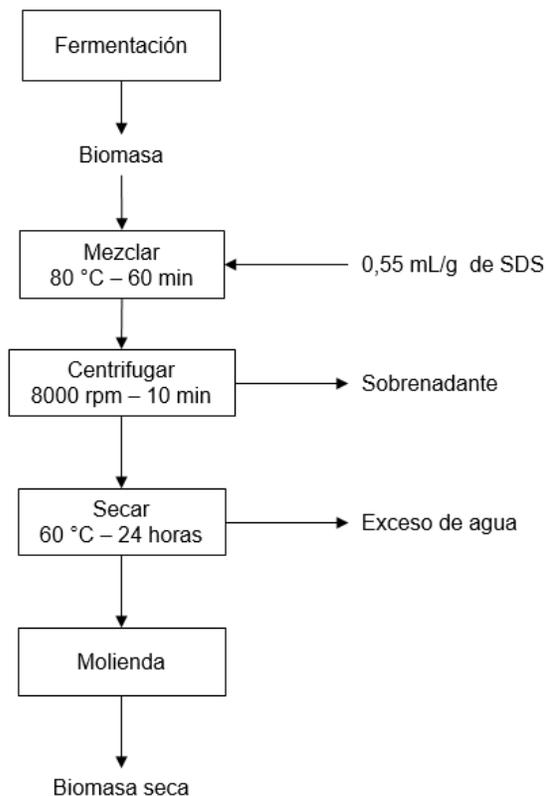
Los métodos empleados para la ejecución del proyecto son: obtención de la biomasa seca, recuperación del P3HB empleando cloroformo-metanol, determinar la solubilidad porcentual del P3HB en los solventes orgánicos determinados y

⁸⁴ CUISINART.COM. Molino para café. [en línea]. [Consultado: 21 de julio de 2018]. Disponible en internet: <https://www.vidri.com.sv/producto/101296/MOLINO-PARA-CAFE-CUISINART-DCG20BKN.html>

recuperación del P3HB empleado el solvente orgánico seleccionado. Todos los métodos se describirán con detalle a continuación.

2.4.1 Obtención de la biomasa seca. Después de la etapa de fermentación, se obtiene una biomasa húmeda con metabolitos residuales, que es tratada con el tensoactivo SDS al 20 % para romper la membrana lipídica que protege el polímero y facilitar la obtención del biopolímero, en una relación 0,55 mL/g, a 80 °C por 60 min. Luego se centrifuga la biomasa obtenida de la fermentación, durante 10 minutos a 8000 rpm, se elimina el sobrenadante, se repite el proceso dos veces con agua de grifo. Posteriormente se vierte en bandejas de aluminio y se seca en un horno a 60 °C por 24 horas. La biomasa seca tiene forma de láminas, el cual se pasa por un molino, para homogenizar y disminuir el tamaño (3 - 1 mm), para pasar a ser almacenada en bolsas de plástico con cierre hermético, a temperatura ambiente. El método se observa en la figura 6.

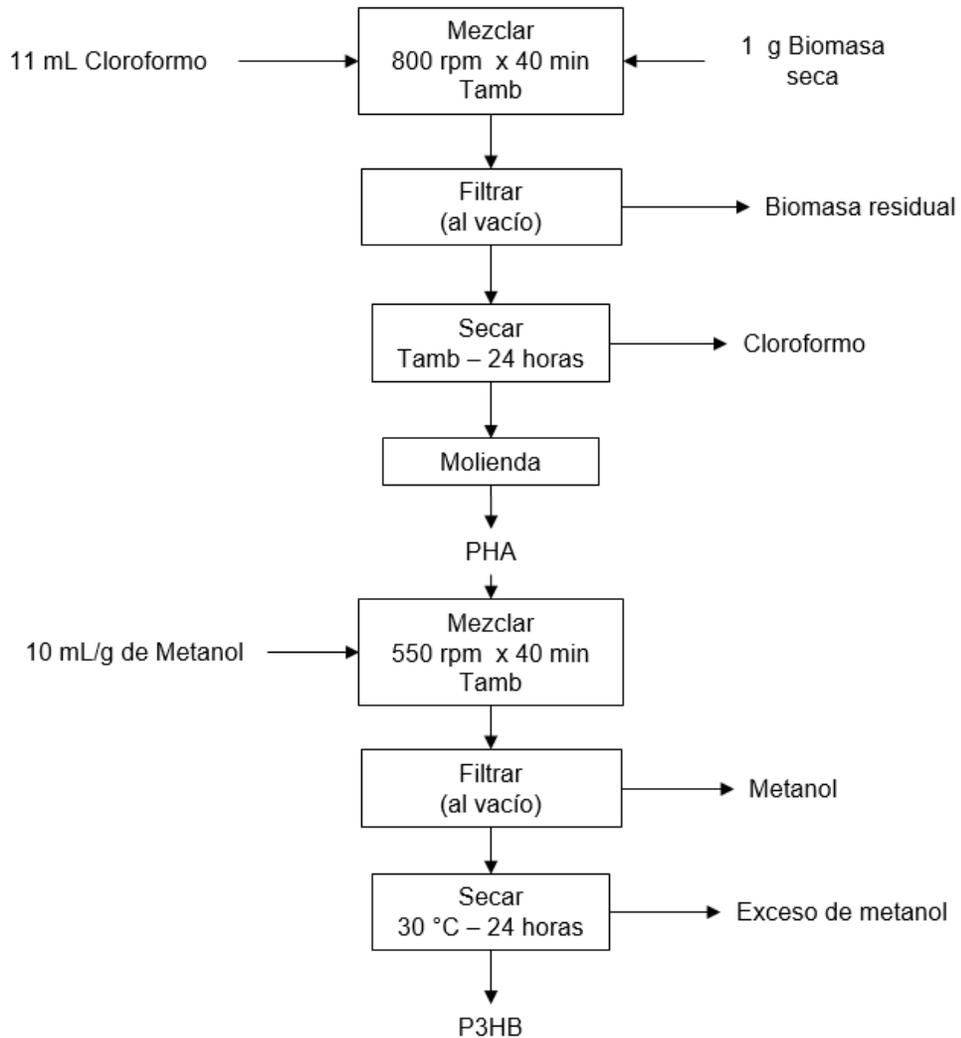
Figura 6. Método para la obtención de biomasa seca con y sin SDS.



2.4.2 Recuperación de P3HB con cloroformo – metanol. Para obtener el P3HB se emplea la biomasa seca, previamente almacenada, se mezcla en un matraz de 1000 mL bajo agitación magnética con cloroformo en una relación de 11 mL/g a temperatura ambiente, (800 rpm - 40 min). Luego se filtra al vacío empleando una bomba y papel filtro de celulosa (0,22 micras), para separar los residuos de biomasa con la solución polimérica. La solución polimérica se vierte en cajas Petri de vidrio y se deja secar en una campana de extracción por 24 horas a temperatura ambiente.

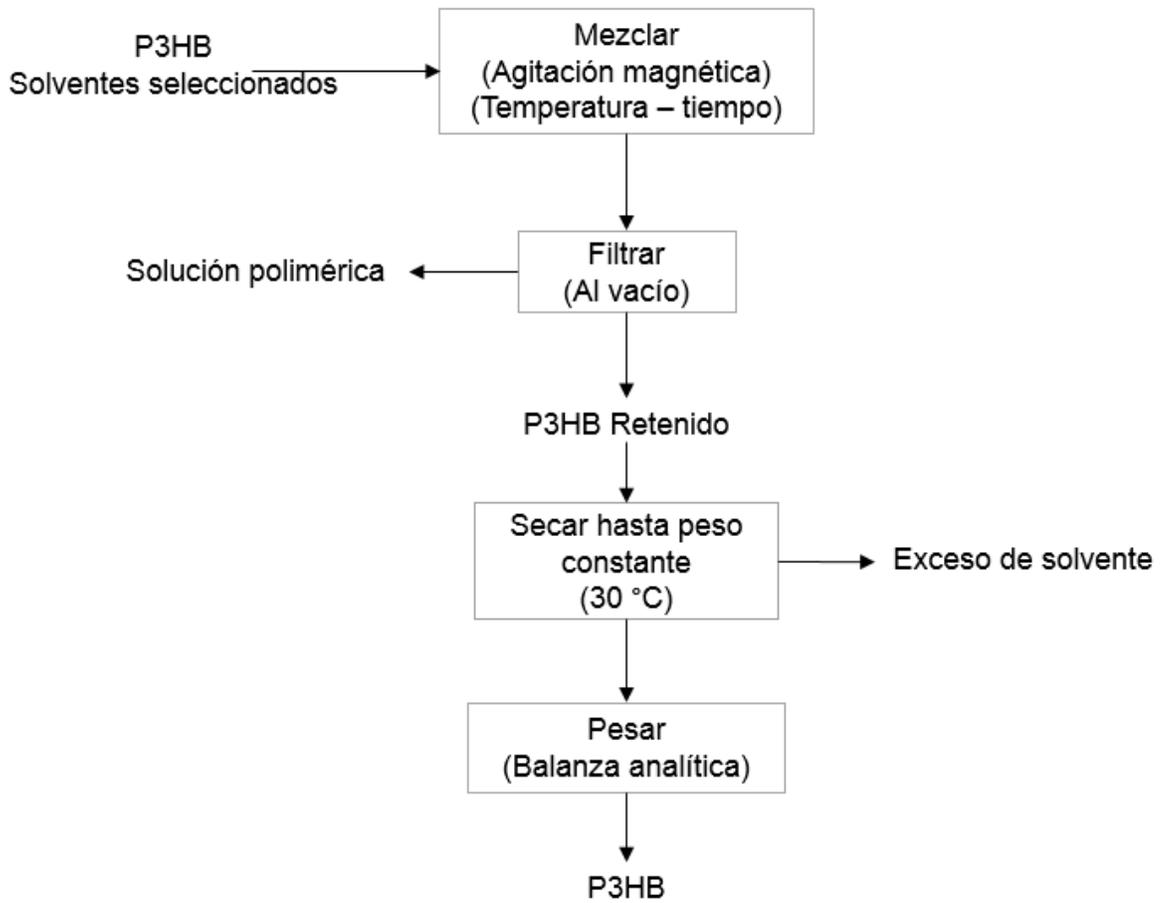
Las películas de PHA pasan por un molino hasta un tamaño de (3 – 1) mm, luego realizar un lavado con metanol para eliminar los residuos grasos producto de la fermentación, se mezcla el polímero con metanol en una proporción de 10mL/g a temperatura ambiente, (550 rpm – 40 min). Se filtra al vacío y se deja secar por 24 horas a 30 °C. Como se observa en la figura 7.

Figura 7. Método de recuperación de P3HB con cloroformo – metanol.



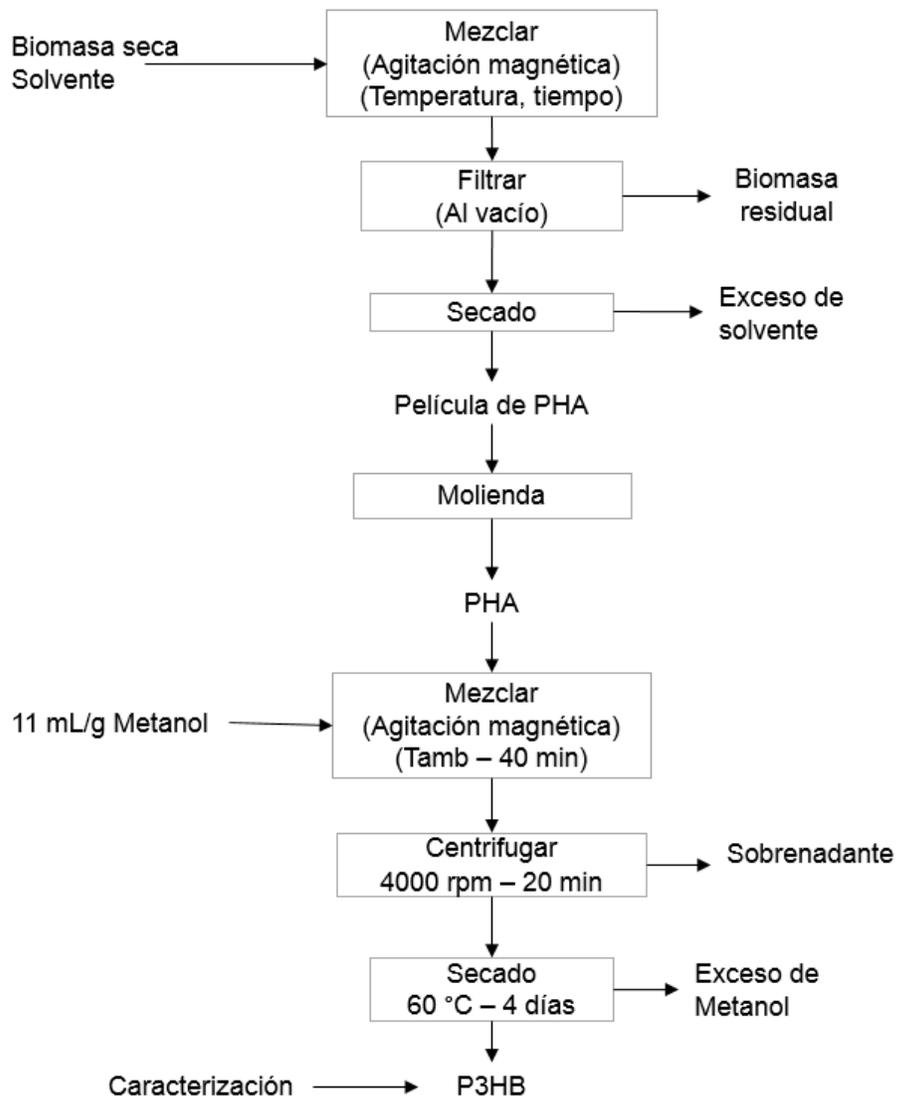
2.4.3 Determinación de la solubilidad del P3HB. Para determinar la solubilidad del biopolímero, se mezcla P3HB obtenido con cloroformo – metanol y los solventes seleccionados en viales de vidrio de 30 mL, variando las condiciones de temperatura, tiempo, concentración y tipo de solvente. Luego la solución polimérica se filtra al vacío mediante una bomba y papel filtro de celulosa (0,22 micras), separando la solución polimérica y el PHA retenido. El biopolímero se seca hasta que se evapore el solvente totalmente y se pesa en una balanza analítica hasta obtener un peso constante del P3HB, que posteriormente se desecha. Como se observa en la figura 8.

Figura 8. Método para determinar la solubilidad del P3HB con diferentes solventes orgánicos.



2.4.4 Método de obtención P3HB con solventes. Para realizar la obtención y purificación del P3HB recuperado con el solvente alternativo, se mezcla la biomasa seca con los solventes seleccionados, las condiciones se determinan con los resultados obtenidos en el método para determinar la solubilidad del P3HB, luego se filtra al vacío, empleando un papel filtro de celulosa, donde se separa la biomasa residual con la mezcla polimérica, la cual se seca en cajas de Petri de vidrio para eliminar el exceso de solvente, las películas pasan por un molino y se realiza el lavado con metanol, el PHA se mezcla con metanol a una proporción de 11 mL por cada gramo de PHA, se centrifuga a 4000 rpm por 20 minutos, para precipitar el polímero y se seca a 60 °C, hasta que obtienen peso constante y se halla eliminado el exceso de metanol. Como se observa en la figura 9.

Figura 9. Método de obtención de P3HB con solventes.



2.4.5 Caracterización de P3HB. Con el fin de conocer las características fisicoquímicas del P3HB obtenido con el solvente alternativo propuesto, se procede a evaluar ciertas características:

2.4.5.1 Porcentaje de recuperación. Para calcular el porcentaje de recuperación del P3HB, se evalúa el rendimiento en %m/m y se emplea la relación entre la cantidad de P3HB (g) después de la recuperación dividido por la cantidad total de biomasa (g) multiplicando por 100. El peso se determina empleando una balanza analítica y los datos se reportan mediante la ecuación 13.

Ecuación 13. Porcentaje de recuperación

$$\text{Porcentaje de recuperacion} = \frac{\text{masa de P3HB recuperado}}{\text{masa de biomasa seca}} \times 100$$

2.4.5.2 Peso molecular viscosimétrico (M_v). Para calcular el peso molecular del P3HB se emplea una técnica que depende de la viscosidad de las moléculas en solución, donde se utiliza la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada, que relaciona la viscosidad intrínseca $[\eta]$ con el peso molecular viscosimétrico (M_v). La técnica descrita en Akita et al, realiza una evaluación del biopolímero P3HB a 30 °C en cloroformo para determinar las constantes K y α , por lo tanto, se determina que K y α son $1,19 \times 10^{-4}$ (g/mL) y 0,78 respectivamente⁸⁵, como se observa en la ecuación 14. Las constantes de Mark-Houwink-Sakurada se emplea para determinar el peso molecular viscosimétrico del P3HB recuperado con diferentes solventes.

Ecuación 14. Ecuación de Mark-Houwink-Sakurada para el P3HB

$$[\eta] = 1,19 \times 10^{-4} M_v^{0,78}$$

Donde:

$[\eta]$: viscosidad intrínseca del P3HB en el disolvente

M_v: peso molecular

➤ **Determinación de la viscosidad intrínseca $[\eta]$.** Para determinar la viscosidad intrínseca de manera experimental, se realiza el método empleado por (Akita et al, 1976), en el cual se emplea cloroformo, el compartimiento ha sido estudiado ampliamente. Para el desarrollo, se utiliza un viscosímetro de Ubbelohde, en un baño de agua a 22 ± 1 °C, controlando la temperatura con un termómetro. Se realiza diferentes disoluciones poliméricas de P3HB en cloroformo, en un rango de (0,025-0,075) g/mL, para calcular el tiempo de flujo (t) requerido para que un

⁸⁵ AKITA, S, et al. Solution Properties of Poly(D- β -Hydroxybutyrate). Biosynthesis and Characterization. En: Macromoleculas. February, 1976, no. 9, vol. 5. 774 p

volumen de disolución polimérica y el disolvente puro (t_0)⁸⁶. Los datos se reportan por medio de la ecuación 2 y 3.

2.4.5.3 Calorimetría diferencia de barrido (DSC). Calorímetro diferencial de barrido (Mettler Toledo). Dentro de un rango de temperatura de (-40 a 200) °C una velocidad de calentamiento de (20 – 10) °C/min. Atmosfera inerte, bajo un flujo de N₂ a 35 mL/min. Se emplea para determinar el punto de fusión (T_m), grado de cristalinidad (X_c) y la entalpía de fusión (H_f) de las muestras.

2.4.5.4 Análisis termogravimétrico (TGA). Analizador termogravimétrico (Mettler Toledo) con crisol de cerámica. Bajo un rango de temperatura de (30 - 500) °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Atmosfera inerte, bajo un flujo de N₂ a 35 mL/min. Se emplea para analizar estabilidad térmica y pureza del material.

2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

La solubilidad de los solventes depende de la presión, temperatura, viscosidad, concentración, tipo de solvente, tamaño de la muestra, lote y método de obtención. Sin embargo, algunos factores se pueden dejar fijos a lo largo del proceso y otros se varían para conocer el efecto en la variable respuesta (solubilidad); por este motivo se determinan como factores fijos: presión, viscosidad, tamaño de la muestras, lote y método de obtención, por otro lado, los factores variables son: concentración, temperatura, tiempo de agitación y tipo de solvente.

- **Objetivo de experimentación.** Determinar las condiciones que aumentan la solubilidad del P3HB, en los solventes orgánicos seleccionados, según el parámetro de solubilidad y el concepto de química “verde”.
- **Variable respuesta.** Porcentaje de solubilidad del P3HB tratado con cloroformo-metanol
- **Variables y niveles de influencia.** Se tienen cuatro variables para determinar los factores que afectan la solubilidad del P3HB obtenido de la cepa B. cepacia B27, como se observa en el cuadro 4. En el desarrollo experimental se realiza la explicación con detalle, de los niveles determinados.

⁸⁶ Armelin, Elaine. (2002). 38p

Cuadro 4. Factores y niveles empleados en el desarrollo experimental para determinar la solubilidad del P3HB.

No.	Factores a 2 niveles	Factores a 4 niveles		
	Tiempo de agitación	Concentración	Temperatura	Solvente
	B	A	C	D
1	b ₁	a ₁	c ₁	d ₁
2	b ₂	a ₂	c ₂	d ₂
3		a ₃	c ₃	d ₃
4		a ₄	c ₄	d ₄

Fuente: elaboración propia

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 DETERMINACIÓN DE LOS SOLVENTES EMPLEANDO EL PARÁMETRO DE SOLUBILIDAD Y EL CONCEPTO DE QUÍMICA “VERDE”

Para determinar el solvente alternativo para la extracción de P3HB, se realizó un método de selección, por lo tanto, se consideran los factores: interacciones intermolecular o parámetro de solubilidad (δ), características fisicoquímicas, toxicidad, impacto ambiental y costos accesibles, empleando el concepto de química “verde”⁸⁷.

3.1.1 Parámetro de solubilidad (δ). Para determinar el parámetro de solubilidad de los solventes (acetato de etilo, acetato de butilo, ácido acético y MEK, se emplea el método de Hansen, donde emplea la contribución de los enlaces intermoleculares que componen la molécula. Hansen define el parámetro de solubilidad en tres interacciones (δ_d ; δ_p ; δ_h) fuerza de dispersión, interacciones polares e interacciones moleculares por puentes de hidrogeno respectivamente, como se observa en la ecuación 7. Este es un modelo tridimensional que permite observar cuales son los solventes que tendrán mayor asociación con el biopolímero. Para este trabajo se empleó un modelo bidimensional de Bagley, el cual introduce un nuevo parámetro (δ_v) combinando los términos (δ_d y δ_p) los cuales presenta una similitud termodinámica entre ellos (ecuación 8)⁸⁸. En la tabla 7 se observan los parámetros de solubilidad de Hansen y el parámetro de Bagley para los 14 solventes orgánicos seleccionados y para el cloroformo como patrón comparativo.

Tabla 7. Interacciones del parámetro de solubilidad de Hansen y Beagle para diferentes solventes

No	Solventes	Hansen			Bagley
		$\delta_D (MP)^{1/2}$	$\delta_P (MP)^{1/2}$	$\delta_H (MP)^{1/2}$	$\delta_V (MP)^{1/2}$
1	Acetona	15,5	18,7	7,0	18,7
2	Ácido acético	14,5	16,6	13,5	16,6
3	Anisol	17,8	18,3	6,7	18,3
4	Acetato de Butilo	15,8	16,2	6,3	16,2
5	Ciclohexanona	17,8	18,9	5,1	18,9
6	Dimetil Sulfóxido	18,4	24,6	10,2	24,6

⁸⁷ Morales, Xóchitl. (2013). 20p

⁸⁸ Kitak, Teja *et al.* (2015). 21549-21568p

Tabla 7. (Continuación)

7	Etanol	15,8	18,1	19,4	18,1
8	Acetato de Etilo	15,8	16,7	7,2	16,7
9	Carbonato de Etileno	19,4	33,8	5,1	33,8
10	Heptano	15,3	15,3	0,0	15,3
11	Metanol	15,1	19,4	22,3	19,4
12	Metiletil Cetona	16,0	18,4	5,1	18,4
13	Carbonato de Propileno	20,0	26,9	4,1	26,9
14	Metilisobutil Cetona	15,3	16,5	4,1	16,5
15	Cloroformo	17,8	18,1	5,7	18,1

Fuente: recopilado de (HANSEN, Charles. Hansen solubility parameters. 2007. 347 – 483 p)

3.1.1.1 Método de 2D para calcular la relación del parámetro de solubilidad. El modelo bidimensional de Bagley se realiza empleando la ecuación 8, donde relaciona los términos δ_d y δ_p , con el término δ_v , debido a la similitud termodinámica de las interacciones polares y fuerzas de dispersión. Para calcular los parámetros de interacción de δ_v y δ_h para los 15 solventes, se emplea los datos obtenidos en la bibliografía δ_h , δ_d y δ_p , debido a que estos parámetros se han determinado experimentalmente⁸⁹. Por otro lado, para determinar los parámetros δ_d , δ_p y δ_h para el biopolímero P3HB, se emplea el modelo matemático de contribución de grupos de Hoftzyer y Van Krevelen⁹⁰ y contribución de grupos de Fedors⁹¹. En la tabla 8, se observan los grupos funcionales del biopolímero P3HB (-CH₃, >CH-, -CH₂-, -COO-), los valores de F_d, F_p y U_h (constantes de Hoftzyer y Van Krevelen, para cada grupo funcional) y el volumen molar (V_m) (constantes de Fedors para cada grupo funcional), por lo tanto, se realiza una sumatorio de los términos y en la tabla 8 se observan el parámetro de solubilidad calculado de Hansen, Bagley y Hildebrand para el P3HB, empleando las ecuaciones del 9 a 11.

