



# **PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA, LACTO SUERO Y GLICERINA DEL BIODIESEL, USANDO LADOS ACTIVADOS**

## **TESIS DE DOCTORADO**

**JUAN CARLOS ALZATE**

Presentada ante la Facultad de Ingeniería de la  
Universidad Nacional de la Plata  
para la obtención del grado académico de

## **DOCTOR EN INGENIERÍA**

### **Dirección de tesis:**

Directora: Dra. Noemí E. Zaritzky

Co-director: Dr. Alejandro H. Caravelli

**2025**

*El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos, CIDCA (UNLP, CIC, CCT–La Plata–CONICET), Con el apoyo del Centro Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) bajo la dirección de la Dra. Noemí E. Zaritzky y el Dr. Alejandro H. Caravelli. El mismo se pone a consideración de las autoridades de la Universidad Nacional de La Plata, con el objeto de acceder al grado académico de Doctor en Ingeniería de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de la Plata.*

*Ing. MSc Juan Carlos Alzate Marin*

## AGRADECIMIENTOS

- Esta tesis no hubiese tenido un principio y un fin sin el apoyo, la inmensa paciencia, dedicación y motivación personal y profesional de la Dra. Noemí Zaritzky y el Dr. Alejandro Caravelli, a quienes debo mi mayor gratitud.
- A los compañeros del grupo de investigación en efluentes del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) con los cuales compartí buenos momentos personales y académicos durante tantos años.
- A mi familia por brindarme el apoyo necesario e incondicional para encarar esta nueva etapa de mi vida.
- Definitivamente a Bibiana, por caminar el día a día conmigo, por cada palabra y cada silencio, por alegrarse con mis alegrías y escuchar mis angustias, por cada aventura por cuidarme y ser mi complemento.
- Al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), por brindar el espacio físico e instrumental que hizo posible el desarrollo de la presente tesis.
- Al CONICET por otorgarme la beca doctoral con la cual pude culminar mi doctorado.
- Al grupo de nuevos materiales, Dra. Sandra Rivero y Dra. Adriana Pinotti, por su gran colaboración en las mezclas poliméricas.
- Al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA) por su colaboración en la determinación de las características del biodiesel obtenido de aceites vegetales usados.

# Índice

CAPITULO 1 .....	13
Introducción .....	14
1.1 Recursos hídricos.....	14
1.2 Contaminación del agua, saneamiento y agua potable: Situación mundial .....	15
1.3 Contaminación del agua: Aguas residuales.....	19
1.4 Efectos de la descarga de efluentes sobre el medio ambiente .....	22
1.4.1 Aumento de la materia orgánica, nutrientes y metales.....	22
1.4.2 Eutrofización .....	23
1.5 Efectos de la contaminación del agua sobre la salud .....	23
1.6 Situación en Argentina .....	25
1.6.1 Recursos hídricos disponibles .....	25
1.6.2 Cobertura de agua potable y alcantarillado.....	26
1.6.3 Contaminación de las aguas subterráneas.....	27
1.6.4 Contaminación de las aguas de superficie .....	28
1.6.5 Aguas residuales.....	30
1.6.5.1 Aguas residuales domesticas .....	30
1.6.5.2 Aguas residuales industriales .....	31
1.6.6 Contaminación por efluentes líquidos industriales .....	33
1.7 Marco legal.....	35
1.7.1 Legislación ambiental para descarga de efluentes .....	35
1.8 Tratamiento biológico de aguas residuales.....	36
1.8.1 Sistema de lodos activados .....	37
1.8.2 Reactores discontinuos (batch).....	38
1.8.3 Reactor de cargas secuenciales (Sequential Batch Reactor, SBR).....	39
1.9 Revalorización de efluentes. Generación de productos con valor agregado: Bioplásticos ...	41
1.10 Materiales poliméricos.....	43
1.10.1 Clasificación de los polímeros .....	43

1.10.1.1 Clasificación según su estructura .....	43
-Lineales: .....	43
-Ramificados:.....	43
1.10.1.2 Clasificación según su origen .....	44
-Polímeros Naturales:.....	44
-Polímeros Sintéticos:.....	44
-Polímeros naturales modificados: .....	44
1.10.1.3 Homopolímeros y copolímeros .....	44
-Homopolímero:.....	44
-Copolímero:.....	44
1.10.1.4 Clasificación por sus propiedades .....	45
-Termoplásticos:.....	45
-Termoestables:.....	46
-Elastómeros: .....	46
1.10.2 Biopolímeros .....	46
1.10.2.1 Biopolímeros que dan lugar a bioplásticos de origen renovable.....	48
-Biopolímeros extraídos directamente de la biomasa .....	49
-Biopolímeros producidos mediante monómeros bio-derivados .....	49
-Biopolímeros producidos por organismos vivos .....	49
-Biopolímeros con características plásticas obtenidos de mezclas de materiales.....	49
1.11 Plásticos convencionales y bioplásticos .....	49
1.11.1 Problemas ambientales.....	51
1.11.2 Ciclo del carbón .....	53
1.11.3 Origen y producción biotecnológica de biopolímeros plásticos .....	54
1.11.4 Polihidroxialcanoatos (PHA).....	54
1.11.5 Producción de PHA.....	56
1.11.5.1 Etapa de selección.....	56
1.11.5.2 Etapa de producción .....	57
1.12 Procesos de la industria láctea.....	57
1.12.1 Producción de queso.....	57
1.12.2 Producción de suero de queso .....	60

1.13 Tratamiento de aguas residuales de industria láctea .....	64
1.13.1 Tratamiento mecánico .....	64
1.13.2 Tratamiento fisicoquímico .....	64
1.13.3 Tratamiento biológico .....	65
1.13.3.1 Procesos aeróbicos.....	65
1.13.3.2 Procesos anaeróbicos.....	66
1.13.3.3 Procesos combinados (anaeróbicos-aeróbicos).....	66
1.14 Aprovechamiento y recuperación de componentes de interés del Suero de queso.....	67
1.15 Producción de PHA utilizando suero de queso, subproducto de la industria láctea .....	69
1.16 Biodiesel .....	71
1.16.1 Procesos de producción de biodiesel.....	73
1.16.1.1 Catálisis básica.....	73
1.16.1.2 Catálisis ácida .....	75
1.17 Glicerol crudo (GC) subproducto del biodiesel .....	76
1.18 Producción de PHA utilizando glicerol, subproducto en el proceso de producción de biodiesel .....	78
1.19 Objetivos de la Tesis.....	79
1.19.1 Objetivo general de la Tesis .....	79
1.19.2 Objetivos específicos.....	79
1.20 Estructura de la tesis .....	80
CAPITULO 2 .....	82
Materiales y métodos .....	83
2.1 Sistema de producción de PHA .....	83
2.1.1 Etapa de selección del cultivo mixto productor de PHA .....	83
2.1.1.1 Reactor y condiciones operativas .....	83
2.1.1.2 Agua residual sintética .....	85
2.1.1.3 Inoculación del reactor.....	85
2.1.1.4 Evaluación del funcionamiento de los SBRs.....	85
2.1.2 Etapa de producción de PHA.....	86
2.1.2.1 Reactor y condiciones operativas .....	86
2.1.2.2 Agua residual sintética y parámetros físico-químicos del reactor batch .....	87

2.2 Determinación del tiempo de residencia celular (TRC) y tiempo de residencia hidráulico (TRH) para los SBRs .....	87
2.2.1 Tiempo de residencia celular (TRC).....	87
2.2.2 Tiempo de residencia hidráulico (TRH) .....	87
2.3 Métodos analíticos.....	88
2.3.1 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno .....	88
2.3.2 Determinación de la concentración de biomasa como DQO y sólidos suspendidos totales y volátiles.....	90
2.3.3 Cuantificación de compuestos inorgánicos solubles de fósforo y nitrógeno .....	92
2.3.3.1 Cuantificación de ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) .....	92
2.3.3.2 Cuantificación de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3$ ).....	93
2.4 Determinación de las cargas volumétricas de sustrato orgánico y de nitrógeno y fosforo inorgánicos .....	93
2.4.1 Carga volumétrica de sustrato orgánico .....	93
2.4.2 Carga volumétrica de nitrógeno amoniacal .....	94
2.4.3 Carga volumétrica de fosforo.....	94
2.5 Velocidad de consumo de oxígeno .....	94
2.6 Detección microscópica de los gránulos de PHA .....	95
2.7 Extracción y Cuantificación de PHA.....	97
2.7.1 Secado de biomasa.....	97
- Secado en estufa de vacío.....	98
- Deshidratación por liofilización.....	99
2.7.2 Extracción, precipitación y purificación de PHA.....	99
-Extracción de PHA.....	99
-Método por reflujo .....	99
-Método Soxhlet.....	100
-Precipitación y purificación de PHA .....	101
2.7.3 Cuantificación de PHA, rendimiento y pureza .....	101
2.8 Preparación de las mezclas poliméricas.....	102
2.9 Caracterización físico-química del polímero .....	103
2.9.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) .....	103

2.9.1.1 FTIR para muestras de biomasa: análisis semi-cuantitativo de PHA .....	104
2.9.1.2 Espectroscopía FT-IR para matrices individuales y compuestas (PHA extraído) ....	105
2.9.2 Análisis térmico a través de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	105
2.9.2.1 Análisis térmico del PHA extraído: efecto de los monómeros HB y HV .....	114
2.9.2.2 Análisis térmicos de las películas individuales y compuestas de PLA y PHA.....	115
2.10 Determinación de parámetros cinéticos y estequiométricos del sistema de producción de PHA.....	117
2.11 Análisis estadístico .....	118
CAPÍTULO 3 .....	119
Producción de polihidroxicanoatos a partir de suero de queso .....	120
3.1 Producción de PHA utilizando cultivos mixtos .....	120
3.2 Objetivos del Capítulo .....	121
3.3 Experimentos preliminares .....	123
3.3.1 Materiales y métodos .....	123
3.3.1.1 Puesta en marcha y estabilización del SBR .....	123
3.3.1.2 Condiciones operativas .....	124
3.3.1.3 Determinaciones fisicoquímicas.....	125
3.3.2 Ensayos experimentales con suero de queso .....	125
3.3.2.1 Composición del agua residual sintética (ARS) para los experimentos preliminares .....	125
3.3.3 Resultados y discusión de los experimentos preliminares .....	126
3.3.3.1 Resultados del Experimento preliminar 1 .....	126
3.3.3.2 Resultados Experimento preliminar 2.....	127
3.4 Nuevas condiciones operativas para obtener un régimen Feast/Famine .....	128
3.4.1 Selección de bacterias con capacidad de acumular PHA. Sistemas con etapas Feast/Famine.....	128
3.4.2 Determinaciones fisicoquímicas.....	129
3.4.3 Composición del agua residual sintética (ARS) para los experimentos finales.....	130
3.5 Resultados del Experimento 3.....	131
3.6 Resultados del Experimento 4.....	133
3.7 Resultados del Experimento 5.....	135

3.7.1 Tinción y observación microscópica.....	136
3.7.2 Determinación de polihidroxialcanoato intracelular por FT-IR.....	137
3.8 Métodos de obtención de PHA a partir de la biomasa .....	139
3.8.1 Selección del método de obtención del PHA .....	141
3.8.1.1 Secado/deshidratación de biomasa y extracción de PHA.....	141
3.8.1.2 Tiempo de extracción por reflujo.....	143
3.9 Resultados obtenidos aplicando las condiciones óptimas del método de secado de biomasa, extracción y purificación del PHA.....	144
3.9.1 Centrifugación y secado de la biomasa .....	144
3.9.2 Extracción y purificación de PHA.....	146
3.10 Sistema de producción de PHA con suero de queso.....	149
3.10.1 Condiciones optimizadas para la producción de PHA.....	149
3.10.2 Puesta en marcha del reactor Batch para la producción de PHA .....	149
3.10.3 Ensayos experimentales.....	149
3.10.4 Agua residual sintética (ARS).....	149
3.11 Sistema limitado en nutrientes (LN).....	150
3.11.1 Determinación de polihidroxialcanoatos intracelulares por FT-IR.....	152
3.11.2 Cuantificación de PHA, rendimiento y pureza .....	153
3.12 Sistema limitado en oxígeno (LO) .....	157
3.12.1 Determinación por FT-IR de polihidroxialcanoatos .....	159
3.12.2 Cuantificación de PHA, rendimiento y pureza .....	160
3.13 Método para monitorear la producción de PHA intracelular usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	162
3.14 Parámetros estequiométricos del sistema de producción limitado en nitrógeno y limitado en oxígeno .....	163
3.15 Determinación de características térmicas por Calorimetría diferencial de barrido del PHA extraído .....	165
3.16 Conclusiones del Capítulo .....	168
CAPITULO 4 .....	172
Producción de polihidroxialcanoatos a partir de glicerol crudo .....	173
4.1 Producción de biodiesel .....	173
4.2 Objetivos del capítulo.....	174

4.3 Experimentos preliminares (Aclimatación de barros activados) .....	175
4.3.1 Puesta en marcha y estabilización del SBR .....	175
- Aclimatación.....	176
- Selección 1.....	176
4.3.2 Determinaciones fisicoquímicas.....	176
4.3.3 Composición del agua residual sintética (ARS) .....	177
4.4 Resultados y discusión .....	178
4.4.1 Sistema de selección del cultivo mixto: Resultados del ensayo de aclimatación .....	178
4.5 Obtención de glicerina cruda a partir de la producción de biodiesel usando aceite vegetal reciclado .....	181
4.5.1 Obtención del aceite vegetal usado .....	181
4.5.2 Pretratamiento del aceite vegetal usado .....	181
- Filtración en caliente .....	181
- Eliminación de la humedad .....	181
4.5.3 Determinaciones analíticas .....	182
- Ácidos grasos libres .....	182
- Índice de saponificación.....	183
4.6 Producción de biodiesel .....	183
4.6.1 Esterificación ácida.....	183
4.6.2 Transesterificación básica .....	185
4.7 Separación del biodiesel y la glicerina .....	186
4.8 Purificación del biodiesel .....	186
4.9 Cuantificación residual de monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y glicerina libre en el biodiesel por cromatografía gaseosa .....	187
4.9.1 Fase móvil (gas portador).....	188
4.9.2 Sistema de inyección de muestra.....	188
4.9.3 Columna cromatográfica .....	190
4.9.4 Fase estacionaria.....	190
4.9.5 Detectores .....	190
4.9.5.1 Detector de ionización de llama (FID).....	191
4.9.6 Análisis cuantitativo .....	192

4.10 Cromatógrafo de gases .....	192
4.10.1 Preparación de patrones por método de estándar interno .....	193
4.10.2 Preparación de muestras de Análisis .....	194
4.11 Resultados y discusión .....	195
4.11.1 Pre-tratamiento del aceite .....	195
4.11.2 Análisis fisicoquímico del aceite.....	197
4.12 Producción de biodiesel .....	198
4.12.1 Esterificación y transesterificación (catálisis en dos etapas), aceite de alta acidez ....	198
- Esterificación (catálisis Acida) .....	198
- Secado del producto obtenido en el proceso de esterificación.....	199
- Transesterificación (catálisis alcalina) .....	200
- Lavado del biodiesel.....	202
4.12.2 Transesterificación (catálisis en una etapa) .....	203
- Lavado del biodiesel.....	204
4.13 Análisis del biodiesel .....	205
4.14 Experimento definitivo con glicerol crudo .....	207
4.14.1 Selección de bacterias con capacidad de acumular PHA. Sistema con régimen Feast/Famine alimentado con glicerol crudo.....	207
4.14.2 Condiciones operativas .....	207
4.14.3 Determinaciones fisicoquímicas.....	208
4.14.4 Composición del agua residual sintética para el glicerol crudo (ARS <sub>GC</sub> ) .....	209
4.15 Resultados y discusión del sistema de selección con glicerol crudo.....	209
4.15.1 Tinción y observación microscópica.....	211
4.16 Sistema de producción de PHA con glicerol crudo .....	212
4.16.1 Puesta en marcha del reactor Batch para la producción de PHA .....	212
4.16.2 Agua residual sintética (ARS).....	212
4.16.3 Proceso de extracción y purificación de PHA.....	213
4.17 Resultados del sistema de producción.....	215
4.17.1 Cuantificación de PHA, rendimiento y pureza .....	216
4.17.2 Parámetros estequiométricos del sistema de producción .....	217
4.17.3 Determinación del PHA obtenido por Calorimetría diferencial de barrido .....	220

4.18 Conclusiones del Capítulo .....	221
CAPITULO 5 .....	226
Mezclas poliméricas de PHA y PLA.....	227
5.1 PHA y PLA en la industria .....	227
5.2 Objetivos del Capítulo .....	229
5.3 Materiales y métodos .....	229
5.3.1 Desarrollo de las mezclas poliméricas.....	229
5.3.1.1 Preparación de las mezclas poliméricas.....	229
5.3.1.2 Ensayos experimentales.....	230
5.3.2 Caracterización de las películas formuladas .....	231
5.3.2.1 Espesor de las películas.....	231
5.3.2.2 Permeabilidad al vapor de agua.....	231
5.3.2.3 Difracción de rayos X (DRX).....	234
5.3.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	236
5.3.2.5 Calorimetría diferencial de barrido.....	238
5.3.2.6 Espectroscopía FT-IR para matrices individuales y compuestas.....	238
5.3.2.7 Análisis de biodesintegración de las películas .....	238
5.4 Resultados y discusión .....	240
5.4.1 Análisis térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido Modulada (MDSC).....	240
5.4.2 Análisis por espectroscopía ATR-FTIR .....	245
5.4.3 Análisis por difracción de rayos-X (DRX) .....	247
5.4.4 Análisis macroscópico y microestructural por SEM .....	248
5.4.5 Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	249
5.4.6 Ensayo de biodesintegración en suelo.....	251
5.5. Conclusiones del capítulo.....	255
CAPITULO 6 .....	257
Conclusiones finales.....	258

# **CAPITULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

# Introducción

## 1.1 Recursos hídricos

En la actualidad el agotamiento de los recursos naturales especialmente el agua se considera una situación crítica a nivel mundial. La Tierra tiene un total de 1400 millones de kilómetros cúbicos de agua de los cuales el 97,41% se encuentra en los océanos. Como se evidencia en la Figura 1.1 el agua dulce en la tierra corresponde al 2,59% del total del agua del planeta (42 millones de km<sup>3</sup>), el 0,54% (226800 km<sup>3</sup>) del total del agua dulce está disponible para el uso humano, esta cantidad representa sólo el 0,014% del agua total del planeta que se encuentra en ríos, lagos, estanques, pozos, etc. La mayor parte del agua se encuentra en forma de icebergs, placas de hielo y glaciares o en profundos acuíferos de aguas subterráneas. La ubicación geográfica es un parámetro fundamental para la disponibilidad de agua dulce; las regiones ecuatoriales pueden tener exceso de agua, por la gran cantidad de agua precipitada en relación con la evaporada. Sin embargo, en las regiones subtropicales la evaporación es mayor en relación con la precipitación causando escasez de agua dulce (Kanade y Bhattacharya., 2016).

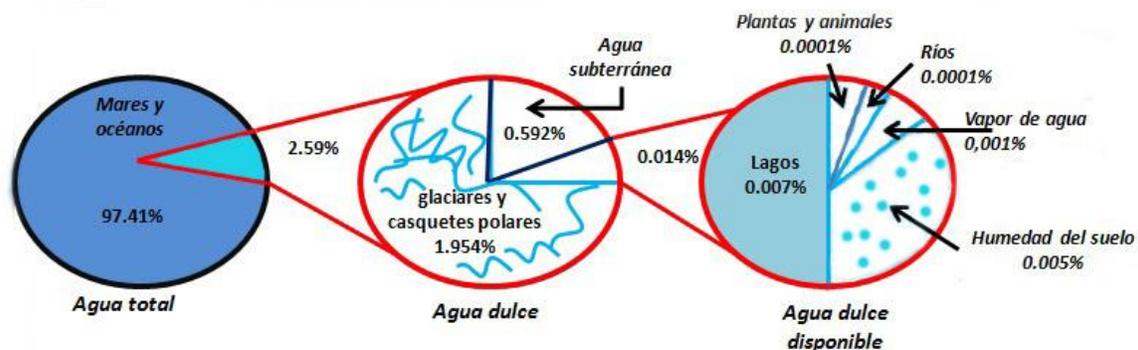


Figura 1.1. Disponibilidad del agua en el mundo. Adaptado de Kanade y Bhattacharya., (2016)

Cerca del 70% del agua dulce extraída de lagos, ríos y napas subterráneas se emplea en la agricultura fundamentalmente para riego, seguida por la industria un poco menos del 20% y los usos domésticos o municipales alrededor del 12%, sin embargo estas cifras varían considerablemente en función del nivel de desarrollo económico de un país;

los países de mayores ingresos utilizan más agua para la industria, mientras que los países de menores ingresos utilizan más del 90% de su agua para el riego agrícola (Tabla 1.1). (Naciones Unidas, 2022, Unesco, 2024).

**Tabla 1.1. Extracción de agua por sector (% de la extracción total de agua dulce por grupo de ingresos). Adaptado de Unesco, (2024)**

Región	Agricultura (%)	Industria (%)	Doméstico (%)
Altos ingresos	44	39	17
Ingreso medio alto	66	16	17
Ingreso medio bajo	88	4	8
Bajos ingresos	90	3	7

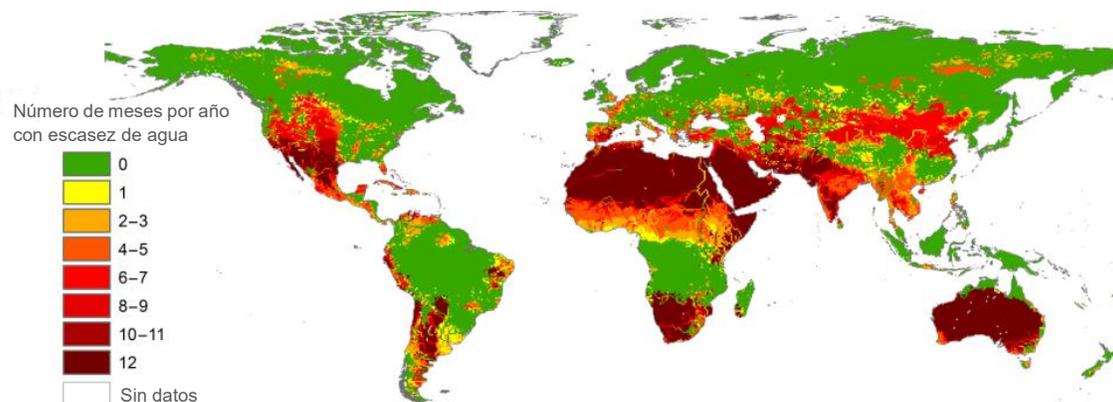
## 1.2 Contaminación del agua, saneamiento y agua potable: Situación mundial

El agua es un recurso natural esencial para la supervivencia de todas las formas de vida conocidas. La calidad de este recurso está cada día más degradada debido principalmente a acciones de origen antropogénico, derivadas de actividades de tipo doméstico, el crecimiento de la población y el aumento de la actividad agrícola e industrial que se genera por la necesidad de producir mayor cantidad de alimentos en menor tiempo y en terrenos no aptos por su baja concentración de nutrientes (Papadakis y col., 2007). La problemática ambiental que representa el vertido sin control de residuos líquidos y sólidos sobre medios acuáticos naturales como acuíferos, ríos y lagos ha ocasionado que el tratamiento de las aguas residuales se convierta en foco de interés de los países en vía de desarrollo.

El uso de agua sin restricciones ha crecido a nivel global a un ritmo de más del doble del aumento de la población en el siglo XX, hasta tal punto que en muchas regiones ya no es posible el suministro de un servicio de agua fiable. La agricultura es el sector económico en el que la escasez de agua tiene más relevancia; en la actualidad, es responsable del 70% de las extracciones de agua dulce y de más del 90% de su uso consuntivo. Bajo la presión conjunta del crecimiento de la población y de los cambios en la dieta, el consumo de alimentos está aumentando en casi todas las regiones del mundo. Se espera que para el año 2050 sea necesario producir 1 billón de toneladas de cereal y 200 millones de toneladas de carne más al año para poder satisfacer la creciente demanda de alimentos (FAO, 2013).

El agua dulce está disponible en forma de aguas superficiales y subterráneas. La disponibilidad de agua de la superficie depende de la cantidad de lluvia, la mayoría del agua durante las lluvias se escurre, filtrándose en el suelo y pasando a ser parte de los acuíferos; cerca de un tercio de la población mundial recibe su suministro de agua de los pozos y pozos entubados, alimentados por acuíferos bajos. En muchos casos el agua subterránea puede ser contaminada por la infiltración de los tanques sépticos, rellenos sanitarios, vertederos y productos químicos, factores de contaminación que destruyen la calidad del agua deteriorándola al punto de no poder utilizarla para el consumo humano, ni en agricultura (Kanade y Bhattacharya, 2016).

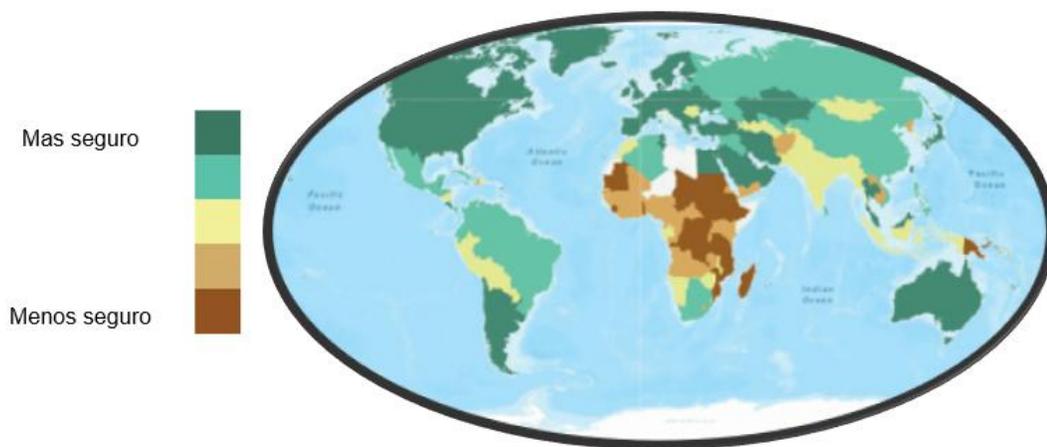
La Figura 1.2 muestra la escasez de agua (baja, moderada, significativa y severa) durante un determinado número de meses al año a nivel global. Alrededor del 66% (4000 millones de personas) viven bajo una grave escasez de agua al menos un mes al año. De estos 4000 millones de personas, 1000 viven en la India y otros 900 millones viven en China. El número de personas que enfrentan una grave escasez de agua durante al menos 4 a 6 meses al año es de 1800 a 2900 millones y 500 millones de personas enfrentan una grave escasez de agua durante todo el año (Mekonnen y Hoekstra, 2016). Debido al aumento de la población y el impacto de nuevas costumbres, el agua potable ha comenzado a escasear, y eso puede convertirse en uno de los mayores problemas de la humanidad. Si bien toda el agua del planeta se recicla naturalmente y se vuelve a utilizar, el problema radica en que hoy el agua disponible se malgasta y se degrada.



**Figura 1.2. Zonas de escasez de agua a nivel mundial. Adaptado de Mekonnen y Hoekstra, (2016)**

El agua dulce es un recurso limitado y su calidad está bajo presión constante. La

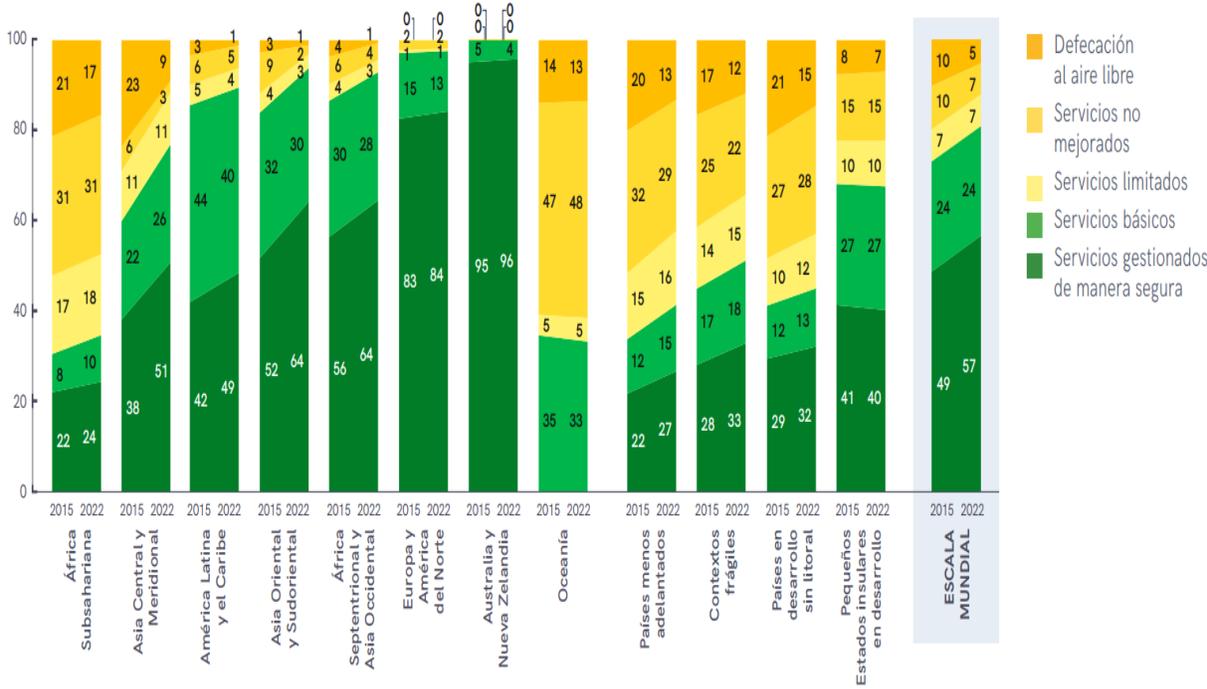
necesidad de agua dulce crece cada año, la situación resulta agravada si se considera la creciente contaminación de los recursos hídricos a nivel mundial. Por diversos motivos, la disponibilidad del agua resulta problemática en muchos países, y por ello se ha convertido en una de las principales preocupaciones de gobiernos en todo el mundo.



**Figura 1.3. Distribución geográfica del acceso al agua potable a nivel mundial. Adaptado de Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Water. In: Climate Change (2022)**

En la Figura 1.3 se encuentran las zonas de población con acceso a agua potable a nivel mundial. En muchos lugares del planeta, ante la dificultad de disponer de agua potable para consumo humano, se ha consolidado un concepto intermedio, el agua segura como el agua que no contiene bacterias peligrosas, metales tóxicos disueltos, o productos químicos dañinos a la salud, y es por lo tanto considerada segura para beber y se emplea cuando el suministro de agua potable está comprometido. Por otro lado, la falta de un adecuado tratamiento de los efluentes conduce a un deterioro de los ecosistemas acuáticos por la creciente contaminación, unido a la carencia de agua potable crean ambientes insalubres que propician enfermedades y disminuyen la productividad de la población. En el norte de África, oriente medio, gran parte del subcontinente indio y el norte de China, la baja seguridad hídrica se debe principalmente a la baja disponibilidad de agua. Sin embargo, muchas áreas con disponibilidad de agua relativamente alta tienen niveles relativamente bajos de seguridad hídrica debido a otros factores. En el 2015 el 29% de la población mundial no tenía acceso a servicios de agua potable (Richie y Roser, 2019). La disponibilidad de agua es relativamente alta en la mayor parte de África, pero la seguridad

hídrica es relativamente baja debido a los bajos estándares de accesibilidad, gestión y seguridad/calidad. Por el contrario, algunas áreas con una gran escasez física de agua, como algunas partes de EE. UU., Australia y el sur de Europa, muestran niveles de seguridad hídrica relativamente altos debido a la buena gobernanza, la seguridad/calidad y la accesibilidad (Marzon y Savin, 2015; Naik, 2017; Armah y col., 2018).



**Figura 1.4. Cobertura mundial y regional de los servicios de saneamiento, 2015-2022 (%).**  
Adaptado de Unicef y OMS, (2023)

Se puede observar en la Figura 1.4 que desde 2015 al 2022, la cobertura de los servicios de saneamiento gestionados de manera segura ha pasado del 49% al 57 %, con un aumento del 36% al 46% en zonas rurales y del 60% al 65% en zonas urbanas (Unicef y OMS, 2023). En 2022, 419 millones de personas no contaban con una infraestructura sanitaria y en consecuencia deben realizar sus deposiciones al aire libre. La falta de acceso al agua potable y saneamiento seguros causa cientos de millones de casos de enfermedades transmitidas por el agua y más de 1,4 millones de muertes por año. La diarrea sigue siendo una de las principales causas de muerte, pero es en gran medida prevenible. La mejora de la calidad del agua, el saneamiento y la higiene podrían prevenir muertes de niños menores de 5 años: 395000 en 2019 (OMS, 2024).

### **1.3 Contaminación del agua: Aguas residuales.**

Según la Organización Mundial de la Salud, el agua se encuentra contaminada cuando se ve alterada en su composición o estado, directa o indirectamente, como consecuencia de la actividad humana, de tal modo que se reducen los usos para los cuales sería apta en su calidad natural. El 70% del agua consumible se utiliza en la agricultura, el 22% en la industria y sólo el 8% en uso doméstico.

Uno de los factores que más influye en el tratamiento de efluentes líquidos es su composición. El origen de las aguas residuales es un aspecto importante que define sus características físicas, químicas y biológicas.

De acuerdo con Ramalho (1993) se distinguen cuatro fuentes fundamentales de aguas residuales:

- 1) Aguas Domésticas o Urbanas
- 2) Aguas Residuales Industriales
- 3) Escorrentías de Usos Agrícolas
- 4) Pluviales

Los contaminantes presentes en los efluentes se clasifican en tres categorías: químicos, físicos y biológicos (Tabla 1.2).

Los compuestos químicos pueden ser tanto inorgánicos como orgánicos. Dentro de los primeros pueden encontrarse sales, ácidos y bases, metales pesados, gases ( $H_2S$ ,  $NH_3$ ,  $CO_2$ , etc.), sustancias minerales no disueltas (sílice, arcillas, etc.), etc. Los compuestos químicos orgánicos incluyen hidratos de carbono, proteínas, aceites y grasas, hidrocarburos, jabones y detergentes, pesticidas, entre otros. Muchos de los compuestos químicos mencionados como contaminantes del agua son tóxicos para los seres humanos, tales como los iones de metales pesados (mercurio, arsénico, cobre, zinc, níquel, cromo, cadmio, etc.) o contaminantes orgánicos como fenoles, clorofenoles, pesticidas, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc. (Orozco y col., 2002).

El aspecto fundamental resultante de la contaminación por compuestos orgánicos es la disminución de oxígeno disuelto por la degradación biológica; en el caso de los compuestos inorgánicos el efecto más importante es su toxicidad. Sin embargo, hay ocasiones en las cuales los compuestos inorgánicos presentan demanda de oxígeno, como es el caso de los sulfitos, amonio y los nitritos. En el caso de los compuestos nitrogenados el amonio es el responsable de la mayor demanda de oxígeno.

Dentro de los contaminantes físicos los más relevantes son los siguientes:

- a) Cambios térmicos (contaminación térmica) por la descarga de aguas relativamente calientes procedentes de plantas industriales, después de haber sido utilizadas en los intercambiadores de calor.
- b) El color generado por licores negros que se descargan procedentes de las plantas de fabricación de pasta química, fabricación de colorantes, etc.
- c) Turbidez por la presencia de sólidos en suspensión originada por la descarga de aguas que contienen sólidos en suspensión.
- d) Formación de espumas por la presencia de detergentes tales como sulfonato de alquilbenceno (SAB).
- e) Radioactividad.

Dentro de los contaminantes biológicos son de particular importancia aquellos responsables de la transmisión de enfermedades por aguas de abastecimiento, como son el cólera, fiebre tifoidea, paratifoidea (Ramalho, 1993). Esto constituye el problema de contaminación de agua más importante a nivel mundial (Botkin y Keller, 2000). Desde el punto de vista histórico, la prevención de las enfermedades originadas por el agua constituyó la razón fundamental del control de la contaminación.

Las aguas residuales, generadas como consecuencia de diversas actividades antropogénicas son, en general, grandes fuentes de contaminación si no son tratadas correctamente antes de su descarga a un cuerpo de agua receptor (mar, río, lago, etc.).

**Tabla 1.2. Características físicas, químicas y biológicas del agua residual (A.R) y sus procedencias (Metcalf y Eddy, 1995)**

Características	Procedencia
<b>Propiedades físicas</b>	
Color, olor, temperatura	A.R. Domésticas e industriales
<b>Constituyentes químicos orgánicos</b>	
Carbohidratos, grasas, aceites	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Pesticidas	Residuos agrícolas
Fenoles	Vertidos industriales
Proteínas	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Compuestos orgánicos volátiles	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Contaminantes prioritarios	A.R. domésticas, industriales y comerciales
<b>Constituyentes químicos inorgánicos</b>	
Alcalinidad	A.R. domésticas, agua de suministro
Cloruros	A.R. domésticas, agua de suministro
pH	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Fósforo	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Contaminantes prioritarios	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Azufre	A.R. domésticas, agua de suministro
<b>Gases</b>	
Sulfuro de hidrógeno	Descomposición de residuos domésticos
Metano	Descomposición de residuos domésticos
Oxígeno	Agua de suministro, infiltración de agua superficial
<b>Constituyentes biológicos</b>	
Animales, plantas	Cursos de agua y plantas de tratamiento
Protistas	A.R. domésticas, plantas de tratamiento, infiltración de agua
Virus	A.R. domesticas

Asimismo, deben considerarse otras fuentes de contaminación que afectan tanto a aguas superficiales como subterráneas. Entre estas últimas se encuentran derrames o fugas a partir de tanques de almacenamiento o tuberías (combustibles, químicos, etc.), filtraciones a partir de sitios de disposición de residuos domésticos, industriales y

radioactivos, filtraciones de sistemas cloacales y sépticos, etc.

La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) corresponde a la cantidad de oxígeno requerido para la oxidación bioquímica aerobia de la materia orgánica biodegradable presente en el agua. Cuando la degradación aerobia es tan completa como sea posible, el oxígeno disuelto (OD) consumido corresponde a la DBO total o final ( $DBO_T$ ) que se alcanza luego de varias semanas. Sin embargo, las condiciones normalmente aceptadas para la determinación de dicho parámetro corresponden a una incubación de 5 días a 20°C (período en el que se descompone alrededor del 60-70% de la materia orgánica biodegradable), obteniéndose así la  $DBO_5$ . Por otra parte, la Demanda Química de Oxígeno (DQO) corresponde a la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la fracción orgánica de una muestra de agua susceptible a la oxidación por dicromato en medio ácido. En este caso, la mayoría de los compuestos orgánicos biodegradables o inertes (no biodegradables) son oxidados completamente.

## **1.4 Efectos de la descarga de efluentes sobre el medio ambiente**

### **1.4.1 Aumento de la materia orgánica, nutrientes y metales**

Todos los cuerpos de agua presentan la capacidad para degradar desechos orgánicos (procedentes de fuentes naturales, escorrentías de suelos agrícolas o efluentes domésticos e industriales) por actividad aerobia bacteriana. No obstante, cuando la carga de tales desechos sobrepasa la capacidad natural de autodepuración de los sistemas acuáticos receptores, se produce una disminución apreciable del oxígeno disuelto debido a su utilización para oxidación biológica de la materia orgánica, pudiendo afectar a diferentes especies sensibles a bajas concentraciones de oxígeno disuelto. La demanda bioquímica de oxígeno disminuye gradualmente aguas abajo en la medida que la materia orgánica descargada va oxidándose progresivamente hasta alcanzar un valor aproximado a los 2 mg/L, indicativo de agua no contaminada (Ramalho, 1993). La DBO y el OD están relacionados de tal forma que la concentración de oxígeno disuelto es baja donde la DBO es alta y viceversa.

Los pesticidas, herbicidas y metales pesados procedentes de actividades agrícolas e industriales pueden causar daño ecológico en sistemas acuáticos superficiales, contaminar cuerpos de agua subterránea y afectar la salud de las poblaciones que se abastecen de tales fuentes de agua.

Por otra parte, el nitrógeno y el fósforo presentes en aguas residuales aceleran el proceso de eutrofización de cuerpos de agua receptores, fenómeno caracterizado por una alta productividad de algas y sedimentación. La proliferación de algas verdes-azuladas hace que el agua presente un color verdoso y malos olores, asociado muchas veces, a la producción de toxinas que afectan la fauna ictícola y el ganado (Ramalho, 1993).

#### **1.4.2 Eutrofización**

Según la Unión Europea en su Directiva 91/271/CEE sobre tratamiento de las aguas residuales urbanas, la eutrofización se define como el aumento de nutrientes en el agua, especialmente de los compuestos de nitrógeno o de fósforo, que estimulan crecimiento acelerado de algas y especies vegetales superiores, con el resultado de trastornos no deseados en el equilibrio entre organismos presentes en el agua y en la calidad del agua a la que afecta. Este fenómeno causa un desequilibrio en el nivel de fertilidad acuática debido a que el ambiente acuático pasa de un estado trófico determinado a uno superior, definiéndose el estado trófico de los cuerpos de agua como su grado de fertilidad o bien su nivel de concentración de nutrientes y productividad (Magrama, 2003; Conzonno, 2009; Huang y col., 2015). El impacto ambiental más drástico generado por la eutrofización de cuerpos de agua está dado por el agotamiento del oxígeno disuelto, siendo éste utilizado en los procesos de oxidación de la materia orgánica de plantas y algas, con graves consecuencias como la muerte de organismos acuáticos; además pueden crecer cianobacterias, algunas de las cuales son productoras de toxinas carcinogénicas (Wentzel, 1990).

Existen diversos tipos de industrias como petroquímicas, farmacéuticas, producción de fertilizantes o alimentarias que generan aguas residuales con elevadas cargas de compuestos nitrogenados principalmente nitrógeno orgánico biodegradable, nitrógeno amoniacal y nitritos, que son vertidos sin control a los sistemas acuáticos generando un fuerte impacto sobre los cuerpos de agua que los recibe, contribuyendo a problemas de eutrofización por la alta demanda de oxígeno al ser oxidados biológicamente. Aproximadamente se necesitan 4,57 g de O<sub>2</sub> por cada g de nitrógeno amoniacal oxidado hasta nitrato (Third, 2003; Metcalf y Eddy 1995):

#### **1.5 Efectos de la contaminación del agua sobre la salud**

Las elevadas concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en los cuerpos de agua

son tóxicas para los organismos acuáticos perjudicando la capacidad de crecer y reproducirse. La ingesta en los seres humanos de agua o alimentos contaminados por estos compuestos químicos pueden producir un deterioro de la salud e incluso la muerte.

El gran problema de salud en los seres humanos por ingestión de agua contaminada con nitritos y nitratos es el riesgo de padecer metahemoglobinemia, enfermedad que se caracteriza por la pérdida en la capacidad de transporte de oxígeno en sangre. La hemoglobina, una hemoproteína encargada de transportar el oxígeno en la sangre, es oxidada por estos compuestos a metahemoglobina con poca afinidad por el oxígeno (Jensen y col 2012). Los grupos más vulnerables son: mujeres embarazadas, mujeres lactantes, personas de edad avanzada y bebés ("síndrome del bebé azul"). Más de 3000 casos de metahemoglobinemia han sido informados alrededor del mundo desde 1945, los cuales siempre han estado asociados con el consumo de agua proveniente de pozos con niveles de concentración de nitrato superior a 10 mg N/L (Wolfe y Patz, 2002). Por otro lado, el consumo de nitritos y nitratos está asociado a la formación de compuestos nitrogenados como las nitrosaminas, generalmente formadas en medio ácido en el estómago por la reacción entre una amina secundaria y el nitrito, teniendo un alto potencial cancerígeno y mutagénico (Fewtrell, 2004). También se ha relacionado el consumo de nitritos y nitratos a casos de deformaciones en recién nacidos, infecciones en el tracto respiratorio y enfermedades coronarias (Grupta y col., 2000).

La incorporación de compuestos nitrogenados a los cuerpos de agua receptores puede favorecer el desarrollo de organismos transmisores o causantes de enfermedades como la malaria y el cólera; además estos nutrientes generan el aumento de algas productoras de toxinas que al ser ingeridas en el agua o alimentos pueden dar lugar a trastornos fisiológicos como náuseas, vómitos, diarrea, gastroenteritis, neumonía, dolores musculares y diversos síntomas de intoxicación (Busse y col., 2006). Asimismo, el nitrógeno amoniacal presente en el agua tratada reacciona con el cloro utilizado como desinfectante, dando lugar a la formación de cloraminas y tricloruro de nitrógeno de menor poder desinfectante que el cloro (Gerardi, 2003).

En síntesis, la descarga de aguas residuales industriales, cloacales y pluviales produce una degradación de la calidad de los ecosistemas acuáticos receptores que comprende alteraciones en sus propiedades físico-químicas y cambios en la comunidad

biológica, afectando a su vez a la población por efectos directos en la salud, por el encarecimiento del tratamiento de potabilización del agua o por el deterioro de las áreas de esparcimiento. En este sentido, el tratamiento de aguas residuales tiene como objetivo remover o convertir los contaminantes a una forma inocua, preservando de esta manera la calidad del agua de los cuerpos receptores. Por tal motivo, resulta muy importante que los sistemas de tratamiento de efluentes operen en forma adecuada, protegiendo en última instancia los ecosistemas acuáticos y la salud del hombre.

## **1.6 Situación en Argentina**

### **1.6.1 Recursos hídricos disponibles**

Argentina es un país rico en agua con una distribución desigual de los recursos hídricos. Los recursos renovables de agua dulce en Argentina, que representan promedios a largo plazo, son aproximadamente de 20.400 m<sup>3</sup> per cápita, y está por encima del umbral de estrés hídrico definido por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo equivalente a 1 700 m<sup>3</sup> per cápita (MCTeIP, 2012). Alrededor del 76% del territorio nacional está sujeto a condiciones de aridez o semi-aridez, con precipitaciones promedio de menos de 800 mm por año. La cuenca del Río de la Plata, que concentra más del 85% de los recursos hídricos nacionales totales, es el mayor centro de asentamientos humanos de desarrollo urbano y actividad económica del país. Fuera del Sistema de la cuenca del Río de La Plata, los ríos más importantes de Argentina son los que desembocan en el Océano Atlántico (aproximadamente el 10% de los recursos nacionales totales), ya que actúan como corredores fluviales de gran importancia económica y ecológica. Aquí es donde se encuentran los asentamientos de población más importantes de la región sur del país. La contribución total de la vertiente atlántica, que incluye la Cuenca del Plata, suma casi el 95% del suministro total de agua superficial del país (OECD, 2020)

El agua extraída se emplea para uso domiciliario, agrícola e industrial. Las áreas urbanas y rurales de regiones áridas y semiáridas se abastecen total o parcialmente con agua subterránea, la cual es también empleada en la industria y riego de tales regiones. No obstante, su uso presenta limitaciones pues en una vasta zona del centro y norte del país, los acuíferos suelen contener arsénico, vanadio y flúor como condición natural, altos contenidos de nitratos por contaminación y presentan problemas de salinización por sobreexplotación (Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria, 1997).

## 1.6.2 Cobertura de agua potable y alcantarillado

El acceso al agua de red es uno de los principales motores de la salud pública. Disponer de este servicio es vital, ya que contribuye a mejorar cualitativamente la satisfacción de necesidades cotidianas como el consumo personal de agua potable, la higiene personal, la limpieza de los alimentos y de la vivienda.

**Tabla 1.3. Población en viviendas particulares con disponibilidad de agua de red según provincia y total del país. CENSO (Año 2022)**

Jurisdicción	Población en viviendas particulares <sup>(1)</sup>	Población en viviendas particulares con provisión de agua por red pública (agua corriente)	Población en viviendas particulares en los que el desagüe del inodoro del baño es a red pública (cloaca)
<b>Total</b>	<b>45.618.787</b>	<b>38.279.681</b>	<b>26.195.514</b>
Ciudad Autónoma de Buenos Aires	3.095.454	3.024.117	3.049.672
Buenos Aires	17.408.906	12.940.658	9.638.612
24 partidos del Gran Buenos Aires	10.801.336	7.920.574	5.720.867
Resto de partidos de la provincia de Buenos Aires	6.607.570	5.020.084	3.917.745
Catamarca	427.625	401.218	218.454
Chaco	1.124.603	859.682	335.634
Chubut	589.454	569.779	478.261
Córdoba	3.812.064	3.568.398	1.545.232
Corrientes	1.209.671	1.069.563	714.191
Entre Ríos	1.415.097	1.287.092	1.087.069
Formosa	605.507	473.426	244.337
Jujuy	809.364	778.130	533.966
La Pampa	359.193	305.131	242.370
La Rioja	382.453	357.705	224.798
Mendoza	2.030.773	1.866.730	1.308.422
Misiones	1.273.347	999.863	295.613
Neuquén	708.578	658.469	528.157
Río Negro	747.697	690.529	490.823
Salta	1.434.225	1.314.830	984.602
San Juan	819.445	772.056	366.689
San Luis	540.548	506.140	403.640
Santa Cruz	335.677	300.301	265.074
Santa Fe	3.519.059	2.969.967	1.946.321
Santiago del Estero	1.057.752	837.573	264.629
Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur <sup>(4)</sup>	184.958	172.553	166.510
Tucumán	1.727.337	1.555.771	862.438

En este sentido, los resultados del Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2022 permiten conocer que de las 45.618.787 de personas censadas en viviendas particulares, 38.279.681 de personas disponen de agua lo que evidencia la

incorporación de 5.501.862 de personas a la disponibilidad de este servicio respecto del Censo 2010 (32.777.819 de personas) esto implica un crecimiento de 14,3% durante los últimos 12 años obteniendo una cobertura del 83.9% a nivel nacional.

En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires se encuestaron 3.095.454 de personas de las cuales 3.024.117 se encuentra con cobertura de agua por red pública y 71.337 personas sin el servicio. La ciudad Autónoma de Buenos Aires cuenta con la mayor cobertura a nivel nacional de agua por red pública con un 97,7%; sin embargo, los 24 partidos del Gran Buenos Aires se encuentran con la menor cobertura en todo el país con 2.880.762 personas sin servicio de agua por red pública de las 10.801.336 de personas encuestadas, alrededor del 73.5% de las personas encuestadas no posee el servicio de agua por red pública (Tabla 1.3).

La recolección y alejamiento de las aguas servidas por medio de un servicio centralizado elimina la posibilidad de que éstas contaminen los suelos, los cursos de agua y/o las napas subterráneas en el área cubierta por el servicio. En este sentido, la disponibilidad de desagüe a red pública cloacal es también de suma importancia para la calidad de vida de las personas que habitan las viviendas y contribuye a evitar serios riesgos sanitarios. El Censo 2022 (Tabla 1.3) muestra que 26.195.514 de personas disponen del servicio de desagüe cloacal, mientras que el Censo 2010 contabiliza 19.381.029 de personas. Por lo tanto, en el período intercensal se presentó un crecimiento del 26% con 6.814.485 de personas en viviendas particulares que pasaron a disponer del servicio de desagüe cloacal.

### **1.6.3 Contaminación de las aguas subterráneas**

Las dificultades que presentan algunos lugares para acceder al agua potable, como lo son las regiones rurales y los asentamientos urbanos informales, los lleva a depender de pozos para acceder a fuentes de agua. El agua subterránea presenta riesgos asociados para la salud derivados de enfermedades transmitidas por la presencia de arsénico que se encuentra de forma natural, el cual afecta a 17 de 23 provincias y aproximadamente 4 millones de habitantes, alrededor del 10 % de la población del país (RSA y CONICET, 2018). Otra fuente de contaminación es por procesos artificiales o antrópicos como la descarga de efluentes de aguas residuales domésticas no tratadas en ríos y lagos y la infiltración de excrementos de tanques sépticos, redes de alcantarillado sanitario mal

mantenidas, vertidos industriales sin tratamiento previo y actividades agrícolas donde los plaguicidas y fertilizantes pueden escurrir por el terreno hasta los acuíferos (McTeIP, 2012).

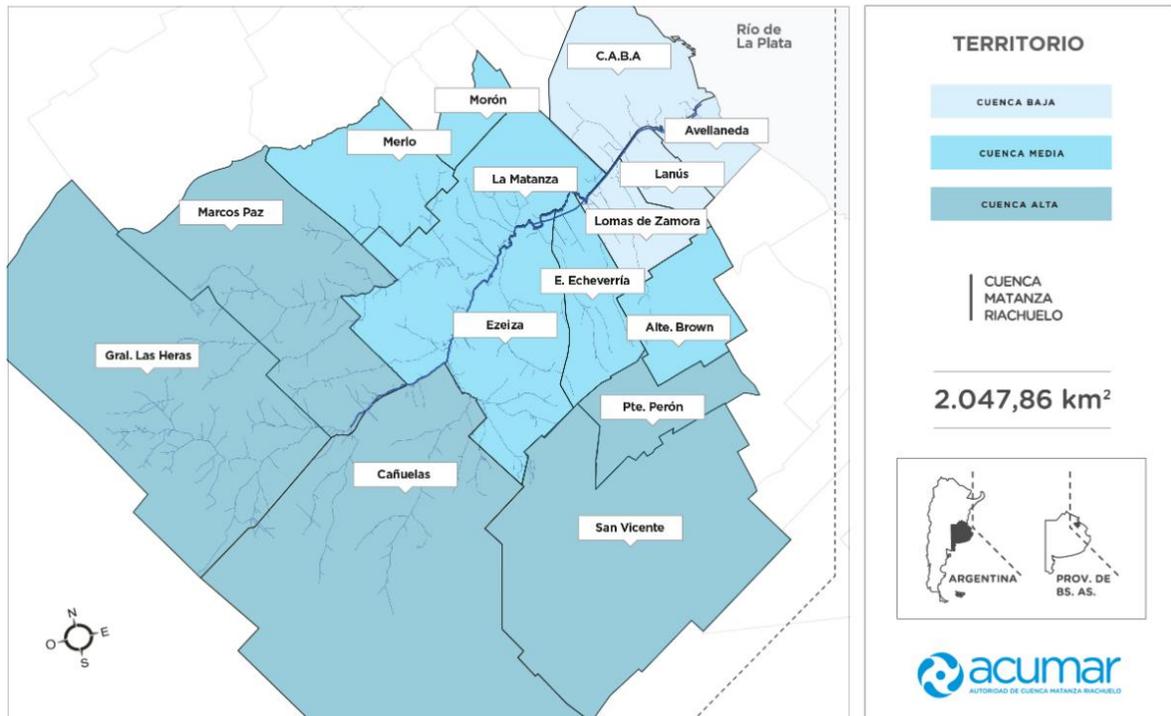
#### **1.6.4 Contaminación de las aguas de superficie**

El Río de La Plata es el segundo río más grande de Sudamérica. Cuenta con una superficie de 38000 km<sup>2</sup> y un caudal comprendido entre 16000 y 28000 m<sup>3</sup>/seg. El Río de La Plata recibe las aguas de los ríos Paraná y Uruguay que aportan caudales de alrededor de 16000 y 4000 m<sup>3</sup>/seg respectivamente. Su cuenca hidrográfica denominada cuenca del Plata se extiende sobre 3,1 millones de km<sup>2</sup>, comprendiendo parcialmente el territorio de Argentina, Brasil, Bolivia, Paraguay y Uruguay. Dentro de la Argentina, la cuenca del Plata representa un 34% de la superficie total del país y un 97% del agua dulce de escurrimiento; sobre la misma se asienta un 70% de la población del país (FAO, 2016; Baigún y col., 2016).

El Río de La Plata representa más del 80% de las disponibilidades de agua en Argentina. En la franja costera de la provincia de Buenos Aires, desde Buenos Aires a La Plata (80 km de costa), se asienta un tercio de la población de Argentina y se concentra la mayor actividad industrial del país, generando un fuerte impacto ambiental sobre el Río de La Plata. Se ha informado la presencia de diferentes tipos de descargas directas y difusas sin previo tratamiento (efluentes cloacales, industriales, etc.) sobre este río y sus numerosos afluentes. Esto afecta la calidad físico-química de sus aguas, comprometiendo la vida acuática y su calidad microbiológica (PNUD, 2009; FAO, 2016).

En el caso de la Cuenca Matanza-Riachuelo, el agua de las precipitaciones forma arroyos (entre los cuales se encuentran el Rodríguez, Morales, Chacón, Cañuelas, Aguirre, Ortega, Santa Catalina, La Paja y Del Rey) que confluyen en un curso principal llamado Matanza, en sus orígenes, y Riachuelo, en su tramo final. Este curso principal recorre 64 km en sentido sudoeste-noreste hasta llegar a su desembocadura y descargar sus aguas en el Río de la Plata, abarcando una superficie aproximada de 2047 Km<sup>2</sup> (Figura 1.5). La cuenca Matanza-Riachuelo constituye uno de los cuerpos de agua más contaminados por fuentes domésticas e industriales de la Argentina, abarca 14 municipios de la provincia de buenos aires: Almirante Brown, Avellaneda, Cañuelas, Esteban Echeverría, Ezeiza, General Las Heras, La Matanza, Lanús, Lomas de Zamora, Marcos Paz, Merlo, Morón, Presidente Perón y San Vicente. Asimismo, atraviesa toda la Comuna 8 y parcialmente las Comunas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10 de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Resolución

ACUMAR N°1113/13). En la actualidad la Autoridad de la Cuenca Matanza Riachuelo (Acumar) posee facultades de regulación, control y fomento respecto de las actividades industriales, la prestación de servicios públicos y cualquier otra actividad con incidencia ambiental en la Cuenca por la resolución 283/2019.



**Figura 1.5. Cuenca la Matanza-Riachuelo limite político**

En la Cuenca viven 4.703.058 personas, según los datos definitivos del Censo Nacional de Población, Hogares y Vivienda 2022 del INDEC. Esto representa aproximadamente un 10% de la población de la República Argentina y da cuenta de una alta densidad poblacional en una pequeña parte del territorio nacional, lo cual significa un severo impacto sobre el ambiente. Las actividades productivas que se desarrollan en la Cuenca son la agropecuaria, fundamentalmente en la Cuenca Alta, y la actividad industrial. Las industrias radicadas en la región son de distinto tipo, pero por su impacto ambiental tienen mayor relevancia las del sector químico y petroquímico, las industrias alimenticias, curtiembres, frigoríficos, galvanoplastias y metalúrgicas. Se trata de la zona más urbanizada e industrializada del país (Acumar, 2023). En la Cuenca Matanza Riachuelo se ubican varias Reservas Naturales que protegen diferentes ecosistemas como los humedales, bosques y pastizales. Estas áreas actúan como refugios para la

biodiversidad y le brindan alimento y hábitat, además de prestar importantes servicios ambientales para la sociedad. En el caso de los humedales, atenúan los efectos frente a las inundaciones. Para contribuir en la protección de las reservas, Acumar lleva adelante acciones concretas en diferentes disciplinas: monitoreos de agua (trimestrales) y biodiversidad, actividades de educación ambiental, intervención en los ámbitos de participación. Se llevan adelante también mesas interjurisdiccionales con los distintos actores oficiales involucrados para ejecutar políticas y acciones coordinadas para agilizar las gestiones vinculadas a estos espacios (Acumar, 2020). Con el fin de ampliar el estudio y conocimiento sobre estas áreas, en el 2023 fue publicado el inventario de humedales de la cuenca Matanza Riachuelo realizado por ACUMAR en conjunto con el Conicet.

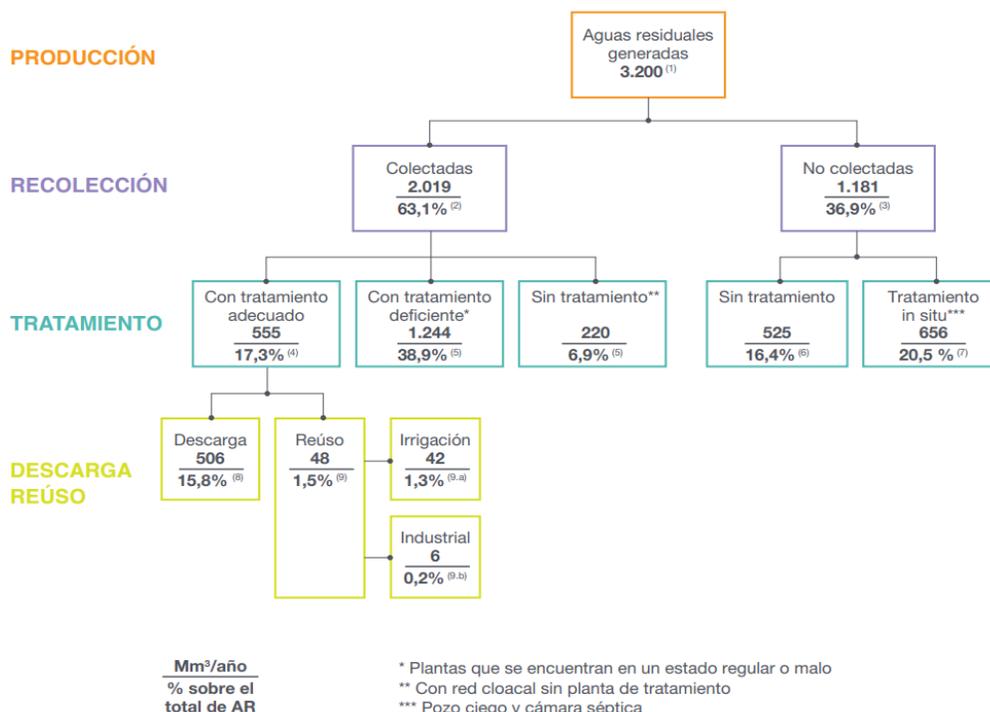
## **1.6.5 Aguas residuales**

### **1.6.5.1 Aguas residuales domesticas**

Las aguas residuales domésticas provienen de casas particulares (domiciliarias), oficinas, aguas sanitarias de pequeñas y medianas industrias (no relacionadas con el proceso de fabricación en sí), hospitales, escuelas; también incluyen aguas domiciliarias no sanitarias (agua de lluvia y napas). Este tipo de agua residual constituye una importante fuente de contaminación de los recursos hídricos de la Argentina. Esto se debe principalmente a que solo un pequeño porcentaje de las aguas residuales domésticas recibe tratamiento.

Según el informe de diagnóstico y prospectiva: Tratamiento de Aguas Residuales en Argentina del Ministerio de Obras Publicas Argentina del 2023, realizado por la Dirección Nacional de Agua Potable y Saneamiento (DNAPyS, 2023), se logra apreciar que del total de aguas residuales generadas, un 63,1% son colectadas por la red cloacal, un 17,3% del total generado llega a plantas de tratamiento que se encuentran en buenas condiciones de infraestructura para realizar un tratamiento adecuado, mientras que el 38,9% llega a plantas de tratamiento con diferentes grados de déficit de tratamiento (Figura 1.6). En este punto, resulta necesario considerar que los niveles de tratamiento que alcanzan las plantas de tratamiento en el país son diversos. En algunos casos, el agua residual llega a la planta de tratamiento y un porcentaje o la totalidad del caudal es by-paseado por recibir un caudal que sobrepasa la capacidad de diseño o se encuentra fuera de servicio. En otros, el agua residual ingresa a la planta de tratamiento, pero la planta se encuentra en estado Malo o

Regular, donde, en diferente medida, todas o algunas de las unidades del tren de tratamiento se encuentran deterioradas o en mal funcionamiento (aireación deficitaria, sedimentadores by-paseados, lagunas colmatadas, entre otros escenarios). Luego, un 6,9% del total generado en zonas urbanas corresponden a aguas residuales colectadas por red cloacal, pero no poseen plantas de tratamiento y vuelcan directamente a cuerpos de agua receptores. En varios casos, representan localidades de poblaciones considerables, como Rosario, Santa Fe, Corrientes, entre otras.



**Figura 1.6. Porcentajes de producción, recolección, tratamiento y descarga/reuso de aguas residuales en Argentina**

Finalmente, las aguas residuales no colectadas están representadas principalmente por población rural o periurbana, que no posee un sistema de red de colección cloacal, y donde las soluciones de tratamiento son individuales o familiares, realizadas in situ. De esta proporción, el 20,5% sobre el total de las generadas poseen un tratamiento adecuado. Parte relevante de la carga orgánica (85%) proviene del aporte de descargas cloacales, diariamente 193 mil m<sup>3</sup> de vertidos cloacales (Acumar, 2019).

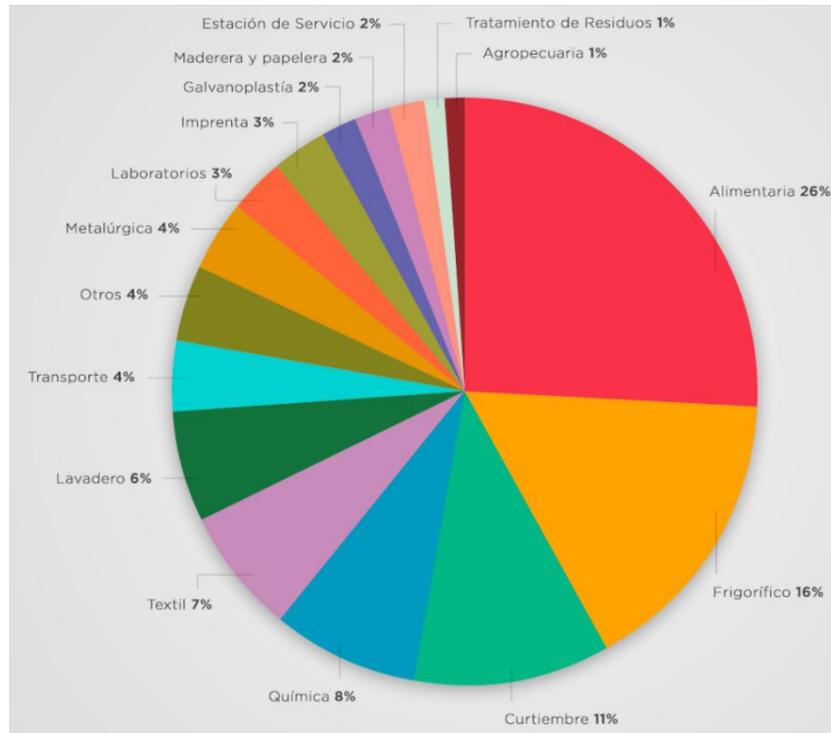
### 1.6.5.2 Aguas residuales industriales

Las aguas residuales industriales son aquellas generadas durante procesos de

producción y su composición varía según el tipo de industria. Las descargas de aguas residuales industriales son otra fuente de contaminación importante en Argentina. La función de las plantas de tratamiento de efluentes industriales es adecuar las características fisicoquímicas y biológicas del líquido residual de la industria a las establecidas por la norma correspondiente, es decir que estos efluentes puedan ser reutilizados produciendo un menor impacto posible en la contaminación o degradación de las aguas tanto superficiales como subterráneas para sus futuros usos (INTI, 2020).

La calidad final de las aguas residuales descargadas puede verse notoriamente afectada por mal funcionamiento y mantenimiento de las plantas de tratamiento. Así, las aguas residuales que no se tratan adecuadamente se descargan en cuerpos de agua afectando su calidad y disponibilidad, generando efectos sumamente nocivos para la salud humana y el medio ambiente, incluyendo brotes de enfermedades transmitidas por vectores, el agua y los alimentos, así como la contaminación y pérdida de la diversidad biológica y servicios ecosistémicos. Por otro lado, es necesario que la mejora de los tratamientos de aguas residuales contemple en su abordaje la reutilización y la recuperación de los subproductos del tratamiento, que son factores que fomentan la transición hacia una economía circular, al permitir reducir las extracciones de agua y la pérdida de recursos en los sistemas de producción, así como en las actividades económicas (DNAPyS, 2023).

Alrededor de 380.000 millones de m<sup>3</sup> de agua podrían recuperarse a partir de los volúmenes de aguas residuales que se producen anualmente. Se calcula que este tipo de reutilización del agua alcanzará los 470.000 millones de m<sup>3</sup> en 2030 y los 574.000 millones de m<sup>3</sup> en 2050 (Qadir y col., 2020). Recuperar agua, nutrientes, metales preciosos y energía a partir de los flujos de desecho son formas de proporcionar valor añadido (WWAP, 2017). La plena recuperación de nitrógeno, fósforo y potasio de las aguas residuales podría satisfacer el 13,4% de la demanda mundial de estos nutrientes en la agricultura, pero las tecnologías actuales de recuperación de nutrientes a partir de las aguas residuales todavía tienen que alcanzar niveles de eficiencia del 100% (Fernández Arévalo y col., 2017; Ward y col., 2018). Aparte de la recuperación de nutrientes y de las ganancias económicas, también conlleva beneficios medioambientales de suma importancia, como la reducción de la eutrofización (Mayer y col., 2016).



**Figura 1.7. Agentes contaminantes por rubro de la cuenta Matanza Riachuelo. Adaptado Acumar, (2017)**

Los establecimientos vinculados a los rubros alimenticio, frigorífico y curtiembres componen más del 50% del total de las empresas o industrias que han sido declaradas Agentes Contaminantes de la Cuenca Matanza Riachuelo (Figura 1.7). Los establecimientos industriales y de servicios radicados en la Cuenca Matanza Riachuelo son inspeccionados sistemáticamente por la Autoridad de Cuenca; del último informe producido por la Dirección de Fiscalización y Adecuación Ambiental, a diciembre de 2017, sobre un universo cercano a los 1400 establecimientos declarados como agente contaminante, más de la mitad pertenecen a los rubros alimenticio, frigorífico y curtiembres (Acumar, 2017).

### **1.6.6 Contaminación por efluentes líquidos industriales**

La contaminación de recursos hídricos es un problema estrechamente relacionado a aguas residuales industriales. En Argentina el crecimiento de la actividad industrial y la falta de previsión sobre la construcción de plantas de tratamiento de efluentes incrementó los problemas relacionados con los efluentes generados. Comúnmente, es posible que una industria pueda descargar sus efluentes directamente en la planta de tratamiento municipal.

De este modo, el tratamiento conjunto de la industria y aguas residuales municipales pueden ser una opción económica y ambientalmente beneficiosa para la industria.

Según el informe del estado del ambiente 2016 del ministerio de ambiente y desarrollo sustentable en Argentina las principales fuentes de deterioro ambiental del Río de la Plata tienen origen en los efluentes urbanos e industriales que no reciben un tratamiento adecuado, evidenciándose alteraciones al ambiente natural producto del crecimiento poblacional, de la urbanización y de las actividades agrícolas, ganaderas e industriales, incluyendo algunos sectores de servicios. Esto se ve reflejado en la disminución de la calidad del agua, la alteración de hábitats y la disminución de la biodiversidad, tanto a nivel de la cuenca como de la franja costera influenciada por la misma. En el área metropolitana costera se encuentran censados un total de 32.987 locales pertenecientes a la industria manufacturera, siendo los establecimientos de mayor impacto los mataderos y elaboración de subproductos (mataderos, fábrica de chacinados, fundición de grasa, etc.), la actividad láctea, curtiembres e industrias de galvanización. De los 32.897 locales industriales de la región Metropolitana, cerca de 22.000 están sobre la cuenca Matanza Riachuelo, Sarandí y Santo Domingo, 6.000 corresponden a la cuenca del Arroyo Medrano y 3.000 a la cuenca del Reconquista. No obstante, sumando el río Luján (que transporta contaminantes provenientes de Mercedes, Luján, General Rodríguez y del Parque Industrial Pilar) y el río Reconquista, el aporte a la contaminación del Río de la Plata es muy grave, aproximando su impacto al producido por el Riachuelo.

Las industrias que generan efluentes líquidos con contenido de compuestos tóxicos son variadas, dentro de la cuenca se encuentran industrias petroleras, químicas y de galvanoplastia. Debido a su elevada toxicidad, son de principal interés aquellas industrias que contienen compuestos aromáticos en sus efluentes líquidos. Muchos de estos contaminantes son tóxicos aún en bajas concentraciones y algunos tienen la capacidad de bioacumularse. Algunos de los contaminantes que más afectan el medio ambiente son los compuestos aromáticos. Estos están considerados como uno de los grupos peligrosos debido a su baja biodegradabilidad y su elevada toxicidad a bajas concentraciones.

Los metales pesados como plomo, cadmio, cromo, zinc, mercurio entre otros son liberados hacia ecosistemas acuáticos, así como a los suelos principalmente debido a diversas actividades antropogénicas y presenta una seria amenaza para las plantas,

animales e incluso los humanos debido a su persistencia, bioacumulación, propiedad no biodegradable y su toxicidad incluso a bajas concentraciones. El hecho de que estos metales se encuentren en los diversos ecosistemas es de preocuparse, dado que muchos seres vivos dependen del adecuado equilibrio en su lugar de alimentación o de vivienda (Pabón y col., 2021).

## **1.7 Marco legal**

### **1.7.1 Legislación ambiental para descarga de efluentes**

La legislación de la Provincia de Buenos Aires establece normas de calidad de los vertidos de los efluentes líquidos domésticos y/o industriales a los distintos cuerpos receptores, siendo uno de los parámetros de control más relevantes la DBO<sub>5</sub> y la DQO.

La normativa ambiental vigente en la Pcia de Buenos Aires, del **Código de aguas (Ley 12257) y su decreto reglamentario N° 2009/60, en su resolución 336/03 del 2003** establece los límites de descarga admisible para diferentes agentes contaminantes. Sin embargo, la ley N° 26168 del 2006 creó la Autoridad de la Cuenca Matanza Riachuelo (Acumar) como ente de derecho público interjurisdiccional, con competencias en el área de la Cuenca Matanza Riachuelo. Las Legislaturas de los Gobiernos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de la Provincia de Buenos Aires han adherido a la norma citada previamente mediante las Leyes N°. 2.217 y N°. 13.642 respectivamente. La ley de creación otorga al organismo facultades de regulación, control y fomento respecto de las actividades industriales, la prestación de servicios públicos y cualquier otra actividad con incidencia ambiental en la Cuenca. Por lo tanto, la Cuenca Matanza Riachuelo se encuentra bajo la **Resolución N° 283/19 del 2019. Buenos Aires. Anexo A. Autoridad de la Cuenca Matanza Riachuelo.**

La Directiva 91/271/CEE de la Comunidad Económica Europea (European Commission, 1991) establece los requisitos de los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas: DBO<sub>5</sub> < 25 mg O<sub>2</sub>/L, DQO < 125 mg O<sub>2</sub>/L, N total < 10-15 mg N/L dependiendo en este caso del número de habitantes-equivalente, entre otros parámetros. Dichos parámetros son más similares a los establecidos por Acumar.

En la Tabla 1.4 se pueden observar representados algunos de los parámetros más relevantes (DBO, BQO, fósforo total, nitrógeno total, nitrógeno amoniacal y nitrógeno

orgánico) en los límites de descarga admisibles en los cuerpos de agua superficial y colectora cloacal determinado por la autoridad del agua de la provincia de Buenos Aires 2003 con vigencia en la actualidad y la Autoridad de la Cuenca Matanza Riachuelo

**Tabla 1.4. Parámetros de calidad de las descargas límites admisibles para la Provincia de Buenos Aires**

Parámetro	Unidad	336/03		283/19	
		Pluvial/cuerpo superficial	Colectora Cloacal	Pluvial/cuerpo superficial	Colectora Cloacal
D.B.O.	mg/L	≤50	≤200	≤30	≤200
D.Q.O.	mg/L	≤250	≤700	≤125	≤700
Fosforo total (a)	mg/L	≤1.0	≤10	≤5.0	≤10
Nitrógeno Total (a)	mg/L	≤35	≤105	NR	NR
Nitrógeno Amoniacal (a)	mg/L	≤25	≤75	≤25	≤75
Nitrógeno Orgánico (a)	mg/L	≤10	≤30	NR	NR
Nitrógeno total Kjeldahl	mgNTK/L	NR	NR	≤35	≤105

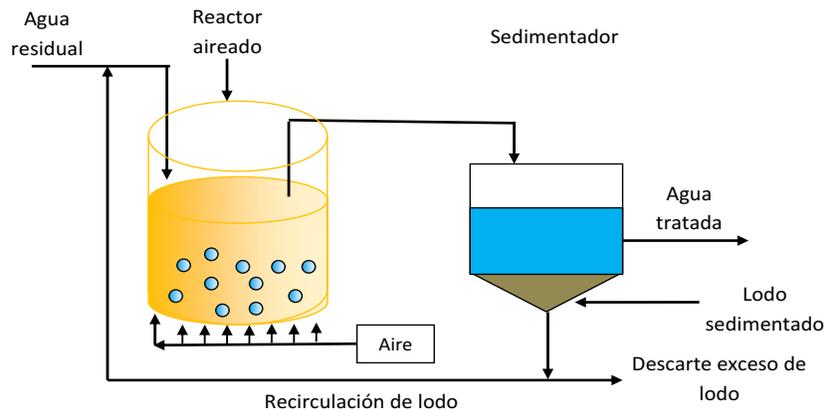
(a) Estos límites serán exigidos en las descargas a lagos, lagunas o ambientes favorables a procesos de eutrofización. de ser necesario, se fijará la carga total diaria permisible en kg/día.  
Nitrógeno total equivalente a la suma del nitrógeno Kjeldahl total (N orgánico y amoniacal), nitrógeno en forma de nitrato (NO<sub>3</sub>) y nitrógeno en forma de nitrito (NO<sub>2</sub>).  
NR: no regula.

## 1.8 Tratamiento biológico de aguas residuales

En la actualidad la sociedad está cada vez más urbanizada e industrializada. Con una población mundial en expansión, se hace necesario desarrollar e implementar tecnologías eficientes y económicamente viables para el tratamiento de aguas residuales. La preocupación por la gestión de los residuos hídricos y los niveles de nutrientes en los cuerpos de agua receptores conlleva a los organismos gubernamentales a establecer normas ambientales cada día más exigentes; esto hace que el tratamiento de aguas residuales sea esencial.

### 1.8.1 Sistema de lodos activados

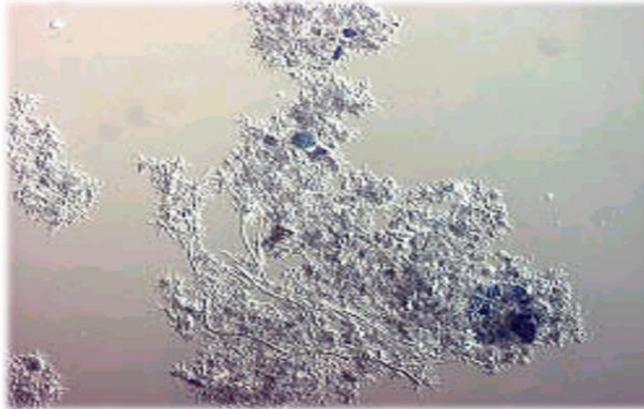
El tratamiento de aguas residuales está mejorando constantemente al igual que la comprensión de los microorganismos implicados en la eliminación de nutrientes. Actualmente los procesos biológicos constituyen el tratamiento más utilizado tanto para aguas domésticas como industriales. Dentro de los sistemas biológicos, el proceso de lodos activados es el más utilizado, este término hace referencia a un proceso biológico que utiliza una comunidad mixta de microorganismos que metabolizan y transforman las sustancias orgánicas e inorgánicas en formas ambientalmente aceptables (Irvine y col., 1997; Seviour y Blackall, 1999). El proceso básico por lodos activados consta de un reactor o tanque de aireación y un sedimentador o clarificador secundario. El agua residual cruda se introduce en el reactor donde se mantiene en suspensión el cultivo bacteriano aeróbico, el cual es el responsable de la degradación de los contaminantes (Figura 1.8). Los lodos activados están compuestos de dos componentes: uno biológico formado por una amplia variedad de bacterias, hongos, protozoos y algunos metazoos y un componente no biológico compuesto de partículas orgánicas e inorgánicas. Estos componentes se disponen formando flóculos (Figura 1.9). Los flóculos de lodos activados conjuntamente con los compuestos orgánicos e inorgánicos solubles y particulados, presentes en el tanque de aireación, constituyen lo que se denomina licor de mezcla.



**Figura 1.8. Esquema del proceso de lodos activados Schmidell y col., (2007)**

El licor de mezcla pasa al clarificador, que se encuentra en serie con el reactor aireado, permitiendo la separación de los flóculos microbianos del agua tratada por sedimentación. El sobrenadante clarificado, denominado efluente secundario, puede ser descargado a un cuerpo de agua receptor, previa desinfección con cloro, o pasar a otra

etapa para un tratamiento complementario. El lodo sedimentado es en parte retornado al tanque de aireación, permitiendo que éste opere con elevada concentración de biomasa, mientras que el exceso de lodo producido es enviado a tratamientos posteriores de secado y disposición final (Schmidell y col., 2007) (Figura 1.8).

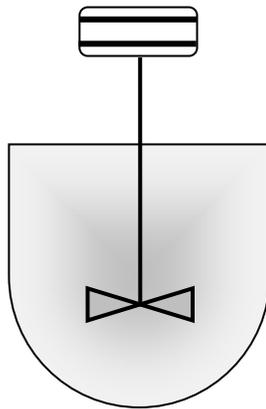


**Figura 1.9. Flóculo de lodos activados**

La microbiología típica de los lodos activados se compone de aproximadamente 95% de bacterias, las cuales incluyen los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Bdellovibrio*, *Mycobacterium* y las dos bacterias nitrificantes más comunes, *Nitrosomas* y *Nitrobacter*. Adicionalmente se pueden presentar diversas formas de bacterias filamentosas tales como: *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Lecicothrix* y *Geotrichum*. También se encuentran otros microorganismos como protozoos y pequeños metazoos (Wanner, 1994).

### **1.8.2 Reactores discontinuos (batch)**

En los sistemas discontinuos el reactor se llena con el agua residual a tratar y se da el tiempo necesario hasta completar el proceso biológico de tratamiento. La ventaja reside que se puede seguir la evolución del proceso en el tiempo y decidir cuándo se alcanza el nivel de contaminación deseado para proceder a la descarga. Además, los sistemas discontinuos son simples y requieren mínimo equipamiento (Figura 1.10). Se utilizan en investigaciones cinéticas dentro del laboratorio; sin embargo, también se lo puede encontrar en operaciones industriales, tratar caudales pequeños de aguas residuales o cuando los tiempos de residencia requeridos para el tratamiento son excesivamente altos (Schmidell, 2007).



**Figura 1.10. Reactor Discontinuo (Batch) Adaptado de Caccavale y col., (2011)**

El reactor presenta las siguientes características debido a la forma en que opera:

- El reactor es un sistema cerrado; por lo tanto, la masa total del mismo es constante. El tiempo de residencia de todos los elementos del fluido es el mismo.
- Este tipo de reactor opera en estado no estacionario; las concentraciones cambian con el tiempo. Sin embargo, y debido a la agitación puede asumirse que, a un tiempo determinado, dentro del reactor la composición y la temperatura son uniformes.

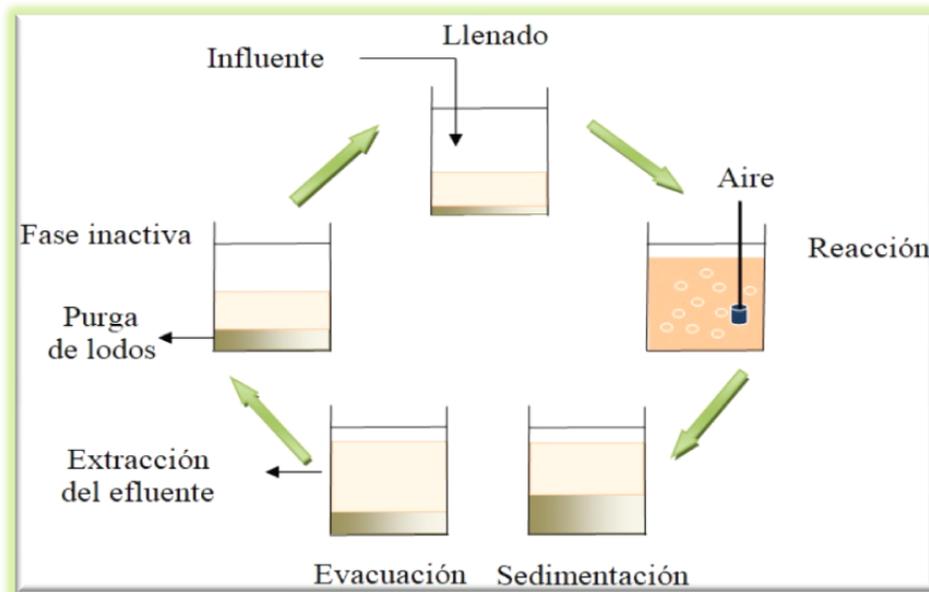
### **1.8.3 Reactor de cargas secuenciales (Sequential Batch Reactor, SBR)**

El reactor de cargas secuenciales (SBR) es una de las principales tecnologías en el tratamiento biológico de efluentes con cultivos en suspensión que se ha utilizado satisfactoriamente en agua residual urbana (Lee y col., 2004; Puig y col., 2005) como en aguas de desechos industriales (Vives y col., 2003; Cassidy y Belia, 2005).

