

**APROVECHAMIENTO DEL RESIDUO AGROINDUSTRIAL GLICEROL PARA LA
PRODUCCIÓN DE TERMOPLÁSTICOS MEDIANTE FERMENTACIÓN
MICROBIANA**

**DANIEL ESTEBAN BERNAL GUARIN
LAURA CAMILA VILLABONA LOZADA**

**Proyecto de grado para optar al título de:
INGENIERO QUÍMICO**

**DIRECTOR
DAVID LEONARDO SOTELO TOBON
QUÍMICO**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D. C.**

2023

NOTA DE ACEPTACIÓN

David Leonardo Sotelo Tobon

Firma del director

Firma docente jurado 1

Firma docente jurado 2

Bogotá D. C. Junio del 2023

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector de Claustro.

Dr. MARIO POSADA GARCÍA PEÑA.

Consejero institucional

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA PEÑA.

Vicerrectora Académica y de Investigaciones.

Dra. ALEXANDRA MEJÍA GUZMÁN.

Vicerrector Administrativo y Financiero.

Dr. RICARDO ALFONSO PEÑARANDA CASTRO.

Secretario general

Dr. JOSÉ LUIS MACÍAS RODRÍGUEZ.

Decana de Facultad de Ingenierías.

Dra. NALINY PATRICIA GUERRA PRIETO.

Director Programa de Ingeniería Química.

Dra. NUBIA LILIANA BECERRA OSPINA.

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

A nuestras familias por darnos la oportunidad de estar donde estamos en este momento, a pocas semanas de obtener nuestro título como profesionales, por siempre creer en nuestro potencial y estar para nosotros en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, se quiere hacer mención y dar nuestros más sinceros agradecimientos a la Universidad de América por disponer de los laboratorios y todos los equipos necesarios para el desarrollo de este proyecto, de igual manera a todas las personas encargadas del laboratorio, por su colaboración y amabilidad. Al director del trabajo de grado, David Sotelo, por su acompañamiento a lo largo del desarrollo y por último, a la profesora Adriana Suesca, por su ayuda y seguimiento en la fase experimental, guiándonos y apoyándonos para un correcto manejo del microorganismo utilizado.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
OBJETIVOS	17
Objetivo General	_ 17
Objetivos Específicos	_ 17
1. MARCO REFERENCIAL	18
1.1. Marco teórico	18
1.1.1. Combustibles fósiles	18
1.1.2. Biodiesel	20
1.1.3. Proceso de producción	25
1.1.4. Glicerol	28
1.1.5. Origen del plástico	31
1.1.6. Problemáticas ambientales	32
1.1.7. Tipos de plásticos	34
1.1.8. Tipos de degradación del plástico	36
1.1.9. Polímeros biodegradables	37
1.1.10. Polihidroxicanoatos	37
1.1.11. Microorganismos	42
1.1.12. Bacterias	42
1.1.13. Microorganismos productores de PHB	43
1.1.14. Bacillus Megaterium	43
1.1.15. Cupriavidus necator	43
1.2. Marco Legal	44
1.2.1. Combustibles fósiles	44
1.2.2. Biodiesel	45
1.2.3. Plásticos	45
1.2.4. Microorganismos	45
1.2.5. Polihidroxicanoatos	46
2. METODOLOGÍA Y RESULTADOS	47
2.1. Objetivo 1	47
2.1.1. Metodología	47

2.1.2.	Resultados	66
2.2.	Objetivo 2	66
2.2.1.	Metodología	66
2.2.2.	Resultados	72
2.3.	Objetivo 3	73
2.3.1.	Metodología	73
2.3.2.	Resultados	74
2.4.	Objetivo 4	81
2.4.1.	Metodología	81
2.4.2.	Resultados	84
3.	ANÁLISIS Y DISCUSIONES	89
3.1.	Análisis de cada uno de los objetivos	89
3.1.1.	Objetivo 1	89
3.1.2.	Objetivo 2	90
3.1.3.	Objetivo 3	92
3.1.4.	Objetivo 4	107
3.2.	Conclusiones	108
	BIBLIOGRAFÍA	112
	ANEXOS	124

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Producción histórica de petróleo (BOPD)	19
Figura 2. Demanda nacional de Biodiesel	21
Figura 3. Evolución histórica mensual de la producción de aceite por zona	23
Figura 4. Evolución histórica de la producción de aceite	24
Figura 5. Diagrama de bloques para la obtención de biodiesel	25
Figura 6. Diagrama de Flujo de Proceso para la obtención de Biodiesel	26
Figura 7. Reacción de Transesterificación	27
Figura 8. Reacción de Neutralización	27
Figura 9. Aplicaciones de mercado del glicerol	30
Figura 10. Estructura general de los polihidroxialcanoatos	38
Figura 11. Clasificación de los PHA según su composición monomérica	39
Figura 12. Métodos de producción de los PHA	41
Figura 13. Oxidación del glicerol por el metaperyodato de sodio	48
Figura 14. Características técnicas del Glicerol Crudo BioD	50
Figura 15. Reacción acidificación empleando ácido fosfórico como catalizador	51
Figura 16. Glicerol crudo BioD	52
Figura 17. Acidificación glicerol crudo	52
Figura 18. Neutralización de la mezcla mediante titulación	53
Figura 19. Filtración de la mezcla	53
Figura 20. Montaje de destilación simple	54
Figura 21. Proceso de decoloración	55
Figura 22. Comparación del Glicerol crudo Bio D con el Glicerol Crudo BioD purificado	55
Figura 23. Medios formulados en preparación con distintas concentraciones de fuente de carbono.	57
Figura 24. Medios formulados autoclavados	58
Figura 25. Montaje de fermentación.	58
Figura 26. Montaje de fermentación en ausencia de luz	59
Figura 27. Biomasa seca	60
Figura 28. Biomasa precipitada	61
Figura 29. Proceso de digestión en Shaker Heidolph	61
Figura 30. Proceso de decantación de la mezcla a partir de la digestión	62
Figura 31. PHB con cloroformo precipitado	62
Figura 32. Evaporación del cloroformo	63
Figura 33. PHB en polvo	64
Figura 34. PHB estructurado	65
Figura 35. Matriz de selección cualitativa	67
Figura 36. Rotulo de la bacteria con su respectivo ATCC	69
Figura 37. KWIK – STIK	69
Figura 38. Agar nutritivo	70

Figura 39. Agar tríptico de soya	70
Figura 40. Vista microscópica de bacterias	71
Figura 41. Preinóculo de bacteria	72
Figura 42. Film adherente y PHB obtenido experimentalmente	82
Figura 43. Film adherente y PHB obtenido experimentalmente	82
Figura 44. Prueba solubilidad – Tiempo = 0 horas.	84
Figura 45. Prueba solubilidad – Tiempo = 12 horas.	84
Figura 46. Prueba solubilidad – Tiempo = 24 horas.	85
Figura 47. Prueba solubilidad – Tiempo = 36 horas.	85
Figura 48. Prueba solubilidad – Tiempo = 48 horas	85
Figura 49. Prueba solubilidad – Tiempo = 60 horas	86
Figura 50. Prueba degradabilidad – Tiempo = 0 horas.	86
Figura 51. Prueba degradabilidad – Tiempo = 12 horas.	86
Figura 52. Prueba degradabilidad – Tiempo = 24 horas	87
Figura 53. Prueba degradabilidad – Tiempo = 36 horas.	87
Figura 54. Prueba degradabilidad – Tiempo = 48 horas.	87
Figura 55. Prueba degradabilidad – Tiempo = 60 horas.	88
Figura 56. Cantidad de biomasa húmeda y seca producida	93
Figura 57. Cantidad de biomasa seca producida en cada fermentación	94
Figura 58. Cantidad de biomasa seca producida en cada fermentación	95
Figura 59. Gráfica de efectos principales para Y = Biomasa Seca (g)	97
Figura 60. Gráfica de interacción para Y = rendimiento (%)	98
Figura 61. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.	100
Figura 62. Gráfica de efectos principales para Y = rendimiento (%).	103
Figura 63. Gráfica de interacción para Y = rendimiento (%).	104
Figura 64. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.	106

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Histórico de capacidad instalada	22
Tabla 2. Lista de Equipos y Condiciones de Operación para la Transesterificación de Aceite de Coco	28
Tabla 3. Propiedades del glicerol	31
Tabla 4. Nomenclatura de los PHA basado en la longitud y posición de la cadena lateral	38
Tabla 5. Principales nutrientes cuya limitación da lugar a la producción de PHA en diferentes microorganismos.	39
Tabla 6. Comparación propiedades físicas entre PHB y polipropileno	42
Tabla 7. Contenido del medio de cultivo formulado	56
Tabla 8. Contenido de los micronutrientes	57
Tabla 9. Matriz de selección cuantitativa	68
Tabla 10. Datos de la primera fermentación	74
Tabla 11. Datos de la segunda fermentación	75
Tabla 12. Datos de la tercera fermentación	75
Tabla 13. Datos de la cuarta fermentación	76
Tabla 14. Valores de biomasa húmeda y seca de la primera fermentación	77
Tabla 15. Valores de biomasa húmeda y seca de la segunda fermentación.	77
Tabla 16. Valores de biomasa húmeda y seca de la tercera fermentación.	78
Tabla 17. Valores de biomasa húmeda y seca de la cuarta fermentación.	78
Tabla 18. Valores de biomasa húmeda y seca de la segunda fermentación.	79
Tabla 19. Resultados obtenidos en el proceso de digestión	79
Tabla 20. Recopilación de resultados	80
Tabla 21. Condiciones prueba de Solubilidad	83
Tabla 22. Condiciones pruebas de Degradabilidad	83
Tabla 23. Diseño de experimentos condiciones de operación para la fermentación.	96
Tabla 24. Matriz de diseño condiciones de operación para la fermentación.	96
Tabla 25. Análisis de varianza diseño de experimentos condiciones de operación digestión.	99
Tabla 26. Diseño de experimentos condiciones de operación digestión	101
Tabla 27. Matriz de diseño condiciones de operación digestión.	101
Tabla 28. Coeficientes codificados diseño de experimentos condiciones de operación digestión.	102
Tabla 29. Análisis de varianza diseño de experimentos condiciones de operación digestión.	105

RESUMEN

El desarrollo de esta tesis se lleva a cabo con el fin de estudiar y determinar la viabilidad que tiene el aprovechamiento de un subproducto agroindustrial, como lo es el glicerol, para la producción de termoplásticos (PHB) mediante fermentación microbiana. El trabajo está compuesto por tres capítulos; en el primer capítulo, el cual comprende el marco referencial del trabajo, se habla acerca de la producción de Biodiesel en Colombia, iniciando con un poco de la historia de los hidrocarburos a nivel mundial, al igual que los problemas ambientales que se han generado y posibles alternativas, adicionalmente se considera en detalle el proceso de producción del Biodiesel con el fin de entender cómo se genera el subproducto de interés, glicerol, y comprender el potencial de uso que tiene debido a sus propiedades. Seguido de esto, se abarca el tema del plástico, su historia, la importancia que este tiene actualmente en la vida cotidiana del ser humano y las problemáticas con las que se enfrenta la humanidad en cuanto al uso de un material tan necesario, pero tan poco amigable con el medio ambiente. Por último, se habla acerca de los polihidroxicanoatos, como una alternativa a los plásticos sintéticos, donde se explica su origen, clases, características y producción. El segundo capítulo, el cual se compone de la metodología que fue abarcada a lo largo de la fase experimental de este trabajo al igual que los resultados obtenidos en el estudio de *Bacillus Megaterium* como microorganismo productor de PHB a partir de glicerol como única fuente de carbono. Finalmente, en el tercer capítulo se realiza la respectiva discusión y análisis de los resultados obtenidos, donde se da respuesta a cada uno de los objetivos planteados del proyecto.

INTRODUCCIÓN

La evolución del ser humano ha llevado a cabo grandes descubrimientos; avances científicos y tecnológicos, los cuales han generado una serie de beneficios en la mejora de la calidad de vida de la humanidad, así mismo en la solución de problemas de la sociedad. Sin embargo, dichos avances pese a que han facilitado la vida humana, no han sido del todo amenos con el medio ambiente y es por eso que en la actualidad uno de los temas de mayor interés en el mundo es, el cuidado del medio ambiente. Es responsabilidad de todos trabajar en pro de proteger el planeta, es por eso que en el año 2015 las naciones unidas adoptaron los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) como un llamado universal a la acción para poner fin a la pobreza, proteger el planeta y garantizar que para el año 2030 todas las personas disfruten de paz y prosperidad, los 17 objetivos planteados buscan dar a entender que el desarrollo debe equilibrar la sostenibilidad social, económica y ambiental.

En busca de aportar con el cumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible se planteó un cambio en el sistema de economía tradicional, el cual consistía en una economía lineal, donde, para la fabricación de un producto se consideraba la extracción de materia prima, la producción y por último se desechaba dicho producto sin tener en cuenta las huellas ambientales y consecuencias. Se propuso realizar una transición a la denominada economía circular, la cual propone un modelo de producción y consumo que garantiza un crecimiento sostenible con el tiempo. Donde se promulga la optimización de recursos, la reducción en el consumo de materias primas y el aprovechamiento de los residuos mediante reciclaje o dándoles una nueva vida para convertirlos en nuevos productos, actualmente varios países han realizado la transición o se encuentran en el proceso para adoptar este nuevo sistema económico, lo cual genera esperanza hacia un cambio en pro del cuidado del planeta [1] Sin embargo, Colombia aún tiene un largo recorrido por delante para lograr implementar este sistema económico, por lo cual existe la necesidad de generar propuestas que aporten en la transición del modelo económico adoptado en la actualidad por el país, lo cual se traduciría en progreso.

Basados en la problemática mencionada anteriormente, el agotamiento del petróleo y demás fuentes de carbón fósiles esenciales para la obtención de energía, existe un creciente uso de productos con bajo impacto ambiental en las actividades humanas, por lo cual en los últimos años se ha impulsado la producción de biocombustibles como una solución amigable con el medio

ambiente, ya que reduce notablemente las emisiones nocivas en su combustión [2]. Aunque los biocombustibles surgen como una solución a la problemática ambiental, se obtienen subproductos, los cuales pueden ser considerados residuos en dado caso de no encontrar una alternativa de uso, o se puede trabajar en el aprovechamiento de dicho residuo para la producción de un nuevo producto y así impulsar la economía circular. El proceso específico que se desea investigar es la producción de biodiesel, en el último año en Colombia se tuvo una demanda nacional de biodiesel de 700.000 toneladas, donde el 10 % de ese biocombustible equivale a un subproducto denominado glicerol o glicerina, lo que indica que en el proceso se obtiene 70.000 toneladas de subproducto por año, la glicerina cruda puede ser refinada y comercializada, pero el proceso de refinamiento presenta índices muy elevados de costo, por lo cual, en la mayoría de Biorrefinerías de Colombia se presenta acumulación de glicerol sin un aprovechamiento fructífero en el país, generándose pérdidas dentro del mismo y convirtiéndose así, en un residuo disponible [3]. Se plantea un proceso sostenible y económico que propone el aprovechamiento del glicerol para la obtención de un producto de alto valor agregado mediante fermentación microbiana.

Al momento de hablar de impacto ambiental, es inevitable pensar en el plástico ya que presenta una gran problemática ambiental debido a que no son biodegradables y pueden tardar cientos de años en degradarse convirtiéndose en una fuente significativa de contaminación ya que genera acumulación en grandes cantidades y adicionalmente en su proceso de producción hay altos consumos de energía y emisiones de CO₂. En el año 2021 Colombia consumió 1,4 millones de toneladas de plástico, de los cuales solo reciclo el 20 %. Alrededor de 770.000 toneladas corresponden a plásticos de uso corto y de esa cantidad por lo menos 38.500 toneladas tienen que ver con elementos de un solo uso [4], lo cual es realmente alarmante, porque adicionalmente son productos de vida útil demasiado corta. Por este motivo se desea investigar la posibilidad de realizar el aprovechamiento del glicerol para la obtención de termoplásticos aptos para sustituir plásticos sintéticos derivados del petróleo.

Debido a que el glicerol obtenido como subproducto en la elaboración de biodiesel presenta impurezas como agua, metanol, restos de catalizador, sales inorgánicas, ácidos grasos libres, metil esterres y residuos de materias primas el glicerol se considera útil en la elaboración de resinas, adhesivos, cosméticos, farmacéuticos productos de limpieza como limpiadores, detergentes, desinfectantes, producción de polímeros, como un aditivo para fertilizantes, y como una alternativa

para la producción de biogás y bioetanol ya que este requiere menores costos en su procesamiento, del mismo modo genera menores emisiones de gases de efecto invernadero en su producción [5].

La importancia de llevar a cabo este trabajo, radica principalmente en promover el desarrollo de Colombia considerando factores ambientales y socioeconómicos, debido al uso irresponsable que se da al plástico y la falta de conciencia en el país, dejando consecuencias más alarmantes para la vida humana.

Por lo cual, el verdadero problema está en la incorrecta manipulación que se les da a los plásticos de un solo uso, donde algunas alternativas de reducir el impacto ambiental son concientizando a las personas del daño que causa al medio ambiente tanto a corto como a largo plazo, así como estudios de nuevas tecnologías de aprovechamiento de residuos para producir plásticos biodegradables que se degraden más rápido en comparación con otros tipos; a su vez, lograr fomentar una transición en el modelo económico actual del país, de una economía lineal a una economía circular, generando una nueva vida útil a los denominados residuos. De esta manera, darles cumplimiento a los 4 objetivos de desarrollo sostenible correspondientes a trabajo decente y crecimiento económico, ciudades y comunidades sostenibles, producción y consumo responsable y, acción por el clima.

Por otro lado, el glicerol cuenta con propiedades fisicoquímicas que le permiten ser compatible con muchos productos químicos, y de ese modo ser empleado en varios procesos industriales, por lo cual al momento de almacenar este compuesto y destinarlo como un residuo se está perdiendo la oportunidad de destinar una nueva vida útil para la producción de productos de valor agregado beneficiosos para la vida humana, como lo puede ser, productos para la industria de alimentos, cosméticos, poliuretano, farmacéutica, resinas, entre otras. Al lograr llevar a cabo el aprovechamiento de un residuo agroindustrial, como lo es el glicerol, se lograría disminuir los impactos ambientales, al igual que proporcionar mayores oportunidades laborales, lo cual permitiría colaborar al País en la reducción de los índices de desempleo los cuales son bastante elevados.

Por lo cual, el rol del ingeniero químico se evidencia en las estrategias implementadas para realizar transformaciones físicas y químicas de cierta materia prima, queriendo convertirlas en un producto con alto valor agregado, donde se desean conocer condiciones de operación del proceso y realizar

una caracterización para el termoplástico biodegradable y contrastarla con un termoplástico convencional, permitiendo llevar a cabo el proyecto a gran escala.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la producción de termoplásticos biodegradables mediante el aprovechamiento del glicerol.

Objetivos Específicos

- Determinar la viabilidad del aprovechamiento del glicerol como materia prima para la producción de termoplásticos.
- Seleccionar el microorganismo que presente mejor adaptación al residuo agroindustrial al igual que las condiciones favorables para su crecimiento.
- Identificar las condiciones de operación en el proceso de producción de termoplásticos biodegradables mediante el aprovechamiento del glicerol.
- Comparar el termoplástico obtenido mediante el aprovechamiento de un residuo agroindustrial con el termoplástico convencional.

1. MARCO REFERENCIAL

1.1. Marco teórico

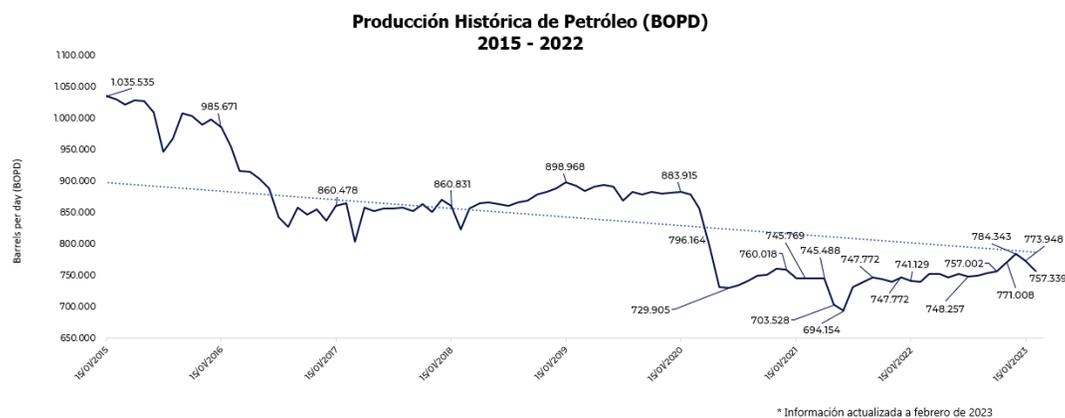
1.1.1. Combustibles fósiles

Los conocidos “combustibles fósiles” son plantas y otros organismos en descomposición, que han sido enterrados bajo capas de sedimentos y rocas que han tardado milenios en convertirse en los depósitos ricos en carbono. Estos combustibles no renovables, entre los cuales se encuentra, el carbón, el petróleo y el gas natural, suministran aproximadamente el 80 % de la energía mundial actual; proporcionan electricidad, calor, transporte y a su vez alimentan los procesos de fabricación de una gran variedad de productos utilizados en la vida cotidiana de la humanidad. Cuando los combustibles fósiles se queman, liberan dióxido de carbono y otros gases de efecto invernadero que, a su vez, atrapan el calor en nuestra atmósfera, lo que los convierte en los principales responsables del calentamiento global y del cambio climático [6].

El petróleo crudo, un líquido compuesto principalmente por carbono e hidrogeno, se refina en una variedad de productos petrolíferos, como la gasolina, el diésel y el gasóleo de calefacción [6]. Es uno de los recursos naturales más importante para la humanidad, esto debido a que muchos de los elementos y productos que son utilizados en la vida cotidiana se derivan de este recurso no renovable, también conocido como oro negro [7]. La explotación petrolera ha traído consigo soluciones prácticas para la vida, como es la producción de energías y combustibles, sin embargo, no ha dejado de generar consecuencias ambientales que en algunos casos son irreversibles [8]. El uso del petróleo representa la mayor parte de las emisiones de carbono en Estados Unidos y aproximadamente un tercio del total mundial, además de la contaminación atmosférica que se libera cuando se quema el petróleo, la perforación y el transporte han provocado varios accidentes graves [6]. Pese a sus consecuencias inaceptables los combustibles fósiles son actualmente los más utilizados a nivel mundial, con el fin de satisfacer las necesidades energéticas de la sociedad, agravando constantemente la situación ambiental debido a los efectos perjudiciales que estos causan [8]. A continuación, se puede evidenciar la demanda total de petróleo en Colombia en los últimos años, con el fin de esclarecer el comportamiento que ha presentado la dependencia hacia este tipo de recursos fósiles en la última década.

Figura 1.

Producción histórica de petróleo (BOPD)



Nota. Producción histórica de petróleo desde el año 2015 hasta el año 2023 en barriles por día. Tomado de "Datos y estadísticas - Agencia Nacional de Hidrocarburos". [https://www.anh.gov.co/es/operaciones-y-regal%C3%ADas/datos-y-estadisticas/\(consultado el 15 de mayo de 2023\)](https://www.anh.gov.co/es/operaciones-y-regal%C3%ADas/datos-y-estadisticas/(consultado%20el%2015%20de%20mayo%20de%202023)).

La agencia nacional de Hidrocarburos (ANH) es la entidad encargada de la administración de los recursos de hidrocarburos en Colombia, por lo tanto, son quienes proporcionan los datos estadísticos de la producción de petróleo, gas natural y otros combustibles fósiles en el país. [9] Mediante los datos registrados por la ANH y expuestos en la figura (1) se puede evidenciar la producción histórica del petróleo en Colombia y como la demanda de recursos fósiles ha disminuido con el paso de los años, esto debido a la conciencia adquirida por la humanidad en cuanto al impacto ambiental que conlleva este tipo de combustibles. Se puede observar como para el año 2015 la producción de petróleo en barriles por día (BOPD) correspondía a 1.035.535 BOPD y como en la actualidad la producción se ha reducido en un 26,87 % por lo cual actualmente se producen 757.339 BOPD, dichos datos tienen una última fecha de actualización correspondiente a febrero de 2023, por lo cual son datos confiables.

En los últimos años, se han desarrollado otras fuentes energéticas más amigables con el medio ambiente, por ejemplo, el biodiésel, este se destaca por su baja emisión de gases, comparada con otros combustibles, además de ser entre un (40 - 80) % menos contaminante que el petrodiesel. Desde los aspectos de inflamabilidad y toxicidad, es más seguro que el gas-oil proveniente del petróleo, no es tóxico y es biodegradable. Asimismo, debido a que la materia prima para su obtención puede ser grasas o aceites, de origen animal o vegetal, el impacto sobre el ecosistema es menor que el generado por materia prima de origen petroquímico [10].

1.1.2. Biodiesel

El biodiesel surge como una posible solución a la búsqueda de fuentes alternas de energía que sean científicamente viables, ambientalmente aceptables y tecnológicamente prometedoras, ya que el uso de combustibles basados en aceites vegetales y grasas animales son recursos no tóxicos, biodegradables y renovables [11].

El Biodiesel es un biocombustible líquido que se obtiene como resultado de la transesterificación de aceites vegetales o grasa animales, por modificación química, donde los ácidos grasos libres se neutralizan y la glicerina es removida de los ésteres, siendo reemplazada con un alcohol [12]. Es de origen natural, renovable y más limpio en comparación al diésel tradicional, este es de color ámbar, con una viscosidad similar a la del diésel de petróleo, muy poco inflamable con un punto de inflamación superior comparado con el diésel de petróleo[13].

El Biodiesel se caracteriza por generar menos gases de combustión en comparación a los combustibles fósiles, reduce dióxido de carbono (CO₂) en un 10 %, dióxido de azufre (SO₂) cerca del 100 % debido a la ausencia de azufre en el biodiesel, hollín entre un (40 – 60) %, monóxido de carbono (CO) entre (10 – 50) %, hidrocarburos entre (10 – 50) %, aldehídos y compuestos poliaromáticos en torno al 13 % [8]. Adicionalmente, este biocombustible aporta el triple de energía de la que se necesita para su producción, por otra parte, en cuanto a la inflamabilidad y toxicidad, es más seguro que el gas-oil proveniente del petróleo, no es tóxico y es biodegradable [10].

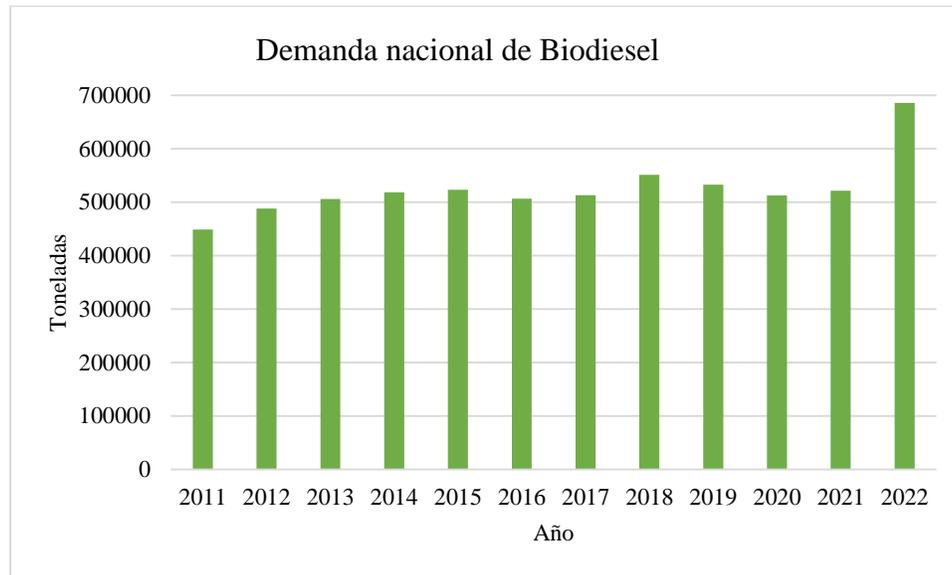
La calidad del biodiesel producido depende directamente de la materia prima utilizada y la calidad del proceso de obtención [14]. Los aceites vegetales comúnmente utilizados para la producción de este biocombustible son los provenientes de semillas oleaginosas como el girasol, la colza, la soya, el coco y la palma [15].

En Colombia, la producción industrial de Biodiesel inició en enero de 2008 y se optó por la utilización del aceite de palma como materia prima, dados los desarrollos alcanzados en este sector. La Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia (Fedebiocombustibles) es una entidad que representa a la industria de los biocombustibles en Colombia, la cual fue creada con el fin de promover el desarrollo, producción y el uso de biocombustibles en Colombia y lograr fomentar la sostenibilidad ambiental, social y económica del sector. Mediante datos reportados por

Fedebiocombustibles se puede apreciar la demanda histórica nacional de Biodiesel en Colombia desde el año 2011 [16].

Figura 2.

Demanda nacional de Biodiesel



Nota. Diagrama de barras de la demanda nacional de Biodiesel desde el año 2011 hasta el año 2022 en toneladas. Tomado de “HOME - Federación Nacional de Biocombustibles”. <https://fedebiocombustibles.com/>(consultado el 16 de mayo de 2023).

Mediante la figura (2) se puede evidenciar el comportamiento de la producción de Biodiesel a lo largo de los últimos años en Colombia, inicialmente, para el año 2011 se contaba con una producción nacional de Biodiesel de 448.933 toneladas por año. Los siguientes años, se evidenció un crecimiento lineal hasta el año 2015, donde se obtuvo una producción total de 523.402 toneladas por año, lo cual representó un incremento del 14,23 %. A partir del año 2016 hasta el año 2021, debido a la crisis económica en el mundo y también por motivos de la pandemia por el COVID-19 el mercado de los biocombustibles se vio bastante afectado, disminuyendo así su producción en todos los países. Esto, como resultado de la disminución significativa en la demanda global de combustibles, por otro lado, debido a las restricciones impuestas para reducir la propagación del virus muchas plantas de producción de biocombustible tuvieron que cerrar, adicionalmente, durante pandemia se contó con interrupciones en las cadenas de suministro agrícolas, por lo cual se contaba con escasez de materias primas. Sin embargo, en el año 2022, se logra evidenciar una recuperación significativa en la producción anual de Biodiesel, alcanzando la tasa de producción

más elevada en toda la historia de Colombia, con un total de 685.694 toneladas anuales de Biodiesel, lo que representa un incremento del 34,53 % con respecto al 2011.

Actualmente Colombia cuenta con plantas productoras en los departamentos del Magdalena, Cesar, Antioquia, Santander, Cundinamarca, Valle del cauca, Meta y el cauca. A continuación, se puede observar el histórico de capacidad instalada de las plantas productoras de biodiesel en Colombia en lo que lleva del año 2023.

Tabla 1.

Histórico de capacidad instalada

Productor Biodiésel	2023 biodiésel (Ton/año)
Manuelita	120.000
BioD	240.000
Ecodiesel	140.000
Bgreen	76.820
BioSC	120.000
Oleoflores	No operativa
La Paz	70.000
Biocastilla	No operativa
Alpo	12.000
Odin	No operativa
TOTAL DE BIODIÉSEL	778.820

Nota. Plantas productoras de Biodiesel en Colombia con su respectiva producción a lo largo del año 2023 en toneladas por año. Tomado de "HOME - Federación Nacional de Biocombustibles". <https://fedebiocombustibles.com/>(consultado el 16 de mayo de 2023).