⁸⁹ HANSEN, Charles. Hansen solubility parameters. 2 ed. Estados Unidos: CRC press. 2007. 26 – 69p.

⁹⁰ BARTON, Allan. Handbook of Solubility Parameters and Other Cohesion Parameters, 2 ed. Estado Unidos: CRC press, 1991. 154-170 p.

⁹¹ AHUMADA, Edgar et al. Estimación de la solubilidad del acetaminofeno en mezclas polietilenglicol 400 + agua según el método extendido de Hildebrand. En: Revista Colombiana de Química. Noviembre, 2012, no. 3, vol. 41. 433-448 p..

Tabla 8. Modelo matemático de contribución de grupos de Hoftzyer y Van Krevelen y Fedors para el P3HB.

Grupo	Cantidad	Método Hoftzyer y Van Krevelen			Método Fedors
		Fd (J ^{1/2} cm ^{3/2} mol ⁻¹)	Fp ² (J ^{1/2} cm ^{3/2} mol ⁻¹)	Uh (J mol ⁻¹)	Vm (cm ³ mol ⁻¹)
-CH ₃	1	420	0	0	33,5
>CH-	1	80	0	0	-1
-CH ₂ -	1	270	0	0	16,1
-COO-	1	390	240100	7000	18
Total	-	1160	240100	7000	66,6

Fuente: elaboración propia, recopilado de: HANSEN, Charles. Hansen solubility parameters. 2007. 64-120 p y AHUMADA, Edgar *et al.* Estimación de la solubilidad del acetaminofeno en mezclas polietilenglicol 400 + agua según el método extendido de Hildebrand. (2012). 439 p.

Tabla 9. Parámetro de solubilidad de Hansen, Bagley y Hildebrand para el P3HB

Polímero	Hansen			Bagley (δ_v) MP ^{1/2}	Hildebrand (δ) MP ^{1/2}
	δ_D MP ^{1/2}	δ_P MP ^{1/2}	δ_H MP ^{1/2}		
P3HB	17,4174	7,3573	10,2521	18,9076	21,5082

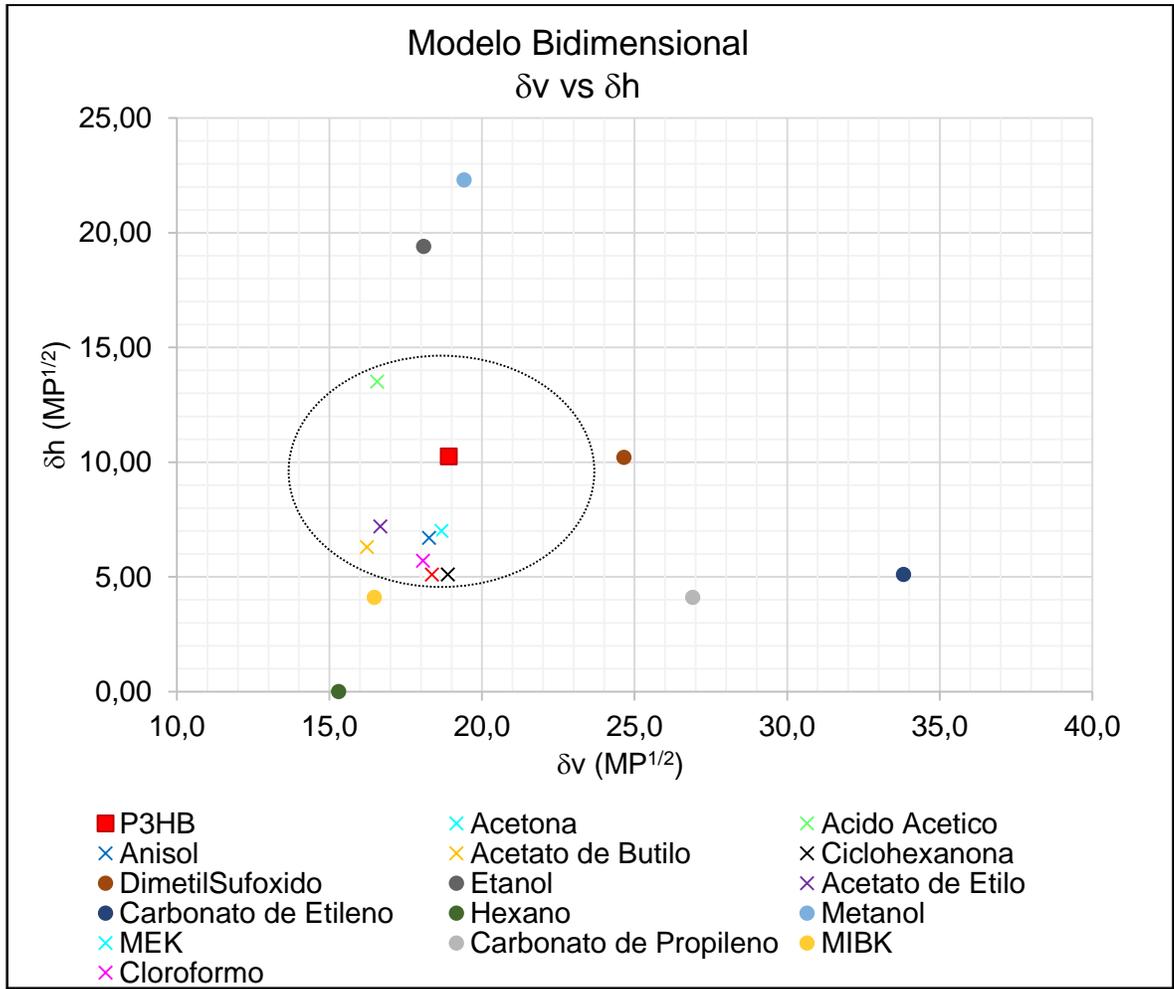
Fuente: elaboración propia.

Con los datos obtenidos en la tabla 9 (δ_v y δ_h), se realiza la gráfica 1, donde se observa la interacción entre los 15 solventes (tabla 7) y el P3HB. Para realizar la selección de los solventes, se emplea un radio de interacción (R_{ij}) que permita establecer los solventes con mayor similitud intermolecular frente al P3HB. El R_{ij} es un valor subjetivo, el cual se determina según las necesidades del investigador⁹², por ello, se incluyen los datos de (δ_v y δ_h) para el cloroformo, estableciendo que el R_{ij} incluya a este solvente.

Por lo tanto, para este trabajo se emplea un R_{ij} de 5 unidades, como lo sugiere (Van Krevelen, D. 2009), para una selección adecuada de solventes.

⁹² HANSEN, Charles. (2007). 115-117 p.

Grafica 1. Modelo bidimensional de Bagley δv vs δh , para la caracterización de disolventes.



Fuente: elaboración propia.

En la gráfica 1, se observan los solventes (anisol, MEK, acetona, acetato de butilo, ácido acético, ciclohexanona, acetato de etilo y cloroformo) que están dentro del Rij con una equis (x), estos solventes alcanzan una mayor miscibilidad con el P3HB, debido que los enlaces intramoleculares (fuerza de dispersión, interacciones no polares, interacciones por los puentes de hidrogeno), son similares. Con el método bidimensional de Bagley, se determinan los solventes potenciales que solubilizan al biopolímero.

3.1.2 Guía sustentable de solventes. Para seleccionar cuales son los solventes que se van a emplear se considera el concepto de solventes “verdes” o “química verde” el cual se rige por buscar productos o procedimientos que permitan reducir o eliminar la utilización de sustancias peligrosas⁹³. Este concepto se emplea con un criterio objetivo, flexible entre los diferentes solventes industriales.

Existen diferentes guías para la selección adecuada de solventes, las cuales realizan un análisis entre las propiedades fisicoquímicas, toxicidad, manejo de residuos, impacto ambiental, entre otras, que ofrecen una herramienta para la elección de solventes. La guía de selección de solventes GlaxoSmithKline (GSK)⁹⁴ realiza una evaluación a más de 150 solventes, la cual permite elegir de acuerdo con sus categorías: manejo de residuos, impacto ambiental, riesgo a la salud humana y seguridad, asignando valores del 1 al 10, donde 1 se considera “muy malo” y 10 “muy bueno”⁹⁵.

Para elegir los cuatro solventes a emplear, se realiza un cuadro comparativo entre las propiedades fisicoquímicas, costos, accesibilidad y criterios empleados en la guía de selección de solventes GSK, de los solventes que se determinaron de la figura 10. Se realiza una relación entre el punto de ebullición contra los problemas conocidos por los diferentes solventes. En la figura 10 se observa los solventes acetato de butilo, acetato de etilo, Metiletil cetona y ácido acético, que cumplen con los requerimientos establecidos. Posteriormente en el capítulo 4, se explicará con detalle, porque se determinaron estos solventes.

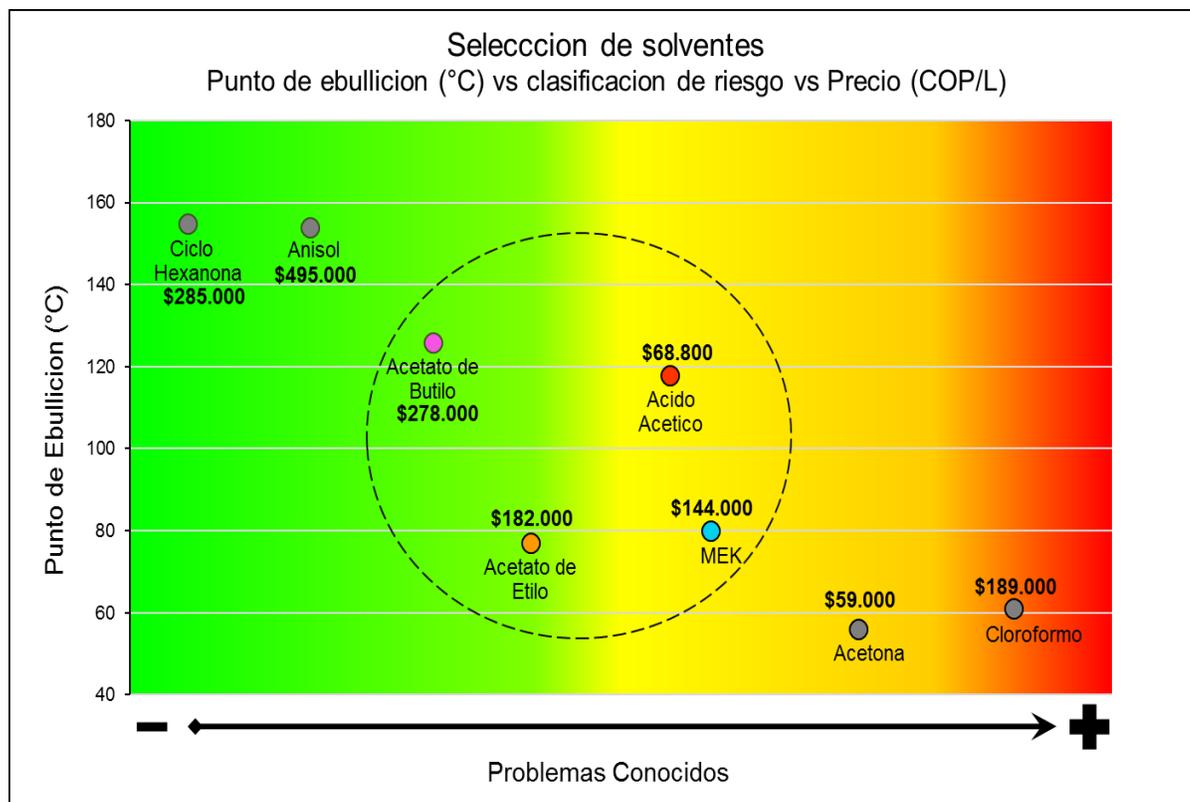
En el anexo A, se observa las propiedades fisicoquímicas de los solventes acetona, ácido acético, anisol, acetato de etilo, acetato de butilo, ciclohexanona, metiletil cetona y cloroformo, en las cuales se puede evidenciar peso molecular, densidad, clasificación, presión de vapor, punto de ebullición, punto de fusión, entre otras.

⁹³UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO. Disolventes verdes, química “verde”. Pág 67-72. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <http://www.dcne.ugto.mx/Contenido/MaterialDidactico/amezquita/Analitica3/Disolventes%20verdes.pdf>

⁹⁴ ALDER, Catherine, et al. Updating and further expanding GSK’s solvent sustainability guide. En: Royal society of chemistry. Abril, 2016, no. 18. 3879p

⁹⁵ Rosengart, A. *et al.* (2015). Pág 39-46

Figura 10. Selección de los solventes orgánicos empleando, la clasificación de los solventes, costos y punto de ebullición (°C).



Fuente: Adaptado de ALDER, Catherine. *et al.* Updating and further expanding GSK's solvent sustainability guide. 2016. 3883-3888 p.

3.2 DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD PARA EL POLIHIDROXIBUTIRATO EN LOS SOLVENTES ORGÁNICOS EMPLEADOS

La solubilidad de una sustancia depende del grado de agitación, temperatura, presión, naturaleza del soluto y solvente⁹⁶. Para determinar las condiciones que se emplearan para el proceso de obtención de PHA con un solvente alternativo, es necesario conocer la relación masa de polímero por volumen de solvente. Por lo cual, se determinan cuatro factores que afectaran la solubilidad del P3HB: concentración, temperatura, tiempo de agitación y tipo de solvente. El comportamiento de la concentración varia para cada solvente, debido que algunos solventes son más viscosos o polares, el fenómeno en el proceso de disolución varia en función de las fuerzas de atracción y repulsión⁹⁷. La solubilidad de los

⁹⁶ BURNS, Ralph. Fundamentos de química. 5 ed. México: Pearson Educación. 2011. 250p.

⁹⁷ BURNS, Ralph. Fundamentos de química. 5 ed. México: Pearson Educación. 2011. 255p.

polímeros termoplásticos es proporcional temperatura, cuando aumenta la temperatura la solubilidad aumenta⁹⁸ y la agitación se realiza para que se diluya en polímero en el solvente.

Para la ejecución se emplearon los solventes orgánicos acetato de butilo, acetato de etilo, ácido acético y metiletil cetona, seleccionado en la gráfica 1, adicional se realizó la evaluación con cloroformo, para comparar los datos obtenidos entre los posibles solventes alternativos y el solvente convencional empleado. Donde se tuvieron en cuenta las siguientes especificaciones:

- Cuatro diferentes concentraciones (0,025, 0,050, 0,100 y 0,200) g/mL respectivamente. Estos niveles se determinan apoyados en la bibliografía para la obtención de PHA⁹⁹¹⁰⁰ y determinar qué relación se ajuste a las necesidades de cada solvente.
- Dos rangos de tiempo de agitación (1 y 3) horas, puesto que se desean conocer, las condiciones de tiempo que se van a replicar posteriormente en la obtención.
- Cuatro rangos de temperatura. (1,2,3 y 4) Teniendo en cuenta los diferentes puntos de ebullición (T_b) para cada solvente cloroformo, metiletil cetona, acetato de etilo, acetato de butilo y ácido acético a una presión atmosférica de 760 mmHg (61, 80, 77, 126 y 118) °C respectivamente. Se determinan cuatros niveles, pero con temperaturas diferentes, teniendo en cuenta la similitud entre los puntos de ebullición, se agrupa de la siguiente manera:
 - ❖ **Grupo 1.** Metiletil cetona y acetato de etilo, con rango de temperatura de (25, 40, 55, 70) °C.
 - ❖ **Grupo 2.** Acetato de butilo y ácido acético con rango de temperatura de (25, 60, 90, 110) °C.
 - ❖ **Grupo 3.** Cloroformo con rango de temperatura de (20, 30, 40, 50) °C

Para realizar todos los ensayos se emplea 180 g de P3HB_(T) tratado con cloroformo-metanol y 2700 mL de solvente (acetato de butilo, acetato de etilo, ácido acético glacial y metiletil cetona). El proceso se realiza depositando la

⁹⁸ SINDHU, R., AMMU, B., BINOD, P., DEEPHI, S., RAMACHANDRAN, K., SOCCOL, C. Y PANDEY, P. (2011). Production and Characterization of Poly-3-hydroxybutyrate from Crude Glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and Improving Its Thermal Properties by Blending with Other Polymers. *Brazilian archives of biology and Technology* 54 (4). Pag 783 – 794.

⁹⁹ MANTELATTO, Paulo. Desenvolvimento de tecnologia para extração e recuperação de polihidroxialcanoatos obtidos a partir da sacarose de cana-de-açúcar. Tesis doctoral. Brasil: Universidade Federal De São Carlos, 2011. 55 p.

¹⁰⁰ ANBUKARASU, Preetam, et al. Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. En: *Scientific Reports*. December, 2015, no. 5. 1-14 p

concentración

(polímero/solvente) determinada en viales de vidrio de 30 mL que fueron sellados con tapón de caucho y agrafes de aluminio, para evitar que el solvente se evaporara. Para mantener la temperatura determinada de los ensayos se realizan en baño de aceite, controlando la temperatura cada 10 minutos con un termómetro. Todo el proceso se realiza con agitación magnética en el tiempo determinado.

Posteriormente, la solución (polímero/solvente), se filtra al vacío, empleando filtros de celulosa previamente pesados. Donde el P3HB que no se solubiliza queda retenido en el filtro, después se deja secar en cajas petri de vidrio a temperatura ambiente por (24 - 72) horas, las muestras se pesan hasta obtener un peso constante y confirmar que el solvente se ha evaporado completamente. Cada ensayo se realizó por triplicado.

En las tablas 10, 11 y 12 se observan los resultados de la experimentación promedio del porcentaje de solubilidad para el metiletil cetona, acetato de etilo, acetato de butilo, ácido acético y cloroformo, para los diferentes parámetros considerados. Los valores registrados son el promedio de las muestras realizadas por triplicado.

En el anexo B, se observan todos los resultados obtenidos en el desarrollo experimental para determinar el porcentaje de solubilidad del P3HB, en las cuales se puede evidenciar la variación del tiempo, temperatura, tipo de solvente y concentración y la reproducibilidad de estos, comprobando que el método empleado es reproducible.

Tabla 10. Resultados experimentales promedio de la solubilidad porcentual del P3HB para el metiletil cetona y acetato de etilo a diferentes tiempos de agitación, temperatura y concentración.

Temperatura (°C)	Tiempo de agitación (h)	Concentración (g/mL)	Solubilidad (%)	
			Metiletil cetona	Acetato de etilo
25	1	0,025	9,34	4,59
25	1	0,050	9,19	5,10
25	1	0,100	6,88	5,54
25	1	0,200	4,49	3,98
25	3	0,025	5,38	3,28
25	3	0,050	6,32	2,81
25	3	0,100	6,22	5,60
25	3	0,200	3,46	3,76
40	1	0,025	6,54	3,40
40	1	0,050	6,41	5,10
40	1	0,100	6,29	4,61
40	1	0,200	4,11	3,28
40	3	0,025	7,91	4,39
40	3	0,050	9,39	3,76
40	3	0,100	9,81	4,27
40	3	0,200	4,16	3,98
55	1	0,025	9,69	5,90
55	1	0,050	13,24	5,72
55	1	0,100	8,52	2,99
55	1	0,200	7,14	4,86
55	3	0,025	10,09	5,49
55	3	0,050	9,19	6,09
55	3	0,100	7,91	4,05
55	3	0,200	5,77	3,21
70	1	0,025	2,09	9,06
70	1	0,050	3,82	6,34
70	1	0,100	4,92	5,14
70	1	0,200	2,74	3,76
70	3	0,025	4,78	8,09
70	3	0,050	3,60	5,95
70	3	0,100	2,14	5,12
70	3	0,200	3,19	3,39

Fuente: elaboración propia

Tabla 11. Resultados experimentales promedio de la solubilidad porcentual del P3HB para el acetato de butilo y ácido acético a diferentes tiempos de agitación, temperatura y concentración.

Temperatura (°C)	Tiempo de agitación (h)	Concentración (g/mL)	Solubilidad (%)	
			Acetato de butilo	Ácido acético
25	1	0,025	4,60	7,64
25	1	0,050	6,54	8,85
25	1	0,100	4,42	4,65
25	1	0,200	4,26	4,98
25	3	0,025	3,97	9,25
25	3	0,050	4,87	9,35
25	3	0,100	4,84	4,38
25	3	0,200	3,46	5,85
60	1	0,025	7,61	10,21
60	1	0,050	6,49	10,53
60	1	0,100	8,73	6,37
60	1	0,200	7,73	5,23
60	3	0,025	9,73	25,83
60	3	0,050	11,33	11,41
60	3	0,100	8,64	9,75
60	3	0,200	10,68	6,56
90	1	0,025	7,40	87,76
90	1	0,050	7,29	84,63
90	1	0,100	6,62	85,65
90	1	0,200	5,03	71,65
90	3	0,025	7,38	88,33
90	3	0,050	8,51	74,61
90	3	0,100	5,36	73,94
90	3	0,200	5,90	68,11
110	1	0,025	34,41	86,93
110	1	0,050	45,44	85,99
110	1	0,100	31,15	85,20
110	1	0,200	11,17	73,66
110	3	0,025	29,34	87,63
110	3	0,050	32,90	80,48
110	3	0,100	23,09	79,88
110	3	0,200	9,51	71,43%

Fuente: elaboración propia

Tabla 12. Resultados experimentales promedio de la solubilidad porcentual del P3HB para el cloroformo a diferentes tiempos de agitación, temperatura y concentración.

Temperatura (°C)	Tiempo de agitación (h)	Tiempo de agitación (h)	Solubilidad (%)
20	1	0,025	94,07
20	1	0,050	93,01
20	1	0,100	83,76
20	1	0,200	65,08
20	3	0,025	87,93
20	3	0,050	84,97
20	3	0,100	63,61
20	3	0,200	92,94
30	1	0,025	94,86
30	1	0,050	89,29
30	1	0,100	82,44
30	1	0,200	67,86
30	3	0,025	88,16
30	3	0,050	86,32
30	3	0,100	60,42
30	3	0,200	94,76
40	1	0,025	95,38
40	1	0,050	89,75
40	1	0,100	84,98
40	1	0,200	54,89
40	3	0,025	88,25
40	3	0,050	84,71
40	3	0,100	61,71
40	3	0,200	94,09
50	1	0,025	94,31
50	1	0,050	87,42
50	1	0,100	79,62
50	1	0,200	62,16
50	3	0,025	93,79
50	3	0,050	88,88
50	3	0,100	83,99
50	3	0,200	55,01

Fuente: elaboración propia

3.3 RECUPERACIÓN DEL P3HB CON SOLVENTES

Para la recuperación del P3HB se empleó la biomasa seca obtenida de la fermentación tratada en ácido acético y cloroformo. Las muestras se compararon para determinar la diferencia entre el solvente patrón (cloroformo) y el solvente seleccionado (ácido acético glacial). Todas las muestras se realizaron por duplicado

3.3.1 Recuperación del P3HB con cloroformo. Debido que el solvente patrón en el proceso es el cloroformo, se realiza la recuperación del P3HB, se emplearon 4g de biomasa seca y 40 mL de cloroformo (99,8 % pureza), se depositó todo en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. El proceso se realizó a temperatura ambiente por 50 minutos con agitación magnética. La suspensión final de células tratadas, se filtró al vacío para eliminar los restos celulares, utilizando filtros de celulosa previamente pesado. Luego la solución de polímero recuperado se vertió en cajas Petri de vidrio y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas en una campana de extracción, para eliminar el exceso de cloroformo, después las películas se pesaron para calcular la cantidad de P3HB obtenido.

Las películas de P3HB obtenido, se pasa por un molino para reducir el tamaño de partícula y realiza un lavado con metanol (99,99 % pureza) el cual elimina los metabolitos y residuos grasos de la fermentación. Para realizar el lavado se utiliza 11 mL de metanol por cada gramo de P3HB obtenido, se mezcla en un matraz agitación magnética a temperatura ambiente por 40 minutos. La suspensión se centrifuga en tubos cónicos de plástico de 15 mL por 20 minutos a 4000 rpm, se elimina el sobrenadante y se seca en un horno a 60 °C por 96 horas, luego se pesa y almacena. Los datos obtenidos se observan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Resultados experimentales promedio de la cantidad de biomasa empleada y PHA recuperado para el solvente cloroformo.

Solvente	Cloroformo	
	I	II
Replica		
Biomasa seca inicial (g)	4,0060	4,0003
P3HB recuperado (g)	2,4509	2,3347

Fuente: elaboración propia.