El funcionamiento de los SBRs se basa en la secuencia de ciclos de llenado y vaciado. Los procesos unitarios que intervienen son idénticos a los de un proceso convencional de lodos activados. En ambos sistemas intervienen la aireación y la sedimentación-clarificación. No obstante, en las plantas convencionales, los procesos se llevan a cabo simultáneamente en tanques separados, mientras que en los SBRs los procesos tienen lugar secuencialmente en el mismo tanque (Metcalf y Eddy, 1995).

Todos los sistemas SBR tienen en común 5 etapas, que tienen lugar de forma secuencial. En la Figura 1.11 se puede ver detallado el modo de operación: (1) **Llenado**: el objetivo de esta fase es la adición de sustrato (afluente, agua residual bruta o efluente

primario); (2) **Reacción**: durante esta fase se completan las reacciones iniciadas durante la fase de llenado; tiene lugar bajo condiciones de agitación pudiendo ser anaeróbica, anóxica o aeróbica; (3) **Sedimentación**: el objetivo de esta fase es permitir la separación de los lodos para conseguir un sobrenadante clarificado como efluente secundario; (4) **Extracción**: en esta fase se realiza la extracción del efluente clarificado; (5) **Fase inactiva**: en esta fase se puede realizar la purga de lodos activados, aunque puede llevarse a cabo durante cualquier fase dependiendo del modo de operación



**Figura 1.11. Esquema de un reactor de cargas secuenciales (SBR) con fase de reacción aeróbica**

Por su configuración y características los SBR presenta las siguientes ventajas y beneficios:

- Diseño simple y compacto debido a la ausencia de un clarificador separado (Cervantes, 2009).
- Ahorro potencial de costos de capital mediante la eliminación de clarificadores y otros equipos como los utilizados en los procesos de desnitrificación. Al requerir un solo reactor lo hace ideal para industrias que no dispongan de espacio suficiente (EPA, 1999).
- Las cargas hidráulicas elevadas no producen arrastre de los sólidos del licor de mezcla (Metcalf y Eddy, 1995).

- Flexibilidad, versatilidad y control de operación. Alta capacidad de adaptación y tolerancia a variaciones de la carga orgánica (EPA, 1999).
- Posibilidad de ajustar secuencias de condiciones anaeróbicas, anóxicas y aeróbicas, lo que lo hacen ideal en la eliminación biológica de nutrientes (Cui y col., 2009).
- Sistema automatizado que puede controlar y ajustar con facilidad la aireación a lo largo del ciclo, cargas del efluente, periodos de reacción y decantación. Gran capacidad para manejar variaciones de carga del efluente diurnas, nocturnas y estacionales (Freitas y col., 2009).

Considerando que la purga de lodos puede realizarse durante la etapa de reacción, el proceso puede ser simplificado. La operación cíclica de un SBR puede definirse con cuatro etapas (Schmidell y col., 2007):

$$TC = TF + TR + TS + TW \quad (1.1)$$

Donde: TC = tiempo total del ciclo

TF = tiempo de llenado

TR = tiempo de reacción

TS = tiempo de sedimentación

TW = tiempo de extracción del efluente

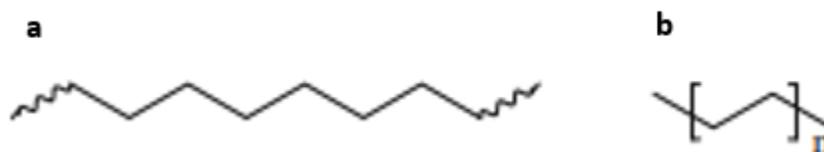
### **1.9 Revalorización de efluentes. Generación de productos con valor agregado: Bioplásticos**

Una forma interesante de revalorización de efluentes consiste en la generación de productos de interés en diversos campos de la industria y medicina como son los bioplásticos como es el caso de los polihidroxicanoatos.

Para comprender el origen, composición y características de los bioplásticos es necesario considerar los conceptos de polímero, biopolímero y plástico.

Los polímeros son moléculas de gran tamaño, constituidas por unidades repetitivas denominadas monómeros (Figura 1.12), las cuales están conectadas por lo general por átomos de carbono mediante enlaces covalentes, que constituyen la columna vertebral de

la cadena polimérica (Ravve, 2012).



**Figura 1.12. a) Cadena lineal, b) monómero repetitivo**

Los polímeros sintéticos se han venido desarrollando por parte de la industria química desde las primeras décadas del siglo XX teniendo un máximo impulso durante la II Guerra Mundial; el desarrollo de este tipo de materiales es considerado uno de los grandes avances del siglo XX, debido a la multiplicación de sus posibilidades de uso, no solo en la industria sino en la vida cotidiana (Meneses y col., 2007). La obtención de estos polímeros es fundamentalmente a partir del petróleo y son creados para funciones específicas.

Por lo general, cuando se habla de biopolímero se hace referencia a macromoléculas que son sintetizadas por sistemas biológicos. Sin embargo, los biopolímeros son polímeros producidos a partir de fuentes naturales, materiales biológicos, sintetizado por sistemas biológicos y/o síntesis química.

Un material plástico es aquel que mediante compresión puede cambiar de forma y conservar esta de modo permanente. Los materiales pueden estar constituidos por compuestos orgánicos sintéticos que tienen la propiedad de ser maleables y por tanto pueden ser moldeados en objetos sólidos de diversas formas. Esta propiedad confiere a los materiales plásticos una gran variedad de aplicaciones. Su nombre deriva de la plasticidad, una propiedad que se refiere a la capacidad de deformarse sin llegar a romperse.

Los productos plásticos son normalmente polímeros orgánicos de alto peso molecular. Usualmente son sintetizados a partir de derivados químicos del petróleo (petroquímicos) siendo conocidos como plásticos convencionales.

Los bioplásticos presentan al menos alguna de las siguientes características: los monómeros son extraídos de recursos renovables (biomasa), el polímero es extraído de la biomasa, el polímero es biodegradable. Dentro de los bioplásticos se encuentran los polihidroxialcanoatos, los cuales son poliésteres biodegradables sintetizados por una gran variedad de microorganismos principalmente bacterias.

## 1.10 Materiales poliméricos

La industria del plástico en la Unión Europea da empleo directo a más de 1,6 millones de personas. Una industria en la que operan cerca de 60.000 compañías, la mayoría de las cuales son PYMEs, con una facturación en el 2018 de más de 360 millones de euros, con una producción de 61,8 millones de toneladas; mientras que la producción mundial alcanzó los 359 millones de toneladas. La industria europea del plástico incluye productores de materias primas, convertidores de plástico, recicladores de plástico y fabricantes de maquinaria de plástico. La industria de los polímeros ocupa el séptimo lugar en la contribución al valor agregado industrial en Europa. Al mismo nivel que la industria farmacéutica y muy cerca de la industria química (Plastics- the Facts, 2019).

### 1.10.1 Clasificación de los polímeros

#### 1.10.1.1 Clasificación según su estructura

**-Lineales:** Los polímeros lineales se caracterizan por tener monómeros con dos puntos reactivos, de modo que la macromolécula se desarrolla de forma unidireccional, formando cadenas lineales, llamada cadena principal (Figura 1.13a). Algunos polímeros de este tipo son: polietileno, cloruro de polivinilo y metacrilato de polimetilo (PMMA) (Chawla, 2012).

**-Ramificados:** Los polímeros ramificados (Figura 1.13b) se forman porque sus monómeros tienen 3 o más puntos reactivos, de modo que la polimerización ocurre tridimensionalmente, es decir en varias direcciones del espacio, debido a esto podemos encontrar diversas formas. Como forma de estrella o de peine (Figura 1.13c, d).

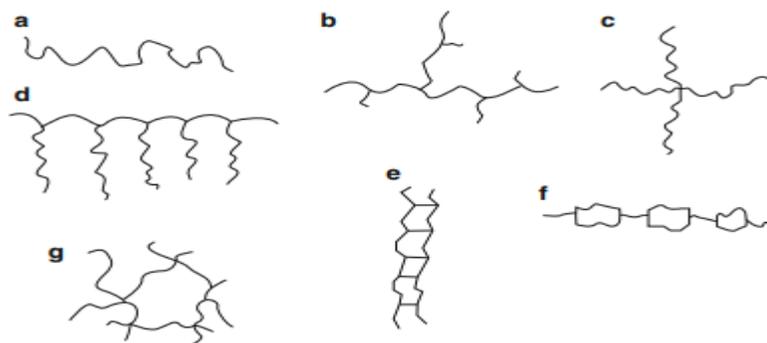


Figura 1.13. Estructuras de moléculas poliméricas. a) lineal. b) Ramificada. c) estrella. d) Peine. e) Escalera f) Semi-escalera. g) Red

Además de lo anterior, las moléculas de polímero también pueden ser bicatenarias. Dichos polímeros se denominan polímeros en escalera y semi-escalera (Figura 1.13e, f) Cuando las ramas de diferentes polímeros se interconectan, se forman estructuras de red. Las redes planas se parecen a la estructura del grafito. Sin embargo, las redes tridimensionales, o redes espaciales, se pueden comparar con los diamantes. Un polímero de red se muestra en la Figura 1.13g (Reve, 2012).

### 1.10.1.2 Clasificación según su origen

**-Polímeros Naturales:** Los polímeros naturales son aquellos que se encuentran en la naturaleza, formando parte de los seres vivos como la celulosa, la lignina, el almidón, la seda, la lana, la quitina, el caucho natural, los polipéptidos (proteínas), los poliésteres (polihidroxitirato) y los ácidos nucleicos (ADN, ARN) (Koltzenburg y col., 2017; Braun y col., 2013).

**-Polímeros Sintéticos:** Los polímeros sintéticos son aquellos fabricados en laboratorios o en procesos de producción industrial como polietileno, el poliestireno, los poliuretanos o las poliamidas.

**-Polímeros naturales modificados:** Este tipo de polímeros se forman cuando los polímeros naturales se modifican de forma química como es el caso del acetato de celulosa que corresponde a una modificación química de la celulosa (Braun y col., 2013).

### 1.10.1.3 Homopolímeros y copolímeros

**-Homopolímero:** Los homopolímeros (Figura 1.14a) son aquellos polímeros que tienen unidades repetitivas en su cadena, esto quiere decir que se compone de la misma unidad monomérica.

**-Copolímero:** Los copolímeros son cadenas de polímeros con dos monómeros diferentes. Si los dos monómeros diferentes se distribuyen aleatoriamente a lo largo de la cadena, tenemos un copolímero aleatorio (Random). Sin embargo, si una secuencia larga de un monómero es seguida por una secuencia larga de otro monómero tenemos un copolímero de bloque. Si tenemos una cadena de un tipo de monómero y ramas de otro tipo tenemos un copolímero de injerto. La Figura 1.14 muestra esquemáticamente los diferentes tipos de copolímeros (Chawla, 2012).

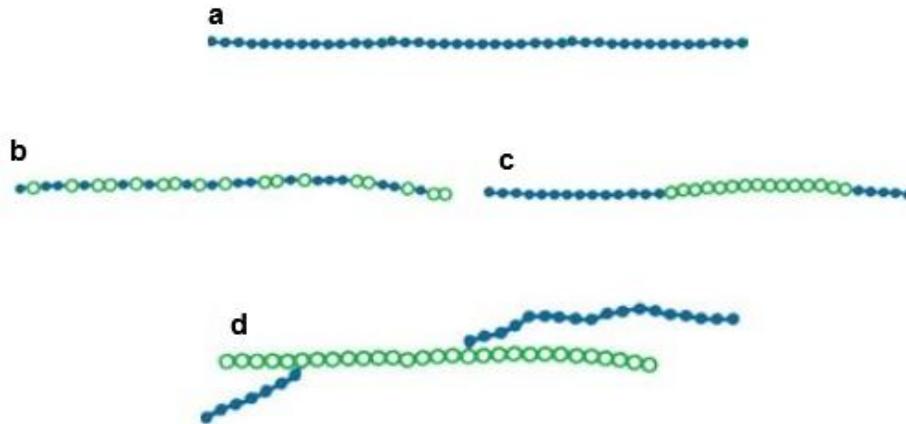


Figura 1.14. Diferentes tipos de copolímeros. a) Homopolímero b) Copolímero Random. c) Copolímero de Bloque. d) Copolímero de Injerto

#### 1.10.1.4 Clasificación por sus propiedades

##### -Termoplásticos:

Los polímeros termoplásticos son aquellos **que a altas temperaturas puede fundirse, permitiendo luego darle diversas formas**. Se funde cuando se calienta y se endurece cuando se enfría. Esta propiedad es de gran ayuda para el reciclaje de plásticos, ya que después de calentarse y moldearse pueden recalentarse y formar otros objetos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, si se funden y se moldean varias veces, sus propiedades físicas cambian gradualmente disminuyendo su posibilidad de reutilización.

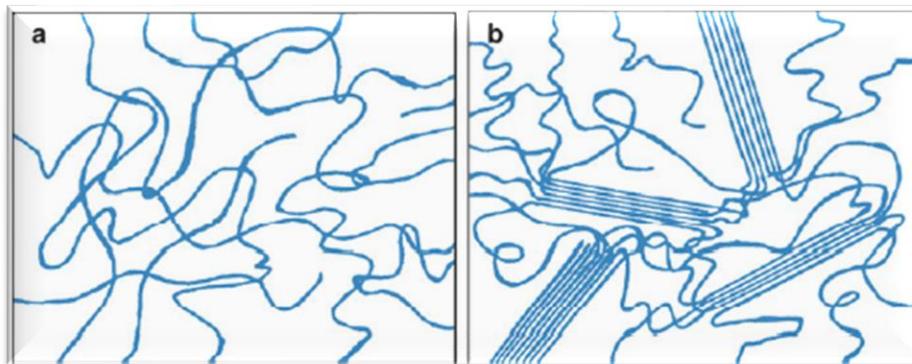


Figura 1.15. Posibles arreglos de las moléculas de polímero: (a) amorfas, (b) semicristalinas

Algunos termoplásticos son: polietileno de baja y alta densidad, poliestireno y polimetilmetacrilato. Cuando la estructura es amorfa, no hay un orden aparente entre las

moléculas y las cadenas se ordenan al azar (Figura 1.15a). Se pueden obtener pequeñas regiones monocristalinas en forma de placas llamadas laminillas o cristalitas por precipitación del polímero a partir de una solución diluida. En las láminas, las cadenas moleculares largas se pliegan de manera regular (Figura 1.15b). Muchos cristalitas se agrupan y forman esferulitas, como los granos en los metales (Chawla, 2012).

### **-Termoestables:**

Los polímeros termoestables son aquellos en los cuales las moléculas se reticulan en forma de red tridimensional con fuertes enlaces covalentes. Estos polímeros experimentan una reacción de curado que implica la reticulación de cadenas poliméricas y su endurecimiento. La reacción de curado puede iniciarse mediante agentes químicos apropiados o mediante la aplicación de calor y presión, algunos materiales de este tipo incluyen resinas epoxi, resinas fenólicas, resinas de poliéster (Pascault y col., 2002).

Los polímeros termoestables asumen una forma permanente después que han sido moldeados a altas temperaturas ya que no se pueden volver a fundir, haciendo que sea imposible volver a moldearlos.

### **-Elastómeros:**

Los polímeros de tipo elastómeros forman una red que puede contraerse y estirarse cuando estos materiales son comprimidos o estirados, incluso pueden deslizarse unas cadenas sobre las otras, mostrando un comportamiento elástico; este tipo de macromolécula se descompone al calentarse. La particularidad de los elastómeros es que pueden ser estirados muchas veces su propia longitud, para luego recuperar su forma original sin una deformación permanente. Los ejemplos comunes de este tipo de polímeros incluyen goma natural, poliuretanos, neopreno, silicona.

## **1.10.2 Biopolímeros**

Los biopolímeros son macromoléculas de origen natural y carácter biodegradable, que pueden ser sintetizados por sistemas biológicos (organismos procariontes y eucariotes) o por síntesis química a partir de materiales de origen biológico (azúcares, almidón, grasas naturales o aceites, etc.). Existe una gran diversidad de biopolímeros sintetizados por organismos vivos, que pueden catalogarse en ocho clases principales según su estructura

química: (i) ácidos nucleicos, (ii) poliamidas, (iii) polisacáridos, (iv) polioxoésteres orgánicos, (v) politioésteres, (vi) poliésteres inorgánicos, (vii) poliisoprenoides y (viii) polifenoles (Steinbuchel, 2001).

El beneficio que los recursos naturales ofrecen en cuanto a conservación y reciclaje se convierte en una excelente opción e innovación en el desarrollo de nuevos productos biodegradables. Los biopolímeros representan los componentes orgánicos más abundantes en la naturaleza. Ellos son importantes para la vida cotidiana y exhiben propiedades fascinantes con variedad de aplicaciones. La completa biodegradación de biopolímeros con características plásticas en productos como CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O y posteriormente en abonos orgánicos constituye una gran ventaja frente a los polímeros convencionales.

Los biopolímeros poseen un amplio rango de funciones esenciales y/o benéficas para los organismos, por ejemplo: conservación y expresión de la información genética, catálisis de reacciones, reserva de Carbono, Nitrógeno, Fósforo y otros nutrientes. Además, actúan como reserva de energía, protección contra los ataques de otras células y de factores ambientales peligrosos o intrínsecos, sensores de factores bióticos y abióticos, comunicadores con el medio ambiente y con otros organismos y mediadores de adhesión a superficies u otros organismos. Conjuntamente, muchos de estos compuestos son componentes estructurales de células, tejidos y microorganismos (Kennedy y Meullenet, 2005). Los materiales utilizados en la fabricación de películas a partir de biopolímeros provienen de cuatro fuentes: origen animal (colágeno/gelatina), marino (quitina/quitosano), agrícola (lípidos y grasas e hidrocoloides; proteínas y polisacáridos) y microbiano (polihidroxialcanoatos, PHA), reforzados con materiales de fibras naturales como el lino, yute, cáñamo y otras fuentes de celulosa. Hasta el presente, se han logrado reemplazar polímeros sintéticos por otros de origen natural, en aplicaciones específicas relacionadas con propiedades de barrera, mecánicas y térmicas, en empaques tipo películas, protectores, espumas, envolturas, platos, tasas, cucharas, bolsas, etc. (López y Jiménez, 2015).

Los biopolímeros con características plásticas son macromoléculas producidas a partir de fuentes renovables, que dan lugar a plásticos biodegradables, siendo una alternativa a los problemas ambientales y sociales que son generados por la industria de los plásticos de origen petroquímico.

Según la ASTM (American Society for Testing and Materials), los polímeros biodegradables se degradan por la acción de microorganismos tales como bacterias, hongos y algas, mientras que los polímeros compostables igualmente se degradan por la acción de microorganismos, pero a una velocidad igual a la de materiales que son compostables tales como hojas, papel y trozos de madera. La biodegradación es un proceso que puede tener lugar en diferentes ambientes como los suelos, las tierras de compostaje, plantas de tratamiento de aguas, ambientes marinos, etc. No todos los materiales son biodegradables bajo todas las condiciones. Para que un material biodegradable sea considerado compostable, deberá biodegradarse en un período de tiempo establecido y el producto final (compost) debe cumplir con las exigencias necesarias para su uso en jardinería y agricultura. Al final de su vida útil, deben disponerse en centros de gestión con un adecuado control del proceso, como las plantas municipales de compostaje.

Los plásticos compostables no deben dejar fragmentos que duren más de 12 semanas en el residuo, no pueden contener metales pesados o toxinas y deben permitir el crecimiento de plantas. Los materiales bioplásticos que pasan estas pruebas se denominan compostables y pueden ser enviados a las plantas de compostaje. Una planta de compostaje es una instalación destinada al reciclaje de los residuos orgánicos mediante un tratamiento biológico de los mismos, produciendo compost o abono orgánico. Se basa en la actividad de microorganismos (hongos y bacterias) que descomponen los residuos en condiciones óptimas de temperatura, humedad y oxígeno. El compost es obtenido de manera natural mediante la descomposición aeróbica de varios residuos orgánicos: restos vegetales, excrementos de animales, restos de comida de los residuos urbanos, fracción orgánica de los residuos urbanos.

A partir del segundo o tercer día la temperatura asciende a 50-60°C. Durante los siguientes 15-20 días se mantiene entre 65 y 75°C. A partir de las dos o tres semanas, la temperatura disminuye, hasta alcanzar la temperatura ambiente.

#### **1.10.2.1 Biopolímeros que dan lugar a bioplásticos de origen renovable**

Los biopolímeros clasifican en cuatro grupos de acuerdo a su fuente, tal como se presenta a continuación:

### **-Biopolímeros extraídos directamente de la biomasa**

Dentro de este grupo se encuentran: la lana, la seda, el algodón, celulosa, almidón, la lignina, el caucho natural (Lutke-Eversloh y col., 2001; Chawla, 2012). Algunos de estos permiten producir bioplásticos de origen natural

### **-Biopolímeros producidos mediante monómeros bio-derivados**

En este grupo están los polímeros constituidos por monómeros que existen en la naturaleza o son derivados de materiales existentes en la naturaleza, por ejemplo: aceites vegetales, ácido poliláctico (PLA). La producción de ácido poliláctico es un proceso de dos etapas: inicialmente se realiza una fermentación para obtener el monómero seguida de un paso convencional de polimerización química; por lo tanto, se cataloga como un polímero sintético derivado al 100% de materias primas renovables, que se producen a partir del ácido láctico (Valero-Valdivieso y col., 2013).

### **-Biopolímeros producidos por organismos vivos**

Entre los biopolímeros producidos por organismos vivos se pueden encontrar la goma xantana, celulosa bacteriana, alginatos, polihidroxialcanoatos (PHA), polihidroxibutirato (PHB), polihidroxivalerato (PHV) y copolímeros Poli 3(HB-co-HV) (Malagon y col., 2017).

### **-Biopolímeros con características plásticas obtenidos de mezclas de materiales**

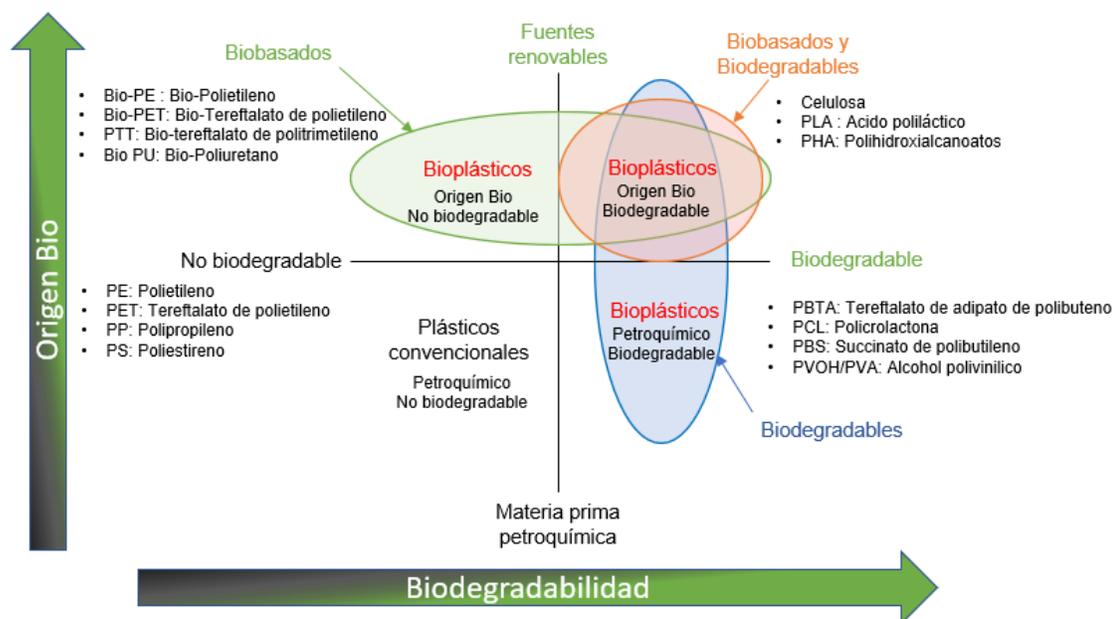
Este grupo incluye los polímeros producidos por mezclas de materiales de fuentes renovables tales como: mezclas de PHA-PLA, Almidón-PLA, Almidón-PHB, Celulosa-PHB, Quitosano-PLA (Loureiro y col., 2015; Rodríguez y Orrego, 2016).

## **1.11 Plásticos convencionales y bioplásticos**

Los plásticos son materiales muy importantes en la economía mundial debido a su uso generalizado en varios campos, como el envasado de alimentos, la ropa, la vivienda, las comunicaciones, el transporte, la construcción, la atención médica y las industrias del ocio (Iwata, 2015). La producción mundial de plástico alcanzó los 348 millones de toneladas en 2018, la mitad de las cuales se atribuyó a productos desechables (Plastic - the Facts, 2019). Debido al manejo inadecuado de los desechos y al comportamiento humano frente

a esta problemática, muchos organismos sufren daños fatales por enredos o ingestión de desechos plásticos, lo que induce una alteración significativa del equilibrio dinámico de la biosfera (Gall y Thompson, 2015). En los casos donde los plásticos son enterrados en vertederos o tratados en plantas de tratamiento de aguas residuales, estos podrían derivarse en gran medida en lixiviados (He y col., 2019), permitiendo la fuga de aditivos y contaminantes químicos, incluyendo bifenilos policlorados, hidrocarburos poliaromáticos, difeniléteres polibromados (Andrady, 2011; Ross y Morales-Caselles, 2015).

Históricamente se ha considerado que un plástico cuando es de origen natural es biodegradable y si es de origen petroquímico no es biodegradable; sin embargo, la palabra biodegradabilidad según las normas ISO se define como materiales que se degradan completamente a dióxido de carbono y agua por la acción de microorganismos naturales, como bacterias, hongos y algas. En consecuencia, no importa si la materia prima utilizada es de recursos fósiles o renovables, sino que sean biodegradables. En la Figura 1.16 se presenta un esquema de la clasificación de los plásticos incluyendo los plásticos convencionales y los diferentes tipos de bioplásticos.



**Figura. 1.16. Clasificación de plásticos convencionales de origen petroquímico y distintos tipos de bioplásticos**

Los plásticos convencionales son de origen petroquímico y no son biodegradables (corresponden al cuadrante inferior izquierdo). Entre los bioplásticos, algunos pueden ser de origen biológico y no ser biodegradable (corresponden al cuadrante superior izquierdo).

Otros pueden ser de origen petroquímico y ser biodegradables (cuadrante inferior derecho) y otros pueden ser de origen biológico y además ser biodegradables (cuadrante superior derecho).

Debe tenerse en cuenta que los bioplásticos tienen que presentar las mismas prestaciones, versatilidad y resistencia que otros tipos de plástico de origen petroquímico. Por lo tanto, no todos los biopolímeros se comportan como bioplásticos

Los bioplásticos de base biológica (biobasados) se han identificado como una alternativa prometedora a los plásticos convencionales y bioplásticos de origen petroquímico biodegradables con respecto a los recursos fósiles finitos y el cambio climático. Este tipo de materiales se definen como materiales que se producen a partir de recursos renovables de carbono. Los componentes extraídos de la biomasa vegetal y de la madera, como almidón, celulosa, hemicelulosa, lignina o aceite vegetal, que se producen mediante la fotosíntesis a partir del dióxido de carbono atmosférico, se utilizan como recursos de carbono renovables (Spierling y col., 2018). Según la fundación Ellen MacArthur en el World Economic Forum (2016), la economía circular se refiere a una economía restauradora y regenerativa; tiene como objetivo mantener los productos, componentes y materiales en su máxima utilidad y valor. Este tipo de concepto no se aplica a recursos fósiles; por lo contrario, apunta a recursos renovables como es el caso de los productos biobasados

Algunos plásticos de origen petroquímico son biodegradables como poli (ε-caprolactona), poli (succinato/adipato de butileno) y poli (adipato-co-tereftalato de butileno). Sin embargo, los derivados de polisacáridos con un alto grado de sustitución, por ejemplo el acetato de celulosa, que se utiliza en películas y filtros, el bio-Polietileno sintetizado a partir del bioetanol, que se produce mediante la fermentación de la glucosa, no son biodegradables pero son de origen renovable, finalmente el carbono producido en la descomposición del bioplástico forma parte del ciclo del carbono por lo tanto no se consideran que aporten CO<sub>2</sub> a la atmósfera a diferencia de los plásticos biodegradables de origen petroquímico los cuales generan huella de carbono (Iwata. 2015).

### **1.11.1 Problemas ambientales**

Los plásticos derivados del petróleo han sustituido parcialmente y en algunas ocasiones en su totalidad a muchos materiales naturales como la madera, el algodón, el

papel, la lana, la piel, el acero y el concreto; esto es debido a que son económicos, livianos, versátiles, resistentes a la temperatura, a la presión, a la oxidación, a los solventes químicos, a la luz UV, entre otros factores, por lo que son muy utilizados en todos los campos de la industria (Castro, 2011). Sin embargo, estas mismas ventajas pueden ser sus peores inconvenientes; la alta resistencia a la corrosión, al agua y a la descomposición bacteriana los convierte en residuos difíciles de eliminar. Esto provoca tanto problemas medioambientales como económicos, debido a la dificultad en el momento de la gestión de estos residuos, cuando el reciclaje y la reutilización no son posibles provocando su acumulación en ríos y suelos, afectando la salud de las especies y las condiciones de vida humana (Singh y Sharman, 2008; Harding y col., 2007, Cavalheiro y col., 2009).

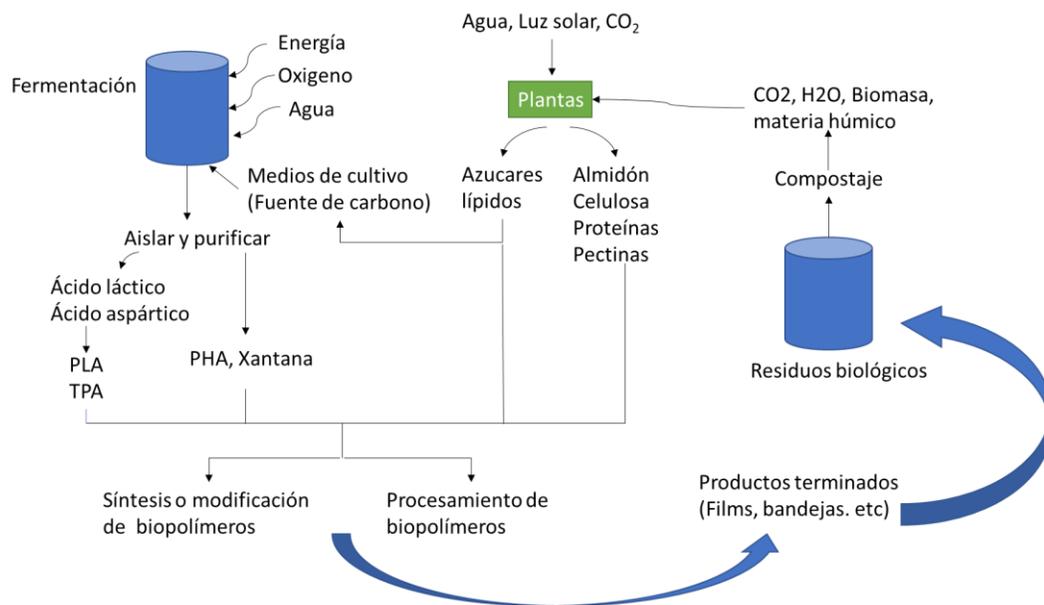
El polietileno y el polipropileno pueden tardar hasta 500 años en descomponerse (Gross y Bhanu, 2002). La cifra global de residuos plásticos aumenta año tras año, lo que genera un importante problema para su gestión. La versatilidad de este material ha ocasionado un incremento de su consumo y, por lo tanto, de la contaminación. El mundo consume dos millones de bolsas plásticas por minuto, es decir más de 1 trillón de bolsas al año (Larsen, 2014). Por otra parte, es bien sabido que la sociedad en general, y la industria de los plásticos en particular, tiene actualmente una peligrosa dependencia del petróleo. Cada vez es más evidente que una economía dependiente del petróleo tiene grandes debilidades por la incertidumbre tanto del suministro como del precio del mismo. La contaminación ambiental causada por los plásticos de origen petroquímico ha sido reconocida como un problema a nivel mundial debido a la resistencia de estos materiales a la biodegradación (Shah y col., 2008; Sivan, 2011). Según un informe del 2017 del programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), en los últimos 50 años se ha multiplicado veinte veces la producción mundial de plásticos, llegándose a generar 320 millones de toneladas en ese plazo, aproximadamente 8 millones de toneladas de plástico acaban en los océanos cada año, situación que ha provocado que en la actualidad haya 600 especies marinas afectadas por esa contaminación, que también origina pérdidas en sectores como la pesca o el turismo.

La limitación de los recursos naturales y una creciente población mundial han puesto la idea de la economía circular en el centro de la investigación, la industria y la política en los últimos años.

Debido a que los plásticos convencionales son materiales derivados del petróleo crudo, materia prima no renovable, se requiere el desarrollo de rutas alternativas de producción las cuales sean amigables con el medioambiente y utilicen recursos renovables. Una de las posibles soluciones es la producción y uso de bioplásticos microbianos obtenidos de desechos industriales, los cuales son totalmente biodegradables por microorganismos y los subproductos de la descomposición no son tóxicos (Siracusa y col., 2008; Zhu y col., 2013; Luengo y col., 2003; Koller y col., 2007).

### 1.11.2 Ciclo del carbón

Los biopolímeros biodegradables presenten o no propiedades plásticas dispuestos en ambientes bioactivos se degradan por la acción enzimática de microorganismos como bacterias, hongos y algas. Sus cadenas poliméricas también pueden romperse mediante procesos no enzimáticos como la hidrólisis química.



**Figura 1.17. Ciclo del carbono. Adaptado de Gross y Bhanu, (2002)**

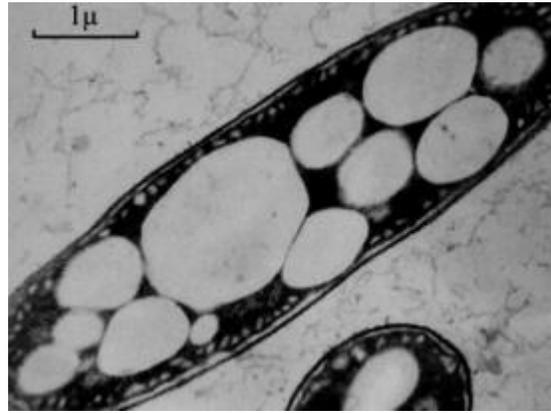
La biodegradación los convierte en biomasa, materia húmica, CO<sub>2</sub> y agua en condiciones aeróbicas y hasta CH<sub>4</sub> en condiciones anaeróbicas (Figura 1.17), Por lo tanto, los PB se reciclan naturalmente mediante procesos biológicos (Gross y Bhanu, 2002; Valero-Valdivieso y col., 2013).

### **1.11.3 Origen y producción biotecnológica de biopolímeros plásticos**

La característica más importante de los biopolímeros es que se pueden obtener a partir de fuentes renovables, procedentes directamente de plantaciones agrícolas o mediante la aplicación de determinados procesos biotecnológicos, cuando se usan materias primas de desechos agrícolas o industriales de bajo costo. Las materias primas utilizadas en aplicaciones no alimentarias que se obtienen de plantaciones agrícolas y de bosques son en su mayoría polímeros (almidón, celulosa, lignina y caucho natural), con la excepción de la sacarosa y los triacilgliceroles, que también pueden transformarse secundariamente en diferentes polímeros por la acción de microorganismos. De forma general, se podría afirmar que los productores de biopolímeros plásticos más importantes son las plantas, aunque la síntesis de otros biopolímeros plásticos importantes como los polihidroxialcanoatos (PHAs) se lleva a cabo principalmente por microorganismos. El desarrollo de la biotecnología ha provocado el interés de la industria en la producción microbiana de biopolímeros plásticos y precursores para la síntesis in vitro de polímeros (Rehm, 2008). Además, en los últimos años se ha impulsado la fabricación industrial de productos biotecnológicos a partir de procesos fermentativos, en detrimento de las explotaciones agrícolas, que quedarían así reservadas para fines alimentarios (Waltz, 2008). Como es el caso de la producción de PHA donde se puede utilizar desechos orgánicos, con o sin previa fermentación, como materia prima: ej. la caña de azúcar (Albuquerque y col., 2007), efluentes de empresas lácteas (Duque y col., 2014), glicerol crudo (Mohamad Fauzi y col., 2019), efluentes de fábricas de papel (Bengtsson y col., 2008), las aguas residuales industriales y domésticas (Carucci y col., 2001; Dionisi y col., 2010).

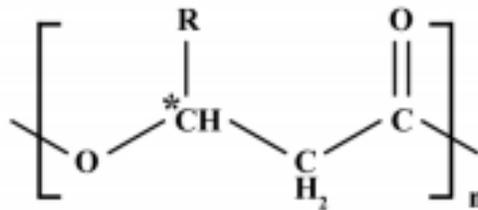
### **1.11.4 Polihidroxialcanoatos (PHA)**

Los polihidroxialcanoatos constituyen una buena alternativa para reemplazar a los plásticos convencionales de origen petroquímico pues presentan propiedades físicas similares a las de compuestos termoplásticos y elastómeros (Cavalheiro y col., 2009). Además, los PHAs son compuestos derivados de recursos renovables, no tóxicos, biocompatibles y biodegradables (Volova y col., 2014; Steinbuchel, 2001). Los PHAs son biopolímeros sintetizados por bacterias como reserva intracelular de carbono y energía, que se acumulan en forma de gránulos en el citoplasma (Figura 1.18) (Waltz, 2008).



**Figura 1.18. Micrografía electrónica de gránulos de PHA intracelular. Adaptado de Laycock y col., (2014)**

Su nomenclatura y el número de carbonos están determinados por el grupo funcional alquilo R (Figura 1.19) que está unido al carbono quiral (Tan y col., 2014). Estos materiales se pueden clasificar en tres grupos según el número de átomos de carbono en las unidades de monómero.



**Figura 1.19. Estructura química del PHA. \* denota el carbono quiral. Adaptado de Tan y col., (2014)**

Los PHA de longitud de cadena corta (scl-PHA) son altamente cristalinos y constan de 3-5 átomos de carbono; PHA de longitud de cadena media (mcl-PHA) son de naturaleza elastómera y contiene 6-14 átomos de carbono, y PHA de longitud de cadena larga (lcl-PHA), con más de 14 átomos de carbono. Los homopolímeros descritos en la Tabla 1.5 tienen diferentes propiedades físicas, desde quebradizas y rígidas hasta flexibles y resistentes (Ruth y col., 2008; Zhu y col., 2013).

Poli (3-hidroxibutirato) (P3HB) y poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV)) tienen propiedades mecánicas similares al polipropileno (PP) y al polietileno (PE), lo que hace que los PHAs sean potenciales sustitutos de estos plásticos no biodegradables (Laycock y col., 2014). P(3HB) es el tipo más común de PHA producido por

microorganismos. El homopolímero P(3HB) es un material altamente cristalino, rígido, pero relativamente frágil, dependiente del peso molecular.

**Tabla 1.5. Nomenclatura en función de su grupo funcional. Tan y col., (2014)**

Grupo R	Numero de carbonos	Homopolímeros PHA
Metil	C4	Poli(3-hidroxibutirato)
Etil	C5	Poli(3-hidroxivalerato)
Propil	C6	Poli(3-hidroxihexanoato)
Butil	C7	Poli(3-hidroxiheptanoato)
Pentil	C8	Poli(3-hidroxiocetanoato)
Hexil	C9	Poli(3-hidroxinonanoato)
Heptil	C10	Poli(3-hidroxidecanoato)
Octil	C11	Poli(3-hidroxoundecanoato)
Nonil	C12	Poli(3-hidroxidodecanoato)
Decil	C13	Poli(3-hidroxitridecanoato)
Undecil	C14	Poli(3-hidroxitetradecanoato)
Dodecil	C15	Poli(3-hidroxipentadecanoato)
Tridecil	C16	Poli(3-hidroxihexadecanoato)

Duque y col (2014) estudiaron la forma de controlar la composición del polímero, en un proceso de producción de PHA utilizando cultivos mixtos alimentados con dos efluentes modelo como suero de queso y melaza de caña. En la etapa inicial de fermentación predominó la producción de ácidos como el acetato y el butirato a partir de suero de queso, mientras que para la melaza el propionato y el valerato. En la etapa de producción de PHA se logró determinar que la composición del polímero es dependiente de los precursores de hidroxibutirato (HB) y hidroxivalerato (HV) producidos en la etapa de fermentación.

### **1.11.5 Producción de PHA**

#### **1.11.5.1 Etapa de selección**

La síntesis de PHA es favorecida bajo condiciones alternantes de disponibilidad (“feast”) y limitación (“famine”) de carbono. Cuando el carbono es un nutriente limitante, las bacterias acumulan PHA por acción de la polimerasa en la fase de disponibilidad; mientras que, en la etapa de limitación, una despolimerasa degrada el PHA, acumulado intracelularmente, a monómeros de hidroxialcanoatos (Has) que se utilizan como fuente de carbono y energía cuando la fuente de carbono extracelular ha sido agotada. El PHA no solo se utiliza como reserva intracelular de carbono, sino también como poder reductor (Ruth y col., 2008).

Las condiciones “feast”/“famine” son logradas en reactores operados con una secuencia temporal de diferentes fases (alimentación, reacción, sedimentación y purga), denominado reactor discontinuo secuencial o reactor batch secuencial (SBR, sequencing batch reactor) (Dias y col., 2006), el cual fue descrito en la Sección 1.8.3.

### **1.11.5.2 Etapa de producción**

Los PHAs se sintetizan en condiciones de desequilibrio nutricional, cuando existe un exceso de fuente de carbono en el medio y el crecimiento se encuentra limitado por la falta de otro nutriente esencial, como nitrógeno u oxígeno (Prieto y col., 2007). La etapa de acumulación de PHA se realiza en un reactor batch o batch alimentado, usando la biomasa seleccionada en la fase previa (Serafim y col., 2008). El proceso de producción de PHA utilizando cultivos mixtos requiere 2 o 3 etapas dependiendo del tipo de sustrato usado como materia prima. Para el caso de ácidos orgánicos se requiere una etapa de selección de microorganismos con capacidad de producir PHA seguida de una etapa de acumulación de PHA (Serafim y col., 2008). Cuando se emplean sustratos ricos en carbohidratos se requiere una etapa anaeróbica fermentativa previa, como se indicó anteriormente, implicando un proceso de 3 etapas (Albuquerque y col., 2007). Para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por lodos activados se pueden utilizar distintos sustratos. En el caso de utilizar subproductos industriales para su aprovechamiento, resulta interesante entre otros analizar: i) el suero de queso (subproducto de la industria láctea) y ii) el glicerol (subproducto del proceso de obtención de biodiesel). A continuación, se describen estas dos sustancias, y los procesos asociados a su obtención.

## **1.12 Procesos de la industria láctea**

### **1.12.1 Producción de queso**

A pesar de que la producción de queso es dependiente de la variedad del tipo de queso, la tecnología de fabricación es similar para casi todos los casos. Las diferencias residen principalmente en la utilización de variados insumos y técnicas, como distintos tipos de leche, fermentos, condiciones de maduración y tecnologías (Castañeda y col., 2010).

Etapas básicas en la elaboración de quesos:

- **Transporte y recepción de la leche:** Normalmente la leche llega hasta la planta de

tratamiento en camiones, en esa instancia generalmente se toman muestras para realizar los correspondientes análisis de calidad y determinación del contenido graso y proteico de la leche (CAR/PL, 2002). Tras la recepción, la leche se suele almacenar en condiciones refrigeradas, en tanques o silos a una temperatura entre los 6 y 10°C (Early, 1998).

- **Filtración y clarificación:** En esta etapa se controla el color, olor, sabor, acidez, materia grasa y ausencia de antibióticos, con el fin de asegurar que la misma sea apta para el proceso de fabricación (INTI, 2005). Se eliminan impurezas que pueda tener la leche por medio de centrifugación (CAR/PL, 2002).
- **Desnatado y normalización/estandarización:** En el desnatado se produce la separación de la materia grasa (nata) del resto de los componentes de la leche, por medio de centrifugas. Posteriormente se realiza la normalización del contenido graso de la leche, añadiendo la nata a la leche desnatada en diferentes proporciones en función de lo que se quiera obtener. Con el proceso de estandarización se garantiza la producción de queso de calidad uniforme (Early, 1998).
- **Tratamiento térmico:** El tratamiento térmico que se suele utilizar es el de pasteurización (72°C por 15 segundos); tratamiento que se realiza con el fin de destruir microorganismos patógenos y la mayor parte de la flora contaminante de la leche, sin modificar sus características fisicoquímicas. Luego de este proceso se conserva la leche en refrigeración evitando contaminación (Early, 1998).
- **Homogeneización:** En este proceso se reduce el tamaño de los glóbulos grasos favoreciendo una distribución uniforme de la materia grasa (CAR/PL, 2002).
- **Coagulación:** Es la formación, por medio del cuajo o enzimas coagulantes, de un gel formado por un entramado tridimensional de proteínas que contienen los glóbulos de grasa (Castañeda y col., 2010). La operación de coagulación se basa en provocar la alteración de la caseína y su precipitación, dando lugar a una masa gelatinosa que engloba todos los componentes de la leche. Se realiza en cubas que no deben moverse ni golpearse, ya que, de no ser así, se puede alterar el proceso con la consecuente pérdida de caseína con el residuo líquido. Se puede llevar a cabo de tres formas: coagulación ácida, coagulación enzimática o coagulación mixta. Durante esta etapa pueden producirse pérdidas o derrames de leche durante su manipulación (INTA EEA Chubut, 2016; RSA CONICET, 2019; CAR/PL, 2002).
- **Corte y desuerado:** En esta etapa se define el momento más adecuado para

realizar el corte de la cuajada. Debe realizarse en el momento justo y de forma lenta para obtener el tamaño de grano deseado para lograr la mayor homogeneidad posible y así evitar pérdidas de grasa, proteína y demás componentes (Castañeda y col., 2010). Para promover la separación del suero y retracción de la cuajada, se corta el gel en pequeños cubos aumentando de esta manera la superficie total por donde éste puede perder líquidos (INTI, 2005). El gel formado en la coagulación, cualquiera que sea el método empleado, constituye un estado físico inestable. Según las condiciones en las que se encuentra la fase líquida o lactosuero que lo impregna, se separa más o menos rápidamente. Este fenómeno es el que se conoce como desuerado.

Según el tipo de coagulación se obtiene un tipo de lactosuero distinto:

**Suero dulce:** generado durante la coagulación enzimática de la leche. Generalmente contiene entre 0,6 – 0,9 % de proteína soluble, alrededor de 0,3 % de grasa y una gran cantidad de lactosa (más de 5 %). En este tipo de suero, la presencia de ácido láctico es prácticamente inapreciable.

**Suero ácido:** se genera cuando se realiza coagulación ácida. Este tipo de lactosuero contiene aproximadamente la misma proporción de proteína soluble que el lactosuero dulce, pero una menor proporción de grasa y lactosa (4,5 %), y el ácido láctico representa hasta un 0,8 %.

- **Moldeo y prensado:** se corta en trozos y se coloca en moldes, los cuales pueden tener diferente forma, dependiendo de la normativa, la tradición o las exigencias de los consumidores. Durante el moldeo, el queso termina de desuerar y la cuajada logra la acidificación adecuada (Castañeda y col., 2010). El prensado se aplica para favorecer la expulsión del suero intergranular de la cuajada y dar al queso su forma definitiva. Durante el prensado también se produce la salida de lactosuero de la masa del queso, aunque la cantidad generada en esta etapa es menor que en el desuerado (CAR/PL, 2002).
- **Salado:** Esta operación se realiza una vez que el queso es retirado de la prensa. El salado se realiza principalmente en baños de salmuera, pero también puede realizarse en seco. La finalidad del proceso es aumentar la conservación, darle sabor y aroma, regular y/o inhibir el crecimiento microbiano y colaborar a la formación de la corteza. El tiempo de salazón depende principalmente del tipo de

queso y de su peso (Castañera y col., 2010).

- **Secado:** Una vez terminada la operación de salado, el queso puede exponerse a una corriente de aire para que se seque la superficie, esta acción tiene una especial importancia cuando el queso se envuelve o se recubre de cera para su maduración. El secado se realiza en salas o cámaras de secado acondicionadas para este fin, donde se hace circular una corriente de aire con condiciones de temperatura y humedad controladas para provocar el secado superficial del queso (CAR/PL, 2002).
- **Maduración:** Durante esta etapa se desarrollan procesos bioquímicos que otorgan a cada queso características particulares de aroma, sabor, textura, etc. Es importante durante la maduración, el control de las condiciones de temperatura, humedad y aireación, los cuales se encuentran regulados automáticamente en la mayoría de las queserías actuales, a través de cámaras climatizadas para tal fin (Castañeda y col., 2010). En general, a temperaturas más altas, más rápidamente se desarrolla el proceso madurativo (Early, 1998).

### 1.12.2 Producción de suero de queso

Debido a que Argentina es el décimo productor de leche a nivel mundial y el sexto país exportador de productos lácteos, este sector industrial es un importante generador de efluentes líquidos.

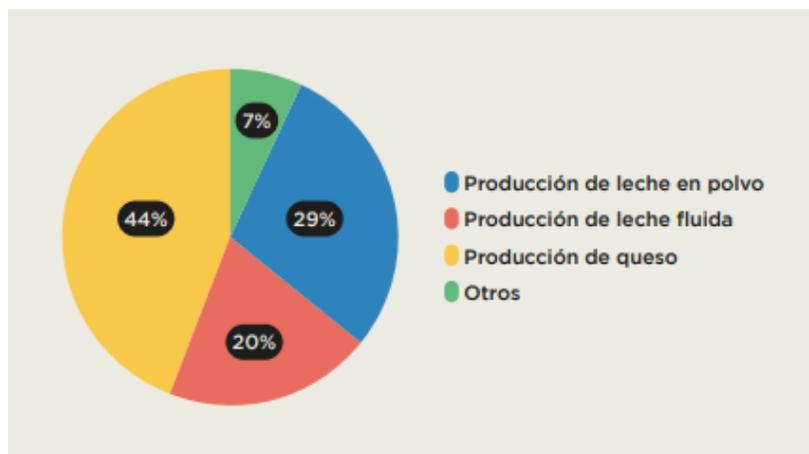


Figura 1.20. Destino de la producción de leche a productos. Adaptado OCLA, (2018)

A diferencia de las aguas residuales con compuestos fenólicos, el principal problema de las aguas residuales del sector lácteo no está asociado a su toxicidad, sino al gran

volumen generado. En 2011 la producción lechera fue de 11206 millones de litros (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, 2020).

Mientras que en el año 2018 fue de 10.527 millones de litros. El 44% de esta producción se destinó a la elaboración de distintos tipos de quesos (OCLA, 2018), como se indica en la Figura 1.20, generando un total aproximado de 3.937 millones de litros de suero por año, lo que equivale a 10 millones y medio de litros por día aproximadamente.

Argentina exporta casi el 10% de lactosuero que produce. El 90 % restante tiene diferentes destinos (OCLA, 2018). En cuanto al mercado interno se calcula que entre el 33% y el 35% se destina aproximadamente a la obtención de lactosa y derivados proteicos y el 4-5% es transformado en suero en polvo. El 60% restante, se desecha como efluente o es aprovechado, con bajo nivel tecnológico, en el sector agropecuario (Figura 1.21). Los dos primeros destinos se asocian generalmente a industrias lácteas grandes (por la alta inversión que requieren), mientras que los dos últimos son predominantes en las PyMES. Es así que se han identificado numerosos pequeños actores de la industria lechera (pero con una participación significativa en el mercado 25-30%) que concentran la producción y comercio de unos pocos productos rentables a corto plazo, aprovechado sólo en parte este lactosuero para obtener concentrados proteicos en forma líquida o deshidratados comercializados como suplementos nutricionales, y en muchos casos disponiendo de manera incorrecta el mismo. Esto se debe a que su alto contenido en agua (93-95%) encarece el transporte y/o procesos de concentración, secado y fraccionamiento; el equipamiento está desarrollado para tratar producciones a gran escala y su valor es marginal a pequeña escala, por lo que solo empresas grandes cuentan con capacidad de procesamiento de lactosuero (OCLA, 2018).

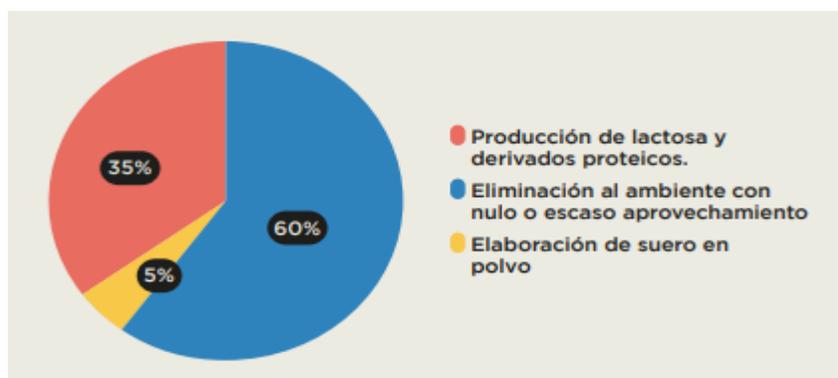


Figura 1.21. Destinos del lactosuero en el mercado interno. Adaptado OCLA, (2018)

De esta manera, se hace evidente la necesidad de contar con equipos para el procesamiento del suero que estén adaptados a la escala y capacidad económica de las pequeñas industrias lácteas, las cuales no han podido acceder a tecnologías más modernas que se han desarrollado en este campo y alcanzar así una transferencia efectiva al medio, con un impacto muy positivo en las empresas que integran el sector.

En Sudamérica, el 50% de las queserías son pequeñas y medianas empresas (PyMES) que procesan menos de 10 mil litros de leche por día. Específicamente en Argentina, Brasil, Colombia y Uruguay se estima que anualmente se generan alrededor de 17 mil millones de litros de suero provenientes de estas empresas (Tabla 1.6), constituyendo una importante fuente nutricional ya que en su composición incluye un completo perfil de minerales, proteínas de alto valor biológico y una fuente significativa de hidratos de carbono para la población (Juliano y col., 2017).

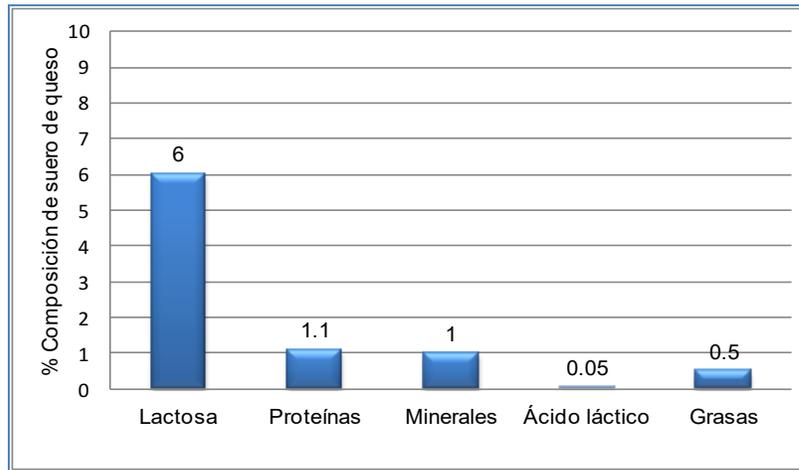
**Tabla 1.6. Producción anual de leche y suero a alimentación animal o vertido al medio ambiente en países seleccionados periodo 2012-2013, Juliano y col., (2017)**

País	Producción anual de leche (millones de litros por año)	Producción de queso (% del total de leche)	Suero generado (millones de litros por año)	Estimado de suero destinado a alimentación animal o vertido efluente (% estimado)
<b>Argentina</b>	11.338	41	4.015	55
<b>Brasil</b>	33.400	38	10.500	49
<b>Colombia</b>	6.772	35*	2.033	70
<b>Uruguay</b>	2.100	35	625	20

\*formal e informal

El principal problema medioambiental que se genera durante la elaboración de quesos está vinculado a la producción de lactosuero. Su contenido de lactosa y proteínas aumenta el grado de contaminación de las aguas residuales. Por esta razón es importante minimizar el vertido de lactosuero junto con el resto de las aguas residuales (INTA EEA Chubut, 2016; RSA CONICET, 2019; CAR/PL, 2002).

En la Figura 1.22 se encuentran los principales componentes del suero de queso. Los efluentes provenientes de la industria láctea constituyen una fuente importante de contaminación orgánica de aguas superficiales, dichos efluentes poseen diferentes características de acuerdo con el producto final obtenido (yogur, leche, queso, manteca helados, etc.) y las condiciones de operación, clima y tipos de limpieza.



**Figura 1.22. Composición del efluente de suero de queso. Sobre cada barra se indica el porcentaje promedio de cada componente; el porcentaje de agua es de 92%. Fuente: Instituto de Tecnología Industrial**

Entre los parámetros clave para la caracterización de estas aguas residuales se encuentran la DBO y DQO; en la Tabla 1.7 se puede observar los parámetros fisicoquímicos del suero de queso. El índice de biodegradabilidad (DBO5/DQO) se encuentra entre 0,4 a 0,8.

**Tabla 1.7. Propiedades fisicoquímicas del suero de queso. Adaptado de Diamantis y Aivasidis, (2018)**

Parámetros	Suero de queso
pH	3,86
DQO total (mg/L)	53850
DQO soluble (mg/L)	51480
Ácidos grasos libres (mg/L como acético)	970
Fosforó total (mg/L)	530
PO <sub>4</sub> -P (mg/L)	540
Nitrógeno total kjeldahl (mg/L)	250
Relación dqo:ntk:p	100:0.46:0.98
NH <sub>4</sub> -N (mg/L)	89
Ca <sup>2+</sup> (mg/L)	790
Mg <sup>2+</sup> (mg/L)	110
K <sup>+</sup> (mg/L)	1300
Na <sup>+</sup> (mg/L)	3300

Las aguas residuales se generan durante la limpieza de tanques, pasteurizadores, bachas de cuajado, limpieza de superficies y servicios del personal. El volumen de agua residual vertida por la industria lechera se estima en 1-2 litros por litro de leche procesada. En la Tabla 1.8 se evidencia como 1000 litros de lactosuero generan aproximadamente 68 kg de DQO y cerca de 35 kg de DBO. Siendo esta fuerza contaminante equivalente a la de aguas negras producidas en un día por 500 personas (INTI, 2017).

**Tabla 1.8. Características del vertido de suero de queso**

<b>Producción (L de lacto suero)</b>	<b>DQO (Kg)</b>	<b>DBO (Kg)</b>	<b>Equivalente a las aguas negras producidas en un día por personas</b>
1000	68	35	500

**Fuente: Instituto Nacional de Tecnología Industrial 2017**

### **1.13 Tratamiento de aguas residuales de industria láctea**

Como se mencionó en la Sección 1.11.2 en el 2018 se calculó una producción aproximada de 3.937 millones de litros de suero por año en Argentina. A partir de estos datos se puede apreciar la importancia de tomar conciencia de la gravedad del problema generado por la producción láctea y emprender acciones con el fin de trabajar sobre dichos efluentes y así tratar de disminuir el impacto producido sobre el ambiente. En el pasado las aguas residuales de industria láctea se descargaban directamente a cuerpos de agua (ríos, lagunas) sin un tratamiento previo. Otra alternativa consistía en la descarga de las aguas residuales a la red de alcantarillado municipal y el posterior tratamiento en plantas de tratamiento biológico municipales. Sin embargo, incluso los efluentes diluidos pueden afectar la eficiencia y la estabilidad de los microorganismos en la planta de tratamiento (Gannoun y col., 2008). Por ello, el tratamiento de aguas residuales de la industria láctea se ha convertido en un reto importante para las pequeñas y medianas empresas que deben ajustarse a las normas de vuelco vigentes. El tratamiento de efluentes en planta es la estrategia más común para la purificación de aguas residuales lácteas (Britz y col., 2006). Por lo general, incluye métodos mecánicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos.

#### **1.13.1 Tratamiento mecánico**

El tratamiento mecánico elimina los sólidos en suspensión de las aguas residuales. Los procedimientos mecánicos convencionales no reducen la carga orgánica debido a la baja concentración de sólidos sedimentables en las aguas residuales de la industria láctea (Rosenwinkel y col., 1999).

#### **1.13.2 Tratamiento fisicoquímico**

Los tratamientos fisicoquímicos destruyen y reducen la grasa de la leche y los coloides proteicos en las aguas residuales de la industria láctea (Nadai y col., 2010). Estos tratamientos tienen como objetivo eliminar la carga orgánica hasta cierto punto. El éxito de

estos métodos depende de la eficacia de la formación de precipitados específicos de suero de queso, como proteínas y grasas, con compuestos químicos como sulfato de aluminio, cloruro férrico y sulfato ferroso (Karpati y col., 1995). La flotación de aire disuelto reduce la carga orgánica a través de la desestabilización de coloides de proteínas siendo más eficiente cuando se combina con coagulantes y floculantes. Sin embargo, este método requiere productos químicos costosos que causan problemas ambientales y eliminan la materia soluble en menor grado (Grupta y Ako, 2005). La espuma resultante es muy difícil de deshidratar y no se recomienda mezclarla con lodos activados.

### **1.13.3 Tratamiento biológico**

Uno de los métodos más fiables para la purificación de efluentes lácteos es el tratamiento biológico. Dichos métodos pueden eliminar todos los componentes de las aguas residuales lácteas. Además, debido a su ilimitada adaptación, pueden usarse conjuntamente en varias secuencias para lograr la remoción de diferentes compuestos (Kolev, 2017). La mayoría de los estudios de tratamiento de aguas residuales de industria láctea se han llevado a cabo por biodegradación tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Gutiérrez y col., 1991; Frigon y col., 2009; Rivas y col., 2010). En general, los procesos biológicos son muy efectivos en la remoción de los compuestos orgánicos, llegando a remover hasta el 90% de la DQO (Janczukowicz y col., 2008).

#### **1.13.3.1 Procesos aeróbicos**

La mayoría de las plantas de tratamiento de aguas residuales lácteas son aeróbicas. En estos sistemas la biodegradación de proteínas genera aminoácidos y amonio, los cuales son utilizados como fuente de carbono y nitrógeno por los microorganismos presentes en los lodos activados. Sin embargo, ciertas proteínas presentes en la leche, tales como la caseína, son resistentes a la biodegradación y por esto se requieren microorganismos que hayan sido previamente adaptados (Rivas y col., 2010). Los principales problemas de los sistemas aeróbicos son alta producción de biomasa, escasa actividad a bajas temperaturas, producción de bulking filamentoso que disminuye la sedimentación del lodo (Cordi y col., 2007; Donkin, 1997). Además, se necesitan realizar altas diluciones del efluente y los tiempos de residencia hidráulica son elevados (Rivas y col., 2010). Se necesitan algunos meses para la adaptación del lodo antes de que se alcance la plena capacidad operativa. Las bacterias aeróbicas son menos útiles en la utilización de coloides en

comparación con las bacterias anaeróbicas. El alto consumo de  $O_2$  en los procesos aeróbicos requiere grandes demandas de energía durante el tratamiento de aguas residuales de la industria láctea (Kolev, 2017). La relación óptima DQO/N/P en procesos aeróbicos es aproximadamente 100/5/1 (Prazeres y col., 2012).

### **1.13.3.2 Procesos anaeróbicos**

Debido a la baja alcalinidad y la concentración de materia orgánica fermentable del agua residual láctea, se generan muchas dificultades en el sistema debido a que el proceso de acidificación ocurre de forma excesivamente rápida (Kolev, 2017) a causa de la fermentación de la lactosa a ácido láctico y en menor medida algunos ácidos como propiónico, butírico o acético. Por otro lado, se necesitan largos periodos de adaptación de la biomasa antes de que puedan utilizar proteínas y grasas. La presencia de grasas genera problemas de flotabilidad y lavado de la biomasa microbiana (Rivas y col., 2010). El rápido descenso del pH debido a la gran cantidad de ácidos producidos por la fermentación promueve el crecimiento de bacterias acetogénicas, generando la inhibición de bacterias productoras de metano (Prazeres y col., 2012; Ranalli y col., 1995). Los sistemas anaeróbicos tienen menor consumo de energía, son relativamente simples, la producción de biomasa bacteriana es relativamente baja en comparación con los tratamientos aeróbicos y tiene lugar la producción de metano, el cual puede ser usado en algunos procesos productivos (Kolev, 2017; Arvanitoyannis y Giakoundis, 2006). La relación óptima DQO/N/P en procesos anaeróbicos es aproximadamente 500/5/1 (Prazeres y col., 2012).

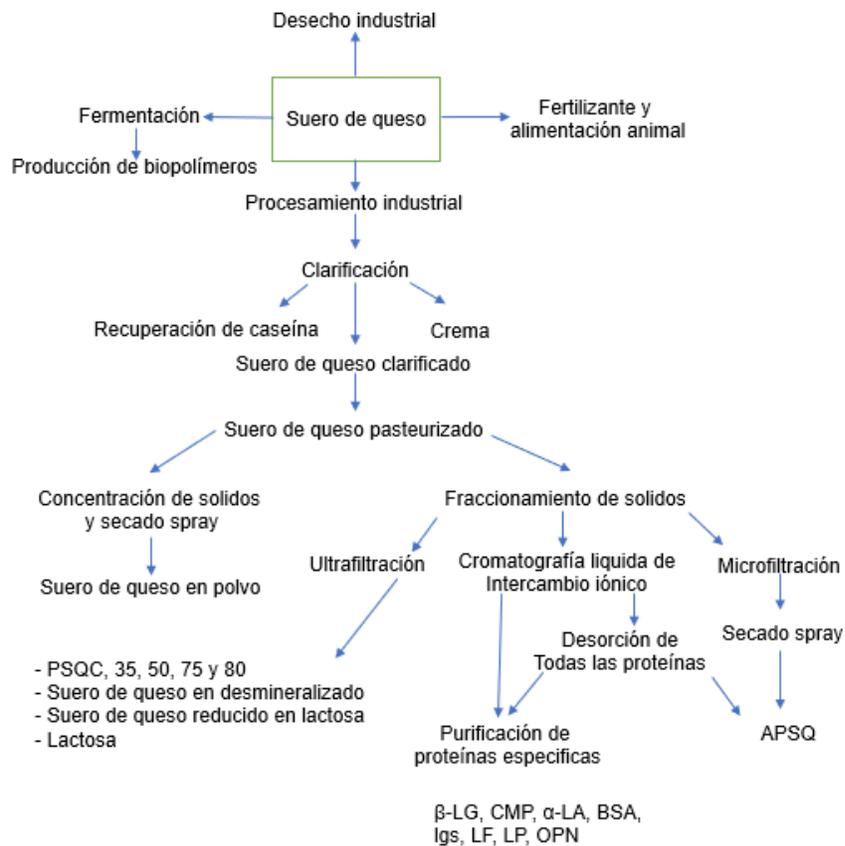
### **1.13.3.3 Procesos combinados (anaeróbicos-aeróbicos)**

La mayoría de los tratamientos biológicos se llevan a cabo con tiempos de residencia hidráulicos ( $\theta_H$ ) elevados de hasta 8 días. Sin embargo, se puede reducir el  $\theta_H$  por medio de la combinación de fases de degradación anaerobia-aerobia o la aplicación de pretratamientos como procesos de coagulación-floculación (Rivas y col., 2010) o precipitación alcalina (Rivas y col., 2010). Debido a que los tratamientos anaeróbicos reducen principalmente los contaminantes que contienen C y tiene un efecto más débil en la eliminación de otros nutrientes, debe considerarse solo como un paso preliminar el cual puede complementarse incorporando un paso aeróbico local (Nadais y col., 2010). En comparación con otros sistemas biológicos como lagunas aireadas o lagunas de estabilización, el sistema de lodos activados posee la ventaja de una elevada eficiencia de

remoción, instalación en espacios reducidos, las cuales se consiguen gracias a una elevada concentración de microorganismos en el reactor. Estas características lo constituyen como una opción viable y eficiente en el tratamiento de aguas residuales de industria láctea.

### 1.14 Aprovechamiento y recuperación de componentes de interés del Suero de queso

El lacto suero es un subproducto de la industria láctea y del queso, constituye la porción acuosa después de la separación de la grasa y las caseínas de la leche entera. El suero de queso es un material sobrante que se produce en volúmenes casi iguales a la leche procesada en las queserías, por lo que sería interesante aprovecharlo.



**Figura 1.23. Productos que pueden ser obtenidos del suero del queso. PSQC: Proteína de suero concentrada, APSQ: Aislado de proteína de suero de queso, β-LG: β-lactoglobulina, CMP: caseino-macropéptido, α-LA: α-lactoalbúmina, BSA: seroalbúmina bovina, Igs: inmunoglobulinas, LF: lactoferrina, LP: lactoperoxidasa, OPN: osteopontina. Tomado de Urtasun y col. (2018).**

Su enorme demanda bioquímica de oxígeno se debe principalmente a su alto contenido en lactosa; Durante los últimos años, las cantidades de suero aumentaron hasta

tal punto que no pueden utilizarse simplemente como alimento para animales como la aplicación más común. Para superar estos problemas, una alternativa sostenible es convertir el suero y sus derivados en un recurso para muchos productos industriales de valor agregado (Figura 1.23), haciendo del suero no solo un desperdicio sino también un recurso valioso (Koller y col., 2012).

**Proteínas del suero de queso:** La mayoría de las proteínas presentes en el suero de queso presentan actividades biológicas y efectos fisiológicos tales que son consideradas compuestos con propiedades funcionales, debido a que ejercen un rol beneficioso (o preventivo de enfermedad crónica) sobre el estado de salud y bienestar (Krissansen, 2007).

**Tabla 1.9. Propiedades funcionales y usos de las proteínas del lactosuero. Adaptado de Ramchandran y Vasiljevic, (2013)**

<b>Tipo de componente</b>	<b>Componentes individuales</b>	<b>Propiedades</b>	<b>Usos</b>
<b>Proteínas mayoritarias</b>	-Lactoglobulina	Estabilizante de espumas	Confitería, panadería, embutidos
	-Lactoalbúmina	Propiedades gelificantes	Formulas infantiles y nutraceúticos
	Seroalbúmina bovina	Espesante	Productos como merengue
	Inmunoglobulinas	Emulsionante	Alimentos funcionales
		Enlaces con lípidos	
		Composición por receptores glicosilados	
		Efecto inmunoregulatorio	
<b>Proteínas minoritarias</b>	Lactoferrina	Actividad antimicrobiana	Farmacéutica
	Lactoperoxidasa	Efecto bactericida	Formulas infantiles
	Factores de crecimiento (GFs)	Promotores de utilización de hierro	Aplicaciones nutraceúticas
	Péptidos bioactivos	Actividad antihipertensiva	Ingredientes bioactivos en suplementos alimenticios
	Caseinmacropeptidos	Actividad antitrombótica, antienvjecimiento	Cuidado de la piel y salud bucal

Muchas de estas proteínas, una vez que son parcialmente digeridas por distintas enzimas, dan lugar a péptidos bioactivos con mejores y nuevas actividades fisiológicas. Estas características brindan a la industria láctea y al mercado de ingredientes nuevas posibilidades basadas en el desarrollo de nuevos productos como bebidas direccionadas al creciente sector de la alimentación funcional (Tabla 1.9) (Sabokbar y Khodaiyan, 2015). Asimismo, la funcionalidad de las bebidas a base de suero también se puede mejorar mediante la incorporación de ingredientes bioactivos y funcionales como probióticos, fibra dietética, vitaminas, minerales, etc. (Smithers, 2015). A continuación, se sintetizan las

propiedades funcionales y usos de las proteínas de lactosuero:

**Proceso de fermentación:** El suero contiene una cantidad apreciable de lactosa que puede ser fermentada por bacterias del ácido láctico. Este componente de lactosa hace que el suero sea apto para la preparación de bebidas fermentadas. El suero dulce se utiliza generalmente para fines de fermentación. El proceso de fermentación a través de cepas específicas de bacterias hace que la bebida de suero sea más funcional debido a la producción de péptidos bioactivos durante la fermentación (Brandelli y col., 2015). El suero también se puede utilizar en el yogurt bebible que es un producto lácteo fermentado de leche, pudiéndose reemplazar la porción de leche en estas bebidas por el suero lácteo. La fermentación de los componentes del suero y el suero también se ha estudiado utilizando granos de kéfir y se informó que es un proceso viable para la preparación comercial (Sabokbar y Khodaiyan, 2015).

### **1.15 Producción de PHA utilizando suero de queso, subproducto de la industria láctea**

La producción industrial de PHA se basa principalmente en el uso de cultivos puros bajo condiciones de esterilidad y empleo de fuentes de carbono puras (Serafim y col., 2008). El uso de cultivos mixtos, como el caso de lodos activados, y de efluentes ricos en carbono permiten reducir los costos de producción de PHA (Dai y col., 2007).

El uso de desechos industriales como sustrato es una estrategia prometedora dada su disponibilidad y bajo costo. La industria láctea, entre otras, genera aguas residuales con alto contenido de carbono. Su alto costo de disposición genera la necesidad de buscar alternativas eficientes para su aprovechamiento.

La producción de PHA a partir de estos efluentes reduce considerablemente los costos de producción, sin competir con la producción de alimentos y al mismo tiempo resuelve un problema ambiental (Amaro y col., 2019).

El uso de cultivos puros es asociado con mayores rendimientos de producción de PHA en comparación con los cultivos mixtos, a pesar de esto los cultivos mixtos pueden trabajar bajo condiciones no estériles y ser capaces de adaptarse a sustratos complejos de residuos industriales (Bosco y col., 2018). Sin embargo, no se recomienda la producción directa de PHA a partir de efluentes ricos en carbohidratos utilizando cultivos mixtos

(Moralejo-Gárate y col., 2011). Al respecto, la mayoría de los estudios implementa un primer paso de fermentación, a fin de convertir los carbohidratos en ácidos grasos volátiles (AGVs), los cuales son posteriormente utilizados en la producción de PHA (Serafim y col., 2008).

La producción de PHB comercial a partir de suero lácteo tanto en polvo como permeado se ha estudiado a partir de la hidrólisis de la lactosa, transformada en glucosa y galactosa, para en un siguiente paso de glicolisis producir piruvato. Esta molécula es entonces transformada en acetil CoA y posteriormente en PHB (Albuquerque y col., 2011; Gumel y col., 2013, Carletto, 2014).

La producción de PHA mediante la fermentación acidogénica del suero de queso para producir AGV empleando cultivos mixtos es otra vía alternativa de producción de PHA. En la primera etapa anaerobia se forman AGV, que luego en una segunda etapa son convertidos en PHA por bacterias acumuladoras de PHA en un proceso aerobio. La composición de los monómeros de los biopolímeros de PHA depende de los tipos de AGV. Los AGV formados por ácido acético y ácido butírico tienden a formar hidroxibutirato (HB), mientras que los AGV compuestos por ácido propiónico y ácido valérico tiende a formar hidroxivalerato (HV). Las propiedades físicas y mecánicas del PHA dependen de la composición del biopolímero. Los PHB son rígidos y quebradizos y con la incorporación de HV para formar un copolímero de (PHB-co-HV) se consigue una mayor elasticidad y flexibilidad (Bengtsson y col., 2008). La incorporación de hidroxivalerato es importante porque reduce la cristalinidad del PHA resultante, es decir reduce la dureza y la fragilidad y se incrementa la flexibilidad (Albuquerque y col., 2011; Martínez-Sanz y col., 2014).

Colombo y col. (2016) observó que la producción y composición del PHA usando cultivos mixtos era distinta al variar la composición del suero lácteo fermentado. En su trabajo usó dos tipos de suero de queso fermentado, uno compuesto de ácidos láctico, acético y butírico en proporción 58/16/26 (% DQO) y otro suero compuesto de ácidos acético, propiónico, butírico, láctico y valérico en proporción 58/19/13/6/4 (% DQO), obteniendo en el primer caso un rendimiento de PHA de  $0.24 \pm 0.02$  mg DQO<sub>PHA</sub>/mg DQO<sub>S</sub>, correspondiente a 60g PHA/kg suero de queso; mientras que en el segundo un rendimiento de  $0.42 \pm 0.03$  mg DQO<sub>PHA</sub>/mg DQO<sub>S</sub>, correspondiente a 70g PHA/Kg suero de queso. También se observó que el PHA obtenido en el primer caso era mayoritariamente 3-hidroxibutirato (HB) mientras que en el segundo caso 40% de 3-HV y 60% de HB.

Duque y col. (2014) estudiaron el efecto del cambio de materia prima sobre el proceso de producción de PHA en cultivos microbianos mixtos, durante un largo tiempo de operación, imitando la variación estacional de la materia prima. El proceso consistió en utilizar suero de queso fermentado en una primera etapa y luego reemplazarlo en un segundo período con melaza de caña de azúcar fermentada. Observaron que los microorganismos acidogénicos asimilan bien el cambio de sustrato dando lugar a diferente perfil de ácidos grasos volátiles, conteniendo ácidos acético y butírico mayoritariamente en el suero de queso fermentado y ácido propiónico y valérico mayoritariamente en la melaza de caña de azúcar fermentada. En este estudio se alcanzó un contenido máximo de PHA para el suero de queso de un 65 % sobre biomasa seca y 56 % con el agua residual de la melaza de caña de azúcar. Para el caso del suero de queso, la composición del PHA (HB:HV, % p/p) fue 81:19 y para la melaza 48:52.

## 1.16 Biodiesel

Los biocombustibles como el biodiesel sirven de fuente de energía renovable para motores. Su uso genera una menor contaminación ambiental y son una alternativa viable al agotamiento de energías no renovables, como el gas y el petróleo. Dentro de este escenario el biodiesel parece ser una alternativa prometedora al diesel de petróleo, el cual es uno de los combustibles más importantes en la sociedad moderna (Barros, 2012). La definición de biodiesel propuesta por las especificaciones ASTM lo describe como “esteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables tales como aceites vegetales o grasas animales, que se emplean en motores de combustión interna” (Figura 1.24).

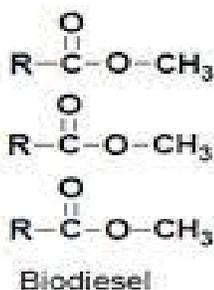


Figura 1.24. Formula general del biodiesel

El aceite vegetal está compuesto principalmente por triglicéridos (o triacilgliceroles), que son ésteres de tres ácidos grasos unidos a un glicerol. Se caracterizan por ser insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos no polares (Lawson, 1994). El biodiesel es una fuente de energía sustitutiva con gran potencial de desarrollo en el país y puede producirse mediante procesos químicos como la esterificación de los ácidos grasos libres (AGL) y la trans-esterificación de los triglicéridos (Annel, 2010) a partir de aceites vegetales como la soja, canola, palma y girasol o subproductos de la industria como grasas animales y aceites vegetales usados (AVUs) (Yin, 2012). El biodiesel se puede usar puro o mezclado con gas-oil; actualmente el biodiesel se usa en varios países en mezclas con diversos porcentajes. En la Argentina la Ley Nacional 26.093 del 2006 establece que se debe agregar un 5% de biodiesel al gas-oil. En el 2013 mediante la resolución 1125/2013 se aumentó a un 10%. El biodiesel presenta infinidad de ventajas respecto del gas-oil derivado del petróleo; entre ellas se pueden mencionar las emisiones. Su combustión no aumenta los niveles actuales de dióxido de carbono en la atmósfera, gas causante del efecto invernadero. Además, puede ser producido en el país, ofreciendo la posibilidad de reducir las importaciones de petróleo, es biodegradable y en relación al gas-oil, sus productos de combustión reducen los niveles de partículas de monóxido de carbono, óxidos de azufre, hollín y bajo ciertas condiciones óxido de nitrógeno (Liu y col., 2004). En el caso de los AVUs que son una materia prima de desecho, permite reciclar un componente parcialmente nocivo para la naturaleza (Marchetti y col., 2007). El empleo de biodiesel es ventajoso sobre todo para el transporte público en las grandes ciudades. Tiene un punto de inflamación relativamente alto (150 °C), lo cual lo hace menos volátil y más seguro para transportar o manipular que el diesel de petróleo. (Krawczyk, 1996).

El biodiesel (ésteres metílicos de ácidos grasos o FAME por sus siglas en inglés (Fatty Acid Methyl Ester)) presenta una volatilidad mucho mayor y una viscosidad mucho menor que la de su correspondiente material graso por lo que es más apto para su uso como combustible. El empleo de residuos de la industria alimentaria, aceites reciclados de baja y alta acidez, conduce al desarrollo de biocombustibles de segunda generación que son aquellos procedentes de materias primas no competitivas con los alimentos. Su ventaja es el aprovechamiento de residuos, que por lo general son de bajo valor económico y constituyen una alternativa viable como materia prima, aunque esto obliga a introducir modificaciones en el diseño del proceso. Su mayor inconveniente radica en que el índice

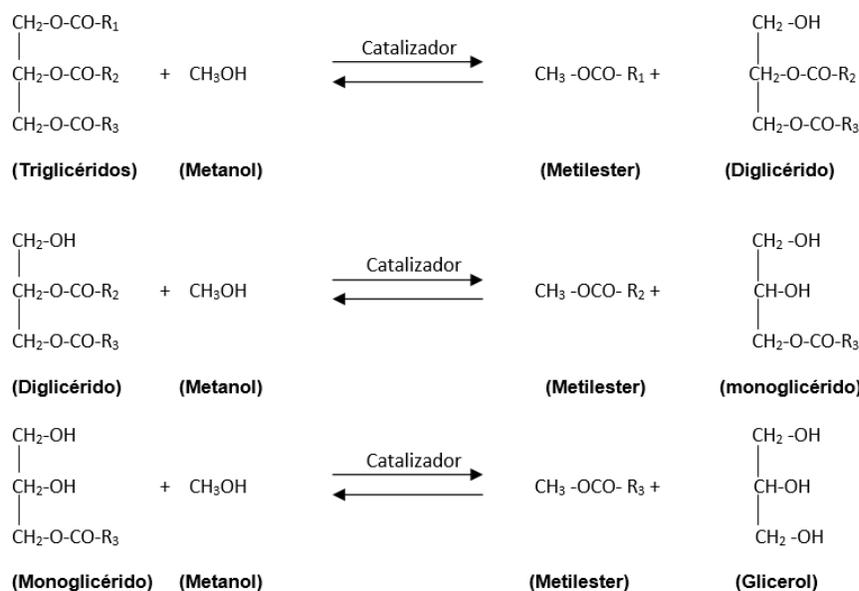
de acidez del AVU es normalmente mayor al 2 %, debido a los procesos térmicos a los cuales es sometido el aceite en presencia de humedad; este fenómeno físico conlleva a la descomposición de los triglicéridos a diglicéridos y monoglicéridos liberando una o dos cadenas de ácidos grasos. En la actualidad se estima una generación de más de 15 millones de toneladas de aceite vegetal usado (Kalam y col., 2011). Esto podría estar asociado con la proliferación de establecimientos de comida rápida a pequeña y gran escala (Cvengros y Cvengrosavá, 2004). Los AVUs son sin duda una fuente de energía rentable y segura, que todavía no se ha explotado en toda su plenitud (Aziz y col., 2012). Su uso como combustible proporciona una gran disminución en los impactos ambientales como la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero, desviación de los residuos de los vertederos y el desarrollo sostenible a través de la conversión de residuos a energía (Papageorgiou y col., 2009). Por otra parte, los costos de producción se ven minimizados al ser una materia prima sin costo o con un valor aproximado de un 60% más bajo que el de los aceites vegetales convencionales (Predojevic, 2008). Zanette y col (2011) y Aziz y col (2012) han detallado las diferentes ventajas de los aceites vegetales usados en la producción de biodiesel. Las materias primas tradicionales que se usan en la producción de biocombustibles como ya se mencionó son aceites refinados de girasol, colza, coco, soja y palma. Sin embargo, su uso para combustible puede cuestionarse ya que estas materias primas se utilizan como alimentos y tienen un alto costo. Yin (2012) plantea que el principal inconveniente del biodiesel de aceites vegetales tradicionales es su valor en comparación con el diesel de petróleo por lo tanto propone encontrar formas de minimizar el costo de producción. Una forma es elegir materias primas más baratas, disminuir la cantidad de catalizador, el consumo de energía y el tiempo de reacción (Uzum y col., 2012).

### **1.16.1 Procesos de producción de biodiesel**

#### **1.16.1.1 Catálisis básica**

Cuando el AVU es de baja acidez (acidez menor al 2%) se desarrolla el proceso tradicional de catálisis alcalina llamado trans-esterificación; es la reacción química más utilizada en la actualidad para la producción de biodiesel a nivel industrial, que involucra triglicéridos y un alcohol en presencia de un catalizador básico, para formar ésteres y glicerina. La transesterificación como se puede evidenciar en la Figura 1.25 implica tres reacciones reversibles y consecutivas, el triglicérido es convertido consecutivamente a diglicérido, seguido por la conversión del diglicérido a monoglicérido y finalmente los

glicéridos se convierten en glicerol liberando un mol de éster en cada paso (Koh y Tinia, 2011).