En la tabla (1) se puede observar la cantidad de toneladas al año que producen cada una de las plantas de biodiesel en Colombia. En la cual se puede evidenciar que la planta con mayor producción de biodiesel en el año es BioD, con un total de 240.000 toneladas al año y la planta con menor cantidad de producción es Bgreen con un total de 76.820 toneladas al año. La producción total del año de biodiesel para lo que va del año 2023 es de 778.820 toneladas al año.

Colombia es el mayor productor de aceite de palma en Latinoamérica y el quinto en el mundo lo cual hace que tenga una posición privilegiada frente a muchos otros países en cuanto a disponibilidad de materia prima. Es importante recalcar que el aceite de palma es uno de los principales aceites vegetales y ha llegado a convertirse en el de mayor producción a nivel mundial.

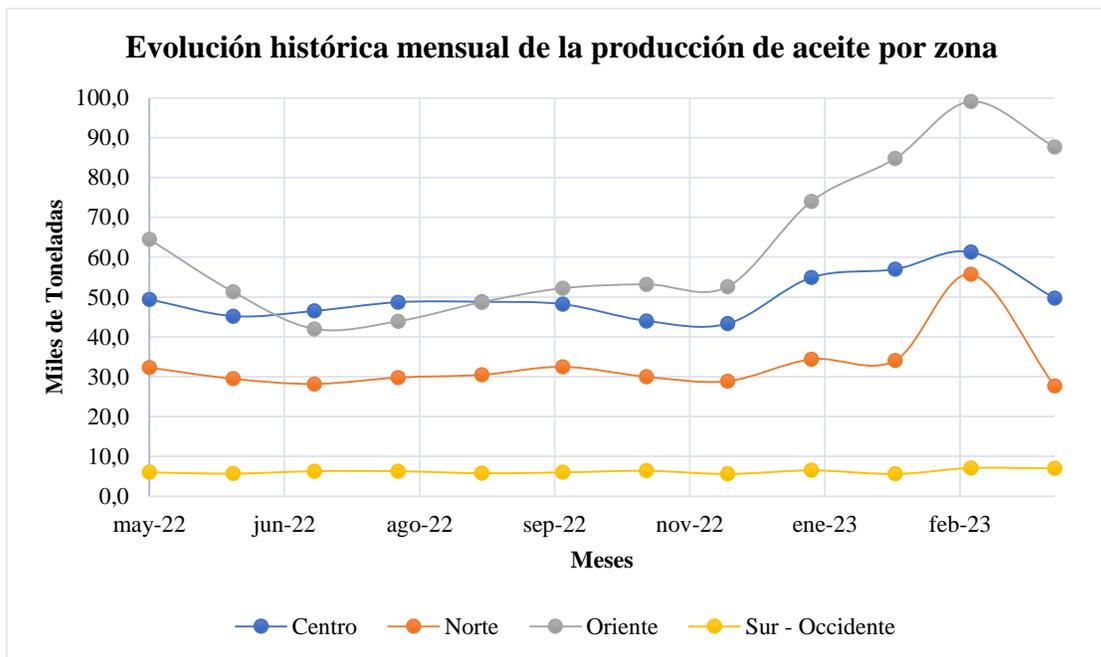
El aceite de palma es extraído del mesocarpio que se encuentra en el fruto de la semilla de la palma africana *Elaeis Guineensis*, en el cual se consigue una extracción de aceite entre el (40 – 50) % mediante procedimientos mecánicos [17].

Es el cultivo oleaginoso que mayor cantidad de aceite produce por unidad de área sembrada, por lo tanto, es la materia prima que ofrece mejores posibilidades para su producción a nivel nacional [18].

La Federación Nacional de Cultivadores de Aceite de Palma (Fedepalma) es una entidad gremial en Colombia la cual representa a los cultivadores de aceite de palma, donde se publican informes y estadísticas sobre la producción de aceite de palma en el país. A continuación, se pueden evidenciar graficas basadas en reportes de Fedepalma en cuanto a su producción en Colombia [19].

Figura 3.

Evolución histórica mensual de la producción de aceite por zona



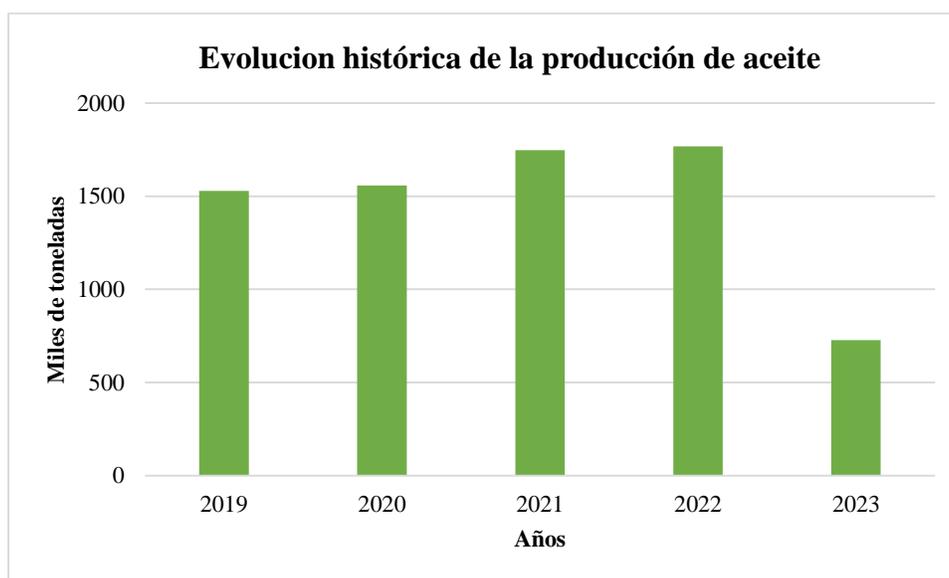
Nota. Evolución histórica mensual de la producción de aceite en la zona centro, norte, oriente y sur – occidente del país desde mayo 2022 hasta febrero 2023. Tomado de “Inicio - Fedepalma”. <https://fedepalma.org/> (consultado el 20 de mayo de 2023).

Mediante la figura (3) se puede evidenciar el comportamiento que ha tenido la producción de aceite de palma en Colombia en los últimos meses, cabe resaltar que la producción de aceite de palma en Colombia se encuentra en constante crecimiento, ya que para el mes de mayo del 2022 la

producción total fue de 152.200 toneladas mientras que para el mes de abril del 2023 la producción total de aceite fue de 172.100 toneladas, teniendo así un crecimiento del 11,56 %. En donde la zona Oriental del país es la zona que mayor aporta en la producción total, con un valor de 87.700 toneladas producidas en el mes de abril del 2023 y la zona que menor aporta, es la zona sur – occidente con un total de 7.000 toneladas producidas en el último mes reportado.

Figura 4.

Evolución histórica de la producción de aceite



Nota. Evolución histórica de la producción de aceite desde el año 2019 hasta el año 2023 en miles de toneladas. Tomado de "Inicio - Fedepalma". <https://fedepalma.org/> (consultado el 20 de mayo de 2023).

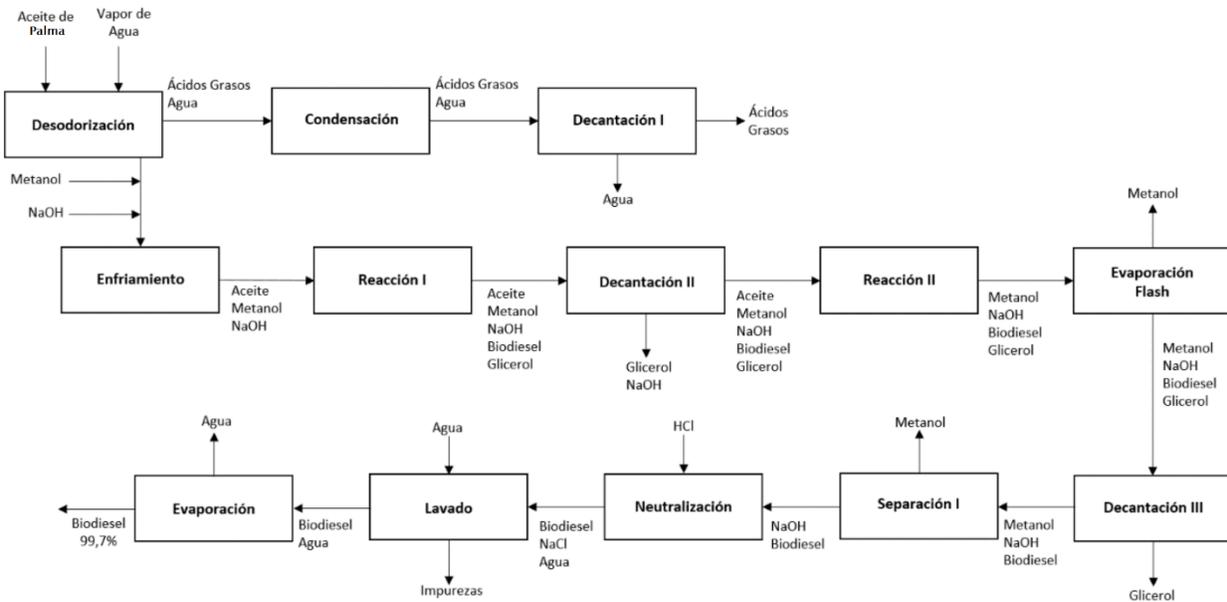
Por medio de la figura (4) se muestra la evolución histórica de la producción de aceite de palma en Colombia durante los últimos 5 años, donde se observa el crecimiento en la producción total de aceite. Para el año 2019, la producción total fue de 1.529.200 toneladas, mientras que para el año 2022, se tuvo un cierre con una producción de 1.767.600 toneladas de aceite, lo cual representa un incremento de 13,49 % en 3 años. Para lo que lleva del año 2023, el cual cuenta con datos reportados para el cierre del primer trimestre, se evidencia una producción de 726.800 toneladas, considerando que aún quedan 2 trimestres del año, se proyecta que la producción a final de año sea de 2.180.400 toneladas de aceite, lo cual representaría un incremento de 29,87 % con respecto al año 2019. Esto demuestra el potencial con el que cuenta Colombia para la producción de esta materia prima.

1.1.3. Proceso de producción

Se realizó tanto un diagrama de bloques (figura 5) como un diagrama de flujo de proceso (figura 6) para la producción de Biodiesel a partir de aceite de palma el cual será descrito posteriormente.

Figura 5.

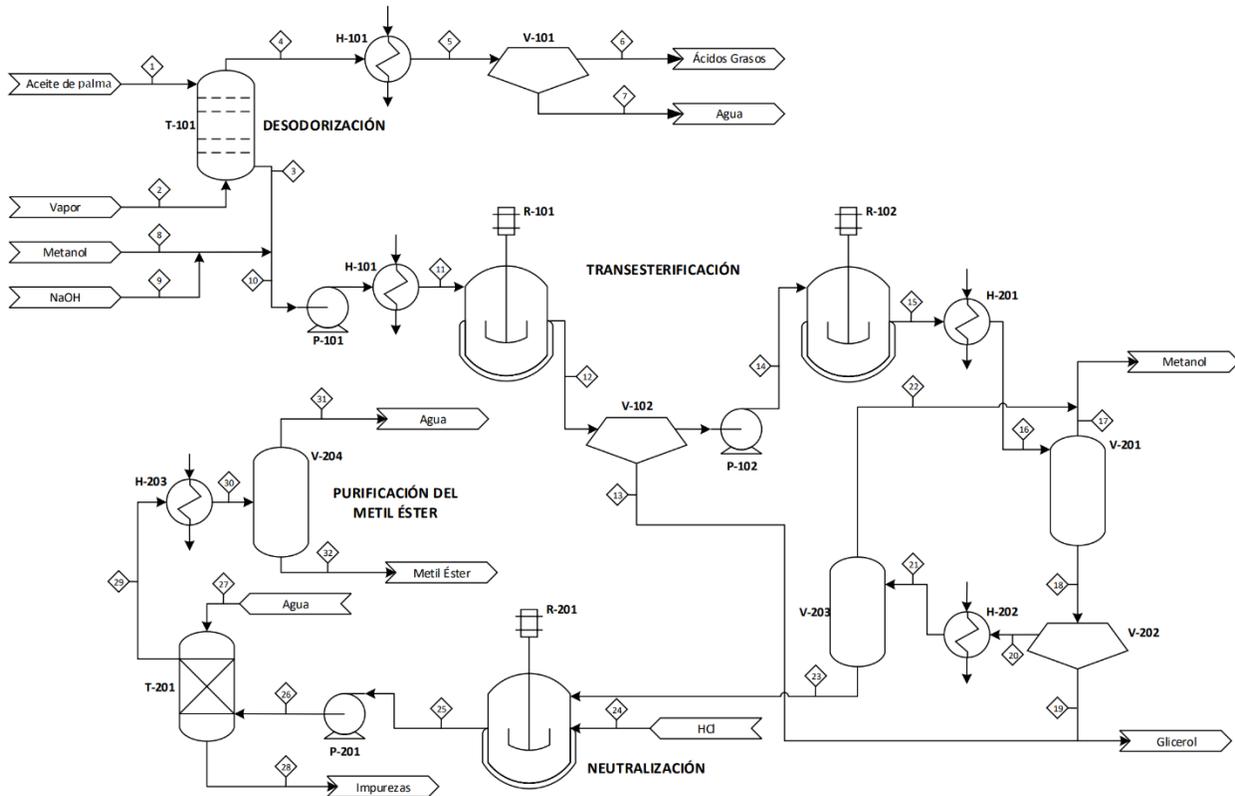
Diagrama de bloques para la obtención de biodiesel



Nota. Diagrama de bloques para la obtención de biodiesel a partir de aceite de palma. Tomado de J. A. García Nuñez, S. M. Rincón Miranda, y D. M. Martínez Cárdenas, "Metil éster sulfonado :una generación nueva de surfactantes", p. 70 p. .,Il., 2010, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/1325>.

Figura 6.

Diagrama de Flujo de Proceso para la obtención de Biodiesel



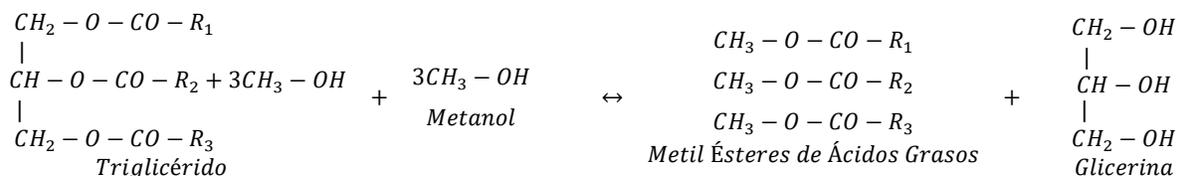
Nota. Diagrama de Flujo de Proceso para la obtención de Biodiesel a partir de aceite de palma. Tomado de J. A. García Nuñez, S. M. Rincón Miranda, y D. M. Martínez Cárdenas, “Metil éster sulfonado :una generación nueva de surfactantes”, p. 70 p. :.Jl., 2010, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/1325>.

Según el proceso de transesterificación descrito en el artículo “Metil éster sulfonado: una generación nueva de surfactantes” [20], el aceite de palma se somete inicialmente a un pretratamiento de desodorización con el objetivo de retirar trazas de humedad y ácidos grasos libres que podrían disminuir posteriormente el rendimiento en la producción de metil ésteres. El aceite se pone en contacto con vapor a 230 °C, el cual arrastra el agua presente junto con los ácidos grasos libres, para separarlos posteriormente en un decantador. De esta columna de desodorización, el aceite sale con 2 ppm de agua y 297 ppm de AGL. En una corriente paralela se realiza la mezcla entre metanol e hidróxido de sodio como catalizador, para posteriormente incorporarla a la corriente del aceite de palma pretratado. De esta forma, se aumenta la temperatura de la mezcla en un intercambiador de calor, hasta aproximadamente 60 °C, posteriormente ingresa al primer reactor de transesterificación, donde reacciona el aceite y el metanol, tal como se puede evidenciar en la figura (7) [21] considerando una relación molar 1:6 respectivamente, el porcentaje

de conversión en este equipo es de 94,5 %, por consiguiente, el producto se separa en un decantador, retirando el glicerol (fase pesada) de la fase liviana, la cual está compuesta por los reactivos remanentes y los metil ésteres. De esta forma la fase liviana ingresa a un nuevo reactor donde el porcentaje de conversión a la salida ahora es del 99,7 %.

Figura 7.

Reacción de Transesterificación



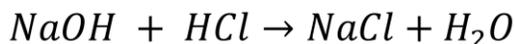
*Nota. Reacción de Transesterificación, donde reacciona un triglicérido y metanol para producir metil ésteres de ácidos grasos y glicerina. Tomado de "Cinética de la reacción de transesterificación para la producción de biodiesel a partir del aceite de *Jatropha curcas* L., en la provincia de Manabí, Ecuador".*

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852018000200007 (consultado el 1 de junio de 2023).

Después de esto, continúa el proceso de purificación de metil ésteres. Inicialmente por medio de una evaporación flash, se retira el metanol remanente en fase gaseosa, aprovechando su bajo punto de ebullición respecto a los demás componentes (este se purifica y se recupera para recircularlo en el proceso), y por la parte inferior del equipo se retira la fase líquida (glicerol y metil ésteres) nuevamente, la mezcla se lleva a un decantador, donde se extrae la glicerina y se obtiene metil éster con algunas trazas de metanol que se retiran posteriormente en un segundo separador flash, obteniendo una corriente final de metil ésteres con 0,3 % de metanol en peso. Para la segunda parte de la purificación del biodiesel, se realiza una neutralización. El metil éster se alimenta a un reactor, en el cual reacciona el hidróxido de sodio (catalizador), con ácido clorhídrico, produciendo cloruro de sodio más agua, tal como se puede evidenciar en la figura (8) [22], que posteriormente es retirado en una etapa de lavado.

Figura 8.

Reacción de Neutralización



Nota. Reacción de Neutralización con hidróxido de sodio como catalizador. Tomado de J. Liso, M. Rut, M. De, y E. Torres, "La neutralización ácido-base a debate", Enseñanza de las Ciencias. Revista de investigación y experiencias didácticas, vol. 20, núm. 3, pp. 451–464, ene. 2002, doi: 10.5565/rev/ensciencias.3960.

Para finalizar, el agua adicionada, es removida en una columna de evaporación flash a 148,41 °C, para así obtener una corriente de biodiesel al 99,7 % en peso, la lista de equipos descrita en el proceso al igual que sus respectivas condiciones de operación se encuentran descritas en la tabla (2).

Tabla 2.

Lista de Equipos y Condiciones de Operación para la Transesterificación de Aceite de Coco

Equipo	Descripción	Condiciones de operación
T-101	Torre de Desodorización de Aceite de Palma	0,06 atm
V-101	Decantador para la recuperación de Ácidos Grasos	1 atm - 27,85 °C
R-101	Reactor de Transesterificación	1 atm - 59,85 °C - 1,3565 h
V-102	Decantador para Glicerol	1 atm - 59,85 °C
R-102	Reactor de Transesterificación	1 atm - 59,85 °C - 1,683 h
V-201	Evaporador de Metanol	1 atm - 149,85 °C
V-202	Decantador para Glicerol	1 atm - 149,85 °C
V-203	Purificador de Meto Ésteres	0,49 atm - 129,85 °C
R-201	Reactor de Neutralización de Metil Ésteres	1 atm - 27,85 °C - 0,0001 h
T-201	Lavador de Metil Ésteres	66,85 °C
V-204	Secador de Metil Ésteres	0,3 atm - 148,41 °C

Nota. *Lista de Equipos y Condiciones de Operación para la Transesterificación de Aceite de Coco con su respectiva descripción. Tomado de J. A. García Nuñez, S. M. Rincón Miranda, y D. M. Martínez Cárdenas, "Metil éster sulfonado :una generación nueva de surfactantes", p. 70 p. :.Il., 2010, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/1325>.*

1.1.4. Glicerol

Considerando los esfuerzos realizados por la comunidad internacional para disminuir la dependencia de la humanidad por los combustibles fósiles, hoy en día se cuenta con un exceso de glicerol crudo, esto debido al aumento de la fabricación de biodiesel. A medida que la población incrementa, la necesidad por obtener avances sostenibles, considerando aspectos económicos, ambientales y sociales se hace cada vez más necesario [23]. Los biocombustibles juegan un papel muy significativo en la transición hacia una sociedad sostenible, sin embargo, traen consigo una grave problemática, la cual es, el exceso de glicerol crudo con altos niveles de impureza generado. El glicerol crudo ha sido producido como un co-producto de la producción de Biodiesel a partir de aceites vegetales, grasas animales, aceite de cocina usado, entre otras grasas de desecho como

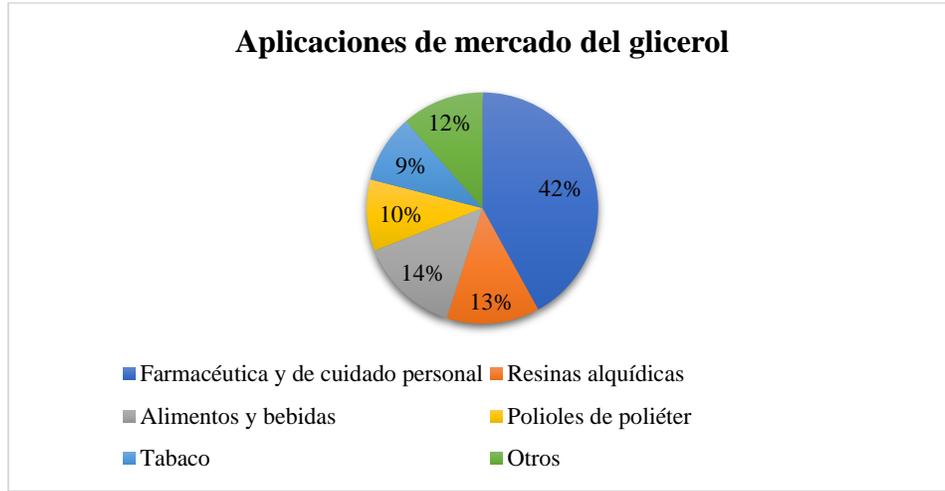
materia prima. La producción de Biodiesel involucra una reacción de transesterificación de triglicéridos con metanol, en donde aproximadamente el 10 % del producto obtenido es glicerol como sub producto, esto ha llevado a tener un exceso de suministro de glicerol crudo altamente impuro por los últimos años, el cual está generando un desequilibrio comercial y dependencia externa en la industria química en Colombia, ya que el glicerol crudo es vendido a China a un precio bajo, debido a la alta demanda del mercado chino y posteriormente Colombia está importando propilenglicol, el cual es producido a partir de glicerol, a un precio más alto desde China. Esto ocasionando que Colombia pierda la oportunidad de agregar valor al glicerol a través de su transformación en productos químicos de mayor valor.

El glicerol, también conocido como propano-1,2,3-triol, es un componente de alto valor agregado en diversos productos utilizados en el diario vivir. Puede ser utilizado en industrias de cuidado personal y farmacéuticas debido a sus propiedades ligeramente antimicrobianas y antivirales, también es utilizado como edulcorante en la industria alimentaria. Adicionalmente, está siendo considerado en aplicaciones como la gasificación o para la producción de hidrogeno y otros productos [24].

Considerando las diversas aplicaciones del glicerol, los productores pueden venderlo como un producto refinado en el mercado global. Actualmente estas son las aplicaciones de mercado que existen a gran escala.

Figura 9.

Aplicaciones de mercado del glicerol



Nota. Distribución de cada una de las aplicaciones del glicerol en el mercado global. Tomado de “Global Glycerol Market 2019-2023 | 7% CAGR Projection Through 2023 | Technavio | Business Wire”. <https://www.businesswire.com/news/home/20191217005425/en/Global-Glycerol-Market-2019-2023-7-CAGR-Projection-Through-2023-Technavio> (consultado el 26 de mayo de 2023).

Como se puede evidenciar en la figura (9) [25], la industria farmacéutica y la de cuidado personal son las industrias con mayor área de oportunidad para el aprovechamiento del glicerol, con un total de 42 % con respecto al mercado global. Seguida por la industria de alimentos y bebidas con un 14 %, resinas alquídicas con un 13 %, polioles de poliéter con un 10 % y la industria del tabaco con un 9 % [26]. Otras aplicaciones incluyen áreas como; alimento de ganado, incineración para generación de energía o digestión anaeróbica [27]. Por otro lado, el glicerol también está siendo utilizado para la producción de químicos importantes, como lo son; epíclorhidrina [28], propilenglicol [29], bio metanol [30] y 1,3 propanodiol [1]. Debido al exceso de suministro y el bajo costo del glicerol, investigadores de todo el mundo, se encuentran trabajando en métodos para valorizar y lograr el aprovechamiento del glicerol crudo en productos de alto valor agregado. Algunas de las propiedades del glicerol se pueden evidenciar en la tabla (3).

Tabla 3.*Propiedades del glicerol*

Propiedades del glicerol	
Formula Química	C ₃ H ₈ O ₃
Masa Molecular [g/mol]	92,09
Punto de fusión [°C]	17,8
Punto de Ebullición [°C]	290
Solubilidad en agua	Miscible
Densidad [g/cm ³]	1,26
Viscosidad [Pa • s]	1,41
Índice de Refracción [η_D]	1,47
Apariencia del glicerol	
Olor	Inoloro
Apariencia	Incoloro

Nota. Propiedades físico-químicas del glicerol al igual que la apariencia con la que cuenta. Tomado de P. Pal, S. P. Chaurasia, S. Upadhyaya, M. Agarwal, y S. Sridhar, "Glycerol Purification Using Membrane Technology", Membrane Processes, pp. 431–463, nov. 2018, doi: 10.1002/9781119418399.CH15.

1.1.5. Origen del plástico

Antes de la creación del plástico, la única fuente de suministro de materiales para las herramientas que utilizaba el hombre era la naturaleza, en donde se encontraba madera, piedras, huesos y algunos metales. A medida que iba evolucionando el hombre, descubrieron que las herramientas fueron perdiendo esas propiedades características que brindaba cada material y ya no satisfacían sus necesidades, con el paso del tiempo se vieron en la necesidad de innovar en el material de dichas herramientas, dando paso a la necesidad de búsqueda de un nuevo material que pudiera cumplir con todas sus expectativas y necesidades.

El hombre empezó a experimentar primero, con los polímeros que se encontraban en la naturaleza como la goma laca, el ámbar, la gutapercha (látex) y asta natural [31]. Los primeros polímeros artificiales surgieron de transformaciones derivadas de los polímeros naturales, durante el siglo XIX se dio lugar al descubrimiento del caucho, la caseína y el celuloide, más adelante en el año 1839 el inventor *Charles Goodyear* elaboró el que se consideró el primer polímero, modificando el caucho natural a través de calentamiento con azufre, que también se conoce como vulcanización [32].

Pero fue hasta 1856 que el metalúrgico e inventor *Alexander Parkes* desarrolló el primer termoplástico basado en la química de la celulosa, Parkesina la cual era nitrocelulosa ablandada con aceites vegetales y alcanfor. Debido a esto, el inventor *John W. Hyatt* descubrió la importancia

del alcanfor en la plastificación y nombró la sustancia como celuloide. Más adelante en 1907 se creó el primer polímero totalmente sintético, por el químico *Leo Hendrik Baekeland*, el cual lo nombró la baquelita, a través de la condensación del fenol y el formaldehído, este nuevo polímero obtuvo un gran éxito debido a que, se le podía dar una forma deseada antes de que se enfriara dicho polímero, era resistente al agua, a los disolventes y no era conductor eléctrico [33].

La industria de los polímeros se incrementó, a partir de 1926 por el descubrimiento acerca de los polímeros del químico *Hermann Staudinger*, de “largas cadenas de pequeñas unidades unidas por enlaces covalentes” (actualmente esto es utilizado como fundamento en la química molecular). En la segunda guerra mundial, varios países se vieron obligados a acelerar el desarrollo de nuevos polímeros que pudieran reemplazar distintas materias primas con las que fabricaban suministros para la guerra, como el nylon desarrollado en Estados Unidos usado para fabricar textiles como paracaídas. Por otro lado, en Alemania, con el caucho sintético para fabricar las llantas de los tanques, después de la guerra y hasta la actualidad se hicieron grandes desarrollos en la industria de los polímeros como el polipropileno y el polietileno, los cuales son de los polímeros sintéticos más usados actualmente, tanto en la industria y en usos domésticos [34].

El plástico se encuentra presente en todos los ámbitos de la vida humana, actualmente, en vista de sus múltiples propiedades y beneficios, se hace casi que indispensable el uso del plástico día a día, por todas estas innovaciones en la historia, el plástico es considerada uno de los más grandes inventos desde su creación, hasta la actualidad.

1.1.6. Problemáticas ambientales

La palabra plástico proviene del griego *plastikos* y hace referencia a algo que se puede moldear fácilmente, y corresponde a cientos de tipos de materiales sintéticos obtenidos de recursos naturales como el petróleo, gas natural, sal, celulosa y carbón, mediante fenómenos de polimerización o policondensación y su principal propiedad es la plasticidad la cual les permite obtener múltiples formas para diferentes propósitos, no son buenos conductores y esto les permite ser aislantes eléctricos, acústicos y térmicos, tienen una alta resistencia al agua, a la corrosión y a fenómenos químicos y biológicos, y su densidad es baja lo que los hace un material liviano en comparación con muchos otros materiales.

En vista de las múltiples propiedades y ventajas que tiene el plástico, su producción se vio incrementada, generando así grandes cantidades de desechos plásticos, hasta tal punto, en donde

ya no se podía controlar esta cantidad de desechos que se estaban acumulando y empezaron a presentar problemas en los ámbitos ambientales, sociales, económicos y sanitarios. A partir del desarrollo de los plásticos se empezaron a reemplazar ciertos materiales por el plástico, debido a su bajo costo, fácil manipulación, durabilidad y según sea el caso su resistencia, esto hizo que su producción creciera de manera desproporcionada, ya que el plástico se empezó a utilizar en todas las industrias y en múltiples usos domésticos [35].

En comparación con los residuos naturales o biodegradables, los desechos de plásticos sintéticos tienen una degradación extremadamente lenta y son más persistentes al cambio, dañinos y voluminosos, a causa de sus propiedades, estos residuos plásticos contribuyen de manera negativa al cambio climático reduciendo la capacidad de los ecosistemas para adaptarse al cambio, sofocan las vías fluviales, contaminan los océanos, los hábitats y los procesos naturales, acaban con las vidas silvestres y se introducen en la cadena alimenticia de los animales y humanos afectando su desarrollo [36].

La degradación de los residuos naturales tarda alrededor de 2 a 4 semanas dependiendo de las condiciones, su entorno puede hacer rápida o más lenta esta degradación, ahora bien, la degradación de los plásticos depende del tipo de polímero y las condiciones de su entorno, sin embargo, esta degradabilidad es muy lenta, los plásticos pueden tardar entre 100 a 1.000 años en degradarse por completo, pero esta degradación genera partículas más pequeñas de plástico denominado microplásticos que permanecen en los ecosistemas [37], por tal motivo la contaminación es un problema reconocido a nivel mundial, se sabe que más del 90 % de los plásticos provienen a partir de combustibles fósiles, en donde en promedio a nivel mundial se produce 400 millones de toneladas de desechos plásticos al año [36], de los cuales el 75 % de estos desechos son plásticos de un solo uso que terminaron en los vertederos o simplemente fueron arrojados [38].