3.3.2 Recuperación del P3HB con ácido acético glacial. Para realizar la recuperación del P3HB, Se empleó 4g de biomasa seca tratada y 80 mL de ácido acético glacial (99,7 % pureza), se depositó todo en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. El proceso se realizó a 90 °C por 60 minutos con agitación magnética, para mantener la temperatura se empleó un baño de aceite y se controló la temperatura con un termómetro. La suspensión final de células tratadas se filtró al vacío para eliminar los restos celulares, utilizando filtros de celulosa previamente pesado. La solución de polímero recuperado se vertió en cajas Petri de vidrio y luego se les suministro calor por medio de una plancha de calentamiento a 110°C por 15 minutos, las láminas se secaron por 96 horas en un horno a 60 °C para eliminar los residuos de disolvente, luego las películas se pesaron hasta obtener un peso constante y calcular la cantidad de P3HB obtenido.

Las películas de P3HB obtenido, se pasa por un molino para reducir el tamaño de partícula y realiza un lavado con metanol (99,95 % pureza) el cual elimina los metabolitos y residuos grasos de la fermentación. Para realizar el lavado se utiliza 11 mL de metanol por cada gramo de P3HB obtenido, se mezcla en un matraz agitación magnética a temperatura ambiente por 40 minutos. La suspensión se centrifuga en tubos cónicos de plástico de 15 mL por 20 minutos a 4000 rpm, se elimina el sobrenadante y se seca en un horno a 60 °C por 96 horas, luego se pesa y almacena. Los datos obtenidos se observan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados experimentales promedio de la cantidad de biomasa empleada y PHA recuperado para el solvente ácido acético.

Solvente Replica	Ácido acético	
	I	II
Biomasa seca inicial (g)	4,0080	4,0060
P3HB recuperado (g)	2,1785	2,2131

Fuente: elaboración propia.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 SELECCIÓN DE SOLVENTES

Para la recuperación de PHA se emplea diferentes técnicas de recuperación, el método de selección por solvente es una de las técnicas más estudiadas, porque no afecta el peso molecular del PHA recuperado¹⁰¹. Por este motivo existen diferentes estudios de la recuperación PHA con solventes, los resultados pueden variar dependiendo del tipo de microorganismo, condiciones de fermentación, PHA recuperado entre otros. Se puede observar que el microorganismo más estudiado para la producción de P3HB es la *Ralstonia eutropha*, esto se debe a que el microorganismo puede acumular gran cantidad de PHA llegando a 80 % del peso en seco, también dependiendo de las condiciones de fermentación, fuente de carbono y situación de estrés, puede acumular el copolímero (P3HB-co-3HHx) el cual tiene mejores propiedades mecánicas, comparándolo con el homopolímero P3HB¹⁰².

Existen diferentes solventes empleados para la recuperación de P3HB, uno de los más empleados es el metiletil cetona donde el porcentaje de recuperación es mayor al 90 % para temperaturas inferiores al punto de ebullición a 760 mmHg. También se puede observar que el ácido acético es el solvente que reporta menor porcentaje de recuperación del 36 % a 100 °C, sin embargo, este solvente es económico, no afecta las propiedades térmicas del polímero¹⁰³.

4.1.1 Parámetro de solubilidad. Para que un solvente solubilice un polímero, es necesario que las moléculas del solvente y polímero se separen y se reduzca la energía de cohesión que exista entre estas moléculas, formando nuevas interacciones mixtas entre el solvente-polímero¹⁰⁴. Se emplea el parámetro de solubilidad (δ), para conocer las interacciones moleculares y determinar la miscibilidad entre el polímero-solvente. Cuando el parámetro de solubilidad es similar entre el polímero y solvente, se considera que el solvente solubilice al polímero. Es por esto que se emplea el método de Hansen que relaciona las interacciones moleculares¹⁰⁵.

Se calculan las interacciones entre los enlaces de hidrogeno (δ_h) y se obtiene que para el P3HB es de 10,25 mientras para el metiletil cetona, acetato de etilo, acetato de butilo y ácido acético son de (5,10, 7,20, 6,30 y 13,50) respectivamente, debido

¹⁰¹ González, Yolanda, *et al.* (2012). 78p

¹⁰² González, Yolanda, *et al.* (2012). 80p

¹⁰³ ANBUKARASU, Preetam, *et al.* Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. En: Scientific Reports. December, 2015, no. 5. 1-14 p

¹⁰⁴ HANSEN, Charles. Hansen solubility parameters. 2 ed. Estados Unidos: CRC press. 2007. 115p

¹⁰⁵ MASSCHELEIN, Liliane. Los solventes. Chile: Centro nacional de convenciones nacionales Chile. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: http://www.cncr.cl/611/articles-4953_archivo_01.pdf

que el ácido acético es un solvente protico tiene un grupo dador de protones OH⁻, por este motivo el valor es el más alto comparado con los otros solventes¹⁰⁶. El polímero P3HB tiene mayor similitud para los solventes acetato de etilo y ácido acético, razón por la cual en el desarrollo experimental el comportamiento de la solubilidad en ácido acético fue favorable.

El parámetro de interacción de Bagley (δv), estable una relación entre las interacciones entre moléculas no dipolares y dipolares, para el P3HB es de 18,91 mientras para el metiletil cetona, acetato de etilo, acetato de butilo y ácido acético son de (18,34, 16,67, 16,23 y 16,56) respectivamente. Se puede observar que el solvente que tienen el valor más alto es el metiletil cetona, esto se debe que es una cetona los cuales se consideran disociadores y moléculas polares, en otro caso los esterios como el acetato de etilo y el acetato de butilo tienen una disociación baja y momentos dipolares medianos. El ácido acético tiene un poder ionizante con la capacidad de dar y recibir electrones. El modelo grafico que relaciona δv vs δh , permite obtener una imagen más clara entre la similitud de las interacciones moleculares entre los solventes empleados y el biopolímero. El radio de interacción (R_{ij}) se emplea para tener un área de control, donde se determina cuáles son los solventes que tendrán una mayor miscibilidad con el polímero P3HB.

4.1.2 Solventes sustentables. De las diferentes guías o parámetros para determinar cuáles son los solventes que se acogen a solventes “verdes” se elige *la guía de selección de GSK*, debido a que ofrece una relación entre las múltiples categorías de salud, medio ambiente, seguridad y residuos, para tener una relación compuesta y asignación de color (verde, amarillo y rojo) para los problemas conocidos, los cuales indican que para verde son pocos, amarillo intermedio y rojos muchos, permitiendo una evaluación objetiva de los diferentes disolventes¹⁰⁷. Los solventes seleccionados son el ácido acético, metiletil cetona, acetato de butilo y acetato de etilo por sus puntos de ebullición (bajos o intermedios), costos asequibles y problemas conocidos (pocos o intermedios).

El ácido acético y metiletil cetona son solventes que se encuentra en categoría amarilla, que tienen algunos problemas registrados, para el ácido acético se debe a una puntuación baja de 3 en manejo de residuos por incineración, debido a que es un solvente soluble en agua y tienen mayor miscibilidad comparado con los otros solventes, cuando mayor sea el contenido de agua mayor es la energía requerida para la eliminación y para el metiletil cetona el cual registra una puntuación baja de 3 en manejo de residuos por biotratamiento, porque tiene una presión de vapor alta y necesita condiciones especiales de almacenamiento.

¹⁰⁶ YANG, Chun.; YANIGER, Stuart.; JORDAN, Craig, KLEIN, Daniel y BITTNER, George. Most Plastic Products Release Estrogenic Chemicals: A Potential Health Problem That Can Be Solved. En: Environ Health Perspect. July, 2011, no. 7, vol. 119. 989–996 p.

¹⁰⁷ Alder, Catherine., *et al* (2016). 40-42p

El acetato de butilo y acetato de etilo son solventes que se encuentra en categoría verde, que tienen pocos problemas registrados, para el acetato de butilo el cual cuenta con puntuaciones altas en manejo de residuo, impacto a la salud humana y seguridad pero una puntuación baja de 3 en impacto ambiental del aire, esto se debe a que es un éster, con un olor dulzón penetrante y una presión de vapor de (15), en cambio el acetato de etilo no registra valores bajos (1-3) en ninguna de las categorías.

Realizando una comparación entre el acetato de etilo, acetato de butilo, metiletil cetona y ácido acético con el cloroformo, se observa que estos son más sustentables que el solvente convencional. El cloroformo es un solvente que se encuentra en categoría roja con altos problemas conocidos, es un compuesto halogenado, volátil, tóxico el cual se busca reemplazar.

En el anexo A, se observa las características fisicoquímicas, costos, riesgos a la salud y toxicidad de los solventes acetato de butilo, acetato de etilo, metiletil cetona, ácido acético y cloroformo.

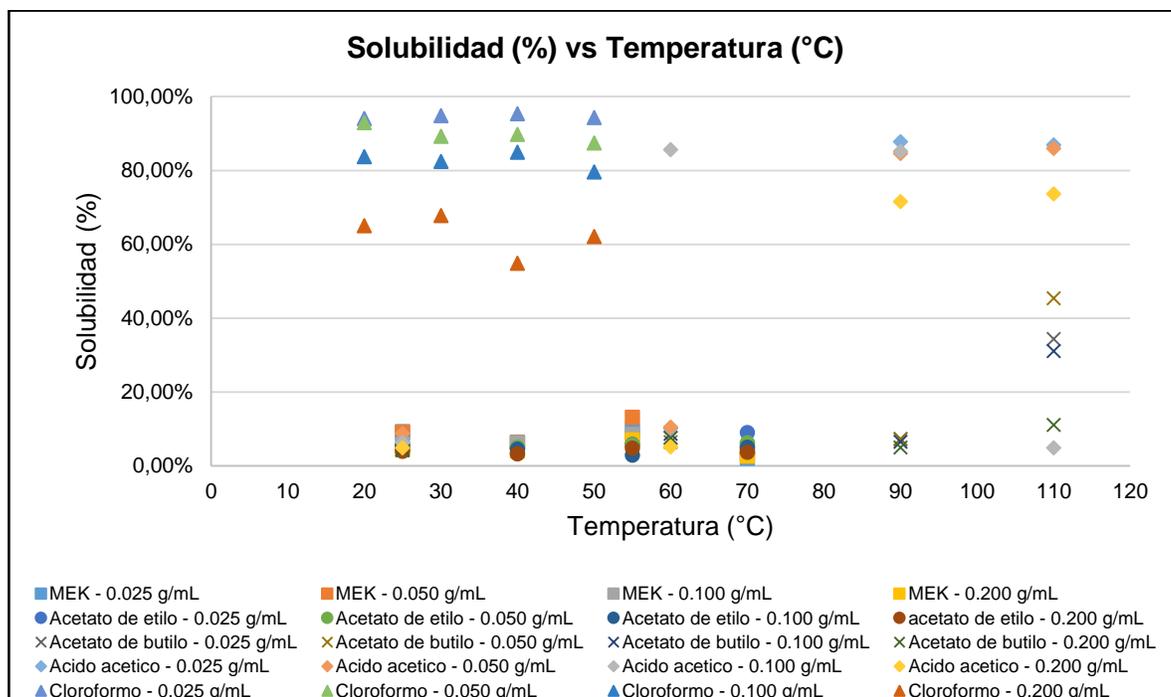
4.2 SOLUBILIDAD EXPERIMENTAL DEL P3HB TRATADO CON CLOROFORMO - METANOL, EN LOS SOLVENTES ACETATO DE BUTILO, ÁCIDO ACÉTICO, ACETATO DE ETILO, METILETIL CETONA Y CLOROFORMO A DIFERENTES TEMPERATURAS

La solubilidad experimental del P3HB previamente recuperado y tratado con cloroformo – metanol, se evalúa para los solventes, acetato de etilo, acetato de butilo, ácido acético, MEK y cloroformo donde se emplean los valores obtenidos con cloroformo como un patrón comparativo, debido que es el solvente que tiene mayor afinidad, solubilidad y se emplea para la recuperación de PHA.

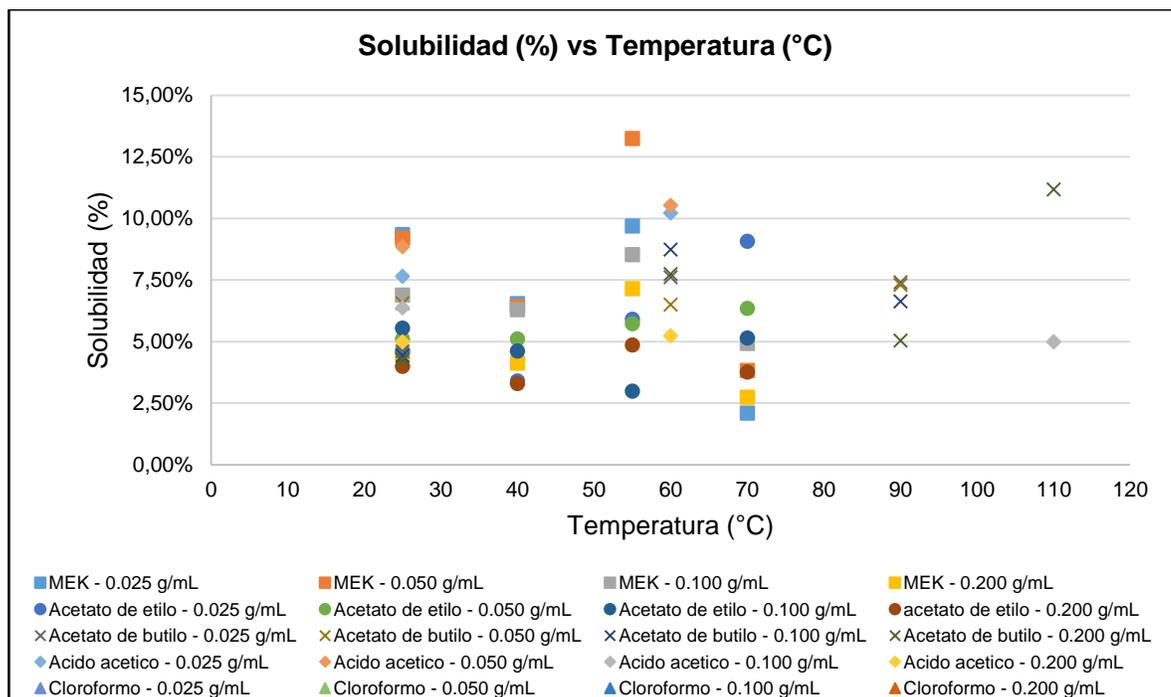
De los resultados obtenidos, se observa que el tiempo de agitación no es un factor que afecte directamente la solubilidad, la concentración genera una variación mínima dependiendo del tipo de solvente y la temperatura es el factor que afecta directamente la solubilidad del P3HB. En las gráficas 2, 3, 4 y 5, se observa como la solubilidad varía en función de la temperatura, para las concentraciones (0,025, 0,050, 0,100 y 0,200) g/mL y los solventes acetato de etilo, acetato de butilo, metiletil cetona, ácido acético y cloroformo, en un tiempo de agitación de 1 y 3 horas respectivamente. Las gráficas 3 y 5, se emplean para observar los datos de solubilidad baja en un rango de (0 – 15%) y evidenciar con mayor detalle los resultados obtenidos. Por otro lado, en las gráficas 6, 7, 8 y 9 se observa como la solubilidad varía en función de la concentración, para las temperaturas (20, 25, 30, 40, 50, 55, 60, 70, 90 y 110) °C y los solventes acetato de etilo, acetato de butilo, metiletil cetona, ácido acético y cloroformo, para un tiempo de agitación de 1 y 3 horas respectivamente. Las gráficas 7 y 9 se emplean para observar los datos de solubilidad alta en un rango de (70 % – 100 %), en los que se observa la similitud

del comportamiento del ácido acético y el cloroformo para las diferentes concentraciones.

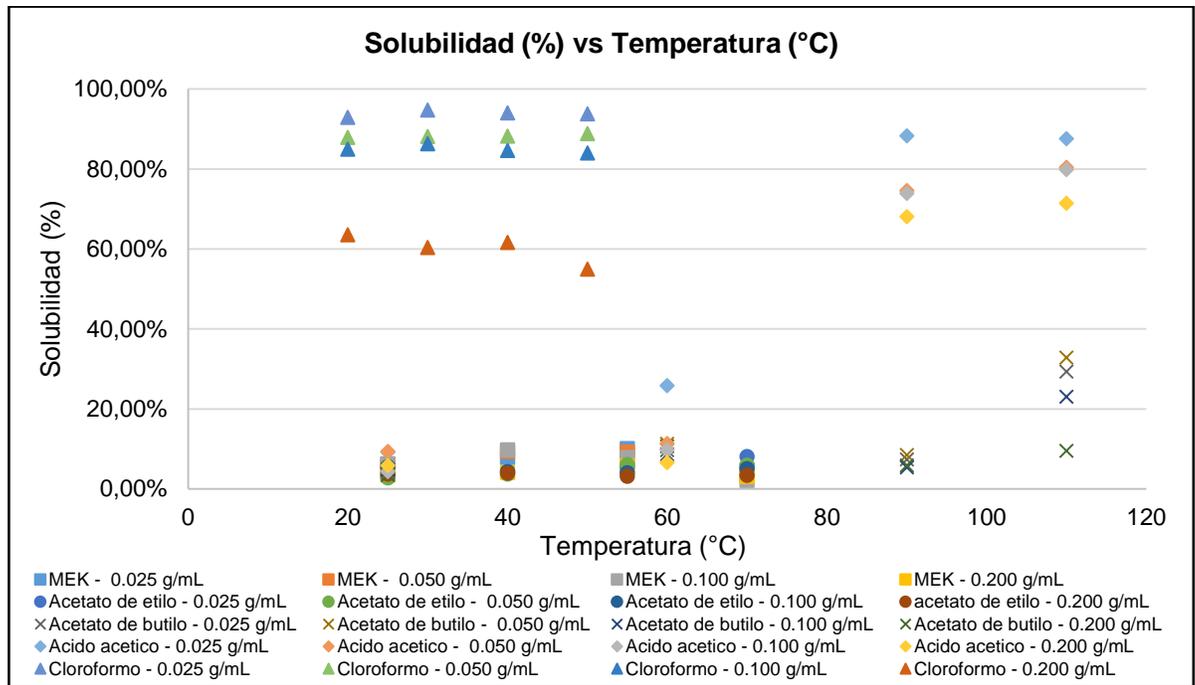
Grafica 2. Puntos de dispersión de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs temperatura (°C) para los diferentes solventes y concentraciones, cuando se emplea un tiempo de agitación de 1 hora.



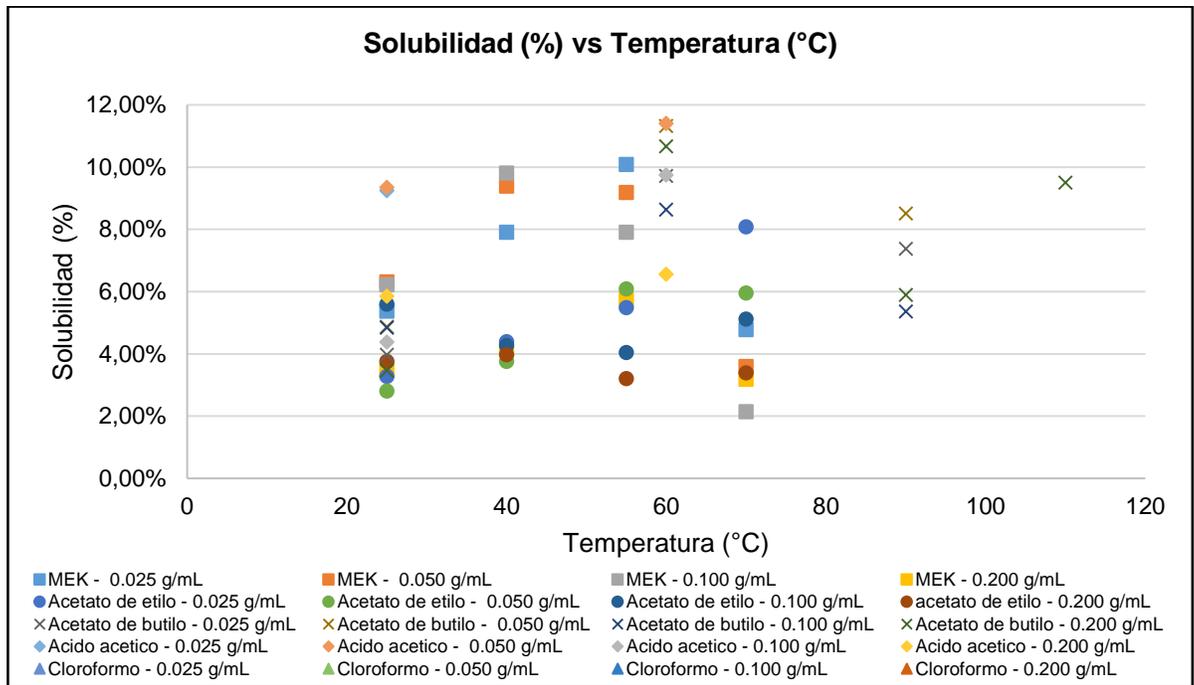
Grafica 3. Puntos de dispersión para la solubilidad baja de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs temperatura (°C) para los diferentes solventes y concentraciones, cuando se emplea un tiempo de agitación de 1 hora.



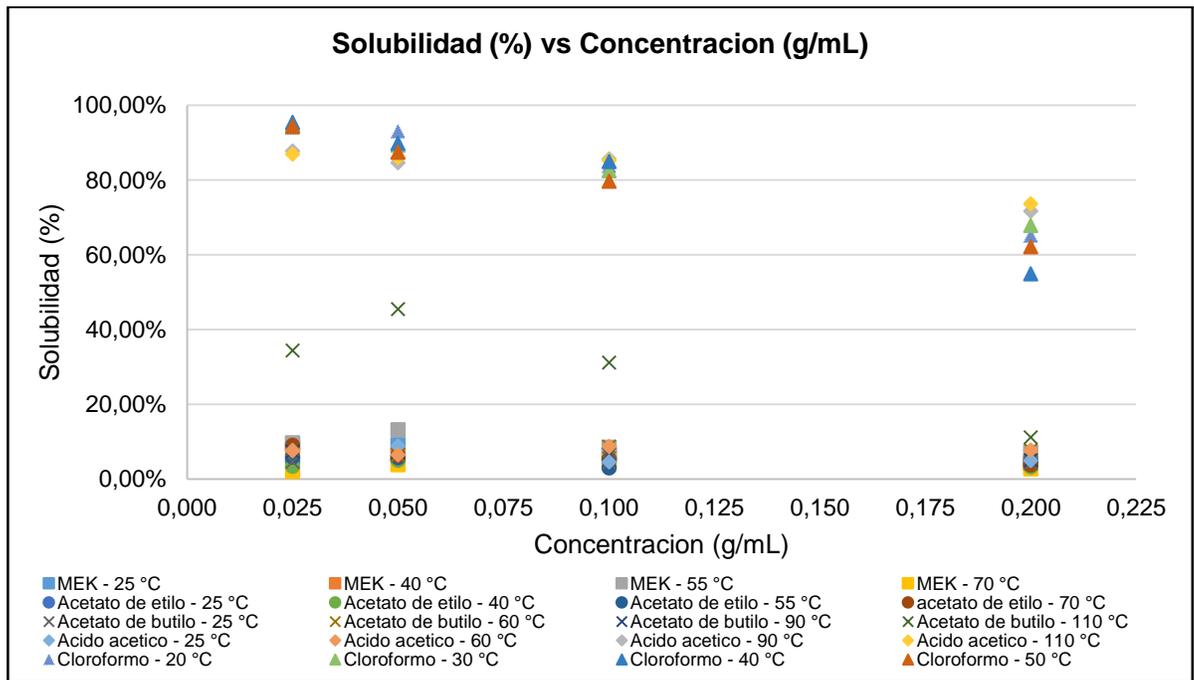
Grafica 4. Puntos de dispersión de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs temperatura (°C) para los diferentes solventes y concentraciones, cuando se emplea un tiempo de agitación de 3 horas.