**Figura 1.25. Etapa de transesterificación. Catálisis básica (Melo, 2006)**

Generalmente se utilizan como catalizadores básicos en la transesterificación hidróxido de potasio o de sodio; el hidróxido de potasio es más soluble en alcohol que el hidróxido de sodio, es un producto barato y fácilmente disponible. Debido a las diferencias en el peso molecular, se necesita mayor cantidad de KOH que de NaOH para llevar a cabo la reacción, lo cual puede elevar los costos (Matthys, 2003).

Algunos estudios han demostrado que utilizando KOH se obtienen mejores rendimientos de transformación que con NaOH (Tomasevic y Marinkovic, 2003). El alcohol es uno de los principales insumos en la producción de biodiesel y su razón molar con el aceite es una de las variables más importantes que afectan el rendimiento de la reacción de esterificación y transesterificación; éste representa alrededor del 10-15 % de los insumos consumidos. Los alcoholes que más comúnmente se utilizan para la producción de biodiesel son el metanol y el etanol.

Se pueden utilizar otros alcoholes como: propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, pentanol e isopentanol (Lang y col., 2001). La reacción de transesterificación se da en tres pasos (Figura 1.25). El primer paso es la reacción del átomo de carbono del grupo carbonilo con el anión del oxígeno del alcohol, formando un intermediario tetraédrico, dando lugar a

un metil ester y el anión correspondiente de los diglicéridos. Otro ciclo catalítico se inicia cuando el catalizador reacciona con una segunda molécula de alcohol, protonando el correspondiente oxígeno del ácido para luego formar, diglicéridos y monoglicéridos (Figura 1.26). Finalmente, por un proceso similar al mencionado se convertirán en metil esteres y glicerol (Koh y Tinia, 2011).

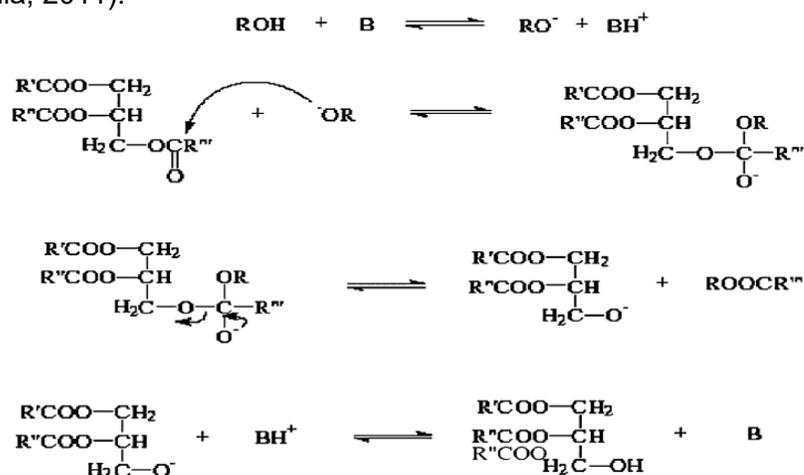


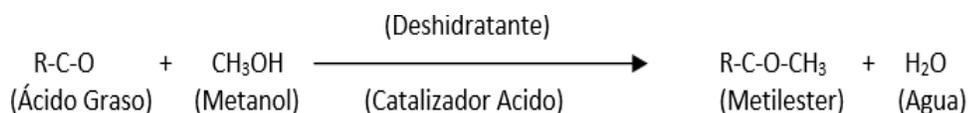
Figura 1.26. Reacción de transesterificación (Kho y Tinia, 2011)

### 1.16.1.2 Catálisis ácida

En el caso que los AVUs presenten índices de acidez mayores a 2 % se requiere la puesta a punto de un proceso en dos etapas, una catalizada por ácidos y otra por álcalis. Esto se debe a que los catalizadores básicos se pierden fácilmente como tales al participar en la reacción debido a la presencia de ácidos grasos libres (AGL) y de agua, que finalmente favorece la formación de jabones y la pérdida de rendimiento. Por este motivo, este tipo de materia prima no puede someterse a las reacciones clásicas de catálisis alcalina y a la vez lograr altos rendimientos. Para este tipo de materias primas se deberá realizar una esterificación previa a la trans-esterificación; este proceso evitará el desarrollo de jabones en la catálisis básica y garantizará el aumento en el rendimiento de los FAME.

La reacción de esterificación se basa en poner en contacto un alcohol con los ácidos grasos libres del aceite en presencia de un catalizador ácido que generalmente es ácido sulfúrico concentrado. Esta reacción pasa por un ataque nucleofílico del oxígeno de una molécula del alcohol al carbono del grupo carboxilo; el protón migra al grupo hidroxilo del ácido que luego es eliminado como agua (Figura 1.27). El rol del catalizador es el de

aumentar la actividad carbonílica (la carga parcial positiva sobre el átomo de carbono) por protonación de uno de los oxígenos del ácido. Esta etapa puede ser compleja y requerir más de un paso de reacción de acuerdo a la acidez inicial de la materia prima. Finalizada la esterificación se obtiene un aceite de baja acidez y se procede a realizar la segunda etapa del proceso (catálisis básica o transesterificación) (Koh y Tinia, 2011).



**Figura 1.27. Etapa de esterificación. Catálisis ácida (Melo, 2006)**

El catalizador utilizado en el proceso de esterificación generalmente es el ácido sulfúrico concentrado como se explicó previamente; el ión sulfato procedente del ácido sulfúrico se combina con el ión sodio procedente del hidróxido en la segunda etapa para formar sulfato de sodio, que es una sal soluble en agua que se separa del biodiesel durante el lavado.

El proceso se lleva a cabo en un reactor donde se producen las diferentes reacciones y las posteriores fases de separación, purificación y estabilización, como lo han evidenciado diferentes autores (Refaat, 2010; Singh, y Singh, 2010; Enweremadu y Mbarawa, 2009; Gerpen, 2009).

### **1.17 Glicerol crudo (GC) subproducto del biodiesel**

El agotamiento de los combustibles fósiles, así como una preocupación medioambiental por las emisiones de gases contaminantes como CO, CO<sub>2</sub>, SO<sub>x</sub> y NO<sub>x</sub> asociados a la quema de hidrocarburos como gasolina han generado políticas de cambio climático y protección medioambiental, permitiendo el desarrollo de energías renovables, así como biocombustibles líquidos siendo uno de los más importantes el biodiesel. Por lo tanto, se han llevado adelante políticas donde se establece realizar el corte del gas-oil para motores diesel con dicho biocombustible, tal como lo establece la legislación, tanto a nivel nacional como internacional, especialmente en la Unión Europea y Estados Unidos (Cardeño y col., 2011). Este hecho es lo que impulsa una producción de biodiesel que está en continuo crecimiento. En la actualidad, el corte obligatorio de Biodiesel en el Diesel fósil

es de 10 %. Todas estas determinaciones son establecidas por la Secretaría de Energía de la Nación referencia ley 2006. El aumento en la producción de biodiesel ha ocasionado un aumento significativo en la cantidad mundial de glicerol crudo, subproducto principal del proceso de producción. Este exceso de glicerol ha incentivado la búsqueda de nuevas aplicaciones que lo transformen en productos valiosos.

En el proceso de producción de biodiesel se genera aproximadamente un 10% (v/V) de glicerol crudo como el principal subproducto (Silva y col., 2009; Moita y col., 2014). La composición del glicerol crudo varía principalmente con el tipo de catalizador utilizado para la producción de biodiesel, la eficiencia de la transesterificación (Posada y col., 2011), la eficiencia de recuperación del biodiesel y la cantidad de impurezas presentes como el alcohol utilizado (Yang y col., 2012). Generalmente el glicerol crudo tiene entre 38 y 96% de glicerol, entre el 0,1-25% de metanol, un remanente de agua y pequeñas cantidades de sal, jabones, así como ácidos grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos (Hansen y col., 2009; Ashby y Solaiman., 2011; Zhu y col., 2013; Wen y col., 2021). El GC se puede someter a destilación fraccionada para obtener glicerina grado técnico (Uso industrial) o glicerina refinada grado USP (United States Pharmacopeia), que para ser aceptada en el mercado debe cumplir las normativas de la FCC (Food Chemicals Codex) y la FDA (Food and Drug Administration).

Debido a que se proyecta un aumento en la demanda de biodiesel, el aprovechamiento de la glicerina se convierte en un tema de suma importancia, puesto que con ello se mejora notablemente la economía global del proceso de producción de biodiesel. La glicerina tiene diversas aplicaciones industriales, por ejemplo, en la fabricación de resinas alquídicas, como plastificante en adhesivos y para la fabricación de explosivos (Shahidi, 2005). También algunos autores emplean la glicerina cruda proveniente de la producción de biodiesel para la síntesis de mono y diglicéridos (Echeverri y col., 2011), aplicaciones como su uso en aditivos oxigenados para combustibles como triacetina (Luque y col., 2008a) y cetales (Giraldo y col., 2009), su uso como reactivo para gasificación y producción de gas de síntesis (Behr y col., 2008). Así pues, el principal desafío que se tiene es la purificación y adecuación de la glicerina para aplicaciones actuales y futuras, de tal forma que su uso sea económico, técnico y ambientalmente viable. Tradicionalmente la glicerina se purifica mediante destilación con alto vacío, el cual es un proceso de alta demanda energética y que produce glicerina de alta pureza (USP) (Thompson y He, 2006;

Aiken, 2006). Sin embargo, una de las aplicaciones prometedoras para el uso de glicerol es la bioconversión a compuestos de alto valor mediante fermentación microbiana, debido a que ofrece la oportunidad de obtener productos químicos como propanodiol y acroleína (Mota y col., 2009), hidroxipropionaldehído, 2,3-butanediol, 1,3-propanediol, ácido succínico, etanol, xilitol, ácido propiónico, hidrógeno y polihidroxialcanoatos (PHAs) entre otros (Silva y col., 2009).

### **1.18 Producción de PHA utilizando glicerol, subproducto en el proceso de producción de biodiesel**

La producción de biodiesel ha aumentado en muchos lugares en el mundo, provocando una caída en el precio del glicerol como subproducto. El glicerol crudo puede ser usado como fuente de carbono para la producción de PHAs, ácido láctico y un amplio rango de intermediarios y productos químicos, lo cual no solo aumenta la rentabilidad de la producción de biodiesel, sino que también se obtienen productos amigables con el ambiente. Existen numerosas cepas microbianas que pueden usar glicerol crudo como sustrato sin necesidad de purificación o desmetanolización para la producción de poliésteres tipo PHA y ácido poliláctico (Chen, 2010).

La producción comercial de PHA usando cultivos puros implica el uso de sustratos puros como glucosa y glicerol. Sin embargo, este método de producción es costoso debido a que se debe trabajar en condiciones estériles (Kleerebezem y Van Loosdrecht, 2007). Los lodos activados como alternativa al cultivo puro han sido ampliamente estudiados para la producción de PHA (Carvalho y col., 2014; Bengtsson y col., 2008; Chua y col., 2003). Los procesos de producción son más económicos y simples porque las técnicas asépticas pueden eliminarse del proceso. En los últimos años, el glicerol crudo ha llamado la atención como fuente de carbono para la producción de PHA, donde los estudios han encontrado que puede usarse sin previa purificación y fermentación (Hawa y col., 2019).

El glicerol crudo es de gran interés como materia prima por su abundancia, potencial aplicación industrial y bajo costo (Valerio y col., 2015; Moralejo-Garate y col., 2011). Según el informe de biocombustibles de junio 2020 de la Dirección de Bioenergía del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Presidencia de la Nación Argentina, las ventas internas de biodiesel en toneladas para el 2017, 2018, 2019 fueron de 1.173.532, 1.099.891 y 1.136.729 respectivamente. Las exportaciones de biodiesel en toneladas para el 2017

fueron de 1.650.119; mientras que en el 2018 fueron de 1.401.317. Las exportaciones de glicerol crudo en toneladas para el 2017 fue de 173.466 y en el 2018 fue de 132.915. Finalmente, la cantidad de glicerina refinada exportada en toneladas para el 2017 fue de 105.685 y para el 2018 fue de 111.178.

## **1.19 Objetivos de la Tesis**

### **1.19.1 Objetivo general de la Tesis**

El objetivo general del presente trabajo de tesis es evaluar la factibilidad de lograr un proceso de producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por lodos activados utilizando un proceso biológico aeróbico de dos etapas. Se utilizará una etapa de selección de bacterias acumuladoras de PHA, en reactor batch secuencial (SBR) bajo régimen de alimentación “Feast”/Famine”, seguido de una etapa de producción en reactor batch.

Para ello se diseñaron dos reactores tipo SBR operados en simultáneo, uno de ellos alimentado con un efluente sintético basado en suero de queso, mientras que el otro, alimentado con glicerol crudo, subproducto de la producción de biodiesel, como fuentes de carbono y energía. Los efluentes fueron suplementados con sales inorgánicas de nitrógeno y fósforo y micronutrientes. Seguidamente se utilizó un reactor batch, limitado en nitrógeno y fosforo o limitado en oxígeno, para cada fuente de carbono estudiada.

### **1.19.2 Objetivos específicos**

Se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Diseño y puesta en marcha de un reactor de cargas secuenciales (SBR) para el proceso de selección de bacterias acumuladoras de polihidroxialcanoatos.
- Determinar las mejores condiciones operativas de sistema de selección para obtener un cultivo rico en bacterias acumuladoras de PHA.
- Diseñar y realizar la puesta en marcha de un reactor batch para el proceso de producción de PHA.
- Evaluar las diferencias entre sistemas de producción limitado en nutrientes y limitado en oxígeno.
- Llevar a cabo el proceso de producción de biodiesel a partir de aceite reciclado con el fin de obtener glicerol crudo el cual es usado como fuente de carbono y energía

en el sistema de selección y producción de PHA.

- Caracterizar el polímero obtenido usando suero de queso o glicerol crudo para alimentar el proceso.
- Realizar mezclas poliméricas de polihidroxicanoatos (PHA) con ácido poliláctico (PLA) en diferentes proporciones.
- Caracterizar las matrices individuales y compuestas de PHA: PLA por medio de Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), Calorimetría diferencial de barrido Modulada (MDSC), Difracción de rayos X (DRX), Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y biodesintegración.

## **1.20 Estructura de la tesis**

A continuación, se detallan los contenidos principales de los diferentes Capítulos que fueron desarrollados para cumplir con los objetivos propuestos.

En el Capítulo 2 se exponen los Materiales y Métodos utilizados en la realización del presente trabajo de Tesis.

En el Capítulo 3 se presenta la puesta en marcha del reactor de cargas secuenciales (SBR) alimentado con suero de queso (subproducto de la industria láctea), para la selección de bacterias con capacidad de acumulación de polihidroxicanoatos (PHA), utilizando como inóculo un cultivo mixto proveniente de un reactor discontinuo alimentado con suero de queso. Se realizaron ensayos preliminares modificando la carga orgánica, duración del ciclo, y tiempos de retención hidráulico y celular con el fin de lograr una etapa de inanición adecuada (< 20%) para la selección de las bacterias acumuladoras de PHA. Una vez que se logró una condición adecuada se realizaron ensayos para encontrar el mejor proceso de extracción del PHA intracelular. Finalmente se llevó a cabo el proceso de producción de PHA en reactor batch en dos condiciones (limitado en nutrientes y limitado en oxígeno) con lodos activados provenientes de la condición más favorable del proceso de selección. Una vez concluido el proceso de producción se realizó la separación de los restos celulares por centrifugación, secado al vacío de los restos celulares, extracción, lavado y purificación del polímero. Finalmente se cuantificó el polímero por espectrofotometría U.V-Visible y se caracterizó por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

En el Capítulo 4 se describe la puesta en marcha del reactor SBR de selección de PHA en el cual se utilizó glicerol crudo (subproducto de la industria del biodiesel). En dicho sistema se introdujeron lodos activados provenientes del reactor SBR de selección de PHA que a su vez fue alimentado con suero de queso, por lo cual la aclimatación a la nueva fuente de carbono se realizó en tres pasos. Inicialmente se partió de una mezcla de suero y glicerol puro (50:50); pasados 4 tiempos de residencia celular se realizó el cambio a 100% glicerol puro y también se mantuvo el sistema por 4 tiempos de residencia celular. Finalmente, el reactor fue alimentado con glicerol crudo. Debido a la dificultad de conseguir glicerol crudo se optó por realizar en nuestro laboratorio la producción de biodiesel con aceite reciclado de alta y baja acidez; el glicerol crudo generado fue utilizado como fuente de carbono y energía en la selección y producción de PHA. Para ello se realizó el pretratamiento al aceite, lo cual involucraba la separación de los restos de comida y eliminación de la humedad. Se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica del aceite reciclado (acidez, índice de saponificación). Una vez que el aceite estuvo en condiciones óptimas se realizó la producción del biodiesel. Finalmente se usó el glicerol obtenido en el proceso para alimentar el reactor de selección de PHA que previamente fue aclimatado con glicerol puro. Una vez realizado el estudio del sistema de selección se procedió a realizar el proceso de producción del polímero en reactor batch. Finalmente se realizó la extracción, lavado y purificación del polímero, el cual fue caracterizado de la misma manera que el polímero obtenido a partir de suero de queso.

En el Capítulo 5 el PHA producido se utilizó para desarrollar mezclas poliméricas. Se combinó PLA grado comercial y el PHA obtenido a partir de suero de queso, estudiando sus características térmicas y microestructurales. Para el desarrollo de las mezclas poliméricas se evaluaron diferentes relaciones de PLA: PHA (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 y 0:100); a las matrices poliméricas obtenidas se les determinó sus propiedades térmicas (temperatura de transición vítrea, entalpía de fusión, porcentaje de cristalización), propiedades microestructurales determinadas por SEM, propiedades cristalinas por difracción de rayos X, barrera al vapor y biodesintegración.

En el capítulo 6 se exponen las conclusiones finales de la tesis.

# **CAPITULO 2**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **Materiales y métodos**

### **2.1 Sistema de producción de PHA**

El sistema de producción de PHA consistió en 2 etapas. La primera de selección de microorganismos acumuladores de PHA, seguida de una etapa de producción de PHA.

#### **2.1.1 Etapa de selección del cultivo mixto productor de PHA**

##### **2.1.1.1 Reactor y condiciones operativas**

Para realizar la selección del cultivo mixto de lodos activados se empleó un bioreactor de cargas secuenciales (SBR, Sequencing Batch Reactor) a escala laboratorio operado en régimen aeróbico. El reactor consistió en un recipiente cilíndrico de polimetilmetacrilato (PMMC) de 5 litros y con un volumen de trabajo de 4,2 litros, el cual fue operado a temperatura ambiente (Figura 2.1).



**Figura 2.1. Rectores de cargas secuenciales (SBRs)**

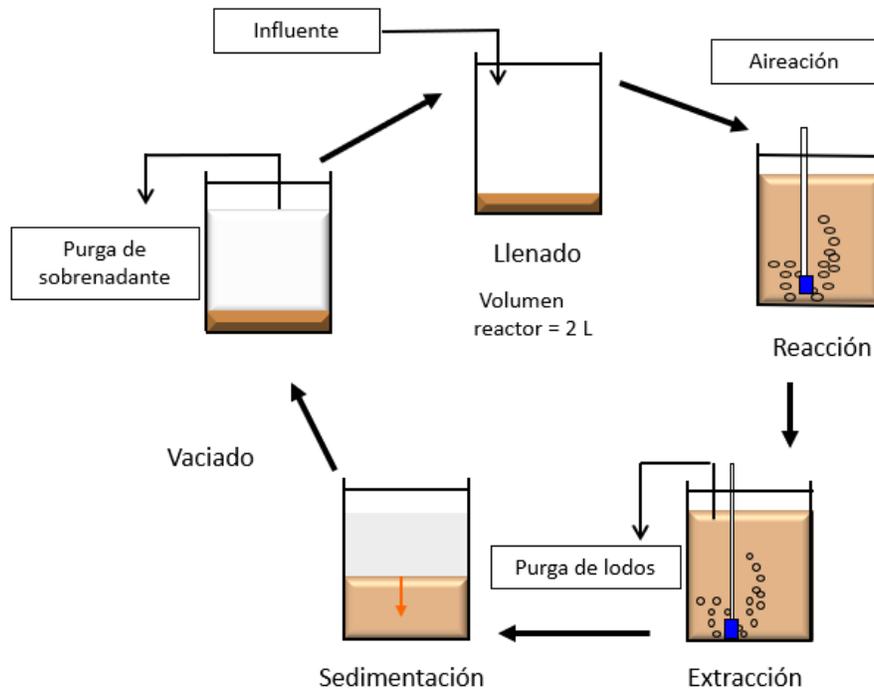
El reactor se operó con sucesivos ciclos que comprenden las siguientes fases

- a) Llenado: el objetivo de esta fase es la adición de sustrato (afluente, agua residual bruta o efluente primario).
- b) Reacción: durante esta fase se completaban las reacciones iniciadas durante la fase

de llenado y tenía lugar bajo condiciones de agitación en aerobiosis.

- c) Extracción: en esta fase se realizaba la purga de lodos.
- d) Sedimentación: el objetivo de esta fase era permitir la separación de los lodos para conseguir un sobrenadante clarificado como efluente secundario.
- e) Vaciado: en esta etapa se realizaba la purga final del sobrenadante.

Durante la fase de reacción aeróbica, el reactor se mezcló con un agitador magnético a velocidad constante de 200 rpm. El suministro de aire se realizó mediante aireadores con difusores porosos, manteniéndose la concentración de oxígeno disuelto por encima de  $4,0 \text{ mgO}_2/\text{L}$ ; el pH no fue controlado, pero se mantuvo alrededor de 8,5. Al final de la fase de reacción se realizaba la purga del licor de mezcla para mantener el tiempo de residencia celular (TRC) de 10 días. La alimentación del sistema se realizó al inicio de proceso. La operación del SBR se esquematiza en la Figura 2.2.



**Figura 2.2. Esquema del reactor de cargas secuenciales (SBR)**

Los lodos activados se sometieron a un régimen de alimentación dinámica aeróbica (ADF, aerobic dynamic feeding), definido por una etapa de disponibilidad de carbono seguido de una etapa de inanición ("feast"/"famine"), para favorecer la selección de

bacterias que acumulen PHA. Este régimen de alimentación es necesario para la selección de un cultivo mixto con capacidad de producción de PHA.

### **2.1.1.2 Agua residual sintética**

Se emplearon diferentes medios de cultivo según la fuente de carbono y energía: suero de queso (100%), glicerol puro (100%), glicerol crudo (100%) y mezclas de suero de queso con glicerol (50/50). Se evaluaron diferentes concentraciones y cargas orgánicas, manteniendo constante la relación DQO:N:P en 100:10:5.

El agua residual sintética con suero de queso presentó la siguiente composición: suero de queso parcialmente hidrolizado (Marca LACTOFOOD, Food S.A., Buenos Aires), sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) como fuente de nitrógeno y sales de fósforo (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Se añadió 1 ml de solución de micronutrientes (Lobo y col., 2013) por 1 L de agua residual sintética. La solución de elementos traza presentó la siguiente composición (g/L): FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 15, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,75, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,15, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0,5, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,15, KI 0,1. El suero de queso presentó la siguiente composición (% p/p): lípidos totales (3%), proteínas totales (12%), lactosa (5%), lactosa hidrolizada (70%), agua (5%) y ceniza (5%). El agua residual sintética para glicerol puro y crudo presentó la siguiente composición: glicerol puro (99% marca Biopack, Sistemas Analíticos S.A, Buenos Aires) o glicerol crudo producido en el CIDCA, sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) como fuente de nitrógeno y sales de fósforo (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Se añadió 1 ml de solución de micronutrientes, descrita previamente, por 1 L de agua residual sintética.

### **2.1.1.3 Inoculación del reactor**

El reactor se inoculó con lodos activados obtenidos de un reactor biológico aerobio semicontinuo a escala laboratorio del CIDCA, el cual estaba alimentado con agua residual modelo de la industria láctea, conteniendo suero de queso como fuente de carbono. Por lo tanto, el sistema biológico fue inicialmente aclimatado a los diferentes efluentes sintéticos y condiciones de operación durante 6 tiempos de residencia celular (TRC).

### **2.1.1.4 Evaluación del funcionamiento de los SBRs**

Se evaluó la estabilidad de cada SBR mediante la determinación de los siguientes parámetros físico-químicos a lo largo de diferentes ciclos: concentración de ortofosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P, mgP/L), concentración de amonio (NH<sub>3</sub>-N, mgN/L), sustrato orgánico como DQO

soluble ( $DQO_s$ , mg/L), velocidad de consumo de oxígeno ( $VCO$ ,  $mgO_2/(L \cdot h)$ ) y concentración de biomasa determinada como DQO ( $DQO_B$ , mg/L).

La presencia de gránulos de PHA intracelular se detectó mediante tinción específica (Sudan Black) y observación microscópica. Mientras que el análisis semi-cuantitativo de PHA intracelular se realizó a los barros activados por medio de FT-IR. Se determinaron los sólidos suspendidos totales y volátiles a partir de muestras tomadas del SBR de selección.

## 2.1.2 Etapa de producción de PHA

### 2.1.2.1 Reactor y condiciones operativas

Se empleó un reactor batch a escala laboratorio, operado en régimen aeróbico. El reactor es un cilindro de polimetilmetacrilato con un volumen de trabajo de 4,2 litros (Figura 2.3), el cual fue inoculado con lodos activados provenientes del SBR de selección en estado estable.



**Figura 2.3. Reactor batch para producción de PHA**

El proceso de producción se llevó a cabo a temperatura ambiente; el pH fue monitoreado y se mantuvo alrededor de 8,5. El sistema fue mezclado por medio de un agitador magnético. El sistema estuvo limitado en nutrientes, mientras que la aireación fue suministrada por medio de aireadores manteniendo la concentración de oxígeno disuelto por encima de  $4 \text{ mgO}_2/L$ . En un segundo ensayo se evaluó el efecto de la limitación de

oxígeno (0,5-1,0 mgO<sub>2</sub>/L) sobre la capacidad de producción de PHA.

### **2.1.2.2 Agua residual sintética y parámetros físico-químicos del reactor batch**

Los diferentes medios de cultivo contenían suero de queso (100%) y glicerol crudo (100%). Los medios de cultivo presentaron concentraciones de N y P 20 veces inferiores a las utilizadas en la etapa de selección y presentaban las siguientes concentraciones de DQO, N y P: 4095 mgDQO/L, 20,45 mgN/L y 10,23 mgP/L respectivamente, resultando una relación DQO:N:P de 100:0,5:0,25. Se trabajó con condiciones limitantes en nutrientes para maximizar la producción de PHA en detrimento del crecimiento microbiano. En el ensayo limitado en oxígeno no se adicionó fuente de nitrógeno ni fósforo.

Para cada sistema batch se determinaron los siguientes parámetros físico-químicos a lo largo de la operación: DQO<sub>S</sub> (mg/L); DQO<sub>T</sub> (mg/L), DQO<sub>B</sub> (mg/L) y PHA.

## **2.2 Determinación del tiempo de residencia celular (TRC) y tiempo de residencia hidráulico (TRH) para los SBRs**

### **2.2.1 Tiempo de residencia celular (TRC)**

TRC se define como el tiempo promedio que las partículas de biomasa permanecen en el reactor antes de ser desechadas (Orozco, 2005).

EL tiempo de residencia celular (TRC, días) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$TRC = \frac{V_r * X}{Pl * X} \quad (2.1)$$

siendo:

V<sub>r</sub>: Volumen de trabajo del reactor (L)

PI : Purga de lodos (L/día)

X : Concentración de biomasa (g DQO<sub>B</sub>/L)

### **2.2.2 Tiempo de residencia hidráulico (TRH)**

TRH es el tiempo promedio que un volumen elemental de agua residual permanece

en un tanque, desde la entrada hasta la salida. El TRH en el reactor es de gran importancia pues define el tiempo promedio durante el cual el sustrato orgánico está sometido a tratamiento (Orozco, 2005). El tiempo de residencia hidráulico (TRH, días) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$TRH = \frac{V_r}{Pl + Ps} \quad (2.2)$$

siendo:

Pl: Purga de lodos (L/día)

Ps: Purga del sobrenadante luego de la etapa de sedimentación (L/día)

## 2.3 Métodos analíticos

### 2.3.1 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) corresponde a la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la fracción de materia orgánica (MO) de una muestra de agua residual susceptible a la oxidación por dicromato ( $Cr_2O_7K_2$ ) en medio ácido. La mayoría de los compuestos orgánicos tanto biodegradables como inertes (no biodegradables) son oxidados completamente:



(naranja)

(naranja/verdoso)

El cambio de color puede ser seguido por un método espectrofotométrico simple y es proporcional al avance de la reacción. En la determinación de la DQO, los compuestos orgánicos son oxidados por el dicromato de potasio en medio ácido (ácido sulfúrico) a 150°C durante dos horas. El ensayo se realiza en presencia de un catalizador, sulfato de plata ( $Ag_2SO_4$ ), para facilitar la oxidación de los compuestos orgánicos. Así, el carbono presente en la mayoría de los compuestos se oxida completamente a  $CO_2$ ; sin embargo, en algunos hidrocarburos aromáticos y piridinas la oxidación puede resultar parcial. La interferencia más común son los iones cloruro, ya que en las condiciones del ensayo los mismos pueden ser oxidados por el dicromato. Para minimizar esta interferencia, la mezcla de reacción contiene sulfato de mercurio ( $HgSO_4$ ). En las condiciones del ensayo, el amonio no puede

ser oxidado y por lo tanto no interfiere en los resultados.

En el presente trabajo de tesis, las determinaciones de DQO se realizaron empleando un kit comercial (Método Hach N° 8000). El método utilizado fue el de digestión orgánica con un rango de medida de 20 a 1500 mg/L DQO (Desviación estándar= 18 mg/L). El procedimiento consistió en la adición de 2 ml de la muestra en tubos de vidrio conteniendo la mezcla de reacción comercial (dicromato de potasio, ácido sulfúrico, sulfato de plata y sulfato de mercurio). Se utilizó un termo-reactor HACH (Figura 2.4) para el tratamiento térmico de las muestras a 150 °C a reflujo cerrado durante dos horas. Posteriormente, los tubos conteniendo las muestras se dejaron enfriar y se determinó la absorbancia a 620 nm con un espectrofotómetro HACH, modelo DR 2800 (Figura 2.5).

Las lecturas de absorbancia fueron convertidas a valores de DQO mediante una curva de calibración incorporada en el equipo.



**Figura 2.4. Termo-reactor HACH**

El valor de DQO total (DQOT) del sistema se determinó utilizando directamente las muestras del licor mixto de los lodos activados obtenidos del reactor biológico. El sustrato orgánico se determinó como DQO soluble (DQOS) utilizando las muestras de licor mixto previamente centrifugadas (13000 rpm, 10 minutos) utilizando una microcentrífuga (Eppendorf modelo 5415C, Figura 2.6) y filtradas mediante membranas de celulosa con tamaño de poro

de 0,45  $\mu\text{m}$  (GE Osmonics). En los casos requeridos se realizaron diluciones adecuadas de las muestras para que las lecturas de absorbancia entren en el rango de medición del método descrito.



**Figura 2.5. Espectrofotómetro Hach DR 2800**



**Figura 2.6. Microcentrífuga**

### **2.3.2 Determinación de la concentración de biomasa como DQO y sólidos suspendidos totales y volátiles**

La concentración de biomasa de lodos activados en los SBRs y reactores batch fue determinada como DQO empleando la técnica propuesta por Contreras y col. (2002). De acuerdo a este método, la DQO correspondiente a la biomasa (DQO<sub>B</sub>) se determina a partir

de la diferencia entre  $DQO_T$  (total) y  $DQO_S$  (soluble).

El valor de la demanda química de oxígeno de la biomasa incluye los aportes correspondientes a la biomasa viable, los sólidos particulados lentamente biodegradables, sustancias particuladas no biodegradables provenientes del agua de desecho a tratar y la materia orgánica particulada generada por la actividad metabólica microbiana en fase endógena (Orhon y Artan, 1994).

La concentración de biomasa expresada como sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) se determinó mediante el siguiente procedimiento:

- 1) Se utilizaron membranas de fibra de vidrio (Osmonics inc.) de 1 micrón de tamaño de poro y 47 mm de diámetro que fueron llevadas a mufla a 550 °C durante 10 min con el fin de eliminar la materia orgánica. Una vez enfriadas a temperatura ambiente se registraba su peso ( $m_0$ , g).
- 2) Un volumen de 35 ml de muestra ( $V_M$ , L) tomado directamente del reactor fue filtrado al vacío, utilizando las membranas previamente secadas y pesadas, con el fin de separar la biomasa del licor mixto.
- 3) Las membranas con la muestra fueron llevadas a estufa a 105 °C durante 24 horas con el objetivo de eliminar el agua remanente. Luego de este periodo, se registró el peso de las membranas ( $m_1$ , g).
- 4) La concentración de biomasa como sólidos suspendidos totales (SST, g/L SST) fue calculada mediante la siguiente expresión:

$$SST = \frac{m_1 - m_0}{V_M} \quad (2.4)$$

- 5) Las membranas con la biomasa previamente pesadas fueron llevadas a la mufla a 550 °C durante 10 min, para volatilizar la fracción orgánica de la muestra, luego se dejaron enfriar y se pesaron ( $m_2$ , g).
- 6) La concentración de biomasa como sólidos suspendidos volátiles (SSV, g/L SSV) fue calculada mediante la siguiente expresión:

$$SSV = \frac{m_1 - m_2}{V_M} \quad (2.5)$$

A partir de las medidas de DQO<sub>B</sub> y SSV se obtuvo una relación lineal, surgiendo un factor de conversión (f<sub>x</sub>) que representa la DQO aportada por unidad de SSV y que depende de los microorganismos y de la composición microbiana de los lodos activados. El factor f<sub>x</sub> fue utilizado para estimar la concentración de SSV a partir de las medidas de DQO<sub>B</sub>.

### 2.3.3 Cuantificación de compuestos inorgánicos solubles de fósforo y nitrógeno

Las concentraciones de ortofosfato y de nitrógeno inorgánico (nitrógeno amoniacal) fueron determinadas, a lo largo del ciclo operativo de cada SBR, por espectrofotometría utilizando reactivos comerciales (Hach Company, Loveland, CO) y el espectrofotómetro Hach modelo DR 2800 (Figura 2.5).

Para ello, se tomaban muestras del reactor, las cuales eran centrifugadas durante 10 min a 13000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf modelo 5415C, Figura 2.6). A continuación, se filtraba el sobrenadante con membranas filtrantes de celulosa con tamaño de poro de 0,45 μm (GE Osmonics). Las muestras filtradas fueron utilizadas para la determinación de los compuestos inorgánicos solubles mediante los métodos espectrofotométricos que se describen a continuación.

#### 2.3.3.1 Cuantificación de ortofosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)

Las concentraciones de ortofosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, mg/L) fueron determinadas mediante el método de molibdo-vanadato. El ortofosfato reacciona con el molibdato en medio ácido para producir un complejo de fosfato/molibdato, que en la presencia de vanadio forma el ácido molibdovanadato-fosfórico de color amarillo. La intensidad del color es proporcional a la concentración de fosfato. La lectura se realiza a una longitud de onda de 430 nm. Para la determinación de ortofosfato se utilizaron las muestras del reactor que fueron previamente filtradas como se detalló en la Sección 2.3.3. Las muestras filtradas (25 mL) se trasvasaban a una cubeta para su determinación espectrofotométrica. En caso de ser necesario se realizaban las correspondientes diluciones, con agua destilada, de la muestra previamente filtrada, con el propósito que la lectura de la absorbancia entre en el rango de medición del método. Paralelamente se utilizaba una cubeta conteniendo 25 mL de agua destilada como

blanco de la muestra. A ambas cubetas se les adicionaba 1 ml de molibdovanadato en medio ácido y se dejaba reaccionar durante 3 min. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se determinaba la concentración de ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ , mg/L) de la muestra mediante el método Hach N° 8114 (Adaptado de Métodos Estándar) a una longitud de onda de 430 nm. Este método presenta un rango de concentración medible comprendido entre 0,3 y 45,0 mg  $\text{PO}_4^{3-}$ /L con una desviación estándar de  $\pm 0,09$  mg  $\text{PO}_4^{3-}$ /L. Finalmente se utilizó el factor de conversión de  $\text{P}/\text{PO}_4^{3-} = 31 \text{ g P}/95 \text{ g PO}_4^{3-} = 0,326$  para expresar los resultados como mg  $\text{PO}_4^{3-}$ -P/L (fósforo como ortofosfato).

### **2.3.3.2 Cuantificación de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3$ )**

El nitrógeno amoniacal fue determinado por el método de Nessler. Este método está basado en la reacción del reactivo de Nessler que contiene una disolución alcalina de yodo-mercuriato potásico ( $\text{K}_2\text{HgI}_4$ ). Dicho compuesto reacciona con el amoníaco formando un complejo de color amarillo. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de amoníaco (Pino, 1983).

El nitrógeno amoniacal fue medido por el método HACH N° 8038, a una longitud de onda de 425 nm, con un rango de medición comprendido entre 0,02 y 2,50 mg  $\text{NH}_3$ -N/L y desviación estándar de  $\pm 0,015$  mg  $\text{NH}_3$ -N/L. Para ello, se tomó la muestra previamente filtrada y se realizó una dilución adecuada colocándose la solución resultante en una cubeta de 25 mL. Paralelamente se utilizó una cubeta conteniendo 25 mL de agua destilada como blanco de la muestra. A continuación, se adicionaba a cada cubeta: 1 ml de reactivo de Nessler (Hach Company, Loveland, CO), 3 gotas de estabilizador mineral para complejar la dureza en la muestra y 3 gotas de alcohol de polivinilo como agente dispersante que ayuda a la formación de color en la reacción. Se dejaba reaccionar durante 1 min. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se determinaba la concentración de nitrógeno amoniacal de la muestra como  $\text{NH}_3$ -N. La técnica fue verificada por determinación de nitrógeno amoniacal de diferentes diluciones obtenidas de una solución estándar de sulfato de amonio.

## **2.4 Determinación de las cargas volumétricas de sustrato orgánico y de nitrógeno y fosforo inorgánicos**

### **2.4.1 Carga volumétrica de sustrato orgánico**

La carga orgánica volumétrica ( $\text{CV}_{\text{DQOs}}$ , mg DQO/(L día)) se puede definir como la

cantidad de sustrato carbonáceo por unidad de volumen que reciben diariamente los microorganismos (Orozco, 2005):

$$CV_{DQOs} = \frac{Q \cdot Cs}{Vr} \quad (2.6)$$

siendo:

Q: Caudal de alimentación del reactor, L/día

Cs: Concentración de sustrato orgánico del agua residual sintética, mg DQOs/L

Vr: Volumen de trabajo del reactor, L

#### **2.4.2 Carga volumétrica de nitrógeno amoniacal**

La carga volumétrica de nitrógeno amoniacal ( $CV_{NH_3-N}$ , mg  $NH_3-N$ /(L día)) se puede definir como la cantidad de nitrógeno por unidad de volumen que reciben diariamente los microorganismos (Orozco, 2005):

$$CV_{NH_3-N} = \frac{Q \cdot CN}{Vr} \quad (2.7)$$

donde CN: Concentración de nitrógeno del agua residual sintética, mg N/L

#### **2.4.3 Carga volumétrica de fósforo**

La carga volumétrica de fósforo ( $CV_P$ , mg P/(L día)) se puede definir como la cantidad de fósforo por unidad de volumen que reciben diariamente los microorganismos (Orozco, 2005):

$$CV_P = \frac{Q \cdot CP}{Vr} \quad (2.8)$$

donde CP: Concentración de fósforo del agua residual sintética, mg P/L.

#### **2.5 Velocidad de consumo de oxígeno**

La velocidad de consumo de oxígeno fue determinada por respirometría utilizando un electrodo de oxígeno (YSI Modelo 58, Figura 2.7). La medición se realizaba en un vaso de precipitado bajo condiciones de agitación magnética suave, sin aireación y a temperatura

ambiente. Inicialmente se introducía el electrodo en el vaso de precipitado, a continuación se procedía a desconectar la aireación y se registraba la disminución lineal de la concentración de OD (mg/L) durante 3-4 minutos, midiéndose la pendiente que corresponde a la velocidad de consumo de oxígeno (VCO,  $\text{mgO}_2/(\text{L h})$ ). También se determinaba la velocidad específica de consumo de oxígeno (VECO,  $\text{mgO}_2/(\text{gDQO}_B \text{ h})$ ) a partir del cociente entre VCO y  $\text{DQO}_B$ .



**Figura 2.7. Electrodo de oxígeno polarimétrico YSI Modelo 58**

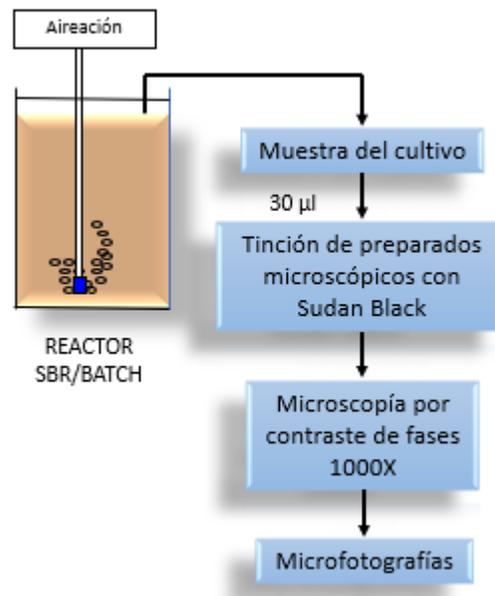
## **2.6 Detección microscópica de los gránulos de PHA**

La detección de gránulos intracelulares de PHA de los SBRs de selección y de los reactores batch de producción se realizó mediante observación microscópica, previa tinción con el colorante lipofílico Sudan Black (Serafim y col., 2002). Se tomaban alícuotas de 30  $\mu\text{L}$  del licor mixto durante el ciclo de operación (Figura 2.8).

Las muestras eran extendidas sobre portaobjetos de vidrio para microscopía ocupando un área rectangular de 6  $\text{cm}^2$  y secadas a temperatura ambiente. Se utilizó una versión ligeramente modificada de la técnica de tinción propuesta por Jenkins (1993). Los preparados fueron teñidos con una solución de Sudan Black, la cual fue preparada en solución hidroalcohólica al 60% V/V con 0,3 % P/V de Sudan Black B(IV) (Anedra). El

colorante tiñe los gránulos intracelulares de PHA de color azul-negro mediante contacto directo durante 10 minutos. Luego los preparados eran lavados con una solución hidroalcohólica al 50% V/V para retirar el exceso de colorante. Con el fin de tener contraste, los preparados se teñían con solución acuosa de safranina T al 0,5% P/V durante 10 segundos y eran enjuagados vigorosamente con agua destilada. La safranina tiñe todas las células de color rosado facilitando la observación de los gránulos intracelulares oscuros de PHA.

Finalmente, los preparados fueron secados, a temperatura ambiente, y observados con un microscopio óptico Leica DMLB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) con cámara fotográfica incorporada (Figuras 2.9 y 2.10).

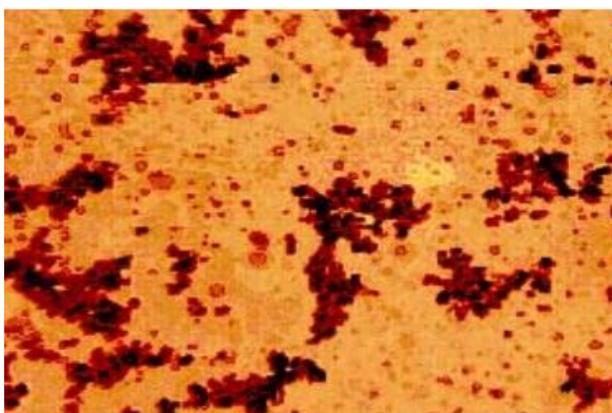


**Figura 2.8. Esquema de la tinción y observación microscópica de gránulos de PHA para reactores SBR y Batch**

Las imágenes microscópicas fueron tomadas bajo iluminación de contraste de fases con un aumento de 1000X. Para la observación por contraste de fases se utilizó una solución de fructosa concentrada en remplazo del aceite de inmersión comercial, ya que este último causa una decoloración del preparado microscópico. En cada muestreo se realizaban dos preparados microscópicos.



**Figura 2.9. Microscopio óptico Leica DMLB**



**Figura 2.10. Micrografía de lodos activados teñidos con Sudan Black Tomada de Munir y col., (2015)**

## **2.7 Extracción y Cuantificación de PHA**

Se evaluaron diferentes métodos de secado de biomasa y extracción de PHA, que se exponen en las siguientes secciones. En el Capítulo 3 se describirá la selección del método más adecuado de secado y extracción y la optimización de las condiciones experimentales.

### **2.7.1 Secado de biomasa**

La biomasa del reactor batch se separaba del licor mixto por centrifugación a una velocidad de 7000 rpm durante 10 min (Beckman Coulter Optima L-100XP, Figura 2.11). El

pellet se lavaba con agua destilada y se volvía a centrifugar; este procedimiento se repetía 3 veces con el fin de garantizar la eliminación de cualquier interferencia con el método de extracción.



**Figura 2.11. Centrifuga Beckman Coulter Optima L-100XP**

Con el fin de determinar el mejor proceso para la eliminar la humedad de biomasa se realizó un estudio utilizando dos métodos:

- **Secado en estufa de vacío:** se basa en el principio de crear vacío para disminuir la presión de la cámara donde se encuentra la muestra por debajo de la presión de vapor de agua haciendo que el agua pase de su estado líquido a gaseoso sin necesidad de un elevado calentamiento (Figura 2.12).



**Figura 2.12. Estufa de vacío ICSA Modelo DZF-6030A**

- **Deshidratación por liofilización:** la deshidratación se realiza en estado congelado mediante la sublimación progresiva del agua presente en la muestra, para lo cual la muestra se lleva a temperaturas por debajo de 0°C. El material congelado se coloca en el liofilizador, donde se genera una presión de vacío lo cual permite que el agua sublime sin necesidad de usar temperaturas altas evitando el daño de algunos compuestos termosensibles (Figura 2.13)



Figura 2.13. Liofilizador Heto-Lab FD4

## 2.7.2 Extracción, precipitación y purificación de PHA

### -Extracción de PHA

La extracción del polímero se realizó usando dos métodos con el fin de determinar cuál de los dos generaba mejores rendimientos. La optimización de los métodos se detallará en el Capítulo 3, Sección 3.8.

-**Método por reflujo:** la extracción por reflujo se define como un proceso de extracción sólido-líquido por medio de un solvente. La extracción del polímero se realiza en un matraz esmerilado donde se deposita la muestra y el cloroformo (solvente). Este proceso se realiza a temperaturas cercanas a la de ebullición del solvente. Para evitar la pérdida del solvente se utiliza un condensador, el cual se encuentra acoplado a la boca del matraz. El condensador es un tubo de vidrio insertado dentro de otro tubo de vidrio, por su parte exterior circula agua en contra corriente lo cual disminuye la temperatura interior del tubo por donde suben los vapores del solvente evitando que escapen; finalmente los vapores son condensados y regresan al balón de reacción (Figura 2.14). Finalmente, la biomasa digerida es separada del cloroformo usando una bomba al vacío acoplada a una membrana de celulosa.



Figura 2.14. Proceso de extracción de PHA por Reflujo

**-Método Soxhlet:** El equipo de extracción por Soxhlet consta de cuatro partes: una manta térmica, un matraz esmerilado donde se calienta el cloroformo (solvente), un sifón el cual contiene la muestra sólida que se encuentra en un dedal de celulosa donde ocurre la extracción y un refrigerante (Figura 2.15). El solvente es calentado en el matraz el cual se evapora ascendiendo por el refrigerante, al disminuir la temperatura el solvente se condensa y cae sobre el dedal; acumulándose en el recipiente que lo contiene hasta quedar completamente lleno, momento en el que el sifón se activa y transfiere el solvente y los compuestos solubles extraídos hasta el matraz, donde se vuelve a calentar y realiza un nuevo ciclo. Debido a que la muestra se encuentra dentro del dedal no es necesario realizar la separación de la biomasa digerida.

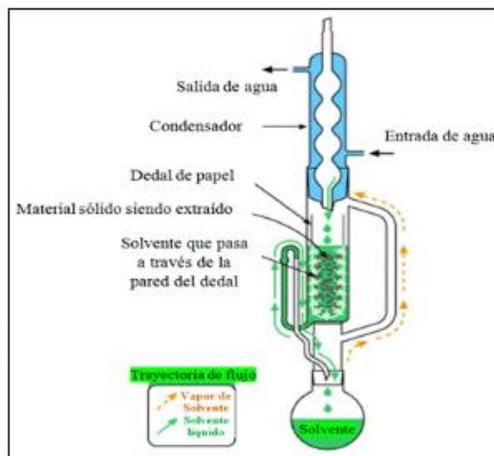


Figura 2.15. Proceso de extracción de PHA por Soxhlet (CIDCA). Esquema de un equipo Soxhlet (Derecha), tomado de: <http://ainstrumental.wikispaces.com/EQUIPO+SOXHLET>

## **-Precipitación y purificación de PHA**

El polímero contenido en el cloroformo, obtenido en ambos procesos de extracción, se precipitaba agregando 8 ml de etanol al 96% frío (4°C) a la solución de cloroformo (2 ml) con agitación constante (Lutke-Eversloh y col., 2001). El PHA se recuperaba por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min utilizando una centrifuga Rolco, Modelo CM 2036 (Rolco S.L.R. Argentina, Figura 2.16). El cloroformo que se encuentra en la parte superior se separó de forma manual del PHA que está precipitado en el fondo.

El cloroformo obtenido no solo contiene PHA, sino que también contiene material soluble en dicho solvente por lo tanto es necesario realizar un proceso de purificación al polímero precipitado. Se procedió a resuspender el PHA precipitado en etanol frío (4°C) al 50%. Luego, el PHA se separaba por centrifugación (3000 rpm, 5 min) en la centrifuga Rolco. El procedimiento de lavado se repetía 3 veces con el fin de garantizar que el polímero resulte lo más puro posible; un proceso similar fue reportado por Lutke-Eversloh y col (2001). Finalmente, el PHA purificado fue secado en un horno de vacío (60 °C, 60 KPa) hasta peso constante.



**Figura 2.16. Centrifuga Rolco. Modelo CM 2036**

### **2.7.3 Cuantificación de PHA, rendimiento y pureza**

La cuantificación de PHA se realizó en un espectrofotómetro UV-Visible DU 650 (Beckman, USA, Figura 2.17), siguiendo una versión ligeramente modificada del procedimiento propuesto por Venkateswar Reddy y col (2012). Para determinar el rendimiento y pureza de PHA total se siguió el protocolo que se detalla a continuación. Se

pesaba 30-35 mg del polímero previamente extraído de los lodos activados, purificado y secado. Se cuantificaba espectrofotométricamente por medio de la técnica de Law y Slepecky (1961). Para esto, se añadía ácido sulfúrico de grado analítico (36 N) al tubo de vidrio conteniendo el polímero hasta 50 ml de volumen final. La mezcla resultante se calentaba a 100°C en un baño de agua durante 10 min. La adición de ácido sulfúrico convierte el polímero en ácido crotonico. La solución se enfriaba y se medía la absorbancia a 235 nm para determinar la concentración de PHA (mg/L). Asimismo, se preparó una curva de calibración utilizando el copolímero grado analítico de poli (3 hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P (3HB-co-3HV)), con un contenido de PHV de 12% molar (Sigma Aldrich, origen natural), sometiéndose al procedimiento de reacción al mismo tiempo que las muestras. Finalmente se analizaban los estándares y las muestras contra un blanco de ácido sulfúrico (Venkateswar y col., 2012).

El rendimiento de PHA se estimó a partir de la relación entre la concentración de PHA y la concentración de biomasa seca (PCS), expresándose como un porcentaje: 100 gPHA/gPCS. La pureza del polímero correspondió a la proporción porcentual de la concentración de PHA y la concentración del material extraído seco después del proceso de purificación del polímero.



**Figura 2.17. Espectrofotómetro UV-VIS Beckman**

## **2.8 Preparación de las mezclas poliméricas**

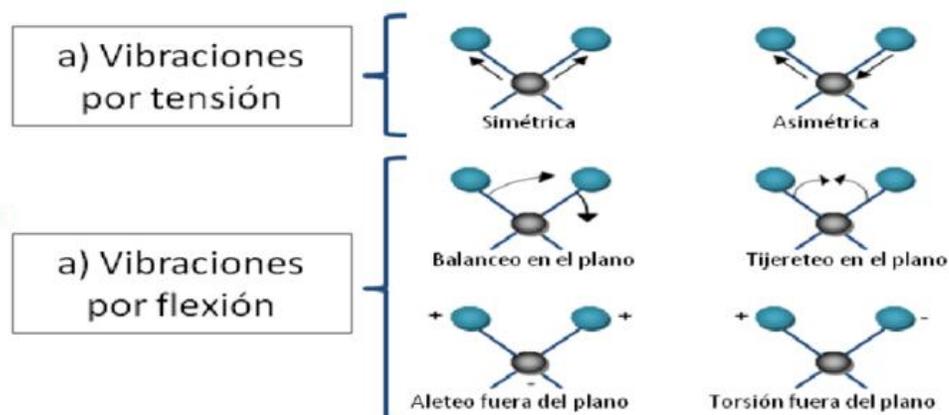
La preparación tanto de las películas individuales como compuestas se realizó

disolviendo el PHA y PLA en cloroformo al 1 y 2% (p/v) respectivamente bajo agitación durante 3 horas (ver capítulo 5).

## 2.9 Caracterización físico-química del polímero

### 2.9.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia de infrarrojo (IR) con transformada de Fourier es una de las técnicas analíticas más importantes y utilizadas debido a que puede emplearse para establecer la identidad de un compuesto (Kumirska y col., 2010). Cada grupo funcional tiene un modo de absorción característico que se presenta en el espectro como un pico o banda y aporta información acerca del tipo de uniones que se establecen cuando se mezclan con otras sustancias. El método se basa en la excitación de los modos de vibración de las moléculas por la absorción de la radiación infrarroja. Durante la excitación es necesaria una variación del momento dipolar de la molécula para que se produzca una absorción en el IR que puede asociarse a vibraciones de tensión (simétricas o asimétricas) o de flexión (Figura 2.18).



**Figura 2.18. Clasificación de los tipos de vibraciones moleculares: de tensión, de flexión.**

Una pequeña muestra se coloca en una celda, donde es sometida a una fuente de luz infrarroja, la cual hace un barrido en un rango de número de onda comprendido entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $400\text{ cm}^{-1}$ . La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra es medida a cada número de onda, lo que permite que la cantidad de luz absorbida por la muestra sea calculada por la diferencia entre la intensidad de la luz antes y después de pasar por la celda de muestra. Esto se conoce como el espectro infrarrojo de la muestra. En algunas

ocasiones las muestras no son lo suficientemente transparentes o delgadas generando saturación en la respuesta por lo tanto se utiliza un accesorio conocido como ATR (Attenuated total reflection) el cual se adapta a cualquier tipo de forma física de la muestra como puede ser polvos, líquidos y sólidos.

### 2.9.1.1 FTIR para muestras de biomasa: análisis semi-cuantitativo de PHA

Los principales grupos funcionales de PHA fueron identificados por espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR). Se usó un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum One FTIR (Perkin-Elmer Inc., Boston, MA, EE. UU.) (Figura 2.19). Las muestras se tomaban a las 0 y 48 h de los reactores batch de producción. Se añadió agua destilada para obtener una misma densidad óptica para todas las muestras. Se distribuyeron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  en celdas de ZnSe. Luego, las muestras se secaron en un horno de vacío hasta que se obtuvo una película transparente y se analizaron en modo de transmisión en un rango de número de onda de  $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ , realizando 64 exploraciones por experimento con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Para evitar la interferencia de las variaciones de biomasa entre las diferentes muestras, los espectros se normalizaron en todo el rango analizado. Se calcularon las áreas de los picos correspondientes al grupo funcional éster ( $\text{C}=\text{O}$ ) del polímero PHA (APHA) y de la banda de amida II (AAm), asociado a las proteínas celulares, los cuales se registraron a  $1745\text{ cm}^{-1}$  y  $1540\text{ cm}^{-1}$  respectivamente.

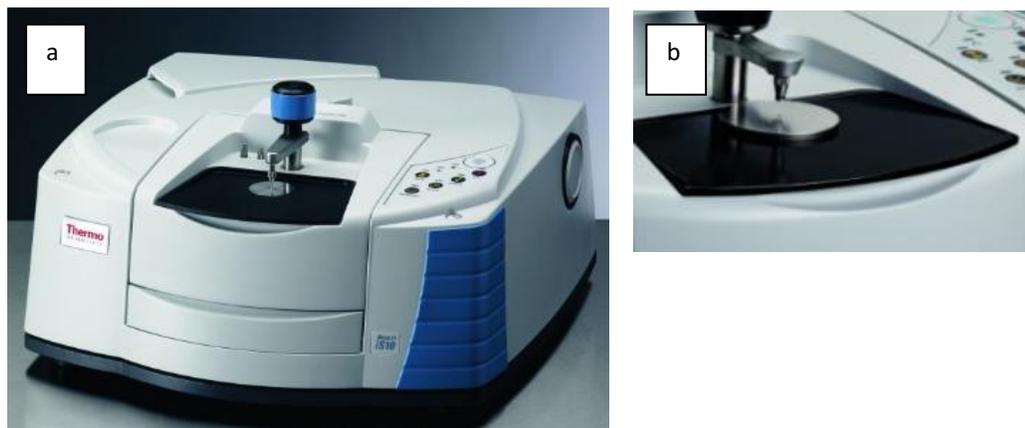


Figura 2.19. Espectroscopio FTIR Perkin Elmer

Se realizó un análisis semi-cuantitativo de PHA de forma similar a lo propuesto por Bosch y col (2008) por medio del valor Alfa ( $\alpha$ ), definido como la relación entre el área del pico asignado al C=O del éster y la banda de Amida II es decir A<sub>PHA</sub>/A<sub>Am</sub>. El análisis del espectro FT-IR se realizó utilizando el software OPUS (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemania), el cual permite la realización de test de calidad y normalización previo al análisis de datos.

### 2.9.1.2 Espectroscopía FT-IR para matrices individuales y compuestas (PHA extraído)

Los espectros de los polímeros individuales y compuestos fueron registrados por un Equipo Nicolet, iS10 Thermo Scientific (Madison, EE. UU.) Figura 2.20.



**Figura 2.20. a) Equipo de FT-IR Nicolet iS10 Thermo Scientific, b) Accesorio ATR**

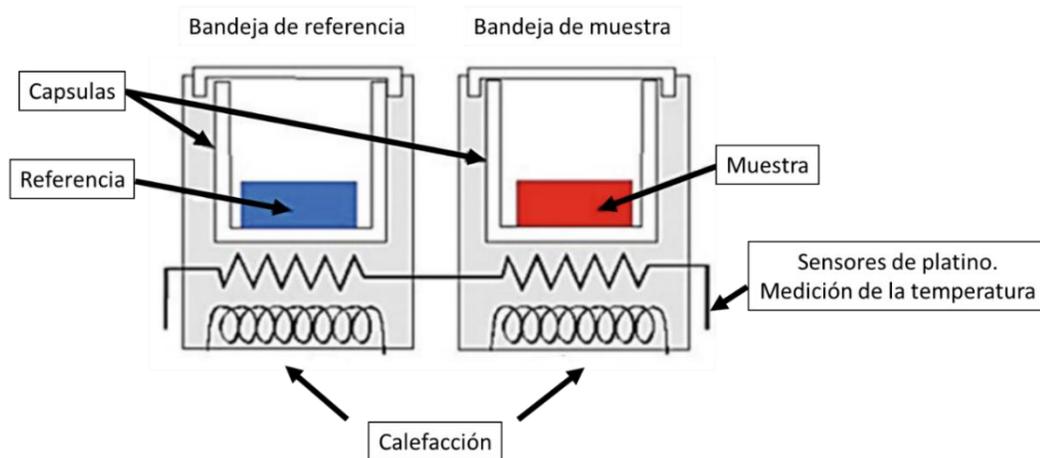
Las películas se analizaron en el rango de onda  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  mediante la acumulación de 64 exploraciones a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras se colocaron en el cristal de diamante ATR (accesorio Smart iTX) para el Nicolet™ iS™ 10 (Thermo Scientific™, Madison, EE. UU.). Los datos se analizaron utilizando el software Omnic 8 (Thermo Scientific, Madison, EE. UU.). Las pruebas se realizaron por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

### 2.9.2 Análisis térmico a través de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

#### - DSC convencional

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica de análisis térmico que

se utiliza para medir las temperaturas y los flujos de calor asociados con las transiciones en materiales en función del tiempo y la temperatura. Tales medidas proporcionan información cualitativa y cuantitativa sobre cambios físicos y químicos que involucran procesos endotérmicos o exotérmicos o cambios en la capacidad calorífica. La Calorimetría Diferencial de Barrido puede ser de flujo de calor o de potencia compensada (Figura 2.21). En este último caso se mide la potencia que hay que aportar o retirar del sistema para que muestra y referencia se mantengan a la misma temperatura cuando dicha muestra se somete a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. DSC es una técnica cuantitativa que permite obtener información de la temperatura a la cual tiene lugar el cambio energético en estudio y del calor involucrado en el proceso.



**Figura 2.21. DSC de potencia compensada modificado de Le Parlouër, (2013)**

DSC tiene muchas ventajas que contribuyen a su uso generalizado, incluido un tiempo de análisis rápido, fácil preparación de la muestra, aplicabilidad tanto a sólidos como a líquidos, amplio rango de temperatura y excelente capacidad cuantitativa. Por otro lado, DSC tiene algunas limitaciones. En orden de importancia, estas limitaciones son:

**a) La capacidad de analizar adecuadamente las transiciones complejas**

Muchas transiciones son complejas porque involucran múltiples procesos. Los ejemplos incluyen la relajación entálpica que ocurre en la transición vítrea y la cristalización de materiales amorfos o estructuras cristalinas metaestables antes o durante la fusión. La relajación entálpica es un proceso endotérmico que puede variar en magnitud dependiendo de la historia térmica del material. En algunas circunstancias, puede hacer que la transición vítrea parezca una transición de fusión. Las simultáneas cristalización y fusión hacen que

sea casi imposible determinar la cristalinidad real de la muestra antes del experimento DSC. Estos problemas se agravan aún más al analizar mezclas de materiales. La técnica de DSC convencional no permite analizar adecuadamente estas complejas transiciones, ya que mide sólo la suma de todos los eventos térmicos en la muestra. Por lo tanto, cuando ocurren múltiples transiciones en el mismo rango de temperatura, los resultados a menudo son confusos y mal interpretados.

#### **b) La presencia de suficiente sensibilidad**

La capacidad del DSC para detectar transiciones débiles depende tanto del ruido a corto plazo (segundos) en la señal de flujo de calor, como de las variaciones a largo plazo (minutos) en la forma de la línea de base del flujo de calor. Sin embargo, dado que el ruido a corto plazo se puede eliminar eficazmente promediando la señal, la limitación real para detectar transiciones débiles de forma reproducible es la variación en el comportamiento rectilíneo de la línea de base. Debido a la necesidad de utilizar diferentes materiales en la construcción de celdas de DSC y debido a cambios en las propiedades de estos materiales y el gas de purga con la temperatura, todos los instrumentos de DSC comerciales tienen diversos grados de deriva de la línea de base y efectos relacionados.

#### **c) La presencia de una resolución adecuada**

Si aumenta el tamaño de la muestra, la velocidad de barrido, o ambas, deberá procurarse que no haya pérdida de resolución en los datos obtenidos, a causa de un calentamiento desparejo de la muestra. Una muestra más grande debe correrse, idealmente, a una velocidad más lenta, y una muestra que se corre a mayor velocidad debería ser más pequeña. Ambas contribuyen, ya que el flujo de calor es una función de la masa de la muestra y la velocidad de barrido.

La alta resolución, o la capacidad de separar las transiciones que están separadas solo unos pocos grados de temperatura, requiere el uso de muestras pequeñas y bajas velocidades de calentamiento. Sin embargo, la magnitud de la señal de flujo de calor disminuye cuando el tamaño de la muestra es pequeño y la velocidad de calentamiento es menor. Esto significa que cualquier mejora en la resolución da como resultado una reducción de la sensibilidad y viceversa. Los resultados de DSC convencionales son siempre un compromiso entre sensibilidad y resolución.

#### d) La necesidad de experimentos complejos

Algunas mediciones en el DSC convencional como la capacidad calorífica, requieren de múltiples experimentos que aumentan la posibilidad de error, así como el tiempo de los tests. En el DSC convencional, la diferencia en el flujo de calor entre una muestra y una referencia inerte se mide como una función del tiempo y la temperatura, ya que tanto la muestra como la referencia están sujetas a un entorno controlado de tiempo, temperatura y presión. El diseño de instrumento más común para hacer esas medidas en un DSC es el diseño de flujo de calor que se muestra en la Figura 2.21. En este diseño, un disco metálico es el medio principal de transferencia de calor hacia y desde la muestra y la referencia. La muestra, contenida en una cápsula de metal, y la referencia (una capsula vacía) se ubican en plataformas elevadas formadas en el disco. A medida que se transfiere calor a través del disco, el flujo de calor diferencial a la muestra y la referencia es medido por termocuplas que cubren la parte inferior de las plataformas. Estas termocuplas están conectadas en serie y miden el flujo de calor diferencial.

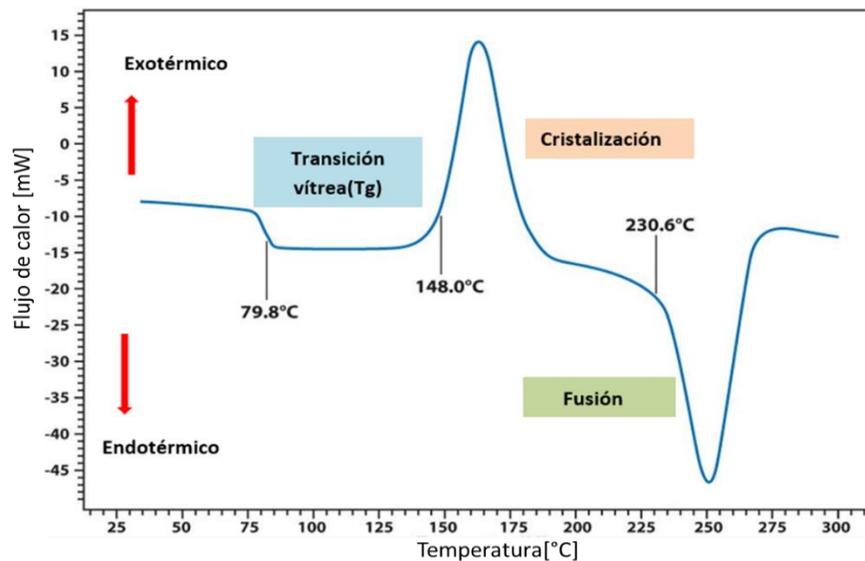


Figura 2.22. Transiciones térmicas para PET obtenidas en un DSC

$$\frac{dQ}{dt} = C_P \frac{dT}{dt} \quad (2.9)$$

donde:  $dQ/dt$  es el flujo calórico;  $C_p$  es el calor específico;  $T$  es la temperatura y  $t$  el tiempo

Por otra parte:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{\Delta T}{R_D} \quad (2.10)$$

siendo:  $\Delta T$ : Diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia;  $R_D$ = Resistencia térmica del disco

La Figura 2.22 muestra las transiciones térmicas para una muestra de PET que ha sido fundida y luego enfriada rápidamente hasta una temperatura por debajo de la  $T_g$  alcanzando características de material casi completamente amorfo o vítreo. Al imponer luego un programa de calentamiento lento controlado, se pueden observar de izquierda a derecha: la Transición vítrea ( $T_g$ ) donde se produce el pasaje de estado vítreo a gomoso (*transición de segundo orden*) que se manifiesta con un cambio en la línea de base y un aumento de la capacidad calorífica. A una temperatura superior a la de la transición vítrea, los polímeros poseen una gran movilidad. Cuando se alcanza la temperatura adecuada, el polímero ha ganado la suficiente energía como para adoptar una disposición ordenada, que corresponde a la formación de cristales; el segundo pico que observamos corresponde entonces a la cristalización en frío (Proceso exotérmico, libera energía). Si continuamos calentando el tercer pico corresponde a la fusión de los cristales formados (Proceso endotérmico, consume energía). A modo de ejemplo se muestran las transiciones térmicas medidas en un DSC en un polímero como el PET (Figura 2.22).

Al medir con el DSC el punto de fusión ( $T_m$ ), no sólo se obtiene el inicio de la fusión, el  $T_m$ , sino también la temperatura pico, que corresponde a una fusión completa en productos orgánicos y a la energía que se requiere para producir la transición de fusión.

#### **-DSC modulado (MDSC)**

La calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC), a diferencia de los analizadores térmicos convencionales, utiliza dos velocidades de calentamiento simultáneas, una velocidad de calentamiento lineal que brinda información similar al DSC estándar, y una velocidad de calentamiento modulada o sinusoidal que permite medir simultáneamente la capacidad calorífica de la muestra y diferenciar entre los eventos reversibles (dependientes de la capacidad calorífica) e irreversibles (dependientes del tiempo y la temperatura) que experimenta la muestra

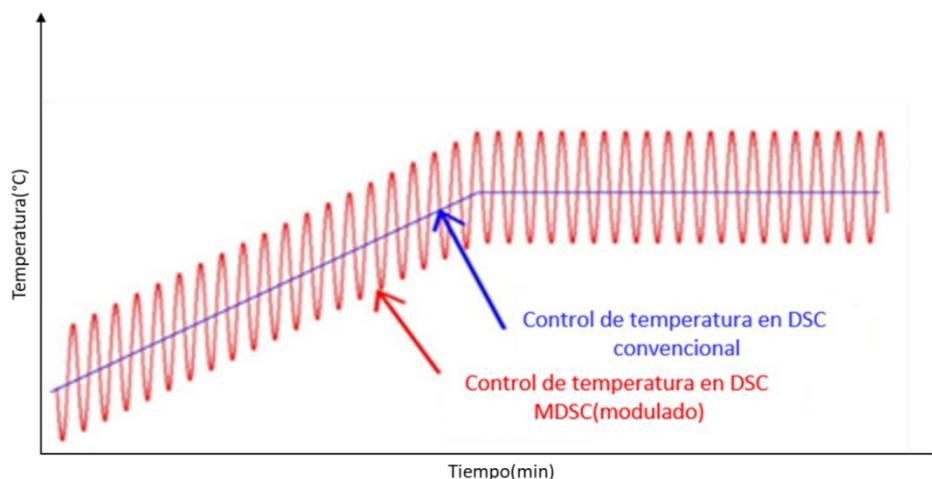
El DSC Modulado Modulated DSC <sup>TM</sup> (MDSC®) proporciona no sólo la misma

información que el DSC convencional, sino que también proporciona información adicional superando la mayoría de las limitaciones de DSC convencional. El resultado es una forma de aumentar significativamente la comprensión básica de las propiedades de los materiales. En el DSC modulado se impone una onda de tipo seno (o cuadrada) sobre la rampa de calentamiento (o enfriamiento) normal, ajustándose la amplitud y el período de la onda; esto permite la separación de la señal de flujo total de calor en sus componentes (termodinámica o reversible y cinética o no reversible) (Figura 2.23).

El rango típico de las condiciones de operación es:

- Velocidades de calentamiento:  $< 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$
- Período de la oscilación: 10 – 100 segundos
- Amplitud de la oscilación:  $0,01 - 3^{\circ}\text{C}$

Se considera importante que haya varios ciclos completos (al menos 5) en el rango de temperatura correspondiente a la característica que se desea analizar, para que la deconvolución posterior conduzca a resultados adecuados.



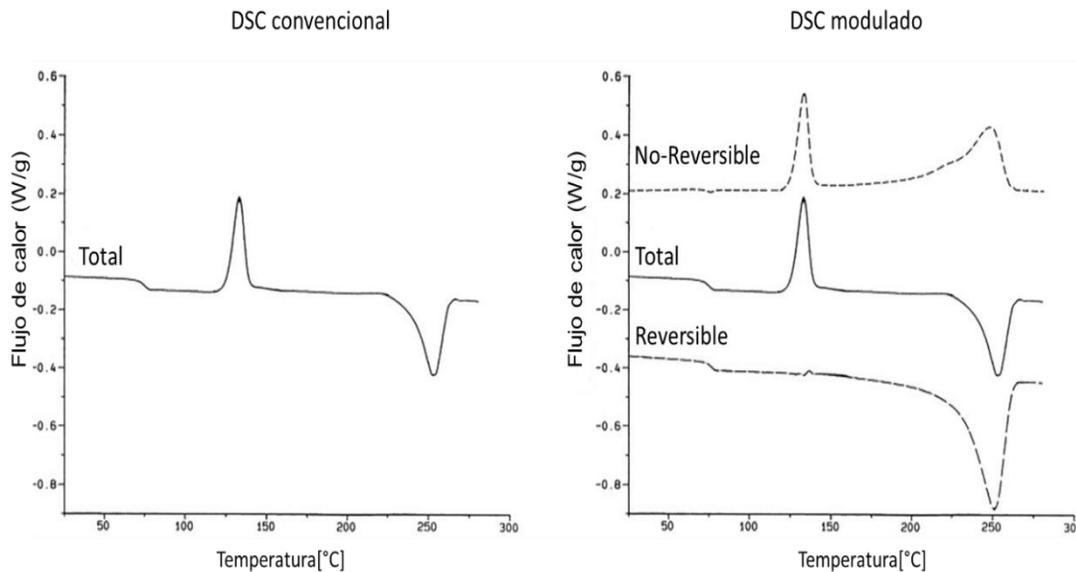
**Figura 2.23. Programas de temperatura en MDSC y en DSC convencional**

El MDSC presenta la ventaja de mejorar la sensibilidad; recordemos que la sensibilidad en DSC baja cuando disminuye la velocidad de enfriamiento o calentamiento. En MDSC se pueden usar bajas velocidades de calentamiento (promedios) y aún tener buena sensibilidad. En el MDSC la sensibilidad es casi independiente de la velocidad de

calentamiento promedio, dependiendo básicamente del período y de la amplitud de la oscilación.

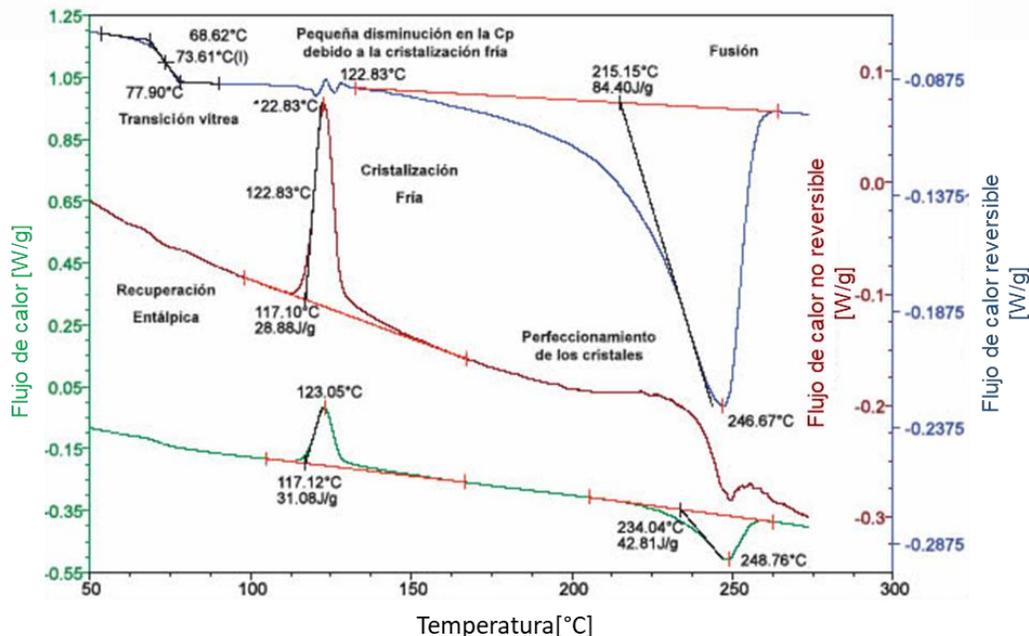
El principio operativo del MDSC difiere del DSC estándar ya que el MDSC utiliza dos velocidades de calentamiento simultáneas: una velocidad de calentamiento lineal que proporciona información similar al DSC estándar y una velocidad de calentamiento sinusoidal o modulada que permite una medición simultánea de la capacidad calorífica de la muestra. El cambio de temperatura requiere seleccionar un período de modulación (seg) y una amplitud de temperatura de modulación ( $\pm$  °C)

La técnica de Calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) permite realizar medidas como en un calorímetro DSC convencional y, además, en modo modulado. En este último, al programa convencional de variación de temperatura (lineal), se superpone una variación periódica, generalmente sinusoidal, de la misma. De esta forma es posible medir el calor específico directamente con gran precisión, así como otras magnitudes tales como el calor latente en transiciones de fase de primer orden. Al superponer un programa de temperatura sinusoidal al perfil de temperatura lineal convencional es posible separar el flujo total de calor en: a) la componente cinética (flujo de calor no reversible) y b) la termodinámica ( $C_p$ ) (flujo de calor reversible) (Figura 2.24).



**Figura 2.24. Resultados de los termogramas de DSC Convencional y Modulado adaptado de Knopp (2015)**

En el DSC modulado se usa el mismo sistema de celda por flujo de calor que se usa en DSC convencional, pero se le aplica una oscilación (modulación) sinusoidal que se superpone a la rampa lineal de calentamiento de la muestra, lo que permite obtener información adicional acerca de las propiedades térmicas de los materiales. Esta información se refleja en tres curvas en el experimento: la curva de flujo total que a su vez se separa en la de flujo reversible (R) y la de flujo calórico no reversible (NR) mediante un análisis por transformada de Fourier de la señal de flujo de calor modulado. Idealmente la cristalización debe aparecer en la curva de flujo No reversible mientras que la fusión aparece en la curva Reversible (Bashir y col., 2000). Algunos ejemplos de eventos que son reversibles son las transiciones vítreas y la endoterma de fusión. Algunos ejemplos de eventos que aparecen en las curvas de flujo no reversibles son la cristalización en frío, relajaciones entálpicas y las reacciones de curado o reticulación de polímeros.



**Figura 2.25. Ejemplo de una medición de una lámina de PET en un Equipo MDSC**

Aclaremos qué significa la cristalización en frío. El enfriamiento desde el punto de fusión de un polímero provoca una variación estructural con tendencia a formar sólidos amorfos o cristalinos. La cristalización normal en los polímeros depende considerablemente de la simetría e irregularidades que presente la estructura del compuesto, así como de la velocidad del enfriamiento. Si la velocidad de enfriamiento es alta al alcanzar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) los movimientos moleculares se inhiben restringiéndose la

cristalización y formándose un sólido amorfo (vítreo). Cuando ese sólido amorfo es calentado por encima de su  $T_g$  se recupera la movilidad, pasa del estado vítreo al gomoso y suceden movimientos cooperativos de las cadenas moleculares. En algunos casos, estos procesos pueden provocar el reagrupamiento de segmentos que originan zonas cristalinas. Esta cristalización que tiene lugar desde el estado amorfo es la llamada cristalización en frío y es un camino muy apropiado para preparar diferentes estudios del material con distintos grados de cristalinidad

En la Figura 2.25 se ilustra a modo de ejemplo una medición de una lámina de PET en un equipo de MDSC. En dicha figura se observan en orden de arriba hacia abajo, la curva de flujo de calor reversible (azul), la curva de flujo no reversible (roja) y la curva de flujo total de calor (verde). La curva de **flujo reversible** permite visualizar la transición vítrea y la fusión, en tanto que la curva de flujo **no reversible** permite visualizar la cristalización fría que es un evento cinético (dependiente del tiempo). También se registran otros pequeños eventos, tales como una pequeña disminución de la capacidad calorífica por la cristalización en frío (en la curva de flujo reversible), una recuperación entálpica en la misma región de la transición vítrea y un reordenamiento cristalino o perfeccionamiento de los cristales en la misma región de la fusión (en la curva de flujo reversible). La componente cinética (no reversible) del flujo de calor total se determina como la diferencia aritmética entre el flujo de calor total y la componente de capacidad calorífica (reversible).

#### **-Ventajas de un MDSC con respecto al DSC convencional**

Las principales ventajas de la tecnología de MDSC con relación a la tecnología de DSC convencional son las siguientes:

- **Análisis de transiciones complejas:** En muchos casos se solapan eventos térmicos en una misma región, no siendo posible por la técnica del DSC convencional diferenciarlos. Sin embargo, si las transiciones que están superpuestas son diferenciables por su carácter reversible o irreversible, pueden distinguirse en un equipo de DSC con tecnología modulada.
- **Incremento de la resolución:** A diferencia de la tecnología de DSC convencional en la cual se debe aumentar la velocidad de calentamiento para aumentar la sensibilidad, aunque se pierde resolución, en la tecnología de MDSC no se tiene

dicho compromiso. A pesar de las bajas velocidades de calentamiento utilizadas en la técnica de DSC modulado es posible diferenciar transiciones térmicas muy próximas entre sí.

- **Medición directa de la capacidad calorífica:** La medición de la capacidad calorífica de un material en un equipo de DSC convencional es más engorrosa y delicada, ya involucra como mínimo tres mediciones, a saber: una medición con la celda con las cápsulas vacías, una medición con un estándar de capacidad calorífica conocida (típicamente un zafiro) y una medición con la muestra. La tecnología de MDSC permite la medición de la capacidad calorífica directamente, incluso a condiciones cuasi-isotérmicas (velocidades de calentamiento muy bajas) o durante transiciones térmicas simplificando notoriamente el trabajo experimental y haciendo más ágil la medición.

### **2.9.2.1 Análisis térmico del PHA extraído: efecto de los monómeros HB y HV.**

Las características térmicas de los polihidroxicanoatos son influenciadas por la fracción de sus monómeros como se puede observar en la Figura 2.26, que corresponden a los termogramas para las muestras PHB (100% hidroxibutirato (HB), 0% hidroxivalerato (HV)); PHBV<sub>1</sub> (84 % HB, 16% de HV) y PHBV<sub>2</sub> (47% HB, 53% de HV) reportados por Wang y col (2013). Se puede observar que la fracción de HV presente en PHBV tiene un efecto significativo en el punto de fusión, que disminuye con el aumento en la fracción de HV en PHBV.

Observaciones similares fueron reportadas por Thellen y col (2008) para PHA extruido donde se observa que la fusión del cristal se produce a temperaturas más altas en las muestras que contienen menor porcentaje de HV; a medida que aumenta el contenido de HV el inicio de la fusión del cristal se produce a temperaturas más bajas. De manera similar se reporta una disminución en la cristalinidad del polímero en función del aumento de la fracción de HV. Otro cambio que se logra observar es la aparición de una figura tipo hombro en el pico de fusión el cual aumenta con el aumento de la fracción de HV, el cual representa la fusión de laminillas de cristal. Puntos de fusión para PHB alrededor de 172-177 °C han sido reportado por diferentes autores (Tsuge, 2002; Thellen y col., 2008; Wang y col., 2013).