El océano es el soporte vital de la tierra, la vida humana depende de él, para regular el clima, absorber el CO₂ y proporciona la mayor fuente de alimento para millones de personas, pero en los océanos, los desechos plásticos alcanzan un 85 % de todos los desechos marinos, de los cuales el 70 % se queda en el fondo marino y el 15 % permanece flotando en la superficie, se sabe que cada año 8 millones de toneladas de desechos plásticos terminan en los océanos [39] y estos afectan principalmente a toda la vida marina, muchos animales como los delfines, peces y las tortugas

confunden el plástico con comida y al ser ingerido es letal para los animales, igualmente, estas especies también pueden quedar atrapados y pueden enredarse en el plástico ahogándose o asfixiándose para morir o convertirse en una presa fácil [40].

1.1.7. Tipos de plásticos

Los plásticos se pueden clasificar de múltiples maneras, ya sea por su estado físico, su estructura, composición química o sus propiedades para el diseño. Este último tipo de clasificación fue propuesto por *R. Crawford* en el libro *Plastics Engineering*, en donde muestra cuales son las propiedades fundamentales desde un punto de vista del diseño de piezas y selección de material a una aplicación determinada [36][41]. Los tipos de plásticos propuestos por *R. Crawford* se muestran a continuación.

1.1.7.a. Termoplásticos: Los termoplásticos se destacan por ser plásticos que son maleables frente al aumento de la temperatura y solidifican en temperaturas bajas, se caracterizan principalmente por su comportamiento térmico, esta propiedad favorece el modelamiento por calentamiento, mediante temperaturas entre los 80 °C y 100 °C, donde se logra por medio de moldes de doblado o presión al vacío. Otra característica es por su naturaleza química, en cuanto a su estructura, los termoplásticos son polímeros lineales que pueden o no presentar ramificaciones. Los termoplásticos son polares, por lo que esto hace que sean solubles en disolventes orgánicos polares [42].

1.1.7.b. Termoestables: Los termoestables al igual que los Termoplásticos, se destacan por su comportamiento térmico, sin embargo, los polímeros termoestables se descomponen frente al aumento de altas temperaturas, estos no se funden y no son maleables, en cuanto a su estructura, los termoestables suelen ser polímeros reticulares, lo que los convierte en polímeros insolubles [42].

1.1.7.c. Elastómeros: Los elastómeros o comúnmente conocidos como cauchos se destacan por la naturaleza de su estructura, estos están compuestos por dobles enlaces en la cadena principal obteniendo cadenas enrolladas sobre sí mismas, alcanzando así su principal característica, la elasticidad y flexibilidad, el comportamiento térmico de los elastómeros es similar a los polímeros termoestables, pierden sus propiedades frente al aumento de la temperatura; los elastómeros son resistentes al ozono, aceites y grasas [41]

1.1.7.d. Composites: Los composites, también conocidos como plásticos compuestos, son materiales formados por dos o más elementos, los cuales presentan mejores propiedades en conjunto que por separados. Estos plásticos compuestos están conformados por dos fases; la primera es la matriz, esta suele ser la más tenaz por un termoplástico o un termo estables y la segunda fase, la cual se denomina, reforzante, esta fase es de mayor resistencia y con mayor elasticidad, en donde se pueden encontrar fibras de vidrio o fibras de carbono. El resultado final de estos composites depende de la combinación de compuestos y de las propiedades de cada uno de estos por individual [43].

1.1.7.e. Plásticos espumados: Los plásticos espumados son copolímeros que generalmente son termoplásticos los cuales, en su estructura presentan celdas con acumulación de gases, y estas celdas pueden estar cerradas o abiertas, en cuanto a las propiedades físicas, estos plásticos presentan una reducción en su densidad, conductividad térmica y disipación de energía acústica y mecánica, debido a que combina las propiedades de los sólidos y los gases, este tipo de plásticos puede ser utilizado en empaques protectores y aislamiento de tubos y sonido [41].

1.1.7.f. Cristales líquidos: Los cristales líquidos también conocidos como LPC o polímeros de cristal líquido, se destacan principalmente por la estructura de sus moléculas, estas se encuentran entre los cristales tridimensionales y la fase desordenada de los amorfos, estos combinan las propiedades de los líquidos y lo solidos cristalinos [44]. Este tipo de estructura optimiza las propiedades ópticas, mecánicas y térmicas para estos polímeros de cristales líquidos [41].

1.1.7.g. Plásticos ingenieriles: Los plásticos ingenieriles o también denominados plásticos de altas prestaciones, estos materiales se obtienen a partir de la polimerización de monómeros los cuales agregan anillos de benceno a la cadena principal del polímero, otorgando mejores propiedades en cuanto a temperaturas de fusión las cuales pueden ser entre los 200 °C y 300 °C, de igual forma estos plásticos suelen ser utilizados para reemplazar materiales como el aluminio debido a que estos poseen una baja densidad, mayor resistencia a la corrosión por líquidos y la facilidad para el diseño de piezas [41].

Los polímeros de igual forma pueden ser clasificados en tres grupos según su origen, el primer grupo es el de los polímeros naturales, estos como su nombre lo indica, son los que se pueden encontrar de manera natural, como lo son: el caucho, la lana, la seda y la celulosa; El segundo grupo son los polímeros semisintéticos, estos se obtienen mediante la polimerización de un

polímero natural como el caucho vulcanizado y por último está el grupo de los polímeros sintéticos, estos polímeros se obtienen mediante procesos industriales a partir de monómeros como el Nylon y el Polietileno [42].

1.1.8. Tipos de degradación del plástico

La degradación en sí, son todos estos cambios indeseados en una o todas las propiedades y características de un material, alimento u objeto, pero en el caso de los polímeros su degradación afecta principalmente sus propiedades químicas, físicas y mecánicas [45].

1.1.8.a. Degradación biológica: Este proceso se lleva a cabo mediante organismos vivos, por medio de la acción de las enzimas, ya sea una acción de limpieza o el aislamiento fisicoquímico, los microorganismos en especial las bacterias son las principales en el proceso de descomposición de un material orgánico, pero esto también se puede llevar a cabo por medio de los hongos, actinomicetos, insectos, roedores y otros animales [45].

1.1.8.b. Degradación térmica: La degradación térmica es un proceso en donde se descomponen en pequeñas fracciones las moléculas de los plásticos al aumentar la temperatura entre 100 °C y 300 °C [45]. Para lograr este proceso, los plásticos pueden ser sometidos antes a un reprocesamiento, en este proceso el polímero se somete a múltiples ciclos de procesamiento con el objetivo de deteriorar las propiedades y facilita la degradación térmica o termo-oxidativa [46].

1.1.8.c. Degradación por radiaciones: En este proceso se utilizan las radiaciones de alta energía y la luz visible y ultravioleta, para deteriorar las propiedades de estos materiales, afectando la cadena principal de su estructura en donde se degrada y ocurre un entrecruzamiento de manera simultánea [45]. Se ha confirmado que la exposición de los polímeros a luz ultravioleta es útil como un pretratamiento que contribuye a la aceleración de la degradación biológica de dichos materiales disminuyendo su vida útil [47].

1.1.8.d. Degradación mecánica: La degradación mecánica es un proceso netamente físico, en el cual, se somete el polímero a diferentes esfuerzos físicos generando un desgastarse, fractura o deformación del material, ya sea con fuerzas de tracción, compresión o cizalla [45].

1.1.8.e. Degradación química: Este tipo de degradación se genera por procesos que involucran reactivos químicos que estén en contacto con los polímeros, en algunas ocasiones los agentes químicos pueden disolver por completo los polímeros o solo de forma parcial [45]. Unos de por

principales procesos de degradación térmica pueden ser: hidrólisis, glucólisis, oxidación y metanólisis, y estos procesos combinados con la variación de la temperatura contribuyen a la velocidad de degradación química de los polímeros [48].

1.1.9. Polímeros biodegradables

Los polímeros naturales comúnmente se conocen con el nombre de polímeros biodegradables, ya que este tipo de polímeros son todos aquellos, que pueden ser degradados en su totalidad por el medio ambiente, a diferencia del término bioplástico, el cual hace referencia a todos los tipos de plásticos derivados de productos vegetales, así como el aceite de maíz o la fécula de papa [49].

Los polímeros biodegradables se pueden clasificar en cuatro grupos según su origen, el primero son los polímeros de origen natural estos se pueden extraer de bacterias, animales marinos y vegetales (polisacáridos, proteínas, celulosa, almidón), en el siguiente grupo encontramos a los polímeros naturales modificados, estos son polímeros como el acetato de celulosa, después están los polímeros sintéticos, estos polímeros son macromoléculas conformados por la unión de monómeros obtenidos de forma artificial y por último encontramos a los polímeros que combinan los tres polímeros anteriores, estos son todos los materiales que están conformados por un polímero sintético y un polímero natural [49].

Una de las principales ventajas de este tipo de materiales frente a los plásticos convencionales, es la reducción de la dependencia del petróleo como materia prima para la producción de plásticos [3].

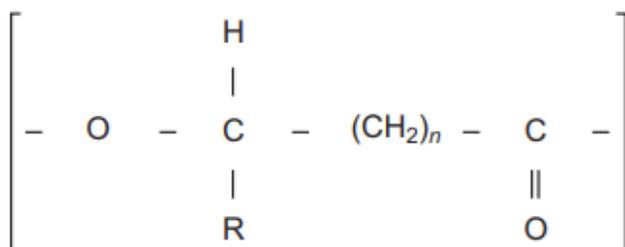
1.1.10. Polihidroxialcanoatos

Debido a los problemas ambientales ocasionados por la dependencia actual de los combustibles fósiles en la industria de plásticos, se ha venido trabajando en el desarrollo de materiales de biopolímeros ecológicos. Entre los cuales se destacan; los compuestos reforzados con fibras, materiales a base de almidón, polímeros producidos en plantas, polímeros producidos microbianamente, resinas, revestimientos y adhesivos de base biológica[50]. De estos materiales, el que mayor interés ha demostrado en los últimos años es el desarrollo de polímeros producidos microbianamente, conocidos como polihidroxialcanoatos (PHA), los cuales son poliésteres alifáticos lineales compuestos de hidroxiacidos grasos, monómeros ácidos y ácido poliláctico (PLA), estos biopoliésteres sintetizados intracelularmente por algunos microorganismos como reserva de carbono y energía que, una vez extraídos de la célula, presentan propiedades físicas

similares a plásticos derivados del petróleo. Son polímeros semi cristalinos con un grado de cristalinidad entre (60 – 80) % si bien, en el citoplasma celular estos poliésteres presentan una estructura amorfa. Al extraer el polímero, ya una vez que las células son rotas ocurre un cambio rápido en la morfología del polímero pasando de amorfo a cristalino [51]. La estructura general se evidencia en la figura (10) [52], mientras que la nomenclatura que presenta este tipo de compuestos se evidencia en la tabla (4).

Figura 10.

Estructura general de los polihidroxicanoatos



Nota. Estructura general de los polihidroxicanoatos. Tomado de Y. G. García, J. Carlos, M. Contreras, G. Reynoso, J. Antonio, y C. López, "Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano".

Tabla 4.

Nomenclatura de los PHA basado en la longitud y posición de la cadena lateral

n	R	Nombre del polímero	Símbolo
1	Hidrógeno	Poli (3-hidroxiopropionato)	PHP
	Metil	Poli (3-hidroxiobutirato)	P3HB
2	Hidrógeno	Poli (4-hidroxiobutirato)	P4HB
3	Hidrógeno	Poli (5-hidroxi valerato)	P5HV

Nota. Ejemplos de nomenclatura de los PHA según la longitud y posición de la cadena lateral. Tomado de Y. G. García, J. Carlos, M. Contreras, G. Reynoso, J. Antonio, y C. López, "Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano".

La síntesis de los PHA, se lleva a cabo mediante unas condiciones de estrés nutricional, en el cual se tiene respuesta a una limitación de nitrógeno, potasio, azufre, magnesio u oxígeno (tabla 5), sumado a la presencia de un exceso de fuente de carbono en el medio de cultivo [53].

Tabla 5.

Principales nutrientes cuya limitación da lugar a la producción de PHA en diferentes microorganismos.

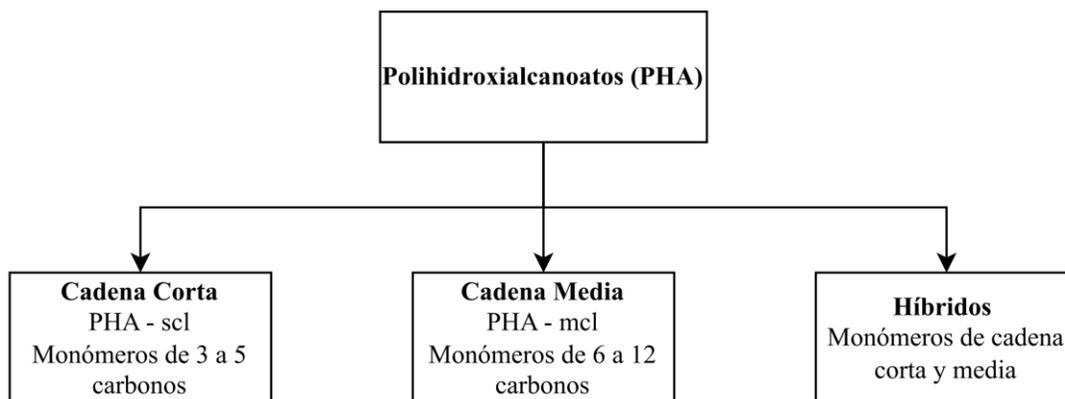
Microorganismo	Nutriente Limitante
<i>Alcaligenes latus</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Ralstonia eutropha</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Cupriavidus necator</i>	Nitrógeno
<i>Pseudomonas sp. K.</i>	Magnesio
<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Azotobacter beijerinckii</i> <i>Rhizobium ORS571</i>	Oxígeno
<i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Caulobacter crescentus</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i>	Fósforo

Nota. Principales nutrientes cuya limitación da lugar a la producción de PHA en diferentes microorganismos. Tomado de C. S. K. Reddy, R. Ghai, Rashmi, y V. C. Kalia, "Polyhydroxyalkanoates: an overview", Bioresour Technol, vol. 87, núm. 2, pp. 137–146, abr. 2003, doi: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2.

En términos de la estructura monomérica que pueden tener los polímeros PHA, dependiendo de la longitud de la cadena de los ácidos hidroxialcanoatos se van a clasificar en distintos tipos, los cuales se pueden observar en la figura (11).

Figura 11.

Clasificación de los PHA según su composición monomérica



Nota. Clasificación de los PHA según su composición monomérica; cadena corta, cadena media e híbridos. Tomado de Y. G. García, J. Carlos, M. Contreras, G. Reynoso, J. Antonio, y C. López, "Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano".

Como se puede evidenciar en la figura (11), existen tres tipos de PHA, según la longitud de la cadena de los ácidos hidroxialcanoicos, en primer lugar, se encuentra el PHA de cadena corta (PHA-scl) el cual corresponde a polímeros compuestos por unidades monoméricas de 3 a 5 átomos de carbono. Por otro lado, se encuentra el PHA de cadena media (PHA-mcl) en el que se encuentran los polímeros compuestos por unidades monoméricas de 6 a 14 átomos de carbono. Finalmente, se encuentran los PHA mixtos o híbridos, los cuales se componen de monómeros tanto de cadena corta como de cadena media [52].

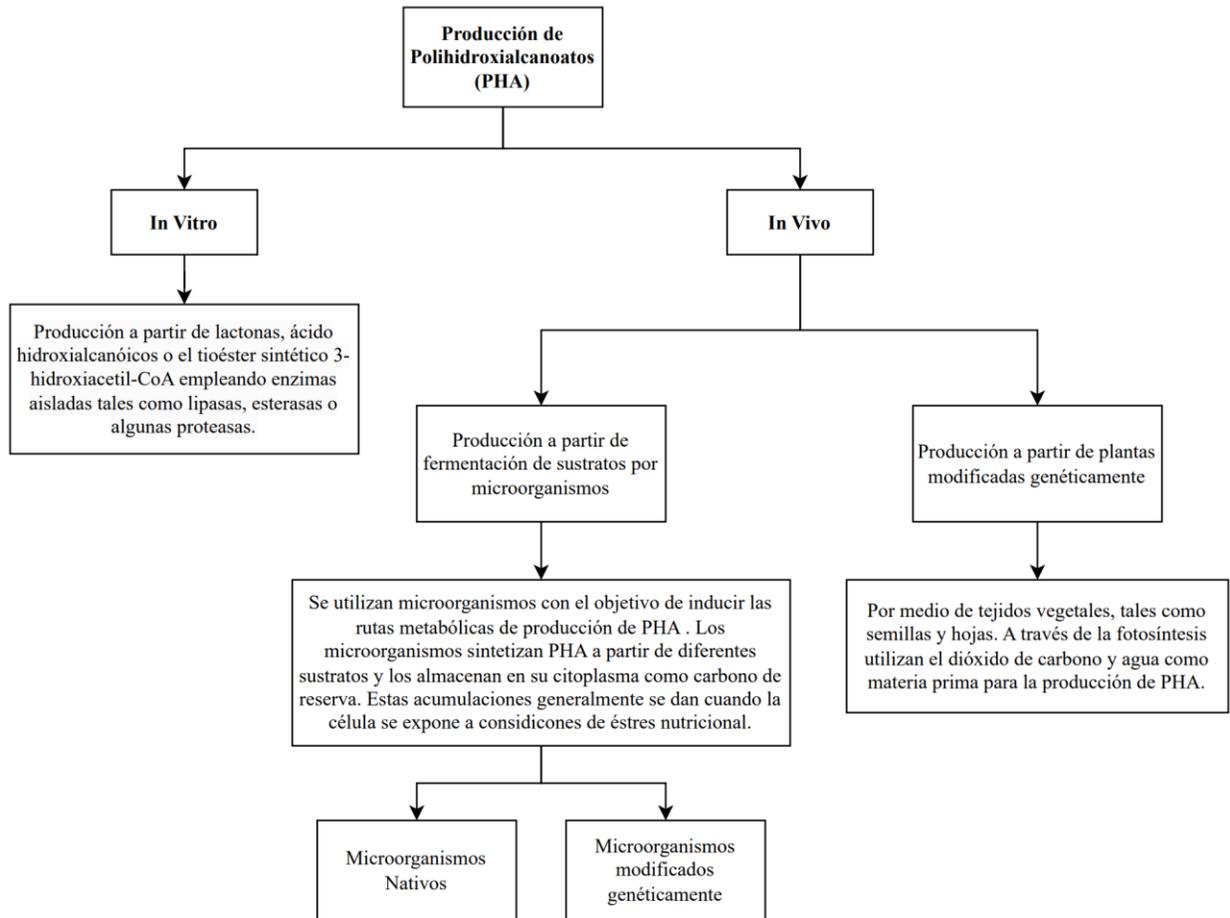
Dependiendo del tipo de microorganismo con el que se esté trabajando se sintetizara cierto tipo de PHA, sin embargo, la mayoría de microorganismo solo producen PHA de cadena corta o PHA de cadena media, son muy pocos los microorganismos capaces de producir PHA híbridos [52].

Los PHA son polímeros de alto interés a nivel industrial, gracias a la propiedades con las que cuentan, entre las que se destacan, que son biodegradables, son obtenidas a partir de fuentes renovables de carbono, lo cual ayuda a mitigar la dependencia de los combustibles fósiles, son biocompatibles, poseen un grado elevado de polimerización, son insolubles en agua, no son tóxicos y adicionalmente son compuestos termoplásticos y elastómeros lo que les permite ser procesados en el procesamiento de plásticos sintéticos [3].

La producción de los PHA se puede llevar a cabo in vitro o in vivo, tal como se muestra en la figura (12).

Figura 12.

Métodos de producción de los PHA



Nota. Métodos de producción de los PHA; in vitro e in vivo. Tomado de usuario, "Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales".

El polihidroxibutirato (PHB) o poli 3- hidroxibutirato con fórmula molecular $(C_4H_6O_2)_n$, es uno de los PHA más comunes, es quebradizo y rígido, no obstante, este presenta propiedades mecánicas similares al polipropileno, el cual es uno de los plásticos convencionales con mayor uso, con la diferencia de que este polímero es biodegradable [54]. Adicionalmente, tienen la ventaja de que pueden ser sintetizados y degradados por varios microorganismos, por lo que se han estudiado las propiedades térmicas y de miscibilidad de los PHB. Entre los organismos que son capaces de sintetizar los PHB se encuentran los cultivos mixtos fototróficos [55]. El PHB cuenta con buenas propiedades termoplásticas ya que cuenta con una temperatura de fusión cercano a los 180 °C, es importante recalcar que es un termoplástico el cual puede ser procesado por técnicas de extrusión e inyección [3].

En los últimos años, el PHB ha sido de gran interés a nivel industrial como posible sustituto de plásticos cuyo origen proviene de combustibles fósiles, como lo son, el polietileno y el polipropileno, esto debido a sus propiedades físico – químicas [56]. A continuación, se evidencian una comparación de algunas propiedades físicas del PHB y el polipropileno (tabla 6) con el fin de evidenciar los motivos por los cuales el PHB podría ser procesado como un termoplástico convencional [57].

Tabla 6.

Comparación propiedades físicas entre PHB y polipropileno

Parámetro	PHB	Polipropileno
Temperatura de fusión (°C)	177	176
Temperatura de transición vítrea (°C)	2	-10
Temperatura de degradación (°C)	262	287
Cristalinidad (%)	60	50-70
Fuerza de tensión (MPa)	43	38
Extensión hasta quiebre (%)	5	400

Nota. Comparación propiedades físicas entre PHB y polipropileno. Tomado de A. Carolina, L. Delgado, y A. M. Cordoba, "Polihidroxialcanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial", Informador técnico, ISSN 0122-056X, ISSN-e 2256-5035, Vol. 79, No. 1, 2015, págs. 93-101, vol. 79, núm. 1, pp. 93-101, 2015, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5290930&info=resumen&idioma=SPA>.

1.1.11. Microorganismos

Los microorganismos son un grupo de seres vivos (excepto los virus que son microorganismos pero no son seres vivos), los cuales solo pueden verse a través de un microscopio debido a su reducido tamaño, estos se miden en micras y dentro de este grupo de seres vivos se encuentran las bacterias, las algas, hongos, archaeas y protozoarios, también pueden ser uni o pluricelulares y cada uno de estos presentan múltiples características distintas entre las cuales se pueden encontrar su nutrición, reproducción, tiempos de crecimiento, morfología y medio de cultivo [58].

1.1.12. Bacterias

Las bacterias son células procariotas unicelulares, las cuales pueden vivir en diferentes condiciones de temperatura y presión, y se pueden encontrar en todas las superficies, incluso dentro del cuerpo humano; Las bacterias cumplen una parte fundamental en los ecosistemas y algunas son benéficas para los procesos digestivos en los humanos y animales. [59]

Las bacterias pueden ser utilizadas en distintos procesos industriales y biotecnológicos por sus múltiples características y su resistencia a condiciones extremas.

1.1.13. Microorganismos productores de PHB

Los polihidroxicanoatos o como se conocen PHAs, son un grupo de biopolímeros producidos por un conjunto de microorganismos, como una respuesta al estrés nutricional en donde estos microorganismos almacenan carbono y energía [60].

Dentro del grupo de bacterias que almacenan PHB en su interior pueden ser de naturaleza gram positiva o gram negativo, lo cual especifica su estructura celular, resistencia a los antibióticos y respuesta a ciertos tratamientos. Existen más de 75 géneros de bacterias que tienen la capacidad de almacenar estos polihidroxicanoatos en su interior, unas de las principales bacterias productoras de PHB son *Cupriavidus necator*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes latus* y *Bacillus Megaterium* [61].

1.1.14. Bacillus Megaterium

Bacillus Megaterium es una bacteria que fue descubierta por de Bray y es conocida por su gran tamaño, esta puede alcanzar a medir hasta 60 mm³ En cuanto a sus características de morfología y fisiología, *B. Megaterium* es una bacteria gram positiva, aerobia, con forma de bacilo y esta presenta colonias blancas, lisas y redondas [62]. Esta bacteria se encuentra principalmente en suelos y aguas contaminadas, alimentos secos, agua de mar, sedimentos e incluso en la miel de abejas.

Una de sus principales ventajas es la gran variedad de fuentes de carbono que utilizar este organismo como lo es la glucosa, la glicerina, sacarosa, almidón y lactosa [63]. Esto les permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales y medios de cultivos.

Adicionalmente es utilizada en procesos industriales desde hace más de 50 años ya que dispone de enzimas inusuales con una alta capacidad para producir exoenzimas [64]. También son utilizadas estas bacterias en la producción α y β amilasas y se utilizan en la industria panadera [65].

1.1.15. Cupriavidus necator

Cupriavidus necator o también conocida como *Ralstonia eutropha*, es un miembro de las bacterias Knallgas (bacterias oxidantes de hidrógeno), estas bacterias, son un grupo fisiológico de bacterias autótrofas facultativas que se caracterizan por su habilidad de crecer en condiciones autotróficas, obteniendo energía de mezclas gaseosas de hidrógeno y oxígeno. Donde utilizan el oxígeno como receptor de electrones y el hidrógeno como donante de electrones [66].

Ralstonia eutropha es una bacteria gram negativa, aerobia, quimio autótrofa facultativa [67]. La cual fue aislada en 1952 y sus capacidades metabólicas han sido caracterizadas desde ese mismo año por Schatz y Bovell. Se ha caracterizado por su habilidad para crecer y producir productos biológicos bajo condiciones autótrofas, lo que la hace un organismo muy valioso. Principalmente su capacidad de sintetizar biopolímeros polihidroxialcanoatos (PHA) en una gran variedad de fuentes de carbono, incluyendo; azúcares, lípidos y dióxido de carbono [68].

Recientes estudios han demostrado que la bacteria *Cupriavidus Necator* es un modelo facultativo de bacteria que puede utilizar ácido glucónico, fructosa y otras fuentes de carbono orgánicas para un crecimiento heterogéneo y también puede utilizar dióxido de carbono para un crecimiento autótrofo [69].

1.2. Marco Legal

Actualmente en Colombia los combustibles fósiles, el biodiesel, los plásticos y los macroorganismos se encuentran regulados por una serie de leyes, decretos y resoluciones, entre las cuales se destacan las siguientes:

1.2.1. Combustibles fósiles

- Ley 9 de 1979 – En esta ley se regula el transporte terrestre y se indican los de seguridad y técnicos para todo tipo de vehículos y la calidad se los combustibles [70].
- Ley 685 de 2001– Esta ley regula todas las actividades mineras en Colombia como la extracción de petróleo, carbón y recursos no renovables. En esta se establecen las obligaciones y responsabilidad de todos los involucrados, así como, los procedimientos de extracción y explotación [71].
- Ley 1209 de 2008 – Esta ley decreta los lineamientos para la producción, distribución y uso de biocombustibles de Colombia, con el propósito de incentivar el uso de este como alternativa [72].
- Ley 1715 de 2014 – En esta ley se da a conocer el desarrollo de fuentes de energía en Colombia, con el objetivo de disminuir el uso de combustibles fósiles [73].
- Resolución 180537 de 2014 – En esta resolución se establecen todos los patrones de calidad que deben tener los combustibles de líquidos derivados del petróleo [74].

1.2.2. Biodiesel

- Decreto 1609 de 2002 – Este decreto regula el uso de alcoholes carburantes y biodiesel en los combustibles para el transporte en el país. Se establecen los estándares de calidad y los porcentajes que deben tener en dichas mezclas [75].
- Ley 939 de 2004 – Esta ley incentiva el desarrollo y uso sostenible de biocombustibles por medio de principios, objetivos y lineamientos generales para el uso de estos combustibles [76].
- Resolución 1420 de 2005 – Esta resolución establece un reglamento de certificación de la calidad del biodiesel y sus mezclas en Colombia por medio de parámetros de calidad para dichos compuestos [77].
- Resolución 38584 de 2018 – En esta resolución se establece el proceso de asignación de la cuota de mezcla de biodiesel en los combustibles líquidos derivados del petróleo en el país, por medio de criterios y procedimientos para la delimitación y asignación de la cuota obligatoria [78].

1.2.3. Plásticos

- Decreto 596 de 2016 – Este decreto reglamenta la gestión de los residuos generados en los establecimientos de atención de la salud, mediante medidas de clasificación, almacenamiento, transporte, tratamiento y disposición final segura de estos residuos [79].
- Resolución 668 de 2016 – Esta resolución regula la disposición de los residuos de aparatos eléctricos, que incluyen componentes de plástico por medio de la selección, tratamiento y gestión final [80].
- Resolución 1407 de 2018 – Esta resolución reglamenta los requisitos necesarios para una correcta gestión de todos los residuos de envases y empaques plásticos, mediante responsabilidades para todos los involucrados durante la vida útil del desecho [81].
- Ley 2068 de 2020 – Esta ley establece la disposición general para la gestión integral de todos los residuos en el país, incluyendo los plásticos. Promueve la mitigación de la acumulación de residuos, la reutilización, el reciclaje y una disposición final adecuada para estos [82].

1.2.4. Microorganismos

- Ley 9 de 1979 – Esta ley no se enfoca específicamente en los microorganismos, sin embargo, establece ciertas regulaciones para el transporte terrestre en el país, en cuanto al cumplimiento

de ciertos requisitos de seguridad y manejo adecuado para el transporte de sustancias biológicas [70]

- Resolución 444 de 2008 – Esta resolución tiene como objetivo crear medidas para el control de los riesgos biológicos en los establecimientos de salud y demás establecimientos que manipulen material biológico [83].

1.2.5. Polihidroxicanoatos

En el caso de los polihidroxicanoatos (PHA), no existe a la fecha un marco legal que se enfoque únicamente en los PHAs, no obstante, estos polímeros pueden estar sujetos a regulaciones más amplias que están relacionadas con los plásticos.

- Ley 9 de 1979 – Código nacional de tránsito terrestre, esta ley regula el transporte terrestre en Colombia, por lo tanto, si los PHA van a ser utilizados en la fabricación de piezas y componentes para vehículos esta ley podría ser relevante. La ley especifica cuales son los requisitos técnicos y de seguridad para los vehículos, al igual que los materiales utilizados en su fabricación. [70]
- Resolución 1407 de 2018 – Esta ley establece los requisitos para la gestión integral de los residuos de envases y empaques en Colombia. Si el uso para el cual va a ser producido el PHA son envases y empaques, podrían estar sujetos a las disposiciones establecidas en dicha resolución. Se abarcan temas como la reducción, reutilización y reciclaje de los materiales utilizados. [81]
- Ley 2068 de 2020 – Esta ley suministra la información necesaria para adoptar instrumentos para la gestión integral de residuos y otras disposiciones en Colombia. Pese a que no haga referencia específicamente a los PHA, promueve la reducción en la generación de residuos y la adopción de soluciones sostenibles, como los plásticos biodegradables. [82]

2. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Experimentación

A lo largo del capítulo 2, se va a explicar la metodología realizada con el fin de cumplir con cada uno de los objetivos, de igual manera, se presentarán los resultados obtenidos.

2.1. Objetivo 1: Determinar la viabilidad del aprovechamiento del glicerol como materia prima para la producción de termoplásticos.

2.1.1. Metodología

Para identificar la viabilidad del aprovechamiento del glicerol como materia prima para la producción de termoplástico, fue necesario realizar todo el proceso de producción desde la purificación de la glicerina hasta la extracción y purificación del polímero.

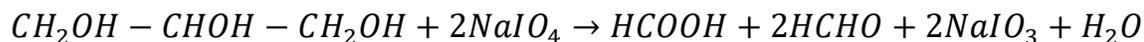
2.1.1.a. Caracterización Glicerol Crudo: Con el fin de caracterizar el glicerol crudo recibido por la empresa BioD, se realizó un análisis de contenido de glicerol en la muestra, al igual que la densidad.