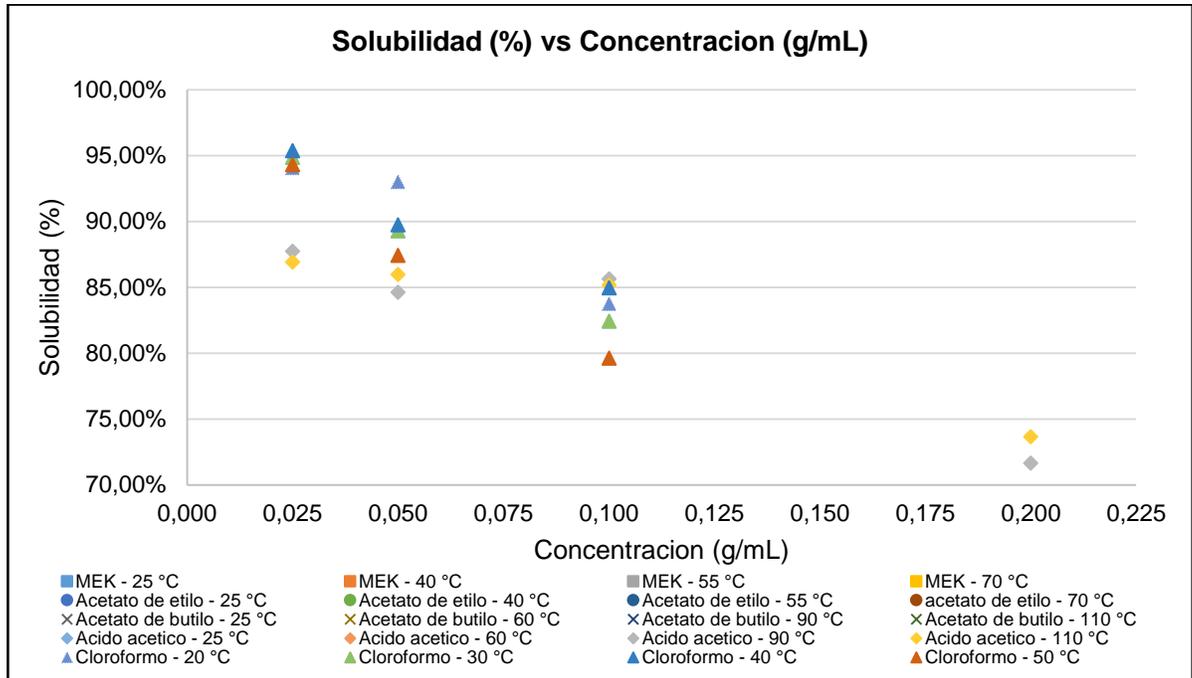
Grafica 5. Puntos de dispersión para la solubilidad baja de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs temperatura (°C) para los diferentes solventes y concentraciones, cuando se emplea un tiempo de agitación de 3 horas.



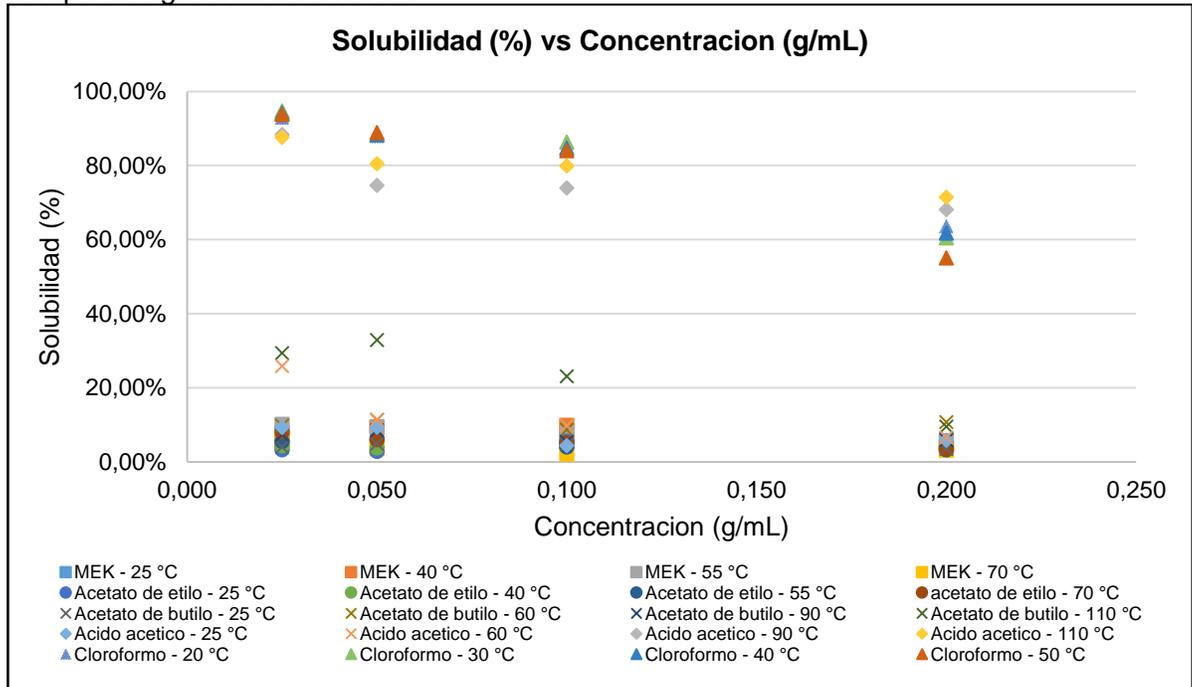
Grafica 6. Puntos de dispersión de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs concentración (g/mL) para los diferentes solventes y temperatura, cuando se emplea un tiempo de agitación de 1 hora.



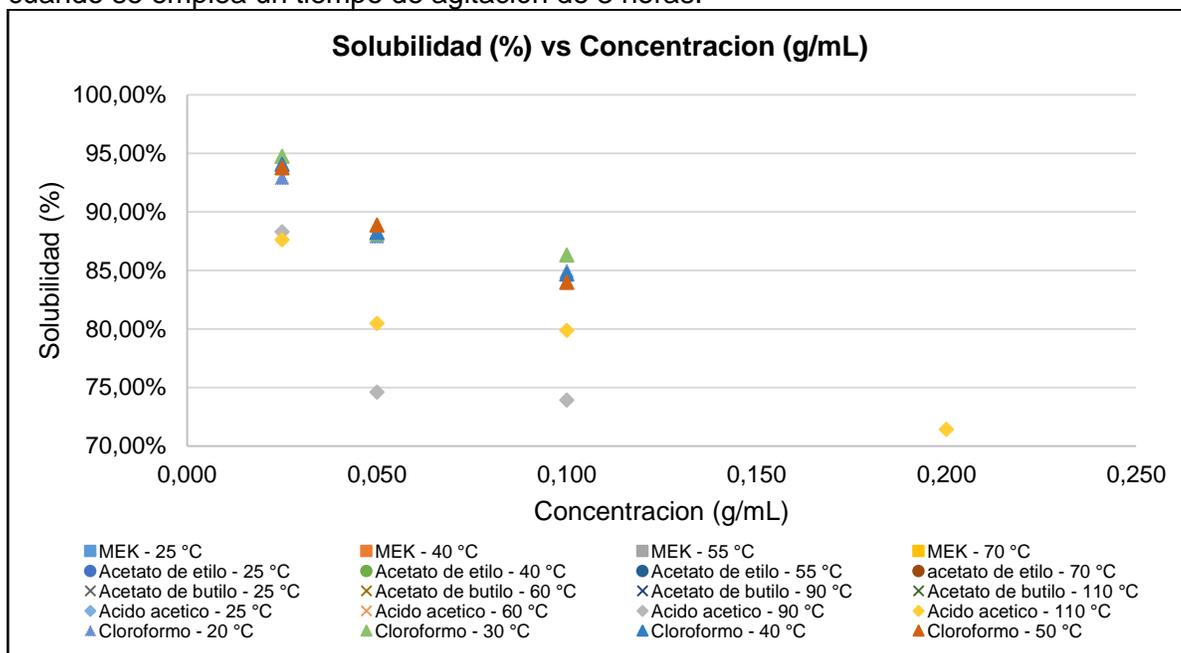
Grafica 7. Puntos de dispersión para la solubilidad alta de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs concentración (g/mL) para los diferentes solventes y temperatura, cuando se emplea un tiempo de agitación de 1 hora.



Grafica 8. Puntos de dispersión de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs concentración (g/mL) para los diferentes solventes y temperatura, cuando se emplea un tiempo de agitación de 3 horas.



Grafica 9. Puntos de dispersión para la solubilidad alta de los resultados experimentales Solubilidad (%) vs concentración (g/mL) para los diferentes solventes y temperatura, cuando se emplea un tiempo de agitación de 3 horas.



En las gráficas 3 y 5 se observa la dispersión de los resultados experimentales de cada solvente estudiado, en el MEK y acetato de etilo tiene una respuesta similar en las diferentes temperaturas, concentración y tiempo. La solubilidad alcanza para estos solventes se determina como baja, debido que no alcanza una solubilidad mayor al 15 %. Aunque se alcanzaron las temperaturas cercanas al punto de ebullición del solvente, la solubilidad del P3HB no se vio afectada, alcanzado valores inferiores al esperados según la literatura.

El MEK, es un compuesto orgánico empleado en distintas investigaciones para la recuperación de PHAscl, los diferentes autores lo recomiendan para la recuperación, porque permite una solubilidad con el biopolímero, realizando la prueba experimental y comparando los datos obtenidos se puede concluir que las condiciones de fermentación, tipo de PHA (copolímero o homopolímero), peso molecular del polímero, microorganismo empleado y cantidad (gramos) puede afectar la solubilidad. Por ejemplo, para el copolímero P(HB-co-HHx) por el microorganismo *Ralstonia eutropha* la solubilidad con el MEK es favorable llegando a solubilizarlo a temperaturas de (50 a 70) °C, en el cual emplearon cantidades de (0,03 a 0,06) g¹⁰⁸ y para el copolímero P(HB-co-HV) por el microorganismo *Ralstonia eutropha* y células recombinantes de *Escherichia coli*, alcanzo una solubilidad del 50 % a 100 °C donde se emplea una temperatura superior al punto de ebullición y generando riesgo de explosión potencial debido a la acumulación de vapor durante el calentamiento¹⁰⁹.

En las gráficas 2 y 4, los solventes acetato de butilo y ácido acético que tienen puntos de ebullición más altos comparados con el acetato de etilo y el MEK, el porcentaje de solubilidad es mayor, aunque para el acetato de butilo que alcanza temperaturas de 110 °C se alcanza una solubilidad máxima del 45 %, aunque el polímero se solubiliza con el P3HB se considera que los resultados son bajos debido a la necesidad de energía requerida para alcanzar la solubilidad. El acetato de butilo es un éster que tienen un punto de ebullición intermedio, a 760 mmHg de 126 °C, debido a las características del P3HB que se solubiliza a altas temperaturas, permite que exista una interacción molecular entre el P3HB-acetato de butilo. Por otro lado, el ácido acético es el solvente que alcanza a solubilizar al P3HB en mayores proporciones, llegando a porcentajes de solubilidad similares a los obtenidos con cloroformo como se observa en las gráficas 7 y 9, en el cual los puntos se sobreponen entre estos solventes, cuando las concentraciones son las mismas. Se puede observar que la solubilidad del biopolímero P3HB en cloroformo y ácido acético son similares cuando el ácido acético alcanza una temperatura de 90 °C, se deduce que a esta temperatura se permite las interacciones moleculares

¹⁰⁸ RIEDEL, Sebastian *et al.* (2012). Recovery of poly(3- Hydroxybutyrate-co-3- Hydroxyhexanoate) From *Ralstonia eutropha* Cultures With Non-Halogenated Solvents. 8p

¹⁰⁹ YANG, Yung *et al.* (2017). Application of a Non-halogenated Solvent, Methyl Ethyl Ketone (MEK) for Recovery of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(HB-co-HV)] from Bacterial Cells. 294-296p

entre el P3HB-ácido acético, el cual genera una miscibilidad (los enlaces intermoleculares se mezclan) y crea un hinchamiento en el polímero, formando una mezcla (polímero-solvente) en estado líquido, pero cuando la mezcla disminuye la temperatura, alcanzando temperaturas inferiores a 90 °C se forma un gel muy viscoso (P3HB-ácido acético).

También se puede determinar que, en los tiempos de agitación establecidos de 1 y 3 horas, el polímero alcanza la solubilidad, por lo tanto, los datos no experimentan una diferencia relevante, pero en caso que no se realice la agitación se genera un ruido en la experimentación, porque el proceso de disolución es lento y alrededor de la cristalización, el polímero que entra en contacto se hincha formando una capa que dificulta la disolución, la agitación rompe la capa, permite la solubilidad y permite que mezcla (polímero-solvente) se solubilice¹¹⁰. Como se observa experimentalmente el cloroformo es el solvente que solubiliza en mayor proporción al P3HB, incluso a temperaturas de 20 °C, debido a que la estructura química está conformada por enlaces C-Cl, altamente polares, aunque la solubilidad disminuye cuando se aumenta la concentración debido que la mezcla es más viscosa, ejerciendo una resistencia al fluir.

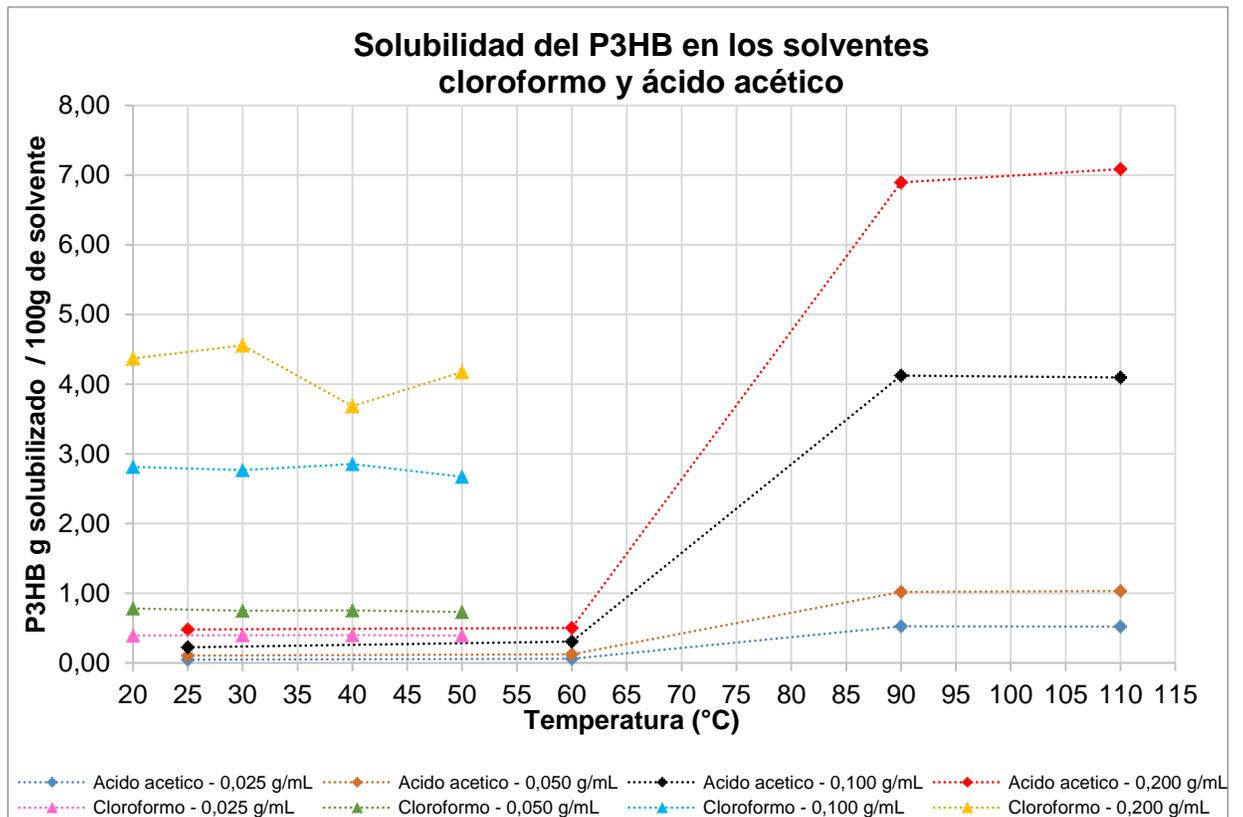
En la gráfica 10, se puede observar las curvas de solubilidad experimental del P3HB en los solventes cloroformo y ácido acético, se evaluó en las concentraciones (0,025, 0,050, 0,100, 0,200) g/mL, donde las concentraciones de 0,100 y 0,200 g/mL a 90 °C el ácido acético solubilizando mayor cantidad de polímero que el cloroformo, porque la densidad es menor, sin embargo, a 0,200 g/mL, se observa una solución viscosa, generado un ruido o incertidumbre en los resultados. También se puede observar el comportamiento del polímero en los solventes son similares al cloroformo, cuando la solución ácida acético-P3HB alcanza una temperatura de 90 °C, para vencer las interacciones moleculares y formar la disolución polimérica.

Las solubilidades de los polímeros varían en función de la temperatura, estructura química y peso molecular, cuando el peso molecular es menor la solubilidad aumenta. Se puede concluir que la solubilidad del P3HB en los diferentes solventes aumenta en función de la temperatura, debido a que es un polímero termoplástico y cristalino el cual depende de la temperatura para solubilizar¹¹¹.

¹¹⁰ UNIVERSIDAD DE ALCALÁ. Prácticas de laboratorio tecnológico de polímeros. [en línea]. [Consultado: 01 de septiembre de 2018]. Disponible en internet: https://portal.uah.es/portal/page/portal/GP_EPD/PG-MA-ASIG/PG-ASIG-66329/TAB42351/praclabo.htm

¹¹¹ González, Yolanda *et al.* (2012). Pág. 85

Grafica 10. Curvas de solubilidad experimental del P3HB en los solventes cloroformo y ácido acético para las concentraciones (0,025, 0,050, 0,100, 0,200) g/mL



En el Anexo C, se puede observar las curvas de solubilidad experimental de los solventes acetato de etilo, acetato de butilo, ácido acético, MEK y cloroformo para las diferentes concentraciones empleadas.

4.2.1 Condiciones óptimas del proceso. De los resultados experimentalmente se puede determinar que las condiciones que optimizan la recuperación de P3HB obtenido de la cepa *B. cepacia B27*, dependen de los factores temperatura, concentración, tipo de solvente y tiempo de agitación.

Se establece que el solvente a emplear es el ácido acético, debido que ofrece mayor porcentaje de solubilidad, la temperatura favorable es de 90 °C, aunque se reporta una solubilidad mayor a una temperatura de 110 °C, la diferencia es menor al 3 %, considerando injustificable el gasto energético para alcanzar los 110 °C y encontrarse a temperaturas cercanas al punto de ebullición, podría ocasionar riesgo de explosión por acumulación de vapor en el proceso, la concentración escogida es de 0,050 g/mL, aunque se obtiene resultados similares de solubilidad a 0,025 g/mL, la diferencia es menor al 5 %, por lo tanto sería necesario mayor cantidad de solvente para obtener la misma cantidad de polímero, aumentando los

gastos al proceso y a una concentración de 0,100 g/mL, la mezcla tiene una viscosidad mayor, generando resistencia a la fluidez e inconvenientes en el momento de realizar la separación por filtración, cuando la temperatura desciende en el proceso de filtración, se genera un gel (P3HB-ácido acético) que ocasiona un taponamiento en el filtro y el tiempo óptimo de agitación se determina de 1 hora, debido a que en la experimentación la solubilidad del P3HB no varía con función del tiempo. En la tabla 13 se observan las mejores condiciones de solubilidad del P3HB, determinadas para el proceso de recuperación de P3HB.

Tabla 13. Mejores condiciones de solubilidad del P3HB

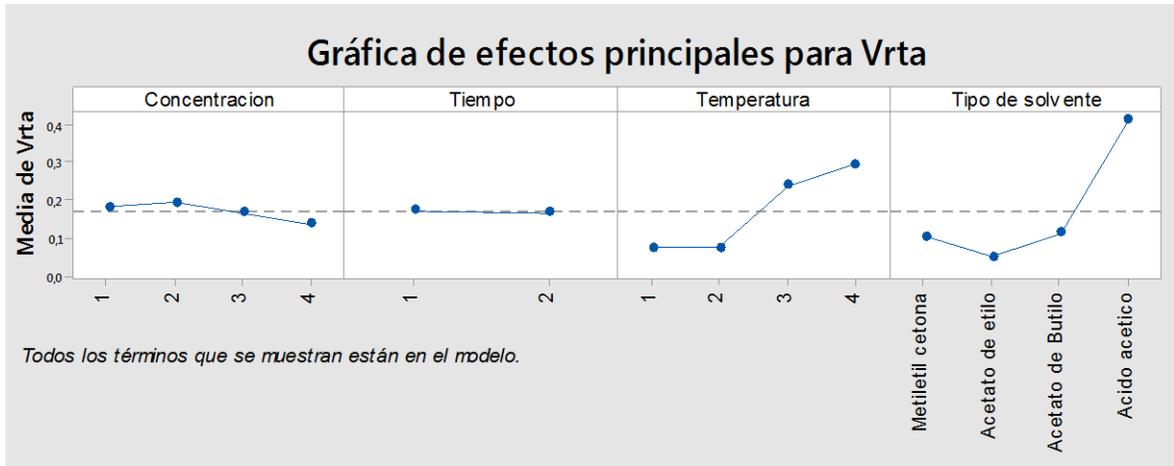
Factores	Condiciones
Tipo de solvente	Ácido acético
Temperatura (°C)	90
Tiempo (h)	1
Concentración (g/mL)	0,050

Fuente: elaboración propia.

4.2.2 Análisis de varianza. El análisis de varianza fue calculado utilizando el programa Minitab 2016. En las gráficas 11 y 12 se observan la variación de los diferentes factores y niveles. El ANOVA y los datos obtenidos se observan en el Anexo D.

En la gráfica 11 se observa, la variación de los diferentes factores con respecto a la media de la variable respuesta (V_{rta}), en el cual se observa que los dos niveles empleados en el tiempo de agitación tienen una mínima variación en la solubilidad del polímero, debido a que los valores se encuentran sobre la media, mientras que la concentración tiene una variación mayor para el nivel 2 pero no significativa para los niveles 1,3 y 4, para la temperatura se observa que se encuentra por debajo de la media cuando está en los niveles 1 y 2, pero que aumenta de la media en los niveles 3 y 4, donde se entiende que cuando aumenta la temperatura la solubilidad aumenta y para el factor cualitativo del tipo de solvente, se observa que el ácido acético es el solvente que se encuentra sobre la media afectando la solubilidad, por otro lado, para los solventes acetato de etilo, acetato de butilo y MEK se encuentra por debajo de la media, los cual no afectan la solubilidad del P3HB bajo estas condiciones.

Grafica 11. Grafica de los efectos principales para la variable respuesta para los factores concentración, tiempo, temperatura y tipo de solvente.

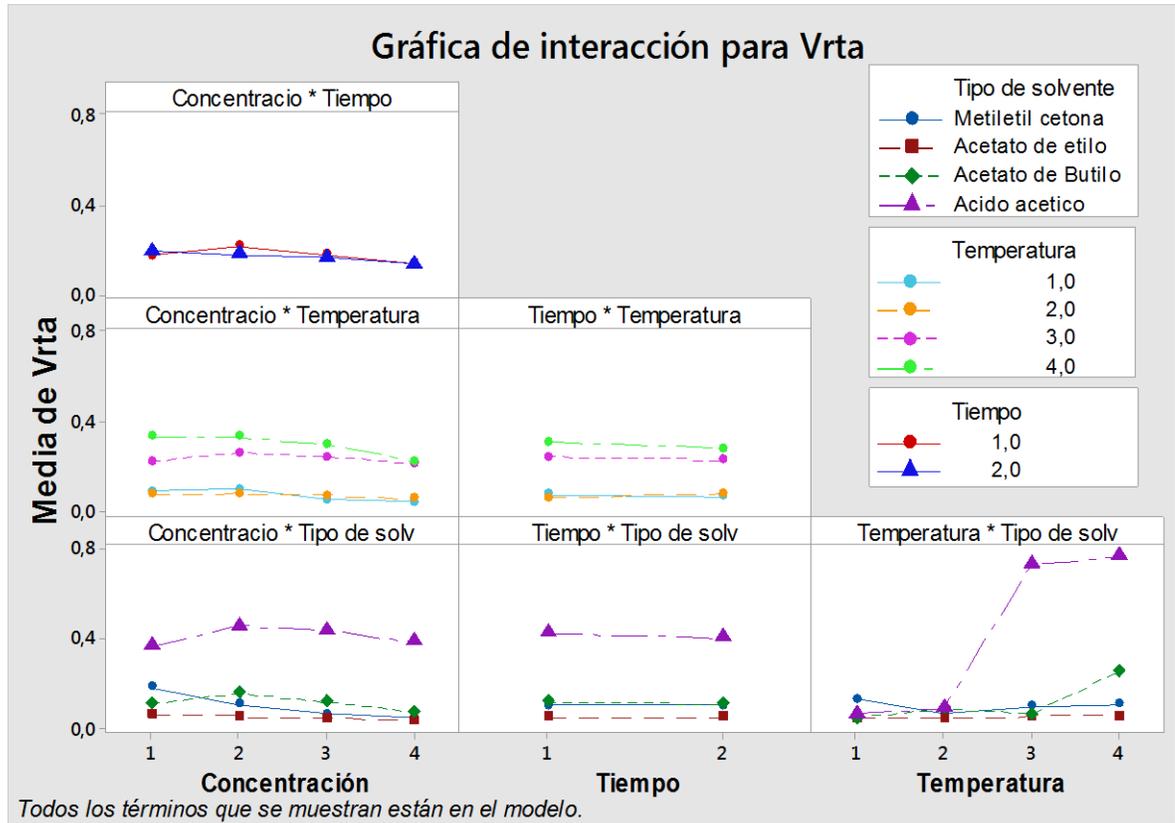


Fuente: obtenido del programa Minitab 2018®

En la gráfica 12 se puede observar las interacciones entre los diferentes factores (concentración, tiempo, temperatura y tipo de solvente) para cada nivel estudiado y el efecto en la variable respuesta (Vrta). Las interacciones entre los factores concentración vs tiempo de agitación no obtienen una variación notable, porque las líneas se encuentran sobrepuestas, en el mismo caso se observa, que para los niveles de temperatura 1 y 2, los factores de concentración y tiempo de agitación, donde las líneas son similares a una línea recta poseen una variación mínima.