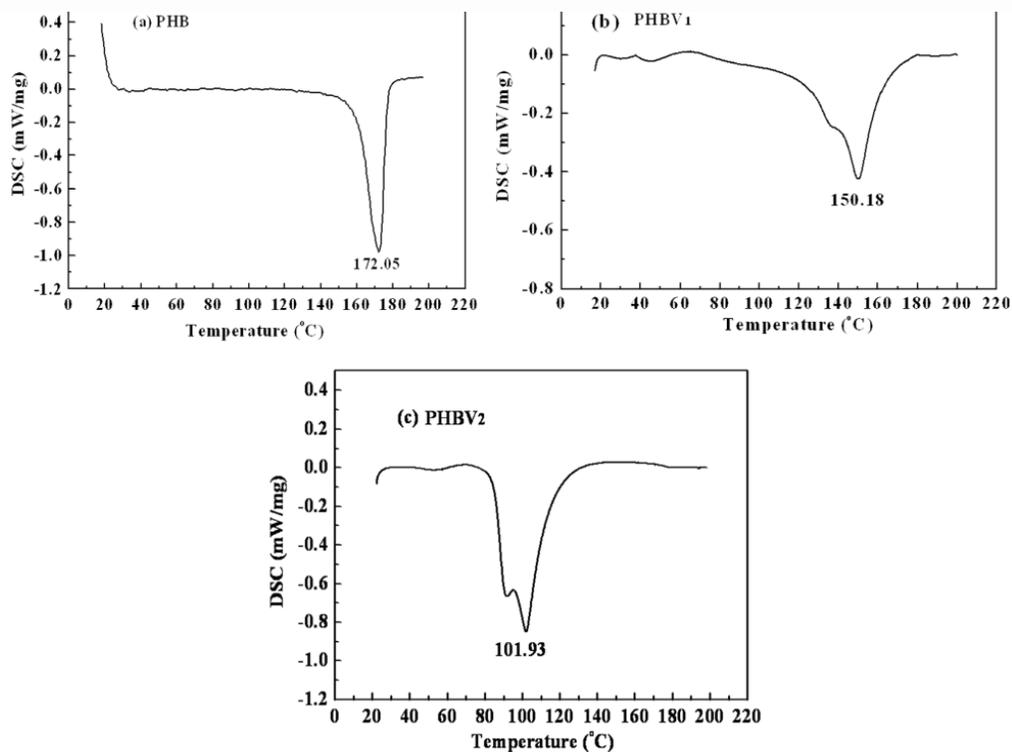


Figura 2.26. Ejemplo de una medición de PHA a diferentes fracciones de HB y HV. a) PHB, b) PHBV<sub>1</sub>, c) PHBV<sub>2</sub>. Adaptado de Wang y col., (2013)

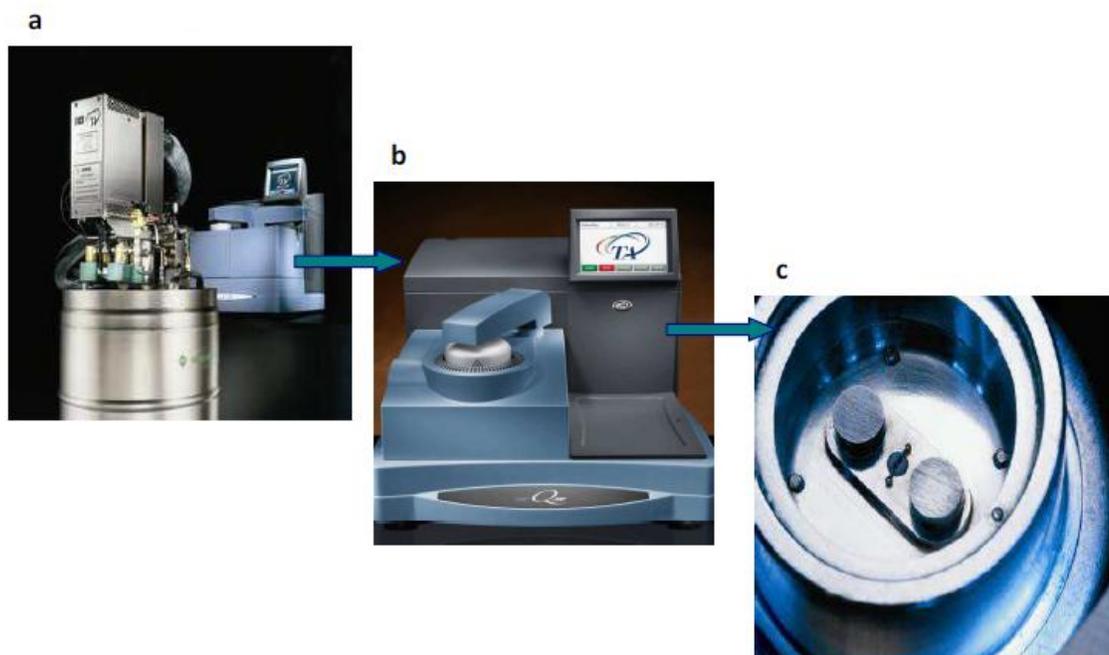
### 2.9.2.2 Análisis térmicos de las películas individuales y compuestas de PLA y PHA

El análisis térmico de las películas individuales de PLA y PHA y sus mezclas se realizó utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC Q100, TA Instruments, USA, Figura 2.27) controlado por un módulo TA 5000 (TA Instruments, New Castle, Delaware, EE. UU.). Cuenta con un accesorio de enfriamiento rápido bajo una atmósfera de N<sub>2</sub> (20 ml min<sup>-1</sup>) y capacidad modulada. Las muestras de aproximadamente 5-6 mg se pesaron en cápsulas de aluminio y se cerraron herméticamente, utilizando una cápsula vacía como referencia.

Todas las mediciones se realizaron al menos dos veces para cada muestra. Se utilizó una rampa de calentamiento estándar de 10 °C min<sup>-1</sup>, para la modulación de la señal el periodo utilizado fue de 60 s y una amplitud de temperatura de 0,5 °C con el fin de lograr identificar los procesos reversibles. El primer escaneo (calentamiento) se realizó desde -50°C hasta 200°C para eliminar la historia térmica y ver de una forma más clara la temperatura de transición

vítrea. Después de que se completó la primera exploración, la muestra se enfrió a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y luego se registró una segunda exploración de calentamiento (Rivero y col., 2016). Todos los resultados informados fueron los promedios para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Se determinaron las señales totales, reversibles y no reversibles.

A partir de los termogramas obtenidos se determinaron diferentes parámetros: temperatura de fusión ( $T_m$ ) y entalpía correspondiente al área del pico endotérmico ( $\Delta H_m$ ), temperatura de cristalización durante la etapa de enfriamiento ( $T_c$ ), entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ ) y temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) determinado a partir de la señal reversible. El análisis de los termogramas se realizó utilizando el software Universal Analysis V1.7F (TA Instruments).



**Figura 2.27. Fotografías del calorímetro diferencial de barrido utilizado, acoplado a un sistema de enfriamiento (a, b), vista del horno del equipo donde se ubica la capsula con la muestra y la referencia (c)**

La cristalinidad de las películas se determinó de la siguiente manera:

$$X\% = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_{REF}} \times 100 \quad (2.11)$$

Donde:

X% es la cristalinidad de la muestra

$\Delta H_m$  es la entalpía de fusión de la muestra de PHA.

$\Delta H_{REF}$  es la entalpía de PHA cristalino al 100%.

## 2.10 Determinación de parámetros cinéticos y estequiométricos del sistema de producción de PHA

Para los SBRs y reactores batch, la velocidad volumétrica de remoción de sustrato carbonáceo ( $r_s$ , mgDQO<sub>s</sub>/(L h)), velocidad volumétrica de consumo de oxígeno total medido como DQO<sub>T</sub> ( $r_T$ , mgDQO<sub>T</sub>/(L h)) y la velocidad volumétrica de producción de PHA ( $r_{PHA}$ , mgDQO<sub>PHA</sub>/(L h)) se determinaron a partir de las pendiente de la parte lineal de las gráficas de DQO<sub>s</sub>, DQO<sub>T</sub> y del PHA en función del tiempo respectivamente. En el caso del PHA se utilizó un factor de conversión PHB a DQO que corresponde a 1,67 mgDQO/mgPHB.

La velocidad específica de remoción del sustrato ( $q_s$ , mg DQO<sub>s</sub>/(gDQO<sub>x0</sub> h)) se determinó mediante la siguiente expresión:

$$q_s = \frac{r_s}{DQO_{x0}} \quad (2.12)$$

donde DQO<sub>x0</sub> es la concentración inicial de biomasa activa (mg DQO<sub>x0</sub>/L). Para SBRs, el valor inicial fue el que se determinó al comienzo del ciclo operacional, para reactores batch se determinó al comienzo del ensayo por lotes. La biomasa activa corresponde a la diferencia entre la biomasa (DQO<sub>B</sub>) y las reservas endógenas de PHA y glucógeno, expresadas como DQO, como se explicará en el Capítulo 3.

Para determinar los diferentes rendimientos del sistema de producción se propuso el siguiente balance:

$$\frac{y_O}{S} + \frac{y_{PHA}}{S} + \frac{y_X}{S} + \frac{y_G}{S} = 1 \quad (2.13)$$

donde  $y_{O/S}$  corresponde al coeficiente de oxidación del sustrato orgánico,  $y_{PHA/S}$  corresponde al rendimiento de PHA,  $y_{X/S}$  y  $y_{G/S}$  corresponde a los rendimientos de biomasa y glucógeno respectivamente.

El coeficiente de oxidación del sustrato se estimó a partir de la siguiente expresión:

$$y_{O/S} = \frac{r_T - r_{End}}{r_S} \quad (2.14)$$

donde  $r_T$  y  $r_S$  corresponden velocidad volumétrica de consumo de oxígeno total medido como  $DQO_T$  (mgDQO<sub>T</sub>/(L h)) y la velocidad volumétrica de remoción de sustrato carbonáceo (mgDQO<sub>S</sub>/(L h)) respectivamente.  $r_{End}$  es la velocidad de consumo de oxígeno, medida como DQO, correspondiente a la actividad endógena (mgDQO<sub>END</sub>/(L h)), determinada luego de 24 hs de inanición de la biomasa.

Para estimar el rendimiento de PHA se utilizó la siguiente expresión:

$$y_{PHA/S} = \frac{r_{PHA}}{r_S} \quad (2.15)$$

donde  $r_{PHA}$  corresponde a la velocidad volumétrica de producción de PHA (mgDQO<sub>PHA</sub>/(L h))

Para estimar el rendimiento de la biomasa se propuso la siguiente expresión:

$$y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} \quad (2.16)$$

donde  $r_X$  corresponde a la velocidad de síntesis de biomasa activa (mgDQO<sub>X</sub>/(L h)). Se utilizó el factor de conversión 1.36 mgDQO<sub>X</sub>/mgX para la fórmula elemental de la biomasa CH<sub>1.8</sub>O<sub>0.5</sub>N<sub>0.2</sub>.

Para estimar el rendimiento del glucógeno se propuso la siguiente expresión:

$$y_{G/S} = 1 - y_{O/S} - y_{PHA/S} - y_{X/S} \quad (2.17)$$

## 2.11 Análisis estadístico

Se utilizó la versión 12 de Systat-software (SYSTAT, Inc., Evanston, IL, EE. UU.) para todos los análisis estadísticos. Se aplicaron análisis de varianza (ANOVA), regresiones lineales y prueba de comparación de medias de Fisher LSD. El nivel de significación utilizado fue de 0,05.

**CAPÍTULO 3**

**PRODUCCIÓN DE**

**POLIHIDROXIALCANOATOS A**

**PARTIR DE SUERO DE QUESO**

## **Producción de polihidroxialcanoatos a partir de suero de queso**

### **3.1 Producción de PHA utilizando cultivos mixtos**

La producción de PHA a partir de cultivos mixtos ofrece la posibilidad de reciclar materiales mediante el uso de compuestos orgánicos renovables de desechos y efluentes industriales. Los estudios de investigación han demostrado la viabilidad técnica de producir PHA en cultivos mixtos con sustratos simples y complejos (Dionisi y col., 2005), incluidos varios desechos fermentados: desechos de alimentos (Rhu y col., 2003), aceite de oliva (Dionisi y col., 2005; Beccari y col., 2009) y aceite de palma (Din y col., 2012), efluentes de molinos, melaza de caña de azúcar (Albuquerque y col., 2007), efluentes de conservas de tomate (Liu y col., 2008), efluentes de fábricas de conservas y lodos municipales (Coats y col., 2007; Mengmeng y col., 2009), residuos de la industria del biodiésel (Kumar y col., 2014; Sathiyarayanan y col., 2017), suero de queso con pretratamiento para la disminución de lípidos y proteínas (Bosco y Chiampo, 2010; Bosco y col., 2018).

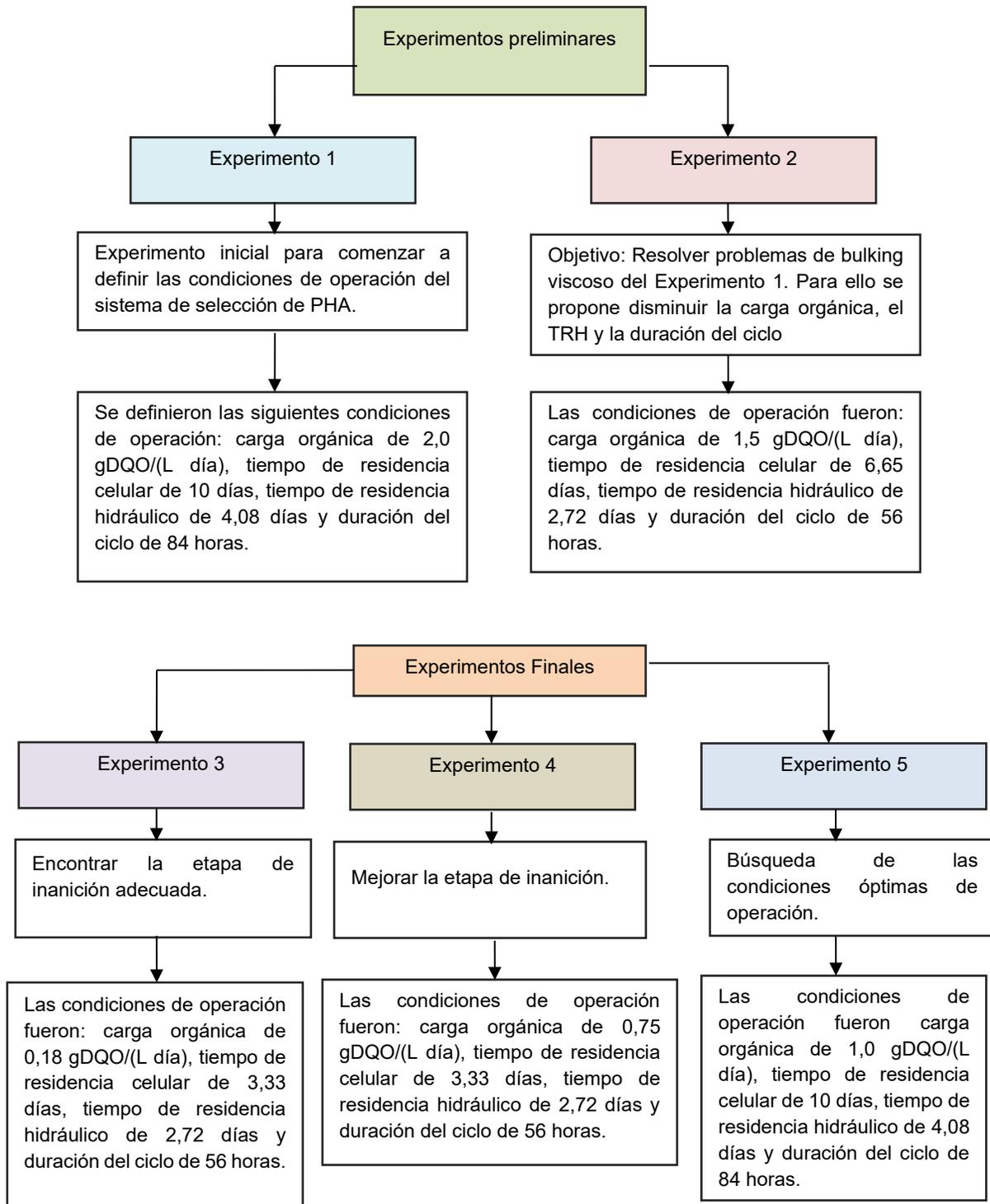
Argentina es el décimo productor de leche a nivel mundial y el sexto exportador de productos lácteos, por lo que lo hace un país con alta generación de efluentes líquidos de la industria láctea, donde el 60% se desecha como efluente o es aprovechado con bajo nivel tecnológico en el sector agropecuario (ver Capítulo 1). Esta alta generación de lacto suero y su alto costo de disposición genera la necesidad de buscar alternativas eficientes para su aprovechamiento. La producción de PHA a partir de estos efluentes es de gran interés ya que reduce considerablemente los costos de producción, sin competir con la producción de alimentos y al mismo tiempo resuelve un problema ambiental (Amaro y col., 2019). El uso de lodos activados en lugar de cultivos puros, aunque se ha asociado con menores rendimientos de producción de PHA, tiene dos ventajas: (i) no requieren condiciones estériles y (ii) son capaces de adaptarse a sustratos complejos de residuos industriales (Bosco y col., 2018).

En este capítulo se estudia la selección de los lodos activados con capacidad de almacenamiento de PHA en un reactor SBR operando con diferentes cargas volumétricas de sustrato orgánico, tiempos de residencia celular y tiempo total del ciclo, a los efectos de evaluar su influencia sobre la acumulación de reservas intracelulares. Una vez obtenido el mejor sistema de selección se realizó la producción de PHA en un reactor batch evaluando un sistema limitado en nutrientes y otro limitado en oxígeno sin adición de nutrientes.

### 3.2 Objetivos del Capítulo

- a) Realizar la puesta en marcha del reactor de selección de tipo SBR determinando las mejores condiciones de operación del sistema de selección con el fin de obtener microorganismos con capacidad de acumulación de PHA.
- b) Realizar experimentos preliminares para determinar un punto de inicio del sistema de selección de PHA. Para ello se puso en marcha el reactor con una carga relativamente alta de DQOs y se fueron realizando ajustes a medida que se obtenían los resultados. En estos ensayos se debía acondicionar el sistema a la fuente de carbono y a las condiciones de operación. El propósito era determinar el rango de cargas de DQOs que debe mantener el sistema para que funcione correctamente, con consumo de la carga orgánica, buena sedimentación y sin problemas de bulking viscoso.
- c) Evaluar el efecto de diferentes condiciones operativas (tiempo de residencia celular, tiempo de residencia hidráulico, duración del ciclo y carga orgánica) sobre la relación feast/famine de cultivos mixtos que presenten completa remoción de suero de queso y adecuada capacidad de sedimentación. Seleccionar la condición experimental que presente relación feast/famine acorde a los valores recomendados en bibliografía para favorecer la selección de bacterias acumuladoras de PHA.
- d) Analizar diferentes metodologías de secado, extracción y purificación de PHA
- e) Realizar la producción de PHA en reactor batch usando el cultivo mixto del sistema de selección con las mejores condiciones de operación.
- f) Seleccionar el método de secado de biomasa y extracción de PHA.
- g) Comparar dos sistemas de producción, un sistema limitado en nitrógeno (LN) y un sistema limitado en oxígeno (LO).
- h) Realizar la extracción, purificación, cuantificación por UV-VIS y caracterización por DSC del PHA obtenido en el sistema de producción.
- i) Determinar un método para monitorear la producción de PHA intracelular usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).

## Diagrama del capítulo



### 3.3 Experimentos preliminares

#### 3.3.1 Materiales y métodos

##### 3.3.1.1 Puesta en marcha y estabilización del SBR

El SBR utilizado en los experimentos preliminares se inoculó con lodos provenientes de un reactor biológico aeróbico semi-continuo, a escala laboratorio alimentado con suero de queso como fuente de carbono. La selección del cultivo mixto se desarrolló en un reactor con capacidad de 5,0 litros y un volumen de trabajo de 4,2 litros, operado a temperatura ambiente en forma aeróbica con una concentración de oxígeno mayor a 4,0 mgO<sub>2</sub>/L; el pH y la temperatura no se controlaron. El reactor fue alimentado con suero de queso parcialmente hidrolizado (ver Capítulo 2). El sistema fue operado con ciclos de entre 56 / 84 horas con el fin de generar condiciones de inanición o limitación de fuente de carbono. Por lo tanto, fue necesario un periodo de aclimatación de los lodos a las nuevas condiciones. Los SBRs de todos los experimentos fueron alimentados con el agua residual sintética usando suero de queso parcialmente hidrolizado como fuente de carbono y energía. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, el pH no se controló, pero se mantuvo alrededor de 8,0.

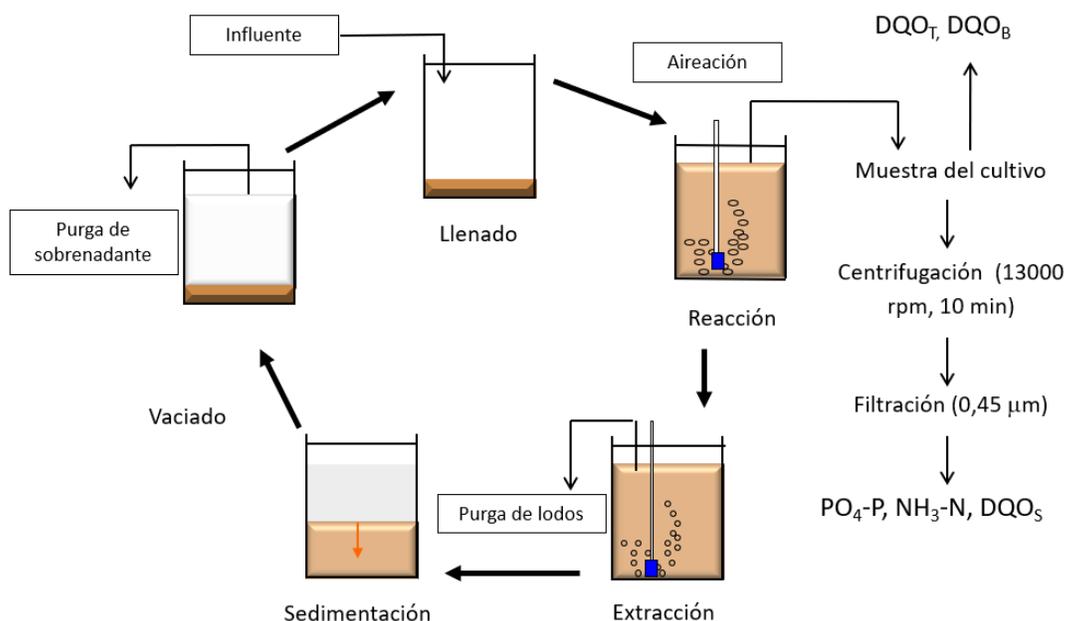


Figura 3.1. Ciclo de operación y determinaciones fisicoquímicas durante el ciclo

La limitación de oxígeno en reactores SBR de selección genera que la fase “feast”, con disponibilidad de carbono exógeno, se prolongue demasiado disminuyendo la fase de “famine” lo cual genera baja presión de selección de bacterias acumuladoras de PHA (Dionisi y col., 2005; Serafim y col., 2004 Moralejo-Garate y col., 2013); por lo tanto, se optó por no realizar ensayos de selección limitados en oxígeno.

### 3.3.1.2 Condiciones operativas

En todos los experimentos el SBR se operó con cinco fases (llenado, reacción, extracción, sedimentación y vaciado). La operación del SBR, toma de muestras y determinaciones fisicoquímicas se presentan en la Figura 3.1. Todos los detalles de la toma de muestra y los protocolos de las diferentes determinaciones se describieron en el Capítulo 2. Las condiciones de operación (Tabla 3.1) en el sistema de selección fueron definidas a los efectos de obtener un sistema estable con buena sedimentación y la mayor producción de biomasa posible.

**Tabla 3.1. Condiciones operativas de los experimentos preliminares. Todos los ensayos se mantuvieron a la misma relación DQO:N:P de 100:10:5, volumen de trabajo de 4,2 litros, volumen de reactor 5 litros y tiempo de sedimentación de 45 min**

Parámetros	Experimentos preliminares. Alimentados con suero de queso	
	1	2
<i>Experimento</i>	1	2
Tiempo de residencia celular (días)	10	6,65
Tiempo de residencia hidráulico (días)	4,08	2,72
Duración del ciclo (días/hs)	3,5/84	2,3/56
Concentración de DQO soluble inicial en el SBR DQO <sub>s</sub> (mg/L)	7018	3509
CV <sub>DQO<sub>s</sub></sub> (gDQO/(L día))	2,0	1,5
CV <sub>NH<sub>3</sub>-N</sub> (gN/(L día))	0,2	0,15
CV <sub>P</sub> (gP/(L día))	0,1	0,075

CV<sub>DQO<sub>s</sub></sub>: Carga volumétrica de sustrato orgánico; CV<sub>NH<sub>3</sub>-N</sub>: Carga volumétrica de nitrógeno; CV<sub>P</sub>: Carga volumétrica de fósforo.

En los experimentos preliminares se plantearon dos ensayos, inicialmente se estudió un sistema con una carga orgánica relativamente alta de 2,0 gDQO/(L día), con el fin de obtener un sistema estable con alta concentración de biomasa. En un segundo ensayo se procedió a disminuir la carga orgánica a 1,5 gDQO/(L día) con el fin de solucionar problemas de sedimentación y bulking viscoso presentado en el primer experimento.

### 3.3.1.3 Determinaciones fisicoquímicas

Para todos los experimentos se evaluó la estabilidad del SBR mediante la determinación de los siguientes parámetros cinéticos y físico-químicos a lo largo de diferentes ciclos: Velocidad de consumo de DQOs, nitrógeno y fósforo y concentración de biomasa determinada como DQO ( $DQO_B$ , mg/L).  $DQO_B$  correspondió a la diferencia entre DQO total ( $DQO_T$ ) y  $DQO_S$ .

### 3.3.2 Ensayos experimentales con suero de queso

#### 3.3.2.1 Composición del agua residual sintética (ARS) para los experimentos preliminares

En la Tabla 3.2 se presenta la composición del agua residual sintética con la cual fue alimentado el SBR para los diferentes ensayos preliminares.

**Tabla 3.2 Composición del ARS para alimentar el SBR de selección con suero de queso para los experimentos preliminares.**

Parámetro	Agua residual sintética (ARS)	
	ARS <sub>1</sub> (g/L)	ARS <sub>2</sub> (g/L)
Suero de queso	8,19	4,09
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,85	1,92
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,11	0,55
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,87	0,43
NaHCO <sub>3</sub>	6,0	3,0

El agua residual sintética presentó su composición expresada en demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno (N) y fósforo (P) para los diferentes ensayos; todos los

experimentos se adecuaron para mantener una relación DQO:N:P= 100:10:5.

Esta relación está por encima de la que limitaría el crecimiento de los microorganismos en relación al fósforo y nitrógeno, es decir es un efluente sintético limitado en carbono. La relación DQO:N:P comúnmente recomendada para el crecimiento heterótrofo es de 100:5:1 (Yang y col., 2023, Hamza y col., 2019). Todos los experimentos se realizaron con suero de queso como fuente de carbono y energía. ARS<sub>1</sub>, ARS<sub>2</sub> corresponden a los experimentos preliminares 1 y 2 respectivamente.

### **3.3.3 Resultados y discusión de los experimentos preliminares**

#### **3.3.3.1 Resultados del Experimento preliminar 1**

El SBR fue operado con sucesivos ciclos con una etapa de reacción aeróbica seguida de la sedimentación de la biomasa y purga final del sobrenadante (Figura 3.1). El sistema presentó ciclos de 3,5 días (84 hs), tiempo de residencia celular de 10 días y tiempo de residencia hidráulico de 4,08 días. La carga orgánica fue de 2,0 gDQO/(L día). Las cargas volumétricas de nitrógeno y fósforo fueron de 0,2 gN/(L día) y 0,1 gP/(L día) respectivamente (Tabla 3.1).

El reactor presentó problemas en la sedimentación, con alta producción de biomasa. Al final del ciclo en la fase de vaciado, con la purga del sobrenadante también se purgaban los lodos activados debido a los problemas de sedimentación; dichos problemas fueron atribuidos a bulking viscoso (Dezotti, 2008). Por lo tanto, no se determinó ningún parámetro fisicoquímico durante el ciclo, por consiguiente, el proceso de producción en dichas condiciones no fue realizado.

Diversos estudios han demostrado que los sistemas limitados en nitrógeno y fósforo (Richad y col., 2003), con alta relación alimento/microorganismo (Jenkins y col., 1993; Richad y col., 2003), bajo oxígeno disuelto (< 2 mg/L) (Wilén y Balmer., 2000; Martins y col., 2003) y largos tiempos de residencia hidráulica, son los responsables de generar producción excesiva de polisacárido extracelular lo cual conlleva a los problemas mencionados anteriormente para este ensayo. En el presente experimento, el problema de bulking viscoso fue atribuido principalmente a la elevada carga orgánica, fácilmente biodegradable, aplicada al SBR. Por lo tanto, se plantearon los siguientes cambios operativos con el fin de mejorar el sistema.

Se redujo la carga orgánica y el TRC (Tabla 3.1) con el propósito de reducir la concentración de biomasa del sistema. Es esperable que la reducción de la carga de DQO fácilmente biodegradable del suero de queso hidrolizado permitiera disminuir la producción de polímeros extracelulares viscosos, favoreciendo el desarrollo de flóculos microbianos con buenas propiedades de sedimentación. Además, se redujo el TRH con el propósito de incrementar la presión de selección hidráulica sobre el cultivo y seleccionar más rápidamente la biomasa que sedimenta adecuadamente (Richad y col., 2003).

### **3.3.3.2 Resultados Experimento preliminar 2**

En el experimento 2 se redujo la carga orgánica desde 2,0 gDQO/(L día) a 1,5 gDQO/(L día). El TRC se disminuyó desde 10 días a 6,65 días mientras que el TRH pasó de 4,08 a 2,72 días. Se trabajó en condiciones aeróbicas y ciclos de 2,33 días (56 hs). Las cargas volumétricas de nitrógeno y fósforo fueron de 0,15 gN/(L día) y 0,075 gP/(L día) respectivamente. Con estas nuevas condiciones se lograron superar los problemas de bulking viscoso y por consiguiente se logró mejorar la sedimentación del sistema. No obstante, al final del ciclo quedaba un valor remanente aproximadamente 1/3 del DQO soluble inicial (1200 mgDQO/L), con lo cual no se pudo tener etapa de inanición y lo que es más grave el efluente final presentó valores de DQO muy por encima del límite de descarga permitido por la legislación ambiental. En este caso la alta concentración de sustrato en estas condiciones de operación y menor tiempo de residencia celular generó una menor concentración de biomasa y en consecuencia menor velocidad de consumo de sustrato, no pudiéndose eliminar rápidamente todo el sustrato durante el ciclo; ese sustrato estaba por lo tanto disponible para crecimiento de microorganismos con poca o nula capacidad de acumulación de reservas intracelulares (Dionisi y col., 2005).

Diversos estudios confirmaron la necesidad de tener una etapa donde el cultivo se encuentre limitado en carbono durante varios ciclos, con el fin de aumentar la capacidad de almacenamiento de PHA de los microorganismos (Johnson y col., 2009). Esto también fue corroborado por Albuquerque y col (2007) utilizando un SBR alimentado con agua residual real como sustrato, el cual estaba limitado en nitrógeno, encontrando pérdida en la respuesta de almacenamiento de PHA, mientras que el sistema con limitación de carbono produjo un cultivo productor de PHA estable. Fue necesario entonces, la aplicación de una presión selectiva con condiciones dinámicas de alimentación es decir etapas feast/famine (alimentación/inanición) (Morgan-Sagastume y col., 2010). Por lo tanto, se plantearon

nuevas condiciones de operación con el fin de obtener un régimen feast/famine, es decir que en una parte del ciclo total (<20%) se produzca el consumo de la fuente externa de carbono orgánico y en el tiempo restante del ciclo se presente inanición logrando la presión selectiva que favorece a los microorganismos productores de PHA.

### 3.4 Nuevas condiciones operativas para obtener un régimen Feast/Famine

#### 3.4.1 Selección de bacterias con capacidad de acumular PHA. Sistemas con etapas Feast/Famine

El SBR utilizado en los ensayos donde se intentaba obtener un régimen Feast/Famine, se inoculó con lodos provenientes del reactor SBR del experimento preliminar 2. La selección del cultivo mixto se desarrolló en un reactor con capacidad de 5 litros y un volumen de trabajo de 4,2 litros, operado a temperatura ambiente en forma aeróbica con una concentración de oxígeno mayor a 4,0 mgO<sub>2</sub>/L, el pH y la temperatura no se controlaron y fue alimentado con suero de queso parcialmente hidrolizado (ver Capítulo 2).

**Tabla 3.3 Condiciones operativas de los experimentos finales. Todos los ensayos se mantuvieron a la misma relación DQO: N:P de 100:10:5, volumen de trabajo de 4.2 L, volumen de reactor 5 L y tiempo de sedimentación de 45 min**

Parámetros	Experimentos Finales		
	3	4	5
<b>Experimento</b>			
Tiempo de residencia celular (días)	3,33	3,33	10,0
Tiempo de residencia hidráulico (días)	2,72	2,72	4,08
Duración del ciclo (días/hs)	2,3/56	2,3/56	3,5/84
Concentración de DQO soluble inicial en el SBR DQO <sub>s</sub> (mg/L)	438	1754	3509
CV <sub>DQOs</sub> (gDQO/(L día))	0,18	0,75	1,0
CV <sub>NH<sub>3</sub>-N</sub> (gN/(L día))	0,018	0,075	0,1
CV <sub>P</sub> (gP/(L día))	0,0093	0,0376	0,05

CV<sub>DQOs</sub>: Carga volumétrica de sustrato orgánico; CV<sub>NH<sub>3</sub>-N</sub>: Carga volumétrica de nitrógeno; CV<sub>P</sub>: Carga volumétrica de fósforo.

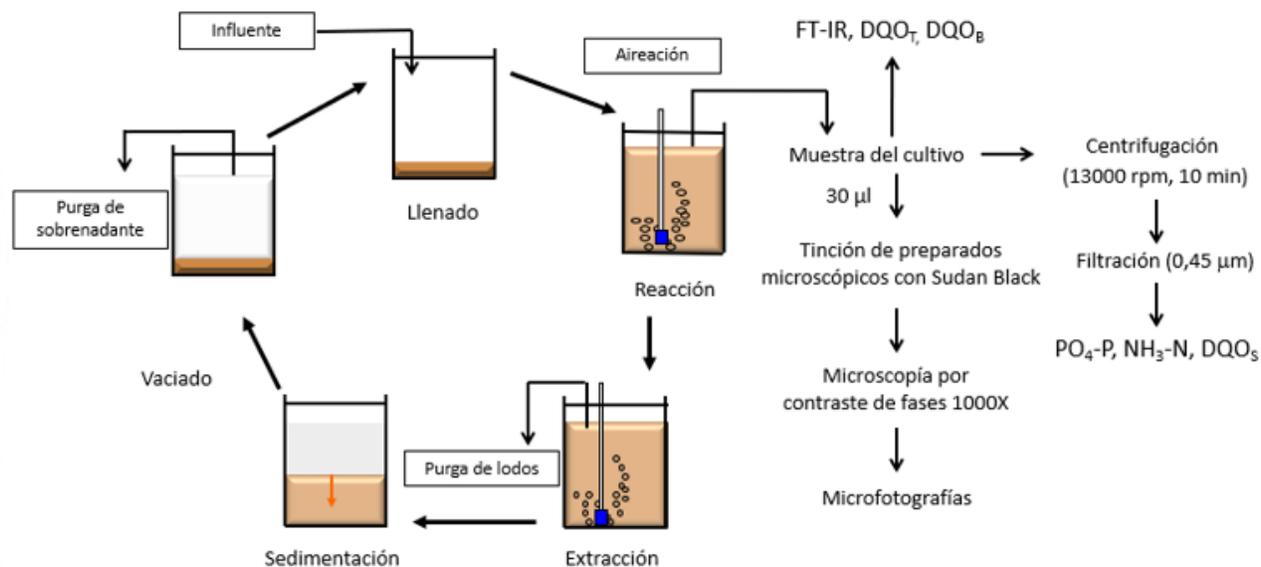
Se evaluaron diferentes condiciones operativas (TRH, TRC, carga orgánica) con el propósito de obtener una relación feast/famine adecuada, conforme a valores

recomendados en la literatura (Beccari y col., 1995; Beun y col., 2000; Martins y col., 2003; Serafim y col., 2004), para seleccionar bacterias acumuladoras de PHA. La capacidad de acumulación de PHA se evaluó cualitativamente por tinción lipofílica Sudan Black y observación microscópica y FTIR.

Las condiciones de operación (Tabla 3.3) en el sistema de selección fueron definidas en función de condiciones de alternancia de disponibilidad y limitación de carbono, para obtener un sistema enriquecido en microorganismos con capacidad de acumular PHA. Algunos autores recomiendan para un ciclo de selección de bacterias acumuladores de PHA mantener por debajo de un 20% la fase de disponibilidad de carbono generando una mayor presión de selección de las bacterias con capacidad de acumular PHA (Serafim y col., 2004; Dionisi y col., 2005; Pittmann y Steinmetz, 2017). Las condiciones de los diferentes experimentos fueron determinadas en función de los resultados obtenidos.

### 3.4.2 Determinaciones fisicoquímicas

Para todos los ensayos se evaluó la estabilidad del SBR mediante la determinación de los siguientes parámetros físico-químicos a lo largo de diferentes ciclos: ortofosfato ( $\text{PO}_4\text{-P}$ , mgP/L), amonio ( $\text{NH}_3\text{-N}$ , mgN/L), sustrato orgánico como DQO soluble (DQO<sub>s</sub>, mg/L) y concentración de biomasa determinada como DQO (DQO<sub>B</sub>, mg/L). DQO<sub>B</sub> correspondió a la diferencia entre DQO total (DQO<sub>T</sub>) y DQO<sub>s</sub>.



**Figura 3.2. Ciclo de operación y determinaciones fisicoquímicas durante el ciclo de selección de bacterias acumuladoras de PHA para experimentos finales**

La velocidad de consumo de oxígeno (VCO) fue determinada por respirometría y la velocidad específica de consumo de oxígeno (VECO) por la relación entre VCO y DQO<sub>B</sub>.

Se determinó si existía acumulación de PHA intracelular por medio de tinción microscópica y FT-IR (ver Capítulo 2).

En todos los experimentos el SBR se operó con cinco fases (llenado, reacción, extracción, sedimentación y vaciado). Tanto los procedimientos en la toma de muestras como las determinaciones fisicoquímicas se realizaron siguiendo la misma metodología en todos los experimentos (Figura 3.2).

### 3.4.3 Composición del agua residual sintética (ARS) para los experimentos finales

En la Tabla 3.4 se presenta la composición del agua residual sintética con la cual fue alimentado el SBR para los experimentos finales de selección de bacterias acumuladoras de PHA. La composición del agua residual sintética se expresó en función de demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno (N) y fósforo (P) para los diferentes ensayos.

ARS<sub>3</sub>, ARS<sub>4</sub>, ARS<sub>5</sub> corresponden a los experimentos 3, 4 y 5 respectivamente.

**Tabla 3.4 Agua residual sintética para el SBR de selección alimentado con suero de queso para los experimentos finales.**

Parámetro	Agua residual sintética (ARS)		
	ARS <sub>3</sub> (g/L)	ARS <sub>4</sub> (g/L)	ARS <sub>5</sub> (g/L)
Suero de queso	0,51	2,04	4,09
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,24	0,96	1,92
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,06	0,27	0,55
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05	0,21	0,43
NaHCO <sub>3</sub>	0,37	1,5	3

Como se mencionó anteriormente se mantuvo la relación DQO:N:P= 100:10:5 para

evitar la limitación del crecimiento de los microorganismos en relación al fósforo y nitrógeno. Todos los experimentos se realizaron con suero de queso como fuente de carbono y energía.

### **3.5 Resultados del Experimento 3**

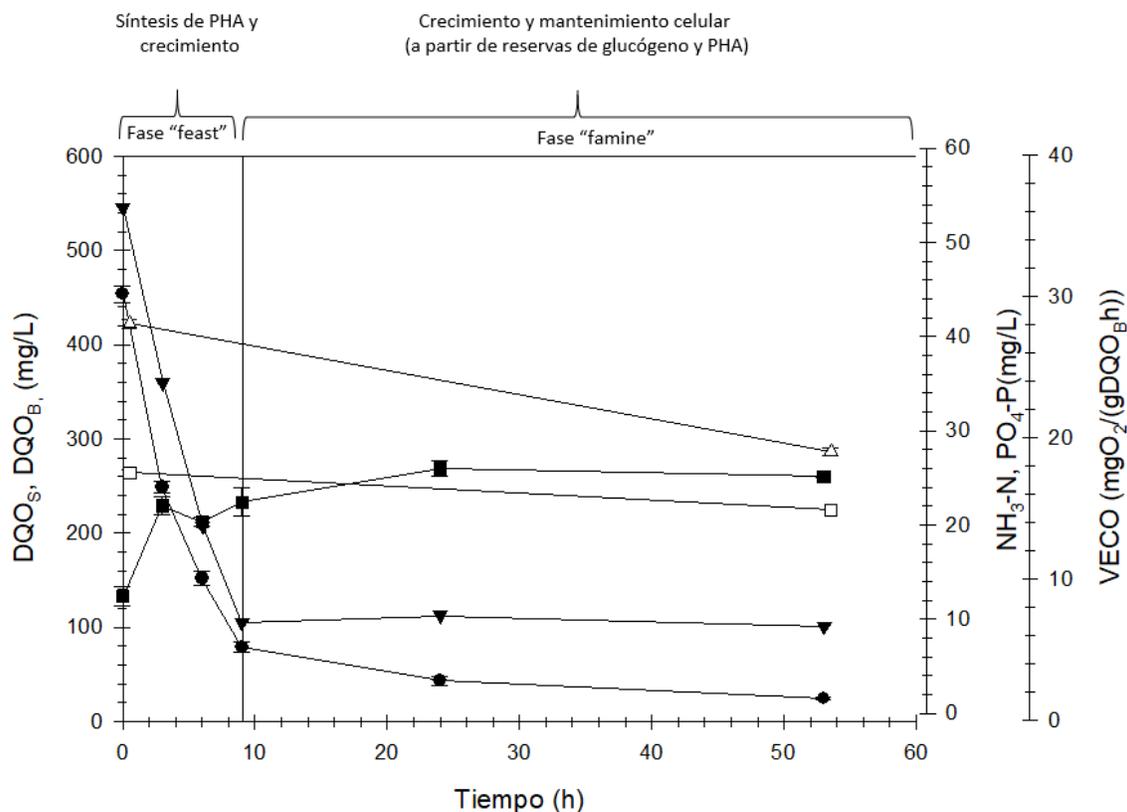
Los resultados obtenidos en el experimento 2 demostraron que la carga orgánica de 1,5 gDQO/L día, ciclos de 2,33 días (56 hs) y TRC y TRH de 6,65 y 2,72 días respectivamente logró el desarrollo de biomasa con buena sedimentación sin problemas de bulking viscoso; no obstante, el sistema no presentaba etapa de inanición con un DQOs al final del ciclo de 1/3 parte del DQOs inicial, por lo tanto, se procedió a disminuir el TRC y la carga orgánica, a fin de obtener lodos más jóvenes con mayor actividad metabólica y específicamente mayor velocidad de consumo de DQOs, lo cual podría conducir a un rápido agotamiento del sustrato carbonáceo y el establecimiento de una etapa de inanición.

Se propusieron los Experimentos 3 y 4 con TRC de 3,33 días y con carga orgánica de 0,18 y 0,75 gDQO/(L día) respectivamente. Cabe destacar que en ambos ensayos se mantuvo la duración del ciclo y el TRH del Experimento 2 (56 hs y 2,72 días respectivamente, Tabla 3.3).

El SBR presentó ciclos de 2,33 días (56 hs) con un tiempo de residencia hidráulico y celular de 2,72 días y 3,33 respectivamente (Experimento 3). El sistema se operó bajo condiciones aeróbicas y carga orgánica de 0,18 gDQO/(L día). Las cargas volumétricas de nitrógeno y fósforo fueron 0,018 gN/(L día) y 0,0093 gP/(L día) respectivamente. El consumo lineal del sustrato orgánico se observó en el periodo inicial de los diferentes ciclos, alrededor de 8 horas, presentando aproximadamente un 14% como etapa feast y un 86% de etapa famine o de inanición, dichos porcentajes fueron calculados en base de la duración del ciclo total (Figura 3.3).

En una fase de inanición larga, el consumo de sustrato por parte de las bacterias es mayor y más rápida que en fases de inanición más cortas (Morgan-Sagastume y col., 2010), condición ideal para las bacterias productoras de PHA, las cuales obtienen una ventaja de selección significativa sobre otros microorganismos (Pittmann y Steinmetz, 2017). Dionisi y col (2005) concluyeron que la proporción de la fase de feast no debe exceder el 20% del ciclo total, porque una fase feast más larga podría conducir a una menor presión de selección sobre las bacterias que no acumulan PHA, con decaimiento de la biomasa y

menor crecimiento a partir de PHA.



**Figura 3.3. Resultados del experimento 3. Parámetros químicos de un ciclo de operación del SBR alimentado con medio de cultivo basado en suero de queso. (●) DQO soluble (DQO<sub>S</sub>, mg/L); (■) DQO de biomasa (DQO<sub>B</sub>, mg/L); (Δ) Nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>-N, mg/L); (□) Ortofosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P, mg/L); (▼) Velocidad específica de consumo de oxígeno (VECO, mgO<sub>2</sub>/(gDQO<sub>B</sub> h))**

El sistema en condiciones de estabilidad presentó una baja concentración inicial de biomasa de 132 mgDQO<sub>B</sub>/L mientras que la concentración de biomasa al final de la fase feast se encontró entre 260 y 270 mgDQO<sub>B</sub>/L conduciendo a una carga orgánica específica de 1363 mgDQO<sub>S</sub>/(gDQO<sub>B</sub> día), con una carga específica de nitrógeno y fósforo de 136,3 mgN/(gDQO<sub>B</sub> día) y 70,4 mgP/(gDQO<sub>B</sub> día) respectivamente (Tabla 3.5). La baja carga orgánica permitió lograr una fase feast corta y una prolongada fase de inanición; sin embargo, la baja concentración de biomasa no era suficiente para alimentar el sistema de producción.

Cabe destacar que para lograr una extracción considerable de PHA es necesario concentraciones de biomasa mayores a 1 gr/L (Moralejo-Garate., 2011).

**Tabla 3.5 Experimentos finales. Parámetros fisicoquímicos y biológicos de los diferentes ensayos con suero de queso**

Parámetro	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
Etapa feast (%)	14	42,8	23
C.E.SO. (mgDQO <sub>s</sub> /(gDQO <sub>B</sub> día)	1363	1833	531
C.E.N. (mgN/(gDQO <sub>B</sub> día)	136,3	183,3	53,1
C.E.P. (mgP/(gDQO <sub>B</sub> día)	70,4	91,9	26,56

C.E.SO: Carga específica de sustrato orgánico; C.E.N: Carga específica de nitrógeno; C.E.P: Carga específica de fosforo

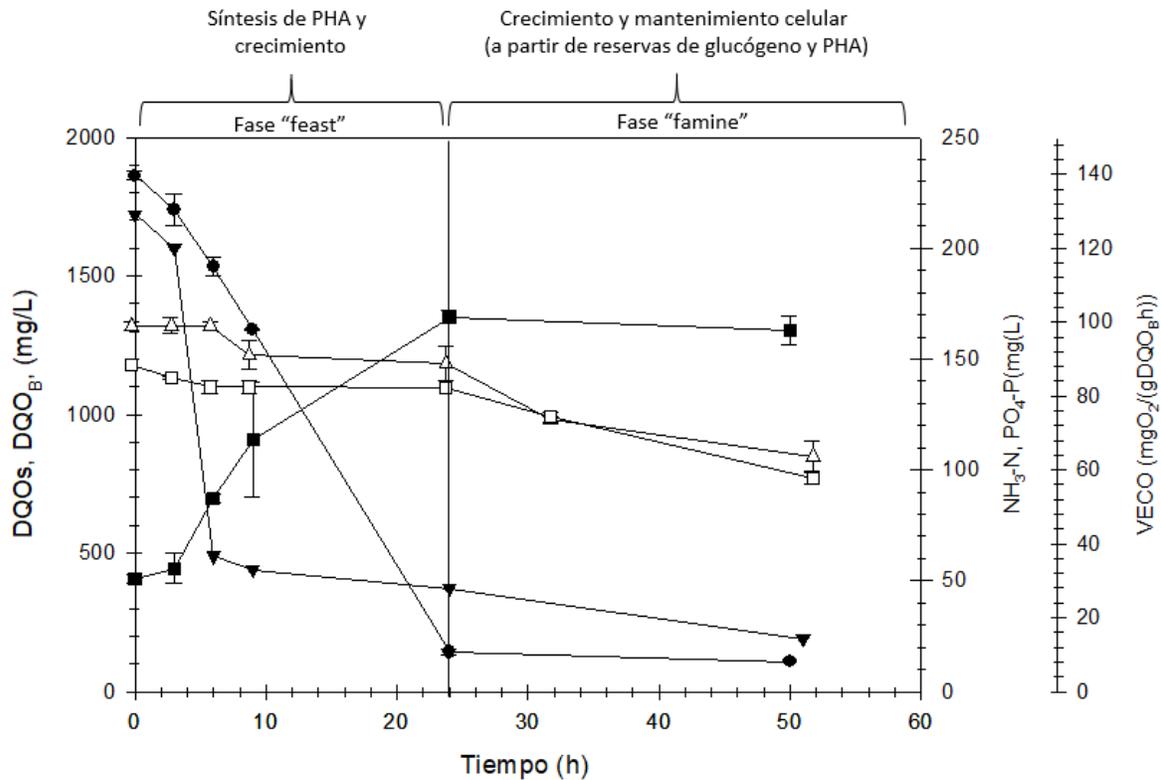
### 3.6 Resultados del Experimento 4

En este experimento se aumentó la carga orgánica de 0,18 a 0,75 gDQO/(L día) con el fin de obtener más biomasa para el proceso de producción. El SBR presentó las mismas condiciones de operación que el Ensayo 3 (ciclos de 2,33 días (56 hs), TRH de 2,72 días y TRC de 3,33 en condiciones aeróbicas). El sistema presentó cargas volumétricas de nitrógeno y fósforo de 0,075 gN/(L día) y 0,0376 gP/(L día) respectivamente (Tabla 3.3).

Una vez alcanzadas las condiciones de estabilidad, el SBR presentó una concentración de biomasa al inicio y final de la etapa feast de  $409 \pm 15,5$  mgDQO<sub>B</sub>/L y  $1352 \pm 24,7$  mgDQO<sub>B</sub>/L respectivamente, conduciendo a una carga orgánica específica de 1833 mgDQO<sub>s</sub>/(gDQO<sub>B</sub> día) (Tabla 3.5). El sustrato orgánico fue consumido casi por completo, alrededor de un 92,4%, al final de la fase feast. Durante el ciclo se pudo determinar que la etapa feast era aproximadamente un 42,8% del ciclo total; mientras que la etapa famine correspondía a un 57,2% (Figura 3.4).

Es bien sabido que sistemas donde la etapa famine es alta (alrededor del 50% del ciclo), el almacenamiento de reservas tiene un rol poco importante y predomina el crecimiento de las bacterias (Dionisi y col., 2005). El aumento de 3 veces de la fase feast, pasando de 14% en el experimento 3 a 42,8% en el experimento 4, redujo la presión selectiva conduciendo a que no se logre una ventaja competitiva; como consecuencia de

esto el sistema no logró ser dominado por bacterias acumuladoras de PHA. Algunos autores han informado que una duración de fase feast por debajo del 10% es la condición ideal para la presión de selección de bacterias acumuladoras de PHA (Beccari y col., 1995 de 4.1%; Beun y col., 2000 de 4.5%; Beun y col., 2002 de 1.7%; Carta y col., 2001 de 5,0%; Martins y col., 2003 de 12.5%; Serafim y col., 2004 de 10%).



**Figura 3.4. Resultados del experimento 4. Parámetros químicos de un ciclo de operación del SBR alimentado con medio de cultivo basado en suero de queso. (●) DQO soluble (DQOₛ, mg/L); (■) DQO de biomasa (DQO₆, mg/L); (Δ) Nitrógeno amoniacal (NH₃-N, mg/L); (□) Ortofosfato (PO₄³⁻-P, mg/L); (▼) Velocidad específica de consumo de oxígeno (VECO, mgO₂/(gDQO₆ h))**

Las velocidades específicas de consumo de DQOs para ensayos 3 y 4 fueron 308,56 y 179,90 (mgDQOs/(gDQO₆ h) respectivamente, si bien se obtuvieron elevadas velocidades de consumo de DQOs con TRC bajos (3,33 días) para ambos ensayos, únicamente se logró un corto período feast (<15% del ciclo total) cuando se aplicó una carga orgánica muy baja. En dichas condiciones operativas (Experimento 3), las concentraciones de biomasa del SBR eran muy pequeñas resultando poco factible, en términos económicos y operativos,

para ser utilizadas en una etapa posterior de producción de PHA en reactor batch. Con el fin de mejorar la presión de selección de las bacterias acumuladoras de PHA y a su vez lograr una elevada concentración de biomasa se decidió aumentar el TRC, TRH, carga orgánica y duración del ciclo (Experimento 5). El TRC, TRH y duración del ciclo fue similar a los parámetros utilizados en el experimento 1, con la diferencia que se redujo la carga orgánica a la mitad, buscando tener una adecuada relación feast/famine y una alta concentración de biomasa.

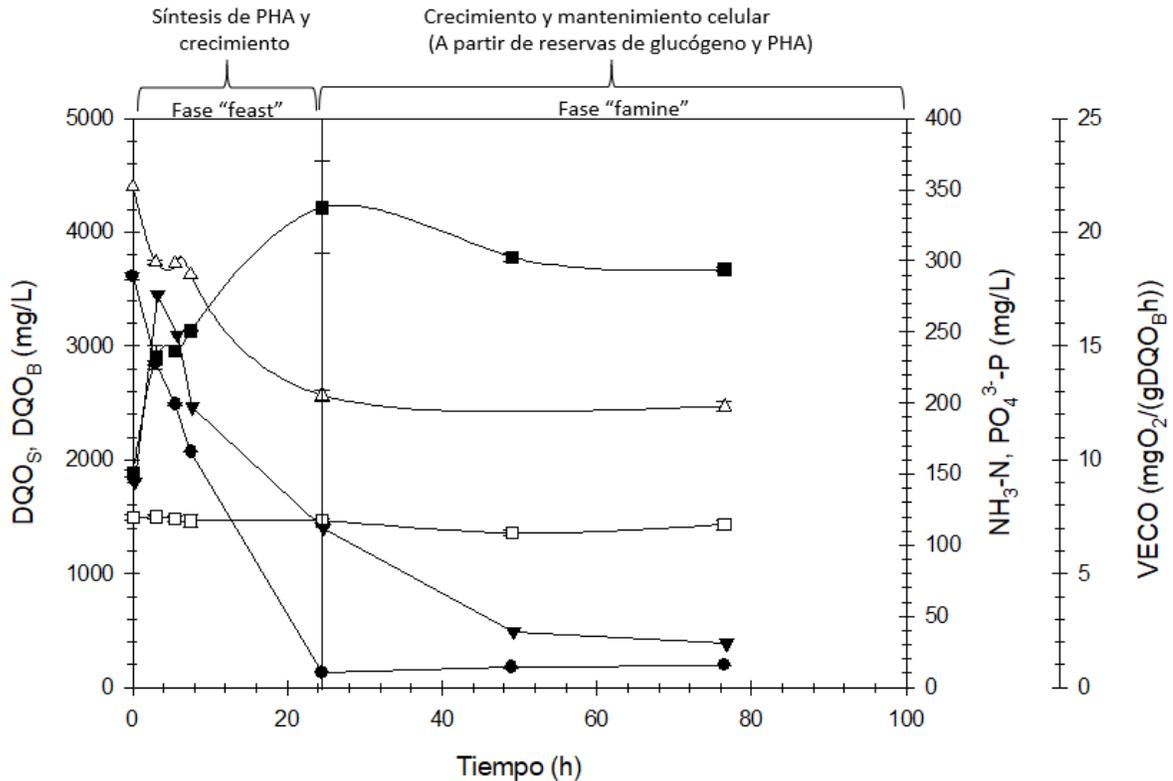
### 3.7 Resultados del Experimento 5

En el Experimento 5, el SBR de selección fue operado con un régimen aeróbico, a temperatura ambiente; el pH se mantuvo constante alrededor de 8,0. El TRC y TRH fue de 10 y 4,08 días respectivamente con ciclos de 3,5 días (84 hs). La carga orgánica aumentó a 1 gDQO/(L día) con una relación DQO:N:P= 100:10:5., mientras que las cargas volumétricas de nitrógeno y fosforo fueron 0,1 gN/(L día) y 0,05 gP/(L día) respectivamente (Tabla 3.3).

El SBR presentó ciclos típicos que consistían en fases Feast/Famine. La fuente de carbono externa se consumió por completo durante las primeras (20-24) hs correspondiente a la fase feast del ciclo o de disponibilidad del sustrato orgánico externo, lo cual se acercaba a la condición recomendada en bibliografía (etapa feast menor a 20% de la duración total del ciclo) (Figura 3.5); condición favorable para la selección de microorganismos con capacidad de acumular PHA. Durante el periodo feast, el amonio disminuyó significativamente mientras que el fósforo apenas se consumió. El consumo de sustrato y macronutrientes se relacionó con el incremento gradual de la biomasa microbiana, alcanzándose una concentración que duplicó el valor medido al inicio del ciclo. Cabe destacar que el incremento de biomasa incluyó el aumento de biomasa activa, por crecimiento microbiano, y probablemente la acumulación de reservas de PHA y glucógeno. La concentración de biomasa decayó ligeramente durante el período "famine" (Figura 3.5). El decaimiento de la biomasa puso de manifiesto la ocurrencia de fenómenos de mantenimiento celular a expensas del consumo de sustancias de reserva intracelular.

Después de 4 tiempos de residencia celular, se alcanzó un estado estable con una concentración de biomasa al final de la fase de feast entre 3900 mgDQO<sub>B</sub>/L y 4200

mgDQO<sub>B</sub>/L.

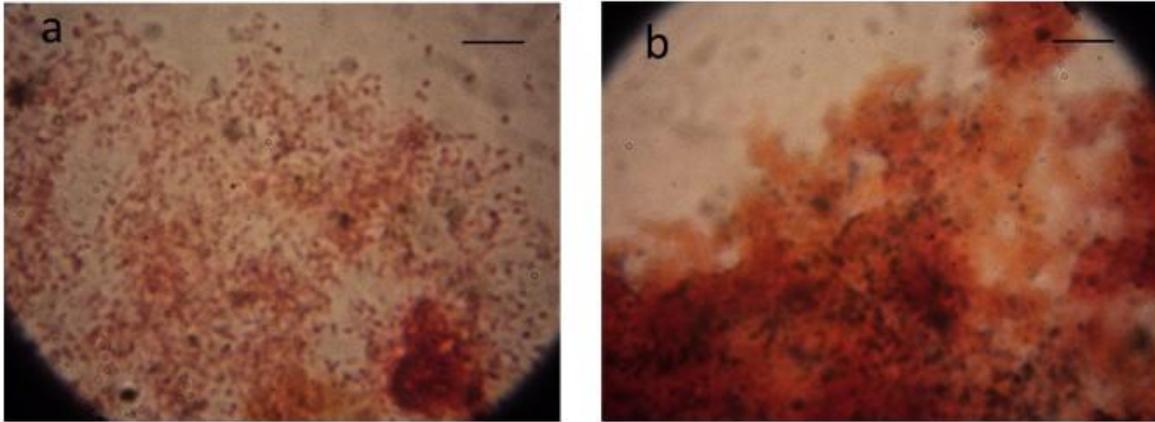


**Figura 3.5. Resultados del Experimento 5. Parámetros químicos de un ciclo de operación del SBR alimentado con medio de cultivo basado en suero de queso. (●) DQO soluble (DQO<sub>S</sub>, mg/L); (■) DQO de biomasa (DQO<sub>B</sub>, mg/L); (Δ) Nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>-N, mg/L); (□) Ortofosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P, mg/L); (▼) Velocidad específica de consumo de oxígeno (VECO, mgO<sub>2</sub>/(gDQO<sub>B</sub> h))**

La velocidad de consumo de oxígeno se incrementó durante la etapa inicial de aumento de la biomasa desde aproximadamente 9 mgO<sub>2</sub>/(gDQO<sub>B</sub> h) hasta 17 mgO<sub>2</sub>/(gDQO<sub>B</sub> h) y luego disminuyó progresivamente hasta 7 mgO<sub>2</sub>/(gDQO<sub>B</sub> h) al final de la fase "feast". Durante el tiempo restante del ciclo (fase Famine), la VECO disminuyó gradualmente hasta alcanzar finalmente valores 7 a 8 veces inferiores a los máximos valores medidos en la fase "feast".

### 3.7.1 Tinción y observación microscópica

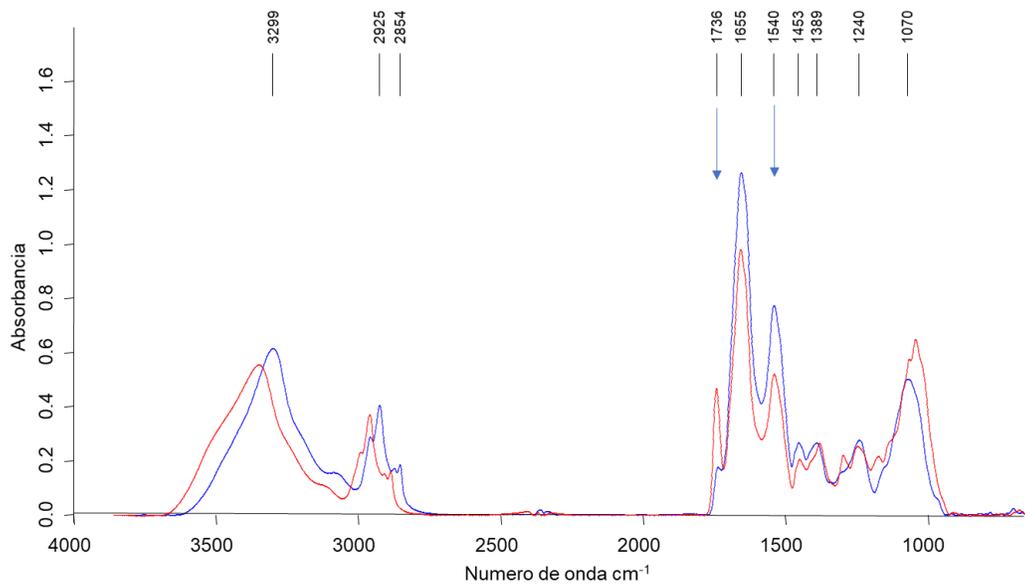
En el experimento 5 se observó la acumulación de PHA, por tinción y observación microscópica, durante la fase "Feast" de los ciclos del SBR (Figura 3.6).



**Figura 3.6. Micrografías de lodos activados con tinción Sudan Black del reactor SBR de selección de PHA experimento 5 con medio de cultivo basado en suero de queso. (a) Tiempo de operación: 0 hs. (b) Tiempo de operación: 24 hs. — 10  $\mu\text{m}$**

### 3.7.2 Determinación de polihidroxicanoato intracelular por FT-IR

A partir de tinción y observación microscópica se pudo observar que el PHA se almacenó en la fase feast mientras estaba presente el sustrato orgánico, por lo tanto, se procedió a realizar análisis de PHA por FT-IR con el fin de comprobar la acumulación de dicho polímero.



**Figura 3.7. Espectros de FT-IR de PHA obtenido en el experimento 5. — inicio de la fase feast, — final de la fase feast**

Las muestras se procesaron de acuerdo con la metodología del Capítulo 2, Sección

2.9.1.1. Dichas muestras evidenciaron señales de absorbancia alrededor de  $1736\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración del grupo funcional éster C=O del polímero de PHA (Figura 3.7). Un pico similar fue encontrado por Arcos-Hernandez y col (2010) trabajando con sistemas bacterianos de cultivo mixto. Además, se detectaron otras señales características de las proteínas celulares a  $1655\text{ cm}^{-1}$  y  $1540\text{ cm}^{-1}$ . Estos han sido reportados como Amida I y Amida II respectivamente (Arcos-Hernandez y col., 2010). También se encontró una señal a  $3299\text{ cm}^{-1}$  asignada a la vibración (estiramiento) de los grupos –OH. Los análisis de FT-IR se realizaron siguiendo el método propuesto por (Bosch y col., 2008). Dicho método relaciona el área del pico asignado al C=O del éster ( $1736\text{ cm}^{-1}$ ) y el pico de Amida II ( $1540\text{ cm}^{-1}$ ) usado como estándar interno de biomasa activa (Figura 3.7 y 3.8) conocido como valor  $\alpha$  (Capítulo 2, Sección 2.9.1.1).

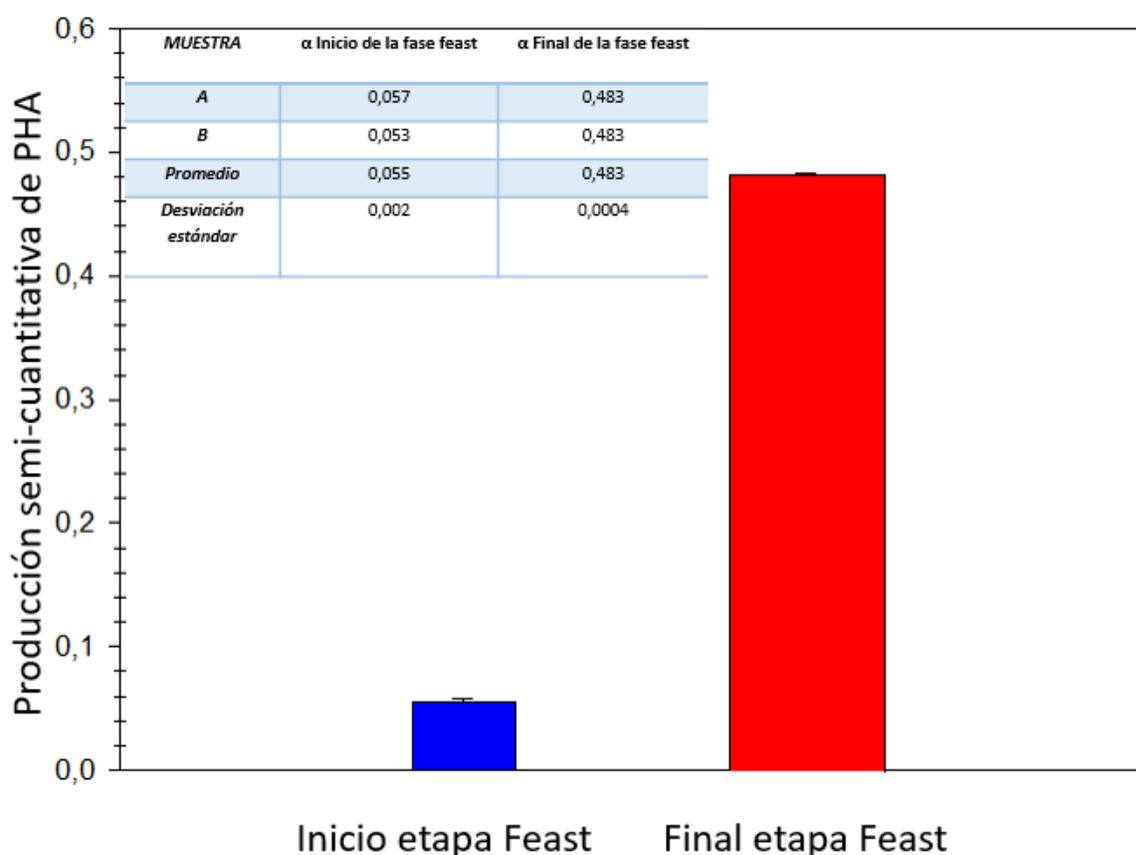


Figura 3.8. Producción semi-cuantitativa de PHA para el experimento 5 etapa de selección. ■ inicio de la etapa Feast. ■ final de la etapa Feast. A y B en la tabla insertada son las muestras con su correspondiente duplicado

Como se puede observar en la Figura 3.7 se presenta un aumento en el pico atribuido al PHA al final de la etapa “feast”, por lo tanto, se puede afirmar que el aumento

de biomasa determinado mediante DQO es atribuible no solamente al crecimiento o multiplicación celular sino también a la síntesis y almacenamiento de PHA (Chen y col., 2012). En consecuencia, se puede concluir que se logró una presión de selección más adecuada en el sistema cuando el TRC y TRH fue de 10 y 4,08 días respectivamente con ciclos de 3,5 días (84 hs), carga orgánica de 1 gDQO/(L día) y relación DQO:N:P= 100:10:5. Esto generó una ventaja competitiva de los microorganismos con capacidad de acumular PHA que pueden utilizar el sustrato almacenado en la fase famine (Guo y col., 2016).

### **3.8 Métodos de obtención de PHA a partir de la biomasa**

Algunos autores han propuesto diferentes metodologías de secado, extracción y purificación de PHA (Tabla 3.6).

Fuchtenbusch (1996) usó liofilización para deshidratar la biomasa, posteriormente la extracción la realizó por Soxhlet usando cloroformo como solvente; finalmente la precipitación del polímero la realizó con etanol y la separación del polímero por filtración, repitiendo el proceso de precipitación para obtener un polímero altamente purificado. Lutke-Eversloh y col (2001) liofilizó la biomasa y realizó la extracción con cloroformo; a continuación, separó los restos celulares por filtración y precipitó el polímero con etanol; el proceso de precipitación se realizó 3 veces con el fin de purificarlo. Bhatt y col (2008) realizó 3 lavados con acetona a la biomasa antes de ser secada en estufa al vacío a temperatura ambiente durante toda la noche, luego la depositó en un vaso de vidrio y la dejó en cloroformo a 30 °C durante toda la noche agitándola a 200 rpm; posteriormente los restos celulares se eliminaron por filtración y el extracto se concentró evaporando el cloroformo y se precipitó el PHA por adición gota a gota de metanol frío. El paso de precipitación se realizó tres veces para obtener el PHA purificado. Cavalheiro (2009) propuso deshidratar la biomasa por liofilización, posteriormente 250 mg de biomasa deshidratada fue llevada a vasos de vidrio con cloroformo (15ml) a 4°C durante 36 horas. Los restos celulares se separaron por filtración al vacío; el cloroformo con el polímero solubilizado fue precipitado con etanol a 4°C dejando reposar el preparado entre 1 y 2 horas, el PHA fue recuperado por filtración al vacío.

Kulkarni (2011) propuso la deshidratación de la biomasa por liofilización, el PHA se extrajo en cloroformo usando un evaporador rotatorio al vacío durante 3 horas; finalmente el polímero se separó por precipitación con metanol.

**Tabla 3.6. Diferentes metodologías de obtención de PHA**

Autor	Secado/deshidratación	Extracción/solvente	Separación de restos celulares	Precipitación	Separación de PHA	Purificación
Fuchtenbusch y col., 1996	Liofilización	Soxhlet cloroformo	N/A	Etanol	Filtración	Etanol
Lutke-Eversloh y col., 2001	Liofilización	Reflujo cloroformo	Filtración	Etanol	N/I	Etanol (3 veces)
*Bhatt y col., 2008	Estufa al vacío	Cloroformo 30°C toda la noche	Filtración	Metanol 4 °C	N/I	Metanol (3 veces)
Cavalheiro y col., 2009	Liofilización	Cloroformo (4°C, 36 horas)	Filtración al vacío	Etanol (4 °C, 1-2 horas)	Filtración al vacío	N/A
Kulkarni y col., 2011	Liofilización	Evaporador rotativo con cloroformo	N/A	Metanol	N/I	N/I
Ashby y col., 2011	Liofilización	Cloroformo 30°C toda la noche	Filtración	Metanol frio	N/I	Metanol (3 veces)
**López y Jimenez, 2012	Liofilización	Soxhlet Cloroformo (24 horas)	N/A	Metanol frio	N/I	N/I
Chuah y col., 2013	Liofilización	Reflujo cloroformo (60°C, 2 días)	Filtración	Hexano/ Metanol	N/I	N/I
Campos y col., 2014	Liofilización	cloroformo (60°C, 2 horas)	Filtración al vacío	N/A	N/A	N/A
Basset y col., 2015	Liofilización	cloroformo (70°C, 3 horas)	Filtración al vacío	Metanol frio	N/I	N/I

\* Pretratamiento a las células antes de ser secadas se lavaron 3 veces con acetona; \*\*Pretratamiento a las muestras antes de ser liofilizadas el cual consistía en lisar las células en hipoclorito de sodio a 37°C durante 12 horas luego fueron centrifugadas a 2500 RPM y el residuo fue lavado con agua, acetona etanol y éter dietílico; N/A: no aplica; N/I: no informa.

Ashby (2011) usó liofilización para deshidratar la biomasa y la extracción del polímero la realizó con cloroformo a 30 °C durante toda la noche con agitación a 250 rpm; los restos celulares fueron eliminados por filtración y el cloroformo que contenía el polímero fue evaporado; el sedimento obtenido se re-suspendió en cloroformo y se precipitó el PHA durante 3 veces mediante la adición de gota a gota de metanol frio. López y Jimenez (2012) realizó un pretratamiento a las muestras antes de ser liofilizadas, el cual consistía en lisar

las células en hipoclorito de sodio a 37°C durante 12 horas; luego las centrifugó a 2500 rpm y el residuo fue lavado con agua, acetona, etanol y éter dietílico. Finalmente, el residuo seco fue sometido a extracción Soxhlet con cloroformo durante 24 horas; la solución de cloroformo con el polímero fue concentrada por evaporación y el polímero se precipitó con metanol frío.

Chuah y col (2013) extrajo el polímero de las células liofilizadas por reflujo con cloroformo (60°C, 2 días); los restos celulares se eliminaron por filtración y la solución con el polímero se precipitó con hexano y metanol. Campos y col (2014) deshidrató la biomasa por liofilización, a continuación, re-suspendió 0,5 gramos de biomasa seca en 50 ml de cloroformo y se incubó a 60°C durante 2 horas con agitación vigorosa; los restos celulares fueron separados por filtración, la solución de cloroformo que contenía el polímero fue evaporada obteniendo un residuo seco que supusieron era PHA puro. Basset y col (2015) usó liofilización para deshidratar la biomasa, la extracción se realizó con cloroformo (50 ml/g de biomasa liofilizada), a 70°C durante 3 horas; los restos celulares se separaron por filtración; finalmente se realizó la precipitación con metanol.

### **3.8.1 Selección del método de obtención del PHA**

Tanto los ensayos de secado/deshidratación de la biomasa como el análisis del tiempo de extracción se realizaron con biomasa de un sistema batch de producción de PHA limitado en nutrientes. El reactor batch fue alimentado con el medio de cultivo limitado en nutrientes LN (suero de queso: 4,09 g/L y sulfato de amonio: 0,0963 g/L (Tabla 3.7)) e inoculado con lodos activados provenientes del SBR de selección de PHA (ensayo 5). Se tomaron muestras del reactor de producción a las 32 horas del ciclo de operación, dichas muestras fueron centrifugadas (Capítulo 2, Sección 2.7.1), secadas/deshidratadas y trituradas como se explica en la siguiente sección. Los ensayos fueron realizados por duplicado. Finalmente, se realizó la separación de los restos celulares por medio de bomba a vacío, se precipitó el PHA y purificó con una solución hidroalcohólica (ver Capítulo 2, Sección 2.7.2).

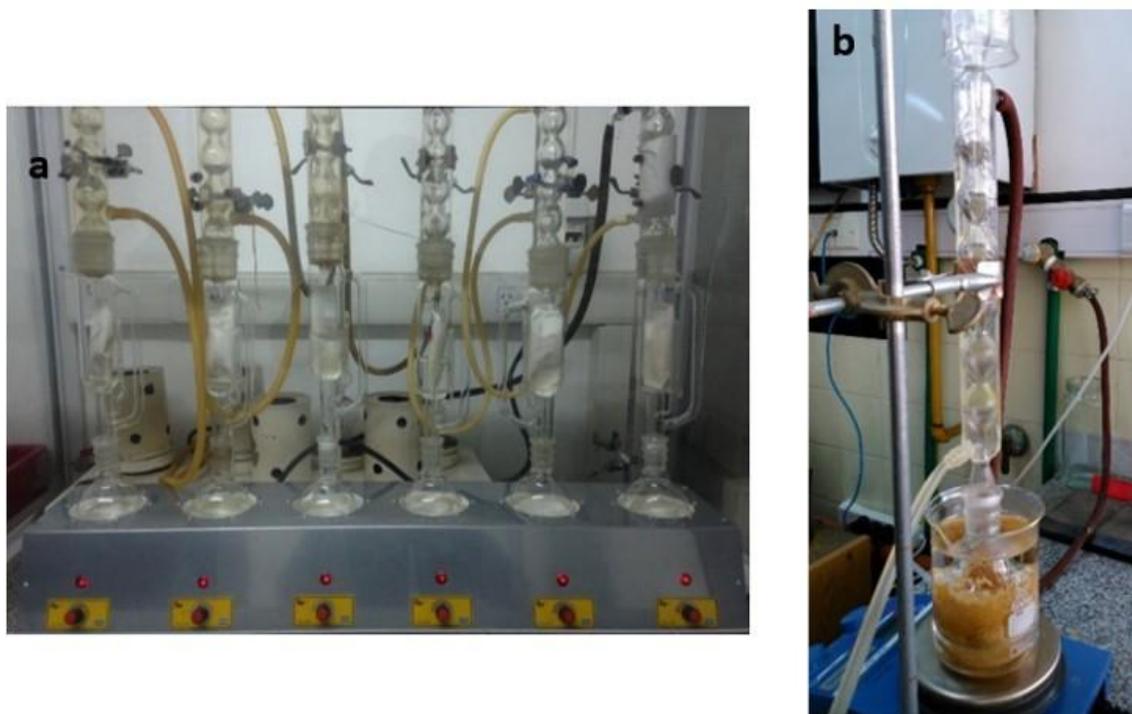
#### **3.8.1.1 Secado/deshidratación de biomasa y extracción de PHA**

Con el fin de determinar si el proceso de deshidratación/secado influye en el rendimiento de extracción de PHA se procedió a realizar la deshidratación/secado de la biomasa proveniente de un sistema de producción por dos métodos: (i) deshidratación por

liofilización y (ii) secado en estufa al vacío. Luego de lograr tener la biomasa deshidratada y seca por ambos métodos se procedió a realizar la extracción de PHA de cada una de las muestras por dos métodos (reflujo y Soxhlet) (Figura 3.9a y 3.9b). Ambas técnicas se realizaron con cloroformo como solvente de extracción.

Se realizaron los siguientes experimentos:

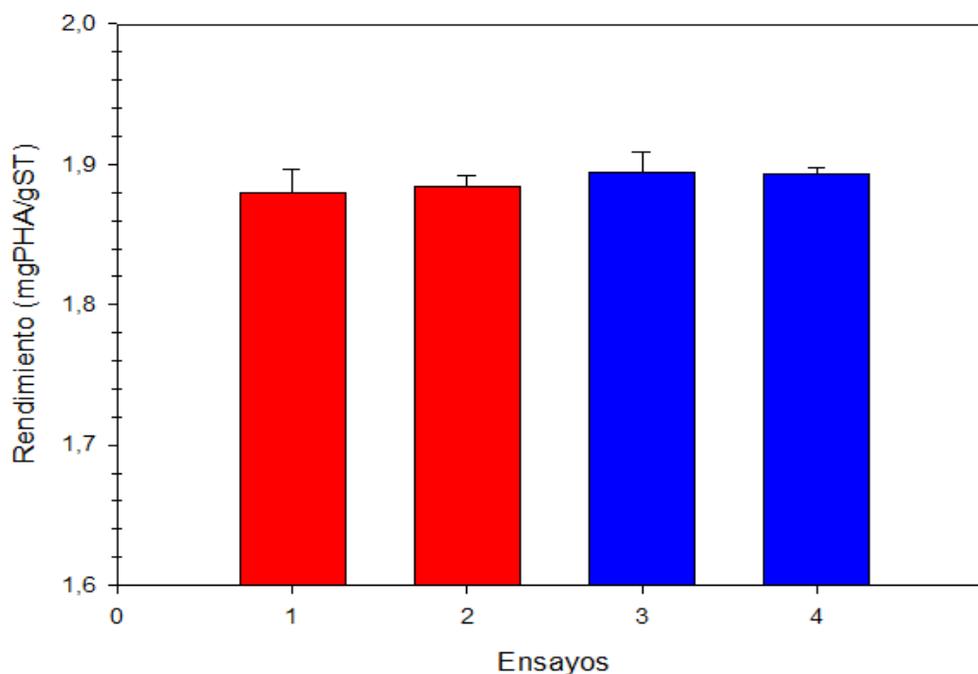
- Ensayo 1. Biomasa secada en estufa al vacío y extracción por reflujo.
- Ensayo 2. Biomasa secada en estufa al vacío y extracción por Soxhlet.
- Ensayo 3. Biomasa deshidratada por liofilización y extracción por reflujo.
- Ensayo 4. Biomasa deshidratada por liofilización y extracción por Soxhlet.



**Figura 3.9. a) Extracción de PHA mediante equipo Soxhlet, b) Extracción de PHA mediante reflujo**

Las muestras previamente centrifugadas se procedieron a deshidratar por liofilización o secado al vacío, hasta peso constante con el fin de garantizar la extracción total del agua (Capítulo 2, Sección 2.7.1). A continuación, la biomasa deshidratada por ambos métodos fue triturada con el fin de aumentar el área de contacto entre el solvente y la muestra, facilitando la extracción del PHA. Los lodos triturados fueron previamente

pesados y llevados a un proceso de extracción del PHA por medio de dos sistemas extracción: por reflujo (60 °C, 3 horas) o Soxhlet (60°C, 8 horas) usando cloroformo como solvente de extracción (Capítulo 2, Sección 2.7.2).



**Figura 3.10. Determinación del rendimiento de PHA para los diferentes métodos de secado y extracción de PHA correspondientes a los siguientes ensayos: 1 y 2 secados en estufa al vacío y extracción por reflujo y Soxhlet, 3 y 4 deshidratación por liofilización y extracción por reflujo y Soxhlet respectivamente**

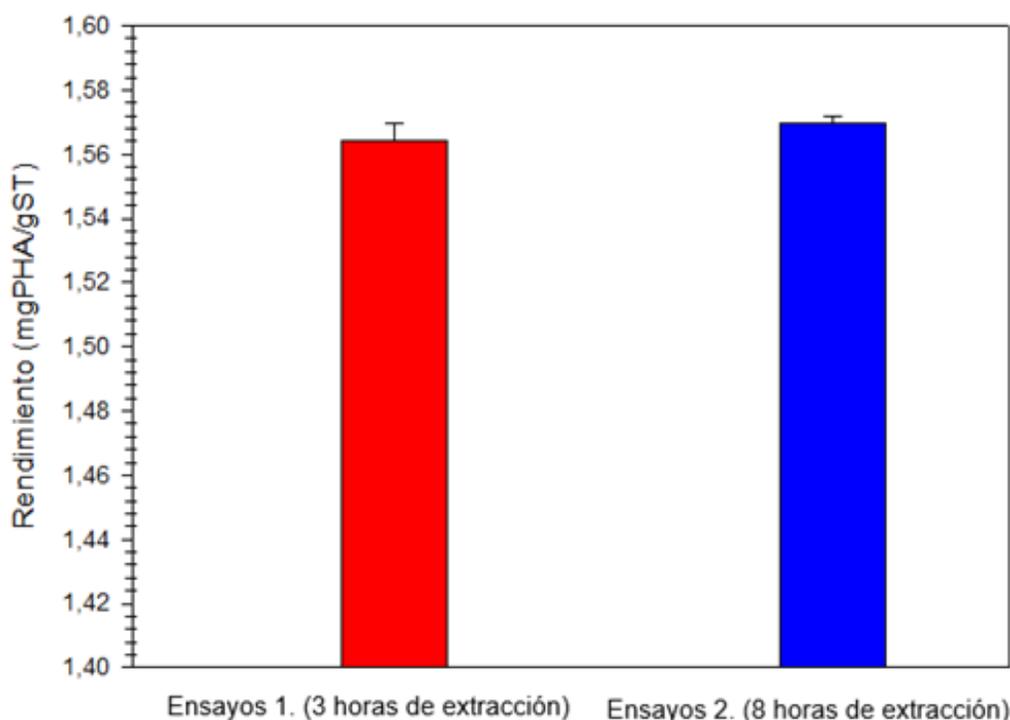
Los 4 ensayos realizados no mostraron diferencias significativas entre las técnicas de secado y extracción ( $P > 0,05$ ); las pequeñas diferencias pueden ser debido a errores por la pequeña cantidad de PHA extraído.

### **3.8.1.2 Tiempo de extracción por reflujo**

Una vez considerado el método de secado en estufa al vacío y método de reflujo como los métodos más económicos sin afectar el rendimiento de extracción de PHA, se determinó si el tiempo de extracción por reflujo sugerido por Basset y col., 2015 de 3 hrs era suficiente o si era necesario aumentarlo para poder obtener más cantidad de PHA. Para ello se realizaron dos ensayos:

Ensayo 1. Tiempo de extracción 3 hs por reflujo.

Ensayo 2. Tiempo de extracción 8 hs por reflujo.



**Figura 3.11. Efecto del tiempo de extracción por el método de reflujo en el rendimiento de obtención de PHA.**

La biomasa previamente centrifugada fue secada por medio de estufa al vacío (ver Capítulo 2, Sección 2.7.1) a continuación fue triturada y se procedió a realizar la extracción por reflujo (Capítulo 2, Sección 2.7.2) con tiempos de reacción de 3 y 8 horas.