2.1.1.a.i. Contenido de glicerol en la muestra: Para llevar a cabo la determinación cuantitativa de glicerina en la muestra se implementó el método titrimétrico. Este método solo puede ser implementado para mezclas con un contenido superior al 75 % de glicerina, considerando que el glicerol crudo proveniente de la empresa BioD cuenta con un porcentaje de pureza de glicerol, superior al 80 %, tal como se puede evidenciar en la ficha técnica del producto (Anexo 1), es factible implementar este método para la determinación.

El método titrimétrico que será implementado, se basa en la oxidación del glicerol por el metaperiodato de sodio en un medio ácido fuerte, tal como se puede evidenciar en la figura (13). Mediante esta oxidación se produce formaldehído y ácido fórmico, el ácido es implementado para medir el contenido de glicerol por titulación con hidróxido de sodio, hasta un pH de 8,1. El resultado de contenido de glicerol obtenido se expresa en porcentaje (m/m).

Figura 13.

Oxidación del glicerol por el metaperyodato de sodio



Nota. Oxidación del glicerol por el metaperyodato de sodio en un medio ácido fuerte. Tomado de ASTM, "Standard Test Method for Determination of Glycerin Assay by Titration (Sodium Meta Periodate)", 2021. Consultado: el 28 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.astm.org/d7637-10r21.html>.

El procedimiento realizado se describe a continuación [84]:

1. Se pesaron 400 mg de glicerol en una balanza analítica los cuales fueron transferidos a un beaker de 600 mL.
2. La muestra fue diluida en el beaker con 50 mL de agua y 3 mL de indicador azul de bromotimol. Cuidadosamente se acidificó con ácido sulfúrico 0,2 N hasta obtener un color amarillo verdoso. Posteriormente se neutralizó con hidróxido de sodio 0,05 N hasta obtener un punto final de color azul, libre de color verde.
3. Se procedió a pipetear 50 mL de la solución de metaperyodato de sodio y se adicionó en el beaker. Se mezcló usando agitación moderada y se cubrió el beaker con un vidrio de reloj. Se dejó precipitar la mezcla dentro del beaker por 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz.
4. Se adicionaron 10 mL de la solución de etilenglicol en el beaker. Se mezcló la muestra usando agitación moderada, se cubrió el beaker con un vidrio de reloj y se dejó precipitar la mezcla dentro del beaker por 20 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz.
5. Se diluyó la solución con agua hasta un volumen de 300 mL.
6. Con ayuda del pHmetro y utilizando agitación controlada se tituló lentamente con hidróxido de sodio 0,1 N a medida que se aproxima al punto final hasta un pH de 8,1 con un rango de tolerancia de $\pm 0,1$.
7. Finalmente, la determinación de blanco para el ensayo de determinación de glicerol, se llevó a cabo al mismo tiempo que el ensayo de la determinación de glicerol y bajo las mismas condiciones, sin considerar la porción de prueba, utilizando las mismas cantidades de reactivos y diluyendo con agua para las determinaciones descritas del paso 1 al 6. Se tituló con hidróxido de sodio 0,1 N a un pH de 6,5 con un rango de tolerancia de $\pm 0,1$ para el blanco.

El contenido de glicerol, expresado como un porcentaje, esta descrito por la siguiente formula:

(1)

$$GLY = \frac{(V_1 - V_B) * F * N}{W} * 100$$

Donde,

GLY = Contenido de glicerol (%)

V_1 = mL de la solución de hidróxido de sodio 0,1 N usada para la titulación de la muestra.

V_B = mL de la solución de hidróxido de sodio 0,1 N usado para la titulación del blanco.

F = 9.210

N = normalidad exacta de hidróxido de sodio que fue utilizado para la titulación

W = masa en gramos, de glicerina que fue sometida a la reacción con la solución de metaperyodato de sodio.

2.1.1.a.ii. Densidad de la muestra: Con el fin de determinar la densidad de la muestra, se implementó el método de picnómetro, para lo cual se realizó el siguiente procedimiento:

1. Inicialmente, se pesó un picnómetro vacío y se registró el valor obtenido.
2. Se procedió a agregar la muestra del glicerol al picnómetro hasta la totalidad de su volumen.
3. Finalmente se procedió a pesar el picnómetro con muestra y se registró el valor obtenido.

El cálculo realizado para la determinación de la densidad del glicerol se describe a continuación:

$$\rho = \frac{m}{v} \quad (2)$$

Donde,

ρ = densidad de la muestra.

m = masa total de la muestra

v = volumen de la muestra

2.1.1.b. Purificación de glicerol: Inicialmente se realizó la adquisición del glicerol, proveniente de una industria de producción de Biodiesel en Colombia. Para lo cual, se consideraron los datos reportados por la Federación de Biocombustibles en Colombia, expuestos en la tabla (1), donde se

evidencia que la planta productora de Biodiesel, Bio D, localizada en el departamento de Cundinamarca, es la mayor productora de Biodiesel en el país, con un total de 240.000 toneladas por año, en lo que va del año 2023. Al considerar los factores de producción anual y ubicación, BioD se convirtió en la mejor opción para realizar la adquisición, ya que el proyecto se está llevando a cabo en la ciudad de Bogotá y es de gran importancia contar con una planta de producción cercana, en este caso en el mismo departamento. Se realizó la respectiva cotización del producto con la empresa, donde se recibió la ficha técnica del glicerol que comercializan (Anexo 1) y al observar que las características eran las necesarias para el proceso, se procedió a realizar la adquisición.

El glicerol crudo obtenido de la empresa BioD, es un subproducto de la producción de biodiesel elaborado a partir de una mezcla de aceite de palma colombiano, obtenido de *Elaeis guineensis* y palma híbrida, con producción trazable. El glicerol crudo tiene un grado de pureza de aproximadamente el 80 % y también contiene agua y sales. Después de un proceso de purificación, puede utilizarse como materia prima valiosa para diferentes industrias. Las propiedades con las que cuenta el glicerol crudo proveniente de BioD, se muestran a continuación (figura 14):

Figura 14.

Características técnicas del Glicerol Crudo BioD

PROPERTIES	UNIT	Bio D SPECIFICATION	METHOD
Appearance	Visual	Report	Visual
Glycerin content (Assay)	%wt	80% min.	USP 35
Moisture content	%wt	15% max	ASTM E -203
pH	N/A	Report	Internal method
MONG	%wt	Report	ISO 2464
Ash	%wt	10% max	USP 35
Salt content as HCl	%wt	Report	Internal method
NaOH content	mg/Kg	Report	Internal method
Methanol content	%	0,1% max	Internal method

Nota. Características técnicas del Glicerol Crudo BioD proporcionado en la ficha técnica del producto. Tomado de "Biodiesel crude oil palm in colombia - Oil palm derivatives in Colombia | Bio D". <http://www.biodsa.com.co/?lang=es> (consultado el 26 de mayo de 2023).

El glicerol obtenido por la empresa BioD (figura 16), es proveniente de la producción de Biodiesel a partir de aceite de palma, como un co-producto, dicho glicerol crudo cuenta con impurezas entre las cuales se encuentra, metanol, catalizador alcalino, materia orgánica no glicerina (MONG)

formada por jabones, ácidos grasos libres, residuo consistente en agua y otras impurezas, por lo cual es de suma importancia realizar un proceso de purificación con el fin de obtener el glicerol en un mayor nivel de pureza para su posterior aprovechamiento.

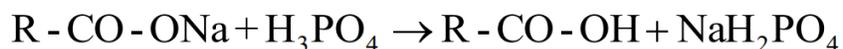
Según el proceso de purificación descrito en el artículo “Purificación de glicerol crudo y sus usos en catálisis” [85], el cual fue tomado como guía en este trabajo, el proceso de purificación del glicerol se realizó empleando cuatro etapas, las cuales se componen de; Acidificación, neutralización, destilación y decoloración.

2.1.1.b.i. Acidificación: El proceso de acidificación se realizó con el fin de eliminar sales, jabones y grasas, este procedimiento facilitara las siguientes etapas del proceso de separación del glicerol de la fase de metiléster.

Para esta primera etapa se acidificó la mezcla empleando ácido fosfórico como catalizador, controlando un pH óptimo de 3.0 con ayuda de un potenciómetro, se evitó acidificar a un pH menor a 3.0 ya que las sales formadas se solubilizan. Con el fin de lograr disminuir la viscosidad de la mezcla y favorecer el mezclado, se manejó una temperatura de operación de 50 °C [86]. La operación fue realizada a un pH tan bajo para permitir la recuperación con mayor pureza de los ácidos grasos generados, tal como se puede evidenciar en la figura (15).

Figura 15.

Reacción acidificación empleando ácido fosfórico como catalizador



Nota. Reacción acidificación empleando ácido fosfórico como catalizador. Tomado de F. L. Aguzín, G. A. Bedogni, N. B. Okulik, y C. L. Padró, “Purificación de glicerol crudo y sus usos en catálisis”, 2015.

Para empezar, se preparó 500 mL de ácido fosfórico al 85 % en peso a temperatura ambiente, se calentó la muestra de glicerol hasta la temperatura de operación y se procedió a adicionar el ácido fosfórico a la materia prima hasta obtener un pH de 3.0 (figura 17), de esa manera se logró eliminar sales y jabones presentes en el glicerol. Posteriormente la mezcla acidificada se dejó decantando por 24 horas, donde se evidencio la formación de tres fases; la fase superior correspondiente a ácidos grasos libres, una fase intermedia la cual contiene una fase acuosa de glicerol y la inferior que contiene sales. La fase intermedia e inferior fueron sometidas a centrifugación para favorecer la separación y se procedió a filtrar[85].

Figura 16.

Glicerol crudo BioD



Nota. 1 galón de Glicerol crudo Bio D

Figura 17.

Acidificación glicerol crudo



Nota. Acidificación glicerol crudo, controlando un pH óptimo de 3.0

2.1.1.b.ii. Neutralización: El proceso de neutralización se realiza a la fase de glicerol con el fin de eliminar los ácidos grasos que quedan disueltos en la misma. Para este proceso se utilizó NaOH 1 N como catalizador y un potenciómetro. Inicialmente se preparó 200 mL de NaOH 1 N a temperatura ambiente, para posteriormente agregarlo gota a gota mediante la técnica de titulación en el glicerol obtenido hasta un pH de 7.0 (figura 18) y finalmente, se procedió a filtrar la mezcla (figura 19) [86].

Figura 18.

Neutralización de la mezcla mediante titulación



Nota. Neutralización de la mezcla mediante titulación, controlando pH de 7.0.

Figura 19.

Filtración de la mezcla

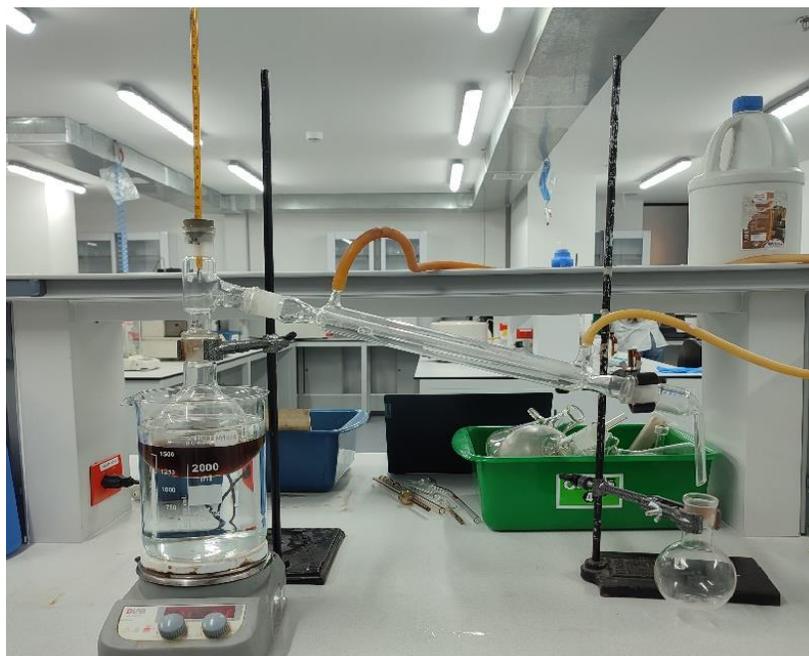


Nota. Filtración de la muestra por gravedad.

2.1.1.b.iii. Destilación: Para iniciar con la fase de destilación del proceso de purificación del glicerol, se realizó un montaje de destilación simple, en el cual se suministró calor al sistema por un tiempo total de 4 horas hasta que la muestra alcanzara una temperatura de 90 °C (figura 20) y lograr extraer la mayor cantidad de metanol presente en la muestra [86].

Figura 20.

Montaje de destilación simple



Nota. Proceso de destilación mediante destilación simple.

2.1.1.b.iv. Decoloración: La etapa final del proceso de purificación del glicerol consiste en realizar la decoloración de la muestra obtenida posterior a la destilación, utilizando peróxido de hidrogeno al 60 % el cual actúa como sustancia decolorante, para realizar el proceso se consideró una relación 4:1 de glicerol: peróxido de hidrogeno respectivamente (figura 21), las condiciones de operación a las que se llevó a cabo la decoloración fueron; Temperatura de 80 °C a 400 rpm durante 30 minutos [85].

Figura 21.

Proceso de decoloración



Nota. Proceso de decoloración manteniendo agitación constante con un agitador orbital.

Posteriormente se procedió a filtrar la muestra y de esta manera concluyo el proceso de purificación, el resultado obtenido se puede evidenciar mediante la figura (22).

Figura 22.

Comparación del Glicerol crudo Bio D con el Glicerol Crudo BioD purificado



Nota. Glicerol crudo Bio D vs Glicerol Crudo BioD purificado.

Una vez culminado en su totalidad el proceso de purificación del glicerol crudo se procedió a realizar la misma caracterización descrita anteriormente, la cual comprende el contenido de glicerol en la muestra y la densidad de la misma.

2.1.1.c. Fermentación: Para el proceso de fermentación se preparó un medio de cultivo formulado con los siguientes nutrientes.

Tabla 7.

Contenido del medio de cultivo formulado

Medio de cultivo formulado	
Compuesto	Cantidades [g/L]
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,08
Na ₂ HPO ₄	1,60
KH ₂ PO ₄	2,00
MgSO ₄	0,50
Solución de microelementos	1 mL
Glicerol	5, 10, 20

Nota. Contenido del medio de cultivo formulado con las cantidades de cada compuesto respectivamente.

Debido a que no se contaba con una mezcla de oligoelementos o micronutrientes disponible, fue necesario realizar esta mezcla de manera manual considerando la siguiente composición.

Tabla 8.

Contenido de los micronutrientes

Solución de micronutrientes	
Compuesto	Cantidades [g/L]
FeSO ₄	2,00
CaCl ₂ •H ₂ O	2,00
CoCl ₂ •6H ₂ O	0,20
CuCl ₂ •2H ₂ O	0,01
NiCl ₃ •6H ₂ O	0,20
MnCl ₂ •4H ₂ O	0,03
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,10
H ₃ BO ₄	0,30
NaMoO ₄ •2H ₂ O	0,03

Nota. Contenido de los micronutrientes con las cantidades de cada compuesto respectivamente

La solución de micronutrientes fue preparada en ácido clorhídrico en 1 N.

El medio de cultivo formulado se dividió en tres erlenmeyers y se les varió la concentración de glicerol de la siguiente forma: (5, 10 y 20) g/L, (figura 23).

Figura 23.

Medios formulados en preparación con distintas concentraciones de fuente de carbono.



Nota. Preparación de los medios de cultivo implementando concentraciones de glicerol de (5, 10 y 20) g/L.

Una vez preparados los medios formulados se autoclavaron durante 15 min a 121 °C y 15 Psi y se agregaron los preinóculos en los erlenmeyers (figura 24), estos se sellaron y se llevaron al Shaker Heidolph durante 72 horas a 35 °C y 200 rpm (figura 25).

Figura 24.

Medios formulados autoclavados



Nota. Medios formulados esterilizados en autoclave.

Figura 25.

Montaje de fermentación.



Nota. Montaje de fermentación en Shaker a 35 °C y 200 rpm.

Figura 26.

Montaje de fermentación en ausencia de luz



Nota. Montaje de fermentación en ausencia de luz en Shaker a 35 °C y 200 rpm.

El Shaker Heidolph se cubrió con bolsas negras para evitar el ingreso de luz a los erlenmeyes durante el tiempo de fermentación (figura 26).

2.1.1.d. Extracción y purificación de polímero: Una vez culminado el proceso de fermentación, se debe realizar la extracción y purificación del polímero, se tomó en consideración el artículo “Recuperación de Poli- β -hidroxihexanoato-co-octanoato sintetizado por *Pseudomonas putida* mediante el uso de dispersiones hipoclorito-cloroformo” [87]. Por lo cual, se emplearon dispersiones de cloroformo e hipoclorito de sodio para la digestión del material celular y solubilización del polímero.

La relación peso de biomasa a volumen de dispersión implementada en el trabajo fue de 0,04 g biomasa / mL dispersión esto considerando que el rango de aceptación para dicha relación está entre (0,01 – 0,04) g biomasa / mL dispersión tal como lo establece Kwang [88] y Hahn [89]. El volumen de dispersión a trabajar se compone de una relación 1:1 de Cloroformo al 99 % e hipoclorito de sodio al 10 % [86].

Para llevar a cabo la digestión se precisa contar con biomasa seca (figura 27), por lo cual fue necesario realizar la separación de la biomasa del medio formulado (figura 28).

Una vez terminado el proceso de fermentación se dispuso a depositar todo el volumen de los erlenmeyers en tubos falcon, con el fin de centrifugar la muestra y lograr la separación de biomasa y medio requerida. Dicho proceso de centrifugación se llevó a cabo a 6.000 rpm durante 30 minutos, una vez culminado ese tiempo, se procedió a retirar el sobrenadante, asegurándose de contar con la menor cantidad de líquido, dichos tubos con biomasa húmeda se llevaron a secar a 50 °C por 12 horas en un horno de convección, con el fin de extraer toda el agua. Una vez pasado el tiempo de secado, se mantuvieron los tubos a temperatura ambiente, ya que la biomasa seca se encontraba pegada en las paredes del fondo del tubo falcon y realizar esta disminución en la temperatura facilitaba la extracción de la biomasa seca. Una vez realizado este proceso, se procedió a realizar la digestión en matraces erlenmeyer, dentro de un shaker durante un lapso de 1 hora y 30 minutos a 50 °C y 250 rpm (figura 29) [86].

Figura 27.

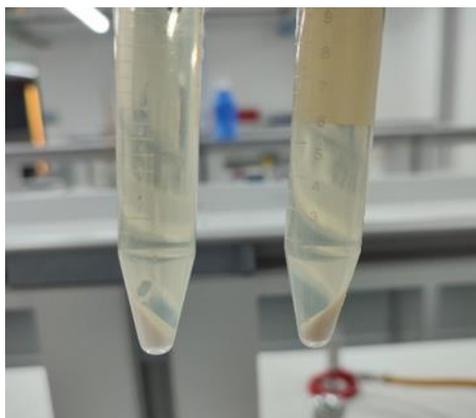
Biomasa seca



Nota. Biomasa seca en tubo falcon

Figura 28.

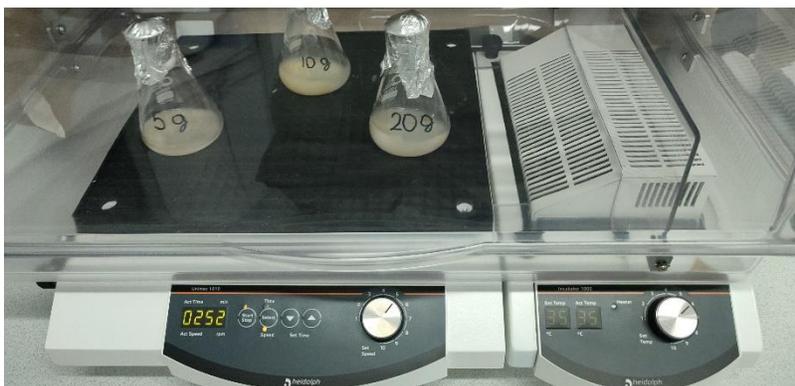
Biomasa precipitada



Nota. Biomasa precipitada con medio como sobrenadante.

Figura 29.

Proceso de digestión en Shaker Heidolph



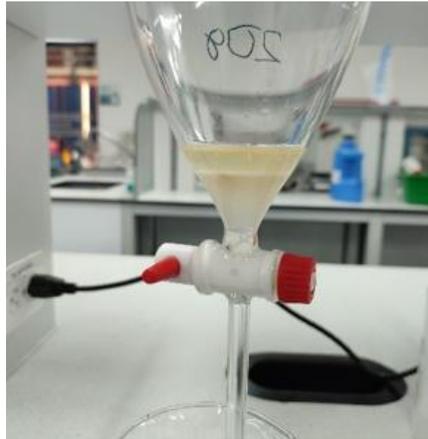
Nota. Proceso de digestión en Shaker Heidolph a 35 °C y 250 rpm.

Una vez finalizado el proceso de digestión se procedió a llevar las muestras a embudos de decantación con el objetivo de dejar decantando la muestra por 24 horas a temperatura ambiente. Se obtuvieron 3 fases; la fase superior, la cual contiene el hipoclorito de sodio, una fase intermedia, que cuenta con la biomasa muerta y por último la fase inferior, donde se encuentra el cloroformo con PHB (figura 30). Debido a que la fase de interés es la fase inferior, la cual contiene el PHB, se procedió a retirar dicha fase a tubos falcon abriendo la llave de paso del decantador, teniendo cuidado de no permitir el paso de la fase intermedia ni la fase superior (figura 31). Posteriormente, se procedió a evaporar el cloroformo, cuya temperatura de ebullición es de 61,2 °C por lo cual se

realizó la evaporación a una temperatura de 65 °C (figura 32) hasta alcanzar un volumen cercano al 20 % del volumen inicial [87].

Figura 30.

Proceso de decantación de la mezcla a partir de la digestión



Nota. Proceso de decantación de la mezcla a partir de la digestión, evidencia de tres fases.

Figura 31.

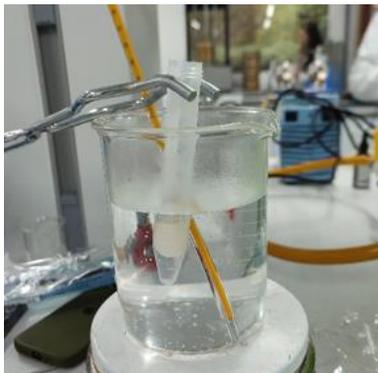
PHB con cloroformo precipitado



Nota. PHB con cloroformo precipitado en tubo falcon.

Figura 32.

Evaporación del cloroformo



Nota. Evaporación del cloroformo a 65 °C

El polímero se precipitó en metanol frío manteniendo una relación 1:5 en volumen de cloroformo a metanol por un tiempo de 1 hora. Para posteriormente centrifugar la muestra obtenida a 3.500 rpm durante 15 minutos, se procedió a retirar el sobrenadante y se dejó secando la muestra en un horno de convección a 37 °C por 48 horas. Una vez culminado este tiempo de secado, se obtuvo el biopolímero en polvo (figura 33) [86].

Figura 33.

PHB en polvo

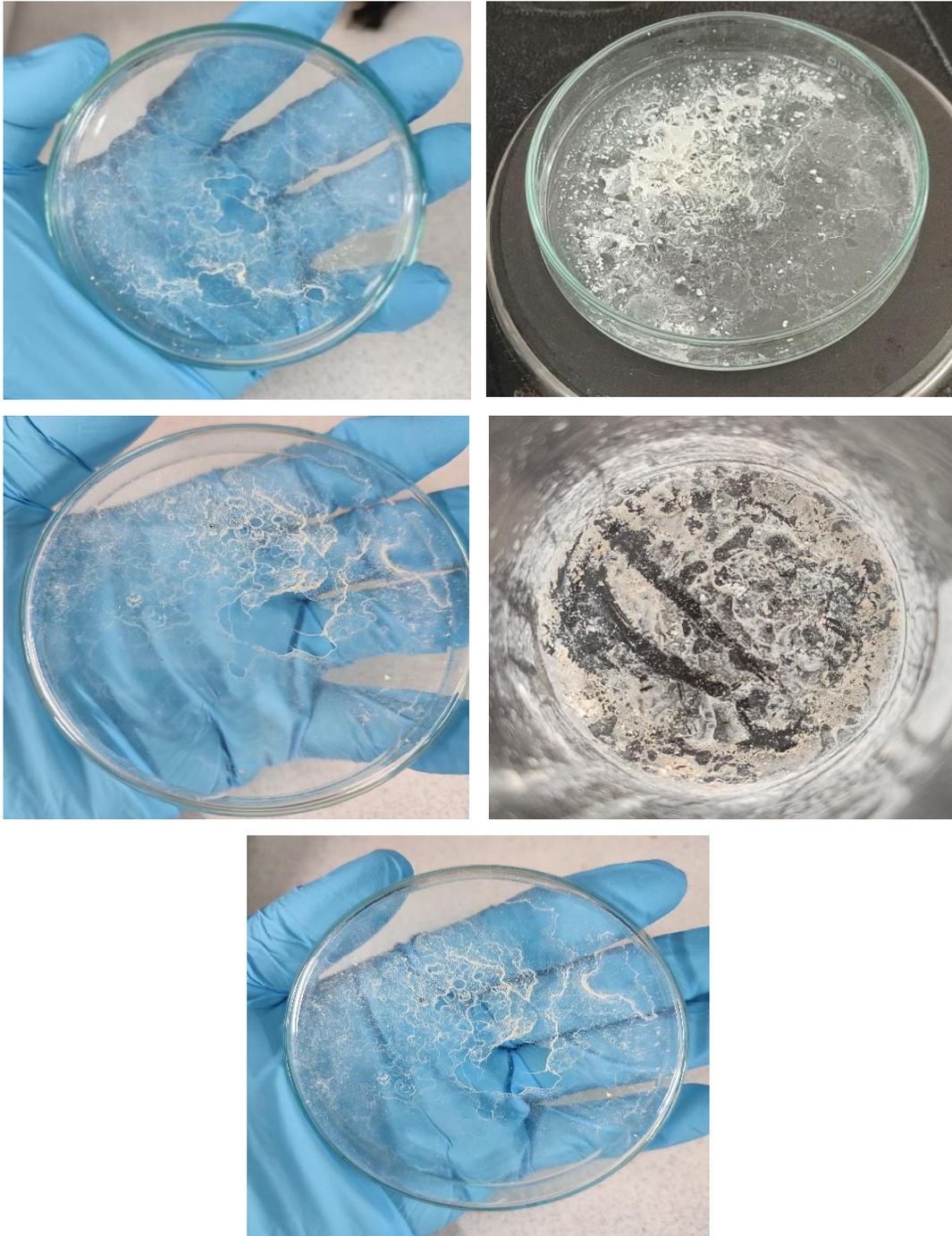


Nota. PHB en polvo almacenado en cajas petri.

Finalmente, con el fin de realizar la respectiva estructuración del biopolímero, se empleó una relación de 1 g:20 mL de PHB en polvo y cloroformo respectivamente, este procedimiento se realizó bajo una cámara de extracción por la naturaleza del cloroformo. Se calentó la muestra hasta 50 °C por un tiempo aproximado de 5 minutos, hasta ver la totalidad del cloroformo evaporado [86]. El resultado de PHB estructurado obtenido se puede evidenciar en la figura (34).

Figura 34.

PHB estructurado



Nota. PHB estructurado adherido a la base de cajas petri

2.1.2. Resultados

- El contenido de glicerol presente en la muestra recibida por la empresa BioD fue de 80,59 % y una vez realizado el proceso de purificación de glicerol se consiguió obtener un contenido de glicerol de 94,40 %.
- La densidad de la muestra recibida por la empresa BioD fue de 1,3506 g/mL y al culminar el proceso de purificación del glicerol la densidad de la mezcla obtuvo un nuevo valor de 1,3028 g/mL.
- De las fermentaciones realizadas se obtuvo en total 26,970 g de biomasa húmeda y 9,536 g de biomasa seca.
- La cantidad de polímero PHB en polvo como resultado del proceso de extracción y purificación de PHB fue de 5,609 g.

2.2. Objetivo 2: Seleccionar el microorganismo que presente mejor adaptación al residuo agroindustrial, al igual que las condiciones favorables para su crecimiento.

2.2.1. Metodología

Con el fin de cumplir con este objetivo, primero se realizó una matriz de selección para escoger el microorganismo más apto para el proceso, y en segundo lugar se realizó la activación del microorganismo seleccionado en diferentes medios de cultivo.

2.2.1.a Justificación de selección del microorganismo: Los aspectos considerados para el desarrollo de la matriz de selección fueron forma, tinción de Gram (la cual permite clasificar y diferenciar si se está trabajando con una bacteria gran positiva o gran negativa), metabolismo, respiración celular, pH de crecimiento, temperatura de crecimiento, rango de tolerancia de temperatura, fuentes de carbono, medios de cultivo, usos industriales y disponibilidad (figura 35).

Figura 35.

Matriz de selección cualitativa

Criterios de selección	Cupriavidus necátor	Bacillus Megaterium	Cita
Forma	Bacilo	Bacilo	[90]
Tinción de Gram	Gram negativa	Gram positiva	[90]
Metabolismo	Quimioheterótrofo obtienen su energía mediante la oxidación de compuestos orgánicos.	Quimioheterótrofo obtienen su energía mediante la oxidación de compuestos orgánicos.	[91]
Respiración celular	Aerobia: son capaces de sobrevivir, multiplicarse y desarrollarse en presencia de oxígeno.	Aerobia: son capaces de sobrevivir, multiplicarse y desarrollarse en presencia de oxígeno.	[91]
pH de crecimiento	6,5 a 7,5 su rango de tolerancia para el potencial de hidrógeno no es tan amplio.	5 a 9 presenta un rango de tolerancia para el potencial de hidrogeno es más grande.	[66]
Temperatura de crecimiento	Su rango de temperatura de mayor crecimiento es de (30 – 37) °C.	Su rango de temperatura de mayor crecimiento es de (25 – 37) °C.	[92]
Rango de tolerancia de temperatura	Pueden sobrevivir en un rango de temperatura de (0 – 45) °C.	Pueden sobrevivir en un rango de temperatura de (0 – 50) °C.	[92]
Fuentes de carbono	Hidrocarburos, ácidos grasos, Glicerina, Azucares e Hidrogeno.	Glucosa, Glicerina, Sacarosa, Almidón y Lactosa.	[93]
Medios de cultivo	Agar Luria -Bertani, Agar mineral y Agar Nutritivo.	Agar Nutritivo, Agar Tríptico de soya y Agar Sabouraud.	[93]
Usos industriales	Productos químicos, Bioplásticos (PHAs) y Biogás.	Medicamentos, Bioplásticos y Producción de enzimas.	[94]
Disponibilidad	El tiempo de envío es más de tres meses y el valor se la cepa es de 431 euros.	El tiempo de envío es de un mes, si se encuentra en stock y el valor de la cepa es de 77 euros.	[95]

Nota. Matriz de selección de microorganismo cualitativa.