Para la interacción de temperatura y tipo de solvente, se observa como la solubilidad aumenta cuando alcanza los niveles 3 y 4 de temperatura en ácido acético, alcanzando los valores más altos reportados en la experimentación.

Grafica 12. Interacciones de la variable respuesta para los factores de concentración, tiempo, temperatura y tipo de solvente.



Fuente: obtenido del programa Minitab 2018®

El análisis estadístico entre los diferentes porcentajes de solubilidad del P3HB para cada uno de los solventes alternativos para la recuperación del polímero a través del T-test y el test de Tukey HSD indicó valores de P para las diferentes interacciones. Se encontró que el tiempo de agitación propuesto (B) y las interacciones con concentración (A), temperatura (C) y tipo de solvente (D) tienen valores mayores a 0,05 ($P > 0,05$) lo que indica que la diferencia no es significativa para la variable respuesta (solubilidad %). Como se observa en el Anexo D.

4.3 RECUPERACIÓN DE P3HB CON SOLVENTES

La obtención del biopolímero se realizó utilizando la biomasa seca, recuperada de la etapa de fermentación y obtención de biomasa seca, en la que se trata con el tensoactivo SDS, para romper la membrana celular y facilitar la extracción del P3HB.

Para la recuperación, se extrae el P3HB de la cepa *B. cepacia* B27, empleando los solventes ácido acético glacial (alternativo) y cloroformo (blanco); donde se obtiene un porcentaje de recuperación de (54 % y 61 %) respectivamente, sin embargo, estos valores pueden ser menores debido a que se está cuantificando la cantidad de P3HB, residuos grasos y residuos celulares, que posteriormente se pueden evidenciar en el TGA, donde la pureza del producto no es del 100 %.

Los resultados obtenidos concuerdan con el diseño experimental realizado, donde la solubilidad del polímero en cloroformo es mayor, esto se debe a la naturaleza química (altamente polar), pero igualmente, es un solvente de toxicidad moderada, la ATSDR (agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades), es una sustancia nociva para la salud humana¹¹², porque genera efectos negativos en el hígado, sistema nervioso central y riñones¹¹³, además de ser un agente cancerígeno¹¹⁴. La diferencia de los porcentajes de recuperación para los dos solventes es mayor del 50 %, aunque se busca obtener una recuperación mayor, los resultados obtenidos son mayores que los reportados por (Aramvash *et al* 2018) donde registra un porcentaje de recuperación de 36.71 ± 2.0 a 100 °C.

En el anexo E se observa el proceso detallado para calcular el rendimiento.

4.3.1 Caracterización. Luego de obtener el PHA con cloroformo y ácido acético, se realizó una caracterización para determinar, el tipo de material obtenido, la pureza, peso molecular, temperatura de fusión y de transición.

4.3.1.1 Peso molecular viscosimétrico. En la tabla 14 se observa, los pesos moleculares para los diferentes P3HB recuperado con los solventes ácido acético y cloroformo, se observa que el polímero recuperado con ácido acético tiene un peso molecular mayor, debido a que la degradación del polímero en el proceso es menor. El peso molecular del obtenido se encuentra en el rango reportados para los PHB (1×10^4 a 3×10^6 g/mol)¹¹⁵.

Al obtenerse un peso molecular mayor, las propiedades mecánicas y reológicas mejoran¹¹⁶. En la industria, para la elaboración de productos termoplásticos se buscan PHB con un peso molecular mayor que 5×10^4 Da¹¹⁷, el peso molecular del

¹¹² AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Chloroform. [en línea]. [Consultado: 11 de octubre de 2018]. Disponible en internet: <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=16>

¹¹³ TORKELESON, T. *et al*. The toxicity of chloroform as determined by single and repeated exposure of laboratory animals. (1976). 697-705 p.

¹¹⁴ KOMORNISKI, E., CALISTRO S., DI BIASI, B., GARAY, J y DAMIN, C. Intoxicación con cloroformo “a propósito de un caso”. Unidad Toxicología - Hospital “Juan Fernández”. Cerviño 3356. CABA.

¹¹⁵ Gonzales, Yolanda, *et al* (2012). 83p

¹¹⁶ MIER, J. *et al*. Síntesis de Polímeros. Pesos moleculares. (1997). 11-48 p.

¹¹⁷ LIU, Junguo *et al*. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. (2005) 2757–2762p

polímero recuperado con ácido acético $9,45 \times 10^5$ Da, es aceptable y se puede emplear para la fabricación de envases¹¹⁸.

Tabla 14. Peso molecular del PHA obtenido con ácido acético y cloroformo.

Tipo de solvente	Peso molecular (Da)
Cloroformo	$8,91 \times 10^5$
Ácido acético	$9,45 \times 10^5$

Fuente: elaboración propia.

En el Anexo F se observa con detalle los cálculos para determinar el peso molecular para los diferentes P3HB recuperados

4.3.1.2 Análisis termogravimétrico (TGA). En la gráfica 13, se observa el análisis TGA para el P3HB recuperado con los solventes ácido acético y cloroformo. La degradación térmica se realiza en un proceso de un solo paso a una temperatura de degradación máxima de $550\text{ }^{\circ}\text{C}$, se obtienen una degradación de los enlaces ester del PHB, para el polímero recuperado con cloroformo y ácido acético la temperatura de descomposición inicial es de $220\text{ }^{\circ}\text{C}$, el P3HB recuperado con ácido acético presenta impurezas de bajo peso molecular, en este caso puede corresponder a residuos de solvente.

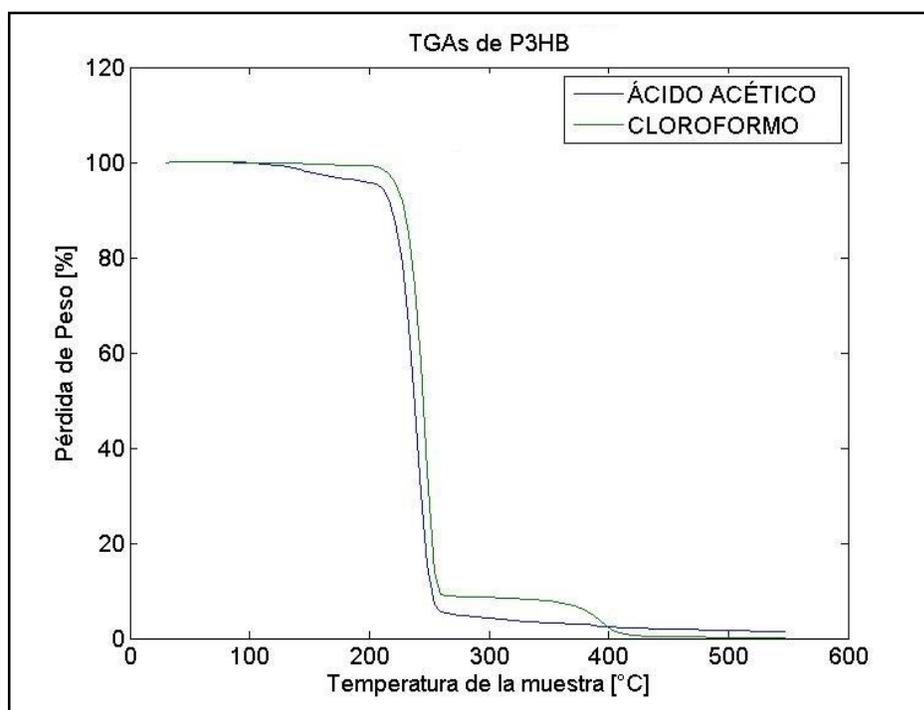
La descomposición final del polímero se alcanza en una temperatura cercana de $254\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, para el polímero recuperado con cloroformo presenta impurezas de alto peso molecular como residuos grasos o biomasa residual productos de la fermentación, que no se retiraron en el proceso. El polímero recuperado con ácido acético obtiene una mayor pureza debido que la pérdida de peso alcanza un valor menor comparada con los datos obtenidos con cloroformo, como se observa en la gráfica 13.

Al aumentar la pureza del producto se puede utilizar en aplicaciones biomédicas, industria alimentaria o farmacéutica, que requieren productos plásticos sin impurezas¹¹⁹.

¹¹⁸ ZULFIQAR, Ali et al. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. (2018). pág. 46-50p

¹¹⁹ BABEL, Wolfgang y STEINBÜCHEL, Alexander. Biopolyesters. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Alemania: Springer-Verlag., 2001. Vol 1. 342 p.

Grafica 13. Diagrama termogravimétrico del P3HB tratado con y sin SDS para Cloroformo y ácido acético



Fuente: elaboración propia programa Matlab®

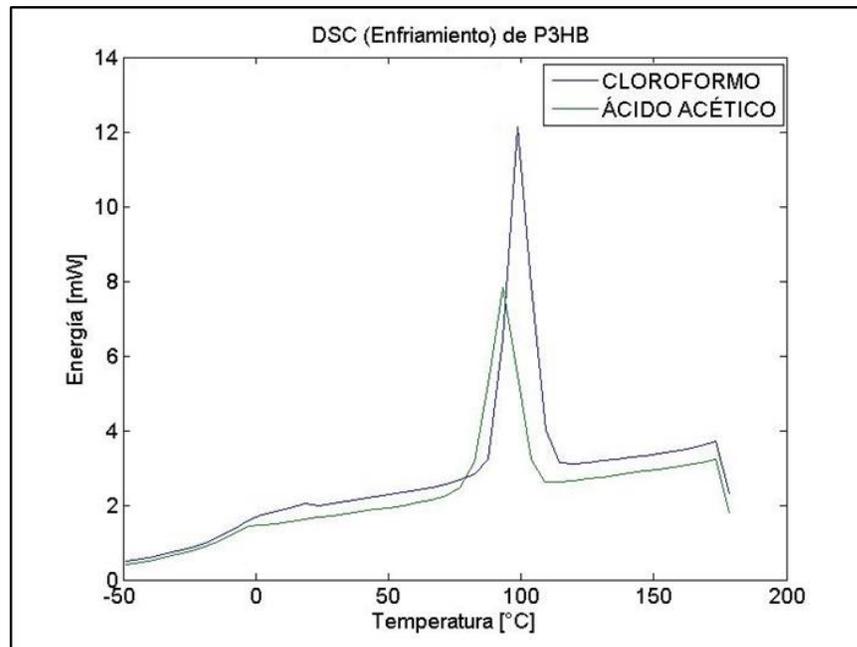
4.3.1.3 Calorimetría de barrido (DSC). En la gráfica 14 y 15, se observan los estudios DSC de enfriamiento y calentamiento para el polímero recuperado con cloroformo y ácido acético.

En la gráfica 14 se pueden observar que la fase cristalina del biopolímero, varía dependiendo del tratamiento realizado. Cuando se realiza el tratamiento con SDS y se recuperado con ácido acético y cloroformo se obtienen valores (93 °C y 99 °C) respectivamente. De las curvas que se obtienen en la gráfica 15, se observa un pico diferente para cada uno de los polímeros recuperados, el cual corresponde a la temperatura de fusión (T_m) del P3HB. Para el polímero recuperado con ácido acético y cloroformo se obtienen valores de (143 °C y 158 °C) respectivamente.

Los valores reportados para el punto de fusión (T_m) depende del método de extracción y solvente empleado, para (Rosengart A., 2015) reporta un T_m de 171,65 °C recuperado con cloroformo y una temperatura de degradación 278,92 °C y (Aramvash, A., 2018) reporta que para el P3HB comercial un T_m 173,6 °C¹²⁰.

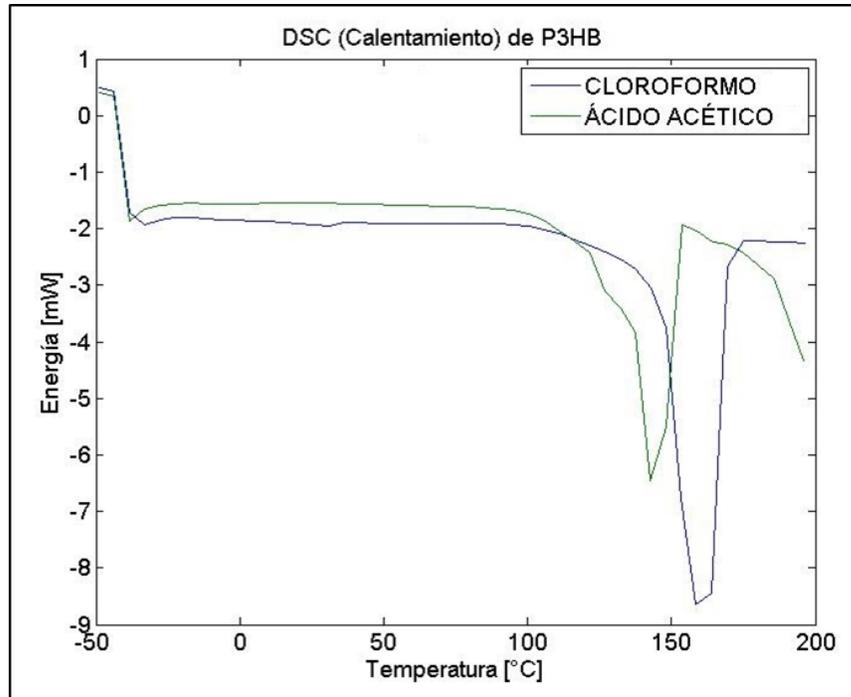
¹²⁰ SINDHU, R. et al. Production and Characterization of Poly-3-hydroxybutyrate from Crude Glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and Improving Its Thermal Properties by Blending with Other Polymers. 2011. 783 – 794p

Grafica 14. Diagrama de calorimetría de barrido (enfriamiento) del P3HB tratado con y sin SDS recuperado.



Fuente: elaboración propia programa Matlab®

Grafica 15. Diagrama de calorimetría de barrido (calentamiento) del P3HB tratado con y sin SDS recuperado con los solventes Cloroformo y ácido acético.



Fuente: elaboración propia programa Matlab®

5. CONCLUSIONES

- Entre los 14 solventes estudiados al inicio de este proyecto (anisol, dimetilsufoxido, carbonato de etileno, MEK, cloroformo, acetona, acetato de butilo, acetato de etilo, etanol, hexano, carbonato de propileno, ácido acético, ciclohexanona, metanol y metilisobutil cetona) y realizando una caracterización por el parámetro de solubilidad, punto de ebullición, costos y el concepto de química “verde”, se determinan los solventes acetato de etilo, acetato de butilo, MEK y ácido acético.
- A partir de la evaluación de la solubilidad experimental de los solventes, ácido acético, acetato de butilo, metiletil cetona y acetato de etilo, se determina que los solventes metiletil cetona y acetato de etilo, alcanzan una solubilidad máxima del 15 % para las temperaturas (25, 40, 55 y 70) °C, mientras tanto el acetato de etilo alcanza una solubilidad máxima del 45 % cuando alcanza una temperatura de 110 °C y el ácido acético logra solubilizar un 85 % al polímero cuando la mezcla alcanza la temperatura de 90 °C.
- Se estableció las condiciones favorables para la recuperación del P3HB obtenido de la cepa *B. cepacia B27* en ácido acético, con el diseño de experimentos, en las que se establece que la concentración es de 0,05 g/mL, temperatura de 90 °C y tiempo de agitación de 1 hora.
- Se determinó que se requiere menor cantidad de ácido acético (g) para solubilizar al polímero P3HB que, de cloroformo, empleando la solubilidad experimental (g de P3HB solubilizado por 100g de solvente) del P3HB obtenido de *B. cepacia B27*, datos que actualmente no se ha reportado con anterioridad.
- Evaluando la recuperación del biopolímero en los solventes ácido acético y cloroformo, se alcanza un porcentaje de recuperación del 54 % y 61 % respectivamente. El biopolímero recuperado con ambos solventes se caracterizó para determinar el peso molecular y las propiedades térmicas, para el ácido acético se obtuvo un peso molecular viscosimétrico de $9,4 \times 10^5$ Da y una temperatura de fusión de 143 °C, por otro lado, para el polímero recuperado con cloroformo, con peso molecular viscosimétrico de $8,9 \times 10^5$ Da y una temperatura de fusión de 158 °C. Ambos polímeros presentan una temperatura de degradación de 220°C. Por lo tanto, el método implementado con ácido acético es ecológico rentable y permite obtener un polímero que se puede implementar en para la fabricación de productos comerciales.
- Entre los diferentes solventes estudiados, el ácido acético es un solvente económico, asequible, con un punto de ebullición intermedio, considerado un solvente “verde”, con gran potencial para la industria.

6. RECOMENDACIONES

- Emplear mezclas de solventes con ácido acético que mejore el porcentaje de recuperación y las propiedades termodinámicas para el biopolímero recuperado.
- Realizar el proceso de extracción con los solventes estudiados o diferentes solventes a temperaturas superiores al punto de ebullición del solvente para determinar si el porcentaje de recuperación es superior.
- Establecer las condiciones que maximizan la recuperación del P3HB de la cepa *B. cepacia B27* con ácido acético, variando los factores tiempo de agitación, temperatura y en las concentraciones de (0,05 y 0,10) g/mL
- Determinar si el ácido acético, tendrá un comportamiento similar en la solubilidad de PHA de cadena corta y media, para posteriormente ser empleado en la recuperación de diversos PHA.

BIBLIOGRAFIA

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Chloroform. [en línea]. [Consultado: 11 de octubre de 2018]. Disponible en internet: <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=16>

AHUMADA, Edgar.; DELGADO, Daniel y MARTÍNEZ Fleming. Estimación de la solubilidad del acetaminofeno en mezclas polietilenglicol 400 + agua según el método extendido de Hildebrand. En: Revista Colombiana de Química. Noviembre, 2012, no. 3, vol. 41. 433-448 p.

AKITA, S.; EINAGA, Y.; MIYAKI, Y. y FUJITA, H. Solution Properties of Poly(D- β -Hydroxybutyrate). Biosynthesis and Characterization. En: Macromoleculas. February, 1976, no. 9, vol. 5. 774-780 p.

ALDER, Catherine.; HAYLER, John.; HENDERSON, Richard.; REDMAN, Anikó.; SHUKLA, Lena y SNEDDON, Helen. Updating and further expanding GSK's solvent sustainability guide. En: Royal society of chemistry. Abril, 2016, no. 18. 3879 -3990 p. DOI: 10.1039/c6gc00611f

ANBUKARASU, Preetam.; SAUVAGEAU, Dominic. y ELIAS, Anastasia. Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. En: Scientific Reports. December, 2015, no. 5. 1-14 p. Doi: 10.1038/srep17884

ANDERSON, Alistair y DAWES, Edwin. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. En: Microbiology Reviews. December, 1990, no. 4, vol. 54. 450-472 p.

ANGARITA, Henry. Estudio de las variables que afectan la procesabilidad bajo condiciones de extrusión de un polímero de glucosa. Tesis de Magister en Ingeniería Química. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2007. 12-17p

ARDILA, Kathy y VILORIA, Andrés. Evaluación del escalamiento de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por fermentación a partir de la bacteria mutante Burkholderia cepacia B27 a nivel semi-industrial. Tesis de pregrado de Ingeniería Química. Bogotá: Universidad de America, 2017. 22 p.

ARMELIN, Elaine. Síntesis y caracterización de nuevas poliesteramidas: estudio de sus propiedades. Título para doctorado de Química. Cataluña: Universidad Politécnica de Cataluña, 2002. 37 p.

BABEL, Wolfgang y STEINBÜCHEL, Alexander. Biopolyesters. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Alemania: Springer-Verlag., 2001. Vol 1.

BARTON, Allan. Handbook of Solubility Parameters and Other Cohesion Parameters, 2 ed. Estado Unidos: CRC press, 1991.

BELLAS, María. Formulación y Caracterización de Materiales Compuestos Integrados por una Matriz de Caucho Estireno-Butadieno (SBR) Reforzada con Nanoarcilla. Tesis para título de doctora. Coruña: Universidade da Coruña, 2012.

BIOPLASTICS.ORG. Bioplásticos. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <http://www.biokunststoffe.de>.

BLOUNT, Estefania. Disolventes orgánicos. Daphnia 12 [en línea]. [Consultado: 15 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <http://www.daphnia.es/revista/12/articulo/425/Disolventes-organicos>.

BROWN, Theodore.; LEMAY, Eugene.; ESCALONA-GARCÍA, Héctor., BURSTEN, Bruce. y BURDGE, Julia. Química: La ciencia central. 9 ed. México: Pearson Educación, 2004. Cap. 13.

BUGNICOURT, Elodie.; CINELLI, Patrizia.; LAZZERI, Andrea y ALVAREZ, Vera. Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. En: Express Polymer. Letters. June, 2014, no. 11, vol. 8. 791–808 p. Doi: 10.3144/expresspolymlett.2014.82

BURNS, Ralph. Fundamentos de química. 5 ed. México: Pearson Educación. 2011.
CARDONA, Carlos. y ORREGO Carlos. Avances investigativos en la producción de biocombustible. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Manizales. 2012.

CENTRE FOR ECOLOGICAL SCIENCES (CES). Environmental Information System, Cloroformo. [en línea]. [Consultado: 01 de julio de 2018]. Disponible en internet: <http://wgbis.ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/ENV/envsp/Vol315.htm>

CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA MOLECULAR & MEDICINA REGENERATIVA (CABIMER). Unidad de Isotopos, Seguridad química y biológica. [en línea]. [Consultado: 15 de julio de 2018]. Disponible en internet: https://www.cabimer.es/web/docs/isotopos/gestion_de_residuos.pdf

CHEN, Guo-Qiang. A microbial polyhydroxyalkanoates based bio- and materials industry. En: Chemical Society Reviews. Mayo, 2009, no. 8, vol. 38. 2434–2446 p. Doi:10.1039/B812677C 38

CHEN, Guo-Qiang. Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications. 1 ed. Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010. Vol 4.

COMPROMISOECO.COM. Conoce cuánto tarda en degradarse los materiales. [en línea]. [Consultado: 07 de septiembre de 2018]. Disponible en internet: <http://compromisoeco.com.ar/residuos/conoce-cuanto-tardan-en-degradarse-los-materiales/>

CORTEZ, Maira. Síntesis y caracterización de polímeros vía radicales libres usando xantatos. Título para licenciado. Mexico: Universidad autónoma del estado de Hidalgo, 2006. 16 p.

CUISINART.COM. Molino para café. [en línea]. [Consultado: 21 de julio de 2018]. Disponible en internet: <https://www.vidri.com.sv/producto/101296/MOLINO-PARA-CAFE-CUISINART-DCG20BKN.html>

DE BUSTURIA, Ignacio. Estudio de la influencia de los cationes de Pb²⁺ y Cs⁺ en la conformación de la polivinilpirrolidona. Título para doctorado. España: Universidad complutense de Madrid. 1992.

DMITRIEVSKY. La planta química, Acetato de butilo. [en línea]. [Consultado: 21 de julio de 2018]. Disponible en internet: <https://www.dcpt.ru/es/acetato-de-butilo/>

DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS PARA PERSONAS MAYORES DE NEW JERSEY. Hoja informativa para sustancias peligrosas, Metiletil cetona. [en línea]. [Consultado: 21 de julio de 2018]. Disponible en internet: <https://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1258sp.pdf>

DER-SHYAN, Sheu; YUH-LING, Lee.; WUN-JYUN, Jhuang.; HOUNG-YUNG, Chen. y WANN-NENG Jane. Cultivation temperature modulated the monomer composition and polymer properties of PHA synthesized by *Cupriavidus* sp. L7L from levulinate as sole carbon source. En: International Journal of Biological Macromolecules. July, 2018, no. 118. 1558 – 1564 p. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.193

EUROPEAN SOLVENTS INDUSTRY GROUP (ESIG). The solvents industry. [en línea]. [Consultado: 21 de julio de 2018]. Disponible en internet: <http://www.esig.org/>

FLOREZ, D. *et al.* Mutagenesis studies for enhancement of PHA production by *Burkholderia cepacia* 2G57, isolated from Colombian soils. En: International Symposium on Biopolymers Santos Brazil. 92p.