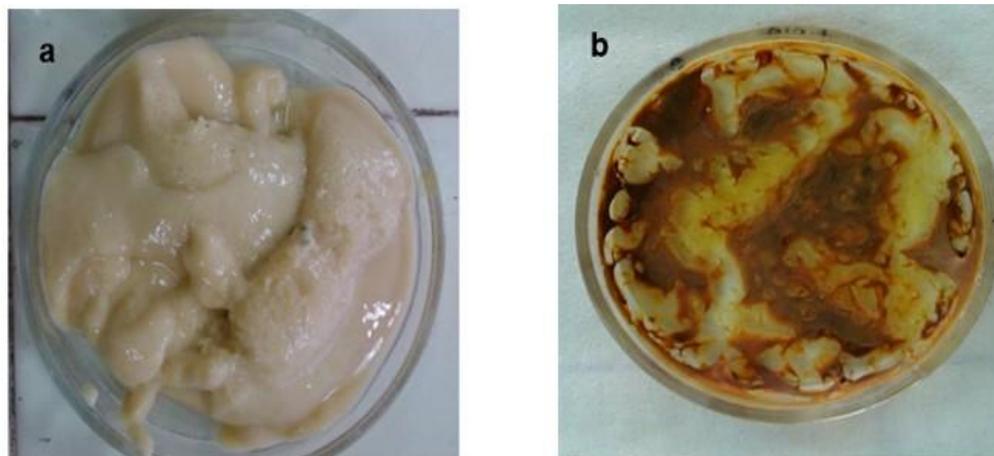
Los ensayos determinaron que no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el rendimiento de extracción de PHA para estos tiempos de reacción (Figura 3.11), por lo tanto, se optó por realizar todos los ensayos secando en estufa al vacío y la extracción por reflujo (3 hs).

### **3.9 Resultados obtenidos aplicando las condiciones óptimas del método de secado de biomasa, extracción y purificación del PHA**

#### **3.9.1 Centrifugación y secado de la biomasa**

Se tomaron muestras de ambos reactores batch de producción de PHA (limitado en nutrientes y limitado en oxígeno) a diferentes tiempos a lo largo del ciclo de producción. La biomasa extraída fue centrifugada a 7000 rpm durante 10 min en centrifuga Beckman (ver

Capítulo 2); los lodos centrifugados (Figura 3.12a) fueron lavados con agua destilada y nuevamente sometidos a centrifugación, este proceso se repitió 3 veces con el fin de eliminar cualquier interferencia en las técnicas de extracción.



**Figura 3.12. a) Biomasa luego del proceso de centrifugado, b) Biomasa secados en estufa al vacío**



**Figura 3.13. Biomasa luego del proceso de tritución**

El pellet resultante se secó a 60 °C en una estufa de vacío (ICSA Modelo DZF-6030A) a 60 KPa, hasta peso constante (Bhatt y col., 2008). Luego, el pellet seco (Figura 3.12b) se trituyó de manera manual usando un mortero (Figura 3.13) asegurando tener partículas lo más pequeñas que se pudieran lograr; con el fin de obtener mayor área de contacto entre el solvente y la biomasa. A continuación, se determinó el peso celular seco (PCS). El proceso de lavado, secado y tritución de biomasa se esquematiza en la Figura 3.14.

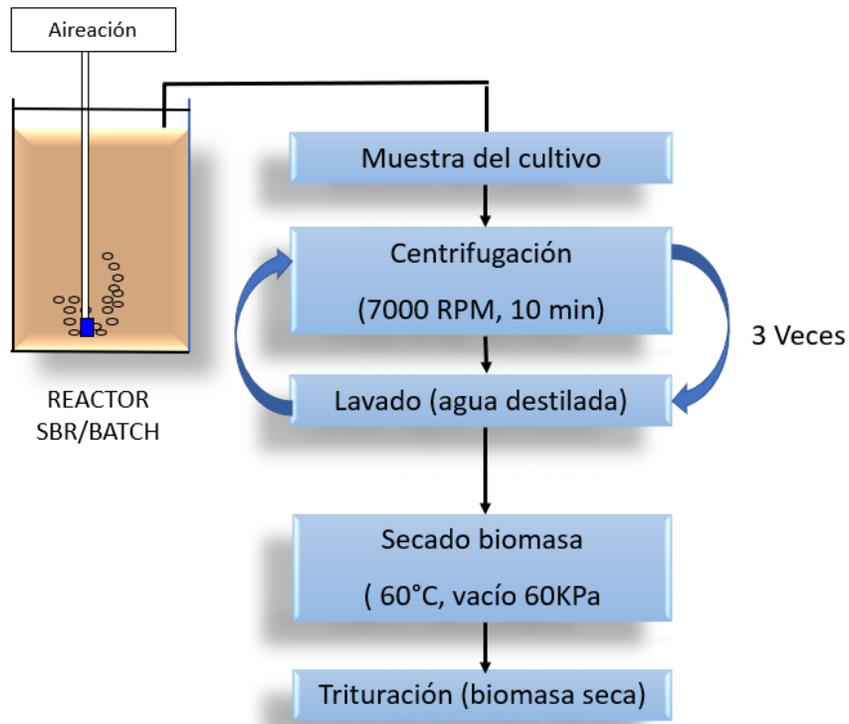


Figura 3.14. Esquema del proceso de lavado, secado y trituración de biomasa

### 3.9.2 Extracción y purificación de PHA

La extracción de PHA se realizó en balones de 250 ml, se tomaron los lodos previamente secados y triturados, se adicionaron en el balón, que contenía cloroformo y se llevaron a reflujo (Figura 3.15) con una relación de lodos secos:cloroformo de 0,5:20 (g/mL) a temperatura de 60°C con agitación constante (250 rpm) durante 3 horas (Basset y col., 2015; Fuchtenbusch y col., 1996; Campos y col., 2014).



Figura 3.15 Proceso de extracción de PHA por reflujo

Una vez alcanzado el tiempo de extracción se procedió a separar los restos celulares del cloroformo, el cual contiene material lipídico y PHA. La separación se realizó por medio de filtros de fibra de vidrio (Osmonics inc.) 1 micrón de tamaño de poro y 47 mm de diámetro usando una bomba de vacío acoplada a un filtro de gases; el filtro fue necesario debido a la producción de gases del cloroformo. Con el fin de garantizar que todo el PHA extraído quedara separado y no atrapado en los restos celulares y el filtro, se realizaron lavados de la biomasa que se depositaba en el filtro por medio de cloroformo previamente calentado a 60 °C.



**Figura 3.16. a) Solución de cloroformo libre de restos celulares; b) PHA precipitado con alcohol; c) PHA purificado**

El cloroformo previamente separado de los restos celulares fue depositado en tubos de ensayo (Figura 3.16a). Posteriormente el PHA presente en la solución de cloroformo fue precipitado por medio de una solución de alcohol etílico al 96% a 4°C con una relación 4:1 de alcohol: muestra y agitación manual vigorosa. A continuación, la muestra fue centrifugada durante 5 min a 3000 rpm (Figura 3.16b), se eliminó el sobrenadante y se procedió a realizar el proceso de purificación. Dicho proceso se realizó resuspendiendo el polímero en alcohol etílico al 50% a 4°C con agitación vigorosa, posteriormente se centrifugó y eliminó el sobrenadante (Figura 3.16c); el procedimiento se repitió 3 veces

(Lutke-Eversloh y col., 2001).



**Figura 3.17 PHA húmedo preparado para el secado**



**Figura 3.18. PHA seco**

Se observó un cambio de la coloración del PHA de marrón claro a blanco (Figura 3.16b y Figura 3.16c), posiblemente por la presencia de material lipídico y restos de cloroformo contenidos entre la matriz del polímero, los cuales fueron arrastrados durante los diferentes lavados (Figura 3.16c).

El polímero húmedo purificado (Figura 3.17) fue secado en estufa al vacío (60 °C, 60 KPa) hasta peso constante (Figura 3.18). El polímero resultante fue analizado por diferentes técnicas analíticas: Espectrofotometría UV-Visible, Calorimetría Diferencial de

Barrido, espectrometría FT-IR y Microscopia Electrónica de Barrido (Ver Capítulo 5).

### **3.10 Sistema de producción de PHA con suero de queso**

#### **3.10.1 Condiciones optimizadas para la producción de PHA**

De los resultados obtenidos del experimento 5 se concluyó que el SBR de selección operado con un TRC y TRH de 10 días y 4,08 días respectivamente con ciclos de 3,5 días (84 hs), carga orgánica de 1 gDQO/(L día) con una relación DQO:N:P= 100:10:5, cargas volumétricas de nitrógeno y fósforo de 0,1 gN/(L día) y 0,05 gP/(L día) respectivamente; fue el experimento donde se logró las mejores condiciones de selección de microorganismos con capacidad de acumulación de PHA. A continuación, se detalla el sistema de producción de PHA en reactor batch.

#### **3.10.2 Puesta en marcha del reactor Batch para la producción de PHA**

El sistema de producción de PHA se llevó a cabo en un reactor batch aeróbico sin control de pH y a temperatura ambiente a partir del cultivo mixto con capacidad de acumular PHA, se utilizó como fuente de carbono suero de queso.

Para los diferentes ensayos de producción se utilizaron lodos provenientes del experimento 5 del sistema de selección previamente estabilizado tomándose los lodos al final de la fase famine.

#### **3.10.3 Ensayos experimentales**

Se realizaron dos experimentos de producción de PHA con suero de queso como fuente de carbono y energía mediante los ensayos:

LN: Limitado en nutrientes.

LO: Limitado en oxígeno sin adición de nutrientes.

#### **3.10.4 Agua residual sintética (ARS)**

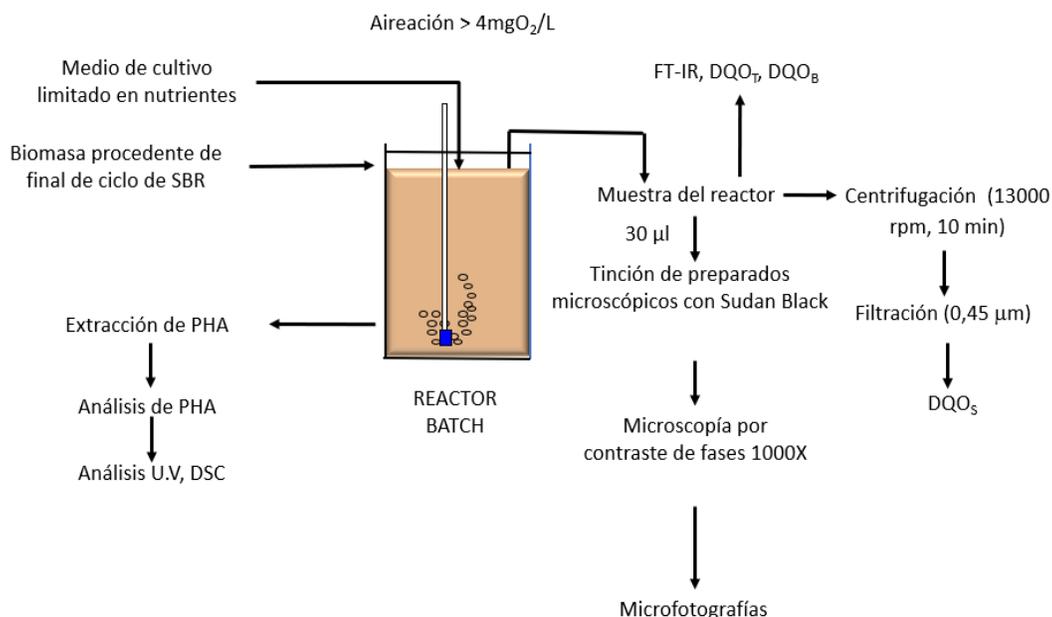
En la tabla 3.7 se presenta la composición del agua residual sintética expresada en demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno (N) y fósforo (P) para los diferentes ensayos del sistema de producción. Para el experimento limitado en nutrientes se mantuvo una relación DQO:N:P= 100:0,5:0,25 mientras que para el experimento limitado en oxígeno no se adicionó fuente de nitrógeno ni fósforo.

**Tabla 3.7. Agua residual sintética de los ensayos estudiados**

Agua residual sintética (ARS)	Ensayo LN (g/ L)	Ensayo LO (g/L)
Suero de queso	4,09	4,09
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0963	----
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0275	----
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,0219	----
NaHCO <sub>3</sub>	3	3

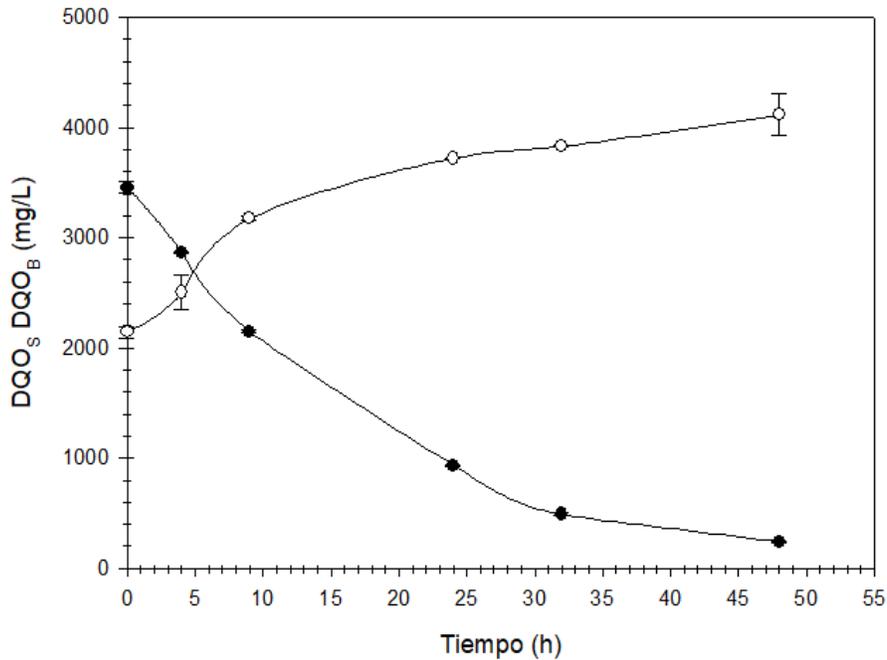
### 3.11 Sistema limitado en nutrientes (LN)

El reactor batch fue operado con exceso de aireación a temperatura ambiente (15-18 °C) y sin control de pH. Para favorecer la acumulación de PHA el sistema fue limitado en nutrientes y con exceso de la fuente de carbono (Braunegg y col., 2004). Las concentraciones de N y P fueron 20 veces inferiores a las utilizadas en la etapa de selección con una relación DQO:N:P de 100:0,5:0,25. En la Figura 3.19 se puede observar el sistema de producción donde se esquematiza los diferentes análisis realizados.



**Figura 3.19. Esquema del sistema de producción de PHA limitado en nutrientes (LN)**

En la Figura 3.20 se presentan las curvas de consumo de sustrato orgánico e incremento de biomasa correspondientes al sistema limitado en nutrientes con alta concentración de oxígeno. La concentración inicial de sustrato orgánico fue 3395 mgDQOs/L, requiriéndose aproximadamente 48 hs para la remoción del 93% de la materia orgánica. La concentración de biomasa aumentó progresivamente a medida que se consumía el sustrato hasta las 24-32 hs de cultivo; el consumo posterior de sustrato no produjo un incremento significativo de biomasa.



**Figura 3.20. Consumo de sustrato orgánico e incremento de biomasa del reactor batch, limitado en nutrientes (LN) alimentado con medio de cultivo a base de suero de queso, en función del tiempo (h). (●) DQO soluble (DQO<sub>S</sub>, mg/L). (○) DQO de biomasa (DQO<sub>B</sub>, mg/L). Lodos activados provenientes del SBR de selección (Ensayo 5, con 7,7 TRC transcurridos)**

Cabe destacar que el incremento de biomasa medida como DQO<sub>B</sub> puede deberse a crecimiento microbiano como a la síntesis de sustancias intracelulares de reserva cómo se explicará posteriormente. Se logró determinar la carga específica de sustrato orgánico ( $675 \pm 22$  mgDQOs/(gDQO<sub>B</sub> día)) y la velocidad volumétrica de remoción de sustrato carbonáceo  $r_S$  durante las primeras 8 horas del proceso de producción de PHA ( $115 \pm 42$  mgDQOs/(L h)).

El reactor batch exhibió acumulación de PHA según lo determinado por tinción con Sudan Black y observación microscópica (Figura 3.21).

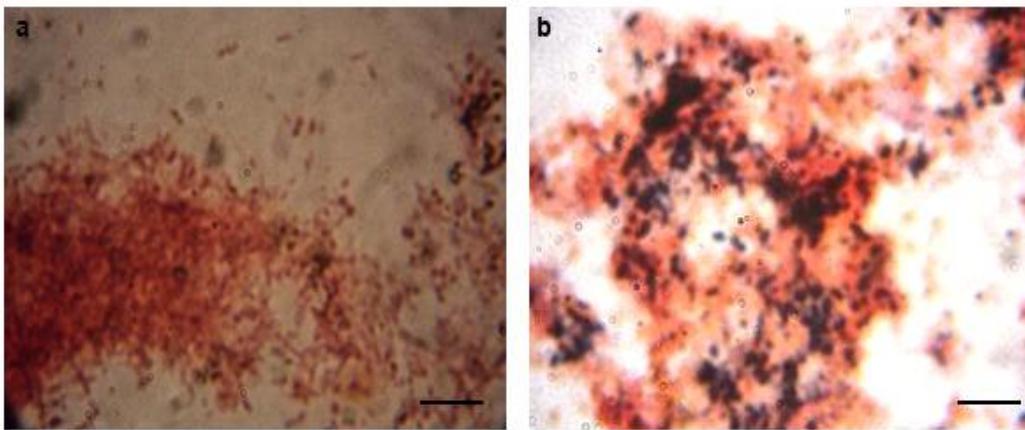


Figura 3.21. Micrografías de lodos activados con tinción Sudan Black del reactor batch de producción de PHA limitado en nutrientes (LN) con medio de cultivo basado en suero de queso. (a) Tiempo de operación: 0 hs. (b) Tiempo de operación: 48 hs. — 10 µm. (Lodos activados provenientes del ensayo 5 de selección)

### 3.11.1 Determinación de polihidroxicanoatos intracelulares por FT-IR

La determinación de PHA por medio de FT-IR se realizó siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 2, Sección 2.9.1.1. La Figura 3.22 muestra el aumento de PHA, para el reactor de producción de PHA limitado en nutrientes.

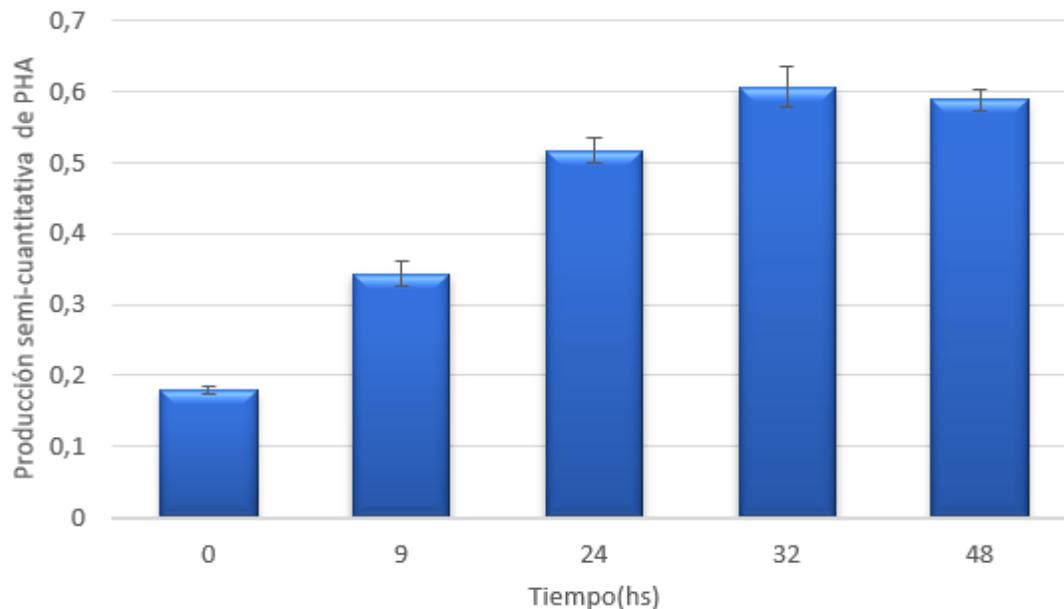


Figura 3.22. Ensayo batch de producción de PHA limitado en nutrientes (LN). Aumento de PHA intracelular determinado por FT-IR durante un ciclo de producción. Se utilizaron lodos activados provenientes del ensayo 5 de selección. La relación de picos (alfa) o Parámetro  $\alpha$  representa la producción semi-cuantitativa de PHA

Se evidenció un aumento del biopolímero intracelular determinado por el valor  $\alpha$ , el

cual fue definido como la relación entre el área del pico asignado al C=O del éster y la banda de Amida II es decir APHA/AAm calculado a partir de los espectros de FT-IR obtenidos a diferentes tiempos del ciclo de producción. El sistema de lodos activados mostró un aumento en la biomasa hasta las 32 horas del ciclo, como se explicó previamente (Figura 3.20), donde se observó un incremento de la señal  $\alpha$  de PHA de 0,17 hasta 0,60 para el cual se encontró el máximo punto de producción de PHA (Figura 3.22).

A las 48 horas se observó una disminución de la señal  $\alpha$  a 0,58; posiblemente este comportamiento se pueda atribuir al agotamiento de la fuente de carbono y energía externa lo cual obliga a los microorganismos a utilizar la fuente de carbono intracelular para su mantenimiento. El aumento de PHA es alrededor de 3,5 veces mayor en su punto máximo (32 horas) en relación con el tiempo cero.

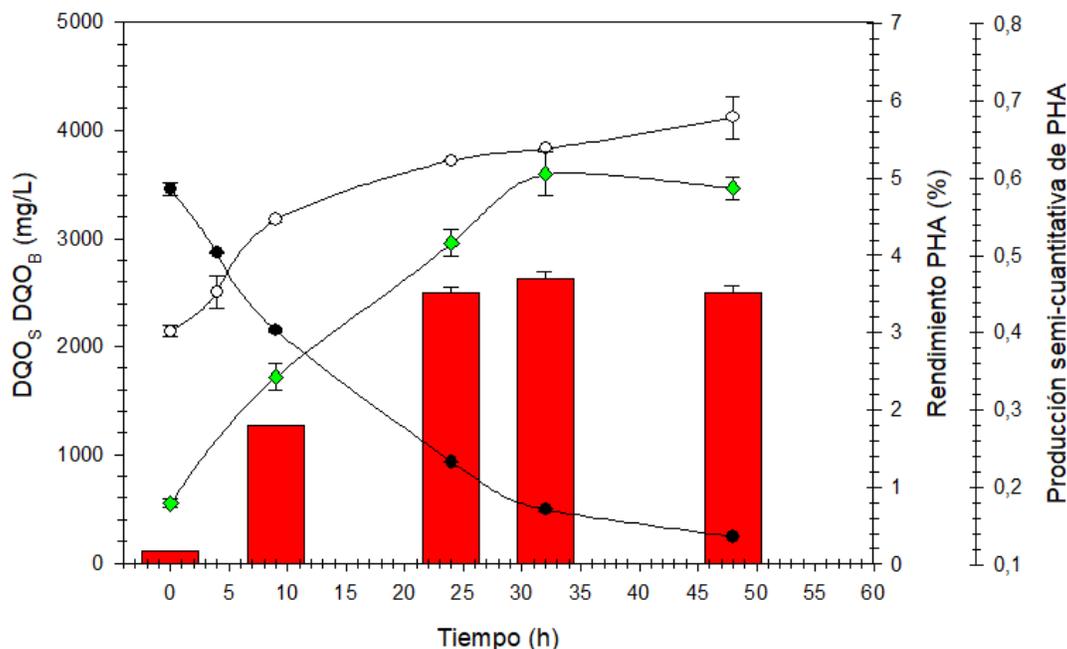
### **3.11.2 Cuantificación de PHA, rendimiento y pureza**

Se determinó la producción de PHA del reactor batch limitado en nutrientes (LN) a diferentes tiempos de operación. Se utilizó el método de secado de biomasa, extracción y purificación del PHA descrito en la Sección 3.9. El PHA obtenido en el sistema LN fue analizado por espectrofotometría UV, siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 2, Sección 2.7.3. Se procedió a pesar entre 30-35 mg de polímero previamente extraído y purificado de los lodos activados del sistema de producción. El polímero fue llevado a un tubo de vidrio al cual se le añadió ácido sulfúrico grado analítico hasta un volumen final de 5 ml, la mezcla fue calentada a 100 °C en baño maría por 10 min, finalmente la solución se enfriaba rápidamente en un baño de hielo y se midió absorbancia a 235 nm para determinar la concentración de PHA total (mg/L). Los resultados del sistema de producción limitado en nutrientes se presentan en la Figura 3.23.

El sistema de producción de PHA mostró un aumento gradual del polímero con un rendimiento desde 0,2% hasta su punto máximo a las 32 horas alrededor de 3,7 % y una leve disminución a las 48 horas (3,5%). El aumento que se percibió desde el punto cero al máximo (32 horas) fue alrededor de 23 veces. La misma tendencia de aumento hasta las 32 horas con una leve disminución a las 48 horas fue determinada por los análisis de FT-IR (Figura 3.22 y Figura 3.23).

EL PHA disminuía después de agotarse la fuente de carbono asimilable; esto puede atribuirse al inicio de la fase de inanición en la que los gránulos de PHA almacenados se

utilizan para mantener la actividad celular normal en ausencia del sustrato carbonáceo exógeno (Venkata-Mohan y col., 2010).



**Figura 3.23. Sistema de producción limitado en nutrientes (LN). (●) DQO<sub>S</sub> (mg/L); (○) DQO<sub>B</sub> (mg/L); (◆) Relación picos (alfa); barras verticales representan el rendimiento de PHA (%)**

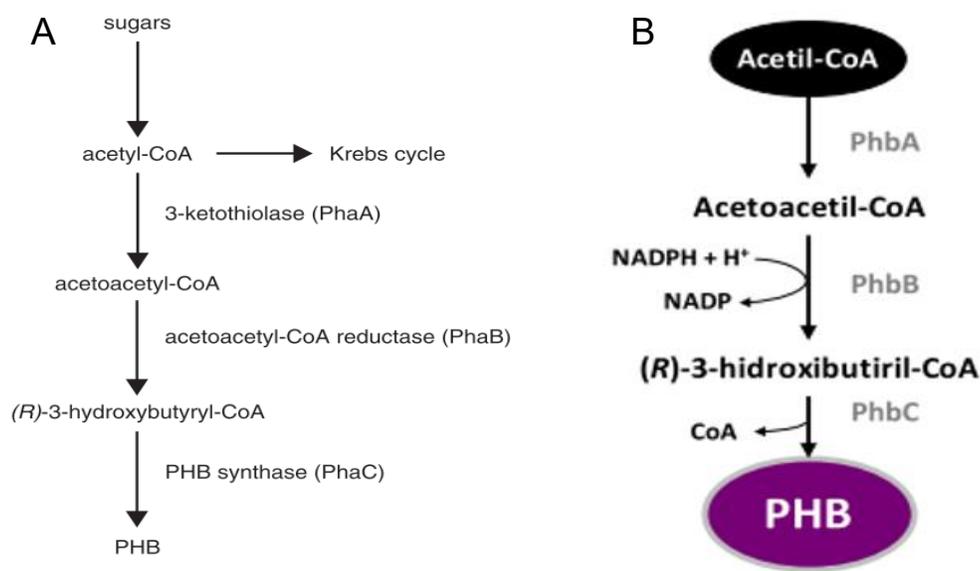
En el presente trabajo de Tesis se obtuvo un rendimiento máximo de PHA, a partir de suero de queso parcialmente hidrolizado, en el sistema limitado en nutrientes de 3,7%, con una pureza del polímero de alrededor del 94%. Cabe destacar que los sistemas ricos en carbohidratos como el suero de queso favorecen la síntesis de glucógeno.

El objetivo en la producción de PHA fue maximizar la fracción de materia prima, como el carbono fácilmente biodegradable, para que se produzca PHA minimizando el crecimiento de biomasa. Para lograrlo generalmente es necesario amortiguar el crecimiento de la biomasa en relación con los procesos de almacenamiento de PHA. Esto se logra limitando el suministro de nutrientes, lo que garantiza que el carbono se consuma únicamente para la producción de PHA. Sin embargo, para la producción de PHA utilizando cultivos mixtos a partir de residuos ricos en nutrientes como lo es el suero de queso, es difícil promover el almacenamiento de PHA sobre el crecimiento celular ya que siempre tienen nutrientes disponibles. Por lo tanto, una opción es limitar el oxígeno (Pratt y col., 2012).

En los sistemas anaeróbicos-aeróbicos la acumulación de PHA se presenta de la

siguiente forma: en la fase anaeróbica los microorganismos absorben el sustrato orgánico consumiendo polifosfato y/o glucógeno como fuente de energía mientras se acumula PHA; en la fase aeróbica utilizan el PHA de forma oxidativa para el crecimiento y la regeneración de polifosfato y/o glucógeno. Sin embargo, este sistema limita la acumulación de PHA al agotamiento de la reserva de polifosfato y/o glucógeno intracelular en la fase anaeróbica. **Condiciones limitadas de oxígeno** pueden favorecer la producción de PHA; cuando los microorganismos entran en contacto con el sustrato orgánico en presencia de una cantidad limitada de oxígeno, ellos pueden absorber sustratos orgánicos obteniendo energía mediante la degradación oxidativa del sustrato orgánico. Si el suministro de oxígeno es alto los microorganismos pueden obtener energía para actividades de asimilación como la producción de proteínas, glucógeno y otros componentes celulares simultáneamente con la absorción de sustratos orgánicos. Si se regula el oxígeno es posible suprimir dicha actividad de asimilación mientras los microorganismos acumulan PHA (Satoh y col., 1998), pues el PHA puede actuar como sumidero de electrones para mantener el balance celular redox bajo condiciones limitadas de oxígeno.

Third y col (2003) estudiaron la influencia de la limitación de oxígeno en la producción de PHA utilizando acetato como fuente de carbono, dicho estudio reporta que hasta el 77% de los equivalentes de reducción presentes en el acetato se convirtieron en PHB bajo limitación de oxígeno ( $DO = 0$  mg/L) en comparación con el 54% en condiciones de exceso de oxígeno ( $DO > 0,9$  mg/L), donde una fracción mayor de acetato se utilizó para el crecimiento de biomasa. Dicho estudio reportó que incluso cuando el crecimiento no está limitado por el oxígeno, las células acumulaban grandes cantidades de acetil-CoA internamente, fomentando la producción de PHB. Sin embargo, la proporción relativa de acetil-CoA canalizada hacia la producción de PHB, en lugar del crecimiento de biomasa, cambia con el aumento del suministro de oxígeno. El PHB se forma a partir de acetil-CoA en tres pasos enzimáticos (Figura 3.24A y B). En un primer lugar tiene lugar la condensación de dos moléculas de acetil-CoA dando lugar a acetoacetil-CoA mediante una  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa (PhbA) codificada por el gen phbA. A continuación, el acetoacetil-CoA generado es reducido de manera estereoselectiva a (R)-3-hidroxiacetil-CoA por una deshidrogenasa dependiente de NADPH denominada acetoacetil-CoA reductasa (PhbB). Por último, los monómeros de (R)-3-hidroxiacetil-CoA son polimerizados por la polimerasa de PHB (PhbC) que codifica el gen phbC (Fernández, 2012).



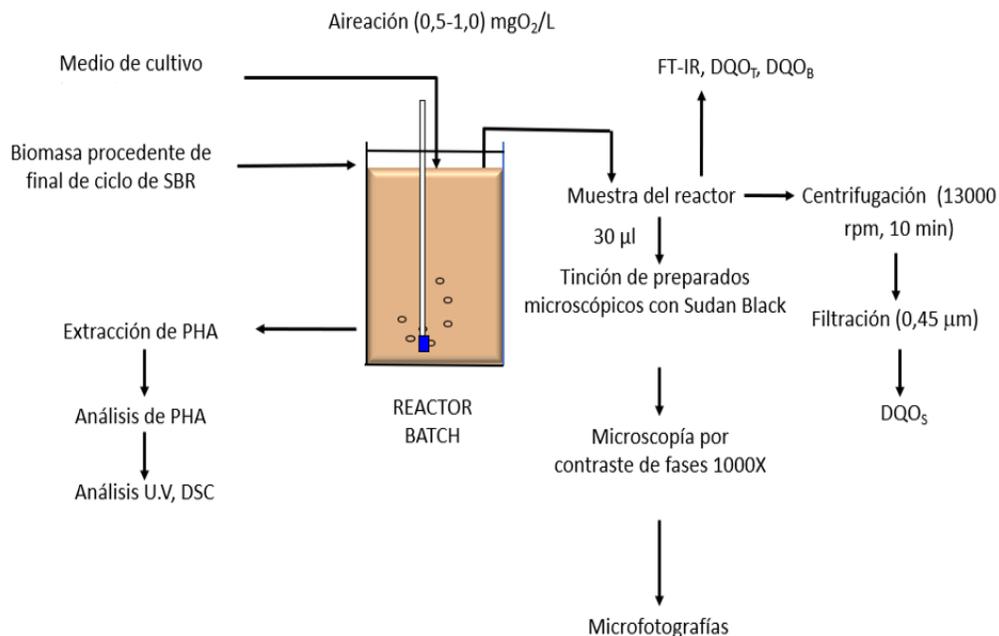
**Figura 3.24. A) Ruta metabólica de la síntesis de PHB a partir de azúcares. B) Ruta metabólica de la síntesis de PHB a partir de acetil-coA. Adaptado de Verlinden R y col., (2007) y Fernández, (2012)**

La producción de PHB requiere Acetil-CoA y poder reductor (NADH) (Figura 3.24B), mientras que la síntesis de biomasa requiere acetil-CoA y ATP (y algo de NADPH). Por lo tanto, la distribución de acetil-CoA entre estas dos vías dependerá de la disponibilidad de NADH y ATP respectivamente. Durante el crecimiento bacteriano normal, la enzima PhbA es inhibida por la coenzima A libre que se libera del ciclo de Krebs. Pero cuando la entrada de acetil-CoA en el ciclo de Krebs está restringida (durante la limitación de nutrientes no carbonados), el exceso de acetil-CoA se canaliza hacia la biosíntesis de PHB (Verlinden y col., 2007). Un sistema limitado en oxígeno produce menos ATP por lo tanto es de esperar que esta condición favorezca la síntesis de PHB (Third y col., 2003) utilizando el exceso de NADH generado a partir del catabolismo de sustratos orgánicos (lípidos, carbohidratos etc.), hasta la formación de acetil-CoA, como también a partir del ciclo de Krebs limitado.

Moralejo-Garate y col. (2013) estudiaron el impacto de la concentración de oxígeno en un sistema de producción de PHA alimentado con glicerol crudo, encontrando que en los sistemas limitados en oxígeno se favorece el almacenamiento intracelular de glucógeno sobre el de PHB, en comparación con los sistemas donde el oxígeno está en exceso donde la producción de PHB se vio favorecida. Pratt y col (2012) estudió el impacto de altas y

bajas concentraciones de oxígeno (5,5 mg/L y 0,2 mg/L, respectivamente) en la producción de PHA usando ácidos grasos libres, encontrando que el sistema de baja concentración de oxígeno acumula en las primeras horas hasta un 50% más de PHA intracelular, sin embargo la capacidad de acumulación no se ve afectada, ambos sistemas acumularon alrededor del 35% al final del proceso de producción; el tiempo necesario para alcanzar la máxima capacidad de acumulación fue tres veces más rápido en las condiciones de alta concentración de oxígeno.

### 3.12 Sistema limitado en oxígeno (LO)



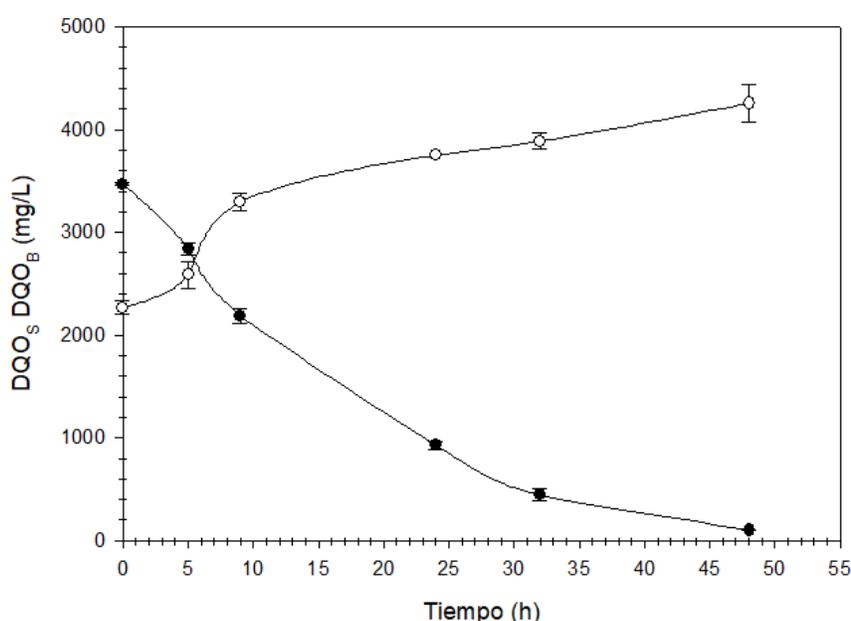
**Figura 3.25. Esquema del sistema de producción de PHA limitado en oxígeno (LO)**

La producción de PHA limitado en oxígeno se llevó a cabo a partir del sistema SBR de selección previamente estabilizado (ensayo 5). El sistema se desarrolló en un reactor batch limitado en oxígeno (0,5-1,0) mgO<sub>2</sub>/L (Figura 3.25) con suero de queso como fuente de carbono y sin adición de nutrientes (Tabla 3.7). El reactor fue operado a temperatura ambiente y sin control de pH.

Las curvas de consumo de la fuente de carbono y el aumento de biomasa están representadas en la Figura 3.26.

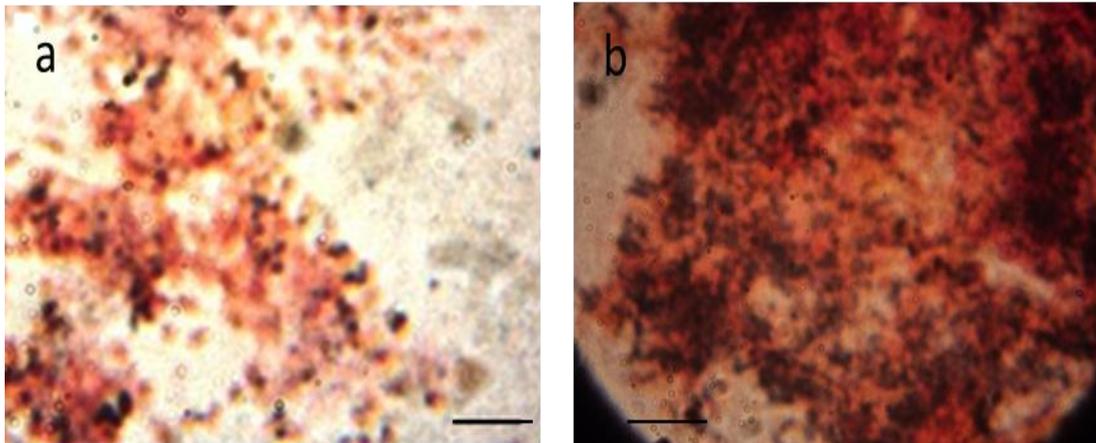
La concentración inicial de sustrato orgánico fue de 3358 mgDQOs/L. El consumo

de sustrato se dio de manera gradual al igual que el aumento en la concentración de biomasa, lográndose una remoción del 97,1 % del sustrato orgánico a las 48 horas. El aumento de la biomasa estuvo ligado a la síntesis y acumulación de PHA y glucógeno, debido a la restricción del crecimiento microbiano generado por la falta de nutrientes y la limitación de oxígeno. Sin embargo, no puede descartarse síntesis microbiana a partir del carbono orgánico y nutrientes del suero de queso como será discutido posteriormente. La carga específica de sustrato orgánico fue de  $667 \pm 17$  mgDQOs/(gDQO<sub>B</sub> día); mientras que la velocidad volumétrica de remoción de sustrato carbonáceo ( $r_s$ ) medida en las primeras 8 horas fue  $114 \pm 38$  mgDQOs/(L h).



**Figura 3.26. Consumo de sustrato orgánico e incremento de biomasa del reactor batch, alimentado con suero de queso limitado en oxígeno (LO), en función del tiempo (h). (●) DQO soluble (DQO<sub>S</sub>, mg/L). (○) DQO de biomasa (DQO<sub>B</sub>, mg/L). Lodos activados provenientes del SBR de selección (Ensayo 5, con 4,6 TRC transcurridos)**

Valores similares de carga específica de sustrato orgánico y velocidad volumétrica de remoción de sustrato fueron encontrado para el sistema limitado en nutrientes:  $675 \pm 22$  mgDQOs/(gDQO<sub>B</sub> día) y  $115 \pm 42$  mgDQOs/(L h), respectivamente, lo cual nos indica que la limitación de oxígeno no generó una influencia significativa en el consumo de la fuente de carbono, demostrando que la limitación en oxígeno puede ser una opción más económica al disminuir el consumo energético del proceso sin verse afectado el rendimiento de producción.



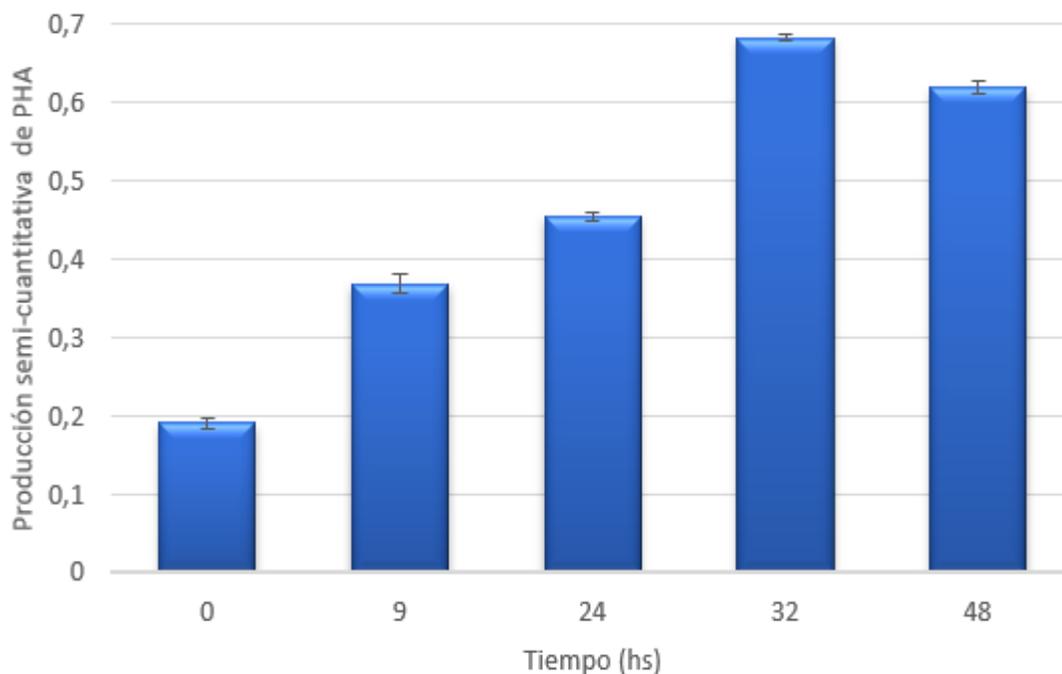
**Figura 3.27. Experimento limitado en oxígeno (LO). Micrografías de lodos activados con tinción Sudan Black del reactor batch de producción de PHA con medio de cultivo basado en suero de queso. (a) Tiempo de operación: 0 hs. (b) Tiempo de operación: 48 hs. — 10  $\mu\text{m}$**

A partir de los preparados microscópicos que fueron teñidos con una solución de Sudan Black (Figura 3.27) se pudo determinar la presencia de PHA intracelular; por lo tanto, se procedió a realizar el análisis por FT-IR para comprobar la acumulación de dicho polímero.

### **3.12.1 Determinación por FT-IR de polihidroxicanoatos**

La Figura 3.28 muestra la cinética de producción de PHA para el reactor de producción de PHA limitado en oxígeno y sin fuente de nutrientes. Se logró evidenciar un aumento del biopolímero intracelular determinado por el valor  $\alpha$  calculado a partir de los espectros de FT-IR obtenidos a diferentes tiempos del ciclo de producción. Se determinó un punto máximo de acumulación de PHA a las 32 horas con un incremento del parámetro semi-cuantitativo  $\alpha$  pasando de 0,18 en su punto inicial a 0,68, lo que implica un aumento de 3,7 veces. Al final del ciclo (48 horas) se evidenció una reducción de  $\alpha$  a 0,61.

El máximo valor del  $\alpha$  estimado en el sistema de producción limitado en nutrientes (Figura 3.22) fue de 0,60 el cual es alrededor de un 11% inferior al determinado para el sistema limitado en oxígeno que era de 0,68. Sin embargo por el análisis de varianza no se encontraron diferencias significativas entre los dos sistemas ( $P > 0,05$ ).



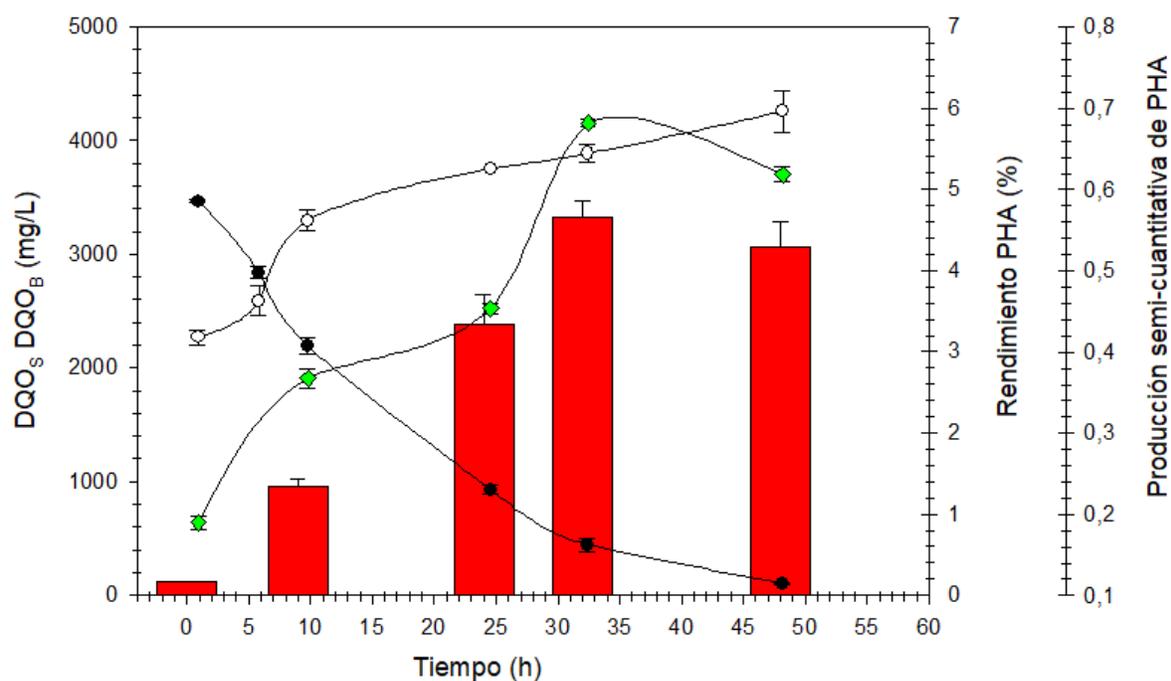
**Figura 3.28. Experimento limitado en oxígeno (LO). Aumento de PHA intracelular determinado por FT-IR durante un ciclo de producción**

### 3.12.2 Cuantificación de PHA, rendimiento y pureza

El PHA obtenido en el sistema de producción limitado en oxígeno fue analizado por espectrofotometría UV, siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 2, Sección 2.7.3. El rendimiento de producción del sistema limitado en oxígeno se puede observar en la Figura 3.29.

El sistema de producción de PHA limitado en oxígeno (0,5-1,0 mgO<sub>2</sub>/L) y sin adición de nutrientes mostró una tendencia similar al sistema limitado en nutrientes, aumentando su acumulación en el tiempo. El punto máximo de acumulación de PHA detectado para el sistema limitado en oxígeno fue de 4,7% a las 32 horas con una leve disminución hasta 4,3% a las 48 horas (Figura 3.29). Cabe destacar que el aumento en la acumulación de PHA desde el tiempo cero (0,16%) hasta las 32 horas fue de alrededor de 29 veces, el cual fue un poco superior al aumento de acumulación encontrado para el sistema limitado en nutrientes (23 veces). Por medio del análisis de varianza se determinó que hay diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para un nivel de significación de 0,05, sin embargo, no se encuentran diferencias significativas ( $p > 0,01$ ) para un menor nivel de significación. A partir de los resultados obtenidos por las dos técnicas utilizadas, FT-IR y espectrofotometría UV,

se puede concluir que el sistema limitado en nutrientes y limitado en oxígeno se comportan de manera similar en la producción de PHA, al menos para los sistemas estudiados que tienen muy bajos rendimientos de PHA (< 5%). Asimismo, debe tenerse en cuenta la pérdida inevitable de PHA en el proceso de extracción y purificación que puede afectar significativamente la determinación del rendimiento del polímero en reactores con baja producción, lo cual dificulta el análisis comparativo entre diferentes condiciones experimentales. Cabe destacar que usar bajos niveles de oxígeno puede reducir los costos de operación del proceso de producción de PHA.



**3.29. Sistema de producción limitado en oxígeno (LO). (●) DQO<sub>s</sub> (mg/L); (○) DQO<sub>e</sub> (mg/L); (◆) Relación de picos (alfa); barras verticales representan el rendimiento de PHA (%)**

En el presente trabajo de Tesis se obtuvieron rendimientos máximos de PHA en el sistema limitado en nutrientes y limitado en oxígeno del 3,7% y 4,7% respectivamente. En ambos casos la pureza del polímero fue alrededor del 94%. En comparación con estos valores otros investigadores reportaron rendimientos de PHA entre 5,1 y 14 % (Bosco y col., 2010) y entre 38 y 41 % (Carletto y col., 2011) trabajando con cultivos mixtos después de 92 y 45 h en condiciones aeróbicas usando suero de leche. Sin embargo, los tiempos de cultivo y la concentración de suero de leche utilizados por estos autores fueron entre 2 a 5 veces superiores a los utilizados en el presente estudio. Además, en esos estudios, el suero

de leche se sometió a varios pretratamientos físico-químicos (calentamiento, centrifugación y filtración) para disminuir el contenido de proteína. Esta estrategia permite reducir la disponibilidad de nitrógeno para el crecimiento microbiano (Bosco y col., 2010; Carletto y col., 2011); sin embargo, implica mayores costos para la producción de PHA.

### **3.13 Método para monitorear la producción de PHA intracelular usando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)**

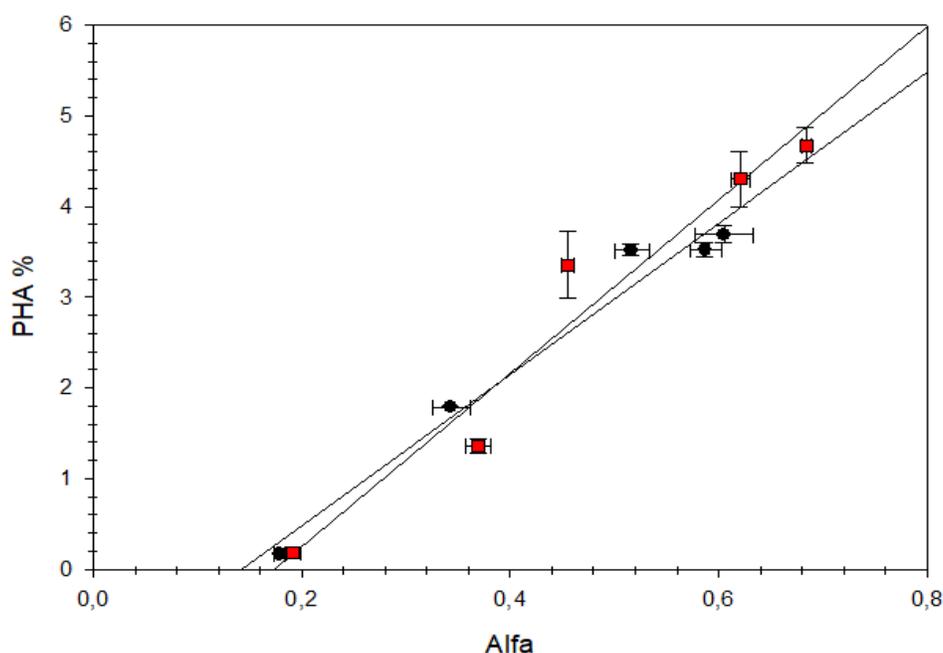
La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier se ha utilizado como un método-semicuantitativo rápido para el monitoreo de los sistemas de producción de polihidroxialcanoatos (PHA) en sistemas bacterianos de cultivos mixtos. Este método semicuantitativo reduce el tiempo analítico a menos de 30 min para determinar el punto final del sistema de producción. Por lo contrario, el proceso de extracción del polímero es un método que puede tardar alrededor de 24 horas debido a la complejidad de la preparación de la muestra que incluye diferentes etapas como la centrifugación, lavado, secado y triturado de la biomasa, para finalmente realizar el proceso de extracción, precipitación y purificación del polímero. Diferentes autores han utilizado la espectroscopía infrarroja para la detección y cuantificación de PHA en células bacterianas intactas extraídas de sistemas de cultivos puros, reportando resultados altamente confiables (Hong y col., 1999; Kansiz y col., 2000; Jarute y col., 2004). Arcos-Hernandez (2010) propuso un método de predicción del contenido de PHA intracelular en cultivos mixtos por medio de FT-IR usando una correlación entre los análisis de cuantificación obtenidos por cromatografía gaseosa y los análisis obtenidos de PHA intracelular por FT-IR.

Al respecto en este trabajo de tesis se propone una correlación entre el porcentaje de PHA obtenido en el proceso de extracción y los valores alfa obtenidos por FT-IR para ambos sistemas de producción LN y LO (Figura 3.30).

Puede apreciarse que las regresiones lineales para ambos sistemas no pasan por el origen de coordenadas; esto puede deberse a la pérdida inevitable de PHA durante el proceso de extracción y el proceso de purificación de PHA obtenido a partir de los lodos activados.

Cabe destacar que la pérdida del polímero es probablemente más significativa para biomasa que presenta muy bajas concentraciones de PHA (<1-2% PHA). Además, quizás no sea posible una completa extracción del PHA de la biomasa, lo cual también podría

explicar el leve desplazamiento de las rectas de regresión. De todas formas, la buena correlación observada entre los parámetros de rendimiento y valores alfa permite avalar la técnica semi-cuantitativa de FTIR propuesta en el trabajo de tesis como herramienta metodológica para monitorear de forma rápida y simple el proceso de producción de PHA, con una preparación de la muestra sencilla, empleando pequeños volúmenes de cultivo, y sin la necesidad del uso de solventes de extracción (Kansiz y col 2000). Estas ventajas lo hacen muy atractivo para lograr el control y la optimización del proceso en tiempo real para aplicaciones a escala industrial, dándonos una idea del momento adecuado para realizar el procesamiento y extracción del PHA.



**Figura 3.30. Correlación entre valores de rendimiento (PHA%) y valores alfa para los sistemas estudiados: Limitación en nitrógeno LN (●)  $r^2= 0.95$ , limitación en oxígeno LO (■)  $r^2= 0.97$**

### 3.14 Parámetros estequiométricos del sistema de producción limitado en nitrógeno y limitado en oxígeno

A partir de los diferentes ensayos de producción de PHA se determinó  $y_{PHA/S}$ ,  $y_{O/S}$ ,  $y_{X/S}$  e  $y_{G/S}$ .

El  $y_{PHA/S}$  se determinó a partir de la relación de las velocidades de producción de PHA como DQO ( $r_{PHA}$ , mgDQO/(L h)) y la velocidad de consumo de DQOs ( $r_s$ , mgDQOs/(L h)). Para obtener el  $r_{PHA}$  es necesario determinar la velocidad de producción de PHA

(mgPHA/(L h)) a partir de los datos obtenidos en la extracción del polímero y convertirla en unidades de DQO mediante el valor estequiométrico de oxidación para PHB: 1,67 mg DQO/mgPHB (Ahmadi y col., 2019). Cabe destacar que el PHA producido correspondió a polihidroxiбутirato (PHB) como se expondrá posteriormente.

El  $y_{O/S}$  se determinó a partir de la relación de la velocidad de consumo de oxígeno como  $r_T$  (mgDQO<sub>T</sub>/(L h)) y el consumo de sustrato orgánico  $r_S$  (mgDQO<sub>S</sub>/(L h)).

El  $y_{X/S}$  se estimó a partir de la relación de la velocidad de producción de biomasa activa como DQO ( $r_X$ , mgDQO<sub>X</sub>/(L h)), por el aporte del nitrógeno del suero de queso, y el  $r_S$  (mgDQO<sub>S</sub>/(L h)). Cabe destacar que en el sistema LN también se consideró el aporte de nitrógeno a partir de la fuente de amonio del medio de cultivo ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para estimar la síntesis de biomasa microbiana. Para determinar  $r_X$  se calculó inicialmente la velocidad de consumo de suero de queso ( $r_S$ , mgDQO<sub>S</sub>/(L h)) durante las primeras 9 horas, donde el sistema no estaba limitado en carbono, así como la velocidad de consumo de amonio ( $r_{NH_3-N}$ ). A partir de  $r_S$  inicial se estimó la velocidad de consumo de nitrógeno orgánico ( $r_{Norg}$ ) considerando el contenido de 1 g DQO/g suero de queso y su relación DQO:N (g/g) de 100:1,55 (LACTOFOOD, Food S.A., Buenos Aires, Capítulo 2).

A partir de la suma de las velocidades  $r_{NH_3-N}$  y  $r_{Norg}$  y utilizando la fórmula elemental de la biomasa heterótrofa CH<sub>1,8</sub>O<sub>0,5</sub>N<sub>0,2</sub>, 2,8 mg de N/24,6 g de biomasa, (Third y col., 2003) se logró determinar la velocidad de formación de biomasa activa (mgX/(L h)). Finalmente se convirtió el valor de biomasa activa a DQO usando un factor de 1,36 mgDQO<sub>X</sub>/mgX obteniendo  $r_X$  expresado en unidades mgDQO<sub>X</sub>/(L h) (Capítulo 2, Sección 2.10).

El  $y_{G/S}$  se obtuvo a partir del siguiente balance:

$$y_{X/S} + y_{O/S} + y_{PHA/S} + y_{G/S} = 1 \quad (3.1)$$

En la Tabla 3.8 se presentan los coeficientes estequiométricos de los sistemas estudiados.

Como se puede observar los factores estequiométricos demuestran que la baja producción de PHA estuvo asociada fundamentalmente a la síntesis y acumulación de glucógeno y crecimiento microbiano (Tabla 3.8). Respecto a los coeficientes estequiométricos, no hubo diferencias significativas entre sistemas LN y LO ( $P > 0,05$ ).

Debe destacarse que a pesar que el cultivo mixto estuvo extremadamente limitado en nitrógeno amoniacal y fósforo para restringir el crecimiento microbiano, dicho crecimiento tuvo lugar a partir del nitrógeno orgánico aportado por el suero de queso. Por lo tanto, el incremento de la biomasa total en los sistemas LN y LO estuvo asociado fundamentalmente a la formación de glucógeno y crecimiento microbiano y en menor medida a la acumulación de PHA.

**Tabla 3.8. Parámetros estequiométricos del sistema de producción aeróbico de PHA con suero de queso en ensayos batch. Experimento limitado en nutrientes (LN). Experimento limitado en oxígeno (LO)**

Sistema	$y_{G/S}$ (mgDQO/mgDQO <sub>s</sub> )	$y_{PHA/S}$ (mgDQO/mgDQO <sub>s</sub> )	$y_{O/S}$ (mgDQO <sub>T</sub> /mgDQO <sub>s</sub> )	$y_{X/S}$ (mgDQO <sub>X</sub> /mgDQO <sub>s</sub> )
LN	0,32 ± 0,11	0,07 ± 0,02	0,35 ± 0,09	0,26 ± 0, 04
LO	0,33 ± 0.14	0,08 ± 0.01	0,35 ± 0.08	0,24 ± 0.05

Cabe destacar que los sistemas LN y LO no presentaron diferencias significativas con respecto al rendimiento del PHA en función del sustrato  $y_{PHA/S}$  y a las medidas semicuantitativas del polímero determinadas por FT-IR como se explicó previamente.

### 3.15 Determinación de características térmicas por Calorimetría diferencial de barrido del PHA extraído

Las características térmicas del pellet del polímero extraído y purificado en los ensayos de producción de PHA limitado en nutrientes (LN) y limitado en oxígeno (LO) fueron determinados en un equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido Q100 (TA Instruments, USA) operado en forma modulada (MDSC). A partir de los termogramas obtenidos se pudieron determinar la temperatura de fusión ( $T_m$ , °C) y la entalpía de fusión correspondiente al área del pico endotérmico ( $\Delta H_m$ , J/g). Los resultados obtenidos fueron analizados por medio del software Universal Analysis V1.7F (TA Instruments) (Capítulo 2, Sección 2.9.2.2).

Las muestras de PHA seco en estufa al vacío (60 °C, 60 KPa) hasta peso constante

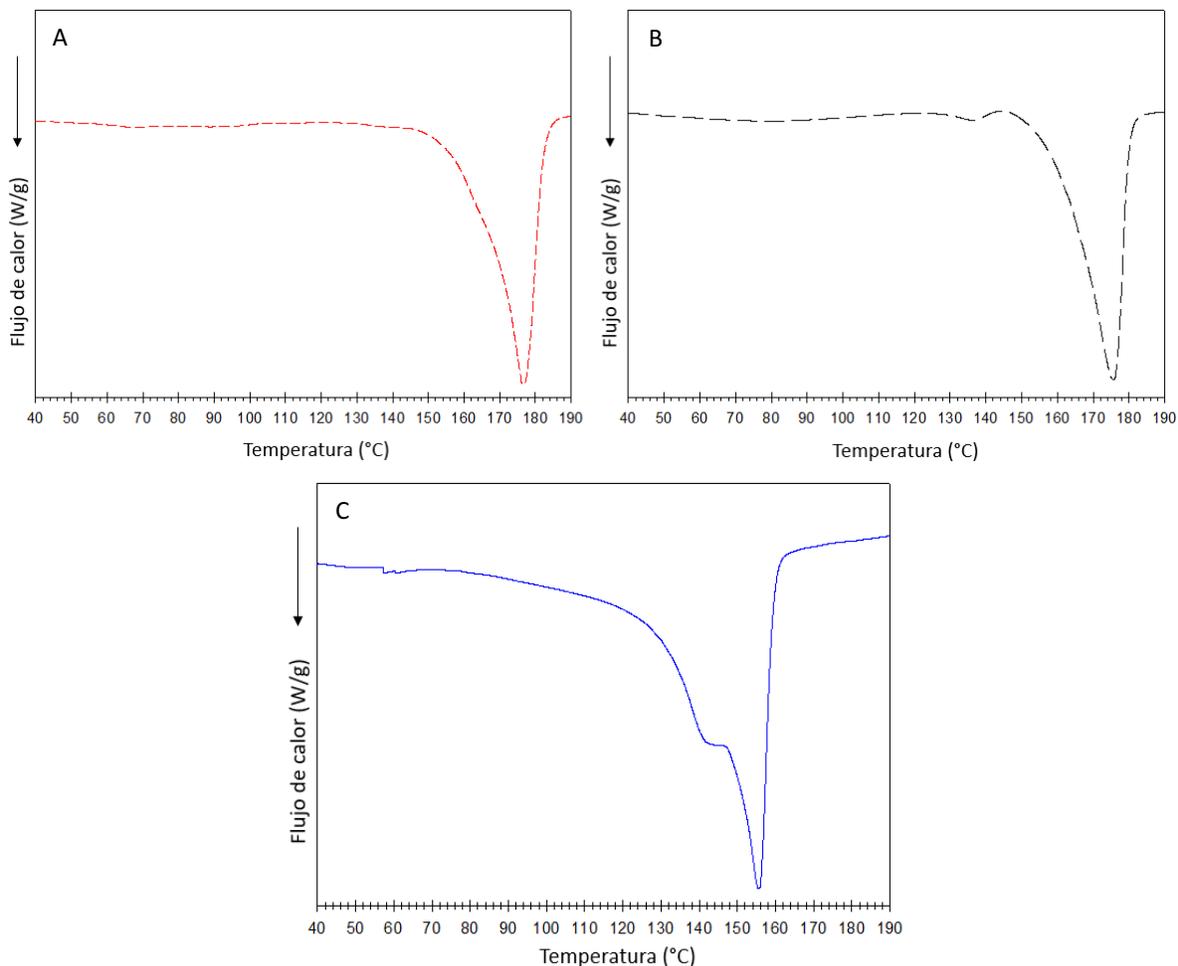
provenientes del proceso de extracción y purificación fueron almacenadas en un desecador para finalmente realizar la medida en el DSC. Mediante los termogramas obtenidos del DSC modulado de las muestras de PHA se pudieron observar picos atribuidos a la fusión de los dominios cristalinos correspondientes a sistema limitado en nutrientes (Figura 3.31A) y limitado en oxígeno (Figura 3.31B). El análisis de los resultados condujo a una temperatura de fusión ( $T_m$ ) y la entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) de 176,5°C y 81,88 J/g respectivamente para el sistema limitado en nutrientes (LN); mientras que para el sistema limitado en oxígeno (LO) la temperatura de fusión y la entalpía de fusión fueron de 175,6 °C y 84,55 J/g respectivamente. En el caso del patrón del copolímero P(3HB-co-3HV) con 12% de HV (Figura 3.31C) la temperatura de fusión y la entalpía de fusión fueron de 155,6°C y 53,62 J/g respectivamente. Valores similares de temperatura de fusión para el polímero obtenido en el presente trabajo de tesis han sido reportados para un homopolímero de PHB por diferentes autores.

Tsuge (2002) reportó una temperatura de fusión de 177 °C; Wang y col (2013) reportaron valores de temperatura de fusión de 172.05 °C. Estos valores de temperatura de fusión (172-177°C) son característicos de los polímeros donde su componente principal es el HB. En el caso de presentar monómeros de HV, a medida que la concentración de éste aumenta disminuye la temperatura de fusión.

Wang y col (2013) reportaron para un copolímero de PHB con 16% y 53% de HV temperaturas de fusión de 150,18°C y 101,93°C, en cuyos termogramas se aprecia la presencia del hombro en el pico de fusión que aumenta al incrementarse el contenido de HV en el copolímero. Como se puede observar el patrón tiene 12% de HV en el polímero y la temperatura de fusión es de 155°C con un hombro en el pico de fusión (Figura 3.31C) lo cual se correlaciona con los datos reportados por Wang y col (2013). Por lo tanto, se puede concluir que el polímero obtenido tanto en el sistema limitado en nitrógeno como limitado en oxígeno corresponde a un homopolímero de PHB.

La cristalinidad del PHA obtenido de los reactores discontinuos se estimó mediante la siguiente ecuación  $X\% = (\Delta H_m / \Delta H_{REF}) * 100$  (ecuación 2.11, Capítulo 2). Cuando los contenidos de HV en el polímero son menores al 10%, el cálculo de la cristalinidad se realiza como si el polímero fuera un homopolímero de HB (Cheng y Sun, 2009). La temperatura de fusión nos da una clara idea que es un homopolímero de PHB. Por lo tanto, se utilizó la

entalpía de fusión de referencia para ambos casos,  $\Delta H_{REF} = 146 \text{ J/g} \cdot w_{PHB}$  (Laycock y col., 2014).  $w_{PHB}$  es la fracción en peso de 3HB en el polímero, mientras que  $146 \text{ J/g}$  correspondió a la entalpía de fusión del polímero PHB 100% cristalizado (Barham y col., 1984).



**Figura 3.31. Curvas de DSC de pellet de PHA. A) PHA obtenido de la planta de producción limitada en nutrientes; B) PHA obtenido de la planta de producción limitada en oxígeno. C) Patrón P(3HB-co-3HV) que contiene 12% molar de HV (Sigma Aldrich)**

La cristalinidad para el sistema limitado en nutrientes, el sistema limitado en oxígeno y el patrón del copolímero P(3HB-co-3HV) resultó del 56,1%, 57,9% y 41,7% respectivamente. Valores similares de cristalinidad para el homopolímero de PHB han sido reportados por diferentes autores. Tsuge (2002) reportó una cristalinidad del 60%; Wang y col (2013) reportó cristalinidad del 61%.

Se puede apreciar la presencia de unidades de HV en el patrón del copolímero

P(3HB-co-3HV) con 12% molar de HV lo cual causa una disminución en las propiedades térmicas del polímero en comparación con las muestras de PHA producido. En el termograma (Figura 3.31C) se evidencia la presencia de un pico con un hombro; éste se atribuye a la fusión de laminillas de cristal de HV las cuales funden a temperaturas más bajas que las de HB (Thellen y col., 2008). La incorporación de unidades monoméricas distintas al HB en los copolímeros PHA aumenta su flexibilidad y procesabilidad debido al decrecimiento de la cristalinidad y la disminución tanto de la temperatura de fusión como de la temperatura de transición vítrea (Dias y col., 2006). Particularmente, los copolímeros de P(HB-co-HV) se vuelven más flexibles y tenaces a medida que la fracción molar de 3HV aumenta de 0 a 25%; además, la temperatura de fusión y la temperatura de transición vítrea disminuyen gradualmente (Zhu y col., 2013).

Cabe señalar que el PHB es el polímero comúnmente sintetizado por varias cepas bacterianas a partir de lactosa de suero, suero o suero hidrolizado (Koller y col., 2012). Se ha informado que la producción de copolímeros de P(HB-HV) por algunas cepas requiere comúnmente co-alimentación de ácido propiónico o ácido valérico como precursores de HV. *Haloferax mediterranei* produjo un copolímero de P(3HB-co-8%-3HV) a partir de permeado de suero de leche hidrolizado; P(3HB-co-5%-3HV) es producido por *Hydrogenophaga pseudoflava* a partir de lactosa de suero de leche hidrolizada más la adición de ácido valérico (Koller y col., 2007). De manera similar, *Ralstonia eutropha* acumula P(3HB-co-3HV) utilizando suero de leche como sustrato orgánico y alimentación por pulsos de ácido propiónico (Marangoni y col., 2002). En cultivos mixtos, los copolímeros de P(HB-HV) se pueden sintetizar a partir de suero de queso fermentado. Para ello, los AGV (precursores de HV y HB) deben ser producidos por fermentación acidogénica del suero, involucrando un proceso de tres etapas (Duque y col., 2014), lo cual incrementa los costos del proceso. Por lo tanto, en sistemas alimentados con suero de queso sin previa fermentación es de esperar que el PHA acumulado sea un homopolímero de PHB, siendo de gran interés realizar estudios de mezclas de PHB con otro tipo de polímeros biodegradables para mejorar las características térmicas del polímero.

### **3.16 Conclusiones del Capítulo**

En el presente capítulo se estudió el sistema de selección de bacterias con capacidad de acumular PHA, evaluando el efecto de las condiciones de operación y cargas volumétricas de sustrato orgánico en la presión de selección de bacterias acumuladoras de

PHA; para ello se usó suero de queso (subproducto de la industria láctea) como fuente de carbono y energía. Se ha propuesto que un factor determinante en el proceso de presión selectiva de dichas bacterias es la relación de las fases feast/famine donde la fase feast debe estar por debajo del 20%, de la duración total del ciclo operativo, para lograr un cultivo enriquecido con bacterias con capacidad de acumular PHA conforme a la bibliografía. Para todos los ensayos se mantuvo constante la relación DQO:N:P de 100:10:5.

Inicialmente se planteó un ensayo en el cual se utilizó una carga orgánica de 2,0 gDQO/(L día), ciclos de 84 horas, tiempo de residencia celular (TRC) y tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 10 y 4,08 días respectivamente (ensayo 1). El reactor presentó problemas en la sedimentación con alta producción de biomasa; por lo tanto, no fue posible realizar medidas al sistema.

Consecuentemente, en el ensayo 2 se decidió disminuir la carga orgánica a 1,5 gDQO/(L día), llevar la duración del ciclo a 56 horas, con TRC= 6,65 días y TRH= 2,72 días. Con las nuevas condiciones de operación se lograron superar los problemas de sedimentación; no obstante, al final del ciclo quedaba 1/3 del DQOs inicial que entra al siguiente ciclo del reactor, sin lograr obtener la etapa de inanición. Por esa razón se decidió realizar un tercer ensayo cambiando las condiciones de operación (carga orgánica= 0,18 gDQO/(L día), duración del ciclo= 56 horas, TRC= 3,33 días y TRH= 2,72 días). En esas condiciones el SBR presentó buenas características de sedimentación y una etapa feast del 14%, condición ideal para la mayor presión de selección de bacterias acumuladoras de PHA. Sin embargo, la carga orgánica tan baja generó una baja concentración de biomasa (260 mgDQO<sub>B</sub>/L) que no es conveniente económicamente. A partir de los resultados obtenidos se tomó la decisión de aumentar solamente la carga orgánica a 0,75 gDQO/(L día) manteniendo las demás condiciones operativas constantes (ensayo 4) con lo cual se generó una etapa feast de 42,8%, considerablemente mayor en comparación con el ensayo 3, perdiéndose la capacidad de presión selectiva de bacterias.

Finalmente se planteó el ensayo 5 en el cual se decidió aumentar el tiempo de residencia celular a 10 días, el tiempo de residencia hidráulico a 4,08 días, se alargó el ciclo a 84 horas y la carga orgánica se aumentó a 1 gDQO/(L día). Dicho ensayo contó con características óptimas de sedimentación, una etapa feast (23%) bastante cerca de la recomendada por bibliografía (menor al 20%) con una concentración de biomasa al final de

la fase feast entre 3900 y 4200 mgDQO<sub>B</sub>/L. Se logró determinar por análisis microscópico la presencia de PHA intracelular por medio de tinción específica con Sudan Black; por otra parte, los análisis de FT-IR mostraron la presencia de picos característicos que confirman que el polímero acumulado es PHA.

Una vez que se logró obtener el proceso de selección de bacterias acumuladoras de PHA se buscó el mejor proceso de extracción del polímero, concluyendo que lo más conveniente era secar la biomasa por medio de estufa al vacío (60°C; 0,6 bar), realizar la extracción del PHA por reflujo con cloroformo a 60°C por un período de 3 horas y finalmente realizar la precipitación y purificación del PHA con etanol a 4°C.

El proceso de producción de PHA se realizó en un reactor batch. Se analizaron dos sistemas de producción, uno limitado en nutrientes (nitrógeno y fósforo) con exceso de aireación, mientras que el otro reactor fue limitado en oxígeno sin adición de nutrientes. Para el sistema limitado en nutrientes el sustrato orgánico fue consumido en las primeras 48 horas con una remoción del 93% de materia orgánica, mientras que el sistema limitado en oxígeno consumió en 48 horas el 97% de la materia orgánica.

Una vez realizada la extracción del polímero se logró determinar que el máximo punto de acumulación de PHA en ambos sistemas se produjo a las 32 horas con un rendimiento de 3,7% y 4,7% (gPHA/gST) para el sistema limitado en nitrógeno (LN) y oxígeno (LO) respectivamente, obteniéndose alrededor de un 20% más de rendimiento para el sistema limitado en oxígeno. Sin embargo, mediante el análisis de varianza no se encontraron diferencias significativas en el rendimiento del PHA en función del sustrato  $y_{\text{PHA/S}}$  y las medidas semi-cuantitativas del polímero determinadas por FT-IR entre los sistemas LN y LO. Las diferencias que se encuentran en la producción de PHA en función de la biomasa pueden estar asociadas a las pérdidas que se pueden dar en el proceso de extracción/purificación del polímero, que porcentualmente pueden resultar más relevantes en sistemas con baja producción de PHA; por lo tanto, no se puede asegurar que existan diferencias significativas entre los dos sistemas estudiados. El bajo rendimiento de PHA a partir de suero de queso se atribuyó a dos procesos, crecimiento microbiano a partir de nitrógeno orgánico del suero de queso y la síntesis de glucógeno, que compiten con la síntesis del PHA por los reductores equivalentes de la fuente de carbono y energía.

En ambos sistemas el polímero obtenido corresponde a homopolímero de

polihidroxitirato (PHB) como se pudo comprobar por medio del análisis térmico (DSC). En los termogramas obtenidos se observó la aparición de un solo pico de fusión a la temperatura característica del PHB (En LN: 176,5°C y en LO: 175,6°C). La entalpia de fusión y la cristalinidad para el sistema LN fueron de 81,88 J/g y 56,1%, respectivamente, mientras que para LO fueron 84,55 J/g y 57,9% respectivamente. EL PHB es el polímero comúnmente sintetizado en los sistemas alimentados con suero de queso donde no se realiza co-alimentación con algún ácido como el propiónico o valérico, que sirven de precursores de la síntesis de copolímeros de tipo P(3HB-co-3HV). Se analizaron en el capítulo las rutas metabólicas de la síntesis de PHB para lograr una mejor interpretación de los resultados obtenidos.

**CAPITULO 4**

**PRODUCCIÓN DE**

**POLIHIDROXIALCANOATOS A**

**PARTIR DE GLICEROL CRUDO**

## **Producción de polihidroxialcanoatos a partir de glicerol crudo**

### **4.1 Producción de biodiesel**

La industria oleoquímica mundialmente viene teniendo una importante expansión en los últimos años, principalmente en la producción de los biocombustibles. La producción de biodiesel, por ejemplo, se ha venido incrementado debido a las perspectivas de agotamiento de los combustibles fósiles, así como de una preocupación medioambiental por las emisiones de gases contaminantes como CO, CO<sub>2</sub>, SOx y NOx asociados a la combustión de hidrocarburos como gasolina y diésel. El biodiesel presenta ventajas medioambientales, pues es un combustible que ha demostrado ser relativamente más limpio y en su producción se utilizan recursos renovables (Sharman y col., 2008; Luque t col., 2008b). El biodiésel tiene una influencia significativa en la reducción de las emisiones de los motores, como hidrocarburos no quemados (68 %), partículas (40 %), monóxido de carbono (44 %), óxido de azufre (100 %) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (80–90 %) (Leduc y col., 2009, Wu y Leung, 2011).

La producción de biodiesel a partir de aceites vegetales usados posee ventajas como la de reciclar un componente parcialmente nocivo para la naturaleza. Los aceites tradicionales que se usan en su producción son de girasol, colza, coco, soja y palma. Sin embargo, el uso de aceites comestibles (no reciclados) para combustible puede cuestionarse ya que estas materias primas se utilizan como alimentos y tienen un alto costo (Marchetti y Errazu, 2007). Con el aumento de la producción de biodiesel se ha incrementado la producción de glicerol crudo (GC) como subproducto principal. La producción de biodiesel genera alrededor del 10% (p/p) de glicerol crudo. Esto significa que una planta de 100 000 toneladas por año de biodiesel produce alrededor de 10.000 toneladas de glicerol crudo (Yang y col., 2012).

Tradicionalmente la glicerina se purifica mediante destilación con alto vacío, que es un proceso de alta demanda energética y que produce glicerina de alta pureza (USP) para usos en industrias alimenticias, farmacéuticas o cosméticas; sin embargo, el glicerol crudo ha llamado la atención como fuente de carbono para la producción de PHA; donde los estudios han encontrado que puede usarse sin previa purificación y fermentación (Hawa y col., 2019).

En este capítulo se realiza la producción de biodiesel utilizando aceite usado con baja y alta acidez con el fin de obtener el glicerol crudo (GC) el cual será usado como fuente de carbono en el proceso de producción de PHA. Inicialmente se realizó la aclimatación de los barros activados provenientes de una planta de producción de PHA utilizando suero de queso, a la nueva fuente de carbono. El reactor fue alimentado con 50:50 (% DQO) de suero de queso y glicerina pura. Una vez estabilizado el sistema se procedió a cambiar la alimentación con el 100% de DQO como glicerol puro y finalmente se realizó la alimentación con 100% glicerol crudo.

## **4.2 Objetivos del capítulo**

- a) Realizar ensayos preliminares (acondicionamiento del sistema a la nueva fuente de carbono) iniciando el sistema con una mezcla de suero de queso y glicerol puro; una vez que el sistema se estabiliza, proceder a realizar el cambio de fuente de carbono al 100% de glicerol puro donde se buscan las mejores condiciones de operación del SBR con el fin de obtener una etapa de inanición alta, lo cual favorece a la acumulación de reservas intracelulares de carbono (PHA).
- b) Obtener biodiesel a partir de aceite vegetal usado de alta y baja acidez, con el fin de obtener glicerina cruda para alimentar el reactor SBR de selección de PHA y el reactor batch de producción de PHA.
- c) Realizar la puesta en marcha del reactor de selección de tipo SBR determinando las mejores condiciones de operación con el fin de obtener microorganismos con capacidad de acumulación de PHA, seguido de la producción de PHA en reactor batch y finalmente realizar la extracción y purificación de PHA.
- d) Realizar experimentos con glicerol crudo a partir de los resultados obtenidos en los ensayos preliminares para las condiciones en las cuales el sistema mostraba consumo de glicerol puro presentando una etapa de inanición adecuada para la selección de microorganismos con capacidad de acumulación de PHA.
- e) Finalmente realizar el proceso de producción de PHA extracción y caracterización de dicho polímero.

### 4.3 Experimentos preliminares (Aclimatación de barros activados)

#### 4.3.1 Puesta en marcha y estabilización del SBR

Se realizaron ensayos preliminares de aclimatación del cultivo mixto a la nueva fuente de carbono (glicerol crudo). Para la selección del cultivo mixto con capacidad de acumular PHA se usó inicialmente una mezcla de suero de queso y glicerol puro (50:50%, como DQO) como fuente de energía. Se trabajó con un inóculo proveniente de una planta de selección de PHA a escala laboratorio alimentada con suero de queso (Experimento 5, Capítulo 3, Secciones 3.4 y 3.7). Una vez que los microorganismos consumieron completamente la mezcla de fuente de carbono, se procedió al cambio de la misma a 100 % glicerol puro (GP) evaluando el proceso de selección de diferentes condiciones de operación para determinar aquella que presente una etapa de inanición prolongada (>80% de la duración del ciclo operativo).

**Tabla 4.1. Ensayo de aclimatación (suero de queso + glicerol puro) y selección con 100% glicerol puro bajo diferentes condiciones operativas. En todos los ensayos se mantuvo la misma relación DQO:N:P de 100:10:5, volumen de trabajo de 4,2, volumen de reactor 5 litros y tiempo de sedimentación de 45 min.**

Parámetros	Experimentos			
	Aclim <sub>S+GP</sub>	GP <sub>1</sub>	GP <sub>2</sub>	GP <sub>3</sub>
Tiempo de residencia celular (días)	10	10	20	20
Tiempo de residencia hidráulico (días)	4,08	4,08	8,16	8,16
Duración del ciclo (días/hs)	3,5/84	3,5/84	7/168	7/168
Concentración inicial de DQO soluble en el SBR DQOs (mg/L)	3509	3509	3509	1754
CV <sub>DQOs</sub> (gDQOs/(L día))	1,0	1,0	0,5	0,25
CV <sub>NH<sub>3</sub>-N</sub> (gN/(L día))	0,1	0,1	0,05	0,025
CV <sub>P</sub> (gP/(L día))	0,05	0,05	0,025	0,012

CV<sub>DQOs</sub>: Carga volumétrica de sustrato orgánico; CV<sub>NH<sub>3</sub>-N</sub>: Carga volumétrica de nitrógeno; CV<sub>P</sub>: Carga volumétrica de fósforo.

Se realizaron los siguientes ensayos de aclimatación al glicerol puro y selección utilizando dicha fuente de carbono (ensayos preliminares) (Tabla 4.1):

- **Aclimatación:** Alimentación con mezcla de suero de queso y glicerol puro (50:50%) corresponde a Aclims+GP.