Tabla 9.*Matriz de selección cuantitativa*

Factores	Peso (%)	Cupriavidus necator		Bacillus Megaterium	
		Calif.	Pond.	Calif.	Pond.
Forma	2	10	0,2	10	0,2
Tinción de Gram	5	10	0,5	10	0,5
Metabolismo	8	10	0,8	10	0,8
Respiración celular	9	10	0,9	10	0,9
pH de crecimiento	5	7	0,35	8	0,4
Temperatura de crecimiento	12	7	0,84	9	1,08
Rango de tolerancia de temperatura	11	8	0,88	10	1,1
Fuentes de carbono	7	8	0,56	7	0,49
Medios de cultivo	8	8	0,64	9	0,72
Usos industriales	8	9	0,72	9	0,72
Disponibilidad	25	6	1,5	10	2,5
TOTAL	100	-	7,89	-	9,41

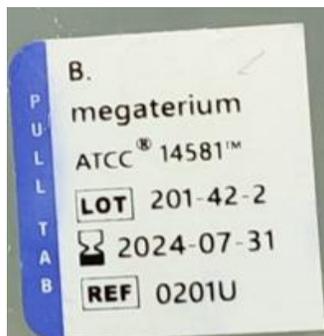
Nota. Matriz de selección de microorganismo cuantitativa

Mediante la tabla (9), donde se puede evidenciar el peso asignado correspondiente a cada criterio, al igual que la valoración para cada uno de los microorganismos y su respectivo peso ponderado, se puede evidenciar que la bacteria *Cupriavidus Necator* cuenta con una calificación total de 7,89 mientras que la bacteria *Bacillus Megaterium* cuenta con una valoración total de 9,41 por lo cual se realiza la elección de trabajar con la bacteria *Bacillus Megaterium* para el desarrollo del presente proyecto.

2.2.1.b. Activación de la bacteria: Como se mencionó anteriormente, la bacteria que fue seleccionada para el proceso fue *Bacillus Megaterium* ATCC 14581 (figura 36), esta bacteria se logró obtener mediante el laboratorio CMLAB S.A.S. en Bogotá – Castilla.

Figura 36.

Rotulo de la bacteria con su respectivo ATCC



Nota. Rotulo ATCC de la bacteria Bacillus Megaterium.

Para la activación de la bacteria se prepararon tres medios de cultivo, uno líquido y dos sólidos, el primer medio de cultivo sólido fue agar nutritivo y el segundo fue agar tréptico de soya. El medio de cultivo líquido fue caldo Sabouraud. Cada uno de estos medios fueron esterilizados en una autoclave por 15 min a 121 °C y a 15 Psi, después de auto clavar los medios de cultivo sólidos se dejaron solidificar cada uno en 4 cajas Petri respectivamente durante 12 horas.

Las bacterias llegaron en el método KWIK STIK™, cada uno de estos contiene un pellet de las bacterias liofilizadas en la parte inferior, una ampolla de líquido hidratante en la parte superior y un isopo de inoculación en la parte intermedia, todo dentro de el mismo KWIK STIK™ como se muestra en la figura (37).

Figura 37.

KWIK – STIK



Nota. KWIK-STIK imagen de referencia.

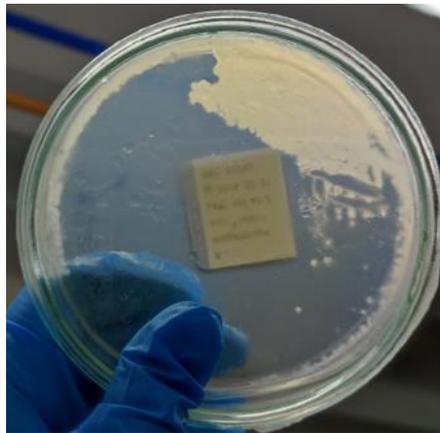
Primero se procedió rompiendo la ampollita con el líquido hidratante, posteriormente sin destapar el KWIK STIK™ se mezcló bien el líquido hidratante y el pellet liofilizado, con el fin de que el isopo absorbiera la mayor cantidad de muestra.

Inmediatamente se sacó el isopo del KWIK STIK™ y se sembró en los medios de cultivos con la técnica de estría por agotamiento con ayuda de un asa redonda, se sellaron las cajas Petri y se incubaron en un Shaker Heidolph 24 horas a 30 °C.

Obteniendo lo siguiente en los medios de cultivo:

Figura 38.

Agar nutritivo



Nota. Bacteria activada en agar nutritivo.

Figura 39.

Agar tréptico de soya



Nota. Bacteria activada en agar tréptico de soya.

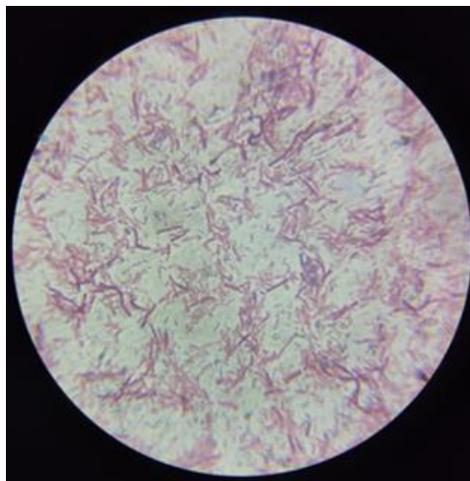
En las figuras (38) y (39) se presenta los medios de cultivo sembrados al cabo de 24 horas, la bacteria activada en agar nutritivo corresponde a la figura (38), mientras que la bacteria activada en agar tréptico de soya se evidencia en la figura (39).

2.2.1.c. Identificación de la bacteria: Una vez sembradas las bacterias en los medios de cultivo, y al cabo de 24 horas se lograban ver a simple vista las colonias de bacterias dentro de las cajas Petri. Para la identificación se utilizó el método de tinción de gram. Se tomó una colonia aislada con el asa redonda y se fijó en el portaobjetos, primero se aplicó una gota de Cristal violeta con el fin de pintar las paredes de las bacterias gram positivas, se dejó actuar por 1 minuto y se lavó con agua desionizada. Después de agregó una gota de Lugol se dejó actuar por 1 minuto y se retiró nuevamente. Posteriormente se agregó una gota de alcohol acetona para limpiar el exceso de colorantes, por 30 segundos y se retiró. Por último, se agregó una gota de safranina con el fin de hacer el contraste con las bacterias gram negativas y se dejó actuar por 1 minuto y se retiró con abundante agua desionizada [90].

Después de terminar la tinción se agregó una gota de aceite de inmersión, y se observó la muestra desde objetivo 100X en el microscopio de marca Advanced Optical como se muestra en la figura (40).

Figura 40.

Vista microscópica de bacterias



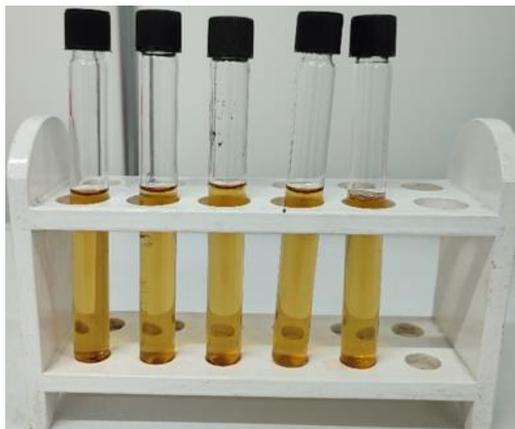
Nota. Vista desde microscopio desde objetivo 100X de bacteria bacillus megaterium.

2.2.1.d. Preinóculo: Antes de la fermentación se preparó un preinóculo, para adaptar las bacterias que se encontraban en un medio sólido a un medio líquido, con el fin de asegurar un crecimiento rápido y abundante para optimizar la fermentación. Primero se preparó un caldo tréptico de soya que se autoclavó a 121 °C y 15 Psi por 15min.

Posteriormente se vertieron 12 mL del caldo en 3 tubos de ensayo con tapa rosca (figura 41), después se tomó una colonia aislada de una de las cajas Petri con el asa redonda y se insertó en un tubo de ensayo, (esto se realizó con cada uno de los tubos de ensayo) se selló y se dejaron todos los preinóculos en el Shaker Heidolph durante 48 horas a 35 °C y 200 rpm.

Figura 41.

Preinóculo de bacteria



Nota. Preinóculo de la bacteria bacillus megaterium

2.2.2. Resultados

- Después de las 24 horas de la activación, se pudo evidenciar que en el medio de cultivo líquido (Caldo Sabouraud) no crecieron colonias, por este motivo se decidió que los preinóculos se realizarían en caldo tréptico de soya.
- Se incubaron las bacterias a 30 °C y 35 °C. Después de 24 horas se pudo evidenciar de forma cualitativa que la temperatura que más favorece el crecimiento de las bacterias es de 35 °C.

2.3. Objetivo 3: Identificar las condiciones de operación en el proceso de producción de termoplásticos biodegradables mediante el aprovechamiento del glicerol

2.3.1. Metodología

Con el fin de identificar las condiciones de operación en el proceso de producción de termoplásticos biodegradables mediante el aprovechamiento del glicerol, fue necesario contar con diversos escenarios en las etapas de; preparación de preinóculo, fermentación y digestión. Modificando algunas variables manipuladas y evidenciando el comportamiento sobre la variable de respuesta de interés.

2.3.1.a. Preinóculo: Para conocer las condiciones de operación para la producción de biomasa inicial durante el preinóculo, fue necesario variar la temperatura, el tiempo y las revoluciones por minuto durante todo el proceso.

Este proceso se realizó cuatro veces, en el primer grupo se llevó a cabo por 24 horas a 30 °C y sin agitación, mientras que el segundo grupo se realizó durante 48 horas a 35 °C y sin agitación.

Después, las condiciones implementadas en el tercer grupo fueron 48 horas a 30 °C y 100 rpm y el último grupo se realizó en 48 horas a 35 °C y 200 rpm.

2.3.1.b. Fermentación: Para identificar la viabilidad de los preinóculos se realizaron cuatro grupos de fermentaciones, en donde se variaron las condiciones de temperatura, revoluciones por minuto y adicionalmente, se evaluaron distintas concentraciones de fuente de carbono.

Todas las fermentaciones se realizaron durante 72 horas en ausencia de luz, con (5, 10 y 20) g/L de glicerol como única fuente de carbono en tres erlenmeyes diferentes.

La primera y la segunda fermentación se realizaron sin agitación a una temperatura de 30 °C y 35 °C respectivamente.

La tercera y la cuarta fermentación se llevaron a cabo a 30 °C y 35 °C respectivamente, con agitación constante de 200 rpm.

2.3.1.c. Digestión: El proceso de digestión es un proceso crítico en la producción de polihidroxialcanoatos a partir de glicerol mediante fermentación microbiana ya que es donde se va a realizar la extracción del producto de interés, en este caso el PHB. Por ende, se evaluaron distintos escenarios con el fin de evidenciar mediante qué condiciones de operación se obtenía el mayor contenido de PHB en polvo. Se realizaron distintas digestiones, en las cuales se evaluó la influencia que tenían la temperatura, tiempo y relación entre biomasa y volumen de dispersión como variables manipuladas en el rendimiento del proceso como variable de respuesta. Todas las variables manipuladas fueron consideradas cuantitativas y los valores que fueron considerados fueron los siguientes: Temperatura (30 °C y 50 °C), tiempo (45 minutos y 90 minutos) y por último la relación entre biomasa y volumen de dispersión (0,2 g biomasa / mL dispersión y 0,4 g biomasa / mL dispersión).

2.3.2. Resultados

2.3.2.a. Tablas de fermentación

2.3.2.a.i. Primera fermentación

Tabla 10.

Datos de la primera fermentación

Tubo	5 g/L glicerol			10 g/L glicerol			20 g/L glicerol		
	T vacío (g)	Biomasa (g)		T vacío (g)	Biomasa (g)		T vacío (g)	Biomasa (g)	
		Húmeda	Seca		Húmeda	Seca		Húmeda	Seca
1	6,431	6,63	6,44	6,289	6,459	6,322	6,415	6,631	6,429
2	6,173	6,314	6,18	6,336	6,521	6,343	6,283	6,409	6,296
3	6,180	6,363	6,189	6,248	6,44	6,255	6,17	6,379	6,241
4	6,239	6,418	6,248	6,292	6,503	6,376	6,361	6,611	6,373
5	6,379	6,535	6,384	6,279	6,446	6,285	6,264	6,533	6,296
6	6,182	6,371	6,191	6,337	6,543	6,344	6,322	6,531	6,335
7	6,307	6,454	6,386	6,182	6,385	6,188	6,339	6,607	6,383
8	6,181	6,373	6,192	6,322	6,578	6,329	6,335	6,669	6,372

Nota. Datos de biomasa seca y biomasa húmeda obtenida de la primera fermentación

2.3.2.a.ii. Segunda fermentación

Tabla 11.

Datos de la segunda fermentación

Tubo	5 g/L glicerol			10 g/L glicerol			20 g/L glicerol		
	T vacío (g)	Biomasa (g)		T vacío (g)	Biomasa (g)		T vacío (g)	Biomasa (g)	
		Húmeda	Seca		Húmeda	Seca		Húmeda	Seca
1	6,198	6,395	6,206	6,36	6,562	6,405	6,32	6,541	6,462
2	6,36	6,568	6,373	6,19	6,358	6,232	6,231	6,454	6,352
3	6,322	6,595	6,351	6,344	6,591	6,461	6,343	6,572	6,389
4	6,356	6,668	6,378	6,175	6,367	6,207	6,432	6,629	6,561
5	6,483	6,683	6,495	6,322	6,598	6,441	6,367	6,597	6,433
6	6,374	6,593	6,387	6,371	6,438	6,482	6,41	6,631	6,595
7	6,356	6,574	6,379	6,281	6,484	6,398	6,179	6,387	6,215
8	6,188	6,405	6,232	6,301	6,651	6,417	6,267	6,433	6,286

Nota. Datos de biomasa seca y biomasa húmeda obtenida de la segunda fermentación.

2.3.2.a.iii. Tercera fermentación

Tabla 12.

Datos de la tercera fermentación

Tubo	5 g/L glicerol			10 g/L glicerol			20 g/L glicerol		
	T vacío (g)	Biomasa (g)		T vacío (g)	Biomasa (g)		T vacío (g)	Biomasa (g)	
		Húmeda	Seca		Húmeda	Seca		Húmeda	Seca
1	6,331	6,875	6,378	6,318	6,537	6,471	6,356	6,62	6,387
2	6,363	6,837	6,412	6,188	6,609	6,363	6,483	6,779	6,529
3	6,311	6,712	6,401	6,251	6,631	6,452	6,374	6,635	6,404
4	6,324	6,735	6,380	6,222	6,568	6,334	6,239	6,460	6,298
5	6,360	6,648	6,389	6,205	6,532	6,289	6,418	6,680	6,563
6	6,322	6,798	6,453	6,441	6,817	6,626	6,298	6,513	6,348
7	6,30	6,849	6,387	6,365	6,851	6,578	6,198	6,449	6,228
8	6,451	6,921	6,528	6,169	6,792	6,414	6,264	6,570	6,486

Nota. Datos de biomasa seca y biomasa húmeda obtenida de la tercera fermentación.

2.3.2.a.iv. Cuarta fermentación

Tabla 13.

Datos de la cuarta fermentación

Tubo	5 g/L glicerol			10 g/L glicerol			20 g/L glicerol		
	T vacío (g)	Biomasa (g)		T vacío (g)	Biomasa (g)		T vacío (g)	Biomasa (g)	
		Húmeda	Seca		Húmeda	Seca		Húmeda	Seca
1	6,190	6,486	6,336	6,420	6,705	6,538	6,198	6,523	6,288
2	6,337	6,658	6,470	6,613	6,937	6,726	6,307	6,743	6,400
3	6,342	6,643	6,499	6,330	6,641	6,436	6,226	6,571	6,382
4	6,165	6,422	6,286	6,445	6,732	6,477	6,344	6,938	6,721
5	6,362	6,653	6,471	6,436	6,919	6,708	6,367	6,753	6,559
6	6,375	6,698	6,497	6,371	6,634	6,417	6,252	6,665	6,524
7	6,436	6,894	6,660	6,281	6,625	6,555	6,664	7,007	6,815
8	6,252	6,578	6,285	6,552	6,994	6,795	6,254	6,597	6,422

Nota. Datos de biomasa seca y biomasa húmeda obtenida de la cuarta fermentación.

En las tablas anteriores (10), (11), (12), y (13) se observan los pesos de los tubos falcon vacíos, los tubos con la biomasa húmeda y los tubos con la biomasa seca en cada una de las fermentaciones. Por otro lado, mediante las tablas (14), (15), (16) y (17) se evidencian los valores obtenidos de biomasa húmeda y seca de cada una de las fermentaciones.

Tabla 14.

Valores de biomasa húmeda y seca de la primera fermentación

Biomasa húmeda (g)		
5 g/L	10 g/L	20 g/L
0,199	0,17	0,216
0,141	0,185	0,126
0,183	0,192	0,209
0,179	0,211	0,25
0,156	0,167	0,269
0,189	0,206	0,209
0,147	0,203	0,268
0,192	0,256	0,334
1,386	1,59	1,881
TOTAL		4,857

Biomasa seca (g)		
5 g/L	10 g/L	20 g/L
0,009	0,033	0,014
0,007	0,007	0,013
0,009	0,007	0,071
0,009	0,084	0,012
0,005	0,006	0,032
0,009	0,007	0,013
0,079	0,006	0,044
0,011	0,007	0,037
0,138	0,157	0,236
TOTAL		0,531

Nota. Valores de biomasa húmeda y seca de la primera fermentación.

Tabla 15.

Valores de biomasa húmeda y seca de la segunda fermentación.

Biomasa húmeda (g)		
5 g/L	10 g/L	20 g/L
0,197	0,202	0,221
0,208	0,168	0,223
0,273	0,247	0,229
0,312	0,192	0,197
0,2	0,276	0,23
0,219	0,067	0,221
0,218	0,203	0,208
0,217	0,35	0,166
1,844	1,705	1,695
TOTAL		5,244

Biomasa seca (g)		
5 g/L	10 g/L	20 g/L
0,008	0,045	0,142
0,013	0,042	0,121
0,029	0,117	0,046
0,022	0,032	0,129
0,012	0,119	0,066
0,013	0,111	0,185
0,023	0,117	0,036
0,044	0,116	0,019
0,164	0,699	0,744
TOTAL		1,607

Nota. Valores de biomasa húmeda y seca de la segunda fermentación.

Tabla 16.

Valores de biomasa húmeda y seca de la tercera fermentación.

Biomasa húmeda (g)		
5 g/L	10 g/L	20 g/L
0,365	0,219	0,544
0,306	0,169	0,474
0,261	0,38	0,401
0,259	0,346	0,411
0,281	0,227	0,288
0,215	0,256	0,476
0,251	0,486	0,449
0,315	0,623	0,37
2,253	2,706	3,413
TOTAL		8,372

Biomasa seca (g)		
5 g/L	10 g/L	20 g/L
0,225	0,036	0,278
0,162	0,035	0,230
0,096	0,011	0,151
0,130	0,181	0,056
0,076	0,114	0,091
0,072	0,086	0,237
0,074	0,251	0,200
0,185	0,536	0,133
1,019	1,251	1,376
TOTAL		3,647

Nota. Valores de biomasa húmeda y seca de la tercera fermentación.

Tabla 17.

Valores de biomasa húmeda y seca de la cuarta fermentación.

Biomasa húmeda (g)		
5 g/L	10 g/L	20 g/L
0,296	0,285	0,325
0,321	0,324	0,436
0,301	0,311	0,345
0,257	0,287	0,594
0,291	0,483	0,386
0,323	0,263	0,413
0,458	0,344	0,343
0,326	0,442	0,343
2,573	2,739	3,185
TOTAL		8,497

Biomasa seca (g)		
5 g/L	10 g/L	20 g/L
0,146	0,118	0,090
0,133	0,113	0,093
0,157	0,106	0,156
0,121	0,032	0,377
0,109	0,272	0,192
0,122	0,046	0,272
0,224	0,274	0,151
0,033	0,243	0,168
1,046	1,205	1,501
TOTAL		3,751

Nota. Valores de biomasa húmeda y seca de la cuarta fermentación.

Tabla 18.*Valores de biomasa húmeda y seca de la segunda fermentación.*

Rendimiento ($Y_{x/s}$)			
Fermentación	Fuente de carbono		
	5 g / L	10 g / L	20 g / L
1	0.277	0.159	0.094
2	0.369	0.171	0.085
3	0.451	0.271	0.171
4	0.515	0.274	0.159

Nota. Valores de biomasa húmeda y seca de la segunda fermentación.

Mediante la tabla (18) se consolidan los datos obtenidos de rendimientos de biomasa sustrato ($Y_{x/s}$) en las cuales se sumó la cantidad de biomasa total obtenida en cada una de las réplicas por concentración de fuente de carbono.

Tablas de digestión

Los resultados obtenidos mediante cada una de las digestiones que fueron realizadas a distintas condiciones de operación se presentan en la tabla (19).

Tabla 19.*Resultados obtenidos en el proceso de digestión*

Tiempo (min)	Temperatura (°C)		Temperatura (°C)	
	30		50	
	Relación (g biomasa / mL dispersión)		Relación (g biomasa / mL dispersión)	
	0,2	0,4	0,2	0,4
45	0,280	0,449	0,393	0,673
90	0,673	1,010	0,897	1,234

Nota. Resultados obtenidos en el proceso de digestión.

Considerando que la biomasa seca obtenida en cada una de las réplicas de la fermentación fue mezclada, el total de biomasa masa seca obtenida de la fermentación fue de 9,536 g y el total de polímero en polvo obtenido del proceso de digestión fue de 5,609 g se procede a realizar los respectivos cálculos de rendimiento y de recuperación.

Para el cálculo del rendimiento se implementó la siguiente ecuación:

$$\eta = \frac{P.O}{B.S} * 100 \quad (3)$$

Donde;

η = Rendimiento (%)

P.O = Polímero obtenido

B.S = Biomasa seca

Obteniendo como resultado

$$\eta = 58,82 \%$$

Para realizar el cálculo de la recuperación es necesario conocer el rendimiento teórico, el cual tiene un valor de 98 % y se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Rendimiento experimental}}{\text{Rendimiento teórico}} * 100 \quad (4)$$

Obteniendo como % de Recuperación un valor de:

$$\text{Recuperación} = 60,02 \%$$

A continuación, se puede evidenciar la tabla (20) la cual consolida los datos anteriormente mencionados

Tabla 20.

Recopilación de resultados

Biomasa húmeda (g)	Biomasa seca (g)	Polímero obtenido (g)	Rendimiento (%)	Recuperación (%)
26,970	9,536	5,609	58,82	60,02

Nota. Recopilación de resultados.

- Una vez realizados los cuatro grupos de preinóculos con diferentes condiciones de operación, se pudo evidenciar de forma cualitativa que el preinóculo que produjo mayor cantidad de biomasa fue el que opero por 48 horas con una temperatura de 35 °C y contaba con agitación continúa de 200 rpm.
- Se observo de manera cualitativa y cuantitativa que la fermentación que produjo mayor cantidad de biomasa fue la que opero a 35 °C con 200 rpm y 20 g de fuente de carbono.

- La mayor cantidad de PHB en polvo producido en el proceso de extracción y purificación del termoplástico, fue implementando las siguientes condiciones de operación en la digestión: Temperatura de 50 °C, durante 90 minutos y considerando una relación de 0,4 g biomasa / mL dispersión.

2.4. Objetivo 4: Comparar el termoplástico obtenido mediante el aprovechamiento de un residuo agroindustrial con el termoplástico convencional

2.4.1. Metodología

Una vez obtenida la estructura del polímero deseado, se procedió a realizar distintas pruebas al material con el fin de lograr una comparación entre el termoplástico obtenido experimentalmente con un termoplástico convencional. Considerando que el PHB puede reemplazar al polietileno de baja densidad se realizó la respectiva comparación con film adhesivo, el cual es un tipo de plástico que se fabrica con una película de polietileno de baja densidad (LDPE) y es comúnmente conocido como papel vinipel, su respectiva ficha técnica se encuentra en el (Anexo 4).

Inicialmente se procedió a adherir las respectivas láminas de plástico a cajas Petri.

Para el termoplástico obtenido experimentalmente, se agregó PHB en polvo en dos cajas Petri y se puso en contacto con cloroformo en una relación de (1 g:20 mL) respectivamente. Se procedió a calentar la caja Petri hasta observar que el cloroformo se evaporara en su totalidad y de esa manera se obtuvo la lámina de PHB adherida a la caja Petri.

Para adherir la lámina de papel vinipel, se procedió a depositar la muestra de plástico en la caja Petri y posteriormente someter la caja a calentamiento hasta observar que la lámina se haya adherido en su totalidad, las muestras de plástico adheridas se pueden evidenciar mediante las figuras (27) y (28):

Figura 42.

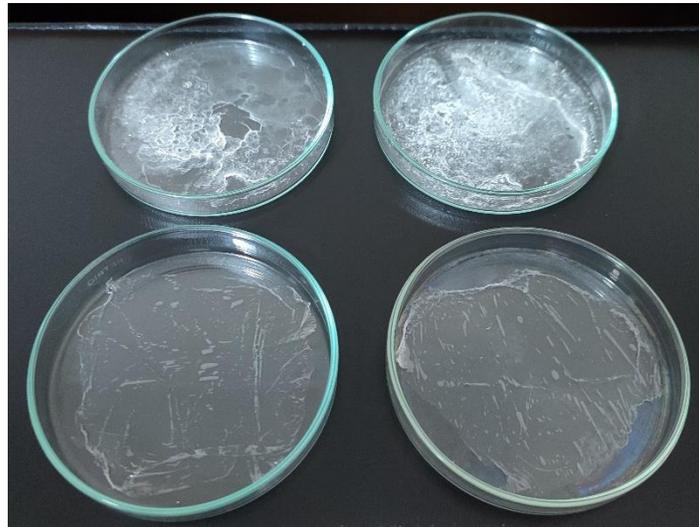
Film adherente y PHB obtenido experimentalmente



Nota. Film adherente y PHB obtenido experimentalmente adheridos en cajas Petri.

Figura 43.

Film adherente y PHB obtenido experimentalmente



Nota. Film adherente y PHB obtenido experimentalmente adheridos en cajas Petri sin tapa.

Una vez listas las cajas Petri con las respectivas muestras, se procedió a realizar las pruebas de degradabilidad y solubilidad de manera cualitativa. Para esto se sumergió en su totalidad las láminas en agua y etanol respectivamente, controlando las condiciones ambientales a las que serían

expuestas por un total de 60 horas y realizando un registro fotográfico del comportamiento que tienen las muestras cada 12 horas.

Para diferenciar las pruebas que serían realizadas en cada caja Petri se procedió a rotular las cajas de la siguiente manera

Tabla 21.

Condiciones prueba de Solubilidad

Prueba Solubilidad				
Caja Petri	Rotulo	Termoplástico	Cantidad	Sustancia
1	A	Experimental	25 mL	Etanol
2	A'	Convencional	25 mL	

Nota. Condiciones prueba Solubilidad.

Tabla 22.

Condiciones pruebas de Degradabilidad

Prueba Degradabilidad				
Caja Petri	Rotulo	Termoplástico	Cantidad	Sustancia
3	B	Experimental	20 mL	Agua
4	B'	Convencional	20 mL	

Nota. Condiciones prueba degradabilidad.

Mediante las tablas (21) y (22) se puede evidenciar el tipo de prueba que será realizada en cada una de las cajas Petri, el número de caja Petri con su respectivo rotulo, que tipo de termoplástico se encuentra en cada caja, cual es la cantidad y la sustancia en la cual estará inmersa la muestra de plástico.

Adicionalmente, aparte de realizar las pruebas de degradabilidad y de solubilidad, también se llevaron a cabo pruebas ópticas del termoplástico obtenido y una prueba mecánica de resistencia del material, todas las pruebas realizadas al material se realizaron de manera cualitativa.

Para la prueba óptica del material, cuyo objetivo principal es determinar la cantidad de luz capaz de atravesar el material. Se procedió a tener una lámina adherida en una caja Petri y analizar de manera visual, si es posible ver a través del polímero y si se permite el paso o no de luz a través del material. Por otro lado, para determinar el grado de resistencia del polímero obtenido de manera cualitativa, se procedió a presionar el material con la mano y rayar la pieza con ayuda de un asa, posteriormente, mediante inspección visual se procedió a evaluar la resistencia del material.

Tanto la prueba óptica como la mecánica, fue realizada al termoplástico obtenido experimentalmente y al termoplástico convencional (papel vinipel) con el fin de realizar la respectiva comparación entre materiales.

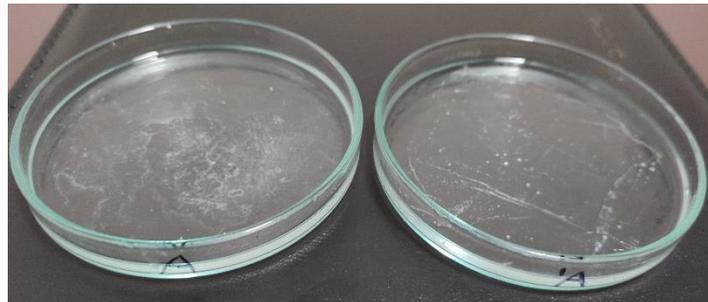
2.4.2. Resultados

Tal como se explicó en la sección metodológica del desarrollo del objetivo 4, se realizaron pruebas cualitativas de degradabilidad y solubilidad, las pruebas tuvieron una duración de 60 horas en las cuales se realizó un registro fotográfico del material sumergido en la respectiva sustancia cada 12 horas, los resultados correspondientes a la prueba de solubilidad se pueden evidenciar mediante las ilustraciones (29), (30), (31), (32), (33) y (34), mientras que los resultados para la prueba de degradabilidad mediante las ilustraciones (35), (36), (37), (38), (39) y (40).

2.4.2.a. Solubilidad

Figura 44.

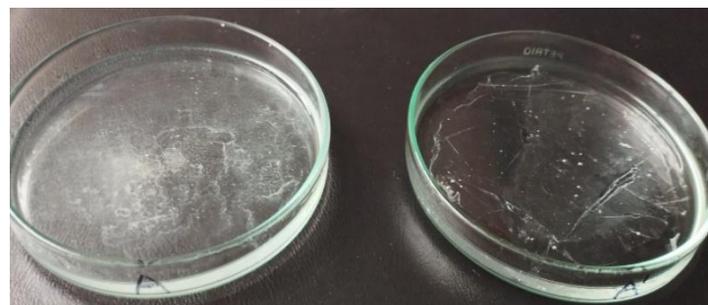
Prueba solubilidad – Tiempo = 0 horas.



Nota. Prueba solubilidad al cabo de 0 horas.

Figura 45.

Prueba solubilidad – Tiempo = 12 horas.



Nota. Prueba solubilidad al cabo de 12 horas.

Figura 46.

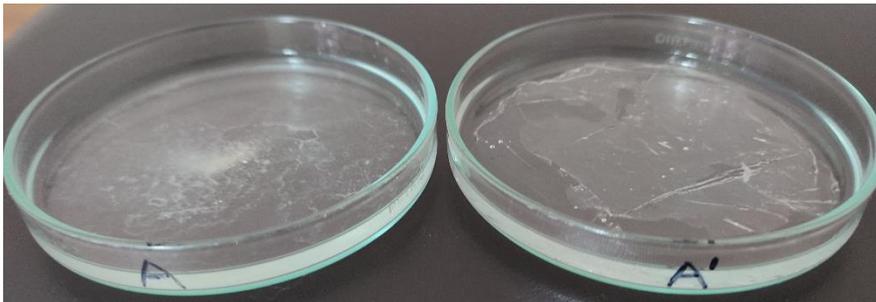
Prueba solubilidad – Tiempo = 24 horas.



Nota. Prueba solubilidad al cabo de 24 horas.

Figura 47.