FRANCO-VEGA, Avelina.; PALOU, Enrique.; RAMÍREZ-CORONA, Nelly. y LÓPEZ-MALO, Aurelio. Líquidos iónicos: una alternativa “verde” para procesos de extracción en la industria de alimentos. En: Temas selectos de ingeniería de alimentos. 2014, no. 1, vol. 8. 15-26 p.

GEYER, Roland.; JAMBECK, Jenna y LAW, Kara. Production, use, and fate of all plastics ever made. En: Science Advances, July, 2017, no. 7, vol. 3. 1-5 p. Doi: 10.1126/sciadv.1700782

GONZALES, Yolanda., MEZA, Juan.; GONZALES, Orfil y CORDOVA, Jesus. Síntesis y biodegradación de Polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. En: Revista Internacional De Contaminación Ambiental. Noviembre, 2012, no.1, vol. 29. 77-115 p

GONZALES-PROLONGO, M. Propiedades químicas y físicas de polímeros. Capitulo I. Introducción. España: Universidad politécnica de Madrid. 1997. 65-94 p. ISBN: 84-89694-35-4

GUTIÉRREZ, C., GARCÍA, M., DE LUCAS, A., GRACIA, I. y RODRÍGUEZ J. Una aproximación practica para el diseño de un proceso reciclado de polímeros mediante disoluciones. En: AFINIDAD. Junio, 2011, no. 553, vol. 68. 181-188 p.

HANSEN, Charles. Hansen solubility parameters. 2 ed. Estados Unidos: CRC press. 2007. 26 – 69 p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION. Compendio de normas para trabajos escritos. NTC-1486-6166. Bogota D.C.; El instituto, 2018. ISBN 9789588585673 153p

INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO. Cloroformo. [en línea]. [Consultado: 28 de agosto de 2018]. Disponible en internet: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valores_Limite/Doc_Toxicologica/FicherosSerie2/DLEP%2026.pdf

INSTITUTO SINDICAL DE TRABAJO, AMBIENTE Y SALUD (ISTAS). Disolventes. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: http://www.istas.net/risctox/gestion/estructuras/_3085.pdf

JENDROSSEK Dieter. y HANDRICK Rene. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. En: Annual Review of Microbiology. February, 2002, no. 1, vol. 56. 403-432 p.

KHANNA, Shilpi. y SRIVASTAVA Ashok. A simple structured mathematical model for biopolymer (P3HB). En: Biotechnology Progress. September, 2008, no. 3, vol. 21. 830-838 p. Doi: 10.1021/bp0495769.

KIT, Yoong.; SHOW, Pau.; LAN, Chi-Wei y LOH, Hwei-San. Economic and environmental analysis of PHAs production process. En: Clean Technologies and Environmental Policy. September, 2017, no. 7, vol. 19. 1941–1953 p. Doi: 10.1007/s10098-017-1377-2

KITAK, Teja., DUMICIC, Aleksandra.; PLANINSEK, Odon.; SIBANC, Rok. Y SRCIC, Stanko. Determination of Solubility Parameters of Ibuprofen and Ibuprofen Lysinate. En: *Molecules*. December, 2015, no. 12, vol. 20. 21549-21568 p. Doi:10.3390/molecules201219777

KOMORNISKI, E., CALISTRO S., DI BIASI, B., GARAY, J y DAMIN, C. Intoxicación con cloroformo “a propósito de un caso”. Unidad Toxicología - Hospital “Juan Fernández”. Cerviño 3356. CABA.

KUNASUNDARI, B., SUDESH, K., 2011. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. En: *Express Polymer Letters*. 2011, no. 7, vol. 5. 620–634 p. <http://dx.doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>.

LEE, Gi Na y NA, Jonguk. Future of microbial polyesters. En: *Microbial Cell Factories*. Mayo, 2013, no. 54, vol. 12. 1- 4 p. Doi: 10.1186/1475-2859-12-54

LE MOS, Carolina. y CORDOBA, Alexis. Polihidroxialcanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. En: *Informador técnico (Colombia)*. Mayo, 2015 no. 1, vol. 79. 93-101 p.

LIU, Junguo.; XING, Jianmin.; CHANG, Tianshi.; MA, Zhiya. Y LIU, Huizhou. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. En: *Process Biochemistry*. July, 2005, no. 8, vol. 40. 2757–2762 p. Doi: 10.1016/j.procbio.2004.12.025

LAFUENTE, Luis.; BURGUETE, Maria y ALTAVA, Benito. Introducción a la química orgánica. Castellón de la plana. España: Publicaciones de la Universitat Jaume I. 1997. 89-91 p.

MANTELATTO, Paulo. Desenvolvimento de tecnologia para extração e recuperação de polihidroxialcanoatos obtidos a partir da sacarose de cana-de-açúcar. Tesis doctoral. Brasil: Universidade Federal De São Carlos, 2011. 55 p.

MASSCHELEIN, Liliane. Los solventes. Chile: Centro nacional de convenciones nacionales Chile. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: http://www.cncr.cl/611/articles-4953_archivo_01.pdf

MÉNDEZ, Daniel. (2016). Modelamiento matemático y optimización del proceso de producción de polihidroxialcanoatos empleando la bacteria *Burkholderia cepacia* B27 a partir de ácidos grasos. Tesis de maestría. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 21-45 p.

MIER, J., ARTIAGA, R Y GARCIA, L. Síntesis de Polímeros. Pesos moleculares. Conformación y configuración. España: Editorial Ferrol. 1997. 11-48 p.

MONTERO-SANCHEZ, J. Disolventes Orgánicos, Fluidos supercríticos y Líquidos iónicos. Facultad de farmacia. Universidad Católica de Manizales (UCM). [Archivo PDF]. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: http://webs.ucm.es/info/btg/personales/jmsanchez/TEMA%204_03.pdf

MORALES, Xochitl. Los disolventes en la química verde. Tesis de pregrado para Ingeniero químico industrial. México: Instituto Politécnico Nacional. 2013. 12- 24 p.

MUHAMMADI, Shabina.; AFZAL, Muhammad y HAMEED, Shafqat. Bacterial polyhydroxyalkanoates eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. En: Green Chemistry Letters and Reviews. Noviembre, 2015, no. 8. 56–77 p. Doi: 10.1080/17518253.2015.1109715

PAKALAPATI, Harshini.; CHANG, Chih.; SHOW, Pau.; ARUMUGASAMY, Kumar y LAN, Jhon. Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. September, 2018, no. 3, vol. 126. 282 - 292 p. Doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.03.016

PEREZ, Sofia. Elaboración de pintura a partir de residuos sólidos urbanos metálicos. Anexo C. disolventes alternativos. Tesis de pregrado. México: 2012. [en línea]. [Consultado: 05 de agosto de 2018]. Disponible en internet: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqi/perez_j_s/apendiceC.pdf

RECURSO NACIONAL CANADIENSE DE SEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL (CCSSO). Metiletilcetona (MEK). [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: http://www.ccsso.ca/oshanswers/chemicals/chem_profiles/mek/basic_mek.html

RIEDEL, Sebastian., BRIGHAM, Christopher.; BUDDE, Charles.; BADER, Johannes.; RHA, Chokyun., STAHL, Ulf. Y SINSKEY, Anthony. Recovery of poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) From *Ralstonia eutropha* Cultures With Non-Halogenated Solvents. En: Biotechnology and Bioengineering. February, 2012, no. 2, vol. 110. Pág. 1-9. Doi: 10.1002/bit.24713

RPP NOTICIAS. Los desechos plásticos, una grave amenaza para la vida en el mar y en la tierra. [en línea]. [Consultado: 20 de septiembre de 2018]. Disponible en internet: <https://rpp.pe/mundo/medio-ambiente/los-desechos-plasticos-una-grave-amenaza-para-la-vida-en-el-mar-y-en-la-tierra-noticia-1107044>

ROSENGART, A., CESARIO, M., DE ALMEIDA, M., RAPOSO, R., ESPERT, A., DE APOCADA, E. Y DA FONSECA, M. (2015). Efficient P(3HB) extraction from *Burkholderia sacchari* cells using non-chlorinated solvents. *Biochemical Engineering Journal* 103. Pág 39-46

SALDÍVAR-GUERRA, Enrique y VIVALDO-LIMA, Eduardo. Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing, 1 ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc. 2013. 363 – 364 p.

SINDHU, R., AMMU, B., BINOD, P., DEEPTHI, S., RAMACHANDRAN, K., SOCCOL, C. Y PANDEY, P. Production and Characterization of Poly-3-hydroxybutyrate from Crude Glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and Improving Its Thermal Properties by Blending with Other Polymers. *Brazilian archives of biology and Technology* 54 (4). (2011). 783 – 794p.

SMALLWOOD, Ian. Handbook of organic solvent properties. Great Britain: Hodder Headline Group. 1996.

SUCROAL SA. Productos industriales, acetato de butilo. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <https://sucroal.com.co/products/acetato-de-butilo/>

SUCROAL SA. Productos industriales, acetato de etilo. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <https://sucroal.com.co/products/acetato-de-etilo/>

TARDIFF, Richard. Health Effects of Organics: Risk and Hazard Assessment of Ingested Chloroform. En: *American Water Works Association*. December, 1977, no.12, vol. 69. 658–661 p. Doi: 10.1002/j.1551-8833.1977.tb06845.x

THARANATHAN, R. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. En: *Critical Review in Food Science and Technology*. March, 2003 no. 3, vol. 14. 71-78 p.

TORKELSON, T., OYEN, F. Y ROWE, K. The toxicity of chloroform as determined by single and repeated exposure of laboratory animals. En: *American Industrial Hygiene Association Journal*. June, 1976, no. 12, vol. 37. 697-705 p.

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ. Prácticas de laboratorio tecnológico de polímeros. [en línea]. [Consultado: 01 de September de 2018]. Disponible en internet: https://portal.uah.es/portal/page/portal/gp_epd/pg_ma-asig/pg-asig-66329/tab42351/praclabo.htm

UNIVERSIDAD DE BARCELONA. Técnicas y operaciones avanzadas en el laboratorio químico (TALQ). [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <http://www.ub.edu/talq/es/node/194>

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN, CHILE. Ficha de seguridad para diferentes reactivos: Acetato de etilo. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <http://www2.udec.cl/sqrt/fich/ACETATO.htm>

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO. Disolventes verdes, química “verde”. Pág 67-72. [en línea]. [Consultado: 29 de agosto de 2018]. Disponible en internet: <http://www.dcne.ugto.mx/Contenido/MaterialDidactico/amezquita/Analitica3/Disolventes%20verdes.pdf>

VALAPPIL, S., BOCCACCINI, A., BUCKE, C. y ROY, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. En: *Ant. Van Leeuwenhoek*. 2006, vol. 91. 1–17p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-006-9095-5>.

VERLINDEN, Rob.; HILL, David.; WILLIAMS, Craig y RADECKA, IZA. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. En: *Journal of Applied Microbiology*. July, 2007, no. 6, vol.102.1442 – 1449 p.

VOGELSANG, David. Análisis del flujo de un biopolímero soluble en agua durante el procesamiento por moldeo y análisis de las propiedades de las películas resultantes. Tesis para magister en Ingeniería química. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 2013.

YANG, Chun.; YANIGER, Stuart.; JORDAN, Craig, KLEIN, Daniel y BITTNER, George. Most Plastic Products Release Estrogenic Chemicals: A Potential Health Problem That Can Be Solved. En: *Environ Health Perspect*. July, 2011, no. 7, vol. 119. 989–996 p.

YANG, Yung, JEON, Jong, YI, Da, KIM, Jung, SEO, Hyung., RHA, Chokyun, SINSKEY, Anthony Y BRIGHAM, Christopher. Application of a Non-halogenated Solvent, Methyl Ethyl Ketone (MEK) for Recovery of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(HB-co-HV)] from Bacterial Cells. En: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Mayo, 2017, vol. 20. 291-297 p.

ZHANG, Bo, CARLSON, Ross y SRIENC, Friedrich. Engineering the monomer composition of polyhydroxyalkanoates synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. En: *Applied and Environmental Microbiology*. January, 2006, vol. 72, 536–543 p. Doi: 10.1128/AEM.72.1.536-543.2006.

ZULFIQAR, Ali.; SHARJEEL, Abid y BANAT, Ibrahim. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. En: *International Biodeterioration & Biodegradation*. January, 2018, vol.126. 45 – 56 p. Doi: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001

ANEXOS

ANEXO A

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y ESPECIFICACIONES DE LOS SOLVENTES PARA LA EXPERIMENTACION

A.1 ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS PARA LOS SOLVENTES ACETONA, ÁCIDO ACÉTICO, ANISOL Y ACETATO DE BUTILO

Caracterización	Acetona ¹²¹	Ácido Acético ¹²²	Anisol ¹²³	Acetato de Butilo ¹²⁴
Tipo	Cetona	Ácido Orgánico	Aromático	Ester
No. CAS	67-64-1	64-19-7	100-66-3	123-86-4
Peso Molar (g/mol)	58,08	60,05	108,4	116
Densidad (g/cm³)	0,79	1,04	0,99	0,88
Punto de Ebullición a 760 mmHg (°C)	56,2	118	155	126
Punto de Fusión (°C)	-95,4	17	-37	-78
Presión de vapor a 25 °C (hPa)	233	20,8	4,7	15
Solubilidad en agua %	100,0	100,0	15,0	0,6
Precio (Pesos/L)	\$59.000	\$68.800	\$495.000	\$278.000
Punto de Inflamabilidad (°C)	-20	39	45	22
T autoignición (°C)	540	427	475	370
Inflamabilidad	H225	H226	H226	H226
Toxicidad Aguda	H336	N/A	H336	H336
Otros peligros	EUH066 - H319	H314	H315 - H319	EUH066

¹²¹ Hoja de seguridad del Acetona. Merck Millipore.pdf

¹²² Hoja de seguridad del Ácido Acético. Merck Millipore.pdf

¹²³ Hoja de seguridad del Anisol. Merck Millipore.pdf

¹²⁴ Hoja de seguridad del Acetato de butilo. Merck Millipore.pdf

Gestión de Residuos	Sustancia peligrosa: (1) Inflamable e irritación ocular. (2) Tratado como residuo peligroso en UE	Sustancia peligrosa: (1) Inflamable y corrosivo. (2) Tratado como residuo peligroso en UE	Sustancia peligrosa: (1) Inflamable. (2) Tratado como residuo peligroso en UE	Sustancia peligrosa: (1) Inflamable e irritación ocular. (2) Tratado como residuo peligroso en UE
exposición al medio ambiente	(1) Fácilmente biodegradable (2) Se espera evaporación en agua y suelo	(1) Biodegradable. (2) Se evapora del suelo seco. (3) No se acumula en cuerpos de agua	(1) Fácilmente biodegradable. (2) Se espera evaporación en agua y suelo	(1) Fácilmente biodegradable. (2) Se espera evaporación en agua y suelo

A.2 ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS PARA LOS SOLVENTES ACETATO DE ETILO, METILETILO CETONA, CICLOHEXANONA Y CLOROFORMO.

Caracterización	Acetato de Etilo ¹²⁵	Metiletil cetona ¹²⁶	Ciclo hexanona ¹²⁷	Cloroformo ¹²⁸
Tipo	Ester	Cetona	Cetona	Halogenado
No. CAS	141-78-6	78-93-3	108-94-1	67-66-3
Peso Molar (g/mol)	88	72	98,1	119,38
Densidad (g/cm³)	0,895	0,79	0,947	1,48
Punto de Ebullición a 760 mmHg (°C)	77	80	155	61
Punto de Fusión (°C)	-83.6	-86	-31	-63
Presión de vapor a 25 °C (hPa)	97,3	59	4,5	211
Solubilidad en agua %	8,0	22,3	97,0	8
Precio (Pesos/L)	\$182.000	\$144.000	\$285.000	\$189.000

¹²⁵ Hoja de seguridad del Acetato de etilo. Merck Millipore.pdf

¹²⁶ Hoja de seguridad del Metiletil cetona. Merck Millipore.pdf

¹²⁷ Hoja de seguridad del Ciclo hexanona. Merck Millipore.pdf

¹²⁸ Hoja de seguridad del Cloroformo. Merck Millipore.pdf

Punto de Inflamabilidad (°C)	-4	-6	44	-
T autoignición (°C)	427	425	430	-
Inflamabilidad	H225	H225	H226	H225
Toxicidad Aguda	H336	-	H332	H331 - H351 – H361d
Otros peligros	H319	H319	H302 - H312 - H315 - H338	H302 – H315 – H319
Gestión de Residuos	Sustancia peligrosa: (1) Inflamable e irritación ocular. (2) Tratado como residuo peligroso en UE	Sustancia peligrosa: (1) Inflamable e irritación ocular. (2) Tratado como residuo peligroso en UE	Sustancia peligrosa: (1) Inflamable. (2) Tratado como residuo peligroso en UE	Sustancia peligrosa: (1) Nocivo e irritación ocular. (2) Tratado como residuo peligroso en UE
exposición al medio ambiente	(1) Fácilmente biodegradable. (2) Se espera evaporación en agua y suelo	(1) Fácilmente biodegradable. (2) Se espera evaporación en agua y suelo	(1) Fácilmente biodegradable. (2) Se espera evaporación en agua y suelo	(1) Nocivo para los animales acuáticos y cuerpos de agua (2) No es fácilmente biodegradable

ANEXO B.

SOLUBILIDAD PORCENTUAL EXPERIMENTAL DEL P3HB EN LOS SOLVENTES (METILETIL CETONA, ACIDO ACETICO, ACETATO DE BUTILO Y ACETATO DE ETILO) PARA LOS FACTORES DE TIEMPO DE AGITACION, TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN REALIZADO POR TRIPLICADO

B1. TABLA DE LA SOLUBILIDAD PORCENTUAL EXPERIMENTAL DEL P3HB EN LOS SOLVENTES (METILETIL CETONA Y ACETATO DE ETILO) PARA LOS FACTORES DE TIEMPO DE AGITACION (1 - 3) h, TEMPERATURA (25, 40, 55 y 70) °C Y CONCENTRACIONES (0,025, 0,050, 0,100, 0,200) g/mL REALIZADO POR TRIPLICADO

No.	Solvente	Concentración (g/L)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Solubilidad (%)
1	Metiletil Cetona (MEK)	25,01	25	1	8,20
2	Metiletil Cetona (MEK)	25,01	25	1	10,56
3	Metiletil Cetona (MEK)	25,05	25	1	9,26
4	Metiletil Cetona (MEK)	50,06	25	1	8,03
5	Metiletil Cetona (MEK)	50,04	25	1	8,87
6	Metiletil Cetona (MEK)	50,04	25	1	10,67
7	Metiletil Cetona (MEK)	100,04	25	1	9,80
8	Metiletil Cetona (MEK)	100,02	25	1	3,98
9	Metiletil Cetona (MEK)	100,08	25	1	6,87
10	Metiletil Cetona (MEK)	200,12	25	1	3,96
11	Metiletil Cetona (MEK)	200,12	25	1	4,58
12	Metiletil Cetona (MEK)	200,04	25	1	4,94
13	Metiletil Cetona (MEK)	25,05	25	3	5,63
14	Metiletil Cetona (MEK)	25,03	25	3	6,23
15	Metiletil Cetona (MEK)	25,05	25	3	4,27
16	Metiletil Cetona (MEK)	50,02	25	3	6,84
17	Metiletil Cetona (MEK)	50,02	25	3	6,80
18	Metiletil Cetona (MEK)	50,02	25	3	5,32
19	Metiletil Cetona (MEK)	100,10	25	3	8,25
20	Metiletil Cetona (MEK)	100,04	25	3	4,56
21	Metiletil Cetona (MEK)	100,06	25	3	5,86
22	Metiletil Cetona (MEK)	200,04	25	3	3,88
23	Metiletil Cetona (MEK)	200,16	25	3	2,08
24	Metiletil Cetona (MEK)	200,04	25	3	4,42
25	Metiletil Cetona (MEK)	25,01	40	1	6,44

26	Metiletil Cetona (MEK)	25,05	40	1	5,79
27	Metiletil Cetona (MEK)	25,05	40	1	7,39
28	Metiletil Cetona (MEK)	50,10	40	1	6,51
29	Metiletil Cetona (MEK)	50,10	40	1	6,47
30	Metiletil Cetona (MEK)	50,18	40	1	6,26
31	Metiletil Cetona (MEK)	100,00	40	1	5,84
32	Metiletil Cetona (MEK)	100,00	40	1	6,84
33	Metiletil Cetona (MEK)	100,04	40	1	6,20
34	Metiletil Cetona (MEK)	200,00	40	1	3,66
35	Metiletil Cetona (MEK)	200,16	40	1	4,60
36	Metiletil Cetona (MEK)	200,12	40	1	4,08
37	Metiletil Cetona (MEK)	25,00	40	3	7,56
38	Metiletil Cetona (MEK)	25,10	40	3	8,61
39	Metiletil Cetona (MEK)	25,00	40	3	7,56
40	Metiletil Cetona (MEK)	50,04	40	3	10,59
41	Metiletil Cetona (MEK)	50,02	40	3	11,24
42	Metiletil Cetona (MEK)	50,10	40	3	6,35
43	Metiletil Cetona (MEK)	100,00	40	3	12,26
44	Metiletil Cetona (MEK)	100,10	40	3	11,65
45	Metiletil Cetona (MEK)	100,10	40	3	5,53
46	Metiletil Cetona (MEK)	200,16	40	3	4,52
47	Metiletil Cetona (MEK)	200,40	40	3	3,59
48	Metiletil Cetona (MEK)	200,00	40	3	4,36
49	Metiletil Cetona (MEK)	25,03	55	1	9,71
50	Metiletil Cetona (MEK)	25,00	55	1	11,12
51	Metiletil Cetona (MEK)	25,01	55	1	8,24
52	Metiletil Cetona (MEK)	50,06	55	1	10,03
53	Metiletil Cetona (MEK)	50,10	55	1	14,25
54	Metiletil Cetona (MEK)	50,10	55	1	15,45
55	Metiletil Cetona (MEK)	100,00	55	1	8,72
56	Metiletil Cetona (MEK)	100,18	55	1	7,11
57	Metiletil Cetona (MEK)	100,00	55	1	9,74
58	Metiletil Cetona (MEK)	200,04	55	1	8,64
59	Metiletil Cetona (MEK)	200,20	55	1	7,23
60	Metiletil Cetona (MEK)	200,20	55	1	5,53
61	Metiletil Cetona (MEK)	25,02	55	3	9,87
62	Metiletil Cetona (MEK)	25,02	55	3	12,47
63	Metiletil Cetona (MEK)	25,00	55	3	7,92
64	Metiletil Cetona (MEK)	50,04	55	3	10,07
65	Metiletil Cetona (MEK)	50,06	55	3	7,19

66	Metiletil Cetona (MEK)	50,08	55	3	10,30
67	Metiletil Cetona (MEK)	100,02	55	3	7,44
68	Metiletil Cetona (MEK)	100,10	55	3	8,05
69	Metiletil Cetona (MEK)	100,04	55	3	8,24
70	Metiletil Cetona (MEK)	200,12	55	3	5,64
71	Metiletil Cetona (MEK)	200,00	55	3	6,54
72	Metiletil Cetona (MEK)	200,04	55	3	5,12
73	Metiletil Cetona (MEK)	25,05	70	1	0,92
74	Metiletil Cetona (MEK)	25,01	70	1	2,64
75	Metiletil Cetona (MEK)	25,01	70	1	2,72
76	Metiletil Cetona (MEK)	50,04	70	1	4,32
77	Metiletil Cetona (MEK)	50,10	70	1	2,12
78	Metiletil Cetona (MEK)	50,06	70	1	5,03
79	Metiletil Cetona (MEK)	100,10	70	1	5,55
80	Metiletil Cetona (MEK)	100,04	70	1	4,06
81	Metiletil Cetona (MEK)	100,10	70	1	5,15
82	Metiletil Cetona (MEK)	200,04	70	1	2,78
83	Metiletil Cetona (MEK)	200,00	70	1	3,68
84	Metiletil Cetona (MEK)	200,00	70	1	1,76
85	Metiletil Cetona (MEK)	25,05	70	3	5,19
86	Metiletil Cetona (MEK)	25,00	70	3	4,44
87	Metiletil Cetona (MEK)	25,00	70	3	4,72
88	Metiletil Cetona (MEK)	50,10	70	3	3,19
89	Metiletil Cetona (MEK)	50,00	70	3	4,80
90	Metiletil Cetona (MEK)	50,00	70	3	2,80
91	Metiletil Cetona (MEK)	100,00	70	3	2,62
92	Metiletil Cetona (MEK)	100,10	70	3	1,98
93	Metiletil Cetona (MEK)	100,00	70	3	1,82
94	Metiletil Cetona (MEK)	200,16	70	3	3,62
95	Metiletil Cetona (MEK)	200,16	70	3	2,48
96	Metiletil Cetona (MEK)	200,04	70	3	3,48
97	Acetato de Etilo	25,01	25	1	3,96
98	Acetato de Etilo	25,01	25	1	5,32
99	Acetato de Etilo	25,00	25	1	4,48
100	Acetato de Etilo	50,04	25	1	7,51
101	Acetato de Etilo	50,08	25	1	4,67
102	Acetato de Etilo	50,06	25	1	3,12
103	Acetato de Etilo	100,02	25	1	4,84
104	Acetato de Etilo	100,02	25	1	5,84
105	Acetato de Etilo	100,04	25	1	5,94