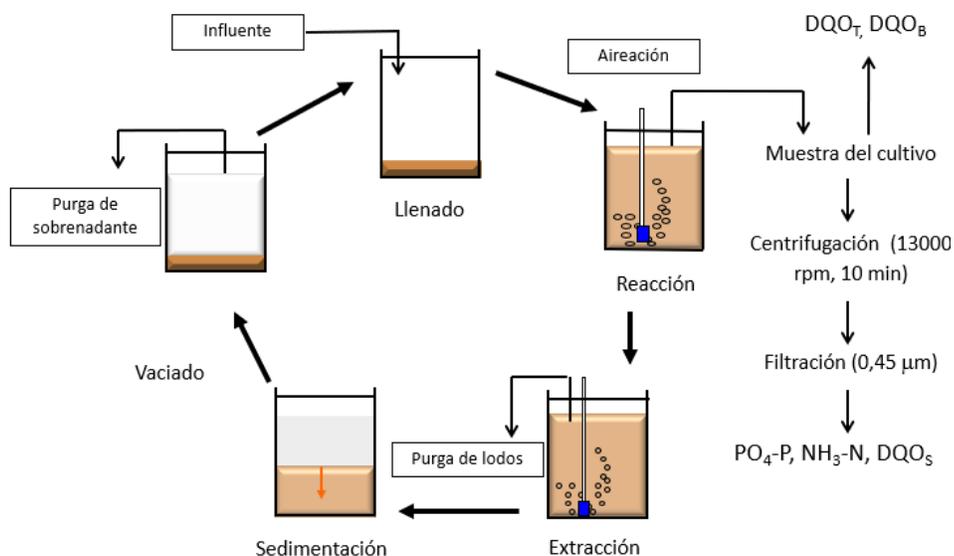
- **Selección 1:** Alimentación con glicerol puro (100%). Para el glicerol puro se proponen 3 ensayos con diferentes condiciones de operación, los cuales corresponden a GP<sub>1</sub>, GP<sub>2</sub> y GP<sub>3</sub>.

Todos los ensayos se realizaron en un reactor 5 litros con un volumen de trabajo de 4,2. Las condiciones de operación en el sistema de selección fueron definidas en función de los mejores resultados obtenidos en el capítulo 3 (Experimento 5) y modificadas en función de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de selección del presente capítulo (Tabla 4.1), con el fin de obtener condiciones de inanición (fase “famine”) a lo largo del ciclo. De esta manera se lograba un sistema enriquecido en microorganismos con capacidad de acumular PHA.

Para el sistema de aclimatación con mezcla de suero de queso y glicerol (50:50%) se trabajó en un SBR a temperatura ambiente en forma aeróbica con una concentración de oxígeno mayor a 4,0 mgO<sub>2</sub>/L (sin control de pH y temperatura). Se trabajó con ciclos repetitivos de 84 hs, tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 4,08 días y tiempo de residencia celular de 10 días. Una vez lograda la aclimatación a la fuente de carbono mezcla se procedió a cambiar el medio de cultivo a glicerol puro 100%. Inicialmente se mantuvieron las condiciones de operación usadas con la fuente de carbono mezcla. Finalmente, se realizaron modificaciones en el sistema en función de los datos obtenidos con el fin de lograr una mayor etapa de inanición (Tabla 4.1).

#### 4.3.2 Determinaciones fisicoquímicas

Para todos los ensayos se evaluó la estabilidad del SBR mediante la determinación de los siguientes parámetros físico-químicos a lo largo de diferentes ciclos: ortofosfato (PO<sub>4</sub>-P, mgP/L), amonio (NH<sub>3</sub>-N, mgN/L), sustrato orgánico como DQO soluble (DQO<sub>S</sub>, mg/L) y concentración de biomasa determinada como DQO (DQO<sub>B</sub>, mg/L). DQO<sub>B</sub> correspondió a la diferencia entre DQO total (DQO<sub>T</sub>) y DQO<sub>S</sub>. En todos los experimentos el SBR se operó con cinco fases (llenado, reacción, extracción, sedimentación y vaciado). Tanto los procedimientos en la toma de muestras como las determinaciones fisicoquímicas se realizaron siguiendo la misma metodología (Figura 4.1). Los detalles de la toma de muestra y los protocolos de las diferentes determinaciones se describieron en el capítulo 2.



**Figura 4.1. Ciclo de operación y determinaciones fisicoquímicas durante el ciclo para los diferentes ensayos de aclimatación y selección.**

### 4.3.3 Composición del agua residual sintética (ARS)

**Tabla 4.2. Agua residual sintética de los ensayos estudiados**

Agua residual sintética (ARS)	Concentración (g/L) ARS <sub>S+GP</sub>	Concentración (g/L) ARS <sub>GP1</sub> , ARS <sub>GP2</sub>	Concentración (g/L) ARS <sub>GP3</sub>
Suero de queso	2,047		
Glicerol puro	1,690	3,380	1,690
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,925	1,925	0,962
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,556	0,556	0,278
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,438	0,438	0,219
NaHCO <sub>3</sub>	3	3	1,5

Medio de cultivo ARS<sub>S+GP</sub>: Mezcla de suero de queso y glicerol puro (50:50%). Medio de cultivo ARS<sub>GP1</sub>, ARS<sub>GP2</sub> y ARS<sub>GP3</sub>: Glicerol puro (100%) correspondiente a los ensayos de selección GP<sub>1</sub>, GP<sub>2</sub>, GP<sub>3</sub> respectivamente.

En la Tabla 4.2 se describen los medios de cultivos; la composición fue expresada en términos de demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno (N) y fósforo (P) para los diferentes ensayos. Todos los experimentos se mantuvieron con una relación DQO:N:P= 100:10:5 a fin de evitar la limitación del crecimiento de los microorganismos por fosforo o

nitrógeno. El glicerol fue expresado como g/L, sin embargo se tuvo en cuenta el factor de conversión de 1,22 gDQO/gGlicerol para mantener la relación DQO:N:P.

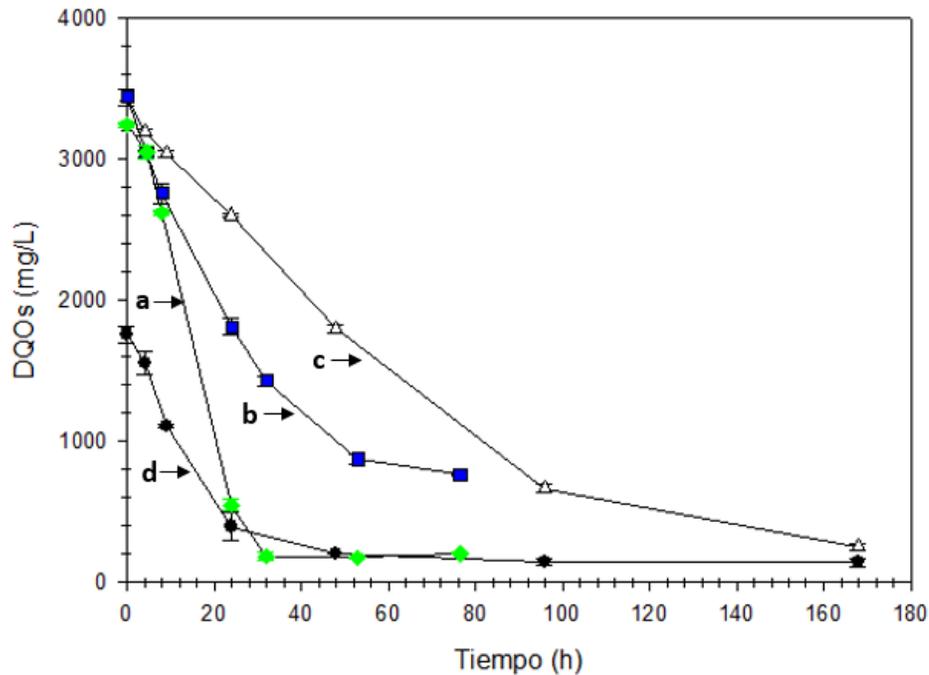
Las concentraciones de ortofosfato, nitrógeno amoniacal y DQO fueron determinadas por espectrofotometría. Para determinar  $PO_4\text{-P}$ ,  $NH_3\text{-N}$  y  $DQO_s$  se centrifugaron 35 ml del cultivo y se filtró el sobrenadante con membranas (0,45  $\mu\text{m}$ ) (Capítulo 2, Sección 2.3.1 y 2.3.3).

## **4.4 Resultados y discusión**

### **4.4.1 Sistema de selección del cultivo mixto: Resultados del ensayo de aclimatación**

Inicialmente se procedió a realizar la aclimatación del sistema a la nueva fuente de carbono, por lo tanto se alimentó el reactor SBR con una mezcla de suero de queso y glicerol 50:50 % como DQO, se trabajó con un tiempo de residencia celular de 10 días y tiempo de residencia hidráulico de 4,08 días, ciclos de 3,5 días (84hs) y carga orgánica de 1gDQO/(L día) con una relación DQO:N:P= 100:10:5. Las cargas volumétricas de nitrógeno y fosforo fueron 0,1 gN/(L día) y 0,05 gP/(L día) respectivamente (Tabla 4.1). Estas condiciones de operación son similares a las utilizadas en el Experimento 5, usando suero de queso como única fuente de carbono, en el cual se obtuvo la mejor presión de selección (Capítulo 3, Sección 3.7).

En la Figura 4.2 se puede observar el consumo de DQOs para ciclos típicos del SBR correspondientes a los ensayos de aclimatación  $Aclim_{S+GP}$  (suero de queso y glicerol puro 50:50) y selección ( $GP_1$ ,  $GP_2$ ,  $GP_3$ ). En  $Aclim_{S+GP}$  la fuente de carbono externa fue removida alrededor de un 93% durante las primeras horas del ciclo (24-32 hs), con una velocidad inicial de consumo de 2520 mg  $DQO_s$ /(L día), correspondiente a la fase feast o de disponibilidad del sustrato orgánico externo, obteniendo una duración de la etapa feast de 34% (Figura 4.2, curva a). Durante esta fase el consumo de sustrato orgánico y el consumo significativo de amoníaco y fósforo conlleva a un aumento gradual de la concentración de biomasa. Se alcanzó un estado estacionario después de 4 TRC, alcanzando una concentración inicial de biomasa de  $2021 \pm 69,29$  mg $DQO_B$ /L.



**Figura 4.2. Ensayos en SBR con glicerol puro. a)  $\blacklozenge$  Aclim<sub>S+GP</sub> carga orgánica 1 gDQO/(L día) con TRC 10 días y 84 horas de ciclo. b)  $\blacksquare$  GP<sub>1</sub> carga orgánica de 1 gDQO/(L día) con TRC 10 días y 84 horas de ciclo. c)  $\triangle$  GP<sub>2</sub> carga orgánica de 0,5 gDQO/(L día) con TRC 20 días y 168 horas de ciclo. d)  $\bullet$  GP<sub>3</sub> carga orgánica de 0,25 gDQO/(L día) con TRC 20 días y 168 horas de ciclo.**

Una vez que se obtuvo un sistema estable con consumo de la fuente de carbono externa (mezcla suero y glicerol puro) y etapa de inanición se procedió a reemplazar el 100% de la fuente de carbono por glicerol puro, manteniendo las mismas condiciones de operación del Aclim<sub>S+GP</sub> (Tabla 4.1). Luego de evaluar más de 4 tiempos de residencia celular, para el experimento GP<sub>1</sub> se logró una remoción de la fuente de carbono externa alrededor de 78% con una velocidad inicial de consumo (1584 mg DQOs/(L día)); se necesita la duración total del ciclo para lograr la degradación, causando la pérdida de la etapa de inanición (Figura 4.2, curva b).

Debido a la pérdida de la etapa de inanición se tomó la decisión de cambiar las condiciones de operación (experimento GP<sub>2</sub> (Tabla 4.1)). Se aumentó la duración del ciclo de 3,5 días (84 horas) a 7 días (168 horas) disminuyendo la carga orgánica de 1,0 a 0,5 gDQO/(L día) con el fin que los microorganismos tuvieran tiempo necesario para consumir la fuente de carbono y generar la etapa de inanición. El cambio en la duración del ciclo llevó a que el tiempo de residencia celular y el tiempo de residencia hidráulico fueran de 20 y 8,16 días respectivamente. El sustrato orgánico se consumió casi en un 92% con baja

velocidad de consumo (672 mg DQO<sub>S</sub>/(L día)); sin embargo, no se contó con una etapa de inanición (Figura 4.2, curva c).

Finalmente se procedió a disminuir la carga orgánica de 0,5 a 0,25 gDQO/(L día) manteniendo el resto de condiciones de operación constantes (experimento GP<sub>3</sub> (Tabla 4.1)). En la Figura 4.2, curva d se puede evidenciar un aumento en la velocidad de consumo del sustrato orgánico (1346 mg DQO<sub>S</sub>/(L día)) removiendo alrededor del 90% de la fuente de carbono externa en las primeras 30-45 hs con una duración de la etapa feast de 17% y etapa famine de 83%. La duración de la etapa feast obtenida para este ensayo está dentro de los valores recomendados en literatura (<20%, Pittmann, 2017) para favorecer la acumulación de PHA. El sistema se estabilizó luego de 4 TRC, con una concentración de biomasa inicial de 1377 ± 18,5 mgDQO<sub>B</sub>/L, su carga específica de sustrato orgánico fue de 181,5 mgDQO<sub>S</sub>/(gDQO<sub>B</sub> día), mientras que la carga específica de nitrógeno y fósforo fue de 18,15 mgN/(gDQO<sub>B</sub> día) y 8,71 mgP/(gDQO<sub>B</sub> día) respectivamente (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3. Parámetros fisicoquímicos y biológicos de los ensayos de aclimatación (mezcla de suero y glicerol puro 50:50) y selección (glicerol puro).**

Parámetro	Aclim <sub>S+GP</sub>	GP <sub>1</sub>	GP <sub>2</sub>	GP <sub>3</sub>
Etapa feast (%)	34	100	100	17
C.E.SO. (mgDQO <sub>S</sub> /(gDQO <sub>B</sub> día))	494	S/D	S/D	181,5
C.E.N. (mgN/(gDQO <sub>B</sub> día))	49,5	S/D	S/D	18,15
C.E.P. (mgP/(gDQO <sub>B</sub> día))	24,75	S/D	S/D	8,71

\*S/D: sin determinar. C.E.SO: Carga específica de sustrato orgánico; C.E.N: Carga específica de nitrógeno; C.E.P: Carga específica de fosforo

El sistema de selección basado en glicerol puro (GP<sub>3</sub>) con carga orgánica de 0,25 gDQO/(L día) y TRC 20 días resultó ser aquel que condujo a óptimas condiciones de operación donde se logró obtener una fase de inanición apropiada para la presión de selección de bacterias acumuladores de PHA. Una vez optimizadas las condiciones

operativas se decidió cambiar la alimentación por glicerol crudo obtenido en la producción de biodiesel como se presenta a continuación.

## **4.5 Obtención de glicerina cruda a partir de la producción de biodiesel usando aceite vegetal reciclado**

### **4.5.1 Obtención del aceite vegetal usado**

Para el proceso de obtención de biodiesel se realizaron ensayos con dos tipos de aceite vegetal con diferentes grados de uso, con el fin de determinar el proceso de producción de biodiesel más adecuado a partir de estas materias primas. Un aceite vegetal fue donado del proceso de snacks de manzana, proyecto desarrollado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).

Este aceite es de poco uso debido a que está destinado a investigación sobre los procesos de frituras. Un segundo aceite fue recolectado de puestos de comida cercanos a la facultad de ingeniería UNLP, dicho aceite ha sido reutilizado gran cantidad de veces por lo tanto tiene características fisicoquímicas diferentes al de poco uso.

### **4.5.2 Pretratamiento del aceite vegetal usado**

#### **- Filtración en caliente**

Los tratamientos realizados al aceite previos al proceso de esterificación y transesterificación son fundamentales dado que es una materia prima reciclada y es considerable tanto su contenido de impurezas mayores y menores (residuos de comida) como su contenido de humedad. La filtración de las impurezas se realizó por medio de un embudo Büchner y un kitasato utilizando una bomba de vacío.

Entre el embudo y el kitasato se colocó un tapón de goma perforado perfectamente adaptado a ambos proporcionando mejores condiciones de vacío. Para el proceso de separación se utilizó un papel de filtro estándar de alta eficiencia grado 589/3 de S&S filter paper. Con el fin de mejorar el filtrado se calentó el aceite a 60°C de acuerdo con lo descripto por Lamarque y col., 2008, Bocanegra y col., 2015.

#### **- Eliminación de la humedad**

También es indispensable que el contenido de humedad de las muestras sea mínimo; este tipo de materias primas suelen contener humedad debido a los procesos de

fritura, por lo tanto, se debe eliminar ya que de lo contrario se presentarán reacciones secundarias de saponificación o de neutralización (Knothe y Gerper, 2005; Rashid y Anwar, 2008; Canakci y Gerper, 2001). El aceite previamente filtrado se procedió a secar a 80 °C hasta peso constante, por medio de un mechero bunsen el cual contaba con una gasa de alambre donde es soportado el recipiente a calentar.

#### 4.5.3 Determinaciones analíticas

##### - Ácidos grasos libres

La determinación de acidez de la materia prima se realizó por titulación según el método Ca 5a-40 (1998) de las normas AOCS. Para ello se pesaron 2 g con una aproximación de 0,01 g y se colocaron en un Erlenmeyer de 250 ml. El aceite se disolvió en una mezcla de 50 ml de alcohol etílico 96% y se neutralizo con NaOH, finalmente se adicionaron 0,3 ml de solución indicadora de fenoltaleina. La concentración de ácidos grasos libres del aceite se obtuvo mediante titulación de esta mezcla con una solución de NaOH 0,1 N y se expresó como porcentaje de ácido oleico (Bernal., 1998). Para convertir el porcentaje de ácidos grasos libres a índice de acidez se debe multiplicar el porcentaje de ácidos grasos libres por 1,99 y expresarse como mgKOH/gmuestra. Se determinó un blanco sin la adición de aceite el cual fue descontado para tener datos más precisos. Este índice es de vital importancia ya que determina la vía catalítica para la reacción necesaria en el proceso de producción de biodiesel. Para aceites usados con valores de acidez menores a 2 mgKOH/g de aceite, se realiza directamente la transesterificación (catálisis básica), mientras que aceites usados con valores de acidez mayor se debe realizar una esterificación (catálisis acida) previa a la trans-esterificación, este proceso evitará el desarrollo de jabones en la catálisis básica, y garantizará el aumento en el rendimiento de los FAME (Mohd y col., 2012; El-Mashad y col., 2008 , Cankci y Sanli, 2008 , Ramadhas y col., 2005)

$$FFA = \frac{V \cdot N \cdot 28.2}{m} \quad (4.1)$$

donde:

FFA: ácidos grasos libres como porcentaje de ácido oleico.

V: volumen de NaOH gastado en la titulación de la muestra (ml)

N: normalidad del NaOH

m. masa de la muestra (g)

### - Índice de saponificación

Se determinó el índice de saponificación con la norma AOCS método Cd 3c-91. Se procedió a realizar la medida por titulación del aceite con ácido clorhídrico en presencia de fenolftaleína. El aceite se mezcla previamente con 20 ml de KOH 1,0 N y es llevado a ebullición por reflujo durante 1,5 a 2,0 horas, para su posterior medición. Con esta prueba se puede estimar el peso promedio del aceite utilizado.

$$IS = \frac{28,2 (V - V')}{m} \quad (4.2)$$

donde:

IS: Índice de saponificación

V: volumen de titulante gastado en el blanco (ml)

V': volumen de titulante gastado en la muestra (ml)

m. masa de la muestra (g)

## 4.6 Producción de biodiesel

### 4.6.1 Esterificación ácida

El proceso de esterificación ácida para obtener biodiesel de aceites comestibles puede ser usada como un único proceso; el problema es el tiempo de reacción siendo alrededor de 26 horas y las grandes cantidad de alcohol requeridas (relación molar metanol:aceite 15:1 hasta relaciones de 60:1), lo que genera un proceso no viable económicamente (Mittelbach y Remschmidt, 2004, Moser, 2009). Sin embargo, cuando la materia prima es un aceite con un alto contenido de ácidos grasos libres como lo son los aceites de fritura usados, no es posible realizar la transesterificación eficientemente con catalizadores básicos. En estos casos entonces se recomienda realizar inicialmente un proceso de esterificación ácida como un paso preliminar para eliminar la mayoría de los

ácidos grasos libres, pero debe ser complementada con una catálisis alcalina para convertir los triglicéridos y diglicéridos contenidos en la materia prima.

**Tabla 4.4 Condiciones de operación de la esterificación ácida**

<b>Muestra</b>	<b>Ácido sulfúrico concentrado (%)</b>	<b>Relación molar (metanol: aceite)</b>	<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<i>CAB<sub>1</sub></i>	0,1	6:1	1,5	60
<i>CAB<sub>2</sub></i>	0,5	6:1	1,5	60
<i>CAB<sub>3</sub></i>	1,0	6:1	1,5	60

Issariyakul y col (2007) estudiaron la producción de biodiésel a partir de residuos de grasa de freidoras con 5–6% en peso de ácidos grasos libres a través de un pretratamiento de esterificación, el cual fue desarrollado a 60 °C, 2% en peso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 5 h de reacción; finalmente se realizó un proceso de transesterificación básica con mezcla de etanol/metanol. Lin y col (2009) evaluaron la influencia de la relación molar de metanol: aceite y el tiempo de reacción en el proceso de esterificación, utilizando como materia prima aceite crudo de salvado de arroz. Se realizó un pretratamiento con 1% en peso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se seleccionaron como condiciones óptimas una relación molar de metanol a aceite de 6:1 y un tiempo de reacción de 60 min para el tratamiento preliminar a la catálisis básica, finalmente en el proceso de catálisis alcalina se realizó con las condiciones de operación descritas en la transesterificación básica. Canoira y col (2008) estudiaron la producción de biodiésel a partir de aceite de soja mezclado con grasa animal de baja calidad (50% en volumen). Dichos autores realizaron un pretratamiento con 0,6 % en peso de ácido p-toluenosulfónico y condiciones de reacción de 60 °C durante 4 horas, la relación molar de metanol:grasa fue de 6:1. Finalmente realizan el proceso de transesterificación usando una relación de metanol/grasa de 7,5:1 y 1% en peso de hidróxido de sodio.

En el presente trabajo de tesis se realizó el proceso de esterificación usando el aceite reciclado previamente filtrado (100 ml) el cual fue adicionado en un balón de 250 ml que contenía 25 ml de alcohol metílico (relación molar 6:1 metanol/aceite) y ácido sulfúrico

concentrado (95%) como catalizador; el balón fue conectado a un condensador por reflujo y llevado a un baño maría a 60°C en una placa de calentamiento durante 1,5 hora. Se realizaron tres experimentos con diferentes concentraciones de catalizador (ácido sulfúrico al 0,1%, 0,5% y 1,0%, que corresponden a CAB<sub>1</sub>, CAB<sub>2</sub> y CAB<sub>3</sub> respectivamente) (Tabla 4.4), finalmente se realizó el proceso de transesterificación alcalina como se describe en la siguiente sección.

#### **4.6.2 Transesterificación básica**

Para la transesterificación alcalina (ensayo CB) se optó por usar KOH como catalizador ya que presenta altas conversiones a condiciones de temperatura moderadas y tiempos de reacción cortos, además es menos corrosivo que el NaOH para los equipos industriales y se requieren pequeños volúmenes de alcohol, lo que representa reactores económicos y de menor tamaño (Agarwal, 2007; Mittelback y Remschmidt, 2004; Moser, 2009). Algunos estudios han demostrado que utilizando KOH se obtienen mejores rendimientos de transformación que con NaOH, por otro lado, también se forma fosfato de potasio, que se obtiene en el agua de lavado del biodiesel, el cual puede ser utilizado como fertilizante (Tomasevic y Marinkovic, 2003).

Se ha encontrado que con una concentración en el rango de 0,5-1,0% (p/p) de catalizador alcalino se obtienen rendimientos del 94-99% en la conversión de aceites vegetales a biodiesel; mientras que un aumento en la concentración del catalizador no afecta la conversión, pero añade costos extra porque el catalizador necesita ser eliminado de la mezcla de reacción después de que se complete la reacción (Barnwal y Sharma, 2005). Otros autores como Al-Widyan y Al-Shyoukh (2002) informan altos rendimientos de producción de biodiesel a partir de aceite de soya usando 1% de hidróxido de potasio.

Por los motivos expuestos se optó por usar KOH 0,8 % (P/P) para el proceso de transesterificación. Antes de empezar el proceso de transesterificación el catalizador fue secado en estufa al vacío a 60 °C durante 1 hora y enfriado en un desecador, con el fin de evitar su contacto prolongado con el aire, pues éste disminuye su efectividad debido a la interacción con la humedad y con el dióxido de carbono (Agarwal, 2007; Meher y col., 2006). Los alcoholes que son usados tradicionalmente en la transesterificación son de cadena corta principalmente metanol (Rashid y Anwar, 2008) y etanol (Alamu y col., 2008). El metanol tiene menor costo y presenta ventajas fisicoquímicas sobre el resto de los

alcoholes como es su alta velocidad de reacción con los triglicéridos y buena solubilidad en KOH; por tal razón se optó por usar metanol como alcohol de la reacción. La relación estequiométrica para la transesterificación es de tres moles de alcohol por un mol de triglicérido para producir 3 moles de esteres y un mol de glicerol. La transesterificación es una reacción de equilibrio reversible que necesita un exceso de alcohol, por dicha razón se utilizó una relación molar de metanol/aceite de 6:1 (Freedman y col., 1984; Nouredini y Zhu, 1997).

**Tabla 4.5 Condiciones de operación en la transesterificación básica**

<b>Tipo de catálisis</b>	<b>Muestra</b>	<b>Catalizador (%)</b>	<b>Relación molar (metanol: aceite)</b>	<b>Tiempo (hrs)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Catálisis básica	CB	0,8	6:1	1,5	90

El exceso de metanol puede ser recuperado después de la reacción por destilación (Enweremadu y Mbarawa, 2009). La transesterificación puede ocurrir a presión atmosférica y a diferentes temperaturas dependiendo de la materia prima utilizada. El rendimiento de la reacción es directamente proporcional a la temperatura (Ma y Hanna, 1999; Meher y col., 2006). Frecuentemente la transesterificación se lleva a cabo a una temperatura cercana al punto de ebullición del alcohol, en este caso al ser metanol se usó 60°C y 90 min de reacción (Tabla 4.5) (Zhang Y y col., 2003, Darnoko y Cheryan, 2000).

#### **4.7 Separación del biodiesel y la glicerina**

Después de la reacción de transesterificación ocurre una separación espontánea de fases debido a su inmiscibilidad; gracias a la diferencia de densidad entre el biodiesel y el glicerol, en la fase superior se obtendrá el biodiesel y en la inferior el glicerol el cual puede ser separado por una simple decantación o centrifugado. Una vez obtenido el biodiesel, este fue transferido a varias ampollas de decantación donde se dejó reposar durante un día logrando la separación de las fases (Gerper J y col., 2004, Dias J y col., 2009).

#### **4.8 Purificación del biodiesel**

Después de realizada la separación de las fases se procedió a eliminar los remanentes de glicerol y catalizador, que pudieran haber quedado en el biodiesel, por

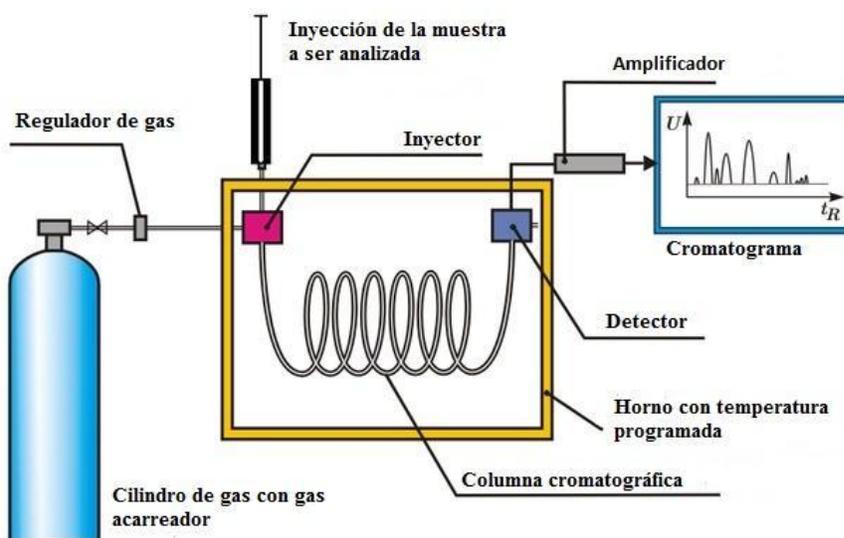
medio de un lavado (consiste en una extracción líquido-líquido) donde el agente de lavado fue ácido fosfórico al 5% (p/p). El ácido fosfórico reacciona con el hidróxido de potasio formando su correspondiente sal (fosfato de potasio que puede ser utilizado como fertilizante). El lavado del biodiesel se realizó en ampollas de decantación adicionando 25 ml de la solución de ácido fosfórico (Predojevic., 2008). A continuación, se procedió a realizar una agitación vigorosa donde se observó la formación de una emulsión; el biodiesel se deja reposando hasta observar la separación de las fases, obteniendo una fase superior (biodiesel) y una inferior (agua de lavado). Es importante esperar hasta que ambas fases se tornen transparentes. Este procedimiento se repitió por lo menos 3 veces para garantizar el correcto lavado del biodiesel.

#### **4.9 Cuantificación residual de monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y glicerina libre en el biodiesel por cromatografía gaseosa**

La cromatografía de gases (CG) es un método físico de separación en donde los componentes individuales de una mezcla gaseosa se distribuyen entre dos fases; la fase estacionaria y la fase móvil que se mueve en una dirección definida. La muestra se vaporiza y es transportada por un gas inerte (fase móvil) a través de la columna, mientras que la partición de la muestra ocurre en la fase estacionaria. Los componentes individuales de la muestra son separados entre sí en función de las presiones de vapor y la afinidad con la fase estacionaria (McNair y Miller, 2009). En la cromatografía de gases la fase estacionaria puede ser un sólido (cromatografía gas-sólido), produciéndose entonces la retención de las moléculas de analito por adsorción; lo más habitual es que la fase estacionaria sea un líquido (cromatografía gas-líquido) en éste caso la fase estacionaria es un líquido no volátil inmovilizado sobre la superficie de un sólido inerte, donde los analitos se distribuyen entre las fases móvil y estacionaria, después de que los analitos son separados llegan al detector el cual se mantiene a una temperatura más alta que la columna, de forma que los analitos se encuentren en forma gaseosa.

La cromatografía de gases por presentar una buena sensibilidad y obtener una buena separación, se emplea en el análisis de mezclas complejas como lo son derivados del petróleo, aceites, insecticidas, plaguicidas, pesticidas, ácidos grasos y esteroides. Igualmente, la técnica de cromatografía de gases incluye la reducción en los tiempos de análisis y las interferencias de pico, debido a la alta estabilidad térmica usada en columnas

capilares polares que mejora la resolución de los componentes (Liu y col., 2007, Cunha y col 2006).



**Figura 4.3. Diagrama del funcionamiento del cromatógrafo gaseoso**

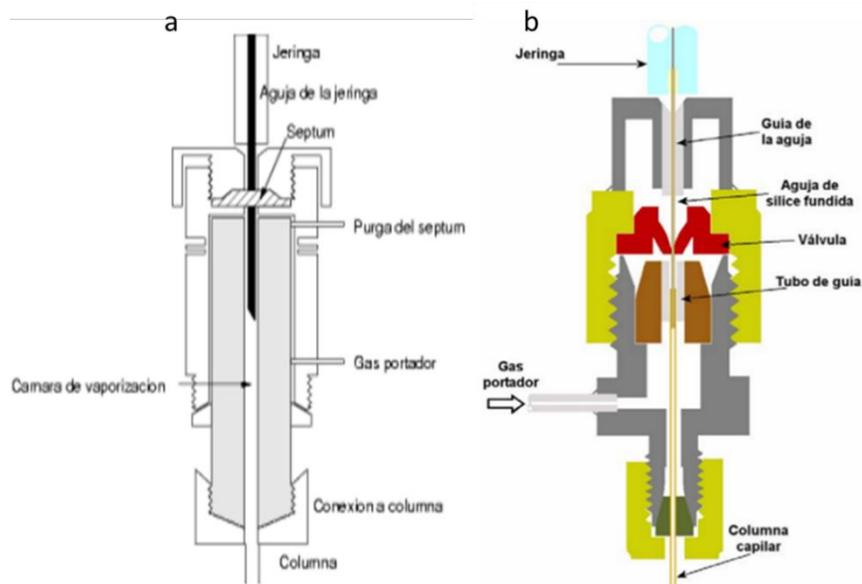
Un cromatógrafo de gases consta de sistema de suministro de fase móvil, sistema de inyección de muestra, columna cromatográfica situada en horno termostatzado y detector (Figura 4.3).

#### **4.9.1 Fase móvil (gas portador)**

El propósito principal del gas portador es transportar los componentes volátiles a través de la columna y debe ser químicamente inerte. Un segundo objetivo es proporcionar una matriz adecuada para el detector favoreciendo las medidas de los componentes de la mezcla. La selección del gas portador puede influir en la eficiencia de separación como en el tiempo de análisis; el sistema del gas portador contiene a menudo un tamiz molecular para eliminar el agua y otras impurezas. Los gases más utilizados son helio, hidrogeno y nitrógeno (Mcnair y Miller, 2009).

#### **4.9.2 Sistema de inyección de muestra**

El método más común de inyección de muestra implica el uso de una micro jeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un diafragma o septum de goma de silicona, en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna (Figura 4.4); esta cámara normalmente está unos  $50^{\circ}\text{C}$  por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra (Mcnair y Miller, 2009).



**Figura 4.4. a) Sistema de inyección Split/Splitless, b) Sistema de inyección on-Column**

Las técnicas de inyección más comunes en cromatografía de gases capilar son Split/Splitless (Figura 4.4a). El modo de inyección Split es más simple, fácil, antiguo y comúnmente utilizado, este procedimiento implica la inyección de  $1\mu\text{L}$  de la muestra por una jeringa estándar en el puerto de inyección. La muestra se vaporiza rápidamente y sólo una fracción, generalmente 1-2%, del vapor entra en la columna. Uno de los principales problemas de los sistemas de inyección utilizados con columnas capilares es la posibilidad de discriminar entre los componentes de la muestra durante los procesos de vaporización de la muestra y paso de la muestra vaporizada a la columna. El modo de inyección splitless, por su parte toma toda la muestra y la inyecta a través del puerto de inyección manejando cantidades de 1 a  $5\mu\text{L}$ . De este modo, la totalidad de la muestra es dirigida hacia la columna, que se mantiene a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra; una vez que la muestra es inyectada empieza el programa de calentamiento de la columna (McNair y Miller, 2009). Un sistema similar al splitless son los sistemas de inyección en columna, los cuales normalmente se conocen por su nombre en inglés on-column (Figura 4.4b). Este sistema asegura que la muestra que entra en la columna corresponda al 100 % con la muestra inyectada. Las agujas que se utilizan con este inyector son extremadamente finas, las cuales suelen ser de sílice fundida de 0.15mm de diámetro, siendo incapaces de perforar un septum, por lo tanto el inyector tiene un sistema de tubos guía que permite llevar la aguja directamente dentro de la columna; una

vez introducida la muestra dentro de la columna, ésta se mantiene a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra, a continuación inicia el programa de calentamiento de la columna para proceder a la separación.

#### **4.9.3 Columna cromatográfica**

En la cromatografía de gases se utilizan dos tipos de columnas, las columnas empaquetadas (o de relleno) y las capilares (o tubulares abiertas) siendo estas las más utilizadas. Las columnas tubulares abiertas o capilares son fabricadas de sílice fundida ( $\text{SiO}_2$ ) y recubiertas de poliamida (un plástico capaz de resistir temperaturas mayores a  $350^\circ\text{C}$ , funciona como soporte y protección contra la humedad atmosférica). Los diámetros de estos tipos de columnas varían entre 0,1 y 0,53 mm y las longitudes típicas varían entre 15 y 100 m. Las columnas tubulares abiertas son de mayor resolución, permiten mayor rapidez de análisis y mayor sensibilidad que las columnas empaquetadas, aunque tiene menor capacidad de muestra (Harris, 2007).

#### **4.9.4 Fase estacionaria**

La fase estacionaria juega un papel decisivo en la cromatografía de gases, estas son en su mayoría líquidas y deben cumplir una serie de requisitos como: baja volatilidad, el punto de ebullición debe estar al menos  $100^\circ\text{C}$  por encima de la temperatura máxima de trabajo, debe ser estable térmicamente y químicamente inerte. La característica más importante de la fase estacionaria es la polaridad puesto que ello define el reparto del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria permitiendo una adecuada separación en cromatografía de gases.

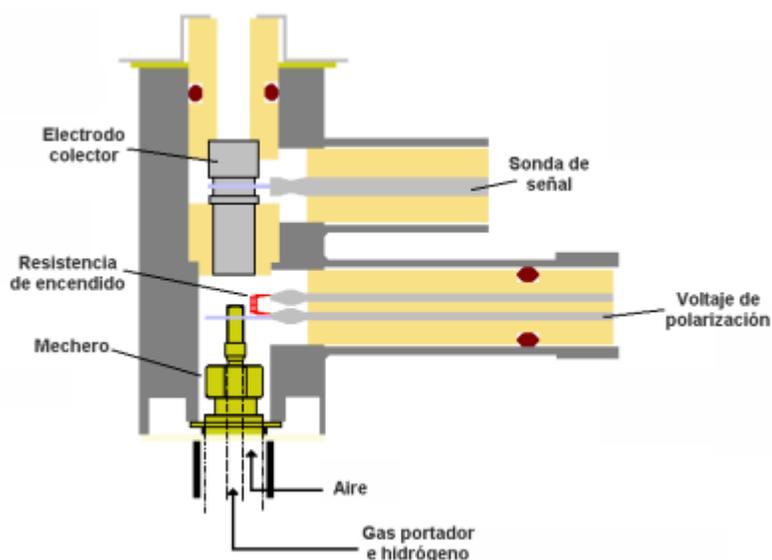
#### **4.9.5 Detectores**

El detector cromatográfico es el dispositivo que mide la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y genera una señal eléctrica que pone de manifiesto los aspectos cualitativos y cuantitativos de la concentración de la muestra analizada. Los detectores deben de cumplir las características deseables como: adecuada sensibilidad, buena estabilidad y reproducibilidad lineal en un intervalo amplio de concentración, amplio intervalo de temperatura de trabajo, tiempo de respuesta corto, no destructible con la muestra y alta fiabilidad y manejo sencillo. Los detectores más usados en la cromatografía

de gases son Ionización de llama (FID), captura de electrones (ECD) y espectrómetro de masas (MS) (Mcnair y Miller, 2009).

#### 4.9.5.1 Detector de ionización de llama (FID)

El detector de ionización de llama básicamente es un quemador de hidrógeno/oxígeno donde se mezcla el efluente de la columna (gas portador y analito) con hidrógeno, esta mezcla se enciende mediante una chispa eléctrica, produciendo una llama de alta temperatura (Figura 4.5).



**Figura 4.5. Detector de ionización de llama**

La mayoría de los compuestos orgánicos al someterse a altas temperaturas pirolizan y producen iones y electrones que son conductores eléctricos. Este hecho se aprovecha estableciendo una diferencia de potencial de unos centenares de voltios entre la parte inferior del quemador y un electrodo colector situado encima de la llama. La corriente generada es baja por lo tanto debe ser amplificada por medio de un amplificador de alta impedancia. Algunas ventajas del FID es su buena sensibilidad ( $10^{-14}$  g/s), amplio intervalo lineal de respuesta  $10^7$  unidades, sencillez en su manejo, robustez, una excelente adaptabilidad a la mayoría de los tamaños de las columnas, además, este detector es insensible a los gases no inflamables,  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $SO_2$ ,  $N_2O$  y tiene bajo ruido de fondo. Una desventaja del detector es que se trata de un detector destructivo de la muestra (Skoog y col., 2008).

#### 4.9.6 Análisis cuantitativo

En la cromatografía de gases los parámetros cuantitativos se basan en la comparación de la altura o el área del pico del analito con la de uno de los patrones. El uso como parámetro del área del pico es más acertado cuando se requiere mayor exactitud en las determinaciones cuantitativas. Como se sabe, el área del pico es función de la cantidad de componente o de la concentración del mismo. Para interpretar cuantitativamente el cromatograma se realizan curvas de calibración, que permitan conocer la relación real que para cada componente existe entre el área del pico y la cantidad de componente presente en una muestra, de forma que todos los picos adecuadamente corregidos sean comparables (Skoog y col., 2008).

#### 4.10 Cromatógrafo de gases



**Figuras 4.6. Cromatógrafo gaseoso HP 6890**

Para la determinación de monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y glicerina libre se utilizó un cromatógrafo de gases marca HP 6890 con inyector cool on y detector FID (Figura 4.6). La columna capilar fue una MET-Biodiesel Capillary non- polar GC de 30 m de longitud, diámetro interno de 0,25 mm y espesor de película 0,25  $\mu\text{m}$  que funciona a altas temperaturas (hasta 400 °C). La adquisición de datos se hizo mediante una placa conectada a una computadora personal con software Clarity® (DataApex, República Checa). El gas portador fue hidrógeno de grado cromatográfico. Las condiciones de operación del equipo se detallan en la (Tabla 4.6).

**Tabla 4.6. Condiciones de operación del cromatógrafo gaseoso**

Inyector		
inyección en columna	1µL	
tamaño de la muestra		
Programa de la temperatura de la columna		
Temperatura inicial	50°C	mantener 1 min
Velocidad 1	15°C/min hasta 180°C	
Velocidad 2	7°C/min hasta 230°C	
Velocidad 3	30°C/min hasta 380°C	mantener 10 min
Detector		
Tipo	ionización por llama (FID)	
Temperatura	380°C	
Gas portador		
Tipo	hidrógeno o helio	
Velocidad de flujo	3 ml/min	

#### 4.10.1 Preparación de patrones por método de estándar interno

Para la preparación de los patrones (glicerina, monooleina, dioleina, y trioleina) y estándares internos (butanotriol y tricaprín) se siguieron los lineamientos establecidos en la Norma ASTM D6584. Los patrones fueron pesados en matraces volumétricos con una aproximación de 0,1mg y aforados hasta su volumen con piridina (Tabla 4.7). A continuación, se prepararon cinco soluciones estándar en viales (Tabla 4.8); a cada una de las 5 soluciones estándar se les agregó 100µl de una solución derivatizante (MSTFA). El vial fue cerrado y agitado vigorosamente. Las soluciones se dejaron reposar durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 8 ml de n-Heptano y se procedió agitar.

**Tabla 4.7. Preparación de las soluciones madre**

Reactivo	Peso (mg)	Volumen final (ml)
Glicerina	25	50
1-Mono [cis-9-octadecenoyl]-rac-glicerol (monooleina)	50	10
1,3-Di [cis-octadecenoyl] glycerol (dioleina)	50	10
1,2,3-Tri [cis-octadecenoyl] glycerol (trioleina)	50	10
(S)-(-)-1,2,4-Butanetriol-( estándar interno 1)	25	25
1,2,3-Tridecanoylglycerol (tricaprina) (estándar interno 2)	80	10

Finalmente se realizaron corridas en el cromatógrafo gaseoso de forma individual por cada solución estándar preparada; para ello se inyectó 1µl de la solución siguiendo las condiciones de operación de la Tabla 4.6.

**Tabla 4.8. Soluciones estándar**

<b>Solución estándar</b>	1	2	3	4	5
µl de glicerol solución madre	10	30	50	70	100
µl de monooleina solución madre	20	50	100	150	200
µl de dioleina solución madre	10	20	40	70	100
µl de trioleina solución madre	10	20	40	70	100
µl de butanetriol solución madre	100	100	100	100	100
µl de tricaprín a solución madre	100	100	100	100	100

Los cromatogramas fueron analizados y se realizó su respectiva integración y confirmación de sus tiempos de retención. Para cada sustancia de referencia se determinó la relación de respuesta (Ecuación 4.3) y la relación de cantidad para cada componente utilizado (Ecuación 4.4).

$$rsp_i = \frac{A_i}{A_s} \quad (4.3)$$

donde:

rsp<sub>i</sub>: relación de respuesta

A<sub>i</sub>: área de los patrones

A<sub>s</sub>: área de los estándares internos

$$amt_i = \frac{W_i}{W_s} \quad (4.4)$$

siendo:

amt<sub>i</sub>: relación de la cantidad

W<sub>i</sub>: peso de los patrones

W<sub>s</sub>: peso de los estándares internos

#### 4.10.2 Preparación de muestras de Análisis

Se pesó 100 mg de muestra (Biodiesel producido) con una precisión de 0,1 mg, la cual fue introducida en un vial de 10 ml y se añadió 100 µl de butanetriol y 100 µl de tricaprín (estándares internos), se adicionó 100 µl de MSTFA, el vial se cerró, se agitó

vigorosamente por 3 min y se dejó en reposo de 15 a 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 8 ml de heptano y se homogenizó la disolución por agitación.

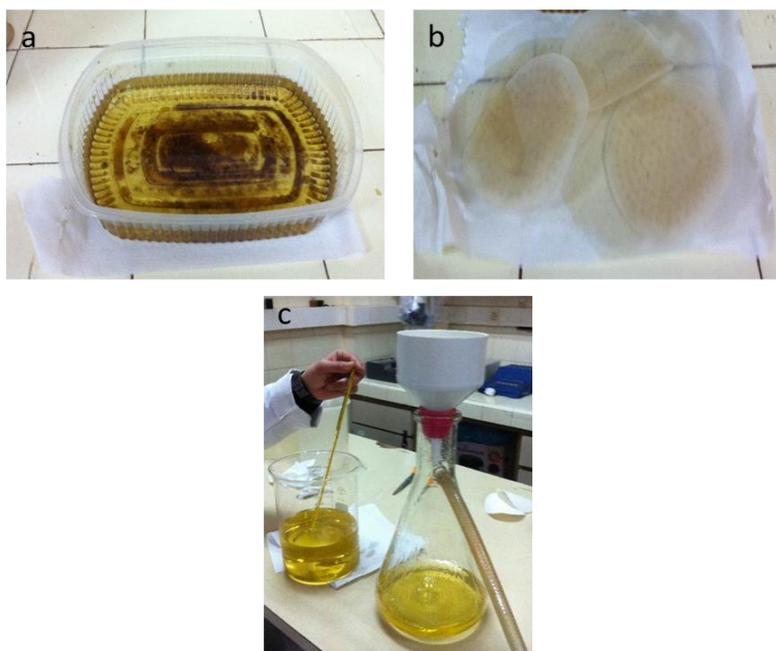
Finalmente se procedió a inyectar la 1  $\mu$ l de la mezcla de reacción usando las mismas condiciones de operación usadas para los patrones y estándares internos. Una vez terminado el análisis se identificaron los picos comparando con los tiempos de retención de los estándares analizados previamente.

## 4.11 Resultados y discusión

### 4.11.1 Pre-tratamiento del aceite

El proceso de pretratamiento del aceite usado en los ensayos de los snacks consistió inicialmente en un filtrado por medio del sistema descrito anteriormente (Sección 4.5.2) usando un papel filtro mediante un sistema de filtración al vacío (Figura 4.7b,c).

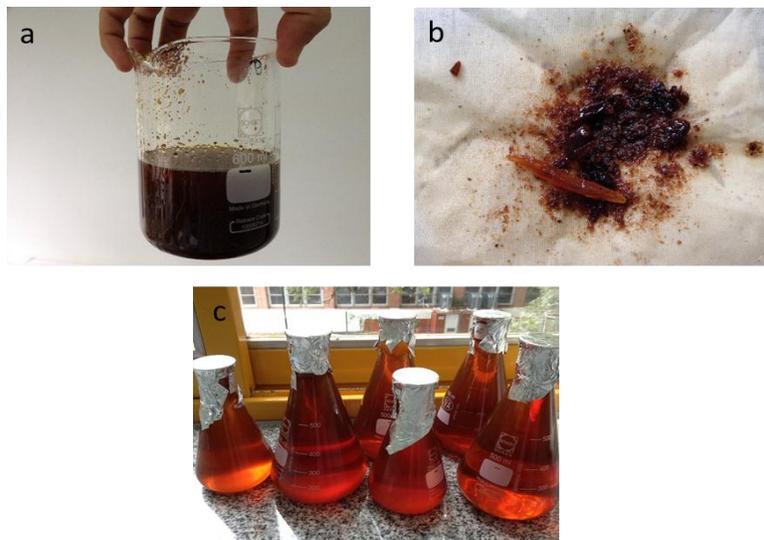
La filtración se desarrolló sin presentar ningún inconveniente ya que las impurezas eran pequeñas y relativamente pocas.



**Figura 4.7. Separación del aceite baja acidez y las partículas sólidas por medio de filtración al vacío. a) Aceite recolectado. b) restos sólidos en papel filtro. C) aceite filtrado**

En el caso del aceite recolectado en los puestos de comida fue necesario realizar un proceso pre-filtrado de las impurezas por medio de una tela filtrante (Figura 4.8b), debido a las obstrucciones generadas por las partículas de gran tamaño, las cuales se depositaban

en el papel filtro impidiendo que el aceite pasara al kitasato; una vez filtradas las impurezas de gran tamaño por medio de la tela filtrante se procedió a realizar el proceso de filtrado al vacío por medio de papel filtro.



**Figura 4.8. Separación de las impurezas de gran tamaño del aceite recolectado en puestos de comida por medio de tela filtrante y filtro. a) aceite recolectado en puestos de comida. b) restos sólidos. C) aceite filtrado**



**Figura 4.9. Proceso de eliminación de la humedad del aceite usado**

Luego del proceso de remoción de impurezas de los dos aceites de prueba se procedió a realizar el secado de los mismos para lo cual un kilogramo de aceite fue depositado en un vaso de precipitado de dos litros y calentado a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas (Figura 4.9), a continuación, se deja enfriar y se registró el peso. Este procedimiento fue

repetido 3 veces sin encontrar diferencias significativas en el peso de ninguna de las muestras por lo tanto se procedió a guardar el aceite tratado en un recipiente hermético para su posterior uso en el proceso de biodiesel

#### **4.11.2 Análisis fisicoquímico del aceite**

En la Tabla 4.9 se pueden apreciar las características fisicoquímicas de las dos muestras de aceite. Las muestras de aceite de fritura de los snacks de manzana presentaron un color característico del aceite sin usar o con muy poco uso con índices de acidez de 0,93 mg NaOH/g muestra, siendo alrededor de 4 veces inferior al encontrado en el aceite recolectado de los puestos de comida (3,80 mg NaOH/g muestra), esto es debido a que en los puestos de comida reutilizan el aceite en muchas ocasiones con el fin de abaratar costos generando una mayor cantidad de hidrólisis de los triglicéridos lo cual produce mayor cantidad de ácidos grasos libres.

El aceite de los puestos de comida presento un color ámbar, este color se pudo generar a partir de compuestos solubles que provocan pardeamiento. Dichos compuestos se producen en la fritura de alimentos como subproductos de las reacciones de Maillard entre azúcares reductores y grupos amino. Adicionalmente, otros productos con grupos carbonilo, generados durante la oxidación lipídica, pueden reemplazar a los carbohidratos y desencadenar estas reacciones con aminas, aminoácidos y proteínas. Igualmente, los oligómeros productos de la oxidación avanzada también aportan color al aceite al ser de tonalidad marrón oscuro. Por otra parte, aunque ocurre caramelización de carbohidratos principalmente en el alimento sometido a fritura y se producen compuestos de alto y bajo peso molecular de color marrón, su contribución a la degradación del aceite durante el proceso de fritura no es significativa (Cardenas y col., 2020). La presencia de ácidos grasos en el aceite también favorece el oscurecimiento, lo cual coincide con su alto índice de acidez (3,80 mg NaOH/g muestra).

Se encontró un aumento de 1,34 veces en el índice de saponificación del aceite de los puestos de comida en comparación con el aceite de fritura de los snacks de manzana (Tabla 4.9), lo cual era un valor esperado debido a que el índice de saponificación es una medida indirecta de la presencia de ácidos grasos libres, mono, di y triglicéridos y otros lípidos saponificables. Cuanto mayor es el índice de saponificación, mayor es la

concentración de ácidos grasos de bajo peso molecular, los cuales se pueden producir en los procesos de freído ( Sajjadi y col., 2014)

**Tabla 4.9 Características físico-químicas del aceite usado**

Parámetros	Aceite fritura snacks de manzana	Aceite recolectado de puestos de comida
Acidez (%oleico)	0,47	1,91
Índice de acidez (mg KOH/g muestra)	0,93	3,80
Índice de saponificación (mg KOH/g muestra)	155,7	208,8
Aspecto visual	Amarillo claro	Marrón

## 4.12 Producción de biodiesel

### 4.12.1 Esterificación y transesterificación (catálisis en dos etapas), aceite de alta acidez

En el caso del aceite recolectado de puestos de comida la determinación del valor de acidez (3,80 mg KOH/g muestra) nos indicó que el proceso más recomendable a seguir es en dos etapas, por lo tanto, se optó por realizar catálisis ácida seguida de catálisis básica (Ekin, 2019). La catálisis ácida principalmente se realiza con el fin de disminuir la concentración de ácidos grasos libres logrando realizar posteriormente el proceso de catálisis básica (Dias y col., 2009).

#### - Esterificación (catálisis Ácida)

El proceso de esterificación y transesterificación tanto para los ensayos con aceite de baja y alta acidez se llevan a cabo usando un equipo de destilación a reflujo, el cual consistía en un balón de destilación esférico de 250 ml adaptado a un condensador de reflujo vertical el cual fue enfriado con agua en contra corriente (Figura 4.10, 4.12 y 4.15). El condensador se utilizó para reducir las pérdidas del metanol por evaporación.

Inicialmente se realizaron pruebas con el aceite de los puestos de comidas para determinar el porcentaje de ácido sulfúrico a utilizar en el proceso de catálisis ácida, para lo cual se prepararon 3 ensayos (Tabla 4.4), variando el porcentaje de ácido sulfúrico (0,1%,

0,5% y 1,0%), mientras que la relación molar (metanol:aceite), el tiempo y la temperatura se mantuvieron constantes.



**Figura 4.10. Esterificación ácida. a) preparación de la muestra. b) proceso de reacción.**

En el proceso esterificación ácida se observó una leve formación de una sustancia oscura que se depositaba en el fondo del balón de destilación, la cual se presentaba en el momento que se detiene la agitación; este fenómeno se pudo evidenciar más fácilmente en el ensayo CAB<sub>2</sub> (0,5% de ácido sulfúrico). En el caso del ensayo CAB<sub>1</sub> (0,1% de ácido sulfúrico), se logró ver levemente, mientras que para el ensayo CAB<sub>3</sub> (1,0% de ácido sulfúrico) no se presentó este fenómeno. Esta sustancia oscura posiblemente se pueda atribuir a la formación de glicerol a partir de los ácidos grasos libres que están siendo esterificados.

#### **- Secado del producto obtenido en el proceso de esterificación**

Es bien sabido que el agua es un producto en las reacciones de esterificación, lo cual es un inconveniente en la transesterificación alcalina debido a que los triglicéridos en presencia de agua y catalizador alcalino producen reacciones de saponificación, disminuyendo no solo el rendimiento de la producción de metil ésteres sino generando inconvenientes al momento de la separación del biodiesel y el glicerol (Talebian-Kiakalaieh y col., 2013). Por lo tanto, se procedió a realizar el secado del producto de la reacción de

esterificación, antes de realizar el proceso de transesterificación. El secado se realizó por medio de una placa magnética a 80°C durante 4 horas a 250 rpm (Figura 4.11). A continuación, se realizó el proceso de transesterificación.



**Figura 4.11. Secado del producto del proceso de esterificación**

#### **- Transesterificación (catálisis alcalina)**

Se tomaron las muestras previamente esterificadas y fueron llevadas a un balón de destilación. En un vaso de precipitado se preparó la solución de metóxido para lo cual se usó metanol anhidro (25 mL) el cual fue mezclado con 0,8 g de KOH previamente secado.



**Figura 4.12. Transesterificación alcalina de aceite de alta acidez**

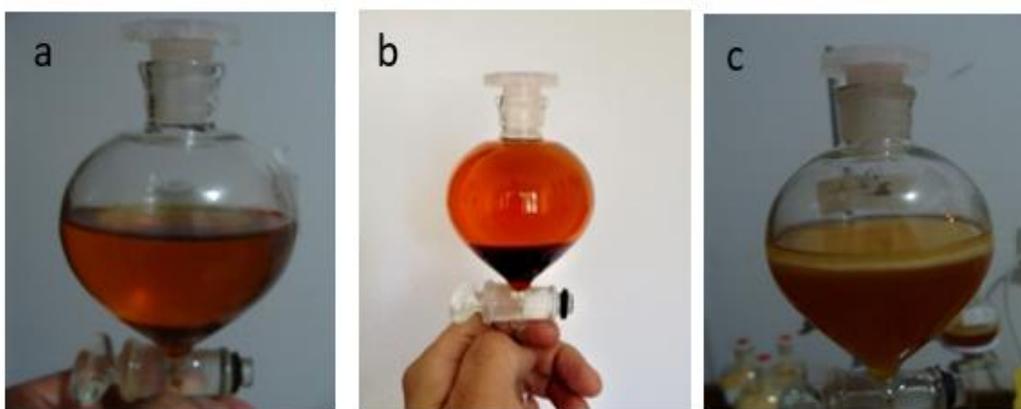
La cantidad de metanol a utilizar fue determinada por la cantidad de aceite usado inicialmente en el proceso de esterificación con una relación molar metanol/aceite de 6:1

(Freedman y col., 1998; Allawzi y Kandah, 2008). Una vez que el hidróxido estaba disuelto se procedió a mezclar con el aceite esterificado en el balón de destilación.

El sistema se dejó reaccionar a reflujo durante 1,5 horas a 60°C (Figura 4.12) y fue transvasado en ampollas de decantación donde se realizó la separación del glicerol y el biodiesel por diferencia de densidad. En la fase superior se encontraba la mezcla formada por esteres metílicos (biodiesel) mientras que la fase inferior contenía el glicerol, exceso de metanol y restos de catalizador.

Como se puede observar en la Figura 4.13a, el ensayo CAB<sub>1</sub> (0,1% de ácido sulfúrico), presentó una pequeña separación de fases, la fase superior donde se encontraban los metil ésteres era de aspecto levemente turbio.

En este ensayo se logró obtener alrededor del 4 mL de glicerol por cada 100 mL de aceite. En el caso del ensayo CAB<sub>2</sub> (0,5% de ácido sulfúrico) la producción de glicerol fue un poco más del doble en comparación con el ensayo CAB<sub>1</sub>, obteniéndose aproximadamente unos 10 mL de glicerol, mientras que la fase que contenía los metil esteres en este caso era más transparente y brillante (Figura 4.13b). Para el ensayo CAB<sub>3</sub> (1,0% de ácido sulfúrico concentrado) no se presentó la típica formación de dos fases en la que se encontraba el glicerol crudo (Figura 4.13c) por lo que podemos concluir que el proceso de producción de biodiesel no se presentó.



**Figura 4.13. Obtención de biodiesel. a) CAB<sub>1</sub> (0,1% de ácido sulfúrico), b) CAB<sub>2</sub> (0,5% de ácido sulfúrico), c) CAB<sub>3</sub> (1,0% de ácido sulfúrico)**

En la Tabla 4.10 se resumen los resultados obtenidos en el proceso de producción de biodiesel en dos etapas.

**Tabla 4.10 Resultados de la producción de biodiesel de la catálisis en dos etapas (ácida y básica)**

Tipo de catálisis	Muestra	Metil ésteres (mL)	Glicerol (mL)
Catálisis ácida y básica	CAB <sub>1</sub>	85	4
	CAB <sub>2</sub>	90	10
	CAB <sub>3</sub>	*NP	*NP

\*NP: no presenta

Cabe destacar que el glicerol es un subproducto de la reacción del proceso de obtención del biodiesel, lo cual indica que a más cantidad de glicerol más cantidad de biodiesel se produce; por lo tanto, el lavado y análisis por cromatografía líquida se realizó solo al ensayo CAB<sub>2</sub> (0,5% de ácido sulfúrico) ya que fue el ensayo donde se logró obtener la mayor cantidad de glicerol.

#### - Lavado del biodiesel

Una vez que se logró tener los ésteres metílicos separados del glicerol se procedió a realizar el lavado del biodiesel (CAB<sub>2</sub>) con 25 ml de una solución de ácido fosfórico al 5% (Predojevic, 2008). A continuación, se tapaba la ampolla de decantación y se procedía a agitar vigorosamente lo cual conducía a la formación de una emulsión (Figura 4.14a).



**Figura 4.14. Purificación del biodiesel producido en dos etapas: catálisis ácida y básica. a) biodiesel emulsionado, b) separación del biodiesel y el agua de lavado**

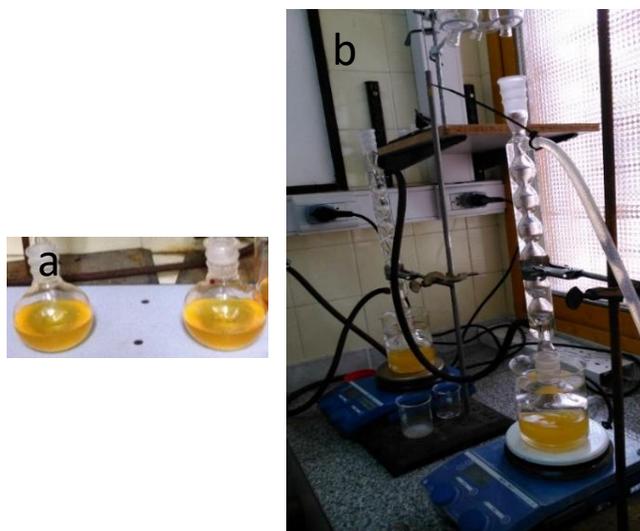
Finalmente se dejaba reposar por unas horas; el sistema presentaba dos fases, una fase superior donde se encontraban los metil ésteres y una fase inferior donde se

encontraba el agua de lavado con las impurezas retiradas de los metil ésteres (Figura 4.14b). Dicho procedimiento se realizó por lo menos tres veces para garantizar el correcto lavado del biodiesel.

#### 4.12.2 Transesterificación (catálisis en una etapa)

El proceso de transesterificación alcalina como único proceso fue elegido para el aceite usado en la fritura de snacks ya que su índice de acidez es de 0,93 mgKOH/g muestra, siendo 2 veces menor al valor recomendado como seguro para realizar la transesterificación alcalina (<2mgKOH/g muestra) (Canakci y Gerpen, 2001).

La transesterificación alcalina de las muestras evaluadas se realizó usando la misma metodología descrita para el ensayo del aceite de alta acidez anteriormente detallado. La transesterificación se realizó en un balón de destilación, donde fue depositado el aceite previamente filtrado y secado, en paralelo se preparó el metóxido en un vaso de precipitado con una relación molar alcohol /aceite de 6:1 con 0,8 gr de KOH, a continuación, se depositó el metóxido en el balón de destilación y se dejó reaccionar durante 1,5 horas a 60 °C (Figura 4.15).



**Figura 4.15. Transesterificación básica del aceite de baja acidez. a) preparación de la muestra. b) proceso de reacción**

Después de la reacción de transesterificación ocurría una separación espontánea de fases debido a su inmiscibilidad y diferencia de densidad del biodiesel y el glicerol. Por lo tanto, el producto de la reacción fue depositado en ampollas de decantación y se dejó reposar por 24 horas donde finalmente se logró la separación de biodiesel (Figura 4.16).



Figura 4.16. Separación de fases de la catálisis básica.

### - Lavado del biodiesel

El lavado del biodiesel se realizó de manera similar al expuesto anteriormente en el sistema en dos etapas, por lo tanto, una vez separado el glicerol se adicionó 25 ml de una solución de ácido fosfórico al 5% a la ampolla de decantación, se agitó vigorosamente (Figura 4.17a) y se dejó reposar durante unas horas hasta obtener la separación de las fases. El procedimiento se repitió por 3 veces, hasta obtener una solución transparente libre de impurezas (Figura 4.17b).



Figura 4.17. Purificación del biodiesel. Catálisis básica. a) biodiesel emulsionado, b) separación del biodiesel y el agua de lavado.

Finalmente se logró obtener 14 mL de glicerol crudo por cada 100 ml de aceite y 96 ml de biodiesel (Tabla 4.11), un poco más de producción de glicerol y metil ésteres en comparación con el mejor ensayo usado en la catálisis de dos etapas (CAB<sub>2</sub>) donde se obtuvieron 90 ml de metil ésteres y 10 ml de glicerol por cada 100 ml de aceite de alta acidez.

El glicerol crudo obtenido en el proceso de catálisis en una sola etapa (aceite de baja acidez) fue alimentado en los reactores de selección y producción de lodos activados como fuente de carbono y energía en la producción de polihidroxialcanoatos.

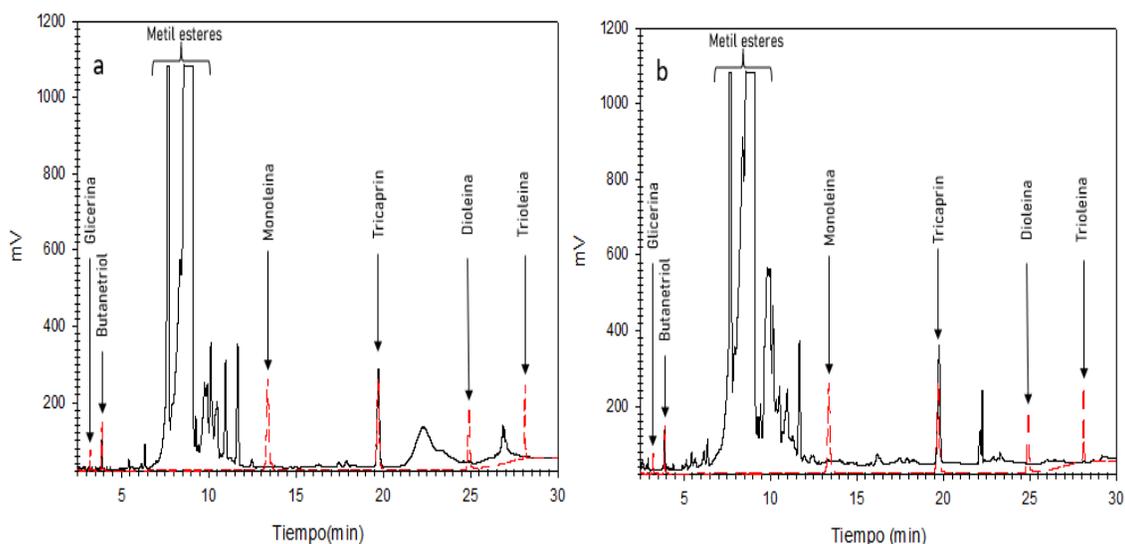
**Tabla 4.11 Resultados de la producción de biodiesel de la catálisis básica**

Tipo de catálisis	Muestra	Metil ésteres (mL)	Glicerol (mL)
Catálisis básica	CB	96	14

### 4.13 Análisis del biodiesel

Se realizó el análisis del biodiesel por cromatografía de gases, descrita en la norma ASTM D6584 para determinación de monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y glicerina libre en B-100, biodiesel, metil ésteres.

En este trabajo se realizó un análisis de glicerina libre, monooleína, dioleína, trioleína siguiendo la técnica de estándar interno tal como lo refiere la norma. Por medio del análisis de los cromatogramas se logró determinar los tiempos de retención de la glicerina, monooleína, dioleína y trioleína: 3,17; 13,38; 24,90 y 28,10 min respectivamente (Figura 4.18 a y b. líneas rojas).



**Figura 4.18. Cromatogramas: a) — Muestra de biodiesel baja acidez. --- Estándares internos y patrones. b) — Muestra de biodiesel alta acidez. --- Estándares internos y patrones**

Sin embargo, ninguna de las muestras obtenidas en la producción de biodiesel, biodiesel de aceite usado baja acidez (línea negra en la Figura 4.18a) y aceite usado de alta acidez (línea negra en la Figura 4.18b), presenta una señal detectable ni cuantificable de ninguno de los analitos objetivo. Por lo que se puede inferir que el proceso de reacción se realizó completamente y el lavado del biodiesel se llevó a cabo de forma exitosa. Con esto podemos concluir que la conversión del aceite en metil ésteres se logró de forma exitosa sin producción de ácidos grasos.

Para la determinación de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) existen varios métodos. El método empleado en el presente estudio fue el que considera que el LC es igual a la concentración del analito que proporcione una señal 10 veces superior a la señal de ruido y que el LD es igual a la concentración de analito que proporcione una señal 3 veces superior a la señal de ruido (Ortega y col., 2001).

Como se observa en la Tabla 4.12, tanto para la mínima cantidad de analito detectable (LD) como para la mínima cantidad de analito que se puede cuantificar (LC), no hay presencia de ninguno de éstos. Teniendo en cuenta que los ácidos grasos son componentes mayoritarios de los aceites de cualquier matriz oleica, obtener un biodiesel con cantidades de glicerina, monoleina, dioleina y trioleina no detectables y por tanto no cuantificables se asocia a un proceso óptimo ya que indica que toda la materia grasa fue convertida en metil ésteres.

**Tabla 4.12 Parámetros analíticos de cuantificación**

Patrones	R <sup>2</sup>	SD	LD (ppm)	LC (ppm)	Tiempo de retención (min)
<b>Glicerina</b>	0,9982	0,00418	0,03941	0,13137	3,173
<b>Monoleina</b>	0,9898	0,00365	0,17410	0,5803	13,38
<b>Dioleina</b>	0,9885	0,00243	0,01492	0,07477	24,90
<b>Trioleina</b>	0,9862	0,00421	0,02671	0,08096	28,10

Vemos que en la tabla 4.12, en el análisis de la curva de calibración de cada analito (glicerina, monoleina, dioleina y trioleina) podemos notar que los coeficientes de correlación

(R<sup>2</sup>) obtenidos fueron mayores a 0,986, indicando que existe correlación en cuanto a la precisión del método. Los parámetros de desviación estándar (SD) indican que el grado de concordancia entre los resultados obtenidos de las muestras es alto y por tanto los análisis son repetibles y el método preciso, evitando de esta manera falsos positivos y falsos negativos (Skoog y col., 2001). Los valores de R<sup>2</sup> y SD fueron suministrados por el software del equipo.

#### 4.14 Experimento definitivo con glicerol crudo

##### 4.14.1 Selección de bacterias con capacidad de acumular PHA. Sistema con régimen Feast/Famine alimentado con glicerol crudo

Una vez acondicionados los barros activados a glicerol puro 100% (Ensayo GP<sub>3</sub>) se procedió a realizar la alimentación del sistema con glicerol crudo 100% (Ensayo GC), obtenido del proceso de producción de biodiesel utilizando aceite vegetal usado de baja acidez (0,93 mgKOH/g muestra); las condiciones de operación del reactor SBR fueron las mismas del ensayo GP<sub>3</sub>.

##### 4.14.2 Condiciones operativas

Tabla 4.13. Condiciones operativas del experimento con glicerol crudo. El ensayo se realizó con una relación DQO:N:P de 100:10:5, volumen de trabajo de 4,2 litros, volumen de reactor de 5 litros y tiempo de sedimentación de 45 min

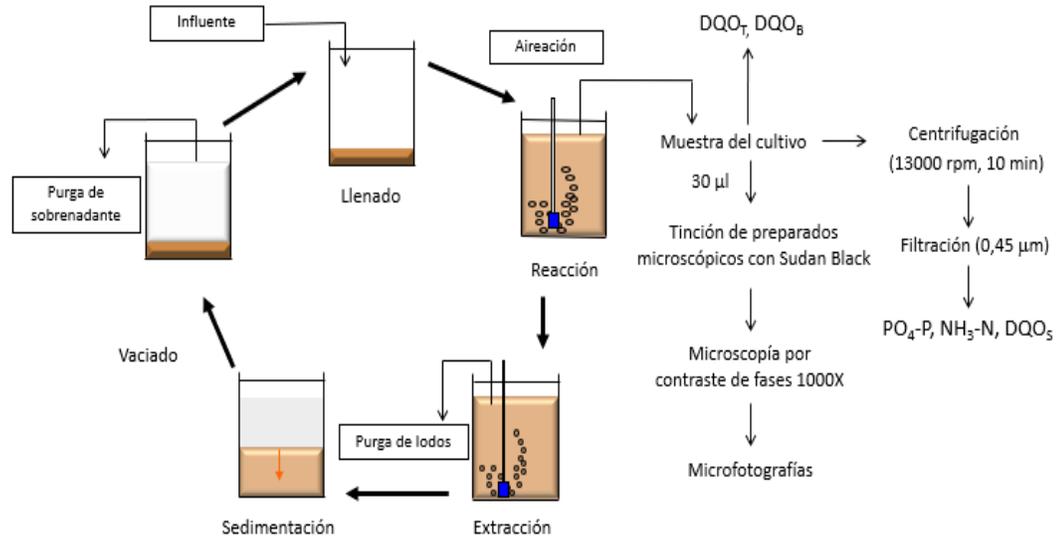
Parámetros	Experimento GC
Tiempo de residencia celular (días)	20
Tiempo de residencia hidráulico (TRH) (días)	8,16
Duración del ciclo (días/horas)	7/168
Concentración inicial de DQO soluble en el SBR DQOs (mg/L)	1754
CV <sub>DQOs</sub> (gDQO/(L día))	0,25
CV <sub>NH<sub>3</sub>-N</sub> (gN/(L día))	0,025
CV <sub>P</sub> (gP/(L día))	0,012

El SBR de selección se realizó en un reactor de capacidad de 5 litros y un volumen de trabajo de 4,2 litros, se operó con ciclos de 168 horas, mientras que el tiempo de residencia hidráulico y celular fueron de 8,16 y 20 días respectivamente (Tabla 4.13). La concentración de oxígeno fue mayor a 4,0 mgO<sub>2</sub>/L, la temperatura y el pH no fueron controlados.

Los materiales y métodos tanto de los análisis fisicoquímicos de los reactores y del polímero como de la extracción, precipitación y purificación del PHA se detallan en el Capítulo 3 en sus correspondientes secciones.

#### 4.14.3 Determinaciones fisicoquímicas

Se evaluó la estabilidad del SBR a lo largo de diferentes ciclos mediante la determinación de los siguientes parámetros físico-químicos: ortofosfato (PO<sub>4</sub>-P, mgP/L), amonio (NH<sub>3</sub>-N, mgN/L), sustrato orgánico como DQO soluble (DQO<sub>S</sub>, mg/L) y concentración de biomasa determinada como DQO (DQO<sub>B</sub>, mg/L). DQO<sub>B</sub> correspondió a la diferencia entre DQO total (DQO<sub>T</sub>) y DQO<sub>S</sub>. La velocidad de consumo de oxígeno (VCO) fue determinada por respirometría y la velocidad específica de consumo de oxígeno (VECO) por la relación entre VCO y DQO<sub>B</sub>. Se determinó si existía acumulación de PHA intracelular por medio de tinción microscópica (ver capítulo 2).



**Figura 4.19. Ciclo de operación y determinaciones fisicoquímicas durante el ciclo de selección de bacterias acumuladoras de PHA alimentado con glicerol crudo**

Para el experimento con glicerol crudo, el SBR se operó con cinco fases: llenado, reacción (167 hs), extracción, sedimentación (45 min) y vaciado (purga de lodos 15 min) (Figura 4.19). Tanto los procedimientos en la toma de muestras como las determinaciones fisicoquímicas se detallan en el capítulo 2.

#### 4.14.4 Composición del agua residual sintética para el glicerol crudo (ARS<sub>Gc</sub>)

En la Tabla 4.14 se presenta el agua residual sintética para el glicerol crudo con la siguiente composición expresada en demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno (N) y fósforo (P) para los diferentes ensayos. Se mantuvo una relación DQO:N:P= 100:10:5 para evitar la limitación del crecimiento de los microorganismos en relación al fósforo y nitrógeno.

**Tabla 4.14. Agua residual sintética de los ensayos estudiados**

Agua residual sintética (ARS)	Concentración (g/L) ARS <sub>Gc</sub>
Glicerol de biodiesel de baja acidez	1,69
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,96
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,21
NaHCO <sub>3</sub>	1,5

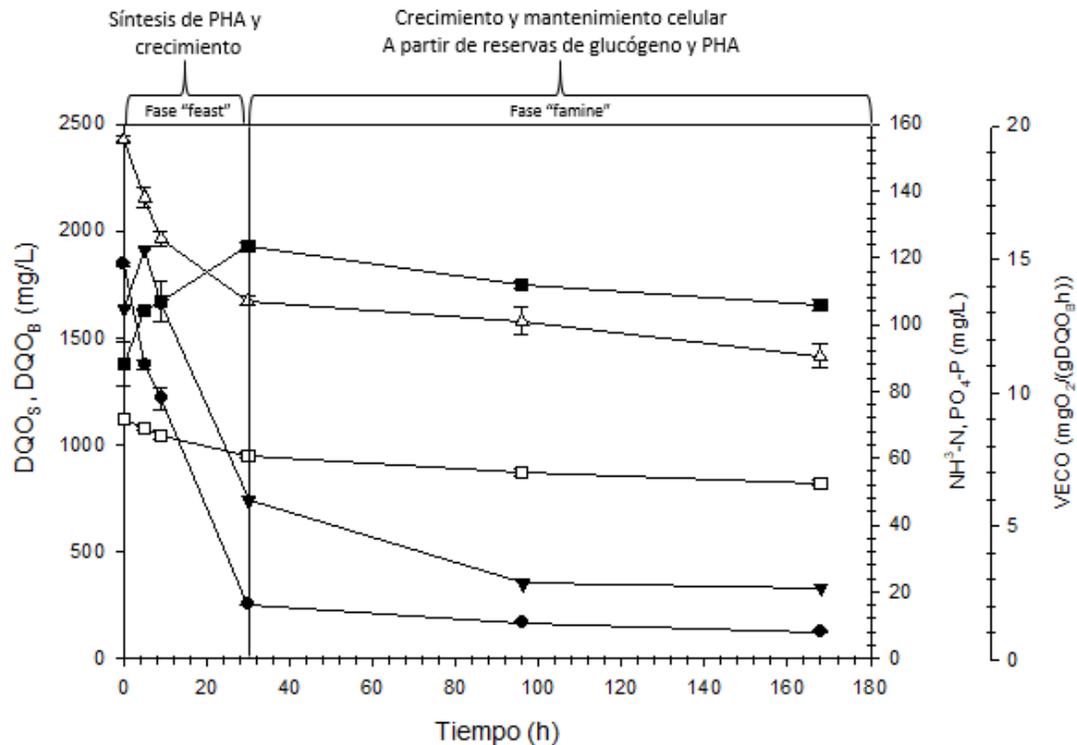
#### 4.15 Resultados y discusión del sistema de selección con glicerol crudo

El SBR alimentado con glicerol crudo presentó un típico ciclo de disponibilidad y limitación de fuente de carbono externa con una relación de 17,8 y 82,2% de la duración total del ciclo operativo respectivamente; como se expuso en el capítulo 3 es necesario que la fase de disponibilidad de carbono en el ciclo de selección se encuentre por debajo de 20% para generar una mayor presión de selección sobre las bacterias con capacidad de acumular PHA (Serafim y col., 2004; Dionisi y col., 2005; Pittmann, 2017).

En la primera fase (etapa “feast”) se produjo el consumo de la fuente de carbono externa, alrededor del 88%, con una velocidad de 1202 mg DQOs/(L día), esta etapa se desarrolló entre las 25 y 30 horas del ciclo. El sistema se estabilizó luego de 4 TRC con una biomasa de 1378 ± 105 mgDQO<sub>B</sub>/L al inicio del ciclo. Asociado al consumo de sustrato se observó un incremento gradual de la biomasa microbiana, en la fase de disponibilidad de

carbono externo, hasta  $1929 \pm 18$  mgDQO<sub>B</sub>/L. Durante el tiempo restante del ciclo (fase de inanición) la concentración de biomasa decayó ligeramente (Figura 4.20).

La velocidad de consumo de oxígeno se incrementó durante la etapa inicial de incremento de la biomasa desde aproximadamente  $13,1$  mgO<sub>2</sub>/(gDQO<sub>B</sub> h) hasta  $15,3$  mgO<sub>2</sub>/(gDQO<sub>B</sub> h) y luego disminuyó progresivamente hasta  $5,9$  mgO<sub>2</sub>/(gDQO<sub>B</sub> h) al final de la fase "feast". Durante el tiempo restante del ciclo (fase Famine), la VECO disminuyó gradualmente hasta alcanzar finalmente valores de  $2,7$  mgO<sub>2</sub>/(gDQO<sub>B</sub> h) (Figura 4.20).



**Figura 4.20. Parámetros químicos de un ciclo de operación del SBR alimentado con medio de cultivo basado en glicerol crudo. (●) DQO soluble (DQO<sub>s</sub>, mg/L); (■) DQO de biomasa (DQO<sub>B</sub>, mg/L); (Δ) Nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>-N, mg/L); (□) Ortofosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P, mg/L); (▼) Velocidad específica de consumo de oxígeno (VECO, mgO<sub>2</sub>/(gDQO<sub>B</sub> h))**

El decaimiento de la biomasa, durante la fase de inanición, puso de manifiesto la ocurrencia de fenómenos de mantenimiento celular a expensas del consumo de sustancias de reserva intracelular. La carga específica de sustrato orgánico fue de  $181,4$  mgDQOs/(gDQO<sub>B</sub> día), mientras que la carga específica de nitrógeno y fósforo fue de  $18,14$

mgN/(gDQO<sub>B</sub> día) y 8,70 mgP/(gDQO<sub>B</sub> día) respectivamente (Tabla 4.15). La disminución de amonio y fosfato fue asociada a síntesis de biomasa; el aumento de biomasa fue determinado mediante DQO, se atribuye no solamente al crecimiento o multiplicación celular sino también a la síntesis y almacenamiento de glucógeno y PHA.

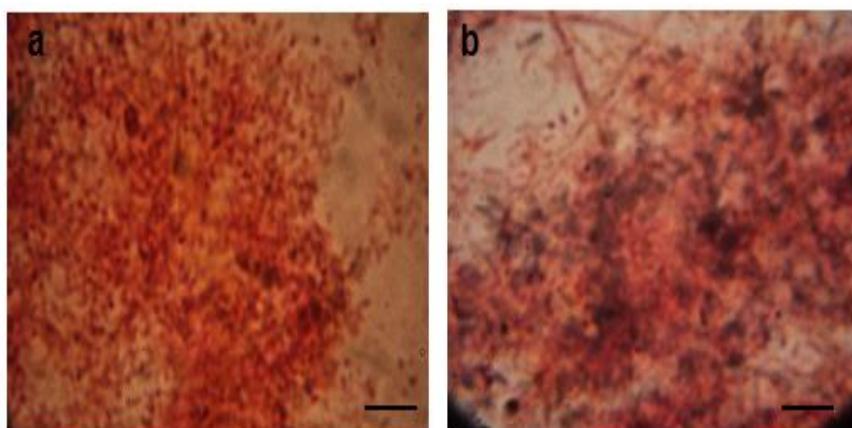
**Tabla 4.15. Parámetros fisicoquímicos y biológicos del sistema alimentado con glicerol crudo**

Parámetro	GC
Etapa feast (%)	17,8
C.E.SO. (mgDQOs/(gDQO <sub>B</sub> día))	181,4
C.E.N. (mgN/(gDQO <sub>B</sub> día))	18,14
C.E.P. (mgP/(gDQO <sub>B</sub> día))	8,70

C.E.SO: Carga específica de sustrato orgánico; C.E.N: Carga específica de nitrógeno; C.E.P: Carga específica de fósforo

#### 4.15.1 Tinción y observación microscópica

Por medio de la tinción con Sudan Black y observación microscópica se logró detectar la acumulación de PHA durante la fase “Feast” de los ciclos del SBR (Figura 4.21).



**Figura 4.21. Micrografías de lodos activados con tinción Sudan Black del reactor SBR de selección de microorganismos acumuladores de PHA con medio de cultivo basado en glicerol crudo. (a) Tiempo de operación: 0 hs. (b) Tiempo de operación: 30 hs. — 10 µm.**

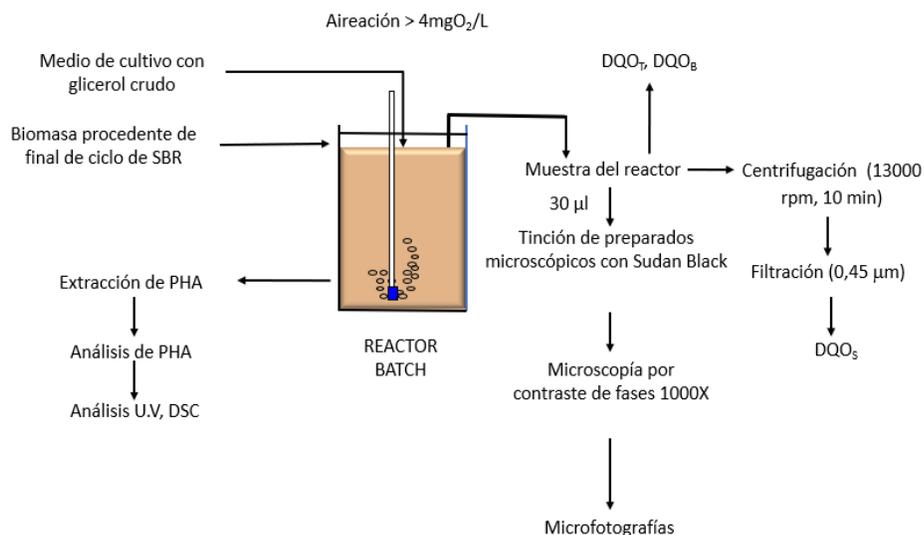
Por medio de los análisis de las micrografías se puede afirmar que se presenta síntesis y almacenamiento de PHA junto al crecimiento, lográndose una presión selectiva

ideal en el sistema cuando el TRC y TRH fue de 20 y 8,16 días respectivamente con ciclos de 7,0 días (168hs), carga orgánica de 0,25 gDQO/(L día) y relación DQO:N:P= 100:10:5. Estas condiciones generaron una ventaja competitiva de los microorganismos con capacidad de acumular PHA que pueden utilizar el sustrato almacenado en la fase famine (Guo y col., 2016).