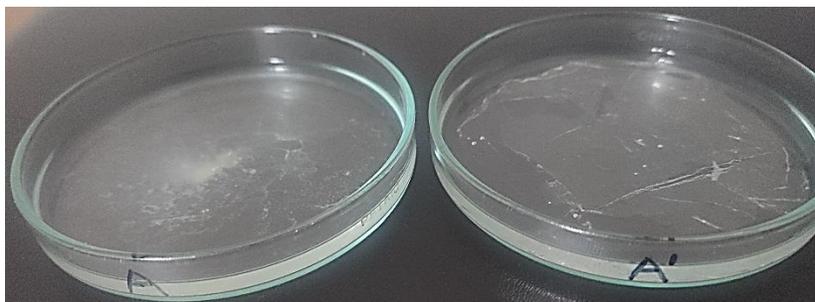
Prueba solubilidad – Tiempo = 36 horas.



Nota. Prueba solubilidad al cabo de 36 horas.

Figura 48.

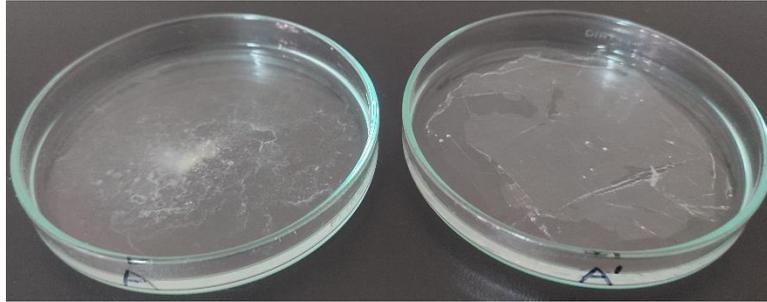
Prueba solubilidad – Tiempo = 48 horas



Nota. Prueba solubilidad al cabo de 48 horas.

Figura 49.

Prueba solubilidad – Tiempo = 60 horas

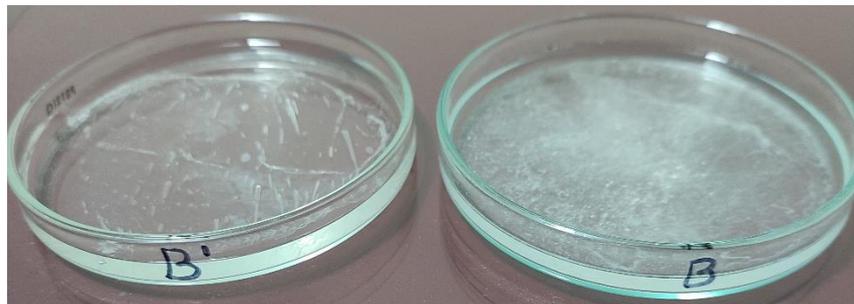


Nota. Prueba solubilidad al cabo de 60 horas.

2.4.2.b. Degradabilidad

Figura 50.

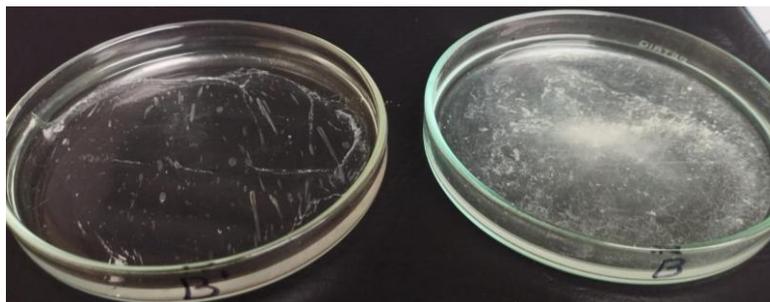
Prueba degradabilidad – Tiempo = 0 horas.



Nota. Prueba degradabilidad al cabo de 0 horas.

Figura 51.

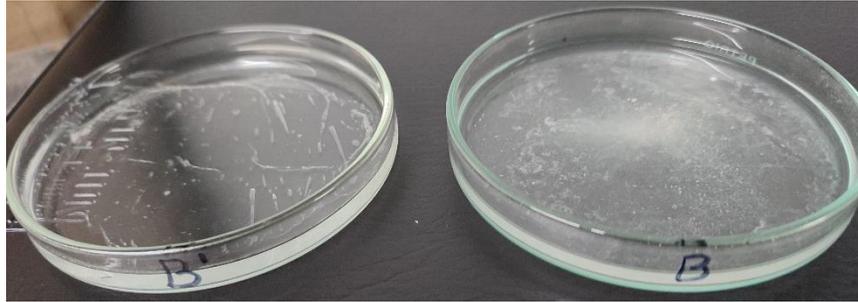
Prueba degradabilidad – Tiempo = 12 horas.



Nota. Prueba degradabilidad al cabo de 12 horas.

Figura 52.

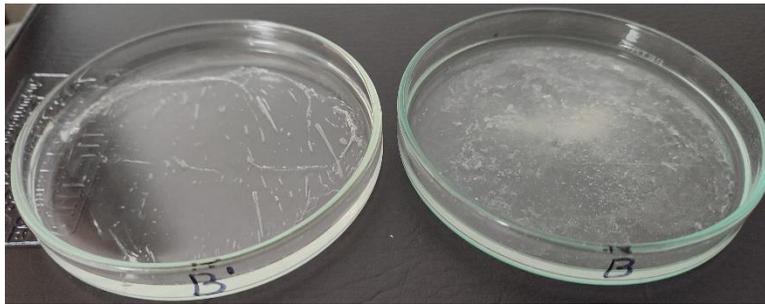
Prueba degradabilidad – Tiempo = 24 horas



Nota. Prueba degradabilidad al cabo de 24 horas.

Figura 53.

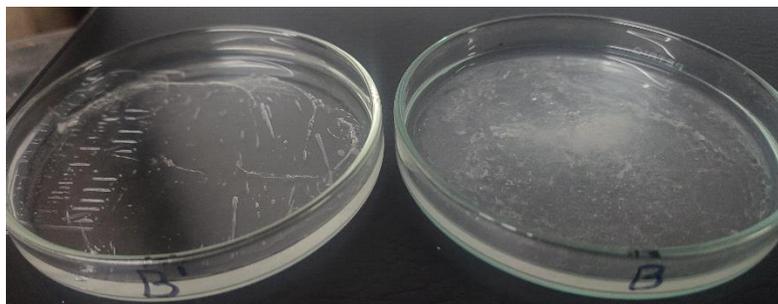
Prueba degradabilidad – Tiempo = 36 horas.



Nota. Prueba degradabilidad al cabo de 36 horas.

Figura 54.

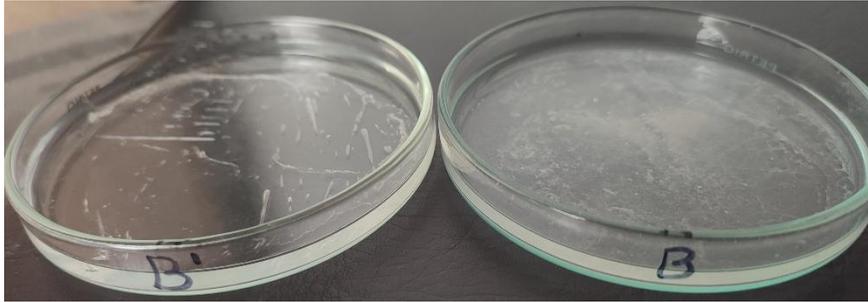
Prueba degradabilidad – Tiempo = 48 horas.



Nota. Prueba degradabilidad al cabo de 48 horas.

Figura 55.

Prueba degradabilidad – Tiempo = 60 horas.



Nota. Prueba degradabilidad al cabo de 60 horas.

2.4.2.c. Ópticas: Los resultados obtenidos mediante las pruebas ópticas realizadas permitieron evidenciar que el termoplástico obtenido tiene un comportamiento translucido, ya que permite un paso parcial de la luz a través de él, sin embargo, no permite una visión totalmente clara de los objetos que se encuentran detrás. Por otro lado, el film adherente que se utilizó para realizar la respectiva comparación se evidencia que es un tipo de plástico transparente ya que permite el paso claro y sin distorsiones de la luz a través de él.

2.4.2.d. Mecánicas: Al realizar la prueba de esfuerzo mecánica de presión y rayadura sobre la muestra de termoplástico obtenida experimentalmente se evidencio un comportamiento semirrígido, ya que era fácil distinguir una resistencia estructural con cierta flexibilidad y maleabilidad. Por el otro lado el film adherente tuvo un comportamiento semirrígido y flexible característico de este tipo de polietileno de baja densidad.

3. ANÁLISIS Y DISCUSIONES

3.1. Análisis de cada uno de los objetivos

3.1.1. Objetivo 1

Determinar la viabilidad del aprovechamiento del glicerol como materia prima para la producción de termoplásticos.

3.1.1.a. Viabilidad del aprovechamiento del glicerol: Mediante los resultados obtenidos correspondientes al cumplimiento del primer objetivo, se puede analizar que la selección de un correcto tren de separación para la purificación del glicerol crudo es fundamental, ya que tal como lo establece Naranjo [3], “Los microorganismos se ven afectados por la concentración de sales y otras impurezas presentes en el glicerol crudo” por lo cual es de suma relevancia contar con la mayor pureza de glicerol y de esta manera lograr favorecer la productividad de PHB. El glicerol obtenido por la industria BioD, se considera un producto de excelente calidad ya que cuenta con un grado de pureza de 80,59 %, lo que indica que previo a su comercialización, el glicerol es sometido a cierto proceso de purificación. El tren de separación seleccionado en este trabajo, el cual se componía de 4 etapas principales; acidificación, neutralización, destilación y decoloración, pese a ser un proceso cuyo consumo energético es elevado debido a la alta capacidad calorífica del glicerol, se obtienen altos rendimientos en términos de producción de glicerina de alta pureza. Al contrastar los resultados obtenidos en este proceso, donde se obtuvo una pureza de glicerol de 94,40 %, con el trabajo realizado por los autores Aguzin, Bedogni, Okuli y Padró [85], donde obtuvieron una pureza de 95 % se evidencia que el proceso de separación fue el adecuado y se encuentra soportado tanto experimental como teóricamente, para su posterior aprovechamiento en la producción de PHB. Por otro lado, se puede evidenciar los resultados de densidad obtenidos tanto de la muestra de glicerol recibida por la empresa BioD como la densidad obtenida posterior a ser sometida al tren de separación. El glicerol puro cuenta con una densidad de $1,26 \text{ g/cm}^3$ e inicialmente el glicerol crudo recibido contaba con una densidad de $1,3506 \text{ g/cm}^3$. Posterior al proceso de purificación la densidad del glicerol crudo de trabajo sufrió una disminución en su densidad obteniendo como nuevo resultado $1,3028 \text{ g/cm}^3$ lo cual demuestra que cada vez se asemeja más a las características del glicerol puro, lo que indica que el glicerol obtenido por la industria BioD como un co producto de la producción de biodiesel es una excelente opción para el aprovechamiento en la producción de termoplásticos.

En cuanto al proceso de fermentación, se evidencia que inicialmente se obtuvo una biomasa húmeda total de 26,970 g, y al realizar el respectivo proceso de secado para eliminar la humedad, se obtuvo un total de biomasa seca de 9,536 g, lo cual indica que hubo una disminución del 64,64 %, esto se debe a que al momento de trabajar con microorganismos, en este caso específico con bacterias, existen varios factores que pueden afectar su rendimiento, como lo son; condiciones ambientales, entre las que se encuentra la temperatura, el pH, la humedad, disponibilidad de oxígeno. Por otro lado, la fuente de los nutrientes, es fundamental contar con buena disponibilidad y calidad de nutrientes para el óptimo crecimiento y desempeño de las bacterias. Asimismo, la presencia de contaminación y el estrés celular pueden afectar el rendimiento, considerando que este trabajo fue realizado netamente experimental y se realizaba en un laboratorio de bioprocesos en el cual se desarrollaban distintos proyectos con otro tipo de microorganismos este último criterio pudo haber tenido influencia en el rendimiento. Todos estos son factores que pueden afectar directamente en el rendimiento de producción.

En cuanto al proceso de extracción y purificación del PHB, el cual tuvo como proceso crítico la digestión, se evidencia que las condiciones a las que se realizó el proceso fueron las adecuadas ya que inicialmente se contaba con 9,536 g de biomasa seca de la cual se obtuvo 5,609 g de PHB en polvo, esto permitiendo obtener un rendimiento de 58,82 % lo cual, al ser comparado con distintos Naranjo [3], Astudillo y Olmedo [86] , se encuentra en un rango adecuado.

Mediante los análisis realizados anteriormente en cada una de las etapas del proceso de producción de PHB a partir de glicerol mediante fermentación microbiana se puede analizar que; con el fin de favorecer el rendimiento de producción de PHB se debe contar con un glicerol de alta pureza, condiciones óptimas y controladas de operación para el proceso de fermentación, al igual que realizar una digestión microbiana con las condiciones adecuadas.

3.1.2. Objetivo 2

Seleccionar el microorganismo que presente mejor adaptación al residuo agroindustrial, al igual que las condiciones favorables para su crecimiento.

3.1.2.a. Matriz de selección: Para lograr hacer una correcta selección del microorganismo fue necesario realizar una matriz de selección como se muestra en las tablas 9 y 10, en donde se resaltaban los aspectos más importantes de las bacterias *Cupriavidus necátor* y *Bacillus*

Megaterium. Estas dos bacterias se han utilizado en estudios anteriores para la producción de PHAs, por la capacidad que tiene para producir estos polímeros bajo condiciones de estrés nutricional. Para este caso, el factor que tiene el peso con mayor influencia es la disponibilidad con un 25 %, este ítem abarca la disponibilidad en Colombia y su precio. Después de realizar una búsqueda en los laboratorios y ceparios disponibles, no se contaba con stock de estas cepas en Colombia, por lo tanto, se tuvo que recurrir a la búsqueda de laboratorios para la importación de estas cepas, *Cupriavidus necator* con numero de ATCC 17699, contaba con un tiempo de entrega superior a los 3 meses y un valor de \$2.009.036 COP (sin considerar los costos de envío e importación), mientras que *Bacillus Megaterium* con numero de ATCC 14581, contaba con tiempo de entrega inferior a los 3 meses y un valor total de \$500.000 COP.

Por otro lado, también se tuvieron en cuenta factores como el pH de crecimiento en donde para *Cupriavidus necator* el rango de tolerancia es de 6,5 a 7,5 mientras que el rango de *Bacillus Megaterium* es mayor y se encuentra en un rango de 5 a 9. Por otra parte, se evaluaron los rangos de temperaturas para la tolerancia y para el crecimiento, en el cual *C. necator* cuenta con un rango de tolerancia de 0 °C a 45 °C y un rango de crecimiento de 30 °C a 37 °C. En contraste con *B. Megaterium* la cual presentaba un rango de tolerancia de 0 °C a 50 °C y un rango de crecimiento de 25 °C a 37 °C.

Todos estos factores nos indica que, la bacteria más adecuada para el proceso es *Bacillus Megaterium*, la cual cuenta con un valor de 9,41/10.

3.1.2.b. Medios de cultivo: Con el fin de seleccionar el medio de cultivo adecuado para el crecimiento y adaptación de los microorganismos, en este caso *Bacillus Megaterium*, fue necesario buscar en fuentes bibliográficas los medios de cultivo, los cuales contienen los nutrientes necesarios para su correcto crecimiento, para este caso se seleccionaron tres medios de cultivo, el primero fue agar nutritivo ya que este cuenta con los nutrientes básicos como peptona y extracto de carne que soportan el crecimiento para múltiples bacterias [91]. En segundo lugar, se eligió el agar tríptico de soya, este medio de cultivo no es selectivo, lo que indica que no tiene agentes que inhiben el crecimiento de bacterias. Este agar este compuesto por triptona, soya peptona, y extracto de soya [92]. Y por último se trabajó con caldo Sabouraud, sus dos principales ingredientes son dextrosa y peptona [93].

Durante el proceso de activación de la bacteria, al cabo de 24 horas se pudo evidenciar que el crecimiento fue exitoso en el agar nutritivo y en el agar tríptico de soya, sin embargo, en el caldo Sabouraud no se pudo evidenciar crecimiento al cabo de 24 horas, esto se dio de esta manera debido a que el caldo utilizado contaba con un aditivo de cloranfenicol. Este aditivo actúa como antibiótico para prevenir el crecimiento bacteriano, este recurso es más utilizado en el crecimiento de hongos y levaduras, no en el crecimiento bacteriano.

3.1.3. Objetivo 3

Identificar las condiciones de operación en el proceso de producción de termoplásticos biodegradables mediante el aprovechamiento del glicerol.

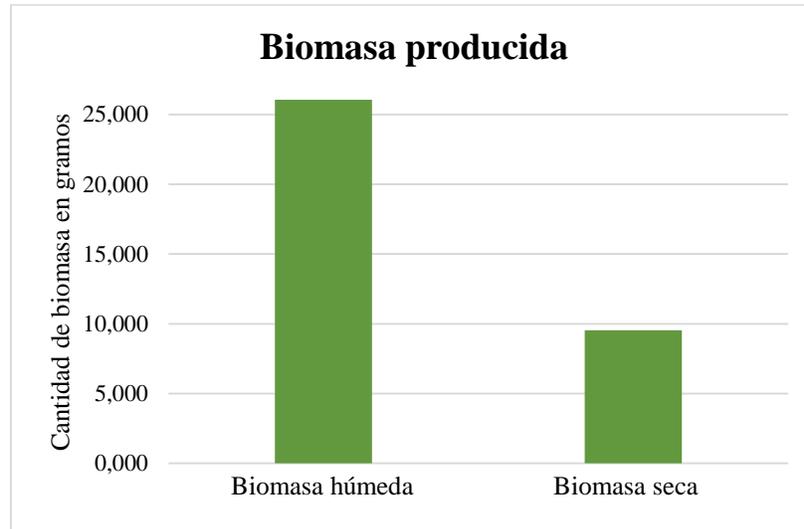
3.1.3.a. Condiciones de operación para preinóculo: El preinóculo cuenta con un impacto importante en la fermentación, debido a que este es el paso donde se establecen las condiciones iniciales del proceso, esto puede influir en la velocidad de crecimiento, la eficiencia y la calidad del producto en el proceso.

Como se mostró anteriormente, las condiciones de operación para el preinóculo son a 35 °C debido que la bacteria *Bacillus Megaterium* es mesófila y su rango de temperatura en donde presenta mayor velocidad de crecimiento es entre los 30 °C y 45 °C [94], por otro lado, el preinóculo se debe realizar mínimo durante 48 horas el cual es el tiempo suficiente para la activación y el crecimiento de las bacterias [95]. Por último, está la agitación constante, esta puede ser a 200 rpm con el fin de lograr una correcta aireación del medio favoreciendo el desarrollo de las bacterias [96].

3.1.3.b. Condiciones de operación de la fermentación: La fermentación microbiana es un proceso metabólico llevado a cabo por microorganismos, ya sea bacterias o levaduras, bajo condiciones aerobias (con presencia de oxígeno) o anaerobias (en ausencia de oxígeno) obteniendo una fuente de energía y potencializando el crecimiento de la biomasa. El proceso de fermentación es obtenido por acción de las enzimas, las cuales realizan cambios químicos en las sustancias orgánicas [97] por medio de factores como: la temperatura, pH, sustrato, incidencia de luz, con o sin agitación.

Figura 56.

Cantidad de biomasa húmeda y seca producida

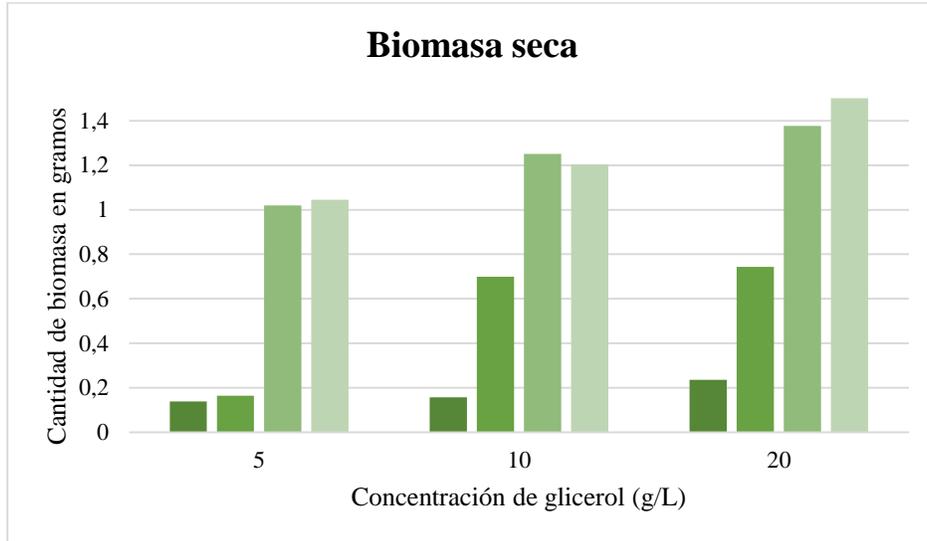


Nota. Cantidad de biomasa húmeda y seca producida.

En la figura (56) se puede observar la cantidad de biomasa húmeda y biomasa seca producida durante los procesos de fermentación, en la cual se presenta una diferencia de 17,434 g y este valor hace referencia a la pérdida de humedad durante el proceso de secado que se lleva a cabo después de la fermentación.

Figura 57.

Cantidad de biomasa seca producida en cada fermentación



Nota. Cantidad de biomasa seca producida en cada fermentación.

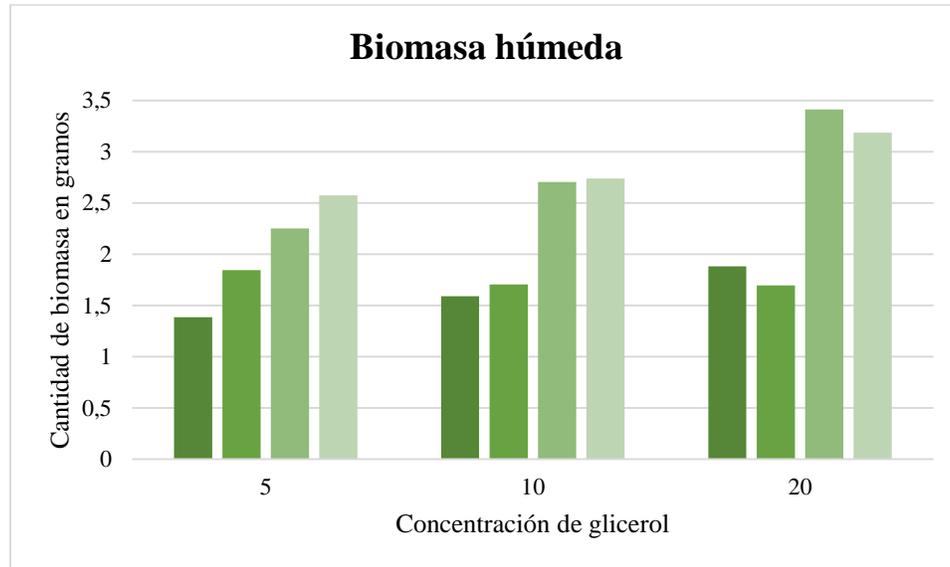
En la figura (57) se puede observar el comportamiento que presenta la biomasa seca en cada una de las cuatro fermentaciones con las diferentes concentraciones de glicerol (5, 10 y 20) g/L, en donde se puede ver que el aumento de glicerol en el medio de cultivo (como fuente de carbono para los microorganismos) favorece la producción de biomasa seca.

En las fermentaciones cuya concentración de glicerol fue de 5 g/L, se pueden ver en las dos primeras fermentaciones que la variación en la temperatura no afecta de forma significativa la producción de biomasa, por el contrario, las dos últimas fermentaciones presentan una gran diferencia en cuanto a la producción de biomasa seca debido a que estas contaban con agitación continua a 200 rpm, de igual forma en este caso la variación de temperatura no afectaba demasiado la producción de biomasa seca.

En las fermentaciones con concentración de (10 y 20) g/L de glicerol, la temperatura afecta de forma significativa los dos primeros grupos de fermentación que no presentaban agitación constante, sin embargo, en los dos últimos grupos que presentaban agitación, el cambio por la temperatura no fue muy relevante.

Figura 58.

Cantidad de biomasa seca producida en cada fermentación



Nota. Cantidad de biomasa seca producida en cada fermentación.

La figura (58) representa el comportamiento de la biomasa húmeda que se obtuvo durante cuatro procesos de fermentación, con la variación de la concentración de glicerol (como fuente de carbono para los microorganismos).

En cada fermentación se puede ver la poca influencia que tiene la temperatura a media que se va aumentando la concentración de glicerol en el medio de cultivo, puesto que el cambio es mínimo, sin embargo, a menores concentraciones el glicerol, el cambio en la producción de biomasa húmeda se ve más influenciado por el cambio en la temperatura, como se muestra en las fermentaciones cuya concentración de glicerina fue de 5 g/L.

Por otro lado, se puede ver que el factor que tiene más influencia en el aumento de la producción de biomasa húmeda es la agitación constante en rpm, como se ve en cada una de las fermentaciones que experimentan este factor.

Con el fin de realizar el diseño de experimentos y su respectivo diseño factorial para el análisis de los datos se implementó el software estadístico MiniTab Statistical Software.

Para identificar los factores que son significativos en la fermentación para la variable de respuesta, que en este caso es la biomasa producida, se realizó un diseño de experimentos factorial para los resultados de la fermentación (tabla 23).

Tabla 23.*Diseño de experimentos condiciones de operación para la fermentación.*

Factores	Niveles	Replica	Respuesta
Temperatura (°C)	2	8	Biomasa seca
Revoluciones por minuto (rpm)	2		
Concentración de glicerol (g/L)	3		

Nota. Diseño de experimentos condiciones de operación para la fermentación.

A continuación, se presenta la matriz del diseño para el caso de la fermentación (tabla 24).

Tabla 24.*Matriz de diseño condiciones de operación para la fermentación.*

Concentración fuente de carbono (g/L)	Temperatura (°C)		Temperatura (°C)	
	30		35	
	Revoluciones por minuto (rpm)		Revoluciones por minuto (rpm)	
	0	200	0	200
5	0,009	0,225	0,008	0,146
	0,007	0,162	0,013	0,133
	0,009	0,096	0,029	0,157
	0,009	0,130	0,022	0,121
	0,005	0,076	0,012	0,109
	0,009	0,072	0,013	0,122
	0,079	0,074	0,023	0,224
	0,011	0,185	0,044	0,033
10	0,033	0,036	0,045	0,118
	0,007	0,035	0,042	0,113
	0,007	0,011	0,117	0,106
	0,084	0,181	0,032	0,032
	0,006	0,114	0,119	0,272
	0,007	0,086	0,111	0,046
	0,006	0,251	0,117	0,274
	0,007	0,536	0,116	0,243
20	0,014	0,278	0,142	0,090
	0,013	0,230	0,121	0,093
	0,071	0,151	0,046	0,156
	0,012	0,056	0,129	0,377
	0,032	0,091	0,066	0,192
	0,013	0,237	0,185	0,272
	0,044	0,200	0,036	0,151

	0,037	0,133	0,019	0,168
--	-------	-------	-------	-------

Nota. Matriz de diseño condiciones de operación para la fermentación.

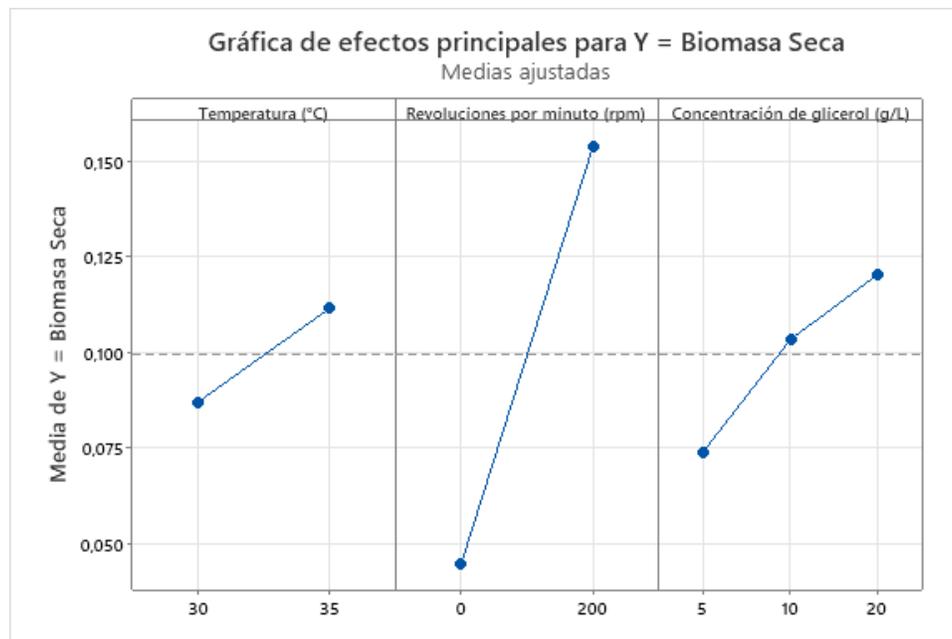
Las hipótesis establecidas en este diseño de experimentos son las siguientes:

H₀ = El factor de estudio no tiene un efecto significativo en el comportamiento de la variable de respuesta.

H_a = El factor de estudio tiene un efecto significativo en el comportamiento de la variable de respuesta.

Figura 59.

Gráfica de efectos principales para Y = Biomasa Seca (g)



Nota. Gráfica de efectos principales para Y = Biomasa Seca (g).

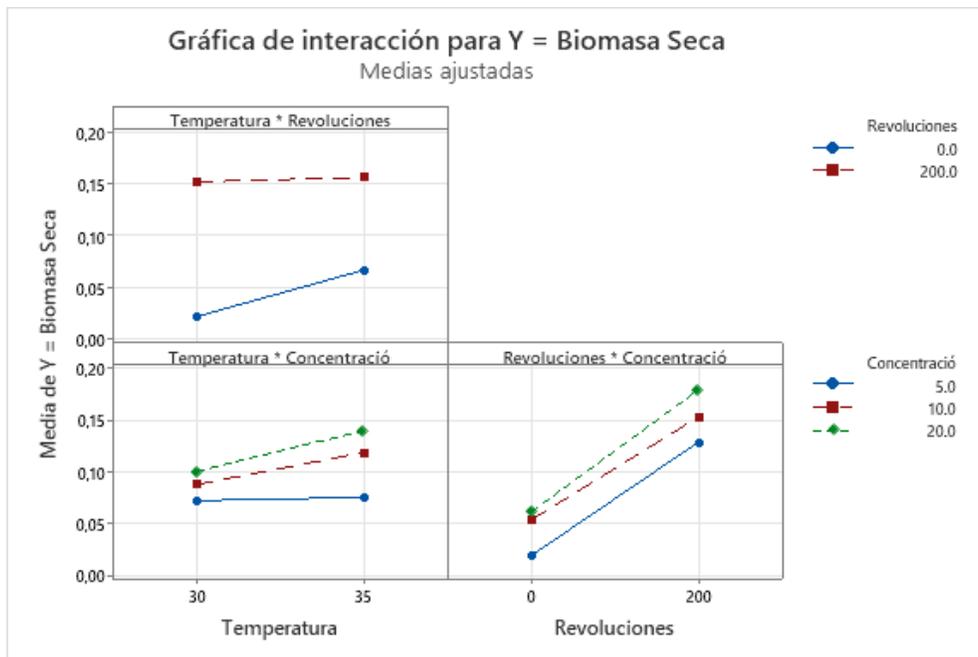
En la figura (59) se puede ver la gráfica de efectos principales para Y = Biomasa seca, en donde las coordenadas que se pueden evidenciar en esta corresponden a los valores de las medias de biomasa seca en cada uno de los niveles evaluados por cada factor, gracias a esto la gráfica se divide en tres cuadrantes, los cuales corresponden a cada una de las variables dependientes.