106	Acetato de Etilo	200,12	25	1	2,36
107	Acetato de Etilo	200,16	25	1	3,18
108	Acetato de Etilo	200,08	25	1	6,42
109	Acetato de Etilo	25,01	25	3	1,84
110	Acetato de Etilo	25,01	25	3	4,92
111	Acetato de Etilo	25,03	25	3	3,08
112	Acetato de Etilo	50,08	25	3	3,59
113	Acetato de Etilo	50,02	25	3	2,96
114	Acetato de Etilo	50,02	25	3	1,88
115	Acetato de Etilo	100,02	25	3	4,26
116	Acetato de Etilo	100,00	25	3	6,22
117	Acetato de Etilo	100,02	25	3	6,32
118	Acetato de Etilo	200,20	25	3	2,92
119	Acetato de Etilo	200,08	25	3	3,62
120	Acetato de Etilo	200,12	25	3	4,76
121	Acetato de Etilo	25,01	40	1	2,52
122	Acetato de Etilo	25,01	40	1	4,36
123	Acetato de Etilo	25,02	40	1	3,32
124	Acetato de Etilo	50,10	40	1	5,19
125	Acetato de Etilo	50,08	40	1	5,87
126	Acetato de Etilo	50,00	40	1	4,24
127	Acetato de Etilo	100,02	40	1	3,30
128	Acetato de Etilo	100,00	40	1	4,78
129	Acetato de Etilo	100,04	40	1	5,74
130	Acetato de Etilo	200,08	40	1	2,08
131	Acetato de Etilo	200,12	40	1	2,98
132	Acetato de Etilo	200,16	40	1	4,80
133	Acetato de Etilo	25,04	40	3	5,87
134	Acetato de Etilo	25,02	40	3	4,00
135	Acetato de Etilo	25,04	40	3	3,31
136	Acetato de Etilo	50,02	40	3	3,36
137	Acetato de Etilo	50,06	40	3	5,11
138	Acetato de Etilo	50,02	40	3	2,80
139	Acetato de Etilo	100,02	40	3	3,08
140	Acetato de Etilo	100,00	40	3	4,08
141	Acetato de Etilo	100,02	40	3	5,64
142	Acetato de Etilo	200,08	40	3	3,56
143	Acetato de Etilo	200,00	40	3	5,20
144	Acetato de Etilo	200,16	40	3	3,18
145	Acetato de Etilo	25,01	55	1	5,04

146	Acetato de Etilo	25,02	55	1	7,99
147	Acetato de Etilo	25,02	55	1	4,68
148	Acetato de Etilo	50,02	55	1	7,92
149	Acetato de Etilo	50,06	55	1	3,76
150	Acetato de Etilo	50,00	55	1	5,48
151	Acetato de Etilo	100,02	55	1	3,10
152	Acetato de Etilo	100,06	55	1	4,34
153	Acetato de Etilo	100,02	55	1	1,52
154	Acetato de Etilo	200,08	55	1	4,86
155	Acetato de Etilo	200,08	55	1	4,00
156	Acetato de Etilo	200,12	55	1	5,72
157	Acetato de Etilo	25,01	55	3	4,24
158	Acetato de Etilo	25,03	55	3	5,15
159	Acetato de Etilo	25,01	55	3	7,08
160	Acetato de Etilo	50,00	55	3	7,44
161	Acetato de Etilo	50,02	55	3	6,04
162	Acetato de Etilo	50,08	55	3	4,79
163	Acetato de Etilo	100,02	55	3	4,30
164	Acetato de Etilo	100,10	55	3	5,13
165	Acetato de Etilo	100,02	55	3	2,72
166	Acetato de Etilo	200,12	55	3	2,34
167	Acetato de Etilo	200,04	55	3	2,82
168	Acetato de Etilo	200,04	55	3	4,48
169	Acetato de Etilo	25,04	70	1	9,74
170	Acetato de Etilo	25,02	70	1	8,27
171	Acetato de Etilo	25,01	70	1	9,16
172	Acetato de Etilo	50,04	70	1	5,92
173	Acetato de Etilo	50,10	70	1	7,74
174	Acetato de Etilo	50,08	70	1	5,35
175	Acetato de Etilo	100,04	70	1	4,12
176	Acetato de Etilo	100,00	70	1	5,82
177	Acetato de Etilo	100,10	70	1	5,47
178	Acetato de Etilo	200,00	70	1	1,56
179	Acetato de Etilo	200,00	70	1	4,30
180	Acetato de Etilo	200,00	70	1	5,42
181	Acetato de Etilo	25,02	70	3	7,95
182	Acetato de Etilo	25,01	70	3	8,96
183	Acetato de Etilo	25,00	70	3	7,36
184	Acetato de Etilo	50,00	70	3	5,48
185	Acetato de Etilo	50,08	70	3	7,79

186	Acetato de Etilo	50,04	70	3	4,60
187	Acetato de Etilo	100,02	70	3	3,14
188	Acetato de Etilo	100,06	70	3	5,12
189	Acetato de Etilo	100,04	70	3	7,10
190	Acetato de Etilo	200,04	70	3	3,20
191	Acetato de Etilo	200,08	70	3	5,42
192	Acetato de Etilo	200,12	70	3	1,56

B2. TABLA DE LA SOLUBILIDAD PORCENTUAL EXPERIMENTAL DEL P3HB EN LOS SOLVENTES (ÁCIDO ACÉTICO Y ACETATO DE BUTILO) PARA LOS FACTORES DE TIEMPO DE AGITACION (1 - 3) h, TEMPERATURA (25, 60, 90 y 110) °C Y CONCENTRACIONES (0,025, 0,050, 0,100, 0,200) g/mL REALIZADO POR TRIPLICADO

No.	Solvente	Concentración (g/L)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Solubilidad (%)
193	Ácido acético	25,00	25	1	5,24
194	Ácido acético	25,04	25	1	10,06
195	Ácido acético	25,03	25	1	7,63
196	Ácido acético	50,02	25	1	9,00
197	Ácido acético	50,04	25	1	11,15
198	Ácido acético	50,02	25	1	6,40
199	Ácido acético	100,00	25	1	5,02
200	Ácido acético	100,02	25	1	3,76
201	Ácido acético	100,04	25	1	5,18
202	Ácido acético	200,12	25	1	6,62
203	Ácido acético	200,08	25	1	4,72
204	Ácido acético	200,04	25	1	3,62
205	Ácido acético	25,01	25	3	8,88
206	Ácido acético	25,00	25	3	8,32
207	Ácido acético	25,01	25	3	10,56
208	Ácido acético	50,06	25	3	11,75
209	Ácido acético	50,04	25	3	9,79
210	Ácido acético	50,02	25	3	6,52
211	Ácido acético	100,02	25	3	3,16
212	Ácido acético	100,04	25	3	5,88
213	Ácido acético	100,00	25	3	4,10
214	Ácido acético	200,08	25	3	7,70
215	Ácido acético	200,12	25	3	4,32
216	Ácido acético	200,08	25	3	5,54
217	Ácido acético	25,01	60	1	7,88

218	Ácido acético	25,02	60	1	8,31
219	Ácido acético	25,01	60	1	14,43
220	Ácido acético	50,06	60	1	10,87
221	Ácido acético	50,02	60	1	8,16
222	Ácido acético	50,02	60	1	12,55
223	Ácido acético	100,02	60	1	8,82
224	Ácido acético	100,04	60	1	4,36
225	Ácido acético	100,02	60	1	5,92
226	Ácido acético	200,16	60	1	4,18
227	Ácido acético	200,08	60	1	5,28
228	Ácido acético	200,04	60	1	6,24
229	Ácido acético	25,02	60	3	7,07
230	Ácido acético	25,01	60	3	18,59
231	Ácido acético	25,03	60	3	35,84
232	Ácido acético	50,02	60	3	13,11
233	Ácido acético	50,00	60	3	11,36
234	Ácido acético	50,06	60	3	9,75
235	Ácido acético	100,06	60	3	11,07
236	Ácido acético	100,06	60	3	9,43
237	Ácido acético	100,08	60	3	8,75
238	Ácido acético	200,12	60	3	7,12
239	Ácido acético	200,04	60	3	6,02
240	Ácido acético	200,12	60	3	6,56
241	Ácido acético	25,09	90	1	87,21
242	Ácido acético	25,04	90	1	86,42
243	Ácido acético	25,00	90	1	89,64
244	Ácido acético	50,12	90	1	90,98
245	Ácido acético	50,08	90	1	81,59
246	Ácido acético	50,10	90	1	81,32
247	Ácido acético	100,10	90	1	86,09
248	Ácido acético	100,08	90	1	82,35
249	Ácido acético	100,10	90	1	88,49
250	Ácido acético	200,08	90	1	69,53
251	Ácido acético	200,20	90	1	73,69
252	Ácido acético	200,16	90	1	71,72
253	Ácido acético	25,05	90	3	90,14
254	Ácido acético	25,00	90	3	86,96
255	Ácido acético	25,00	90	3	87,88
256	Ácido acético	50,00	90	3	76,52
257	Ácido acético	50,04	90	3	73,30

258	Ácido acético	50,10	90	3	74,01
259	Ácido acético	100,10	90	3	74,43
260	Ácido acético	100,00	90	3	73,98
261	Ácido acético	100,10	90	3	73,41
262	Ácido acético	200,16	90	3	69,42
263	Ácido acético	200,20	90	3	67,69
264	Ácido acético	200,16	90	3	67,21
265	Ácido acético	25,01	110	1	88,48
266	Ácido acético	25,03	110	1	85,42
267	Ácido acético	25,02	110	1	86,89
268	Ácido acético	50,10	110	1	88,02
269	Ácido acético	50,02	110	1	82,13
270	Ácido acético	50,10	110	1	87,82
271	Ácido acético	100,02	110	1	86,22
272	Ácido acético	100,02	110	1	85,48
273	Ácido acético	100,04	110	1	83,89
274	Ácido acético	200,04	110	1	75,16
275	Ácido acético	200,08	110	1	73,39
276	Ácido acético	200,04	110	1	72,43
277	Ácido acético	25,01	110	3	88,08
278	Ácido acético	25,01	110	3	85,89
279	Ácido acético	25,00	110	3	88,92
280	Ácido acético	50,02	110	3	82,21
281	Ácido acético	50,06	110	3	80,02
282	Ácido acético	50,02	110	3	79,21
283	Ácido acético	100,10	110	3	77,80
284	Ácido acético	100,02	110	3	82,42
285	Ácido acético	100,04	110	3	79,43
286	Ácido acético	200,12	110	3	67,34
287	Ácido acético	200,08	110	3	72,89
288	Ácido acético	200,20	110	3	74,05
289	Acetato de Butilo	25,01	25	1	7,12
290	Acetato de Butilo	25,01	25	1	2,56
291	Acetato de Butilo	25,03	25	1	4,12
292	Acetato de Butilo	50,08	25	1	5,47
293	Acetato de Butilo	50,02	25	1	8,44
294	Acetato de Butilo	50,00	25	1	5,72
295	Acetato de Butilo	100,02	25	1	2,78
296	Acetato de Butilo	100,08	25	1	7,85
297	Acetato de Butilo	100,02	25	1	2,64

298	Acetato de Butilo	200,08	25	1	5,88
299	Acetato de Butilo	200,08	25	1	4,52
300	Acetato de Butilo	200,04	25	1	2,38
301	Acetato de Butilo	25,01	25	3	6,44
302	Acetato de Butilo	25,01	25	3	1,72
303	Acetato de Butilo	25,00	25	3	3,76
304	Acetato de Butilo	50,10	25	3	6,71
305	Acetato de Butilo	50,00	25	3	2,80
306	Acetato de Butilo	50,02	25	3	5,12
307	Acetato de Butilo	100,02	25	3	7,12
308	Acetato de Butilo	100,02	25	3	4,18
309	Acetato de Butilo	100,00	25	3	3,22
310	Acetato de Butilo	200,00	25	3	3,18
311	Acetato de Butilo	200,08	25	3	5,38
312	Acetato de Butilo	200,20	25	3	1,82
313	Acetato de Butilo	25,02	60	1	9,51
314	Acetato de Butilo	25,02	60	1	3,88
315	Acetato de Butilo	25,01	60	1	9,44
316	Acetato de Butilo	50,06	60	1	6,59
317	Acetato de Butilo	50,06	60	1	7,67
318	Acetato de Butilo	50,00	60	1	5,20
319	Acetato de Butilo	100,02	60	1	8,78
320	Acetato de Butilo	100,06	60	1	8,20
321	Acetato de Butilo	100,08	60	1	9,21
322	Acetato de Butilo	200,16	60	1	8,29
323	Acetato de Butilo	200,12	60	1	7,00
324	Acetato de Butilo	200,16	60	1	7,91
325	Acetato de Butilo	25,02	60	3	12,23
326	Acetato de Butilo	25,02	60	3	8,15
327	Acetato de Butilo	25,00	60	3	8,80
328	Acetato de Butilo	50,00	60	3	9,96
329	Acetato de Butilo	50,00	60	3	11,84
330	Acetato de Butilo	50,08	60	3	12,18
331	Acetato de Butilo	100,04	60	3	6,86
332	Acetato de Butilo	100,10	60	3	8,83
333	Acetato de Butilo	100,00	60	3	10,24
334	Acetato de Butilo	200,08	60	3	9,40
335	Acetato de Butilo	200,00	60	3	11,40
336	Acetato de Butilo	200,04	60	3	11,24
337	Acetato de Butilo	25,01	90	1	7,36

338	Acetato de Butilo	25,02	90	1	6,95
339	Acetato de Butilo	25,02	90	1	7,87
340	Acetato de Butilo	50,00	90	1	7,12
341	Acetato de Butilo	50,00	90	1	6,00
342	Acetato de Butilo	50,02	90	1	8,76
343	Acetato de Butilo	100,02	90	1	8,02
344	Acetato de Butilo	100,06	90	1	5,04
345	Acetato de Butilo	100,08	90	1	6,79
346	Acetato de Butilo	200,20	90	1	4,38
347	Acetato de Butilo	200,08	90	1	5,90
348	Acetato de Butilo	200,08	90	1	4,82
349	Acetato de Butilo	25,04	90	3	8,91
350	Acetato de Butilo	25,01	90	3	6,80
351	Acetato de Butilo	25,01	90	3	6,44
352	Acetato de Butilo	50,02	90	3	8,24
353	Acetato de Butilo	50,02	90	3	7,64
354	Acetato de Butilo	50,08	90	3	9,66
355	Acetato de Butilo	100,02	90	3	4,22
356	Acetato de Butilo	100,08	90	3	4,86
357	Acetato de Butilo	100,02	90	3	7,02
358	Acetato de Butilo	200,16	90	3	3,92
359	Acetato de Butilo	200,12	90	3	6,14
360	Acetato de Butilo	200,16	90	3	7,63
361	Acetato de Butilo	25,05	110	1	34,09
362	Acetato de Butilo	25,05	110	1	32,94
363	Acetato de Butilo	25,00	110	1	36,20
364	Acetato de Butilo	50,00	110	1	52,76
365	Acetato de Butilo	50,00	110	1	45,68
366	Acetato de Butilo	50,04	110	1	37,89
367	Acetato de Butilo	100,00	110	1	30,98
368	Acetato de Butilo	100,08	110	1	34,51
369	Acetato de Butilo	100,10	110	1	27,95
370	Acetato de Butilo	200,12	110	1	15,35
371	Acetato de Butilo	200,00	110	1	7,42
372	Acetato de Butilo	200,20	110	1	10,73
373	Acetato de Butilo	25,00	110	3	30,80
374	Acetato de Butilo	25,01	110	3	28,35
375	Acetato de Butilo	25,02	110	3	28,86
376	Acetato de Butilo	50,04	110	3	31,57
377	Acetato de Butilo	50,00	110	3	37,92

378	Acetato de Butilo	50,06	110	3	29,20
379	Acetato de Butilo	100,02	110	3	22,26
380	Acetato de Butilo	100,06	110	3	25,96
381	Acetato de Butilo	100,06	110	3	21,05
382	Acetato de Butilo	200,00	110	3	7,82
383	Acetato de Butilo	200,04	110	3	9,74
384	Acetato de Butilo	200,08	110	3	10,98

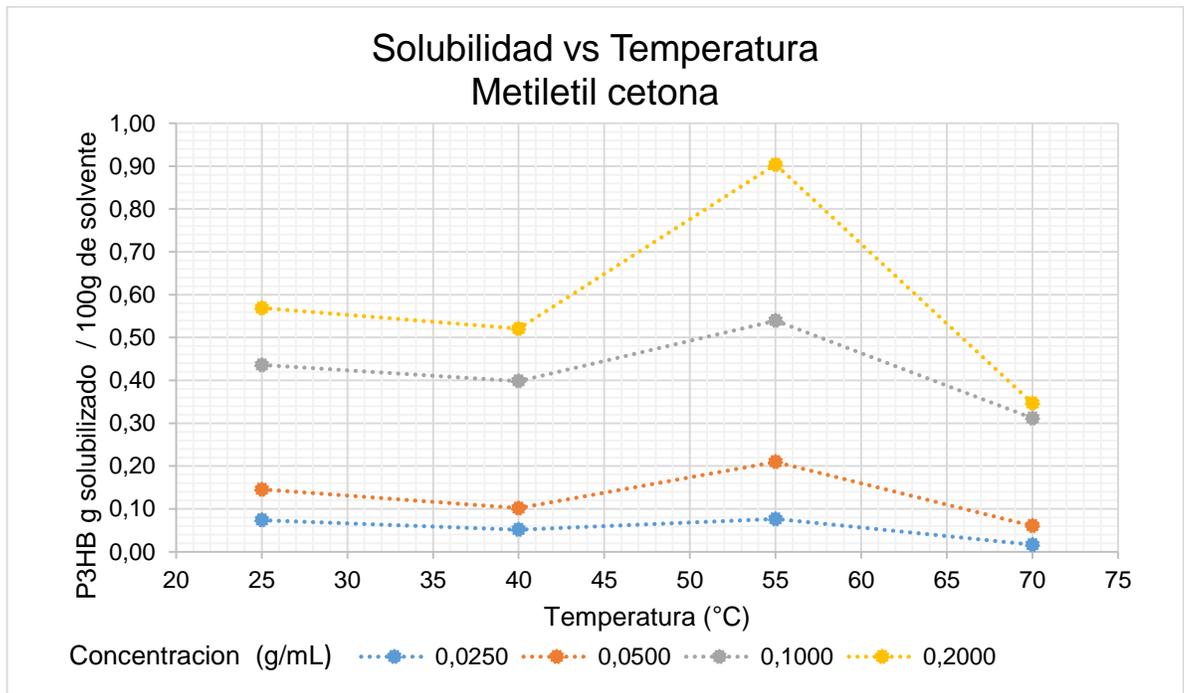
ANEXO C

GRAFICAS DE CURVAS DE SOLUBILIDAD ENTRE EL P3HB Y LOS SOLVENTES METILETIL CETONA, ACETATO DE ETILO, ACETATO DE BUTILO, ÁCIDO ACÉTICO Y CLOROFORMO A DIFERENTES CONCENTRACIONES (0,025, 0,500, 0,100, 0,200) g/mL EMPLEANDO 1 HORA DE AGITACION

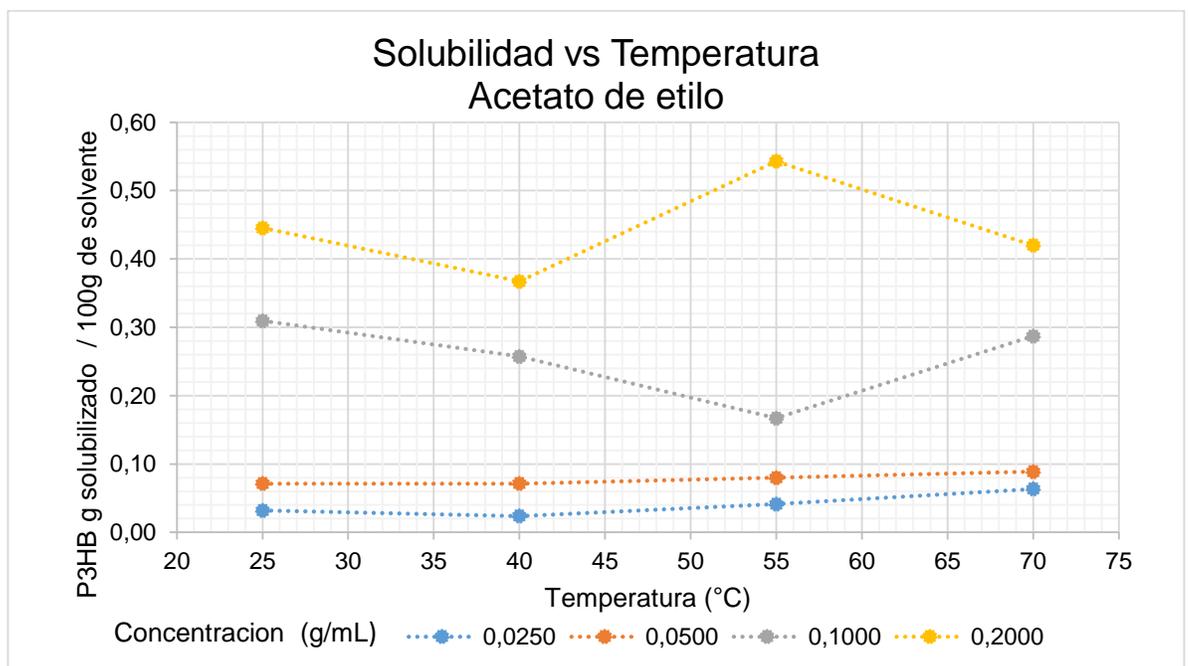
C.1 TABLA DE LOS DATOS DE SOLUBILIDAD (g de P3HB solubilizado por 100g de solvente) PARA LOS SOLVENTES METILETIL CETONA Y ACETATO DE ETILO

Condiciones			P3HB solubilizado (g)		Solubilidad (g de P3HB por 100g de solvente)	
Tiempo de agitación (h)	Temperatura (°C)	Concentración (g/mL)	Metiletil cetona	Acetato de etilo	Metiletil cetona	Acetato de etilo
1	25	0,0250	0,0234	0,0115	0,074	0,032
1	40	0,0250	0,0164	0,0085	0,052	0,024
1	55	0,0250	0,0242	0,0148	0,077	0,041
1	70	0,0250	0,0052	0,0227	0,017	0,063
1	25	0,0500	0,0230	0,0128	0,146	0,071
1	40	0,0500	0,0161	0,0128	0,102	0,071
1	55	0,0500	0,0332	0,0143	0,210	0,080
1	70	0,0500	0,0096	0,0159	0,061	0,089
1	25	0,1000	0,0344	0,0277	0,436	0,309
1	40	0,1000	0,0315	0,0230	0,398	0,257
1	55	0,1000	0,0426	0,0149	0,540	0,167
1	70	0,1000	0,0246	0,0257	0,312	0,287
1	25	0,2000	0,0225	0,0199	0,569	0,445
1	40	0,2000	0,0206	0,0164	0,521	0,367
1	55	0,2000	0,0357	0,0243	0,904	0,543
1	70	0,2000	0,0137	0,0188	0,347	0,420

C.2.1 CURVA DE SOLUBILIDAD en función de la temperatura para el metiletil cetona a diferentes concentraciones (0,025, 0,500, 0,100, 0,200) g/mL



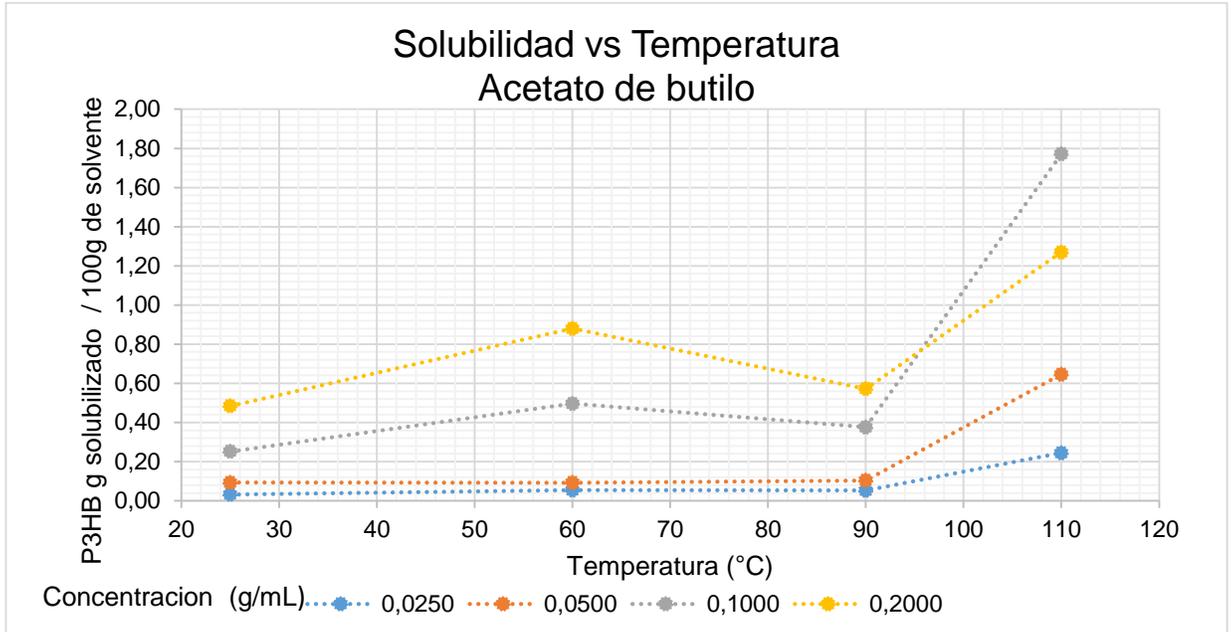
C.2.2 CURVA DE SOLUBILIDAD en función de la temperatura para el acetato de etilo a diferentes concentraciones (0,025, 0,500, 0,100, 0,200) g/mL.