## 4.16 Sistema de producción de PHA con glicerol crudo

### 4.16.1 Puesta en marcha del reactor Batch para la producción de PHA

El sistema de producción de PHA se realizó usando como inóculo los lodos activados del sistema de selección con glicerol crudo (GC), dichos microorganismos contaban con la capacidad de acumular PHA como se logró confirmar por medio de las micrografías con tinción Sudan Black. Para el ensayo de producción se utilizó glicerol crudo como fuente de carbono y energía, el cual fue obtenido como subproducto del proceso de producción de biodiesel usando aceite reciclado de baja acidez. Las determinaciones fisicoquímicas se detallan en el Capítulo 2 y 3 en sus correspondientes secciones.



**Figura 4.22. Esquema del sistema de producción de PHA alimentado con glicerol crudo**

### 4.16.2 Agua residual sintética (ARS)

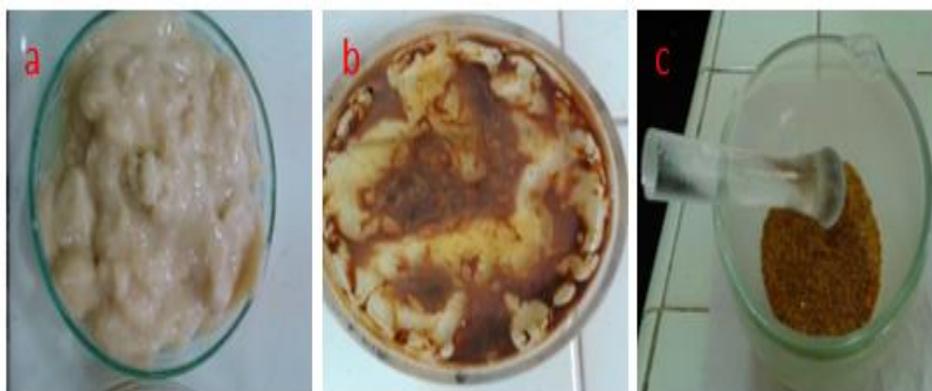
En la Tabla 4.16 se presenta la composición del agua residual sintética con la siguiente composición expresada en demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno (N) y fósforo (P). Para el experimento se mantuvo con una relación DQO:N:P= 100:0,5:0,25.

**Tabla 4.16. Agua residual sintética del sistema de producción de PHA con glicerol crudo**

Agua residual sintética (ARS)	Concentración (g/L) ARS <sub>GC</sub>
Glicerol de biodiesel de baja acidez	1,690
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0481
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,01375
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,0109
NaHCO <sub>3</sub>	1,5

#### 4.16.3 Proceso de extracción y purificación de PHA

Una vez se finalizado el proceso de producción de PHA se realiza la extracción y purificación del polímero intracelular, el cual se llevó a cabo siguiendo la metodología estandarizada en el Capítulo 3, Sección 3.8. La biomasa obtenida al final del proceso de producción fue separada del licor mixto por centrifugación; el pellet se resuspendió con agua destilada y se volvió a centrifugar, procedimiento que se repitió tres veces (Figura 4.23a). A continuación, se secó el pellet (Figura 4.23b); finalmente la biomasa seca fue triturada (Figura 4.23c).



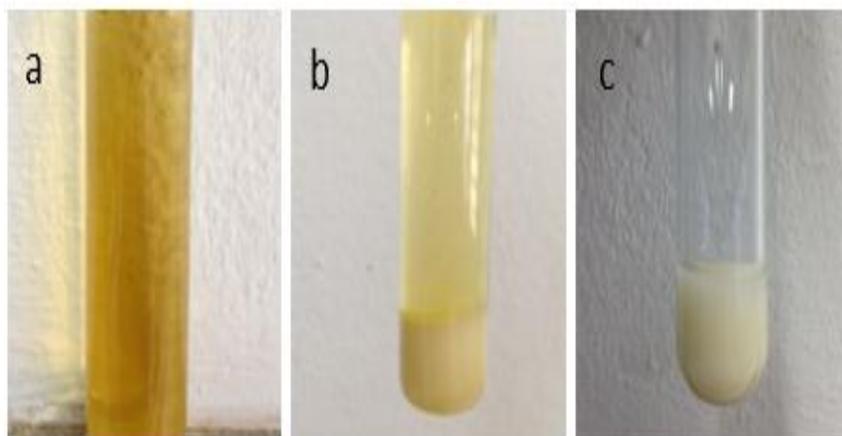
**Figura 4.23. a) Lodos activados luego del proceso de centrifugado, b) Lodos activados secados en estufa al vacío, c) Lodos activados luego del proceso de trituración**

Para el proceso de extracción se tomó la biomasa triturada y se realizó la extracción por medio del método optimizado en el Capítulo 3, Sección 3.9 (Figura 4.24). Al finalizar el tiempo de extracción se procedió a separar los restos celulares del cloroformo por medio de una bomba de vacío y filtros de celulosa (ver Capítulo 2 y 3).



**Figura 4.24. Proceso de extracción de PHA por reflujo**

La separación y purificación del PHA se efectuó en tubos de ensayo que contenían el cloroformo libre de restos celulares (Figura 4.25a), a los cuales se les adicionó una solución de etanol 96% con el cual fue precipitado el PHA (Figura 4.25b). Posteriormente, la muestra fue centrifugada y a continuación se procedía a eliminar el sobrenadante. Finalmente se realiza el proceso de purificación mediante adición de etanol 50%, centrifugación y eliminación del sobrenadante (Figura 4.25c); el procedimiento se repitió 3 veces (Lutke y col., 2001).



**Figura 4.25. a) Solución de cloroformo libre de restos celulares; b) PHA precipitado con alcohol; c) PHA purificado**

A continuación, se secó el polímero húmedo que previamente fue purificado (Figura 4.26.a), el proceso de secado se realizó hasta peso constante (Figura 4.26.b). El polímero resultante fue analizado por Espectrofotometría UV-Visible y Calorimetría Diferencial de Barrido (Capítulo 2, sección 2.7.3 y 2.9.2.2).

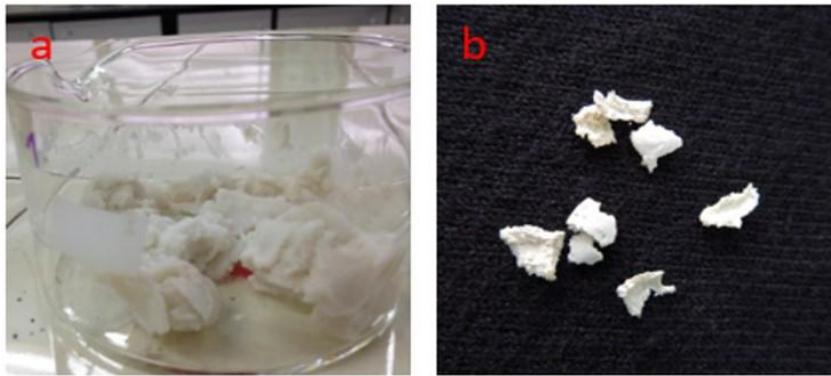


Figura 4.26. a) PHA húmedo preparado para el secado; b) PHA seco.

#### 4.17 Resultados del sistema de producción

El sistema de producción de polihidroxialcanoatos se realizó en un reactor batch aireado (Figura 4.22). La producción de PHA se llevó a cabo una vez que el SBR de selección alimentado con glicerol crudo se encontraba estabilizado (ensayo GC). El reactor batch fue operado a temperatura ambiente (15-18 °C), sin controlar el pH y con exceso de aireación. Para favorecer la acumulación de PHA el sistema fue limitado en nutrientes y con exceso de la fuente de carbono (Braunegg y col., 2004). Las concentraciones de N y P fueron 20 veces inferiores a las utilizadas en la etapa de selección con una relación DQO:N:P de 100:0,5:0,25.

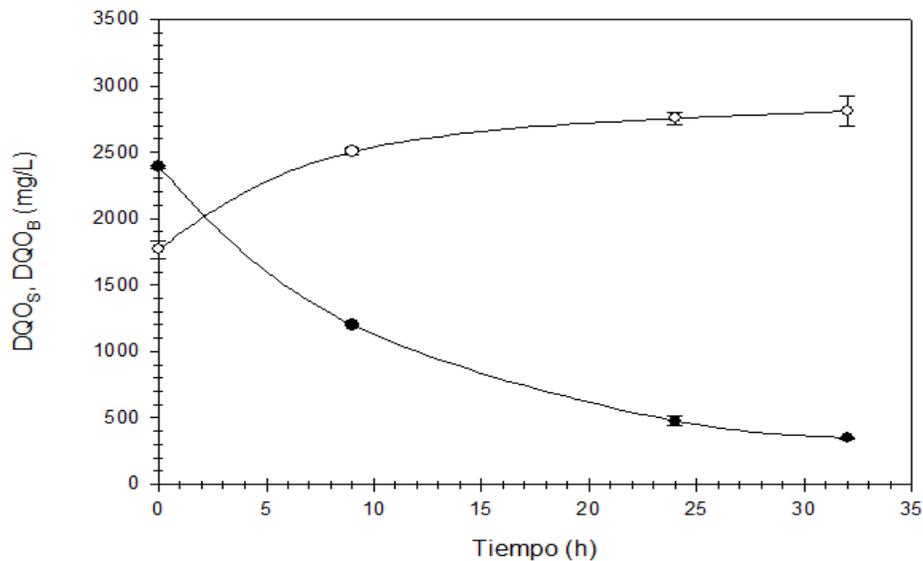
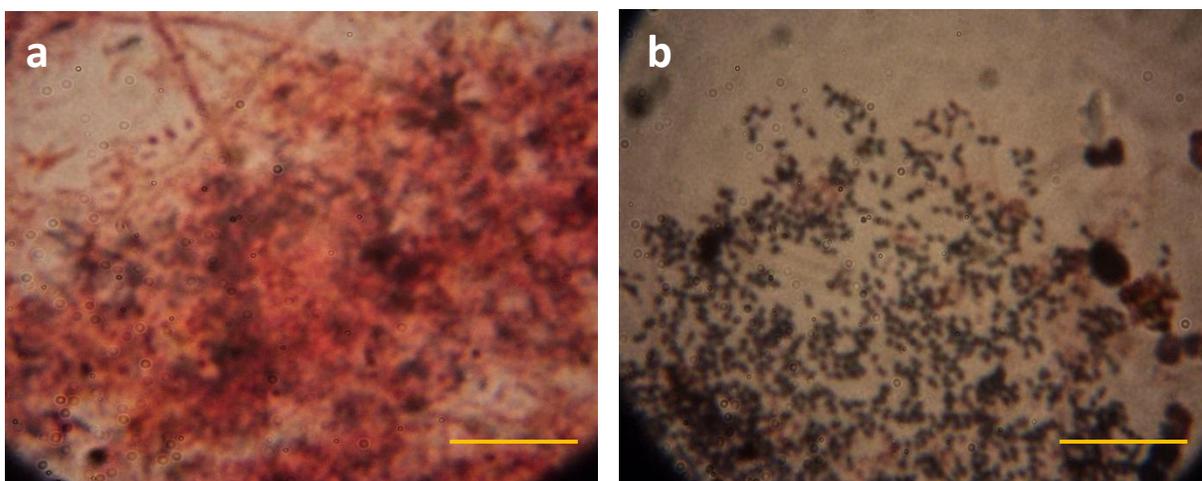


Figura 4.27. Consumo de sustrato orgánico e incremento de biomasa del reactor batch, alimentado con medio de cultivo a base de glicerol crudo (GC) en función del tiempo (h). (●) DQO soluble (DQO<sub>S</sub>, mg/L). (○) DQO de biomasa (DQO<sub>B</sub>, mg/L). Lodos activados provenientes del SBR de selección del ensayo con glicerol crudo.

En la Figura 4.27 se presentan las curvas de consumo de sustrato orgánico e incremento de biomasa para un ciclo de producción alimentado con glicerol crudo. La concentración inicial de sustrato orgánico fue 2392 mgDQOs/L, lo que condujo a una carga

específica de sustrato orgánico de  $917 \pm 64$  mgDQOs/(gDQO<sub>B</sub> día); mientras que la velocidad volumétrica de remoción de sustrato carbonáceo ( $r_s$ ) medida en las primeras 8 horas fue  $101 \pm 43$  mgDQOs/(L h). Fue necesario alrededor de 32 h para la remoción del 85% de la materia orgánica. La concentración de biomasa aumentó considerablemente en las primeras 9 horas y progresivamente fue aumentando a medida que se consumía el sustrato hasta las 24 h de cultivo; el consumo posterior de sustrato no produjo un incremento significativo de biomasa. Debe destacarse que el aumento de la concentración de biomasa estuvo asociado fundamentalmente a la síntesis y acumulación de glucógeno y PHA, pues el medio de cultivo utilizado estuvo extremadamente limitado en nitrógeno amoniacal y fósforo para restringir el crecimiento microbiano.

Se tomaron micrografías al inicio y final del sistema de producción, las cuales fueron teñidas con solución de Sudan Black. Como se logra observar en la Figura 4.28 se produjo un aumento significativo en la tinción verificando la acumulación de PHA intracelular.



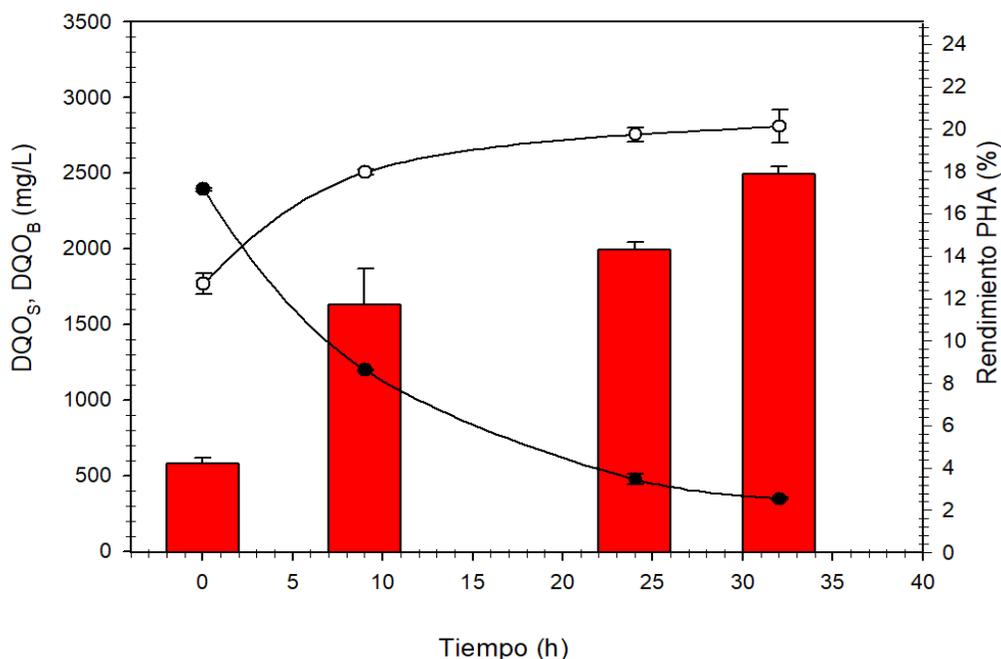
**Figura 4.28. Micrografías de lodos activados con tinción Sudan Black del reactor batch de producción de PHA con medio de cultivo basado en glicerol crudo. (a) Tiempo de operación: 0 hs. (b) Tiempo de operación: 32 hs. — 10  $\mu$ m. (Lodos activados provenientes del ensayo de selección con glicerol crudo).**

#### **4.17.1 Cuantificación de PHA, rendimiento y pureza**

El PHA previamente purificado y secado obtenido del sistema de producción de la planta alimentada con glicerol crudo fue analizado por espectrofotometría UV, siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 2, sección 2.7.3.

En el sistema de producción se registró un aumento gradual del polímero con un rendimiento desde el 4% en el tiempo cero hasta un 18% al final del sistema (32h) (Figura

4.29); el polímero obtenido tuvo una pureza alrededor del 97%. El incremento del polímero intracelular desde el tiempo cero hasta las 32 horas fue alrededor de 4,5 veces.



**4.29. Sistema de producción con glicerol crudo (GC). (●) DQO<sub>s</sub> (mg/L); (○) DQO<sub>e</sub> (mg/L); Barras verticales representan el rendimiento de PHA (%).**

En comparación con el sistema alimentado con suero de queso, se aumentó en 4,2 veces la producción de PHA en el sistema alimentado con glicerol crudo.

#### 4.17.2 Parámetros estequiométricos del sistema de producción

A partir del ensayo de producción de PHA se determinaron los diferentes parámetros estequiométricos ( $y_{PHA/S}$ ,  $y_{O/S}$ ,  $y_{X/S}$  e  $y_{G/S}$ ).

La determinación del  $y_{PHA/S}$ ,  $y_{O/S}$  e  $y_{G/S}$  se realizó de forma similar a la detallada en el Capítulo 2, Sección 2.10, en el caso del  $y_{X/S}$  se asumió como cero debido a que no había aporte de nitrógeno de la fuente de energía como fue el caso del suero de queso.

En la Tabla 4.17 se presentan los coeficientes estequiométricos para el sistema de producción de PHA a partir de glicerol crudo. Como se puede observar los factores estequiométricos demuestran una acumulación de PHA y glucógeno en similares proporciones. Por lo tanto, el aumento de la biomasa estuvo asociado fundamentalmente a la formación de glucógeno y PHA. El  $y_{PHA/S}$  fue alrededor de 3,2 veces mayor en el sistema alimentado con glicerol crudo en comparación con el sistema alimentado con suero

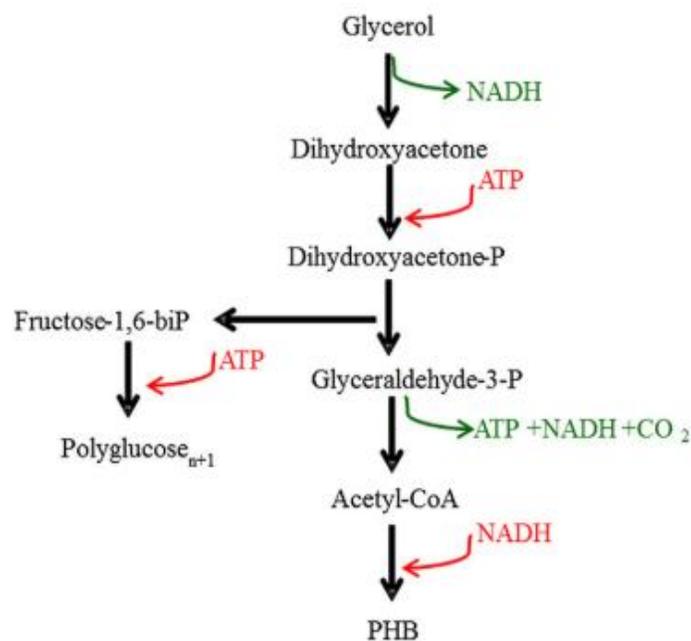
de queso. Posiblemente la baja producción de PHA en el sistema alimentado con suero de queso está relacionada con el nitrógeno aportado por el suero de queso, el cual generaba crecimiento celular

**Tabla 4.17. Parámetros estequiométricos del sistema de producción con glicerol crudo.**

Sistema	$y_{G/S}$ (mgDQO/mgDQOs)	$y_{PHA/S}$ (mgDQO/mgDQOs)	$y_{O/S}$ (mgDQO <sub>T</sub> /mgDQOs)	$y_{X/S}$ (mgDQO <sub>X</sub> /mgDQOs)
<b>GC</b>	0,26 ± 0,00	0,23 ± 0,01	0,50 ± 0,00	0,0 ± 0,0

Moita (2014) estudió las diferencias entre cuatro sistemas de producción de PHB alimentando los reactores batch con glicerol crudo (GM<sub>1</sub>), glicerol sintético (GM<sub>2</sub>), metanol sintético (GM<sub>3</sub>) y mezcla metanol sintético y glicerol sintético (GM<sub>4</sub>), dichos reactores fueron alimentados por pulsos (3 pulsos en total, 3 x 30 C-mM); los factores estequiométricos para el ensayo (GM<sub>1</sub>) en el primer pulso de  $y_{PHA/S}$  y  $y_{G/S}$  fueron de 0,26 y 0,27 mg O<sub>2</sub>/mg O<sub>2</sub> respectivamente, con una relación alimento/microorganismo (A/M) de alrededor de 0,45 C-mmol glicerol crudo/C-mmol biomasa, valores similares fueron obtenidos en el presente trabajo de tesis ( $y_{PHA/S}$  e  $y_{G/S}$  de 0,23 y 0,26 mgDQO/mgDQOs, respectivamente) con una relación A/M de 1,22 C-mmol glicerol crudo/C-mmol biomasa. Finalmente, el sistema (GM<sub>1</sub>) con la adición de los dos siguientes pulsos sufrió un aumento en la relación A/M a 1,4 C-mmol glicerol crudo/C-mmol biomasa similar a la relación del presente trabajo de tesis, sin embargo, el  $y_{PHA/S}$  aumentó a 0,41 mg O<sub>2</sub>/mg O<sub>2</sub> y disminuyó el  $y_{G/S}$  a 0,18 mg O<sub>2</sub>/mg O<sub>2</sub> con un leve aumento en el  $y_{O/S}$ . Esto demuestra que a mayor relación alimento/microorganismo se ve favorecido la síntesis de PHB y desfavorece la síntesis de glucógeno. Para el caso del ensayo (GM<sub>4</sub>) la velocidad de consumo específico de la mezcla (sintética) glicerol-metanol fue más baja en comparación con el ensayo GM<sub>2</sub> (glicerol sintético), esto debido a un posible efecto de inhibición por la concentración acumulada de metanol al final de los tres pulsos. Dicha afirmación es respaldada por el alto coeficiente de oxidación del sustrato  $y_{O/S}$  observado en dicho ensayo (GM<sub>4</sub>), el cual aumentó del primer pulso al tercer pulso desde 0,27 a 0,36 mg O<sub>2</sub>/mg O<sub>2</sub>. Fauzi (2019) estudió el efecto del aumento de la carga orgánica, glicerol crudo, en reactores de selección y cómo esto influye en el proceso de producción de PHA, encontrando que al aumentar la carga orgánica en el sistema de selección aumentó la relación A/M y la relación feast/famine, desde 0,2 hasta 2, lo que

significó un incremento de la fase feast desde aproximadamente 20% hasta 67% del ciclo total, generando en la siguiente etapa (sistema de producción) una disminución del 70% de la producción de PHA y un aumento del  $y_{O/S}$  de 2,37 veces en comparación con los sistemas de producción alimentados con la biomasa proveniente de los reactores de selección con baja carga orgánica. En el caso del presente trabajo no se presentó una alta relación feast/famine ni A/M por lo tanto el alto valor de  $y_{O/S}$  reportado en el sistema de producción del presente trabajo de tesis se puede atribuir a la alta concentración de metanol que pueda tener el glicerol obtenido en la producción de biodiesel que actuaría como inhibidor del proceso de producción de PHA.



**Figura 4.30 Esquema de las vías metabólicas para consumo de glicerol y conversión a glucógeno y PHB. Adaptado de Moralejo-Garate y col., (2013)**

La vía metabólica de la producción de PHA intracelular se da por medio de la vía glucolítica. El glicerol se oxida a dihidroxiacetona que luego se convierte en dihidroxiacetona-P (DHAP) y gliceraldehido-3-P (G3P); se establece un equilibrio entre DHAP y G3P. A partir de la combinación de estas dos especies se produce la síntesis de glucógeno, pero es necesario ATP para la ramificación de los monómeros de glucosa a la cadena de glucógeno. Por otro lado, el G3P se puede oxidar a acetil-CoA liberando NADH, ATP y CO<sub>2</sub> y finalmente se utiliza la acetil-CoA para la síntesis de PHB (Figura 4.30).

A partir de 1 C-mol de glicerol la producción de glucógeno genera 0,33 unidades de NADH y se consumen 0,5 ATP, en el caso de la producción de PHB se produce 0,83 y 0,33 unidades de NADH y ATP respectivamente (Moralejo-Garate y col., 2013).

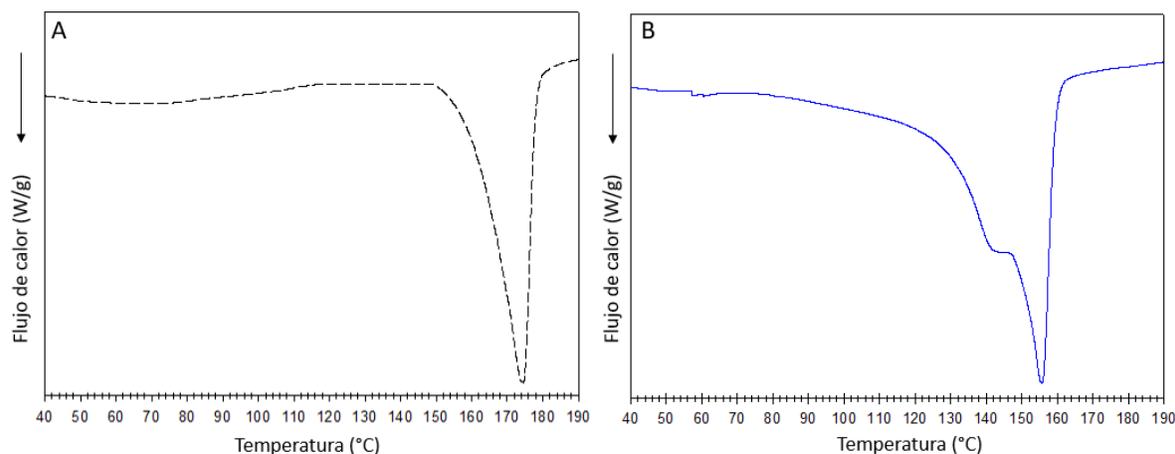
La síntesis de PHB se asocia con una mayor cantidad de equivalentes reductores producidos en comparación con el glucógeno, para controlar el estado redox de las células se requiere de oxígeno para reoxidar estos cofactores y mantener la relación NADH/NAD<sup>+</sup> constante. Por lo tanto, en sistemas de producción limitados en oxígeno se impulsará la acumulación de glucógeno en lugar de PHB (Moralejo-Garate y col., 2013). Dircks (2001) demostró que no sólo el almacenamiento de glucógeno era más eficiente en términos de ATP que PHB, sino también que se necesitaba menos oxígeno para convertir la glucosa en glucógeno que el acetato en PHA. Además, el mantenimiento basado en el consumo de glucógeno fue entre un 10% y un 15% menor que el mantenimiento basado en el consumo de PHB. La limitación de oxígeno en la etapa de selección en sistemas alimentados con glicerol genera que la fase “feast”, con disponibilidad de carbono exógeno, se prolongue demasiado disminuyendo la fase “famine” lo cual genera baja presión de selección de bacterias acumuladoras de PHA (Dionisi y col., 2005; Serafim y col., 2004). Moralejo-Garate (2013) trabajando con cultivos mixtos alimentados con glicerol y limitados en oxígeno determinaron que la ruta metabólica de la glicolisis tiende a la acumulación de glucógeno con poca acumulación de PHB, lo que se corresponde con las diferencias encontradas en las rutas metabólicas de la producción de los polímeros, es decir una menor generación de NADH en la ruta de producción de glucógeno, lo que implica menores requerimientos de oxígeno para la oxidación de dicho cofactor. Además, que se reducen las tasas de conversión de glicerol a glucógeno y PHB y se favorece el crecimiento microbiano directamente a partir de glicerol. En el caso del batch de producción, la limitación de O<sub>2</sub> redujo tasas de consumo de glicerol y tasas de síntesis de PHB y glucógeno, pero no favoreció de forma significativa ninguna de las rutas metabólicas de síntesis de uno u otro polímero (Moralejo-Garate 2013). Debido a esto, en el presente trabajo de tesis el sistema de selección y producción alimentado con glicerol no fue limitado en oxígeno.

#### **4.17.3 Determinación del PHA obtenido por Calorimetría diferencial de barrido**

Los termogramas obtenidos mediante DSC modulado de las muestras de PHA pueden observarse en la Figura 4.31. La muestra del polímero obtenido en el sistema de producción alimentado con glicerol crudo presentó un pico de fusión a 174,5°C con una

entalpía de 82,9 J/g, (Figura 4.31A) y cristalinidad de 56,8%. Valores similares fueron reportados por Dobroth (2010) para sistemas alimentados con glicerol crudo donde se estudió diferentes condiciones de operación encontrando que en todos los sistemas el polímero producido era PHB con picos de fusión de 175 °C, Tg entre -5 y 5°C y cristalinidad alrededor del 60%. El polímero obtenido a partir de glicerol crudo correspondió a un homopolímero de PHB de acuerdo a las propiedades térmicas encontradas.

Valores similares fueron encontrados mediante el análisis térmico para el sistema alimentado con suero de queso (Capítulo 3, ensayo 5).



**Figura 4.31. Curvas de DSC de PHA. A) PHA obtenido de la planta de producción con glicerol crudo; B) Patrón P(3HB-co-3HV) con 12% de HV Sigma Aldrich.**

#### 4.18 Conclusiones del Capítulo

En el presente capítulo se estudió el sistema de aclimatación (mezcla glicerol puro: suero de queso y glicerol puro) y selección de bacterias con capacidad de acumular PHA en un SBR alimentado con glicerol puro y crudo, subproducto de la industria del biodiesel, como fuente de carbono y energía. Se evaluaron las mejores condiciones de operación y cargas volumétricas de sustrato orgánico en la presión de selección del consorcio microbiano; de igual manera que en el sistema alimentado con suero de queso (Capítulo 3) se usó como factor determinante en el proceso de selección de las bacterias la relación de las fases feast/famine donde la fase feast debe estar por debajo del 20% de la duración total del ciclo operativo para lograr un sistema enriquecido en bacterias con capacidad de acumular PHA.

Se trabajó con un inóculo proveniente del SBR de selección alimentado con suero de queso. Inicialmente para la aclimatación del cultivo mixto a la nueva fuente de carbono (glicerol crudo) se utilizaron las condiciones de operación del sistema de selección para suero de queso con mejores resultados (Capítulo 3, Ensayo 5); el cambio a la nueva fuente de carbono se realizó gradualmente por lo tanto para la aclimatación se usó una mezcla de suero de queso y glicerol puro (50:50%) (Aclim<sub>S+G</sub>). El reactor operó a temperatura ambiente y sin control de pH, con ciclos repetitivos de 84hs, tiempo de residencia hidráulico de 4,08 días, tiempo de residencia celular de 10 días y carga orgánica de 1gDQO/(L día). La fuente de carbono externa fue removida en un 93% durante las primeras 24-32 horas, obteniendo una duración de la etapa feast de 34%. Con el sistema estabilizado se procedió a reemplazar el 100% la fuente de carbono por glicerol puro, manteniendo constantes las condiciones de operación (GP<sub>1</sub>). El glicerol puro como única fuente de carbono generó la pérdida de la etapa de inanición, se logró remover alrededor del 78% la fuente de carbono, para la cual fue necesario la totalidad del ciclo de selección. Se decidió aumentar la duración del ciclo de 84 hs a 168 hs y disminuir la carga orgánica gradualmente desde 1gDQO/(L día) hasta 0,25 gDQO/(L día) para lograr la extensión de la fase feast adecuada (GP<sub>3</sub>). Con la disminución de la carga orgánica y el aumento del ciclo se logró remover alrededor del 90% de la fuente de carbono externa en las primeras 30-45 horas lo que condujo a obtener la etapa de inanición (etapa feast de 17%) condición óptima para favorecer la presión de selección de bacterias acumuladoras de PHA. Se logró determinar una biomasa al inicio del ciclo de  $1377 \pm 18,5$  mgDQO<sub>B</sub>/L y su carga específica de sustrato orgánico fue de 181,5 mgDQOs/(gDQO<sub>B</sub> día).

Una vez que se logró un sistema de selección con la etapa feast menor al 20% alimentado con glicerol puro se procedió a cambiar la fuente de carbono por glicerol crudo.

Se llevaron a cabo experimentos para la obtención de glicerol a partir del proceso de producción de biodiesel partiendo de dos tipos de aceites (de alta y baja acidez) con el fin de obtener el glicerol crudo con el cual se alimentaron los reactores. Inicialmente se realizó un pre-tratamiento de los aceites donde se filtraron las impurezas. A continuación, se realizó el secado para evitar reacciones de saponificación en la producción de biodiesel. Los análisis fisicoquímicos relevaron diferencias en el color, el índice de saponificación y el índice de acidez de los dos aceites.

El aceite que presentó un menor índice de acidez (0,93 mgKOH/g muestra) fue procesado por transesterificación alcalina dado que el valor de dicho índice resultó 2 veces menor al valor recomendado como seguro para realizar este procedimiento (Índice < 2mgKOH/g muestra); mientras que el aceite que presentó un mayor índice de acidez (3,80 mg KOH/g muestra) fue procesado en dos etapas; primero una catálisis ácida seguida de catálisis básica.

En el caso del aceite de baja acidez se realizó catálisis alcalina, utilizando una relación molar metanol/aceite de 6:1 y como catalizador KOH; el sistema se dejó reaccionar durante 1,5 horas a 60°C. La separación del biodiesel y la glicerina se realizó en ampollas de decantación, finalmente el biodiesel fue lavado con una solución de ácido fosfórico. Se logró obtener por cada 100 ml de aceite alrededor de 14 ml de glicerol crudo.

Para el caso del aceite de alta acidez se realizó inicialmente la catálisis ácida. Para ello se realizaron tres ensayos con el fin de determinar el porcentaje adecuado de ácido sulfúrico (0,1, 0,5 y 1,0 %) que se debía utilizar. La relación molar metanol/aceite (6:1), tiempo (1,5 hs) y temperatura (60°C) se mantuvieron constantes en los tres ensayos.

En la catálisis ácida se realiza una esterificación; los ácidos grasos libres del aceite (u otra materia prima) reaccionan con el alcohol (metanol) y se transforman en metil ésteres con producción de agua lo cual es un gran inconveniente para la segunda reacción. Esto es debido a que los triglicéridos en presencia de agua y un catalizador alcalino generan reacciones de saponificación y la materia prima que debería convertirse en biodiesel se convierte en jabones, lo que no sólo afecta el rendimiento de producción, sino que también dificulta la separación del biodiesel y glicerol. Debido a esto se realizó un secado al finalizar la catálisis ácida, posteriormente se realizó la catálisis alcalina y la separación y el lavado del biodiesel de igual manera como se realizó para el aceite de baja acidez.

El proceso de producción de biodiesel catalizado en dos etapas se logró de manera exitosa usando 0,5% de ácido sulfúrico, obteniéndose 10 ml de glicerol por cada 100 ml de aceite. En el caso que se usó 0,1% solo se logró obtener 4 ml de glicerol y en el ensayo con 1,0% no se presentó formación de glicerol lo que nos indica que el exceso de ácido evitó la producción de biodiesel.

Se realizó análisis por cromatografía gaseosa a las muestras de biodiesel por catálisis alcalina y a la muestra más exitosa (0,5% de ácido sulfúrico) usando catálisis en dos etapas. En los cromatogramas obtenidos se logró observar que la reacción fue exitosa donde todo el material lipídico fue convertido en metil ésteres.

Debido a la mayor facilidad del proceso en una sola etapa usando aceite de baja acidez se planteó realizar la producción de biodiesel únicamente con este aceite para obtener el glicerol crudo que se utilizó como fuente de carbono y energía en el sistema de selección de bacterias acumuladoras de PHA y sistema de producción de PHA.

El sistema de selección alimentado con glicerol crudo fue inoculado con barros activados previamente seleccionados con glicerol puro (GP<sub>3</sub>) usando las mismas condiciones de operación. El sistema se operó con ciclos de 168 horas, el tiempo de residencia hidráulico y celular fue de 8,16 y 20 días respectivamente, la carga orgánica de 0,25 gDQO/(L día) y la relación DQO:N:P= 100:10:5. La concentración de oxígeno fue mayor a 4,0 mgO<sub>2</sub>/L, la temperatura y el pH no fueron controlados. El sistema fue operado bajo la secuencia temporal de diferentes fases: reacción (167 hs), sedimentación (45 min) y purga del sobrenadante (15 min). El consumo de la fuente de carbono externa fue alrededor del 88 % con una velocidad de consumo de 1202 mg DQO<sub>S</sub>/(L día), esta etapa se desarrolló entre las 25 y 30 horas del ciclo, resultando una etapa feast del 17,8% condición ideal para la selección de bacterias acumuladoras de PHA. El sistema se estabilizó luego de 4 TRC con una biomasa de 1378 ± 105 mgDQO<sub>B</sub>/L al inicio del SBR. La carga específica de sustrato orgánico fue de 181,4 mgDQO<sub>S</sub>/(gDQO<sub>B</sub> día), mientras que la carga específica de nitrógeno y fósforo fue de 18,14 mgN/(gDQO<sub>B</sub> día) y 8,70 mgP/(gDQO<sub>B</sub> día) respectivamente. El aumento de biomasa fue determinado mediante DQO, y se atribuyó no solamente al crecimiento o multiplicación celular sino también a la síntesis y almacenamiento de glucógeno y PHA. Se logró determinar la acumulación de PHA por medio de la observación microscópica de los preparados teñidos con Sudan Black.

El sistema de producción de PHA se realizó usando el inóculo del sistema de selección con glicerol crudo. El reactor batch fue operado a temperatura ambiente (15-18 °C), sin controlar el pH, con exceso de aireación y limitado en nutrientes (DQO:N:P= 100:0,5:0,25). La concentración inicial de sustrato orgánico fue 2392 mgDQO<sub>S</sub>/L, requiriéndose aproximadamente 32 h para la remoción del 85% de la materia orgánica. La

concentración de biomasa aumentó considerablemente en las primeras 9 horas y progresivamente fue aumentando a medida que se consumía el sustrato hasta las 24 h de cultivo; el consumo posterior de sustrato no produjo un incremento significativo de biomasa.

En el sistema de producción se registró un aumento gradual del polímero con un rendimiento desde el 4% en el tiempo cero hasta un 18% al final del proceso (32h). El polímero obtenido tuvo una pureza de alrededor del 97%. El rendimiento en la producción de PHA fue alrededor de 4,2 veces mayor en comparación con el sistema alimentado con suero de queso limitado en oxígeno (Capítulo 3).

Por medio del análisis de los parámetros estequiométricos se observó no sólo acumulación de PHA, sino que también se produjo acumulación de glucógeno, lo cual ha sido reportado por diferentes autores para sistemas alimentados con glicerol ( $y_{G/S} = 0,26$  mgDQO/mgDQOs y  $y_{PHA/S} = 0,23$  mgDQO/mgDQOs). El alto valor del  $y_{O/S} = 0,5$  mgDQO<sub>T</sub>/mgDQOs se puede atribuir a inhibición del sistema por restos de metanol provenientes del proceso de producción de biodiesel.

Mediante el análisis térmico por DSC se determinó que el polímero extraído es un PHB con un pico de fusión a 174,5°C, entalpía de fusión de 82,9 J/g y cristalinidad del 56.8%. Valores similares fueron encontrados para el polímero extraído del sistema de producción alimentado con suero de queso limitado en nitrógeno y limitado en oxígeno.

# **CAPITULO 5**

## **MEZCLAS POLIMÉRICAS DE PHA Y PLA**

## Mezclas poliméricas de PHA y PLA

### 5.1 PHA y PLA en la industria

Los polímeros PLA (ácido poliláctico) y PHA (polihidroxialcanoatos) son poliésteres y se utilizan en productos de consumo, en un amplio sector industrial debido a su buena compatibilidad y sostenibilidad (Armentano y col., 2015), tienen un comportamiento térmico comparable con algunos polímeros convencionales y esto ha generado mucho interés en explotar sus propiedades físicas y estructurales para identificar posibles aplicaciones (Abdelwahab y col., 2012).

La combinación de dos polímeros permite el diseño de materiales con propiedades adaptables que difieren significativamente de las de cada componente, aprovechando las ventajas de cada polímero para obtener materiales con diferentes aplicaciones. La formulación de mezclas es más fácil y rápida que los métodos de copolimerización utilizados para mejorar las características de los polímeros individuales (Zhang y Tomas 2011). En este sentido, mezclar PLA con PHA para obtener materiales a medida constituye una alternativa prometedora. En general, la adición de PHA al PLA mejora la biodegradabilidad mientras que la adición de PLA proporciona resistencia y disminuye la cristalinidad (Khemani y col., 2007; Noda y col., 2010).

Sin embargo, la miscibilidad de estos polímeros es un factor crucial en la preparación de las películas compuestas. La miscibilidad entre el PLA y el PHA ha sido estudiada por diversos autores indicando que el PLA muestra miscibilidad limitada o parcial con PHB de baja masa molar (Bartczak y col., 2013; Hu y col., 2008). Ni y colaboradores (2009) mezclaron oligómeros de 3-hidroxibutirato (OHB) con PLA y consiguieron mejorar la capacidad de cristalización del PLA con cantidades de OHB inferiores a un 40%. Estos mismos autores demostraron que cantidades superiores de OHB generaban una separación de fases, indicada por la presencia de dos Tg. Chang y Woo (2012) estudiaron el comportamiento de la cinética de cristalización de PHB mezclándolo con L-PLA y D-PLA (50:50), como agentes de nucleación biodegradables, e informaron una mejora de la densidad de nucleación del PHB con un 10% en peso de D,L-PLA. Por otra parte, se ha visto que la rigidez del PHB puede mejorarse significativamente mediante la mezcla con PLA (Vogel y Siesler 2008).

Por otro lado, se considera que la temperatura tiene una mayor influencia. Algunos estudios han demostrado que las mezclas de PLA-PHB son totalmente miscibles en estado fundido (Blümm y Owen 1995; Focarete y col., 1998). En este sentido, Zhang y colaboradores (1996) encontraron que las mezclas de PLA-PHB preparadas a alta temperatura exhibieron mayor miscibilidad que las mismas mezclas preparadas con disolvente a temperatura ambiente. Este efecto, de mayor miscibilidad entre el PLA y el PHB en su estado fundido, podría deberse a que ocurre una reacción de transesterificación entre el PLA y las cadenas de PHB a la temperatura de proceso (Carrasco y col., 2011; Zhang y col., 1996).

Furukawa y colaboradores (2005) estudiaron mezclas de PLA-PHB preparadas por moldeo con disolvente cloroformo con relaciones de mezcla 20/80, 40/60, 60/40 y 80/20 (PLA/PHB % en peso) e informaron que el PHB cristalizó como muy pequeñas esferulitas que pueden actuar como sitios de nucleación del PLA en la mezcla 20/80. Del mismo modo, Zhang y Thomas (2011) estudiando mezclas de PLA-PHB en diferentes proporciones 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 y 0/100 (PLA/PHB % en peso), mezcladas en el estado fundido y seguido de un proceso de moldeo por compresión para obtener films, encontraron que la mezcla PLA-PHB en una proporción de 75/25 consiguió una óptima miscibilidad y una mejora de las propiedades de tracción con respecto al PLA puro, atribuyendo este resultado al efecto de refuerzo que provocan los cristales de PHB en la matriz de PLA. Bartczak y colaboradores (2013) estudiaron la modificación de PLA mediante la adición de hasta un 20 % en peso de PHB y concluyeron que el PHB puede ser considerado como un efectivo modificador del PLA ya que aumenta su resistencia al impacto.

En este capítulo se estudian las propiedades microestructurales y el comportamiento térmico de películas individuales de PHA (obtenido por lodos activados, ver capítulo 3) y PLA comercial, así como de sus mezclas. El comportamiento frente al proceso de biodesintegración de películas individuales y mezclas se examinó desde el punto de vista microestructural. Las películas individuales y compuestas se desarrollaron mediante disolución de los polímeros en solvente seguidas de un secado al vacío con el fin de eliminar cualquier remanente de solvente. La formulación de mezclas busca estudiar los cambios microestructurales y de biodesintegración para diferentes aplicaciones industriales.

## 5.2 Objetivos del Capítulo

El objetivo del este capítulo fue estudiar el comportamiento de matrices individuales y compuestas de PHA y PLA analizando los cambios microestructurales, térmicos y de biodesintegración con el fin de mejorar las aplicaciones industriales de las películas individuales.

## 5.3 Materiales y métodos

### 5.3.1 Desarrollo de las mezclas poliméricas

Se desarrollaron películas compuestas de PHA y PLA utilizando ácido poliláctico grado 4043D en forma de granallas (98% de L lactida con isómero D aproximadamente del 2%) que se adquirió de Natureworks®. El polihidroxialcanoato correspondió al obtenido de lodos activados mediante los ensayos experimentales de producción utilizando suero de queso rico en lactosa hidrolizada (efluente de la industria láctea) como fuente de carbono. El PHA se caracterizó mediante diferentes técnicas analíticas (ver capítulo 2).

#### 5.3.1.1 Preparación de las mezclas poliméricas

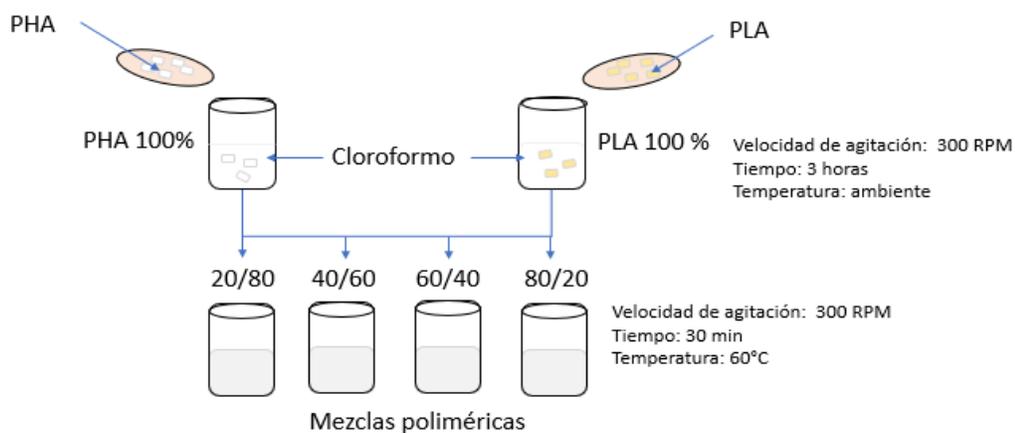
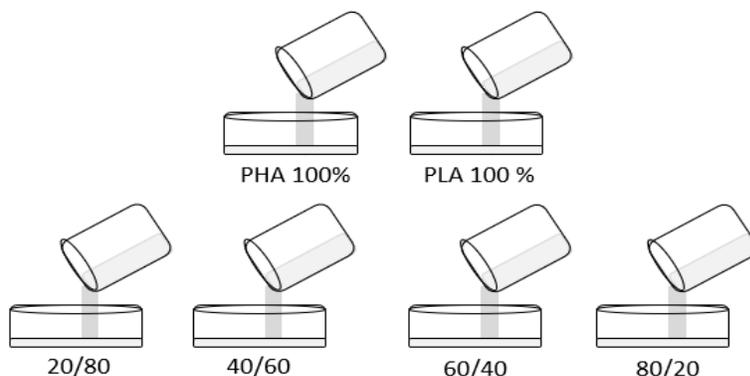


Figura 5.1. Preparación de las mezclas poliméricas

Se prepararon películas individuales de PHA y PLA y mezclas de ambas, para ello los gránulos de PHA y PLA puros se disolvieron en cloroformo 1 y 2% (p/v) respectivamente, bajo agitación durante 3 h y a temperatura ambiente. A continuación, con las soluciones preparadas anteriormente se procedió a realizar las mezclas siguiendo diferentes proporciones: 20/80, 40/60, 60/40, 80/20 (p/p) de PLA/PHA respectivamente, las cuales fueron agitadas durante 30 minutos a una temperatura de 60°C (Figura 5.1).



**Figura 5.2. Preparación de películas individuales y compuestas de PHA y PLA**

Las soluciones filmogénicas tanto de PHA y PLA como de sus mezclas fueron depositadas en placas de vidrio (Petri) de 9 cm de diámetro (Figura 5.2). Luego se dejaron bajo una campana de extracción el tiempo necesario para lograr la evaporación del cloroformo; finalmente, las muestras en las placas de vidrio se secaron en un horno de vacío a 60 °C y 60 KPa para asegurar la eliminación total del disolvente de las matrices.

### 5.3.1.2 Ensayos experimentales

Con el fin de determinar los cambios microestructurales, térmicos y de biodesintegración se realizaron 5 ensayos experimentales que comprendían matrices poliméricas individuales y compuestas de PHA y PLA (Tabla 5.1). Las diferentes matrices se obtuvieron a partir de las soluciones de PHA y PLA preparadas previamente.

**Tabla 5.1. Matrices poliméricas individuales y compuestas de PHA y PLA**

Experimentos	PHA/PLA (p/p)
Ensayo 1	100:0
Ensayo 2	80:20
Ensayo 3	60:40
Ensayo 4	40:60
Ensayo 5	20:80
Ensayo 6	0:100

### 5.3.2 Caracterización de las películas formuladas

Se determinó el espesor de las matrices poliméricas y la Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA). Se realizaron estudios de: Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), Calorimetría Diferencial de Barrido Modulada (MDSC), Difracción de rayos X (DRX), Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y biodesintegración.

#### 5.3.2.1 Espesor de las películas



Figura 5.3. Medidor de espesor de recubrimiento

El espesor de la película ( $\mu\text{m}$ ) se determinó utilizando un medidor de espesor de recubrimiento Check Line DCN-900 (Nueva York, EE. UU.) para materiales no conductores sobre sustratos no ferrosos (Figura 5.3). Los valores informados corresponden al promedio de al menos quince mediciones en diferentes posiciones para cada muestra.

#### 5.3.2.2 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad es el producto del coeficiente de difusión por la solubilidad. La difusión de una sustancia a través de una matriz polimérica se produce en sentido contrario al del gradiente de concentraciones es decir desde la zona de mayor concentración a la de menor concentración.

La permeación comprende tres pasos: adsorción del permeante sobre el lado de mayor concentración de la superficie de la película, difusión del permeante a través de la matriz y desorción desde el lado de menor concentración de la superficie de la película (Figura 5.4). Estos fenómenos de transferencia de materia permiten determinar la permeabilidad, que se define como la capacidad de transporte de una sustancia permeante

por unidad de tiempo, área y fuerza impulsora. La permeabilidad al vapor de agua (WVP, por sus siglas en inglés) se determinó de acuerdo a una modificación de la norma ASTM E96 (Mali y col., 2002). El método permite cuantificar el flujo por unidad de área o la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR).

El flujo de materia (F) de acuerdo a ley de Fick aplicada a una película plana de espesor  $l$  en estado estacionario, resulta:

$$F = -D \frac{dc}{dx} = D \frac{c_2 - c_1}{l} \quad (5.1)$$

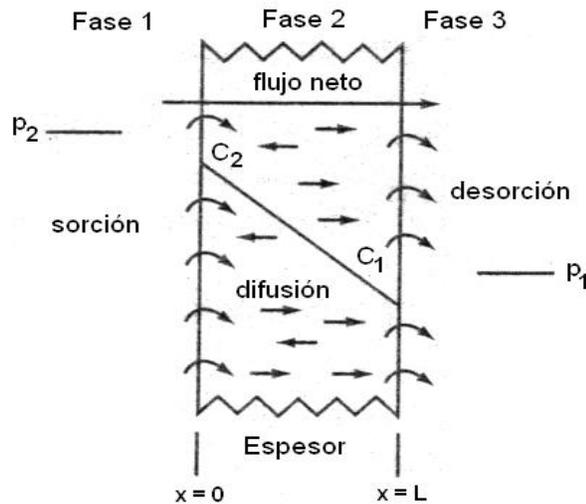
Donde:

F: Flujo de materia

D: Coeficiente de difusión

$dc/dx$ : Gradiente de concentración

$l$ : Espesor de la película



**Figura 5.4. Esquema del flujo de materia en una película plana**

En estudios de permeabilidad, sin embargo, la presión parcial del vapor de agua que rodea la película es más fácil de medir que su concentración  $c$  en el polímero. Se puede aplicar la Ley de Henry ( $c = S p$ ), y se sustituye  $c$  por la presión parcial  $p$  resultando:

$$F = D S \frac{p_2 - p_1}{l} \quad (5.2)$$

El producto  $DS = P$  (Permeabilidad)

Como el flujo  $F$  es la cantidad de sustancia que permea por unidad de área  $A$  en un tiempo  $t$ ,  $F = q/At$ , reordenando la ecuación queda:

$$P = DS = \frac{q \ell}{A t \Delta p} \quad (5.3)$$

donde

$$\Delta p = p_2 - p_1$$

$P$  es el producto del coeficiente de difusión y el coeficiente de solubilidad, y es un indicador de las características de barrera del polímero a la sustancia permeante.

Una de las unidades en la cuales generalmente se expresa la permeabilidad al vapor de agua es  $\text{cm}^3$  (STP)  $\text{cm}/(\text{m}^2 \text{ día atm})$ . También se puede expresar  $\text{g} \cdot \text{cm}/\text{m}^2 \cdot \text{día} \cdot \text{mm Hg}$ , o en  $\text{g}/(\text{s m Pa})$

Por otra parte, **la permeancia al vapor de agua** ( $W_p$ ) es la cantidad de vapor que pasa por unidad de superficie de una muestra de espesor dado en un tiempo unitario y cuando entre sus paredes se establece una diferencia de presión unitaria. Es decir, la permeancia es la permeabilidad para un material de espesor conocido. Se expresa en  $\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{Pa})$  y se calcula como el cociente de la permeabilidad y el espesor de la película.

$$W_p = P/l \quad (5.4)$$

Previo al ensayo, las muestras se almacenaron durante 48 horas a 65% de humedad relativa (HR). Para realizar las determinaciones, las películas se colocaron en celdas de acrílico (Figura 5.5), las que se ubicaron en contenedores herméticos. El gradiente de 75% de HR a través de las películas se obtuvo poniendo sílica gel anhidra en el fondo de la celda (0% HR) y una solución saturada de NaCl en el contenedor (75% HR). La diferencia de presión parcial de vapor de agua existente a ambos lados de la película proporciona la fuerza impulsora para producir el flujo de vapor a través de la muestra. Este gradiente corresponde a 1753,55 Pa, expresado como presión parcial de vapor de agua a 20°C. Se registró el cambio en el peso de la celda en una balanza analítica con una precisión de 0,0001g. A intervalos de tiempo establecidos ( $\Delta t$ ), se registró la variación de peso ( $\Delta p$ ) de

la celda, que es una medida de la cantidad de materia que fue transferida por unidad de área a través de la película. A partir de los ensayos se graficó la ganancia en peso de la celda en función del tiempo. Se realizó una regresión lineal de los datos obtenidos y se calculó la permeabilidad al vapor de agua ( $\text{g s}^{-1}\text{m}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ ) considerando el espesor de las películas y la diferencia de presión parcial de vapor de agua antes mencionada. Cada valor informado corresponde al promedio de al menos 4 determinaciones.



**Figura 5.5. Celda de permeabilidad utilizada para evaluar las propiedades de barrera al vapor de agua**

### 5.3.2.3 Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X es una técnica que permite la caracterización e identificación de materiales proveyendo información sobre la estructura y arreglo atómico de un espécimen. Proporciona, además, detalles sobre la presencia de imperfecciones o defectos, tamaño de partícula y espaciado interatómico. Los materiales sólidos pueden ser cristalinos, semicristalinos o amorfos. Los cristalinos presentan un ordenamiento periódico de sus átomos, iones o moléculas. Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética cuya longitud de onda oscila entre  $0,02 \text{ \AA}$  y  $100 \text{ \AA}$ , siendo emitidos por los átomos debido a profundas perturbaciones en sus estructuras electrónicas. Cuando un haz de rayos X alcanza la superficie del compuesto a cualquier ángulo, una porción es dispersada por la capa de átomos de la superficie. La porción no dispersada penetra a la segunda capa de átomos y así sucesivamente. El efecto acumulativo de esta dispersión desde los centros regularmente espaciados del cristal es la dispersión del haz. El fundamento del método de DRX considera que la distancia entre los átomos, iones o moléculas empaquetados de forma regular en un cristal es del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de los rayos X, por lo que, de acuerdo con las leyes de la óptica, estos cristales pueden producir

fenómenos de difracción. Bragg (1913) determinó la ecuación que permite establecer la relación existente entre la longitud de onda de los rayos X y los espacios inter-planares de los cristales. La ley que describe la difracción de rayos X en término de reflexiones provenientes de los planos de un cristal se conoce como ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (5.5)$$

Donde  $n$  es el orden de la difracción,  $\lambda$  es la longitud de onda del haz irradiado,  $d$  el espaciado entre planos atómicos y  $\theta$  el ángulo entre el haz difractado o incidente y el plano cristalográfico. Representando la intensidad de radiación que llega al detector en función del ángulo  $\theta$  aparecerá un pico cuando se cumpla la condición de Bragg (Ecuación 5.5). Su presentación se denomina espectro de difracción o difractograma. Toda sustancia cristalina dispersa rayos X con su propio patrón de difracción, produciendo una “huella” de su estructura atómica y molecular. La difracción de rayos X presenta una característica única con la cual los componentes se identifican como compuestos específicos a partir de sus diagramas de difracción. En la Figura 5.6 se esquematiza el funcionamiento de un difractómetro.

Las películas individuales y combinadas se analizaron mediante difracción de rayos X en un modelo analítico X'Pert Pro P Analytical model PW 3040/60 (Almelo, Países Bajos). La radiación  $\text{CuK}\alpha$  (1,542 Å), operada a temperatura ambiente, con una diferencia de potencia de 40 kV y una densidad de corriente de 30 mA, y la intensidad relativa se registró en el rango de dispersión de 3-60° ( $2\theta$ ) con un tamaño de paso de  $2\theta = 0.02^\circ$ , debido a que el detector está a  $1\theta$  de la muestra y la muestra está a  $1\theta$  del haz de luz por lo tanto el detector está a  $2\theta$  del haz de luz.

Se determinó el grado de cristalinidad (GC) mediante la relación del área de la difracción del pico cristalino ( $\Delta P$ ), siendo este el pico que representa la cristalinidad del polímero, con respecto al área total del difractograma ( $\Delta T$ ) calculándose de la siguiente manera:

$$GC = \frac{\Delta P}{\Delta T} \times 100 \quad (5.6)$$

Un procedimiento similar para determinar el grado de cristalinidad fue propuesto por diferentes autores (Lamarra y col., 2017, Villarruel y col., 2015).

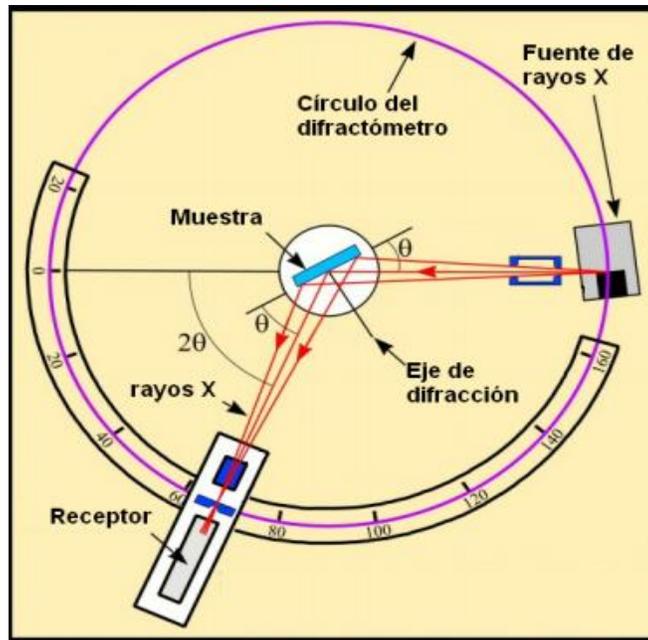


Figura 5.6. Esquema de funcionamiento de difractómetro de Rayos X

#### 5.3.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido permite estudiar la microestructura de las películas y sus mezclas, formando la imagen con los electrones secundarios que se generan en la interacción de la radiación electrónica con una capa superficial y fina de la muestra mediante un proceso de rastreo. El SEM se encuentra principalmente compuesto por un emisor de electrones, una columna y diferentes lentes electromagnéticas. La función del emisor es generar un haz de electrones (electrones incidentes), el cual viaja a través de la columna de vacío.

En la columna el haz de electrones pasa a través de las diferentes lentes electromagnéticas y un sistema de deflexión que permite manipular el haz de electrones para poder llevar a cabo un barrido superficial de la muestra (Figura 5.7). Una vez que los electrones incidentes interaccionan con la superficie de la muestra se generan diferentes señales como son electrones secundarios, electrones retro-dispersados, rayos X, entre otras. Estas señales son capturadas por distintos tipos de detectores, ayudando a obtener información morfológica y de composición química superficial de la muestra.

Gracias a la interacción entre el haz de electrones y la superficie de la muestra se pueden obtener señales de:

-Electrones secundarios (SE): proporcionan información sobre la morfología superficial de la muestra.

-Electrones retro-dispersados (BSE): generan imágenes con diferente brillantez en función de la composición química superficial.

-Espectrometría de energía dispersiva de Rayos X (EDS): detecta, cualitativamente, los rayos X característicos de los elementos químicos presentes en la superficie de la muestra. Muestra un análisis semi-cuantitativo de la composición química detectada.



**Figura 5.7. Funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido**

La evaluación de la morfología de las películas se estudió mediante microscopio electrónico de barrido (SEM) Quanta 200 modelo FEI (The Netherlands) en modo bajo vacío. Es conocido como microscopio ambiental o environmental scanning electron microscope (ESEM) y permite el análisis de muestras no conductoras y húmedas. Cuenta con un cañón termoiónico, que genera el haz de electrones a partir de un filamento de tungsteno (W). Ofrece una resolución nominal de 10 nm. Las películas individuales y las matrices de mezcla se congelaron criogénicamente en nitrógeno líquido.

Las muestras se montaron en trozos de bronce usando una cinta de doble faz de carbón y se examinaron sin ningún recubrimiento de metal o carbono a baja presión y un voltaje de aceleración de 12.5 kV. Adicionalmente, las fallas mecánicas producidas en las

muestras sometidas a tracción se analizaron por observación microscópica de la sección transversal donde se produjo la fractura de las muestras.

### **5.3.2.5 Calorimetría diferencial de barrido**

El análisis térmico de las películas individuales de PLA y PHA y sus mezclas se realizó utilizando un calorímetro diferencial de barrido. A partir de los termogramas obtenidos se determinaron diferentes parámetros: temperatura de fusión ( $T_m$ ) y entalpía correspondiente al área del pico endotérmico ( $\Delta H_m$ ), temperatura de cristalización durante la etapa de enfriamiento ( $T_c$ ), entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ ) y temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) determinado a partir de la señal reversible. La metodología utilizada se detalla en el Capítulo 2 Sección 2.9.2.2.

### **5.3.2.6 Espectroscopía FT-IR para matrices individuales y compuestas**

El análisis por espectroscopia FT-IR se realizó en un rango de  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  mediante la acumulación de 64 exploraciones a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . La metodología utilizada se detalla en el Capítulo 2 Sección 2.9.1.2.

### **5.3.2.7 Análisis de biodesintegración de las películas**

Se evaluó la biodesintegración aeróbica de películas en contacto con el suelo bajo condiciones controladas de laboratorio.

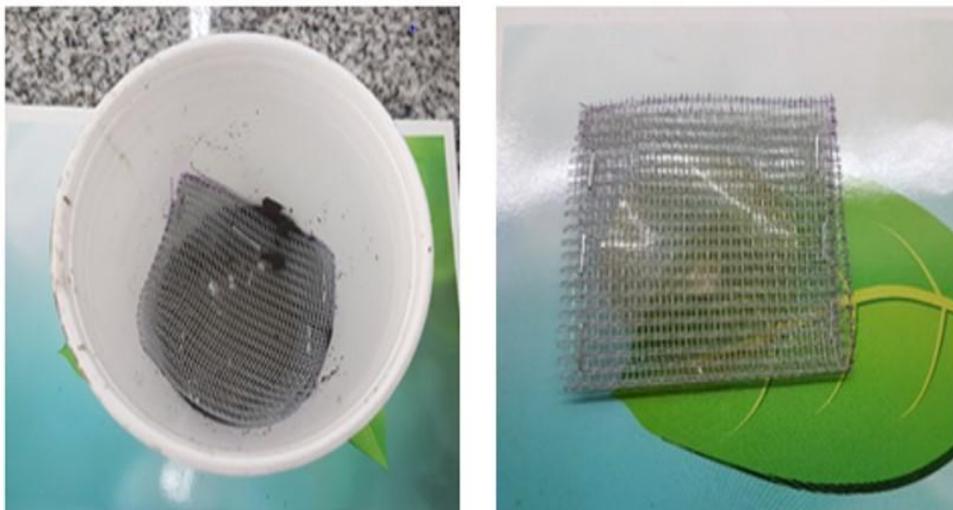
El estudio de biodesintegración de las películas de PHA, PLA y sus mezclas se realizó teniendo en cuenta la metodología descrita por diferentes autores (Dalev y col., 2000; Martucci y col., 2009; González y col., 2013). Los ensayos se realizaron bajo condiciones similares a las ambientales.

Para desarrollar los ensayos se prepararon una serie de macetas de plástico ( $400\text{ cm}^3$ ) las cuales fueron llenadas con suelo fértil. Se prepararon muestras de  $3 \times 3\text{ cm}$  con espesores en promedio de  $25\text{ }\mu\text{m}$  (Figura 5.8). Las muestras se colocaron en un soporte construido por una malla plástica, la cual permitía un fácil acceso de los microorganismos, humedad y la fácil recuperación de las muestras degradadas. Dichas muestras se enterraron en los recipientes plásticos (Figura 5.9), a una profundidad de  $5\text{ cm}$  desde la superficie a fin de asegurar la degradación aeróbica. Como medio degradante se utilizó la propia microflora presente en el suelo utilizado.



**Figura 5.8. Películas individuales y compuestas antes de ser sometidas a las pruebas de biodesintegración**

Las muestras se acondicionaron a una temperatura de 20 °C y una humedad relativa del 50%, tomadas como promedio de las condiciones ambientales. En todos los casos, las matrices se rociaron regularmente con una cantidad definida y constante de agua. Rivero y col. (2013) emplearon condiciones similares. Las muestras se recuperaron del suelo a intervalos de tiempo específicos y se limpiaron con un cepillo cuidadosamente para evitar daños en la estructura de la película.



**Figura 5.9. Malla y maceta para ensayos de biodesintegración**

Las características fisicoquímicas y la composición del suelo utilizado fueron: humedad: 17-19%, cenizas: 76-79%, relación C/N: 11,5, materia orgánica: 3,5- 4,5%, pH: 7 y conductividad eléctrica: 0,5-1 mS.cm<sup>-1</sup>. Se agregó 1 g de compost por 25 g de suelo.

Las características fisicoquímicas y la composición del compost utilizado fueron: humedad: 35-40%, ceniza: 40-45%, relación C/N: 7,7, materia orgánica: 15-20%, pH: 6 y conductividad eléctrica: 1,1 mS.cm<sup>-1</sup>. Los estudios de la morfología de las películas degradadas se realizaron mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido, ATR-FTIR y análisis térmico.

Se evaluaron a distintos tiempos de exposición para hacer un seguimiento del grado de avance de la degradación de los materiales. Se realizaron inspecciones visuales de las películas luego de haberlas extraído de los recipientes a los distintos tiempos de ensayo y se realizaron análisis por SEM, ATR-FTIR y DSC a los 30 y 50 días del proceso de biodesintegración.

## **5.4 Resultados y discusión**

### **5.4.1 Análisis térmico por Calorimetría Diferencial de Barrido Modulada (MDSC)**

Las características térmicas de las matrices fueron determinadas en un equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido Q100 (TA Instruments, USA) operando en forma modulada (MDSC) (Capítulo 2). Esta técnica permite determinar a partir de los termogramas obtenidos las siguientes propiedades:

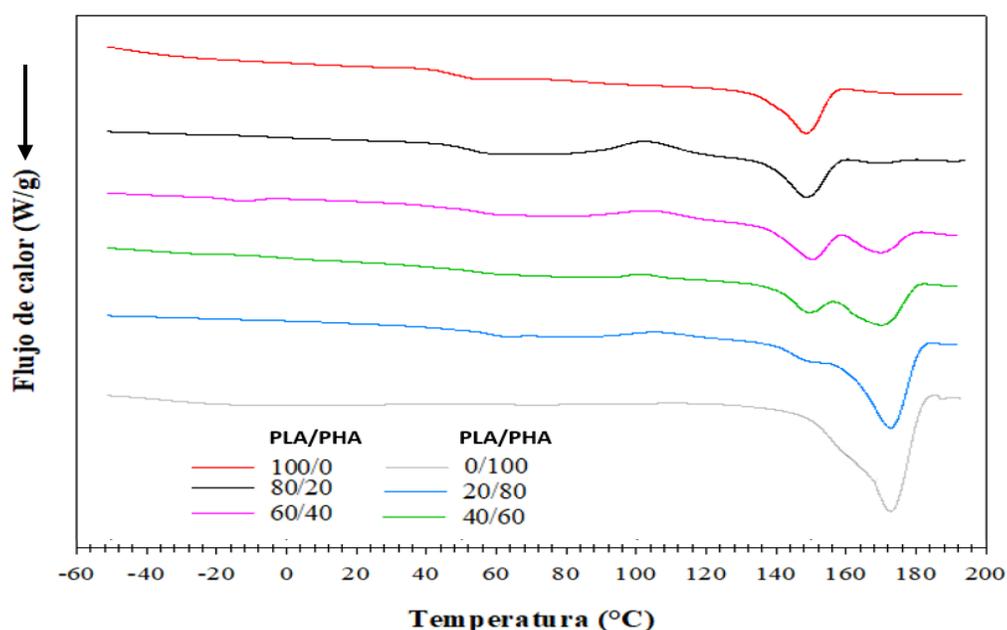
- Temperatura de fusión ( $T_m$ , °C).
- Entalpía de fusión correspondiente al área del pico endotérmico ( $\Delta H_m$ , J g<sup>-1</sup>).
- Temperatura de cristalización durante la etapa de enfriamiento ( $T_c$ , °C).
- Entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ , J g<sup>-1</sup>).
- Transición vítrea ( $T_g$ , °C): evento reversible que se determinó como la temperatura en el punto medio de inflexión de la línea de base de la señal del flujo de calor reversible.

Los parámetros se analizaron con el software Universal Analysis V1.7F (TA Instruments).

Los termogramas obtenidos mediante DSC modulado de las películas de PLA, PHA y sus mezclas pueden observarse en las Figuras 5.10 y 5.11, donde se muestran las etapas de calentamiento y enfriamiento, respectivamente.

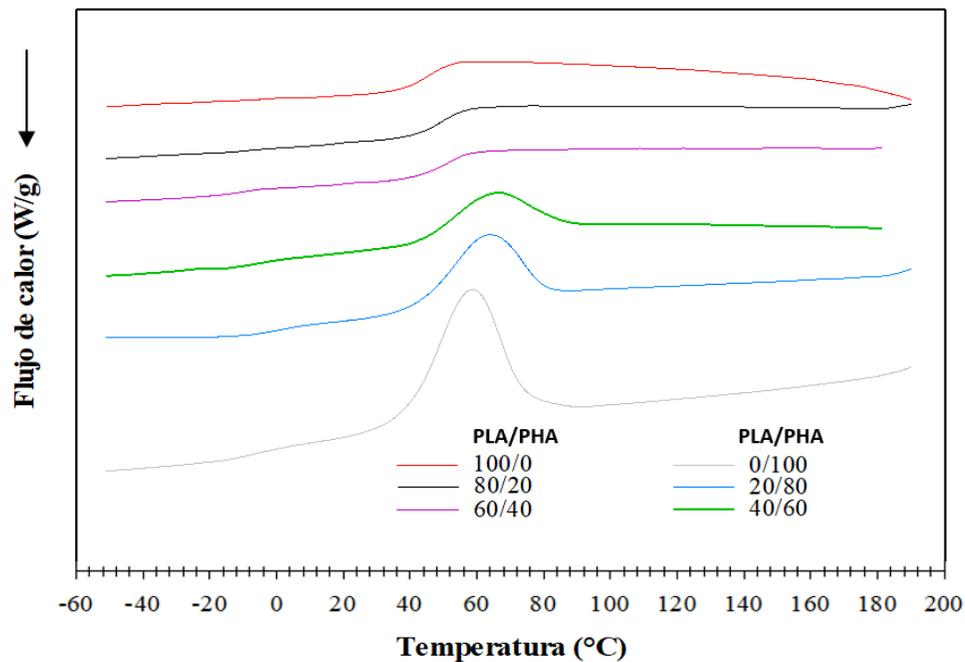
Asimismo, las temperaturas de las diferentes transiciones térmicas y los valores de entalpía de fusión ( $\text{J g}^{-1}$ ) asociados con cada evento endotérmico obtenidos de las curvas de MDSC se resumen en la Tabla 5.2 y 5.3.

Durante el calentamiento de las películas individuales se observaron picos atribuidos a la fusión de los dominios cristalinos, correspondientes al PLA y PHA a  $147,7^\circ\text{C}$  y  $172,7^\circ\text{C}$ , con una entalpía asociada de  $20,1$  y  $86,6 \text{ J g}^{-1}$ , respectivamente (Figura 5.10 y Tabla 5.2). La intensidad del pico de fusión está relacionada con el número de cristales o poblaciones cristalinas (fracción cristalina) que existen en el material en el momento en que ocurre la fusión.



**Figura 5.10. Curvas de MDSC de películas individuales y compuestas con distintas proporciones de PLA/PHA durante la etapa de calentamiento**

Thellen y col (2008) estudiaron propiedades térmicas utilizando un MDSC, informando que la fusión del cristal se produce a temperaturas más altas en las muestras de PHA que contienen el menor porcentaje de valerato, porque a medida que aumenta el contenido de valerato, el inicio de la fusión del cristal se produce a temperaturas más bajas. Los termogramas de copolímeros de HB y HV evidencian la presencia de un pico con un hombro, que representan la fusión de las laminillas de cristal como lo reportaron Tellen y colaboradores (2008) para PHA extruido.



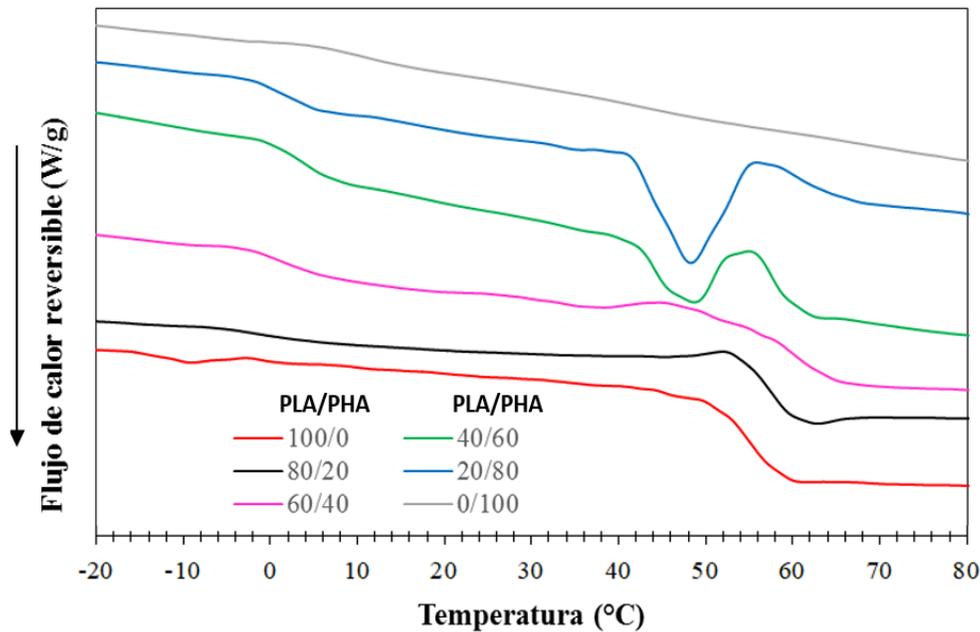
**Figura 5.11. Curvas de MDSC de películas individuales y compuestas con distintas proporciones de PLA/PHA durante la etapa de enfriamiento**

En el presente estudio, los termogramas de PHA evidenciaron la presencia de un pico definido característico de un homopolímero de HB. Por otro lado, el PHA exhibió una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) a  $-4,7^{\circ}\text{C}$ , mientras que el PLA mostró una marcada transición a  $58,1^{\circ}\text{C}$  (Figura 5.12 y Tabla 5.2). Da silva y col (2005) reportaron valores de temperatura de transición vítrea que oscilan entre  $2,7$  y  $-4,4^{\circ}\text{C}$  para la matriz de PHA obtenida por moldeo.

Asimismo, en la Figura 5.10 los termogramas de todas las mezclas exhibieron picos de recristalización del PLA inducidos por el agregado de PHA, localizado a  $107^{\circ}\text{C}$ , siendo esta transición más evidente cuando la proporción de PLA en la mezcla fue mayor. Estos resultados indicarían que la incorporación de PHA contribuye al proceso de recristalización del PLA en todas las formulaciones compuestas o mezclas, manifestándose con mayor intensidad en el caso de la mezcla 80/20. Este comportamiento se puede explicar teniendo en cuenta que una baja proporción de dominios cristalinos de PHA dispersos en una matriz continua de PLA induce el fenómeno de nucleación de este polímero.

Como es sabido, el comportamiento de recristalización depende en gran medida de la diferencia en las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) entre los componentes de la mezcla. Cuando la diferencia de  $T_m$  es grande, el componente con mayor temperatura de fusión recristaliza primero, y sus esferulitas contribuyen generalmente a llenar todo el volumen.

De acuerdo con Abdelwahab y col (2012) el componente de menor  $T_m$  cristaliza a una temperatura inferior en regiones espacialmente limitadas dentro de las esferulitas del otro componente.



**Figura 5.12. Curvas de MDSC de películas individuales y compuestas con distintas proporciones de PLA/PHA durante el flujo de calor reversible que evidencia la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de cada componente**

La mezcla 20/80 exhibió un pico a  $171,9^\circ\text{C}$  debido a la fusión de la fracción cristalina del PHA y un hombro a  $148,4^\circ\text{C}$  correspondiente a la fusión del PLA. En el mismo sentido, las mezclas 80/20, 60/40 y 40/60 mostraron dos transiciones endotérmicas; la entalpia asociada al primer evento disminuyó con la incorporación de una mayor concentración de PHA en la mezcla, mientras que la entalpia del pico endotérmico asociado a la fusión de la fase cristalina del PHA se hizo más prominente (Figura 5.10 y Tabla 5.2).

Todas las mezclas a base de PLA/PHA exhibieron dos temperaturas de transición vítrea ligeramente desplazadas respecto del valor correspondiente a los polímeros puros (Figura 5.12), lo que explicaría la existencia de cierta interacción entre los mismos.

En los sistemas compuestos, la detección de dos picos de fusión correspondientes a los dominios cristalinos de cada polímero, así como la aparición de dos  $T_g$  independientemente de la composición de la mezcla soporta la existencia de un sistema

parcialmente miscible, es decir materiales de estructura heterogénea bifásica (Lipatov y Alekseeva 2007).

**Tabla 5.2. Análisis térmico de películas simples y compuestas con distintas proporciones de PLA/PHA**

PLA/PHA <sup>*</sup>	Etapa de calentamiento					
	Eventos característicos del PHA			Eventos característicos del PLA		
	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J g <sup>-1</sup> )	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J g <sup>-1</sup> )	T <sub>g</sub> (°C)
<b>100/0</b>	--	--	--	147,7 (1,0) <sup>a</sup>	20,1 (1,3) <sup>c</sup>	58,1 (0,9) <sup>a</sup>
<b>80/20</b>	170,4 (1,2) <sup>a</sup>	1,5 (0,07) <sup>a</sup>	-5,4 (0,1) <sup>b</sup>	150,3 (1,9) <sup>a</sup>	20,0 (0,7) <sup>c</sup>	58,0 (0,6) <sup>a</sup>
<b>60/40</b>	169,9 (0,6) <sup>a</sup>	9,1 (0,1) <sup>b</sup>	-4,6 (0,8) <sup>b</sup>	149,8 (0,6) <sup>a</sup>	13,4 (0,5) <sup>b</sup>	56,3 (1,8) <sup>a</sup>
<b>40/60</b>	170,3 (0,4) <sup>a</sup>	18,8 (0,7) <sup>c</sup>	-0,6 (0,1) <sup>a</sup>	149,5 (0,9) <sup>a</sup>	5,8 (0,1) <sup>a</sup>	56,8 (0,7) <sup>a</sup>
<b>20/80</b>	171,9 (0,8) <sup>a</sup>	61,7 (1,2) <sup>d</sup>	-0,7 (0,1) <sup>a</sup>	--	--	57,9 (0,5) <sup>a</sup>
<b>0/100</b>	172,7 (0,1) <sup>a</sup>	86,6 (0,1) <sup>e</sup>	-4,7 (0,5) <sup>b</sup>	--	--	--

\*Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05) entre las muestras

**Tabla 5.3. Análisis térmico de películas individuales y compuestas con distintas proporciones de PLA/PHA etapa de enfriamiento.**

PLA/PHA <sup>*</sup>	Etapa de enfriamiento	
	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH <sub>c</sub> (J g <sup>-1</sup> )
<b>100/0</b>	--	--
<b>80/20</b>	--	--
<b>60/40</b>	--	--
<b>40/60</b>	65,6 (0,5) <sup>b</sup>	18,8 (0,1) <sup>a</sup>
<b>20/80</b>	65,9 (3,8) <sup>b</sup>	31,4 (1,9) <sup>b</sup>
<b>0/100</b>	58,8 (0,5) <sup>a</sup>	48,4 (0,4) <sup>c</sup>

\*Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05) entre las muestras

Durante la etapa de enfriamiento el PHA exhibió un pico de cristalización a 58,8°C con una entalpía asociada de 48,4 J g<sup>-1</sup>, mientras que en el termograma del PLA no se pudo

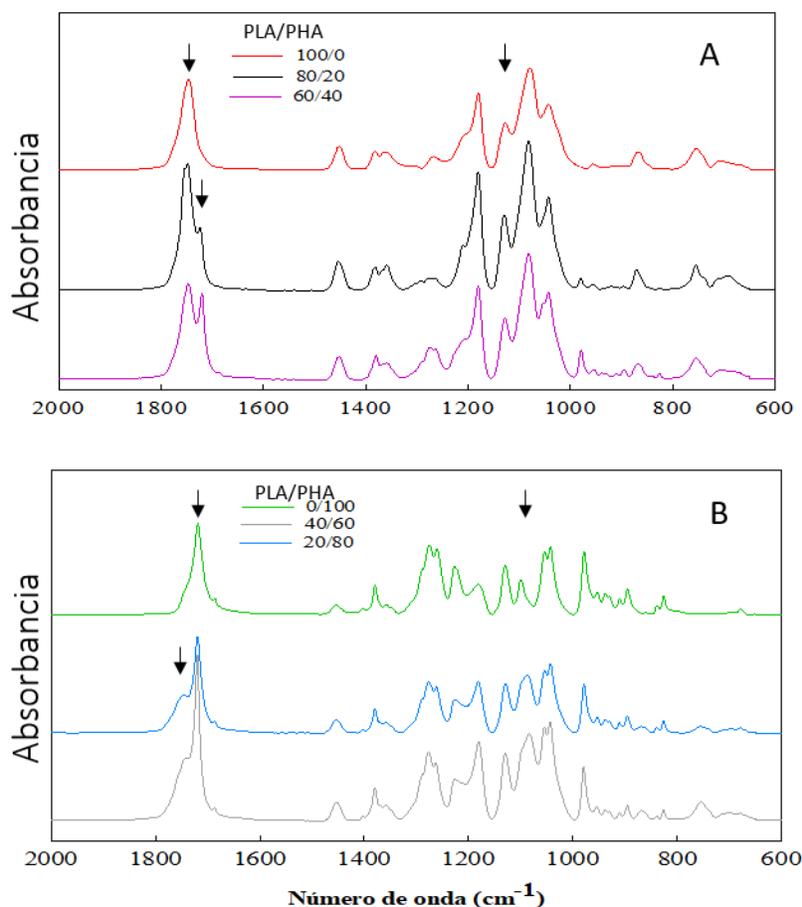
visualizar esta transición (Figura 5.11 y Tabla 5.3). Teniendo en cuenta estos resultados es posible inferir que la cristalinidad de PHA es mayor que la del PLA.