En la gráfica se puede observar el aumento correspondiente para cada una de las variables independientes y su efecto para la variable de respuesta, la cual, para este caso es la producción de biomasa seca, en donde el factor con mayor influencia es la variable de agitación, dado que cuando se tienen 0 rpm el valor de la media de biomasa seca es de 0,045 mientras que la media para 200

rpm es de 0,154, con un delta de 0,109. Y el factor con menor influencia es la temperatura, este a 30 °C presenta una media de 0,087 y a 35 °C su media es de 0,111 el aumento entre estos valores no es significativo debido al valor de su delta, el cual es de 0,024, en comparación con las revoluciones por minuto. Finalmente se tiene el factor de concentración de glicerol, este es el único que cuenta con tres niveles, su primer nivel es de 5 g/L y su valor correspondiente de media es de 0,074, después se encuentra el nivel de 10 g/L con un valor de media de 0,104 y por último está el nivel de 20 g/L con un nivel de 0,121.

Figura 60.

Gráfica de interacción para Y = rendimiento (%)



Nota. Gráfica de interacción para Y = rendimiento (%).

En la figura (60) se puede observar la gráfica de interacciones para Y = Biomasa seca, que facilita la visualización del efecto que tienen las dos variables independientes en la variable de respuesta. En la primera interacción se observa la influencia de la temperatura y las revoluciones por minuto con respecto a la media de la biomasa seca, resaltando los puntos mínimos y máximos para cada nivel, en las variables independientes. En la segunda interacción se puede evidenciar la influencia de la temperatura y la concentración con respecto a la media, en la cual, se ve el comportamiento de cada una de las concentraciones a 30 °C y 35 °C, en donde el cambio más significativo fue para

los 20 g/L. Y por último esta la interacción con más influencia en la media, las revoluciones por minuto y la concentración de glicerol, estas presentan el mayor aumento en su inclinación.

Tabla 25.

Análisis de varianza diseño de experimentos condiciones de operación digestión.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	0.360219	0.032747	5.76	0.000
Lineal	4	0.337642	0.084411	14.85	0.000
Temperatura (°C)	1	0.014455	0.014455	2.54	0.115
Revoluciones por minuto (rpm)	1	0.287766	0.287766	50.63	0.000
Concentración de glicerol (g/L)	2	0.035421	0.017711	3.12	0.049
Interacciones de 2 términos	5	0.017023	0.003405	0.60	0.701
Temperatura (°C) *Revoluciones por minuto (rpm)	1	0.009882	0.009882	1.74	0.191
Temperatura (°C) *Concentración de glicerol (g/L)	2	0.005757	0.002878	0.51	0.604
Revoluciones por minuto (rpm)*Concentración de glicerol (g/L)	2	0.001384	0.000692	0.12	0.886
Interacciones de 3 términos	2	0.005555	0.002777	0.49	0.615
Temperatura (°C) *Revoluciones por minuto (rpm)*Concentración de glicerol (g/L)	2	0.005555	0.002777	0.49	0.615
Error	84	0.477406	0.005683		
Total	95	0.837626			

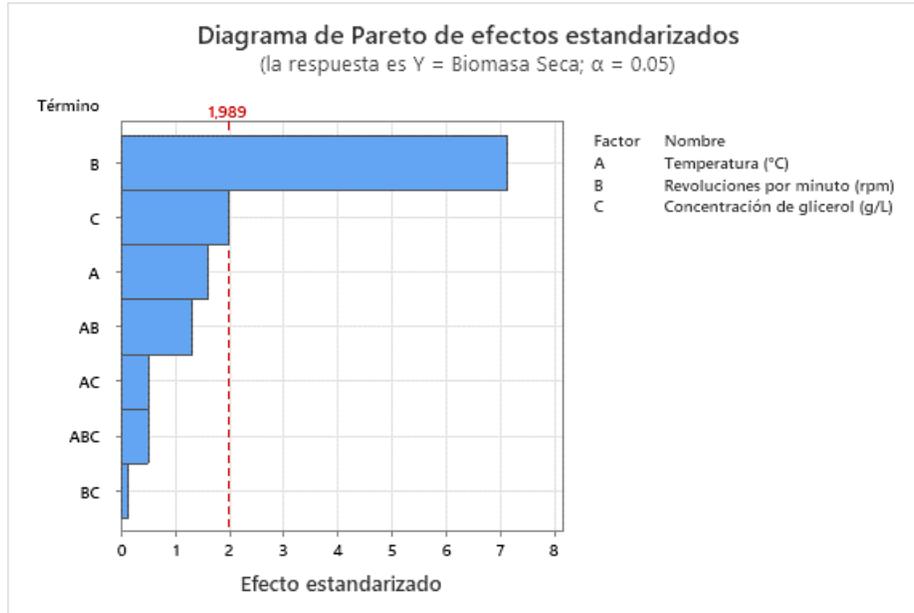
Nota. Análisis de varianza diseño de experimentos condiciones de operación digestión.

En la tabla (25) se reportan los resultados del análisis de varianza (ANOVA) en la cual, se definen cuáles son los factores que tienen un efecto significativo sobre la biomasa seca, con lo cual va a permitir rechazar o aceptar cada una de las hipótesis. El valor de α con el que se desarrolló este diseño de experimentos fue de 0,05 lo cual indica que tiene un nivel de significancia de 95 %. Ahora bien, con el valor de P, el cual indica si un factor tiene o no un impacto significativo en la variable de respuesta, y con el valor de α se puede saber si aceptar o rechazar la hipótesis nula, si el valor de P es menor que el valor de α , se puede rechazar la hipótesis nula y de esa manera aceptar la hipótesis alternativa.

Para el caso de la fermentación, el valor de P respecto a las revoluciones por minuto es de 0 por lo cual se puede rechazar la hipótesis nula para este factor, al igual que para el factor de la concentración de glicerol, la cual cuenta con un valor de P de 0,049 y al ser menor al valor de alfa, se procede a aceptar la hipótesis alternativa.

Figura 61.

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.



Nota. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.

En la figura (61) se representa el diagrama de Pareto de efectos estadísticos, para la variable de respuesta (Biomasa seca). Todos los factores que se encuentren al lado derecho del valor de 1,989 representado con una línea roja son considerados factores con efecto significativo sobre la variable de respuesta, para este caso solo el factor revoluciones por minuto y concentración de glicerol tienen un efecto considerablemente significativo en la fermentación.

Por último, con ayuda de la tabla (18) referente al rendimiento biomasa sustrato ($Y_{x/s}$), es posible evidenciar que a pesar de que manejando la menor concentración de fuente de carbono estudiada en este proyecto (5g /L) se produjera menor cantidad de biomasa que con respecto a las otras dos concentraciones de fuente de carbono utilizadas. El rendimiento biomasa sustrato es mayor implementando una concentración de fuente de carbono menor, los resultados obtenidos fueron comparados con la autora Becerra [98], donde se evidencia que se obtienen valores de rendimiento similares, por lo cual muestra total concordancia en el procedimiento y resultados obtenidos.

3.1.3.c. Condiciones de operación de la digestión: El proceso de digestión microbiana es uno de los procesos críticos en la producción de PHB a partir de glicerol mediante fermentación microbiana ya que es la etapa donde la bacteria en cuestión produce enzimas lipolíticas las cuales son utilizadas en el rompimiento de los enlaces éster del glicerol y de esa manera liberar los ácidos

grasos, que son metabolizados por las células. Y finalmente mediante reacciones enzimáticas, se convierte en P3HB. Por este motivo, es de suma importancia manejar las condiciones de operación adecuadas y lograr favorecer la producción del P3HB.

Para realizar la selección de las condiciones de operación en la etapa de digestión se realizaron distintas digestiones por duplicado con el fin de poder realizar el análisis factorial y evidenciar que variables independientes tienen un efecto significativo sobre la variable dependiente.

El diseño de experimentos correspondiente a la etapa de digestión cuenta con las siguientes características (tabla 26).

Tabla 26.

Diseño de experimentos condiciones de operación digestión

Factores	Niveles	Replicas	Respuesta
Temperatura (°C)	2	2	Rendimiento
Tiempo (min)	2		
Relación (g biomasa/ mL dispersión)	2		

Nota. Diseño de experimentos condiciones de operación digestión.

Los datos obtenidos a lo largo del proceso y los cuales serán utilizados para realizar el diseño de experimentos (tabla 27), son los siguientes:

Tabla 27.

Matriz de diseño condiciones de operación digestión.

Tiempo (min)	Temperatura (°C)		Temperatura (°C)	
	30		50	
	Relación (g biomasa / mL dispersión)		Relación (g biomasa / mL dispersión)	
	0.2	0.4	0.2	0.4
45	11.70	18.75	16.40	28.15
	11.79	18.92	16.57	28.31
90	28.10	42.32	37.58	51.72
	28.36	42.41	37.67	51.80

Nota. Matriz de diseño condiciones de operación digestión.

Las hipótesis establecidas en este diseño de experimentos son las siguientes:

Ho = El factor de estudio no tiene un efecto significativo en el comportamiento de la variable de respuesta.

Ha = El factor de estudio tiene un efecto significativo en el comportamiento de la variable de respuesta.

Los resultados obtenidos con la solución del diseño de experimentos son los siguientes; en primer lugar, se tiene la información sobre los coeficientes codificados, la cual ayudará a dar un mayor entendimiento tanto a la gráfica de efectos principales para la variable de respuesta, como a la gráfica de interacción para la variable de respuesta.

Coeficientes codificados

Tabla 28.

Coeficientes codificados diseño de experimentos condiciones de operación digestión.

Término	Efecto
Constante	
Temperatura (°C)	8.2313
Tiempo (min)	21.1713
Relación (g biomasa/mL dispersión)	11.7763
Temperatura (°C) * Tiempo (min)	1.1637
Temperatura (°C) * Relación (g biomasa/ mL dispersión)	1.1638
Tiempo (min) * Relación (g biomasa/mL dispersión)	2.3587
Temperatura (°C) * Tiempo (min) * Relación (g biomasa/mL dispersión)	-1.1638

Nota. Coeficientes codificados diseño de experimentos condiciones de operación digestión.

Mediante los resultados obtenidos en la tabla (28) correspondiente a coeficientes codificados, se pueden evidenciar los parámetros que están siendo evaluados, estos se componen de las variables independientes y de las respectivas interacciones de dichas variables. Con el fin de evidenciar el efecto que tendrán sobre la variable dependiente.

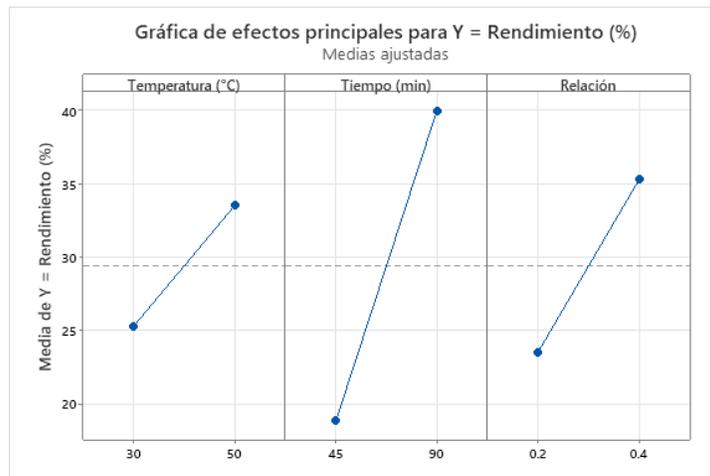
Se puede evidenciar como a excepción de la última interacción, todas presentan un efecto creciente con respecto al rendimiento, permitiendo evidenciar que el tiempo es la variable cuyo efecto es más significativo con respecto a la demás ya que cuenta con un valor de 21,1713, lo cual representa

la diferencia entre las medias de los rendimientos obtenidos a los tiempos evaluados por el diseño (45 y 90 minutos).

Mediante las gráficas factoriales para la variable de respuesta y la gráfica de interacción para la variable de respuesta es posible evidenciar de manera visual la información suministrada por la tabla (27) en la cual se establece el efecto de cada variable en el rendimiento.

Figura 62.

Gráfica de efectos principales para Y = rendimiento (%).



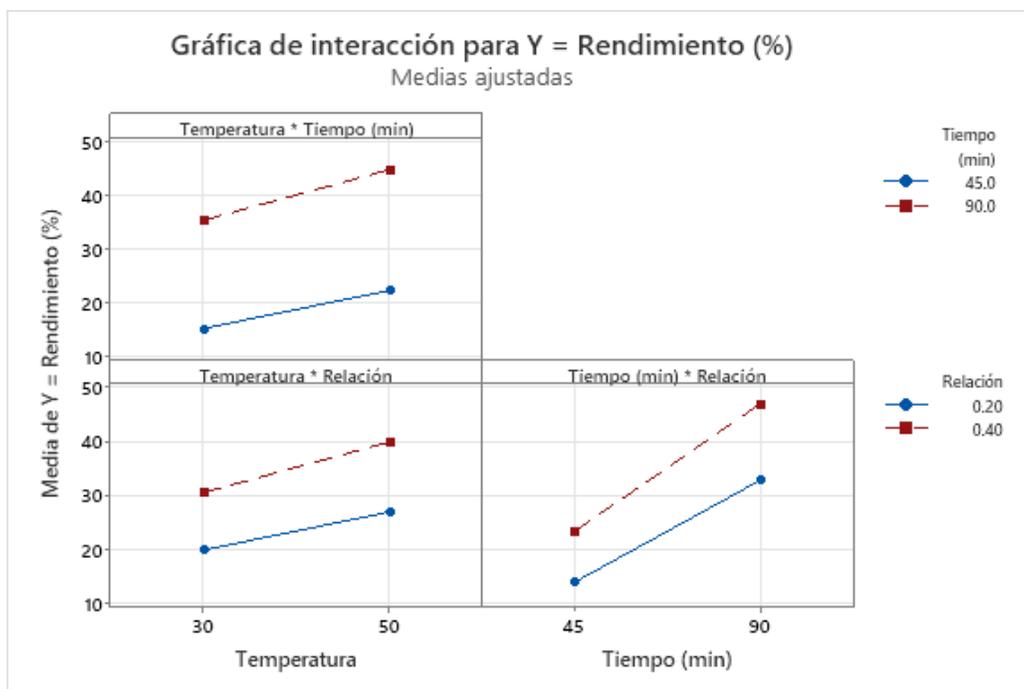
Nota. Gráfica de efectos principales para Y = rendimiento (%).

Mediante la figura (62) correspondiente a la gráfica de efectos principales para Y = rendimiento (%) se puede evidenciar visualmente el efecto creciente que tiene cada variable independiente en la variable de respuesta, siendo la temperatura, la que menor efecto tiene debido a su grado de inclinación lo que se ve reflejado mediante una menor pendiente, mientras que el tiempo se evidencia que cuenta con un cambio superior y será la variable que más influya en la variable dependiente. Las coordenadas que se pueden evidenciar en la gráfica corresponden a los valores de las medias de rendimiento en cada uno de los niveles evaluados por cada factor, es por esto que se puede evidenciar como la gráfica se divide en tres cuadrantes, los cuales corresponden a cada una de las variables independientes. En primer lugar, se tiene la dependencia de la temperatura en la media del rendimiento, por lo cual se evidencia que a una temperatura de 30 °C el valor de la media de rendimiento es de 25,2937 mientras que la media de rendimiento a una temperatura de 50 °C es de 33,525 lo cual obtiene un cambio de 8,2313 tal como se evidencia en la tabla (27). En el segundo cuadrante se cuenta con un valor de media de rendimiento de 18,8237 para un tiempo

de 45 minutos y un valor de media de rendimiento de 39,995 a los 90 minutos, obteniendo así un cambio positivo de 21,1713. Por último, en el cuadrante número tres, se evidencia la influencia de la relación entre la biomasa seca y el disolvente, el cual se compone de cloroformo e hipoclorito de sodio, se puede observar cómo implementando una relación de 0,2 la media de rendimiento es de 23,5213, mientras que al trabajar con una relación de 0,4 se obtiene una media de rendimiento mayor, con un valor de 35,2975, obteniendo así un cambio de 11,7763. Mediante esta grafica se pudo evidenciar que cada una de las variables influye de manera directamente proporcional en el rendimiento, sin embargo, es necesario tener en consideración otros análisis que serán expuestos más adelante para tomar la decisión de que factores son significativos y cuales no, y de esta manera poder aceptar la hipótesis correcta.

Figura 63.

Gráfica de interacción para Y = rendimiento (%).



Nota. Gráfica de interacción para Y = rendimiento (%).

Por otro lado, se cuenta con la gráfica de interacciones para Y = rendimiento (%) (figura 63), la cual permite evidenciar el efecto que tienen 2 variables independientes en la variable de respuesta. En primer lugar, se observa, la influencia que tiene la temperatura y el tiempo con respecto a la media del rendimiento, considerando tanto los mínimos como los máximos de cada una de las variables manipuladas. Por otro lado, se evidencia como la temperatura y la relación entre biomasa

y volumen de dispersión tienen un efecto de crecimiento en términos de rendimiento y por último como el tiempo y la relación de biomasa y volumen de dispersión también cuentan con el mismo comportamiento que las otras interacciones.

El siguiente análisis que es importante resaltar de este diseño de experimentos, es el análisis de varianza (ANOVA) el cual define cuales factores tienen un efecto significativo sobre el rendimiento. Lo cual va a permitir rechazar o aceptar cada una de las hipótesis. Los resultados del análisis de varianza se encuentran a continuación:

Análisis de Varianza

Tabla 29.

Análisis de varianza diseño de experimentos condiciones de operación digestión.

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
Modelo	7	2657.13	379.59	33425.62	0.000
Lineal	3	2618.62	872.87	76862.86	0.000
Temperatura (°C)	1	271.01	271.01	23864.74	0.000
Tiempo (min)	1	1792.89	1792.89	157876.70	0.000
Relación	1	554.72	554.72	48847.13	0.000
Interacciones de 2 términos	3	33.09	11.03	971.25	0.000
Temperatura (°C) * Tiempo (min)	1	5.42	5.42	477.03	0.000
Temperatura (°C) * Relación	1	5.42	5.42	477.03	0.000
Tiempo (min) * Relación	1	22.25	22.25	1959.70	0.000
Interacciones de 3 términos	1	5.42	5.42	477.03	0.000
Temperatura (°C) * Tiempo (min) * Relación	1	5.42	5.42	477.03	0.000
Error	8	0.09	0.01		
Total	15	2657.22			

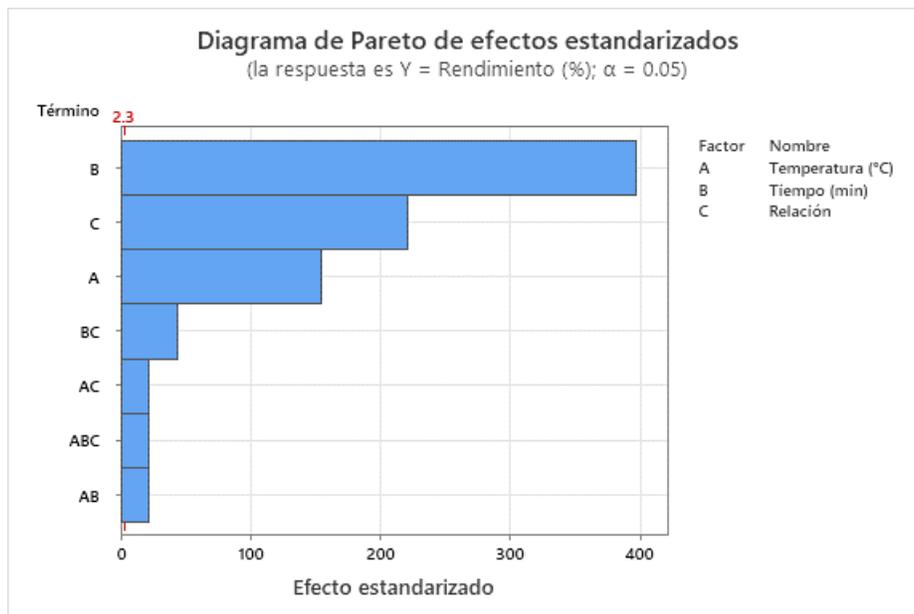
Nota. Análisis de varianza diseño de experimentos condiciones de operación digestión.

Con base a los resultados expuestos en la tabla (29) correspondiente al análisis de varianza se puede complementar la información analizada anteriormente y consolidar una decisión en cuanto a la aceptación o rechazo de las hipótesis, en este caso el Valor p obtenido en el ANOVA nos va a permitir evidenciar que factor tiene o no tiene un impacto significativo en la variable de respuesta al igual que cual interacción de variables manipuladas tienen efecto sobre la variable de respuesta. Es importante recalcar que el valor de α con el que se desarrolló este diseño de experimentos es de 0,05 lo cual indica que tiene un nivel de significancia de 95 %. Mediante el valor de p obtenido

por el análisis de varianza se puede saber si aceptar o rechazar la hipótesis nula, si el valor de p es menor que el valor de α , se puede rechazar la hipótesis nula y de esa manera aceptar la hipótesis alternativa. En este caso se puede evidenciar que para todos los factores e interacciones entre factores el valor de p es de 0 por lo cual se procede a rechazar la hipótesis nula para cada uno de los factores, indicando así que el factor de temperatura, tiempo y relación entre la biomasa y el volumen de dispersión tiene un efecto significativo sobre el rendimiento. Por último, mediante el diagrama de Pareto de efectos estandarizados (figura 14) se logra evidenciar la información analizada en el análisis de varianza analizado previamente,

Figura 64.

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.



Nota. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.

En la figura (64) todos los factores que se encuentren al lado derecho del valor de 2,3 representado con una línea roja son considerados factores con efecto significativo sobre la variable de respuesta, y a medida que mayor sea su valor correspondiente de efecto estandarizado, mayor será la influencia de cada variable manipulada sobre el rendimiento, por ende, se puede evidenciar que el factor que más favorecerá el rendimiento es el tiempo, seguido de la relación entre biomasa y volumen de dispersión y por último la temperatura. Por lo cual las condiciones de operación para este proceso se encontraban en el máximo de los niveles establecidos para cada uno de los factores, ya que se tiene una relación directamente proporcional en todos los factores con respecto a la

variable de respuesta, dichas condiciones son: Realizar la digestión por una duración de 90 minutos, con una relación de 0,04 g biomasa / mL dispersión a 50 °C.

El autor Hahn realizó un estudio en 1995 [89], en el cual establece que a mayor tiempo de digestión se favorece la recuperación de mayor cantidad de polímero, sin embargo, no estudió la influencia de la temperatura como si fue realizado en este trabajo. Por otro lado, los autores Moreno Sarmiento, Malagón Romero, Cortazar, Espinoza Hernandez en su artículo Recuperación de Polihidroxialcanoato co-octanoato sintetizado por *Pseudomonas putida* mediante el uso de dispersiones hipoclorito – cloroformo [87], establecen que las condiciones de operaciones adecuadas para el proceso de digestión son a una temperatura de 60 °C con una duración de 1 hora. Estos resultados que están siendo contrastados con otros autores y permiten evidenciar que los resultados obtenidos en este trabajo son totalmente coherentes y se encuentran soportados tanto experimental como teóricamente.

3.1.4. Objetivo 4:

Comparar el termoplástico obtenido mediante el aprovechamiento de un residuo agroindustrial con el termoplástico convencional.

3.1.4.a Comparación del termoplástico: Con ayuda del registro fotográfico realizado cada 12 horas por una duración total de 60 horas se permitió evaluar dos características fundamentales de los termoplásticos, en primer lugar, se tiene la prueba de la solubilidad, en donde tanto la muestra de termoplástico obtenida experimentalmente como el termoplástico convencional se encontraban totalmente sumergidos en 25 mL de etanol y expuestos a condiciones ambiente en Bogotá. En términos del biopolímero obtenido experimentalmente se puede evidenciar que a partir de las 12 horas tuvo un desprendimiento muy mínimo de partículas, sin embargo, de ahí en adelante la estructura del plástico no tuvo ningún cambio, tuvo un comportamiento constante, lo cual permite identificar que el etanol no tiene un efecto significativo en su estructura y no se disuelve. En términos del film adherente, se evidencia que a lo largo de las 60 horas no sufrió ninguna alteración en su estructura, esto debido a que es un polietileno los cuales se caracterizan por no ser solubles en etanol.

En cuanto a la siguiente prueba realizada, la degradabilidad de los materiales, las láminas fueron sumergidas en su totalidad en agua y sometidas a condiciones ambiente extremas (temperaturas

muy elevadas, temperaturas muy bajas y un entorno con un alto nivel de humedad) en la ciudad de Bogotá. Al tratarse de una prueba cualitativa, los análisis realizados mediante observación se enfocaron en evidenciar cambios en las propiedades físicas y apariencia de la muestra a lo largo de las 60 horas evaluadas, con ayuda del registro fotográfico en los intervalos de 12 horas. En cuanto al PHB obtenido experimentalmente se pudo evidenciar que a medida que transcurría el tiempo, había mayor aparición de grietas en la lámina, al igual que distintas fragmentaciones las cuales fueron más notorias a partir de las 36 horas, por otro lado desde las primeras 12 horas en adelante se evidencia un cambio de color y se alcanza a percibir un cambio en la textura superficial, lo cual indica que se están liberando productos solubles y que está ocurriendo alguna forma de degradación, lo cual demuestra la naturaleza biodegradable que tiene este tipo de termoplásticos, ya que al ser sometido a condiciones de ambiente extremo en la ciudad de Bogotá, se logró evidenciar cambios en las propiedades físicas del material. Mientras que el film adhesivo se puede evidenciar que a lo largo de las 60 horas no sufrió ningún tipo de cambio en su estructura, lo cual indica que no es un material biodegradable y puede tardar años en degradarse en condiciones ambiente.

Los resultados obtenidos en términos de las características ópticas y mecánicas de ambos materiales se asemejan bastante, en primer lugar, ambos polímeros cuentan con un comportamiento semirrígido lo cual explica su comportamiento flexible. En términos ópticos, ninguno de los dos plásticos es opaco, en ambos se logra percibir la luz traspasar por el material, pese a que uno sea transparente en su totalidad y el otro translucido, se puede considerar que son características similares y solo varía en la aplicación final para la cual será destinado el material. Esto demuestra que el PHB puede sustituir al polietileno de baja densidad, lo cual es beneficioso en términos ambientales por sus características biodegradables.

3.2. Conclusiones

Con el fin de determinar la viabilidad del aprovechamiento del glicerol como materia prima para la producción de termoplásticos, se utilizó glicerol proveniente de la planta de producción de Biodiesel, BioD. Dicho glicerol crudo se sometió a un proceso de purificación en el cual se obtuvo un porcentaje de pureza de 94,40 % para posteriormente ser utilizado como única fuente de carbono en el proceso de fermentación para la bacteria *bacillus megaterium* y seguido de esto realizar un proceso de digestión en el cual se pone en contacto la biomasa obtenida en el proceso

de fermentación con cloroformo e hipoclorito de sodio y de esta manera se logró producir un total de 5,609 g de biopolímero en polvo. Al culminar con el proceso de producción se evidenció que es un proceso de aprovechamiento viable por el cual es posible proporcionar una solución al exceso de suministro de glicerol como residuo agroindustrial mitigando el impacto ambiental.

Para realizar la selección del microorganismo, se inició con una búsqueda bibliográfica acerca de los microorganismos capaces de producir PHB mediante fermentación microbiana. Una vez encontrados los dos microorganismos con mejor adaptación al glicerol y mejores reportes de rendimiento, los cuales fueron; *Cupriavidus necator* y *Bacillus Megaterium* se procedió a evaluar diferentes criterios de selección los cuales fueron consolidados en una matriz en la cual mediante valoración cualitativa se llegó a la decisión de trabajar con *Bacillus Megaterium*. Los criterios que contaron con mayor influencia en la decisión fueron, la disponibilidad de la cepa, los rangos de temperaturas de tolerancia y crecimiento. Por otro lado, las condiciones favorables para su crecimiento se obtienen de realizar la activación en medio sólido de agar tréptico de soya ya que es el medio que cuenta con mayor cantidad de nutrientes beneficiosos para la bacteria en estudio. Por otro lado, el crecimiento en medio líquido se favorece a temperaturas de 35 °C en presencia de agitación, debido a que permite una correcta aireación en el medio y ayuda a la liberación de gases generados por las bacterias, lo cual favorece su producción.

Para la identificación de las condiciones de operación en el proceso de producción de termoplásticos biodegradables mediante el aprovechamiento del glicerol, se evaluaron distintas condiciones para los procesos de; preparación de preinóculo, fermentación y digestión, en donde se tomaron como variables manipuladas la temperatura, tiempo, revoluciones por minuto, concentración de fuente de carbono y relación de biomasa sobre volumen de dispersión, según corresponda. Las condiciones de operación que favorecieron la productividad de PHB y permitieron obtener un rendimiento de 58,82 % con un porcentaje de recuperación de 60,02 % fueron; para el preinóculo operar a 35 °C con 200 rpm por 48 horas. Para el proceso de fermentación operar a 35 °C con 200 rpm y 20 g/L de glicerol como única fuente de carbono. Por último, para el proceso de digestión operar a 50 °C con una relación de 0,4 g biomasa / mL dispersión por 90 minutos.

Mediante la caracterización realizada de manera cualitativa del PHB obtenido experimentalmente y el film adhesivo (polietileno de baja densidad) se realizó la respectiva comparación de las propiedades estudiadas, entre las cuales se encontraban; la degradabilidad, solubilidad, resistencia y un análisis óptico. En donde se obtuvo como resultado que en términos de degradabilidad el PHB obtenido puede ser degradado mediante condiciones ambientales, mientras que el polietileno no cuenta con esta característica. Ninguno de los dos polímeros es soluble en etanol, ambos materiales cuentan con un comportamiento semirrígido y flexible. Por último, ambos plásticos permiten la incidencia de la luz, lo cual los clasifica entre los plásticos transparentes y translucidos. Al contar con propiedades físicas y mecánicas semejantes se puede concluir que el PHB puede reemplazar al polietileno de baja densidad con la ventaja de ser un material biodegradable.

3.3. Recomendaciones

Para el desarrollo de futuros proyectos, se recomienda la implementación de un biorreactor donde se puede llevar a cabo las fermentaciones con el fin de incrementar la tasa de producción de biomasa y de esta manera obtener mayor producción de PHB, para así lograr realizar pruebas mecánicas y de esfuerzo en el polímero obtenido, ya que al haber realizado todas las fermentaciones en matraces erlenmeyer se obtuvo una producción de PHB muy baja por lo cual no fue posible alcanzar a tener la cantidad necesaria para completar una probeta y realizar este tipo de análisis.

Debido a la alta capacidad calorífica con la que cuenta el glicerol, el proceso de destilación pese a producir niveles de glicerol de alta pureza tiene un consumo energético muy elevado, ya que demanda un alto suministro de energía para su evaporación, por lo cual se recomienda considerar otras rutas de purificación de glicerol.

Se recomienda evaluar la fermentación en función del tiempo con el fin de lograr evidenciar de manera clara las distintas fases de la fermentación, compuestas por, fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. Esto permitirá establecer cuál es el tiempo necesario para la fermentación y puede reducir los tiempos del proceso de producción.