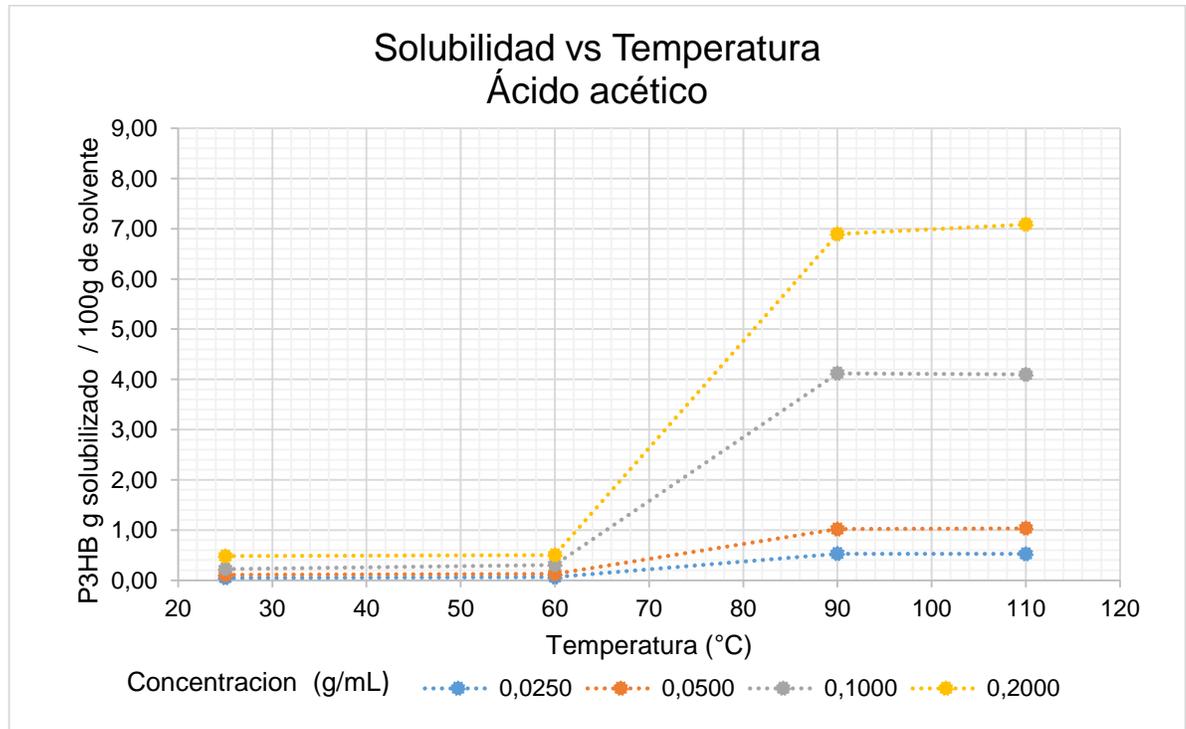
C.3. TABLA DE LOS DATOS DE SOLUBILIDAD (g de P3HB solubilizado por 100g de solvente) PARA LOS SOLVENTES ACETATO DE BUTILO Y ÁCIDO ACÉTICO

Condiciones			P3HB solubilizado (g)		Solubilidad (g de P3HB por 100g de solvente)	
Tiempo de agitación (h)	Temperatura (°C)	Concentración (g/mL)	Acetato de butilo	Ácido acético	Acetato de butilo	Ácido acético
1	25	0,0250	35,20	41,60	0,033	0,046
1	60	0,0250	35,20	41,60	0,054	0,061
1	90	0,0250	35,20	41,60	0,053	0,528
1	110	0,0250	35,20	41,60	0,245	0,523
1	25	0,0500	17,60	20,80	0,093	0,106
1	60	0,0500	17,60	20,80	0,092	0,127
1	90	0,0500	17,60	20,80	0,104	1,019
1	110	0,0500	17,60	20,80	0,646	1,035
1	25	0,1000	8,80	10,40	0,252	0,224
1	60	0,1000	8,80	10,40	0,496	0,306
1	90	0,1000	8,80	10,40	0,376	4,121
1	110	0,1000	8,80	10,40	1,771	4,097
1	25	0,2000	4,40	5,20	0,484	0,479
1	60	0,2000	4,40	5,20	0,880	0,503
1	90	0,2000	4,40	5,20	0,572	6,894
1	110	0,2000	4,40	5,20	1,270	7,085

B.3.1 CURVA DE SOLUBILIDAD en función de la temperatura para el acetato de butilo a diferentes concentraciones (0,025, 0,500, 0,100, 0,200) g/mL



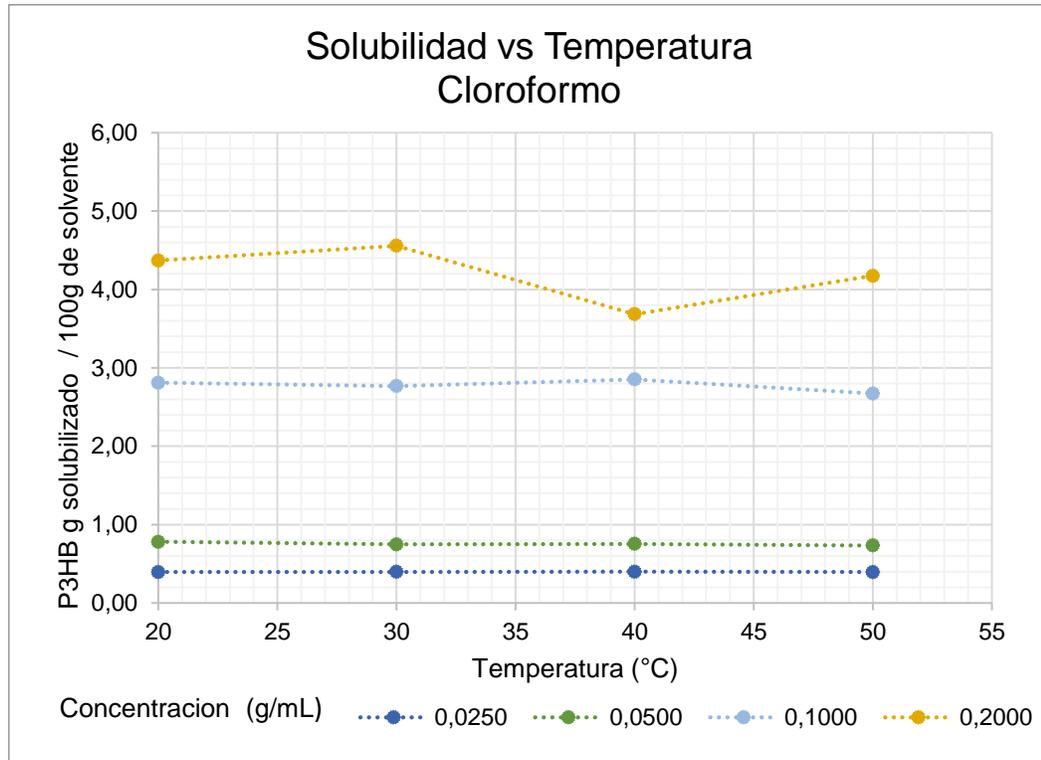
C.3.2 CURVA DE SOLUBILIDAD en función de la temperatura para el ácido acético a diferentes concentraciones (0,025, 0,500, 0,100, 0,200) g/mL



B.4 TABLA DE LOS DATOS DE SOLUBILIDAD (g de P3HB solubilizado por 100g de solvente) PARA EL SOLVENTE CLOROFORMO

Tiempo de agitación (h)	Temperatura (°C)	Concentración (g/mL)	P3HB solubilizado (g)	Solubilidad (g de P3HB por 100g de solvente)
1	20	0,0250	0,2353	0,395
1	30	0,0250	0,2374	0,398
1	40	0,0250	0,2388	0,401
1	50	0,0250	0,2358	0,396
1	20	0,0500	0,2328	0,781
1	30	0,0500	0,2234	0,750
1	40	0,0500	0,2246	0,754
1	50	0,0500	0,2187	0,734
1	20	0,1000	0,4189	2,811
1	30	0,1000	0,4124	2,768
1	40	0,1000	0,4251	2,853
1	50	0,1000	0,3982	2,673
1	20	0,2000	0,3255	4,370
1	30	0,2000	0,3395	4,557
1	40	0,2000	0,2745	3,685
1	50	0,2000	0,3110	4,174

C.4.1 CURVA DE SOLUBILIDAD en función de la temperatura para el cloroformo a diferentes concentraciones (0,025, 0,500, 0,100, 0,200) g/mL



Cálculos:

Constantes empleadas:

Solventes	Densidad (ρ) g/mL
Acetato de etilo	0,90
Acetato de butilo	0,88
Ácido acético	1,04
Cloroformo	1,49
Metiletil cetona	0,79

Para 1 gramo de P3HB se emplearon los diferentes volúmenes, concentraciones y la cantidad en gramos de cada solvente empleado

Condiciones		Solventes			
Concentración (g/mL)	Volumen inicial (V _o) mL	Acetato de butilo (g)	Acetato de etilo (g)	Ácido acético (g)	Cloroformo (g)
0,025	40	35,20	35,80	41,60	59,60
0,050	20	17,60	17,90	20,80	29,80
0,100	10	8,80	8,95	10,40	14,90
0,200	5	4,40	4,48	5,20	7,45

Para determinar el volumen por cada gramo de P3HB se empleó la siguiente relación:

$$V_o \text{ de solvente (mL)} = \frac{1 \text{ g}}{\text{Concentracion (g/mL)}}$$

Para calcular la masa (g) de cada solvente:

$$\text{masa de solvente (g)} = \rho_{\text{solvente}} \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) * V_o \text{ de solvente (mL)}$$

Se determina la cantidad de P3HB solubilizado, con los porcentajes de recuperación que se obtiene del método para determinar la solubilidad del P3HB en diferentes solventes orgánicos

$$P3HB \text{ retenido (g)} = P3HB \text{ inicial (g)} - \left[\frac{(\% \text{ solubilidad})_{C,t,T,Solv}}{100} * P3HB \text{ inicial (g)} \right]$$

$$P3HB \text{ solubilizado (g)} = P3HB \text{ inicial (g)} - P3HB \text{ retenido (g)}$$

La solubilidad se calcula en unidades (g P3HB x 100 g de Solvente)

$$\text{Solubilidad} = \frac{P3HB \text{ solubilizado (g)} * 100 \text{ g solv}}{\text{masa de solvente (g)}}$$

Ejemplo del cálculo de la solubilidad (g P3HB x 100 g de Solvente) para el acetato de butilo a una concentración de 0,025 g/mL, 1 hora de agitación y 25 °C.

$$V_o \text{ de acetato de butilo (mL)} = \frac{1 \text{ g}}{0,025 \text{ g/mL}} = 40 \text{ mL}$$

$$\text{masa de solvente (g)} = 0,88 \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) * 40 \text{ (mL)} = 35,2 \text{ g}$$

$$\text{P3HB retenido (g)} = 0,2500 \text{ g} - \left[\frac{4,60}{100} * 0,2500 \text{ g} \right] = 0,2385 \text{ g}$$

$$\text{P3HB solubilizado (g)} = 0,2500 \text{ g de P3HB} - 0,2385 \text{ g de P3HB}_r = 0,0115 \text{ g}$$

$$\text{Solubilidad} = \frac{0,0115 \text{ g} * 100 \text{ g de solv}}{35,20 \text{ g}} = 0,032$$

$$\text{Solubilidad (g de P3HB por 100g de solvente)} = 0,032$$

ANEXO D

CALCULOS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL PROGRAMA ESTADISTICO MINITAB 18.1® PARA EL DISEÑO EXPERIMENTAL. ANOVA

Fuente de variación	GL	SC	CM	P	Respuesta Ho para P
A	3	0,1820	0,06068	0,003	Rechaza
B	1	0,0059	0,00594	0,499	Acepta
C	3	3,7674	1,25579	0,000	Rechaza
D	3	7,7644	2,58812	0,000	Rechaza
AB	3	0,0408	0,01360	0,371	Acepta
AC	9	0,0965	0,01072	0,591	Acepta
AD	9	0,3209	0,03566	0,004	Rechaza
BC	3	0,0211	0,00703	0,653	Acepta
BD	3	0,0061	0,00204	0,925	Acepta
CD	9	7,7997	0,86664	0,000	Rechaza
ABC	9	0,0366	0,00407	0,970	Acepta
ABD	9	0,0500	0,00555	0,919	Acepta
ACD	27	0,4571	0,01693	0,149	Acepta
BCD	9	0,0352	0,00391	0,974	Acepta
Error	254	3,2906	0,01296		
TOTAL	38	23,999			

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Concentración	4	1. 2. 3. 4
Tiempo	2	1. 2
Temperatura	4	1. 2. 3. 4
Tipo de solvente	4	Metiletil cetona. Acetato de etilo. Acetato de Butilo. Ácido acético

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.
Modelo	129	20,7083	86,29%	20,7083
Bloques	2	0,0000	0,00%	0,0000
Lineal	10	11,7197	48,83%	11,7197
Concentración	3	0,1820	0,76%	0,1820
Tiempo	1	0,0059	0,02%	0,0059
Temperatura	3	3,7674	15,70%	3,7674
Tipo de solvente	3	7,7644	32,35%	7,7644
Interacciones de 2 términos	36	8,2852	34,52%	8,2852
Concentración*Tiempo	3	0,0408	0,17%	0,0408
Concentración*Temperatura	9	0,0965	0,40%	0,0965
Concentración*Tipo de solvente	9	0,3209	1,34%	0,3209
Tiempo*Temperatura	3	0,0211	0,09%	0,0211
Tiempo*Tipo de solvente	3	0,0061	0,03%	0,0061
Temperatura*Tipo de solvente	9	7,7997	32,50%	7,7997
Interacciones de 3 términos	54	0,5789	2,41%	0,5789
Concentración*Tiempo*Temperatura	9	0,0366	0,15%	0,0366
Concentración*Tiempo*Tipo de solvente	9	0,0500	0,21%	0,0500
Concentración*Temperatura*Tipo de solvente	27	0,4571	1,90%	0,4571
Tiempo*Temperatura*Tipo de solvente	9	0,0352	0,15%	0,0352
Interacciones de 4 términos	27	0,1245	0,52%	0,1245
Concentración*Tiempo*Temperatura*Tipo de solvente	27	0,1245	0,52%	0,1245
Error	254	3,2906	13,71%	3,2906
Total	383	23,9990	100,00%	

Fuente	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	0,16053	12,39	0,000
Bloques	0,00001	0,00	0,999
Lineal	1,17197	90,46	0,000

Concentración	0,06068	4,68	0,003
Tiempo	0,00594	0,46	0,499
Temperatura	1,25579	96,93	0,000
Tipo de solvente	2,58812	199,77	0,000
Interacciones de 2 términos	0,23014	17,76	0,000
Concentración*Tiempo	0,01360	1,05	0,371
Concentración*Temperatura	0,01072	0,83	0,591
Concentración*Tipo de solvente	0,03566	2,75	0,004
Tiempo*Temperatura	0,00703	0,54	0,653
Tiempo*Tipo de solvente	0,00204	0,16	0,925
Temperatura*Tipo de solvente	0,86664	66,89	0,000
Interacciones de 3 términos	0,01072	0,83	0,796
Concentración*Tiempo*Temperatura	0,00407	0,31	0,970
Concentración*Tiempo*Tipo de solvente	0,00555	0,43	0,919
Concentración*Temperatura*Tipo de solvente	0,01693	1,31	0,149
Tiempo*Temperatura*Tipo de solvente	0,00391	0,30	0,974
Interacciones de 4 términos	0,00461	0,36	0,999
Concentración*Tiempo*Temperatura*Tipo de solvente	0,00461	0,36	0,999
Error	0,01296		
Total			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)
0,113821	86,29%	79,32%	7,52100	68,66%

Optimización de respuesta: Vrta

Parámetros

Respuesta	Meta	Inferior	Objetivo	Superior	Ponderación	Importancia
Vrta Solución	Máximo	0,0091816	0,909816		1	1

Solución	Concentración	Tiempo	Temperatura	Tipo de solvente	Vrta Ajuste	Deseabilidad compuesta
1	2	1	4	Ácido acético	0,859918	0,944597

Predicción de respuesta múltiple

Variable	Valor de configuración
Concentración	2
Tiempo	1
Temperatura	4
Tipo de solvente	Ácido acético

Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	IP de 95%
Vrta	0,8599	0,0657	(0,7305. 0,9893)	(0,6011. 1,1187)

ANEXO E

RESULTADOS DEL RENDIMIENTO DE RECUPERACION

E.1 TABLA DE LOS DATOS OBTENIDOS PARA LAS DIFERENTES BIOMASA

Datos	Solventes			
	Cloroformo		Ácido acético	
	I	II	I	II
Biomasa seca inicial (g)	4,0060	4,0003	4,0080	4,0060
P3HB recuperado (g)	2,4509	2,3347	2,1785	2,2131
Rendimiento (% p/p)	61,2	58,4	54,4	55,2

E.2 CUADRO DE LOS DATOS PROMEDIO DE RECUPERACION DE LA BIOMASA SECA CON Y SIN SDS PARA EL P3HB RECUPERADO CON LOS SOLVENTES ÁCIDO ACÉTICO Y CLOROFORMO.

Datos	Solvente	
	Cloroformo	Ácido acético
Biomasa seca inicial (g)	4,0032	4,0070
P3HB recuperado (g)	2,3928	2,1958
Rendimiento (% p/p)	59,77 ± 1,41	55 ± 0,45

Cálculos:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{promedio peso del P3HB extraído}}{\text{promedio peso de biomasa seca}} * 100$$

Ejemplo del cálculo del rendimiento del P3HB recuperado con cloroformo.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\left(\frac{2.4509 \text{ g} + 2.3347 \text{ g}}{2}\right)}{\left(\frac{4.0060 \text{ g} + 4.0003 \text{ g}}{2}\right)} * 100 = 59.77 \%$$

ANEXO F
PESO MOLECULAR DEL PHA

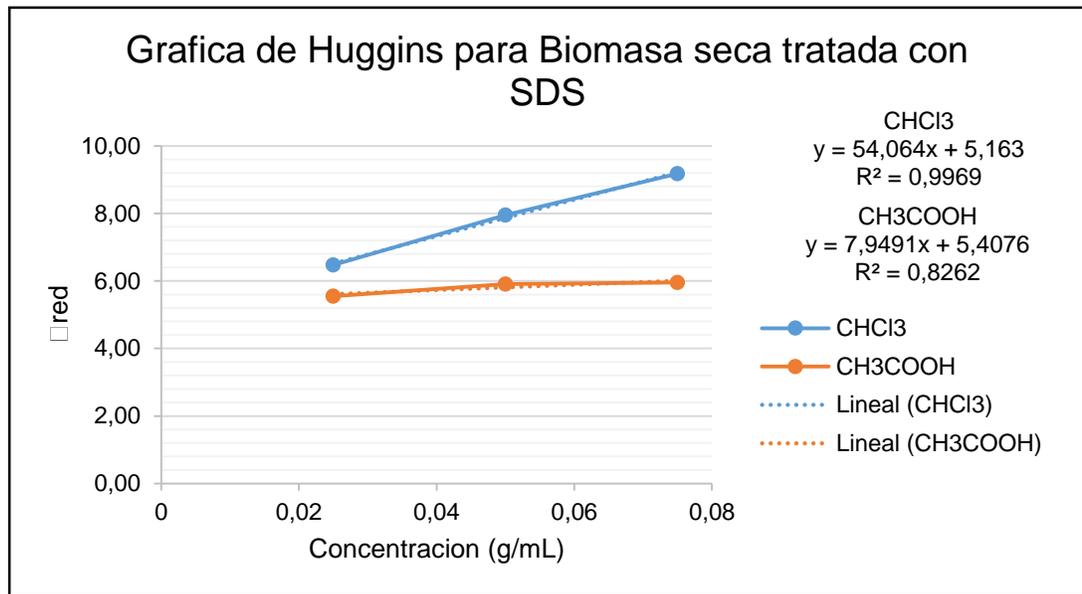
Constantes empleadas:

ρ Cloroformo (g/mL)	1,49
K_{Huggins} (dL/g)	$1,18 \times 10^{-3}$
α_{Huggins}	0,78

F.2. PESO MOLECULAR VISCOSIMETRICO PARA EL PHA OBTENDIO CON ÁCIDO ACÉTICO Y CLOROFORMO.

Concentración (g/mL)	Biomasa tratada con SDS.	
	Recuperado con	
	Cloroformo tiempo (s)	Ácido acético tiempo (s)
Cloroformo puro	234,49	208,44
0,025	272,42	237,38
0,05	327,74	270,03
0,075	395,83	301,47

Concentración (g/mL)	Biomasa tratada con SDS.			
	Cloroformo		Ácido acético	
	η_{sp}	η_{red}	η_{ps}	η_{red}
Cloroformo puro	0,00	N/A	310,57	N/A
0,025	0,16	6,471	353,69	5,554
0,05	0,40	7,954	402,35	5,910
0,075	0,69	9,174	449,19	5,951



Tipo de solvente	η	Mv
CHCl3	5,1630	891303,9
CH3COOH	5,4076	945797,5

Cálculos:

$$\eta_{sp} = \frac{\frac{\text{tiempo en solucion}}{\rho_{\text{Cloroformo}}}}{\frac{\text{tiempo del solvente puro}}{\rho_{\text{Cloroformo}}}} - 1$$

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k[\eta]^2 c$$

$$[\eta] = 1,18 \times 10^{-4} M_v^{0,78}$$

Ejemplo del cálculo del peso molecular para la biomasa seca tratada con SDS y recuperado con cloroformo.

$$\eta_{sp} = \frac{272,42 \text{ s}}{234,49 \text{ s}} - 1 = 0,1617$$

$$\frac{0,1617}{0,025 \text{ g/mL}} = [\eta] + k[\eta]^2 * (0,025 \text{ g/mL})$$

$$5,1630 \frac{\text{mL}}{\text{g}} = 1,18 \times 10^{-3} \frac{\text{mL}}{\text{g}} M_v^{0,78}$$

$$M_v = \left(\frac{5,1630 \text{ dL/g}}{1,18 \times 10^{-3} \text{ dL/g}} \right)^{\frac{1}{0,78}} = 46555,9 \text{ Da}$$