Para futuros trabajos se recomienda evaluar la posibilidad de trabajar con distintos tipos de medios de cultivo para la preparación del preinóculo con el fin de evidenciar si se logra una mayor

tasa de crecimiento de microorganismo previo a la fermentación, lo cual se vería reflejado en mejores rendimientos en términos de producción de PHB.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Betancourt, W. N.- Tecciencia, y undefined 2012, “Aprovechamiento integral del glicerol residual en la industria del biodiesel: caso 1, 3-propanodiol (1, 3-pd)”, *dialnet.unirioja.es*, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5113368>
- [2] M. Julieth, V. Botero, y C. Ariel Cardona Alzate, “evaluación ambiental para procesos que usan residuos de la industria de los biocombustibles como materias primas”.
- [3] usuario, “producción de polhidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales”.
- [4] J. Pablo y G. Pérez, “La industria del plástico en México y el mundo”, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://www.freeimages.com/browse.phtml?f=download&id=248748>
- [5] E. Colombia, L. Victoria, P. Gonzalez, S. P. Montenegro Gómez, P. Andrea, y G. Abad, “Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia”, *RIAA, ISSN-e 2145-6453, Vol. 8, N°. 2, 2017, págs. 141-150*, vol. 8, núm. 2, pp. 141–150, 2017, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6285350&info=resumen&idioma=SPA>
- [6] “¿Qué son los combustibles fósiles? | National Geographic”. <https://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/explicacion-que-son-combustibles-fosiles> (consultado el 24 de mayo de 2023).
- [7] E. Wirth, “¿Qué pasará con el petróleo?”, 2020, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://repositorio.comillas.edu/xmlui/handle/11531/46114>
- [8] A. N. M. Marquínez *et al.*, “Obtención de biodiesel a partir de aceite de coco (*Cocos nucifera* L.)”, *Revista de Iniciación Científica*, vol. 6, núm. 1, pp. 9–14, jun. 2020, doi: 10.33412/REV-RIC.V6.1.2605.
- [9] “Datos y estadísticas - Agencia Nacional de Hidrocarburos”. <https://www.anh.gov.co/es/operaciones-y-regal%C3%ADas/datos-y-estadisticas/> (consultado el 26 de julio de 2023).

- [10] C. N. Tejada *et al.*, “Alternativas Para La Obtencion De Biodiesel A Partir De Aceites Vegetales-Coco, Almendras, Ajonjolí Y Marañón (*Cocus nucifera*, *Prunus amigdalus*, *sesamum indicum* L y *Anacardium occidentale*)”, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: www.agrocadenas.gov.co/oleaginosas/reportes
- [11] M. S. Dresselhaus y I. L. Thomas, “Alternative energy technologies”, *Nature* 2001 414:6861, vol. 414, núm. 6861, pp. 332–337, nov. 2001, doi: 10.1038/35104599.
- [12] S. Brahma *et al.*, “Biodiesel production from mixed oils: A sustainable approach towards industrial biofuel production”, *Chemical Engineering Journal Advances*, vol. 10, p. 100284, may 2022, doi: 10.1016/J.CEJA.2022.100284.
- [13] G. C. Castellar Ortega, E. R. Angulo Mercado, y B. M. Cardozo Arrieta, “Transesterificación de aceites vegetales empleando catalizadores heterogéneos Transesterification vegetable oils using heterogeneous catalysts”, vol. 12, pp. 90–104, 2014.
- [14] A. Guarenas y A. Chirinos’, “Producción de Biodiesel de aceite de coco artesanal de una población del Estado Falcón”.
- [15] M. Medina Villadiego, Y. O. Roa, y L. Tejada Benítez, “Esterificación Y Transesterificación De Aceites Residuales Para Obtener Biodiesel”, doi: 10.17151/luaz.2015.40.3.
- [16] “HOME - Federación Nacional de Biocombustibles”. <https://fedebiocombustibles.com/> (consultado el 26 de julio de 2023).
- [17] “Vista de Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria”. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1432/1432> (consultado el 24 de mayo de 2023).
- [18] R. De Colombia *et al.*, “BIOCOMBUSTIBLES E N C O L O M B I A”, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: www.digitosydisenos.com
- [19] “Inicio - Fedepalma”. <https://fedepalma.org/> (consultado el 26 de julio de 2023).

- [20] J. A. García Nuñez, S. M. Rincón Miranda, y D. M. Martínez Cárdenas, “Metil éster sulfonado :una generación nueva de surfactantes”, p. 70 p. .,Il., 2010, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/1325>
- [21] “Cinética de la reacción de transesterificación para la producción de biodiesel a partir del aceite de *Jatropha curcas* L., en la provincia de Manabí, Ecuador”.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852018000200007
(consultado el 1 de junio de 2023).
- [22] J. Liso, M. Rut, M. De, y E. Torres, “La neutralización ácido-base a debate”, *Enseñanza de las Ciencias. Revista de investigación y experiencias didácticas*, vol. 20, núm. 3, pp. 451–464, ene. 2002, doi: 10.5565/rev/ensciencias.3960.
- [23] T. Attarbach, M. D. Kingsley, y V. Spallina, “New trends on crude glycerol purification: A review”, *Fuel*, vol. 340, p. 127485, may 2023, doi: 10.1016/J.FUEL.2023.127485.
- [24] H. W. Tan, A. R. Abdul Aziz, y M. K. Aroua, “Glycerol production and its applications as a raw material: A review”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 27, pp. 118–127, nov. 2013, doi: 10.1016/J.RSER.2013.06.035.
- [25] “Global Glycerol Market 2019-2023 | 7% CAGR Projection Through 2023 | Technavio | Business Wire”. <https://www.businesswire.com/news/home/20191217005425/en/Global-Glycerol-Market-2019-2023-7-CAGR-Projection-Through-2023-Technavio> (consultado el 26 de julio de 2023).
- [26] “Global Glycerol Market 2019-2023 ”.
<https://www.businesswire.com/news/home/20191217005425/en/Global-Glycerol-Market-2019-2023-7-CAGR-Projection-Through-2023-Technavio> (consultado el 24 de mayo de 2023).
- [27] M. B. Viana, A. V. Freitas, R. C. Leitão, G. A. S. Pinto, y S. T. Santaella, “Anaerobic digestion of crude glycerol: a review”, <https://doi.org/10.1080/09593330.2012.692723>, vol. 1, núm. 1, pp. 81–92, nov. 2012, doi: 10.1080/09593330.2012.692723.
- [28] M. Pagliaro, “C3-Monomers”, *Glycerol*, pp. 23–57, ene. 2017, doi: 10.1016/B978-0-12-812205-1.00002-3.

- [29] “Propylene Glycol USP ”.
https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/product/sial/p4347?gclid=Cj0KCQjwjryjBhD0ARIsAMLvnF9OpKzt9rEDd9R_GhLV22Lo4ARzhPWa73J8wDlr4T2ocRT-iac7rf8aAvWpEALw_wcB&gclsrc=aw.ds (consultado el 24 de mayo de 2023).
- [30] J. G. van Bennekom, R. H. Venderbosch, H. J. Heeres, J. G. van Bennekom, R. H. Venderbosch, y H. J. Heeres, “Biomethanol from Glycerol”, *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*, dic. 2012, doi: 10.5772/53691.
- [31] S. García, “REFERENCIAS HISTÓRICAS Y EVOLUCIÓN DE LOS PLÁSTICOS”, *Rev. Iberoam. Polim*, vol. 10, núm. 1, pp. 71–80, 2009.
- [32] J. de Cusa Ramos, *Aplicaciones del plástico en la construcción*, 1a. ed. en Biblioteca CEAC de Construcción. : Ediciones CEAC, 1979.
- [33] C. E. Jr. C. Raimond B. Seymour, *Introducción a la química de los polímeros* . Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en:
<https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=OdMfEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=Introducci%C3%B3n+a+la+qu%C3%ADmica+de+los+pol%C3%ADmeros&ots=GwUnUGnRyM&sig=1-RGxd6-UuT116am4lcFR0P9XTU#v=onepage&q=Introducci%C3%B3n%20a%20la%20qu%C3%ADmica%20de%20los%20pol%C3%ADmeros&f=false>
- [34] A. J. Jamieson, L. S. R. Brooks, W. D. K. Reid, S. B. Piertney, B. E. Narayanaswamy, y T. D. Linley, “Explosion in Plastic Pollution Post-World War II Seen in Marine Sediments”, *R Soc Open Sci*, vol. 6, núm. 2, sep. 2019, doi: 10.1098/RSOS.180667.
- [35] D. Segura, “Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables GacS/A and the Rsm system in *Azotobacter vinelandii* View project”, 2007, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en:
<https://www.researchgate.net/publication/242144167>
- [36] L. A. Amaral-Zettler *et al.*, “The biogeography of the Plastisphere: Implications for policy”, *Front Ecol Environ*, vol. 13, núm. 10, pp. 541–546, dic. 2015, doi: 10.1890/150017.

- [37] M. del M. López-Fernández, A. J. Franco-Mariscal, M. del M. López-Fernández, y A. J. Franco-Mariscal, “Indagación sobre la degradación de plásticos con estudiantes de secundaria”, *Educación química*, vol. 32, núm. 2, pp. 21–36, abr. 2021, doi: 10.22201/FQ.18708404E.2021.2.76553.
- [38] ONU programa para el medio ambiente, “Contaminación por plásticos”. <https://www.unep.org/es/contaminacion-por-plasticos> (consultado el 24 de mayo de 2023).
- [39] “Cómo reducir el impacto de los plásticos de un solo uso”. <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/como-reducir-el-impacto-de-los-plasticos-de-un-solo-uso> (consultado el 24 de mayo de 2023).
- [40] G. B. Bentónicos, “Mar del plástico: una revisión del plástico en el mar.”, *REV. INVEST. DESARR. PESQ. N°*, vol. 27, pp. 83–105, 2015, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://aquadocs.org/handle/1834/10964>
- [41] “TEMA 2. TIPOS DE PLASTICOS, ADITIVACIÓN Y MEZCLADO”.
- [42] Juan Manuel López Romero, “Transformación de materiales termoplásticos. QUIT0209”, 2014. https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=qkspEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT4&dq=Termoplasticos&ots=NUPcjZuFmQ&sig=O-CEs4HVeN5N1h2-3vaXWOqFSshs&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (consultado el 24 de mayo de 2023).
- [43] M. Olivares Santiago, C. Galan Marin, y J. Roa Fernández, “Los composites. Características y aplicaciones en la edificación”. <https://informesdelaconstruccion.revistas.csic.es/index.php/informesdelaconstruccion/article/view/568/643> (consultado el 24 de mayo de 2023).
- [44] R. Benavente, “Polímeros amorfos, semicristalinos, polímeros cristales líquidos y orientación”, 1997.
- [45] B. P. Bustamante, “La degradación de los plásticos”, *Revista Universidad EAFIT*, vol. 30, núm. 94, pp. 67–86, ago. 2012, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea].

Disponible en: <https://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/view/1408>

- [46] A. Felipe, R. González, y T. Osswald, “Determinación de la degradación térmica de polímeros por análisis de cambio de color”, *Ingeniería*, vol. 21, núm. 1, pp. 19–30, 2016, doi: 10.14483/UDISTRITAL.JOUR.REVING.2016.1.A02.
- [47] E. Baltierra-Trejo, J. Manuel Sanchez-Yañez, y L. Marquez-Benavides, “Positive efect of pretreatment with ultraviolet radiation on plastic film on its anaerobic mesophilic degratation rate”, 2016, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/308024019>
- [48] Aurelio Ramírez, Leticia Guadalupe Navarro, y Jorge Conde Acevedo, “Degradación Química Del Poli(Etilen Tereftalato)”, 2010. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28042010000300002 (consultado el 24 de mayo de 2023).
- [49] A. Labeaga, V. Tutor, J. De Dios, C. Ruiz, y F. De Ciencias, “Polímeros biodegradables. Importancia y potenciales aplicaciones”, mar. 2018.
- [50] A. A. Khardenavis, M. Suresh Kumar, S. N. Mudliar, y T. Chakrabarti, “Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly beta-hydroxybutyrate”, *Bioresour Technol*, vol. 98, núm. 18, pp. 3579–3584, dic. 2007, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2006.11.024.
- [51] S. A. S. Moreno, M. A. M. Montoya, y A. L. M. Martínez, “Identificación de bacterias productoras de Polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique”, *Rev Colomb Biotecnol*, vol. 14, núm. 2, pp. 89–100, jul. 2012, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/37286>
- [52] Y. G. García, J. Carlos, M. Contreras, G. Reynoso, J. Antonio, y C. López, “Síntesis Y Biodegradación De Polihidroxicanoatos: Plásticos De Origen Microbiano”.

- [53] C. S. K. Reddy, R. Ghai, Rashmi, y V. C. Kalia, “Polyhydroxyalkanoates: an overview”, *Bioresour Technol*, vol. 87, núm. 2, pp. 137–146, abr. 2003, doi: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2.
- [54] L. Á. Ramírez Pérez y D. Sánchez Vargas, “Evaluación de mezclas de polihidroxibutirato (P3HB) con aditivos para la obtención de un material polimérico”, nov. 2019, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/7718>
- [55] O. Cortés De Luna, “Producción de polihidroxibutirato (PHB) con un cultivo mixto fotoheterotrófico”, ene. 2018, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://tesis.ipn.mx/xmlui/handle/123456789/24021>
- [56] K. R. Shah, “Optimization and production of Polyhydroxybutarate(PHB) by *Bacillus subtilis* G1S1 from soil”, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, vol. 3, núm. 5, pp. 377–387, 2014, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://www.ijcmas.com>
- [57] A. Carolina, L. Delgado, y A. M. Cordoba, “Polihidroxicanoatos (PHA’s) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial”, *Informador técnico*, ISSN 0122-056X, ISSN-e 2256-5035, Vol. 79, N^o. 1, 2015, págs. 93-101, vol. 79, núm. 1, pp. 93–101, 2015, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5290930&info=resumen&idioma=SPA>
- [58] ... T. V. F.-R. y undefined 2014, “Clasificación de los Microorganismos”, *revistasbolivianas.ciencia.bo*, Consultado: el 1 de junio de 2023. [En línea]. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000500002&script=sci_arttext&tlng=es
- [59] “Bacteria | NHGRI”, mayo de 2023. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bacteria> (consultado el 24 de mayo de 2023).
- [60] J. Yadira y S. Riaño, “Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos.: Una solución frente a la contaminación del medio ambiente”, *Teoría y praxis investigativa*, ISSN-e 1900-9380, Vol. 5, N^o. 2, 2010, págs. 79-84, vol. 5, núm. 2, pp. 79–84, 2010, Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en:

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3702404&info=resumen&idioma=EN>
G

- [61] Y. H. Wei, W. C. Chen, H. S. Wu, y O. M. Janarthanan, “Biodegradable and Biocompatible Biomaterial, Polyhydroxybutyrate, Produced by an Indigenous *Vibrio* sp. BM-1 Isolated from Marine Environment”, *Marine Drugs* 2011, Vol. 9, Pages 615-624, vol. 9, núm. 4, pp. 615–624, abr. 2011, doi: 10.3390/MD9040615.
- [62] V. Munjal *et al.*, “Genotyping and identification of broad spectrum antimicrobial volatiles in black pepper root endophytic biocontrol agent, *Bacillus megaterium* BP17”, *Biological Control*, vol. 92, pp. 66–76, ene. 2016, doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2015.09.005.
- [63] S. Shahid *et al.*, “Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509”, *J Biosci Bioeng*, vol. 116, núm. 3, pp. 302–308, sep. 2013, doi: 10.1016/J.JBIOSEC.2013.02.017.
- [64] P. S. Vary *et al.*, “*Bacillus megaterium*-from simple soil bacterium to industrial protein production host”, *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 76, núm. 5, pp. 957–967, oct. 2007, doi: 10.1007/S00253-007-1089-3/METRICS.
- [65] R. Biedendieck, B. Bunk, T. Fürch, E. Franco-Lara, M. Jahn, y D. Jahn, “Systems biology of recombinant protein production in *Bacillus megaterium*”, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, vol. 120, pp. 133–161, 2010, doi: 10.1007/10_2009_62/COVER.
- [66] G. M. Pumphrey, A. Ranchou-Peyruse, y J. C. Spain, “Cultivation-Independent Detection of Autotrophic Hydrogen-Oxidizing Bacteria by DNA Stable-Isotope Probing”, *Appl Environ Microbiol*, vol. 77, núm. 14, p. 4931, jul. 2011, doi: 10.1128/AEM.00285-11.
- [67] X. Yu, D. Nicks, A. Mulchandani, y R. Hille, “Efficient reduction of CO₂ by the molybdenum-containing formate dehydrogenase from *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*)”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, núm. 41, pp. 16872–16879, oct. 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.785576.

- [68] C. Brigham, “Perspectives for the biotechnological production of biofuels from CO₂ and H₂ using *Ralstonia eutropha* and other ‘Knallgas’ bacteria”, *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 103, núm. 5, pp. 2113–2120, mar. 2019, doi: 10.1007/S00253-019-09636-Y.
- [69] H. Wei *et al.*, “Prospects for engineering *Ralstonia eutropha* and *Zymomonas mobilis* for the autotrophic production of 2,3-butanediol from CO₂ and H₂”, *Engineering Microbiology*, vol. 3, núm. 2, p. 100074, jun. 2023, doi: 10.1016/J.ENGMIC.2023.100074.
- [70] “Ley 9 de 1979 Congreso de la República de Colombia”.
<https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=1177&dt=S> (consultado el 24 de mayo de 2023).
- [71] *Ley 685 de 2001*. Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en:
<http://www.secretariassenado.gov.co/Diarios/445222.htm4/2712010>
- [72] “Ley 1209 de 2008 Congreso de la República de Colombia”.
<https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=31442&dt=S>
(consultado el 24 de mayo de 2023).
- [73] *Ley 1715 de 2014*.
- [74] “Resolución 180 de 2014 Instituto Distrital de Gestión de Riesgos y Cambio Climático - IDIGER”. <https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=60348>
(consultado el 24 de mayo de 2023).
- [75] *Decreto 1609 de 2002* . Consultado: el 25 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en:
<https://www.habitatbogota.gov.co/transparencia/normativa/decretos/decreto-1609-2002>
- [76] *Ley 939 de 2004* . Consultado: el 25 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en:
<http://www.lexbase.co/lexdocs/indice/2004/10939de2004>
- [77] *Resolución 1420 de 2005*. Consultado: el 25 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en:
<https://vlex.com.co/vid/resolucion-1420-43228178>
- [78] *Resolución 38584 de 2018*. Consultado: el 25 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en:

https://www.supertransporte.gov.co/documentos/2018/Septiembre/Notificaciones_18_RNA/Resoluciones/38584de2018.pdf

- [79] *Decreto 596 de 2016*. Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma_pdf.php?i=69038
- [80] *Resolución 668 de 2016*. Consultado: el 25 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://fenavi.org/wp-content/uploads/2018/05/resolucion-668-de-2016-minambiente-bolsas-plasticas-1.pdf>
- [81] *Resolución 1407 de 2018* . Consultado: el 25 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.minambiente.gov.co/documento-normativa/resolucion-1407-de-2018/>
- [82] *Ley 2068 de 2020*. Consultado: el 24 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: http://www.secretariassenado.gov.co/senado/basedoc/ley_2068_2020.html
- [83] *Resolución 444 de 2008*. Consultado: el 25 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Resoluci%C3%B3n_0444_de_2008.pdf
- [84] ASTM, “Standard Test Method for Determination of Glycerin Assay by Titration (Sodium Meta Periodate)”, 2021. Consultado: el 28 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.astm.org/d7637-10r21.html>
- [85] F. L. Aguzín, G. A. Bedogni, N. B. Okulik, y C. L. Padró, “PURIFICACIÓN DE GLICEROL CRUDO Y SUS USOS EN CATÁLISIS”, 2015.
- [86] M. Cristina, A. Fajardo, I. J. Braulio, y A. Pinos, “Obtención de polihidroxibutirato (PHB) a partir del subproducto glicerol procedente de la transformación de aceites usados de palma a biodiesel.”, 2021.
- [87] “Recuperación De Poli-B-Hidroxihexanoato- Octanoato Sintetizado Por Pseudomonas Putida Mediante El Uso De Dispersiones Hipoclorito-Cloroformo | Universitas Scientiarum”. <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4945> (consultado el 25 de mayo de 2023).

- [88] S. K. Hahn, Y. K. Chang, B. S. Kim, y H. N. Chang, “Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform”, *Biotechnol Bioeng*, vol. 44, núm. 2, pp. 256–261, 1994, doi: 10.1002/BIT.260440215.
- [89] Sei Kwang Hahn, Yong Keun Chang, y Sang Yup Lee, “Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*.”, *Appl Environ Microbiol*, vol. 61, núm. 1, p. 34, 1995, doi: 10.1128/AEM.61.1.34-39.1995.
- [90] T. J. Beveridge, “Use of the Gram stain in microbiology”, <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>, vol. 76, núm. 3, pp. 111–118, 2009, doi: 10.1080/BIH.76.3.111.118.
- [91] Britanialab, “Nutritivo Agar”. Consultado: el 1 de junio de 2023. [En línea]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707641dee11.pdf
- [92] “CONTROL DE CALIDAD Tripteína Soya Agar suplementado con 5% de sangre ovina”.
- [93] Britanialab, “Sabouraud Glucosado Caldo”. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60708edc8645d.pdf (consultado el 1 de junio de 2023).
- [94] M. F. Villarreal-Delgado *et al.*, “El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola”, *Revista mexicana de fitopatología*, vol. 36, núm. 1, pp. 95–130, ene. 2018, doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-5.
- [95] L. Mendoza *et al.*, “Tiempo de crecimiento bacteriano en hemocultivos en neonatos”, *Rev Chil Pediatr*, vol. 86, núm. 5, pp. 337–344, sep. 2015, doi: 10.1016/J.RCHIPE.2015.07.004.
- [96] J. C. B. Pérez y R. A. H. Sánchez, “Efecto de la Relación Agitación-Aireación sobre el Crecimiento Celular y la Producción de Azadiractina en Cultivos Celulares de *Azadirachta indica* A. Juss.”, *Rev Fac Nac Agron Medellin*, vol. 63, núm. 1, pp. 5293–

5305, ene. 2010, Consultado: el 1 de junio de 2023. [En línea]. Disponible en:
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24950>

- [97] E. Barrientos y E. Levano, ““Cinética De Crecimiento De Una Levadura Probiótica (Saccharomyces Boulardii), En Bebida A Base Del Germinado De Maíz Morado (Zea mays L.)””, 2021.
- [98] M. Liliana Becerra Jiménez, “Producción De Un Polímero Tipo Polihidroxialcanoato (PHA) Empleando Residuos De La Producción De Biodiesel”, 2013.

ANEXOS

Anexo I.

Ficha Técnica del Glicerol Crudo



TECHNICAL DATA SHEET CRUDE GLYCERINE DATE:17/04/2020

1. DESCRIPTION

BioD Crude Glycerine is a by-product from the biodiesel production made from Colombian responsible palm oil mixture from *Elaeis guineensis* and Hybrid palm with traceable production. Crude Glycerin has a purity grade of about 80 percent it also contains water and salts. After a purification process can be use as valuable raw material for differences industries.

2. TECHNICAL CHARACTERISTICS

PROPERTIES	UNIT	Bio D SPECIFICATION	METHOD
Appearance	Visual	Report	Visual
Glycerin content (Assay)	%wt	80% min.	USP 35
Moisture content	%wt	15% max	ASTM E -203
pH	N/A	Report	Internal method
MONG	%wt	Report	ISO 2464
Ash	%wt	10% max	USP 35
Salt content as HCl	%wt	Report	Internal method
NaOH content	mg/Kg	Report	Internal method
Methanol content	%	0,1% max	Internal method

3. PRODUCT USES AND STORAGE CONDITIONS

The product is used in the following sectors.

- **Agroindustry**

It is used as an alternative source of energy in animal feed.

- **Construction industry**

In industrial applications for additive manufacturing, for concrete, and in cement manufacturing.

- **Others**

It can also be refined for use in a wide variety of applications in industry of printing inks, alkyd resins, etc.

For a right storage is necessary to consider the following safety recommendations:

Storage the product in closed containers. Keep the container dry, isolated, in a cool and well-ventilated area. Keep the container away from sources of ignition and incompatible materials.

SOCIAL AND ENVIRONMENTAL MANAGEMENT

We are 8,300 proud Colombians that work everyday for the responsible cultivation of 40,000 hectares of oil palm, its extraction and its transformation into the products that we deliver today.

The well-being of all members of our Symbiotic Circle of Business is our highest priority. The true sustainability of Bio D is always based on serving in the best way to all its participants.

This is why the philosophy of Bio D is guided by five simple words:



Above All, Everyone Must Benefit. TM

ATTENTION OF REQUESTS, COMPLAINTS, CLAIMS AND SUGGESTIONS

The RCS are received by written means in the mailboxes of suggestions or addressed to the email atencionalcliente@biodsa.com, website www.biodsa.com or through a phone call to the number +57 891 03 00

Anexo 2.

Factura de microorganismos CMLAB



CMLAB SAS Nit. 900922389-0

Documento Oficial de Autorización de Numeración Facturación Electrónica No. 18764032435343 que habilita desde COMP 4731 hasta COMP 6000. Vence 2023-08-03

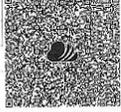
Calle 7 a Bis c # 78-68, 2 do. Piso - Bogotá
 Telefonos: (1) 9370405 / 3209807937 / 3107785961
 www.cmlab.com.co / comercial@cmlab.com.co

No somos Grandes Contribuyentes

IVA Regimen Común No somos Retenedores de Renta ni de IVA
 Actividad Económica ICA 4664 11.04 X 1000

CLIENTE: LAURA CAMILA VILLABONA LOZADA
 NIT: 1233503332
 DIRECCIÓN: Calle 8 # 86 - 65 Castilla imperial torre 1 apartamento 2105
 CIUDAD: Bogotá D.C.
 TELÉFONO: 6781519

Factura Electrónica De Venta No. COMP 5949	
FECHA FACTURA	FECHA VENCIMIENTO
27/03/2023	27/03/2023
Orden de Compra No.	FORMA DE PAGO
5682	Credito



ITEM	Referencia	Descripción	Lote	F. Venc.	Cantidad	V. Unitario	IVA	Total
1	0201P	BACILLUS MEGATERIUM ATCC® 14581™* - KS2C X 2 KWIK-STIK - PASE 3 - IMPORTACION 30 - 45 DIAS - MICROBIOLOGICS	201-42-23	31/07/2024	1	500.000	0%	500.000

Total ítems 1 Valor en Letras QUINIENTOS MIL PESOS M/CTE

Observacion: No se aceptan devoluciones y/o reclamaciones de productos 3 días después de efectuada la entrega de los mismos.

COTIZACION 5682

Esta Factura Electrónica tiene efectos legales y es Título Valor. 1. Recibí de conformidad la mercancía y/o servicios que trata esta factura y acepto el valor estipulado en la misma. 2. El pago del presente documento es exigible en nuestras oficinas a la fecha de su vencimiento y causa un interés que aplica a la tasa máxima legal permitida por la Ley. Si su pago se realiza en cheque y este es devuelto se aplicará la sanción del Art. 731 del código de comercio.

Presentación: Códigos de la Factura de Venta Electrónica Fecha y hora de generación: 27/03/2023 08:47:53

SUBTOTAL	500.000
IVA	0
RETEIVA	0
RETEFUENTE	0
RETEICA	0
TOTAL A PAGAR	500.000

Anexo 3.

Certificado de análisis de pureza Microbiologics



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>Specifications Microorganism Name: Bacillus megaterium Catalog Number: 0201 Lot Number: 201-42** Reference Number: ATCC® 14581™* Passage from Reference: 3</p>	<p>Expiration Date: 2024/7/31 Release Information: Quality Control Technologist: Kavitha Gobalan Release Date: 2022/8/9</p>
--	--

Performance	
<p>Macroscopic Features: Medium, circular, convex, entire to slightly erose edge, gray/white, glistening, grainy appearance Microscopic Features: Straight, gram positive rod, with an ellipsoidal or spherical, terminal endospore</p>	<p>Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)</p>

ID System: MALDI-TOF (1)

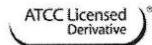
See attached ID System results document.

Amanda Kuperus
 Director of Quality Control
 AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2022-08-02T15:06:21.563 KG

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
B1 (+++) (A)	201-42	Bacillus megaterium	2.06

Comments:

The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.

Anexo 4.

Ficha Técnica de Film Adherente Cintandina



FICHA TECNICA

FILM STRETCH Película estirable Aplicación en máquina

Película Plástica Estirable, fabricada con equipos de alta tecnología que permite la coextrusión a 5 capas de resinas de polietileno de baja densidad, obteniendo películas de calidad con excelentes propiedades como estiramiento, adherencia, brillo y transparencia que brindan a nuestros clientes uno de los mejores rendimientos en el mercado, mismos que se traducen en una significativa reducción de costos en sus procesos de embalaje.

Usos típicos

Industria de bebidas, automotriz, vidriera, alimentos, papel, entre otras.

Características

- Excelentes propiedades ópticas
- Buena resistencia al punzonado
- Buena resistencia al rasgado
- Bajo nivel de ruido al aplicarse
- Alto estiramiento.

Beneficios

- Buena estabilidad de pallets
- Alto rendimiento en la aplicación
- Ideal para aplicaciones en equipos orbitales
- Alta velocidad de aplicación

Datos de presentación del producto

REFERENCIA	MEDIDA	PESO NETO	Unidad Empaque
LINEA STRETCH AUTOMATICO	0,50*15*2400	16,65	6
LINEA STRETCH AUTOMATICO	0,50*20*1830	16,93	6

Propiedades físicas

Material: Polietileno lineal de baja densidad (LLDPE)
Polietileno de ultra baja densidad (ULDPE)

Planta Principal	www.cintandina.com	Regionales
Carrera 2 No. 37 - 50 Cali - Colombia ☎ Pbx: (57-2) 443 0801 Fax: (57-2) 443 0801 Ext. 104 - 105		Bogotá (1) 253 67 75 Medellín (4) 412 4193 Barranquilla (5) 353 2933

PROPIEDAD	UNIDADES	VALORES TÍPICOS		METODO
Calibre	Mils	15	20	ASTM-D- 5947
	Micras	0.6 +/- 2	0.8 +/- 2	
Ancho	mm	50 +/- 2		ASTM-D- 2103
Color	----	Transparente		-----
Resistencia al Punzonado	N	17	19	ASTM D 5748
Tensión a Ruptura				
Dirección máquina DM	Mpa	40	44	ASTM D- 882
Dirección transversal DT		3.5	4.5	
Elongación				
Dirección máquina DM	%	400	500	ASTM D- 882
Dirección transversal DT		500	700	

Las características físicas y de funcionamiento mostradas arriba han sido obtenidas de ensayos recomendados por la ASTM, normas internacionales y no representan garantía de comportamiento del producto. Rollos individuales pueden variar ligeramente de estos promedios. El usuario debe determinar si el producto cumple para un propósito en particular y es adecuado para el método de aplicación antes de usarlo.

Recomendaciones de uso y almacenamiento

- Se debe almacenar en posición vertical.
- Si utiliza cuchilla para abrir el contenido, tenga cuidado de no deslizarla sobre el material plástico del rollo. Corte sobre las áreas que no están en contacto con el producto.
- El rollo no puede estar cerca de materiales que expidan olores, los cuales pueden contaminarlo ni transportarlo junto con productos químicos, especies por que puede dañar el contenido del empaque.
- El rollo no puede estar en contacto con la humedad, ya que los tubos pueden colapsar.
- La posición de almacenamiento y transporte de los rollos debe ser vertical.
- No se debe exponer a la intemperie (estar libre de polvo, rayos del sol, etc.)
- Se debe evitar maltratar el material, que reciba golpes en las orillas, porque esto puede causar Reventamiento en el momento de la aplicación.
- El producto debe permanecer en su empaque original antes de utilizarlo.

E-03/ 01-16