El análisis térmico de las mezclas de PLA/PHA mostró que el pico de cristalización atribuido al PHA se observó sólo en las mezclas 20/80 y 40/60, con una menor entalpía asociada, respecto a la película individual de PHA. Mientras tanto, los termogramas de las películas individuales de PLA y las mezclas 60/40 y 80/20 no evidenciaron esta transición térmica. Sin embargo, se observó un salto a 57,7 °C asignado a la temperatura de transición vítrea de la fase enriquecida en PLA. Similares resultados fueron informados por Arrieta y colaboradores (2014).

Furukawa y col (2005) y Zhang y Tomas (2011) señalaron que estos resultados serían un indicio que el PHA presente en las mezclas no cristaliza durante la etapa de enfriamiento cuando se encuentra en menor proporción.

#### **5.4.2 Análisis por espectroscopía ATR-FTIR**

Los espectros de los polímeros individuales y compuestos fueron registrados por un equipo Nicolet, iS10 Thermo Scientific (Madison, EE. UU). Este equipo nos brinda información sobre las interacciones entre los componentes. La Figura 5.13A y 5.13B muestran los espectros obtenidos mediante FTIR del PLA y PHA, identificando los grupos funcionales de ambos, los cuales son consistentes con los reportados por Rivero y col., 2017; Ashok y col., 2014; Wheng y col., 2013. En el espectro de PLA (Fig. 5.13A), la banda a 1746  $\text{cm}^{-1}$  es un pico fuerte que corresponde a la vibración del carbonilo de la porción amorfa mientras la vibración del carbonilo de la porción cristalina del PLA a 1755  $\text{cm}^{-1}$  es una señal muy débil y no puede ser claramente identificada en el espectro (Rivero y col., 2017). Las bandas ubicadas a 1180 y 1080  $\text{cm}^{-1}$  pertenecen a las vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico de -C-O-C. Como se sabe el PLA es un polímero hidrófobo debido a la presencia de grupos laterales -CH. Los picos aproximadamente 2997  $\text{cm}^{-1}$  y 2946  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de los grupos -CH de las cadenas laterales (datos no mostrados). Por otra parte, en el espectro obtenido para las películas de PHA puro (Fig. 5.13B) se puede observar un pico agudo a 1719  $\text{cm}^{-1}$ , atribuido al estiramiento de las vibraciones del grupo carbonilo de la fase cristalina. El estiramiento de las vibraciones del grupo carbonilo de la fase amorfa es prácticamente indistinguible e imperceptible.



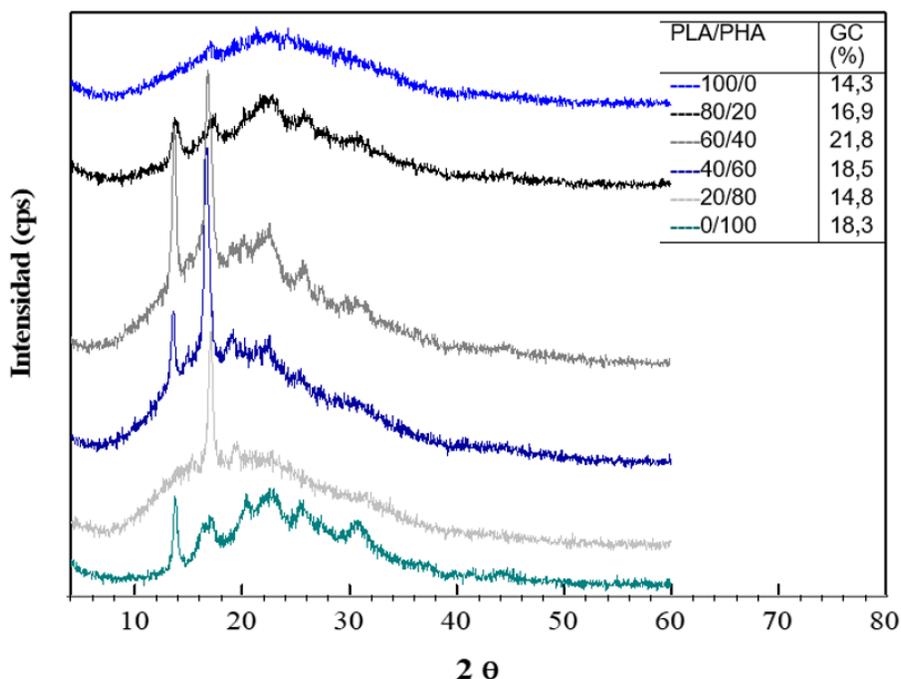
**Figura 5.13. Espectros de FTIR de películas de PHA, PLA y compuestas con distintas proporciones de PLA/PHA. A) relación PLA/PHA 100/0, 80/20, 60/40 y B) relación PLA/PHA 0/100, 40/60 y 20/80.**

Los espectros de las mezclas de composición 80/20 y 60/40 siguen un patrón similar al del PLA puro mientras las mezclas 40/60 y 20/80 se identifican principalmente con el PHA. Todas ellas despliegan las dos bandas correspondientes al estiramiento de los carbonilos localizadas a 1746 y 1719  $\text{cm}^{-1}$  debidas al PLA y PHA, respectivamente (Figura 5.13A y 5.13B).

Es interesante hacer notar que las intensidades de estas bandas están interconectadas y que son mutuamente dependientes, incrementándose una a expensas de la otra, es decir la relación de intensidades de estas dos bandas cambia de acuerdo a la relación de los componentes individuales. Estos resultados permitieron inferir la parcial inmiscibilidad de estas mezclas y la existencia de interacciones débiles entre los dos componentes.

### 5.4.3 Análisis por difracción de rayos-X (DRX)

Las películas individuales y combinadas se analizaron mediante difracción de rayos X en un modelo analítico X'Pert Pro P Analytical model PW 3040/60 (Almelo, Países Bajos).



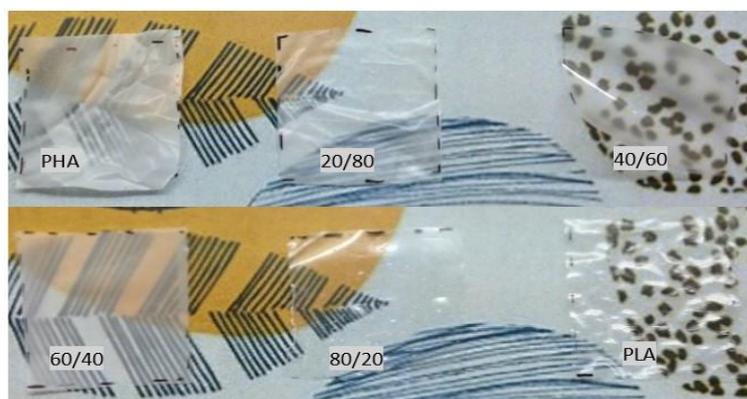
**Figura 5.14. Espectros de difracción de rayos X de películas simples y compuestas con distintas proporciones de PLA/PHA**

Los patrones de difracción de rayos X típicos de películas de PHA, PLA y sus mezclas se muestran en la Figura 5.14. El espectro de difracción de rayos X de la muestra individual de PLA exhibió un patrón correspondiente a un material amorfo con un pico de muy baja intensidad en  $2\theta = 17^\circ$  característico de la reflexión de los cristales del polímero; el grado de cristalinidad (GC) estimado fue de 14,3%. Por el contrario, el PHA es un polímero muy ordenado y se sabe que cristaliza de forma ortorrómbica (Abdelwahad y col., 2012). El espectro del PHA evidenció picos de difracción situados en  $2\theta = 13,8^\circ$  y  $17^\circ$ , asociados con los planos (020) y (110), respectivamente (Zhang y Thomas 2011). Adicionalmente se detectaron picos a  $2\theta = 20,3, 22,4, 25,4$  y  $30,8^\circ$  característicos del polímero, siendo su GC de 18,3% en coincidencia con lo informado por Arieta y colaboradores (2015). Los resultados de mayor cristalinidad del PHA se correlacionan con el comportamiento térmico de los polímeros evidenciado por MDSC. La inclusión de PHA en las mezclas aumentó la cristalinidad del material (Tabla inserta en Figura 5.14). El mayor

GC de las mezclas 60/40 y 40/60 se confirmó mediante rayos-X, mostrando los difractogramas picos de mayor intensidad que los sistemas individuales. Este comportamiento se atribuye a que el PHA induce la recristalización del PLA debido a su habilidad para actuar como agente de nucleación generando una mejor densidad de empaquetamiento de los segmentos poliméricos y promoviendo una mejor adhesión e interacción a nivel de la interface (Furukawa y col., 2005, Arieta y col., 2015).

#### 5.4.4 Análisis macroscópico y microestructural por SEM

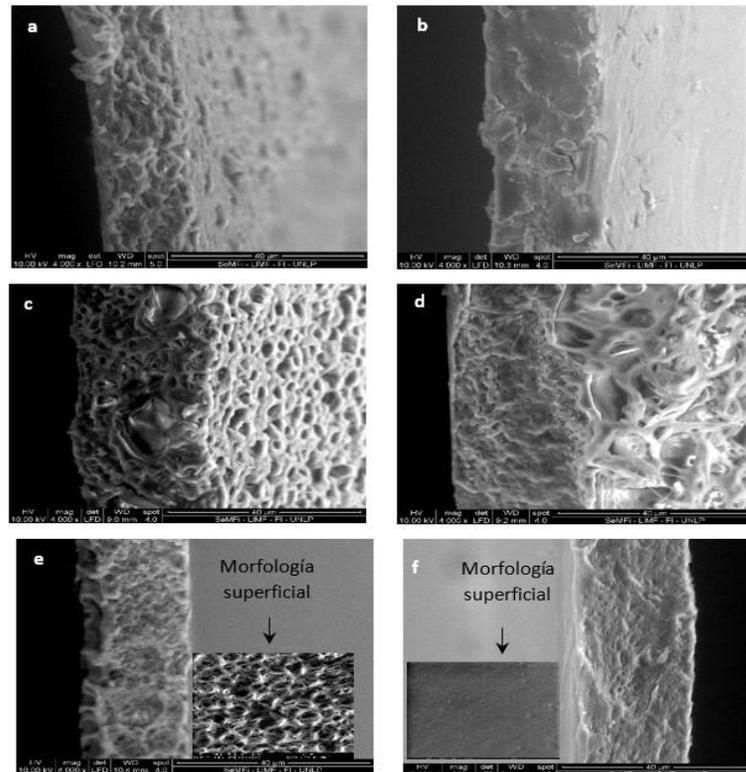
Desde el punto de vista macroscópico, las películas compuestas por diferentes proporciones de ambos polímeros aparecieron como matrices continuas, sin separación de fases. Como puede observarse en la Figura 5.15 las matrices presentaron una apariencia homogénea independientemente de la proporción PLA/PHA; aunque el FTIR mostró inmiscibilidad de ambos componentes. El espesor de las películas fue en promedio de 25  $\mu\text{m}$ , lo que se logró corroborar por medio del análisis microscópico.



**Figura 5.15. Fotografías de películas individuales y compuestas con distinta proporción de PLA/PHA**

Desde el punto de vista microscópico, la sección transversal presentó diferencias importantes según se analizaran las películas formadas por los polímeros puros o mezclas de los mismos. En el caso del PLA, se formaron películas homogéneas, con buena integridad estructural, sin poros mientras que el PHA dio lugar a películas cuya sección transversal fue rugosa, formando una estructura con apariencia fibrosa (Figura 5.16b y 5.16a respectivamente). La sección transversal y la superficie de las mezclas 20/80 y 40/60 (Figura 5.16c y 16d) revelaron la presencia de una estructura ordenada atribuida al crecimiento y cristalización de las esferulitas del PHA, mostrando una red formada por co-

dominios correspondientes a los distintos polímeros con una apariencia granular interdispersa y un patrón repetitivo. Es importante resaltar que la mayor proporción de PHA en las mezclas (PLA/PHA: 20/80) evidencio una microestructura porosa debido a la disposición estructural entre los polímeros; de acuerdo con Abdelwahab y col (2012) las interacciones de la interfaz entre las fases PHA y PLA podrían influir en el fenómeno de nucleación como lo respaldan los resultados de difracción de rayos X.



**Figura 5.16. Micrografías de matrices de: a) PHA, b) PLA, compuestas con distintas proporciones de PLA/PHA: c) 20/80, d) 40/60, e) 60/40 y f) 80/20**

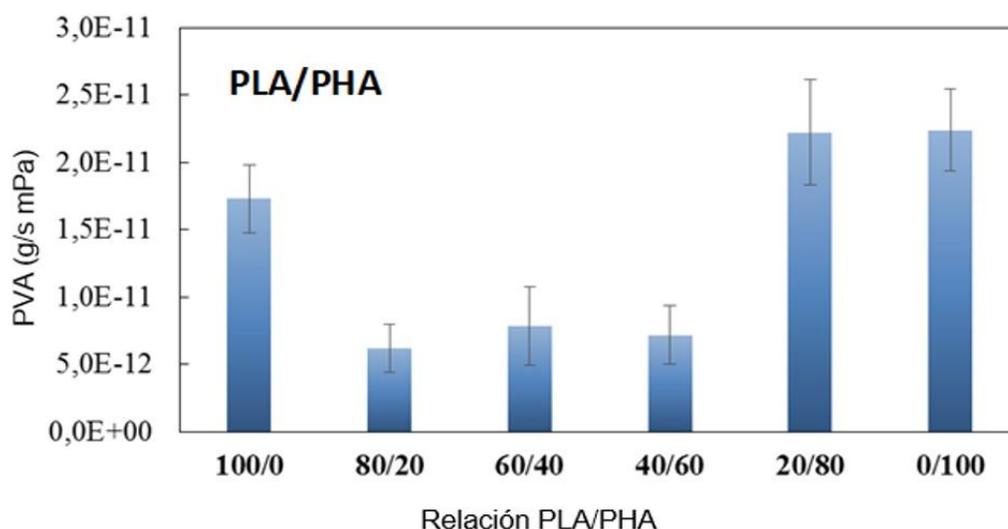
Estas micrografías refuerzan los resultados de inmiscibilidad obtenidos por otras técnicas. A medida que aumentó la proporción de PLA la morfología de las matrices se tornó más homogénea, menos rugosa hasta que la mezcla 80/20 presentó una apariencia donde la fase enriquecida en PLA formaba un dominio continuo y la fase enriquecida en PHA estaba dispersa, homogéneamente distribuida como puede observarse en la Figura 5.16f.

#### **5.4.5 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)**

La permeabilidad al vapor de agua se realizó siguiendo los métodos descritos en el

Capítulo 2. La formulación de matrices compuestas mejoró las propiedades de barrera de los materiales obteniendo una reducción del 40% en los valores de PVA para las muestras 40/60, 60/40 y 80/20 respecto al valor de las películas individuales de PLA y PHA de  $1,7 \times 10^{-11} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  y  $2,2 \times 10^{-11} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  respectivamente. Mientras tanto en la matriz PLA/PHA: 20/80 no mostró diferencias significativas con respecto a los ensayos donde el PLA y PHA se encontraban al 100% (Figura 5.17).

La cristalización parcial del PLA reduce la permeabilidad debido a que los cristales disminuyen el volumen de fase amorfa generando un camino de mayor tortuosidad, y reduciendo la transferencia de materia (Arrieta y col., 2015). La mejora en las propiedades de barrera está relacionada con la mayor cristalinidad de las matrices compuestas de PLA y PHA como se observa mediante la técnica de difracción de rayos X y el análisis térmico por MDSC.



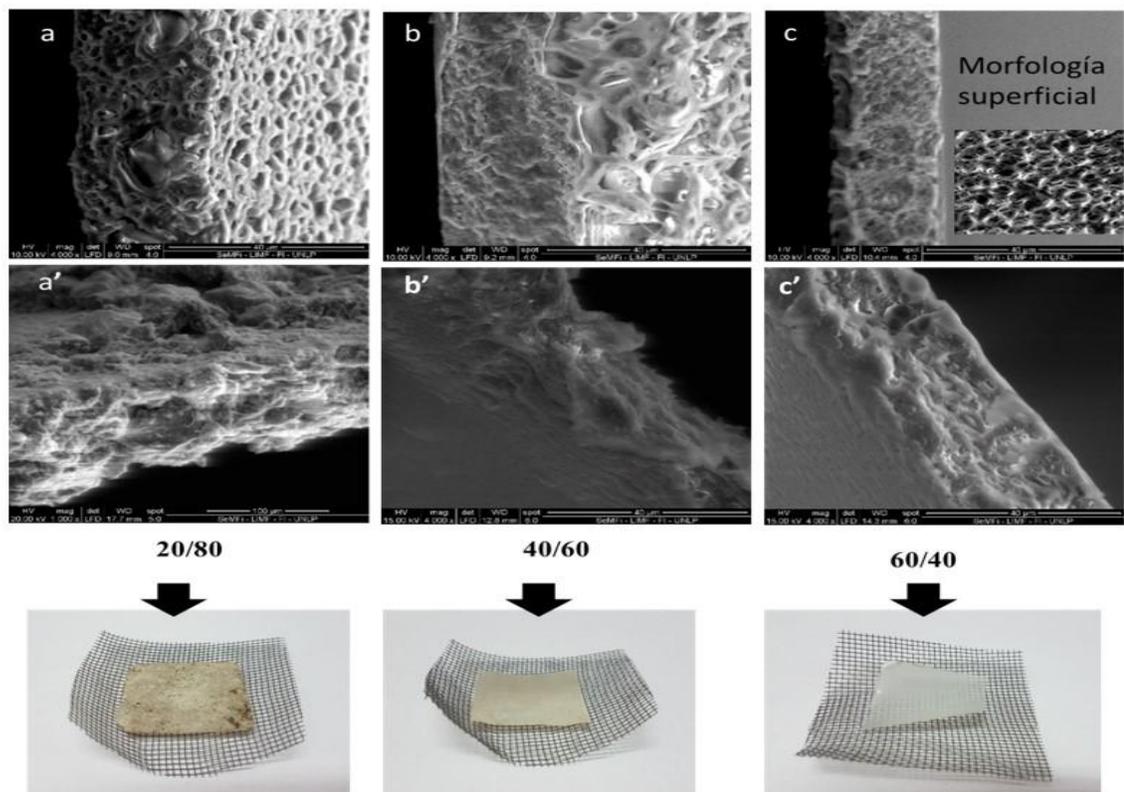
**Figura 5.17. Propiedades de barrera al vapor de agua de películas individuales y compuestas con diferentes proporciones de PLA/PHA**

Los polímeros son relativamente permeables a las moléculas pequeñas, tales como gases, vapor de agua, vapores orgánicos y líquidos, a diferencia de las cerámicas, vidrios y metales (Auras y col., 2005). Por lo tanto, una de las propiedades más importantes cuando se trata de desarrollar un sistema para envasado de alimentos es la permeabilidad al vapor de agua. Mejorar esta propiedad de barrera lo hace muy atractivo y de gran importancia cuando se busca mejorar la protección del producto que contienen, conservarlo y extender su vida útil. Los materiales poliméricos pueden establecer interacciones tanto con el entorno

como con el alimento; lo que puede dar lugar a una reducción de la calidad del producto, como alteraciones químicas, nutricionales y sensoriales del alimento y como consecuencia una reducción de su vida útil (Arrieta y col., 2015).

#### 5.4.6 Ensayo de biodesintegración en suelo

Durante el estudio de biodesintegración de las películas individuales y compuestas se examinó la influencia de la microestructura desarrollada durante la formulación de las mezclas en el proceso de biodesintegración. El estudio morfológico por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) durante los experimentos de biodesintegración en suelo fue complementario al examen visual ya que ayudó a confirmar la existencia de modificaciones estructurales en las películas, permitiendo una evaluación detallada del proceso de degradación.



**Figura 5.18. Micrografías de muestras: a, b, y c corresponden matrices compuestas de PLA/PHA tiempo cero: 20/80, 40/60 60/40 respectivamente. a', b' y c' pertenece a sus correspondientes letras luego de 50 días de exposición al proceso de biodesintegración.**

Los resultados mostraron que el comportamiento de desintegración de los polímeros de base biológica siguió diferentes patrones en cuanto a las características

morfológicas de cada matriz, como puede observarse en la Figura 5.18.

El ensayo de biodesintegración reveló que las películas de PHA exhibieron una biodesintegración notable a los 30 días. Las mezclas de PLA/PHA mostraron cambios alrededor de los 50 días, lo que indicaría un retraso en el proceso de biodesintegración. Según Weng y col (2013) el polímero de PHA podría biodegradarse a un ritmo elevado, tanto en condiciones de compostaje como en condiciones ambientales en suelo; mientras que el PLA es biodegradable en condiciones de compostaje, pero la tasa de degradación en el suelo era lenta. Las micrografías SEM muestran la superficie de fractura de las matrices PLA/PHA después de un proceso de biodesintegración de 50 días (Figura 5.18 a' b' c').

Puede verse que la biodesintegración se intensificó con las proporciones más altas de PHA en mezclas poliméricas. A medida que aumentó la proporción de PHA, particularmente de 40/60 a 20/80, las matrices mostraron mayores intersticios o cavidades (Figura 5.18b y 5.18a respectivamente) que podrían facilitar el proceso de biodesintegración. Zhang y Thomas 2011 informaron que la inclusión de PHA mejoró el grado de degradación del PLA a temperatura ambiente. Los autores determinaron que PHA y PLA exhiben diferentes patrones de degradación. El PHA se degrada principalmente por el ataque de varias enzimas en la superficie. Según Weng y colaboradores (2013) la degradación del PHA se puede atribuir a la erosión catalizada por las bacterias desde la superficie hacia el interior. Por el contrario, la degradación del PLA se produce en toda la muestra, comenzando con una hidrólisis no enzimática que conduce a una reducción en el peso molecular (Zhang y Tomas 2011). Luego, el PLA de bajo peso molecular se difunde fuera del polímero y puede ser metabolizado por microorganismos produciendo agua, dióxido de carbono y humus (Auras y col., 2004).

Los termogramas de las matrices compuestas, 20/80, 40/60 y 60/40 expuestas al proceso de biodesintegración durante 50 días (Figura 5.19) evidenciaron una disminución de la entalpía de transición correspondiente a la fusión de la fracción cristalina del PHA a  $28,2 \text{ J g}^{-1}$ ,  $9,06 \text{ J g}^{-1}$ ,  $2,24 \text{ J g}^{-1}$  respectivamente, siendo más marcada en las mezclas con mayor proporción de PHA (Tabla 5.4).

Dharmalingam 2014 estudió los cambios de entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) para un material compuesto basado en mezclas de PLA/PHA encontrando que presentan

despolimerización por hidrólisis de los enlaces éster. En consecuencia, este fenómeno podría indicar una mayor sensibilidad al proceso de degradación en presencia de una mayor proporción de PHA, independientemente de la transposición formada entre ambos polímeros.

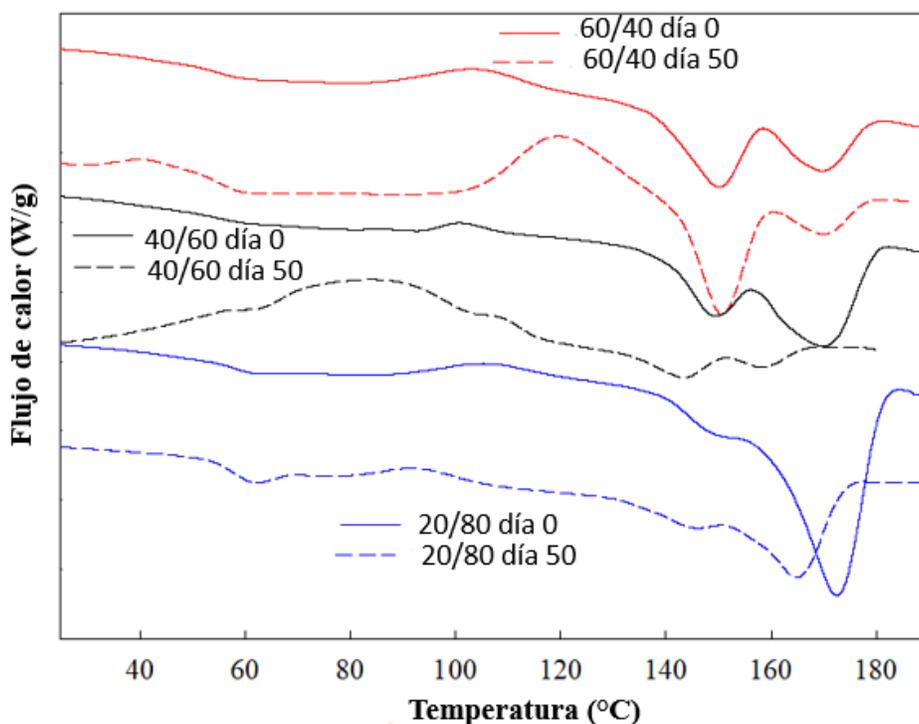
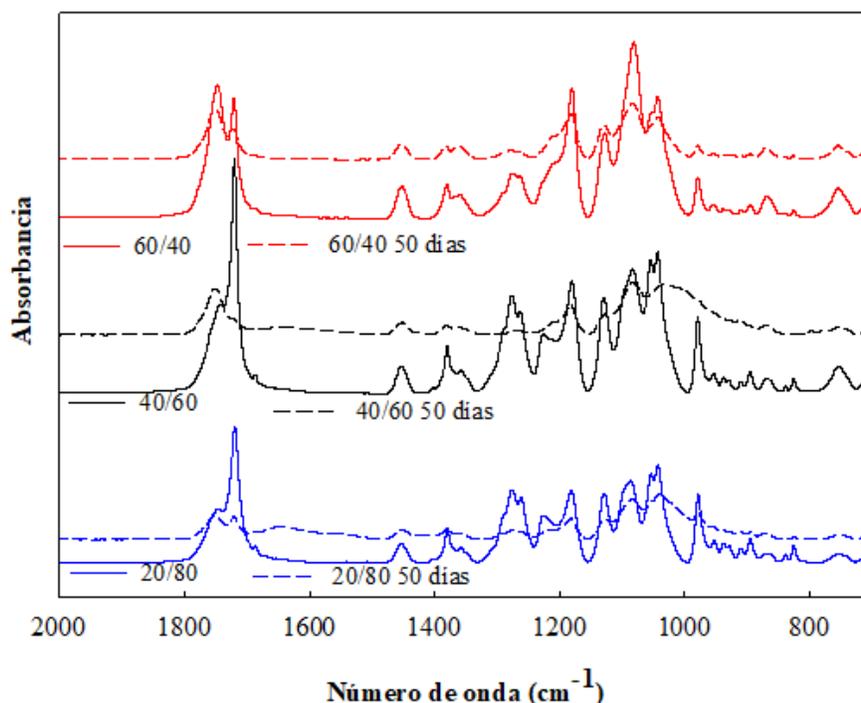


Figura 5.19. Curvas de MDSC de películas compuestas con distintas proporciones de PLA/PHA a tiempo 0 y 50 días de biodesintegración.

Tabla 5.4. Análisis térmico de películas compuestas con distintas proporciones de PLA/PHA a tiempo cero y 50 días de biodesintegración.

PLA/PHA	Etapa de calentamiento		
	$\Delta H_m$ (J g <sup>-1</sup> ) Día 0	$\Delta H_{m1}$ (J g <sup>-1</sup> ) Día 50	Diferencia entre $\Delta H_m$ y $\Delta H_{m1}$
60/40	9,1	2,24	6,86
40/60	18,8	9,06	9,74
20/80	61,7	28,2	33,5

Los cambios de estructura química de las matrices expuestas al proceso de biodesintegración fueron investigados por ATR-FTIR (Figura 5.20). Los espectros ATR-FTIR corroboraron los cambios provocados en la estructura de los polímeros. Después de 50 días de exposición al proceso de biodesintegración, los espectros ATR-FTIR de PHA y películas de mezcla mostraron que las bandas perdieron definición.



**Figura 5.20. Análisis por ATR-FTIR de películas compuestas con distintas proporciones de PLA/PHA a tiempo 0 y 50 días de biodesintegración.**

Ludueña y colaboradores (2012) señalaron que la hidrólisis química y enzimática son los principales mecanismos de ruptura de la cadena durante el proceso de degradación. Entonces, el proceso de biodegradación depende de la disponibilidad de agua, lo que produce hidrólisis y ataque microbiano de la matriz.

La difusión del agua en el suelo provocó una degradación hidrolítica del material modificando la superficie y visualizando una estructura porosa con evidentes signos de degradación (Figura 5.18). Rocca-Smith y col (2017) propusieron una explicación similar. La biodesintegración de las mezclas fue más marcada en películas formuladas con proporciones crecientes de PHA; Zhang y Thomas (2011) informaron resultados similares.

## 5.5. Conclusiones del capítulo

En el presente capítulo se estudió el comportamiento de matrices individuales y compuestas de PHA y PLA analizando los cambios microestructurales, térmicos y de biodesintegración. Se lograron preparar películas individuales y mezclas de PHA y PLA disolviendo los polímeros en cloroformo a 60°C durante 30 min. En los termogramas obtenidos en el estudio térmico mediante DSC modulado de las películas de PLA, PHA y sus mezclas, durante el calentamiento de las películas individuales, se observaron picos atribuidos a la fusión de los dominios cristalinos, correspondientes al PLA y PHA a 147,7°C y 172,7°C, con una entalpía asociada de 20,1 y 86,6 J g<sup>-1</sup>, respectivamente. En el caso de las mezclas se observaron dos picos de fusión característicos de cada polímero individual; la intensidad de cada pico de fusión estuvo de acuerdo con la mayor o menor proporción de cada polímero en la mezcla. Sin embargo, las mezclas exhibieron picos de recristalización del PLA inducidos por el agregado de PHA, localizado a 107°C, siendo esta transición más evidente cuando la proporción de PLA en la mezcla fue mayor, con lo que se puede concluir que las mezclas de PLA/PHA son parcialmente miscibles. El PHA permitió aumentar la cristalinidad del PLA además de inducir el fenómeno de recristalización del mismo, dado que el PHA cristalizó como pequeñas esferulitas actuando como agente de nucleación del PLA. Este análisis concuerda con los datos obtenidos por espectroscopía ATR-FTIR donde los espectros individuales presentan bandas con picos característicos del PLA (vibración del carbonilo porción amorfa) y PHA (vibración del carbonilo porción cristalina) 1746 cm<sup>-1</sup> y 1719 cm<sup>-1</sup> respectivamente. En el caso de las mezclas se visualizaron las dos bandas correspondientes al estiramiento del grupo carbonilo correspondiente al PLA y PHA; la intensidad de cada banda cambió de acuerdo a la relación de cada polímero en la película demostrando una débil interacción entre los componentes y manifestando que las mezclas son parcialmente inmiscibles.

Los difractogramas obtenidos en el análisis mediante difracción de rayos X demostraron que el PLA es un material amorfo con un pico de muy baja intensidad característico de la reflexión de cristales del polímero con un grado de cristalinidad del 14,3% mientras que el PHA presentó un grado de cristalinidad del 18,3%.

En las mezclas se pudo observar que las películas con proporciones de PLA/PHA 60/40 y 40/60 presentaron picos de mayor intensidad que el PHA, con grados de cristalinidad de 21,8 y 18,5 respectivamente. Este comportamiento se puede atribuir a que

el PHA induce la recristalización del PLA. Por otro lado, el análisis microestructural por microscopía electrónica de barrido permitió ver en las secciones transversales y la superficie, las diferencias estructurales. En el caso del PLA se formó una película homogénea sin poros mientras que el PHA presentó una estructura de apariencia fibrosa. En relación con las mezclas 20/80 y 40/60 se logró evidenciar una estructura ordenada con apariencia granular donde se destacó la cristalización de las esferulitas de PHA mientras que para la mezcla 80/20 la apariencia era menos rugosa.

La permeabilidad al vapor de agua demostró que las mezclas 80/20, 60/40 y 40/60 permitieron reducir en un 40% los valores de PVA en relación a las películas individuales y la mezcla 20/80; este comportamiento era esperable debido a que la cristalización parcial del PLA disminuye el volumen de la fase amorfa generando un camino de mayor tortuosidad reduciendo así la transferencia de masa.

En el ensayo de biodesintegración de las películas individuales y sus mezclas se logró determinar que a los 50 días los espectros de ATR-FTIR presentaban bandas con menos definición y picos más pequeños en comparación con las muestras iniciales. Los análisis de MDSC y SEM demostraron que las muestras que contenían mayor proporción de PHA especialmente 40/60 y 20/80 presentaban mayor deterioro lo cual se logró confirmar por MDSC con una mayor disminución de la entalpia de transición correspondiente a la fusión de la fracción cristalina.

# **CAPITULO 6**

# **CONCLUSIONES**

## Conclusiones finales

En el presente trabajo de tesis se evaluó el sistema de producción de polihidroxialcanoatos (PHA) de dos etapas, selección de bacterias en SBR y producción en batch, utilizando dos efluentes sintéticos uno a base de suero de queso y el otro de glicerol crudo, utilizando cultivos mixtos de lodos activados. A partir del PHA obtenido se desarrollaron películas individuales y mezclas PLA/PHA con diferentes propiedades físico-químicas y de biodesintegración. La producción comercial de PHA usando cultivos puros implica el uso de sustratos puros y condiciones de esterilidad, lo que lo hace un método con altos costos de producción. Los lodos activados como alternativa al cultivo puro permiten reducir los costos de producción al eliminar las etapas de esterilización necesarias en los cultivos puros.

En el sistema de selección de bacterias con capacidad de acumular PHA se evaluó el efecto de diferentes parámetros operativos (carga volumétrica de sustrato orgánico, duración del ciclo, tiempo de residencia celular y tiempo de residencia hidráulico) en la presión de selección de bacterias acumuladoras de PHA usando suero de queso (subproducto de la industria láctea) o glicerol crudo (subproducto de la industria del biodiesel) como fuente de carbono y energía.

Inicialmente se realizaron diferentes ensayos de selección de bacterias acumuladoras de PHA, tanto para el sistema alimentado con suero de queso (Capítulo 3) como con glicerol crudo (Capítulo 4) con el fin de encontrar las mejores condiciones de operación y generar un cultivo rico en bacterias con capacidad de acumular PHA. Para ello se ha tenido en cuenta, en base a información bibliográfica, que un factor determinante en el proceso de presión selectiva de dichas bacterias es la relación de las fases “feast/famine”, donde la fase “feast” debe estar por debajo del 20% de la duración total del ciclo operativo para lograr un cultivo enriquecido con bacterias con capacidad de acumular PHA.

El SBR alimentado con suero de queso, operado con tiempo de residencia celular de 10 días, tiempo de residencia hidráulico de 4 días, ciclo de 84 horas y carga orgánica de 1 gDQO/(L día) presentó una etapa feast de 23%, cercano al valor recomendado en bibliografía (<20%). Se utilizó una relación DQO:N:P de 100:10:5. La concentración de biomasa al final de la fase feast fue entre 3900 mgDQO<sub>B</sub>/L y 4200 mgDQO<sub>B</sub>/L, concentraciones adecuadas para poder utilizar en la siguiente fase de producción. Se logró

determinar por análisis microscópico la presencia de PHA intracelular por medio de tinción específica con Sudan Black; por otra parte, los análisis de FT-IR realizados al cultivo mixto mostraron la presencia de señales características del grupo funcional éster del polímero de PHA ( $1745\text{ cm}^{-1}$ ) que confirman que el polímero acumulado es PHA.

Una vez que se logró obtener el proceso de selección de bacterias acumuladoras de PHA se buscó el mejor proceso de extracción del polímero, concluyendo que lo más conveniente era secar la biomasa por medio de estufa al vacío ( $60^{\circ}\text{C}$ ; 0,6 bar), realizar la extracción del PHA por reflujo con cloroformo a  $60^{\circ}\text{C}$  por un período de 3 horas y finalmente realizar la precipitación y purificación del PHA con etanol a  $4^{\circ}\text{C}$ .

El sistema de producción de PHA se realizó en un reactor batch que fue inoculado con el cultivo del reactor SBR de selección. Se analizaron dos sistemas de producción, uno limitado en nutrientes (LN: nitrógeno y fósforo) (con una relación DQO:N:P de 100:0,5:0,25) con exceso de aireación ( $> 4\text{ mgO}_2/\text{L}$ ), mientras que el otro reactor fue limitado en oxígeno (LO: limitado en oxígeno sin adición de nutrientes) con una relación DQO:N:P de 100:0:0.

Se propuso un método semicuantitativo para monitorear y detectar el punto final del sistema de producción de PHA, a partir de medidas realizadas por FT-IR al cultivo mixto, evitando todas las etapas de extracción y purificación del polímero que pueden requerir hasta 24 horas. Este método propone una correlación entre el porcentaje de PHA obtenido en el proceso de extracción y cuantificación por espectroscopía UV-Vis y los valores alfa obtenidos por FT-IR lo cual reduciría el tiempo de detección y cuantificación a menos de 30 min.

En el sistema limitado en nutrientes el sustrato orgánico fue consumido en las primeras 48 horas con una remoción del 93% de la materia orgánica externa, con un rendimiento de PHA del 3,7% mientras que el sistema limitado en oxígeno consumió en 48 horas el 97% de la materia orgánica y el rendimiento de PHA fue de 4,7%. Aunque el rendimiento de producción de PHA en el sistema limitado en oxígeno es alrededor de 20% mayor al limitado en nutrientes, mediante el análisis de varianza no se encontraron diferencias significativas entre ambos ensayos para un nivel de significación de 0,01. Las diferencias encontradas en la producción de PHA pueden ser causadas por las pérdidas que ocurren inevitablemente en el proceso de extracción, lo cual puede afectar de forma

significativa la determinación del rendimiento de PHA en reactores con baja producción de PHA (<5%).

En ambos sistemas el polímero obtenido corresponde a homopolímero de polihidroxibutirato (PHB) como se pudo comprobar por medio del análisis térmico (DSC). En los termogramas obtenidos se observó la aparición de un solo pico de fusión a la temperatura característica del PHB (LN: 176,5°C y LO: 175,6°C). La entalpia de fusión y la cristalinidad para el sistema LN fueron de 81,88 J g<sup>-1</sup> y 56,1% respectivamente, mientras que para LO fueron 84,55 J g<sup>-1</sup> y 57,9% respectivamente.

En el caso del sistema de selección alimentado con glicerol crudo fue necesario realizar inicialmente la obtención del glicerol crudo, para lo cual se realizó un proceso de producción de biodiesel utilizando aceite reciclado. Se trabajó con dos tipos de aceites (aceite de poco uso proporcionado por el CIDCA y aceite recolectado de puestos de comida). Dichos aceites al ser reciclados fue necesario realizar un pretratamiento que implicó la filtración de las impurezas y eliminación de la humedad. Los análisis fisicoquímicos determinaron la ruta que se debería seguir para la producción de biodiesel.

El aceite de poco uso presentó un menor índice de acidez (0,93 mgKOH/g muestra) y fue procesado por transesterificación alcalina dado que el valor de dicho índice resultó 2 veces menor al valor recomendado como seguro para realizar este procedimiento (Índice <2mgKOH/g muestra); mientras que el aceite recolectado de puestos de comida presentó un mayor índice de acidez (3,80 mg KOH/g muestra) y fue procesado en dos etapas; primero una catálisis ácida seguida de catálisis básica.

En el proceso de catálisis alcalina se utilizó una relación molar metanol/aceite de 6:1 y como catalizador KOH; el sistema se dejó reaccionar durante 1,5 horas a 60°C. La separación del biodiesel y la glicerina se realizó en ampollas de decantación, finalmente el biodiesel fue lavado con una solución de ácido fosfórico. Se logró obtener por cada 100 ml de aceite alrededor de 14 ml de glicerol crudo.

Para el proceso en dos etapas se realizó inicialmente la catálisis ácida. Para ello se realizaron tres ensayos con el fin de determinar el porcentaje adecuado de ácido sulfúrico (0,1, 0,5 y 1,0 %) que se debía utilizar. La relación molar metanol/aceite (6:1), tiempo (1,5 hs) y temperatura (60°C) se mantuvieron constantes en los tres ensayos.

En la catálisis ácida se realiza una esterificación; los ácidos grasos libres del aceite (u otra materia prima) reaccionan con el alcohol (metanol) y se transforman en metil ésteres con producción de agua lo cual es un gran inconveniente para la segunda reacción. Esto es debido a que los triglicéridos en presencia de agua y un catalizador alcalino generan reacciones de saponificación y la materia prima que debería convertirse en biodiesel se convierte en jabones, lo que no sólo afecta el rendimiento de producción, sino que también dificulta la separación del biodiesel y glicerol. Debido a esto se realizó un secado al finalizar la catálisis ácida, posteriormente se realizó la catálisis alcalina y la separación y el lavado del biodiesel de igual manera a como se realizó para el aceite de baja acidez.

El proceso de producción de biodiesel catalizado en dos etapas se logró de manera exitosa usando 0,5% de ácido sulfúrico, obteniéndose 10 ml de glicerol por cada 100 ml de aceite. En el caso que se usó 0,1% solo se logró obtener 4 ml de glicerol y en el ensayo con 1,0% no se presentó formación de glicerol lo que nos indica que el exceso de ácido evitó la producción de biodiesel.

Se realizó análisis por cromatografía gaseosa a las muestras de biodiesel por catálisis alcalina y a la muestra más exitosa (0,5% de ácido sulfúrico) usando catálisis en dos etapas. En los cromatogramas obtenidos se logró observar que la reacción fue exitosa donde todo el material lipídico fue convertido en metil esterés.

Debido a la mayor facilidad del proceso en una sola etapa usando aceite de baja acidez se planteó realizar la producción de biodiesel únicamente con este aceite para obtener el glicerol crudo que se utilizó como fuente de carbono y energía en el sistema de selección de bacterias acumuladoras de PHA y sistema de producción de PHA.

En el caso del sistema de selección alimentado con glicerol crudo se determinaron las mejores condiciones operativas: ciclos de 168 horas, tiempo de residencia hidráulico y celular de 8,16 y 20 días respectivamente, carga orgánica de 0,25 gDQO/(L día) y relación DQO:N:P.= 100:10:5. La concentración de biomasa fue de  $1378 \pm 105$  mgDQO<sub>B</sub>/L al inicio del SBR con una etapa feast de 17,8%. Se determinó la presencia de gránulos intracelulares de PHA por medio de tinción microscópica con sudan black.

El sistema de producción de PHA se realizó en un reactor batch con exceso de aireación (>4,0 mgO<sub>2</sub>/L) y limitado en nutrientes (DQO:N:P de 100:0,5:0,25). El sustrato

orgánico fue consumido en las primeras 32 horas con una remoción alrededor del 85% de la materia orgánica. El rendimiento de PHA fue de 18% a las 32 horas. El rendimiento en la producción de PHA fue alrededor de 4,2 veces mayor al correspondiente al sistema alimentado con suero de queso limitado en oxígeno; esta diferencia en la producción de PHA entre ambos sistemas puede estar asociado con el nitrógeno orgánico que contiene el suero de queso, el cual puede ser usado para crecimiento celular a expensas de la fuente de carbono y energía.

Mediante el análisis térmico se logró determinar que el polímero extraído es PHB con un pico de fusión a 174,5°C, entalpía de fusión de 82,9 J g<sup>-1</sup> y cristalinidad del 56,8%. Valores similares fueron encontrados para el polímero extraído de los dos sistemas alimentados con suero de queso.

Finalmente se prepararon películas individuales de PLA (comercial) y PHA (obtenido a partir de suero de queso en el presente trabajo de tesis) y mezclas PLA/PHA (80/20, 60/40, 20/80) con el fin de estudiar los cambios microestructurales, térmicos y de biodesintegración.

En los termogramas obtenidos en el estudio térmico mediante DSC modulado de las películas de PLA, PHA y sus mezclas, durante el calentamiento de las películas individuales, se observaron picos atribuidos a la fusión de los dominios cristalinos correspondientes al PLA y PHA a 147,7°C y 172,7°C, con una entalpía asociada de 20,1 y 86,6 J g<sup>-1</sup> respectivamente. En los termogramas de las mezclas se observaron dos picos de fusión característicos de cada polímero individual, siendo la intensidad de cada pico dependiente de la mayor o menor proporción de cada polímero en la mezcla. En las mezclas se observaron picos de recristalización del PLA inducidos por el agregado de PHA, siendo más evidente cuando el PLA se encuentra en mayor proporción en la mezcla, con lo que podemos concluir que las mezclas de PLA/PHA son parcialmente inmiscibles. El PHA permitió aumentar la cristalinidad del PLA además de inducir el fenómeno de recristalización del mismo. En los espectros por ATR-FTIR se observó que la intensidad de cada banda correspondiente al estiramiento de los carbonilos localizadas a 1746 y 1719 cm<sup>-1</sup> debidas al PLA y PHA respectivamente cambia de acuerdo a la relación de cada polímero en la película demostrando una débil interacción entre los componentes, lo que indica que las mezclas son parcialmente inmiscibles.

Mediante análisis de los difractogramas obtenidos por difracción de rayos X se logra observar que el PLA es un material amorfo con un pico de muy baja intensidad resultando un grado de cristalinidad del 14,3% mientras que el PHA presentó un grado de cristalinidad del 18,3%. Las mezclas PLA/PHA 60/40 y 40/60 presentaron picos de mayor intensidad que el PHA y PLA, con grado de cristalinidad de 21,8 y 18,5% respectivamente. Este comportamiento se atribuye a que el PHA induce la recristalización del PLA. Mediante el análisis por microscopia electrónica de barrido se logró observar que la película de PLA es homogénea y con poros mientras que la película de PHA es de apariencia fibrosa. Mientras que en las mezclas 20/80 y 40/60 se logró evidenciar una estructura ordenada con apariencia granular donde se destaca la cristalización de las esferulitas de PHA mientras que la mezcla 80/20 presentaba una apariencia menos rugosa.

Los análisis de permeabilidad al vapor de agua demostraron que las mezclas poliméricas disminuyen la permeabilidad hasta en un 40% en relación a las películas individuales y la mezcla 20/80, esto puede deberse a que la cristalización parcial del PLA disminuye el volumen de la fase amorfa generando un camino de mayor tortuosidad reduciendo la transferencia de masa.

El ensayo de biodesintegración de las películas individuales y compuestas se realizó por 50 días, las películas se analizaron por ATR-FTIR, MDSC y SEM demostrando que las películas con mayor proporción de PHA especialmente 40/60 y 20/80 presentaban mayor deterioro en comparación con las muestras analizadas al día cero.

El PLA posee múltiples ventajas como alta transparencia, disponibilidad en el mercado, facilidad de procesamiento, costos competitivos, buenas características ambientales. Sin embargo, sus propiedades de barrera al vapor de agua son deficientes, por lo tanto, lograr la disminución de la permeabilidad por medio de la mezcla con un polímero más cristalino con temperatura de fusión similar como es el caso del PHA es de gran interés. Dicha mezcla polimérica es muy atractiva y de gran importancia en el desarrollo de envases para alimentos donde la baja permeabilidad del empaque es fundamental para mejorar la protección del producto, conservarlo y extender su vida útil.

## Bibliografía

- Agarwal, K. (2007). Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33(3), 233–271. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2006.08.003>.
- Ahmadi, F., Zinatizadeh, A., Asadi, A., Younesi, H. (2019). Influence of Different Culture Selection Methods on Polyhydroxyalkanoate Production at Short-term Biomass Enrichment. *International Journal of Engineering, Transactions B: Applications*, 32(2), 184–191. <https://doi.org/10.5829/ije.2019.32.02b.01>.
- Aiken Jhon. Purification of Glicerín. US 7.126.032 (2006).
- Alamu, J., Waheed, A., Jekayinfa, O. (2008). Effect of ethanol-palm kernel oil ratio on alkali-catalyzed biodiesel yield. *Fuel*, 87(8–9), 1529–1533. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2007.08.011>.
- Albuquerque M. G. E., Martino V., Pollet E., Avérous L. & Reis M. A. M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acids (VFA)-rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of biotechnology*, 151(1), 66-76.
- Albuquerque., E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B. R., Reis, M. (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*, 130(4), 411–421. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.05.011>.
- Al-Widyan, M. I., & Al-Shyoukh, A. O. (2002). Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. *Bioresource Technology*, 85(3), 253–256. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00135-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00135-9).
- Allawzi M, Kandah M. (2008). Parametric study of biodiesel production from used soybean oil. *Eur J Lipid Sci Technol*;110(8):760–7
- Amaro, T., Rosa, D., Comi, G., Iacumin, L. (2019). Prospects for the use of whey for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00992>.
- Abdelwahab, A., Flynn, A., Chiou, B. Sen, Imam, S., Orts, W., Chiellini, E. (2012). Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA-PHB blends. *Polymer Degradation and Stability*, 97(9), 1822–1828. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.05.036>.
- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596–1605. 1596-1605.
- Annel K, Greene. 2010. Síntesis de biodiesel a partir de grasas animales utilizando catalizadores sólidos. *A&G Tomo XX. Vol 2*, 252-253.

- Arvanitoyannis, S., Giakoundis, A. (2006). Current strategies for dairy waste management: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(5), 379–390. <https://doi.org/10.1080/10408390591000695>.
- Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria. (1997). "Catálogo Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental." Edición Argentina. AIDIS ARGENTINA. CIDIS 96/97.
- Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria. (2001). "Catálogo Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental " Edición Argentina. AIDIS ARGENTINA. CIDIS 2001/2003.
- Ashby, R., Solaiman, D. (2011). Efficient Utilization of Crude Glycerol as Fermentation Substrate in the Synthesis of Poly ( 3-hydroxybutyrate ) Biopolymers. 949–959. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1755-6>.
- Ashok, B., Naresh, S., Reddy, O., Madhukar, K., Cai, J., Zhang, L., Rajulu, V. (2014). Tensile and Thermal Properties of Poly(lactic acid)/Eggshell Powder Composite Films, *Int. J. Polymer Analysis & Characterization*. 19, 245-255.
- Auras, A., Singh, P., Singh, J. (2005). Evaluation of oriented poly(lactide) polymers vs. existing PET and oriented PS for fresh food service containers. *Packaging Technology and Science*, 18(4), 207–216. <https://doi.org/10.1002/pts.692>.
- Autoridad de Cuenca Matanza-Riachuelo. (2007). "Informe correspondiente al plan integral de saneamiento ambiental de la cuenca hídrica Matanza-Riachuelo conforme requerimiento de la corte Suprema de Justicia de la Nación." <http://www.farn.org.ar/participacion/riachuelo/documentos/65preguntas091107.pdf> consultado noviembre 2013.
- Arcos-Hernandez, M. V., GuriEFF, N., Pratt, S., Magnusson, P., Werker, A., Vargas, A., Lant, P. (2010). Rapid quantification of intracellular PHA using infrared spectroscopy: An application in mixed cultures. *Journal of Biotechnology*, 150(3), 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.939>.
- Arrieta, P., López, J., Hernández, A., Rayón, E. (2014). Ternary PLA-PHB-Limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. *European Polymer Journal*, 50(1), 255–270. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.11.009>.
- Armentano, I., Fortunati, E., Burgos, N., Dominici, F., Luzi, F., Fiori, S., Jiménez, A., Yoon, K., Ahn, J., Kang, S., Kenny, J. M. (2015). Processing and characterization of plasticized PLA/PHB blends for biodegradable multiphase systems. *Express Polymer Letters*, 9(7), 583–596. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2015.55>.
- Aziz, A., Daud, W., Diyauddien, H., Chakrabarti, M. (2012). Performance evaluation of biodiesel from used domestic waste oils: A review. *Process Safety and Environmental Protection*. (Article in press).
- Barham, J., Keller, A., Otun, L., Holmes, A. (1984). Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Materials Science* 19 (9), 2781–2794.
- Bartczak, Z., Galeski, A., Kowalczyk, M., Sobota, M., Malinowski, R. (2013). Tough blends

- of poly(lactide) and amorphous poly([R,S]-3-hydroxy butyrate) - Morphology and properties. *European Polymer Journal*, 49(11), 3630–3641. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.07.033>.
- Barnwal, K., Sharma, P. (2005). Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 9(4), 363–378. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2004.05.007>.
- Barros, A., Oliveira, A., Magalhães, M., Villa, R. (2012). Determination of sodium and potassium in biodiesel by flame atomic emission spectrometry, with dissolution in ethanol as a single sample preparation step. *Fuel* 93, 381-384.
- Bashir, Z., Al-Aloush, I., Al-Raqibah, I., & Ibrahim, M. (2000). Evaluation of three methods for the measurement of crystallinity of PET resins, preforms, and bottles. *Polymer Engineering and Science*, 40(11), 2442–2455. <https://doi.org/10.1002/pen.11376>.
- Basset, N., Katsou, E., Frison, N., Malamis, S., Dosta, J., Fatone, F. (2015). Integrating the selection of PHA storing biomass and nitrogen removal via nitrite in the main wastewater treatment line. *Bioresource Technology*, 200, 820–829. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.063>.
- Beccari, M., Bertin, L., Dionisi, D., Fava, F., Lampis, S., Majone, M., Valentino, F., Vallini, G., Villano, M. (2009). Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(6), 901–908. <https://doi.org/10.1002/jctb.2173>.
- Behr, A., Eilting, J., Irawadi, K., Leschinski, J., Lindner, F. (2008). Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol. *Green Chemistry*, 10(1), 13–30. <https://doi.org/10.1039/b710561d>.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology*, 99(3), 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.020>.
- Bernal, I. (1998). *Análisis de los Alimentos*. Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales. ISBN: 958-9205-00-3.
- Beun, J., Paletta, F., Van Loosdrecht, M., Heijnen, J. (2000). Stoichiometry and Kinetics of Poly-Hydroxybutyrate Metabolism in Aerobic, Slow Growing, Activated Sludge Cultures. In *Biotechnol Bioeng* (Vol. 67).
- Beun, J., Dircks, K., Van Loosdrecht, M., Heijnen, J. (2002). Poly-b-hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures. In *Water Research* (Vol. 36).
- Bocanegra, J., Malagón, D., y López, L. (2015). Obtención de biodiesel a partir de aceite usado de cocina por transesterificación. *Ingeniería Y Universidad*, 19(1), 155-172. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.iyu19-1.odba>
- Bosch, A., Miñán, A., Vescina, C., Degrossi, J., Gatti, B., Montanaro, P., Messina, M., Franco, M., Vay, C., Schmitt, J., Naumann, D., Yantorno, O. (2008). Fourier transform

- infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2535–2546. <https://doi.org/10.1128/JCM.02267-07>.
- Bosco, F., Chiampo, F. (2010). Production of polyhydroxyalcanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge. Production of bioplastics using dairy residues. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(4), 418–421. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.10.012>.
- Bosco F., Carletto R., Marmo L. (2018). An Integrated Cheese Whey Valorization Process, *Chemical Engineering Transactions*, 64, 379-384.
- Botkin, B., Keller, E. (2000). *Environmental science Earth as a living planet*. Third Edition. John Wiley & Sons, INC. N.Y.
- Bhatt, R., Shah, D., Patel, C., Trivedi, U. (2008). PHA-rubber blends: Synthesis, characterization and biodegradation. *Bioresource Technology*, 99(11), 4615–4620. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.054>.
- Bragg, H., Bragg, L. (1913). The reflection of X-rays by crystals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 88(605), 428-438.
- Brandelli, A., Sala, L., Kalil, J. (2015). Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Research International*, 73, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.015>.
- Braun, D., Cherdrón, H., Rehahn, M., Ritter, H., Voit, B. (2013). *Polymer Synthesis: Theory and Practice*. In *Polymer Synthesis: Theory and Practice: Fundamentals, Methods, Experiments*, Fifth Edition. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-28980-4>.
- Braunegg, G., Bona, R., Koller, M. (2004). Sustainable Polymer Production. *Polymer Plastics Technology and Engineering* 43: 1779-1793.
- Britz, T., Schalwyk, C., Hung, T. (2006). Treatment of dairy processing wastewaters. In: Wang LK, Hung YT, Lo HH, Yapi-jakis C, editors. *Waste treatment in the food processing industry*. Boca Raton, FL, USA. pp.1–25.
- Blümm, E., Owen, J. (1995). Miscibility, crystallization and melting of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(l-lactide) blends. *Polymer*. 36(21):4077-4081.
- Budde, F., Mahan, E., Lu, J., Rha, C., Sinskey, J. (2010). Ling H16. *J. Bacteriol.* 192:5319-5328.
- Busse, B., Venrick, L., Antrobus, R., Miller, E., Vigilant, V., Silver, W., Prezelin, B. (2006). Domoic acid in phytoplankton and fish in San Diego, CA, USA. *Harmful Algae*, 5(1), 91-101. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2005.06.005>.
- Caccavale, F., Lamarino, M., Pierri, F., Tufano, V. (2011). Control and Monitoring of Chemical Batch Reactors. *Advances in Industrial Control*. doi:10.1007/978-0-85729-195-0.

- Campos, I., Figueiredo, B., Sousa, S., Druzian, I. (2014). The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. *Industrial Crops and Products*, 52, 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.008>.
- Canakci, M. & Gerpen, J. (2001). Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. 44(6), 1429–1436.
- Cankci, M., Sanli, H., (2008). Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 431– 441.
- Canoira, L., Rodríguez-Gamero, M., Querol, E., Alcántara, R., Lapuerta, M., Oliva, F. (2008). Biodiesel from low-grade animal fat: production process assessment and biodiesel properties characterization. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 47(21), 7997–8004. <https://doi.org/10.1021/ie8002045>.
- Cassidy, D.P. y Belia, E. (2005). Nitrogen and phosphorus removal from an abattoir wastewater in a SBR with aerobic granular sludge. *Wat. Res.* 39(19), 4817-4823.
- Cárdenas, J., Orjuela, A., Sánchez, D. L., Narváez, C., Katryniok, B., Clark, J. (2021). Pre-treatment of used cooking oils for the production of green chemicals: A review. *Journal of Cleaner Production*, 289(xxxx). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125129>.
- Cardeño, F., Gallego, J., Rios, L. (2011). Refinación de la Fase Glicerina del Biodiesel de Aceite de Palma empleando Ácidos Minerales. *Informacion Tecnologica.* 22(6), 15–24. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000600003>.
- Carletto, R. A. (2014). Studio della produzione di poliidrossialcanoati da siero di latte. (Doctoral dissertation, Politecnico di Torino).
- Carletto R., Chiado, A., Gillio, L., Bosc, F., Marmo, L. (2011). Application of SBB Staining Technique for Monitoring PHA Production in Milk Wry Fermentation. *Chemical Engineering transaction.* Vol 24.
- Carucci, A., Dionisi, D., Majone, M., Rolle, E., Smurra, P. (2001). Aerobic storage by activated sludge on real wastewater. *Pergamon.* 35(16), 3833–3844.
- CAR/PL (Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia). Plan de Acción para el Mediterráneo. (2002).
- Carrasco, F., Gámez-Pérez, J., Santana, O., Maspoch L. (2011). Processing of poly(lactic acid)/organomontmorillonite nanocomposites: Microstructure, thermal stability and kinetics of the thermal decomposition. *Chemical Engineering Journal.* 178:451-460.
- Carta, F., Beun, J., Van Loosdrecht, M., Heijnen, J. (2001). Simultaneous storage and degradation of PHB and glycogen in activated sludge cultures. *Water Research* 35:2693-2701
- Carvalho, G., Oehmen, A., Albuquerque, E., Reis, M. (2014). The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses. *N. Biotechnol.* 31, 257–263.

- Cavalheiro, T., Almeida, M., Grandfils, C., Fonseca, R. (2009). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, 44(5), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.01.008>.
- Castañeda, R., Borbonet, S., Ibarra, A., Ipar, J., Vazquez, A., Brito, C., Alonso, R., (2010). *Quesos de America del sur*. Albatros, ISBN 9789502413129.
- Castro, R., Perez, R. (2009). *Saneamiento rural y salud. Guía para acciones a nivel local*. Guatemala.
- Coats, E., Loge, J., Wolcott, P., Englund, K., McDonald, G., (2007). Synthesis of polyhydroxyalkanoates in municipal wastewater treatment. *Water Environ. Res.* 79, 2396e2403.
- Cervantes, F.J. (2009). *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*, IWA Publishing, London.
- Colombo, B., Sciarria, T, Reis, M., Scaglia, B, Adani, F., (2016). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresource Technology*. 218. 692-699.
- Comisión sobre el Desarrollo Sustentable. (1997 a). "Comprehensive Assessment of the Freshwater Resources of the World. Report of the SecretaryGeneral." United Nations Economics and Social Council. 170.
- Conzonno V. (2009) *Limnología Química*. 1era edición. Editorial de La Universidad Nacional de La Plata.
- Cordi, L., Almeida, S., Assalin, R., Duran, N. (2007). Intumescimento Filamentoso no Processo de Lodos Ativado Aplicado ao Tratamento de Soro de Queijo: Caracterização e Uso de Floculantes para melhorar a Sedimentabilidade. *Engenharia Ambiental-Espírito Santo do Pinhal* 4 (2), 26e37.
- Cui, Y., Wang, S., Li, J. (2009). On-line Monitoring for Phosphorus Removal Process and Bacterial Community in Sequencing Batch Reactor. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17(3), 484–492. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(08\)60235-9](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(08)60235-9).
- Cunha, S. S., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2006). Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1128(1–2), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.039>.
- Cvengros, J., Cvengrosová, Z. (2004). Used frying oils and fats and their utilization in the production of methyl esters of higher fatty acids. *Biomass Bioenergy* 27, 173–181.
- Chang, L., Woo, M. (2012). Crystallization of poly(3-hydroxybutyrate) with stereocomplexed polylactide as biodegradable nucleation agent. *Polymer Engineering and Science*. 52(7):1413-1419.
- Chawla, K. (2012). *Composite Materials*. In *Composite Materials*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74365-3>.

- Chen, Y., Shiau, J., Wei, H., Chen, M., Yu, H., Yen, Y., Hsueh, C. (2012). Feasibility study of polyhydroxyalkanoate production for materials recycling using naturally occurring pollutant degraders. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(3), 455–458. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.08.005>.
- Chen, G.-Q. (2010). *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. Berlin: Springer. ISBN 3642032885.
- Cheng, L., Sun, M. (2009). Relationship between free volume properties and structure of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) membranes via various crystallization conditions. *Polymer*, 50(22), 5298–5307. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.09.035>.
- Chuah, A., Yamada, M., Taguchi, S., Sudesh, K., Doi, Y., Numata, K. (2013). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing 5-hydroxyvalerate units: Effects of 5HV units on biodegradability, cytotoxicity, mechanical and thermal properties. *Polymer Degradation and Stability*, 98(1), 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.09.008>.
- Chua, M., Takabatake, H., Satoh, H., Mino, T. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT) and acetate concentration in influent. *WaterRes.* 37, 3602–3611.
- Dai, Y., Yuan, Z., Jack, K., Keller, J. (2007). Production of targeted poly(3-hydroxyalkanoates) copolymers by glycogen accumulating organisms using acetate as sole carbon source. *Journal of Biotechnology*, 129(3), 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.036>.
- Dalev, P., Patil, R., Mark, J., Vassileva, E., Fakirov, S. (2000). Biodegradation or chemically modified gelatin films in soil. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol 78. 1 41-1347.
- Da Silva, G., Vargas, H., Poley, H., Rodriguez, S., Baptista, B. (2005). Structural impact of hydroxyvalerate in polyhydroxyalkanoates (PHA scl) dense film monitored by XPS and photothermal methods. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(4), 790–795. <https://doi.org/10.1590/s0103-50532005000500017>.
- Darnoko, D., Cheryan, M. (2000). Kinetics of Palm Oil Transesterification in a Batch Reactor PDF created with FinePrint pdfFactory trial version <http://www.fineprint.com> PDF created with FinePrint pdfFactory trial version <http://www.fineprint.com>. 12, 1263–1267.
- Diamantis, V., Aivasidis, A. (2018). Performance of an ECSB reactor for high-rate anaerobic treatment of cheese industry wastewater: Effect of pre-acidification on process efficiency and calcium precipitation. *Water Science and Technology*, 78(9), 1893–1900. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.406>.
- Dias, J, Alvim-ferraz, C. Almeida F (2009), Production of biodiesel from acid waste lard, *Bioresource Technology*, 100, 6355-6361.
- Dias, L., Lemos, P., Serafim, S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M., Ramos, A., Oliveira, R., Reis, M. (2006). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by

- mixed aerobic cultures: From the substrate to the final product. In *Macromolecular Bioscience* (Vol. 6, Issue 11, pp. 885–906). <https://doi.org/10.1002/mabi.200600112>.
- Dias, J., Alvim-Ferraz, M., Almeida, F. (2009). Production of biodiesel from acid waste lard. *Bioresource Technology*, 100(24), 6355–6361. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.025>.
- Din, F., Ujang, Z., Van Loosdrecht, M., Ahmad, A., Sairan, F. (2006). Optimization of nitrogen and phosphorus limitation for better biodegradable plastic production and organic removal using single fed-batch mixed cultures and renewable resources. *Water Sci. Technol.* 53, 15-20.
- Dircks, K., Beun, J., Van Loosdrecht, M., Heijnen, J., Henze, M., (2001). Glycogen metabolism in aerobic mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 85-94.
- Dezotti, M. (2008). *Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos* Rio de Janeiro: Ed. E-papers, 360 p.
- Dharmalingam, S. (2014). *Biodegradation and photodegradation of polylactic acid and polylactic acid/polyhydroxyalkanoate blends nonwoven agricultural mulches in ambient soil conditions*. Doctoral Thesis.
- Dionisi, D., Carucci, G., Papini, M., Riccardi, C., Majone, M., Carrasco, F. (2005). Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Research*, 39(10), 2076–2084. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.011>.
- Dionisi, D., Majone, M., Levantesi, C., Bellani, A., Fuoco, A. (2010). Effect of Feed Length on Settability, Substrate Uptake and Storage in a Sequencing Batch Reactor Treating an Industrial Wastewater batch reactor treating an industrial. January 2015, 37–41. <https://doi.org/10.1080/09593332708618700>.
- Dobroth, Z. T., Hu, S., Coats, E. R., & McDonald, A. G. (2011). Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. *Bioresource Technology*, 102(3), 3352–3359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.053>.
- Donking, J. (1997). Bulking in aerobic biological system treating dairy processing wastewaters. *Int. J. Dairy Technol.* 50(2) 67-72.
- Duque, A. F., Oliveira, C. S. S., Carmo, I. T. D., Gouveia, A. R., Pardelha, F., Ramos, A. M., Reis, M. a. M. (2014). Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: impact on polymer composition. *New Biotechnology*, 31(4), 276–288. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.10.010>.
- Early, R. 1998. *Tecnología de los productos lácteos*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 459 p.
- Echeverri, A., Cardeño, F., Rios, A. (2011). Glycerolysis of soybean oil with crude glycerol containing residual alkaline catalysts from biodiesel production. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(4), 551–557. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1688-5>.
- Ekin, I. (2019). Quality and composition of lipids used in biodiesel production and methods

- of transesterification: A review. *International Journal of Chemistry and Technology*, 3(2), 77–91. <https://doi.org/10.32571/ijct.623165>.
- El-Mashad, H. M., Zhang, R., & Avena-Bustillos, R. J. (2008). A two-step process for biodiesel production from salmon oil. *Biosystems Engineering*, 99(2), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2007.09.029>.
- Enweremadu, C., Mbarawa, M. (2009). Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(9), 2205–2224. Doi:10.1016/J.Rser.2009.06.007
- EPA. (1999). Wastewater Technology Fact Sheet Sequencing Batch Reactors.
- Evaluación de la Gestión del Agua en Agricultura. (2007). "Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture. Water for Food, Water for Life: A Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture. London: Earthscan, and Colombo." International Water Management Institute.
- FAO. (2013). Afrontar la escasez de agua Un marco de acción para la agricultura y la seguridad alimentaria. In Informe Sobre Temas Hídricos no. 38. <http://www.fao.org/3/a-i3015s.pdf>.
- Fasce, M. (1982). "Regímenes y caudales fluviales. en: Atlas Total de la República Argentina." Centro Editor de América Latina, Buenos Aires, Argentina, vol. 24.
- Fewtrell, L. (2004). Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: A discussion. *Environmental Health Perspectives*, 112(14), 1371-1374. <http://doi.org/10.1289/ehp.7216>
- Focarete, L., Ceccorulli, G., Scandola, M., Kowalczyk, M. (1998). Further evidence of crystallinity-induced biodegradation of synthetic atactic poly(3-hydroxybutyrate) by PHB-depolymerase A from *Pseudomonas lemoignei*. Blends of atactic poly(3-hydroxybutyrate) with crystalline polyesters. *Macromolecules*. 31(24):8485- 8492.
- Fuchtenbusch, B., Fabritius, D., Steinbüchel, A. (1996). Incorporation of 2-methyl-3-hydroxybutyric acid into polyhydroxyalkanoic acids by axenic cultures in defined media. *Fems. Microbiol. Lett.* 138, 153-160.
- Furukawa, T., Sato, H., Murakami, R., Zhang, M., Duan, X., Noda, I. (2005). Structure, dispersibility, and crystallinity of poly(hydroxybutyrate)/poly(L-lactic acid) blends studied by FT-IR microspectroscopy and differential scanning calorimetry. *Macromolecules*. 38(15):6445-6454.
- Freedman, B., Pryde, H., Mounts, L. (1984). Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *JAOCS* 61(10): 1638–1643.
- Freedman, B., Pryde, H., Mounts, T. (1998). Variables affecting the yield of fatty ester from transesterified vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc.*, Vol. 65, pp. 936-938.
- Freitas, F., Temudo, M., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M. (2009). Robustness of sludge enriched with short SBR cycles for biological nutrient removal. *Bioresource Technology*, 100(6), 1969–1976. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.031>.

- Frigon, J., Breton, J., Bruneau, T., Molett, R., Guiot, R. (2009). The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale. *Bioresour Technol.*100:4156–63.
- Gall, C., Thompson, C. (2015). The impact of debris on marine life. *Marine Pollution Bulletin*, 92(1–2), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.041>.
- Gannoun, H., Khelifi, E., Bouallagui, H., Touhami, Y., Hamdi, M. (2008). "Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter." *Bioresource Technology* 99(14): 6105-6111.
- Gerardi, H. (2003). Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process. <http://doi.org/10.1002/0471216682>.
- Gerpen, J. (2009). Biodiesel: Small Scale Production and Quality Requirements. *Biofuels, Methods Mol Biol.* 2009;581:281-90. doi: 10.1007/978-1-60761-214-8\_18. PMID: 19768629.
- Gerpen, J., Shanks, B., Pruszko, R., Clements, D. & Knothe, G. (2004). Biodiesel production technology. *Natl. Renew. Energy Lab. NREL/SR-510-36244*, United States N. p. <https://doi.org/10.2172/15008801>
- Giraldo, Y., Ríos, A., Franco, A., Cardeño, F. (2009). Síntesis de aditivos para biodiesel a partir de modificaciones químicas de la glicerina. *Informacion Tecnologica*, 20(6), 75–84. <https://doi.org/10.1612/inf.tecnol.4109bit.08>.
- González & Igarzabal. (2013). Soy protein e Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. *Food Hydrocolloids*. 33. 289-296.
- Gumel, A. M., Anuar, M. S. M. & Chisti, Y. (2013). Recent advances in the production, recovery and applications of polyhydroxyalkanoates. *Journal of polymers and the environment*, 21(2), 580-605.
- Guo, Z., Chen, Z., Wen, Q., Huang, L., Bakke, R. (2016). Strategy to reduce the acclimation period for enrichment of PHA Strategy to reduce the acclimation period for enrichment of PHA accumulating cultures. September 2017. <https://doi.org/10.1080/19443994.2016.1155177>.
- Gupta, K., Gupta, C., Gupta, B., Seth, K., Bassin, K., Gupta, A. (2000). Recurrent acute respiratory tract infections in areas with high nitrate concentrations in drinking water. *Environmental health perspectives*, 108(4), 363-366.
- Gupta, S., Ako, E. (2005). Application of guar gum as a flocculant aid in food processing and potable water treatment. *European Food Research and Technology*, 221(6), 746–751. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0056-4>
- Gutiérrez, R., Encina, G., Polanco, F. (1991). Anaerobic treatment of cheese-production wastewater using a UASB reactor. *Bioresour Technol.* 37:271–6. [http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90194-O](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(91)90194-O).
- Greenpeace (2013). "Las Aguas siguen bajando turbias". Análisis sobre la calidad de aguas superficiales en la Cuenca Matanza-Riachuelo Campañas ACUMAR 2008-2012.

- Gross, R., Bhanu, K. (2002). Biodegradable Polymers for the Environment. *Science*, 297(5582), 803–807. <https://doi.org/10.1126/science.297.5582.803>.
- Hamza, A., Zaghloul, S., Iorhemen, T., Sheng, Z., Tay, H. (2019). Optimization of organics to nutrients (COD:N:P) ratio for aerobic granular sludge treating high-strength organic wastewater. *Science of the Total Environment*, 650, 3168–3179. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.026>.
- Hansen, C., Hernandez, A., Mullan, P., Moore, K., Trezona-Murray, M., King, H., Pluske, R. (2009). A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effects of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. *Animal Production Science*, 49(2), 154–161. <https://doi.org/10.1071/EA08210>.
- Harding, K., Dennis, J., Vonblotnitz, H., Harrison, S. (2007). Environmental analysis of plastic production processes: Comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid using life cycle analysis. *Journal of Biotechnology*, 130(1), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.012>.
- Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Tercera edición. Editorial Reverte, S.A. Barcelona, España.
- Hawa, A., Chua, M., Yoon, W., Nittami, T., Yeoh, K. (2019). Enrichment of PHA-accumulators for sustainable PHA production from crude glycerol. *Process Safety and Environmental Protection*, 122, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.12.002>
- He, P., Chen, L., Shao, L., Zhang, H., Lü, F. (2019). Municipal solid waste (MSW) landfill: A source of microplastics? -Evidence of microplastics in landfill leachate. *Water Research*, 159, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.060>.
- Hong, K., Sun, S., Tian, W., Chen, Q., Huang, W. (1999). A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(4), 523–526. <https://doi.org/10.1007/s002530051427>.
- Hu, Y., Sato, H., Zhang, J., Noda, I., Ozaki, Y. (2008). Crystallization behavior of poly(l-lactic acid) affected by the addition of a small amount of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer*, 49(19), 4204–4210. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.07.031>.
- Huang, L., Zhou, S., Zhang, H., Bai, S., He, X., Yang, X. (2015). Nitrogen removal characteristics of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier from oligotrophic drinking water reservoir, *Zoogloea* sp. N299. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 10038–10060. <http://doi.org/10.3390/ijms160510038>.
- Informe de la Auditoría General de la Nación, A. (1995-2005). "La problemática ambiental de la cuenca hídrica MatanzaRiachuelo. Período 1995-2005.
- Instituto Blacksmith y Cruz Verde Suiza. (2013). "The world worst 2013: the top ten toxic threats " <http://www.worstpolluted.org/docs/TopTenThreats2013.pdf> consultado noviembre 2013.

- INTA EEA Chubut. (2016). disponible en [http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-etapas\\_del\\_proceso\\_de\\_elaboracin\\_de\\_quesos.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-etapas_del_proceso_de_elaboracin_de_quesos.pdf).
- INTI. (2005). Elaboración de quesos de pasta semidura con ojos. Cuaderno tecnológico N° 3. Ing. Gauna A.
- INTI. (2017). Valorización del lacto suero.
- Irvine, R., Wilderer, P., Flemming, H., (1997). Controlled unsteady state processes and technologies: An overview. *Water Science and Technology*, 35(1), pp.1–10. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273122396008724>.
- Issariyakul, T., Kulkarni, G., Dalai, K., Bakhshi, N. (2007). Production of biodiesel from waste fryer grease using mixed methanol/ethanol system. *Fuel Processing Technology*, 88(5), 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2006.04.007>.
- Iwata, T. (2015). Biodegradable and bio-based polymers: Future prospects of eco-friendly plastics. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(11), 3210–3215. <https://doi.org/10.1002/anie.201410770>.
- Janczukowicz, W., Zielinski, M. Debowski, M., (2008). Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. *Bioresour. Technol.* 99 (10), 4199-4205.
- Jarute, G., Kainz, A., Schroll, G., Baena, R., Lendl, B. (2004). On-line determination of the intracellular poly( $\gamma$ -hydroxybutyric acid) content in transformed *Escherichia coli* and glucose during PHB production using stopped-flow attenuated total reflection FT-IR spectrometry. *Anal. Chem.* 76, 6353–6358.
- Jenkins, K., Richard, G., Daigger, T. (1993). *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*, 2nd ed. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Jensen, B., Darby, L., Seidel, C., Gorman, C. (2012). Drinking Water Treatment for Nitrate. Technical Report 6. Addressing Nitrate in California's Drinking Water with a Focus on Tulare Lake Basin and Salinas Valley Groundwater. Report for the State Water Resources Control Board Report to the Legislature. Recuperado a partir de <http://groundwaternitrate.ucdavis.edu>
- Johnson, K., Jiang, Y., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Van Loosdrecht, M. (2009). Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromolecules*, 10(4), 670–676. <https://doi.org/10.1021/bm8013796>.
- Juliano, P.; Muset, G.; Castells, M. Valorización del lactosuero. (2017). San Martín: Instituto Nacional de Tecnología Industrial, pág. 96. ISBN 978-950-532-341-8.
- Kalam, A., Masjuki, H., Jayed, H., Liaquat, A. M. (2011). Emission and performance characteristics of an indirect ignition diesel engine fuelled with waste cooking oil. *Energy*, 36(1), 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2010.10.026>.
- Kanade, P., Bhattacharya, S. (2016). *A Guide to Filtration with String Wound Cartridges Influence of Winding Parameters on Filtration Behaviour of String Wound Filter Cartridges*. Elsevier Science, Boston A. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804847->

4/00009-1.

- Kansiz, M., Billman, H., McNughton, D. (2000). Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly (  $\beta$  -hydroxybutyrate ) in a Recombinant Escherichia coli Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly (  $\beta$  -hydroxybutyrate ). *Journal of Applied Microbiology*, 88(4), 666-672. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3415-3420.2000>. Updated.
- Karpati, I., Bencze, L., Borszerki, J. (1995). New process for physicochemical pretreatment of dairy effluents with agricultural use of sludge produced. *Water Science and Technology*, 22(9):93–100.
- Kennedy J., Meullenet, F. (2005). Book review. *Carbohydrate Polymers*, 59(2), 265–265. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.07.013>.
- Koh, M., Tinia, I. (2011). A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 15, Issue 5, pp. 2240–2251). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.02.013>.
- Kolev, A. (2017). General Characteristics and Treatment Possibilities of Dairy Wastewater – A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 53(2), 237–242.
- Koltzenburg, S., Maskos, M., Nuyken, O. (2017). *Polymer Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-49279-6>.
- Koller, M., Hesse, P., Bona, R., Kutschera, C., Atlić, A., Braunegg, G., 2007. Biosynthesis of high quality polyhydroxyalkanoate co- and terpolyesters for potential medical application by the archaeon *Haloferax mediterranei*. *Macromol. Symp.* 253, 33–39.
- Koller, M., Salerno, A., Muhr, A., Reiterer, A., Chiellini, E., Casella, S., Horvat, P., Braunegg, G. (2012). Whey Lactose as a Raw Material for Microbial Production of Biodegradable Polyesters. In *Polyester*. InTech. <https://doi.org/10.5772/48737>
- Khemani K, Schmidt H, Hodson SK. (2007). Biodegradable films and sheets suitable for use as coatings, wraps and packaging materials. Google Patents.
- Knopp, M., Löbmann, K., Elder, P., Rades, T., Holm, R. (2016). Recent advances and potential applications of modulated differential scanning calorimetry (mDSC) in drug development. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.024>.
- Knothe, G., Gerpen, J. (2005). *The Biodiesel Handbook* Editors.
- Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M. C. (2007). Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.05.001>.
- Krawczyk, T. (1996). Biodiesel . *INFORM* 7(8): 801-822.
- Krissansen, G. W. (2007). Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *Journal of the American College of Nutrition*, 26, 713-723S.

- Kumar, P., Ray, S., Patel, S.K.S., Lee, J.K., Kalia, V.C., (2015). Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions. *Int. J. Biol. Macromol.* 78, 9–16.
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., y Stepnowski, P. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 8(5), 1567-1636.
- Kulkarni, O., Kanekar, P., Jog, P., Patil, P., Nilegaonkar, S., Sarnaik, S., Kshirsagar, P. R. (2011). Characterisation of copolymer, poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) produced by *Halomonas campisalis* (MCM B-1027), its biodegradability and potential application. *Bioresource Technology*, 102(11), 6625–6628. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.054>.
- Lamarra, J., Giannuzzi, L., Rivero, S., Pinotti, A. (2017). Assembly of chitosan support matrix with gallic acid-functionalized nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C.*, 79, 848- 859.
- Lamarque, A., Maestri, D., Labuckas, D., Zygadlo, J. Torres, M. (2008). *Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica*. Córdoba, Argentina: Encuentro Grupo Editor. Recuperado de <http://bit.ly/2EtJ6ob>.
- Lang, X., Dalai, A., Bakhshi, N., Reaney, M., Hertz, P. (2011). Preparation and characterization of biodiesels from various bio-oils, *Bioresource technology* 80, 53-52.
- Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., Lant, P. (2014). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, 39(2), 397–442. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.06.008>.
- Lawson, H. (1994) *Aceites y grasas alimentarios -Tecnología, utilización y nutrición*. Zaragoza: Editorial Acribia. p. 333 pp..
- Leduc, S., Natarajan, K., Dotzauer, E., McCallum, I., Obersteiner, M. (2009). Optimizing biodiesel production in India. *Appl Energy*; 86(S1):S125–31.
- Lee, S., Basu, S., Tyler, C., Wei, W. (2004). Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island Treatment Plant. *Advances in Environmental Research*, 8(3–4), 371–378. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(02\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(02)00118-1).
- Lin, L., Ying, D., Chaitep, S., & Vittayapadung, S. (2009). Biodiesel production from crude rice bran oil and properties as fuel. *Applied Energy*, 86(5), 681-688. DOI: 10.1016/j.apenergy.2008.06.002.
- Lipatov, S., Alekseeva, T. (2007). Phase-separated interpenetrating polymer networks. In *Phase-Separated Interpenetrating Polymer Networks* (pp. 1-227). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Liu, W. H., Ding, B., Ruan, X. M., Xu, H. T., Yang, J., & Liu, S. M. (2007). Analysis of free and conjugated phytosterols in tobacco by an improved method using gas chromatography-flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 1163(1–2), 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.043>.
- Liu, Y., Hall, V., Darby, L., Coats, R., Green, G., Thompson, E., Loge, J. (2008). Production

of polyhydroxyalkanoate during treatment of tomato cannery wastewater. *Water Environ. Res.* 80, 367–372.

- López, F., Jiménez, C. (2015). Películas biopoliméricas: Aplicaciones para envases y otros productos. En Ramírez-Ortiz, M.E. (Ed.). *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*. Barcelona, España: OmniaScience. 9-36.
- Loureiro, N., Esteves, J., Viana, J., Ghosh, S. (2015). Mechanical characterization of polyhydroxyalkanoate and poly(lactic acid) blends. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 28(2), 195–213. <https://doi.org/10.1177/0892705712475020>.
- Ludueña, L., Vázquez, A., Alvarez, V. (2012). Effect of lignocellulosic filler type and content on the behavior of polycaprolactone based eco-composites for packaging applications. *Carbohydr. Polym.* 87, 411-421.
- Luengo, M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., Olivera, L.. (2003) Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiol* 6: 251–260.
- Luque, R., Budarin, V., Clark, H., Macquarrie, J. (2008a). Glycerol transformations on polysaccharide derived mesoporous materials. *Applied Catalysis B: Environmental*, 82(3–4), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2008.01.015>.
- Luque, R., Herrero-Davila, L., Campelo, J., Clark, J., Hidalgo, M., Luna, D., Marinas, M., Romero, A. (2008b). Biofuels: A technological perspective. *Energy and Environmental Science*, 1(5), 542–564. <https://doi.org/10.1039/b807094f>.
- Lütke-Eversloh, T., Bergander, K., Luftmann, H., Steinbüchel, A. (2001). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptoputyrate) as a sulfur analogue to poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). *Biomacromolecules*, 2(3), 1061–1065. <https://doi.org/10.1021/bm015564p>
- Ma, F., Hanna, A. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology* 70 1815.
- Malagón M, López S, Martínez A. (2017). Síntesis De Bioplásticos a Partir De Microorganismos. *América Semilleros Formación Investigativa*, 3(1), 127–135. <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6446/1/COL0046961-2017-1-IQ.pdf>.
- Mali, S., Grossmann, M., García, M., Martino, M., y Zaritzky, N. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50, 379-386.
- Malpartida, R. (2002). "La cuenca del río Matanza Riachuelo. ." Universidad Tecnológica Nacional, Argentina.
- Marangoni, C., Furigo, A., Aragão, F. (2002). Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. *Process Biochemistry*, 38(2), 137–141. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00313-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00313-2).
- Marchetti, M., Errazu, F. (2007). Transformación de ácido oleico en ésteres utilizando diferentes catalizadores en presencia de triglicéridos. *A&G Tomo XVII. Vol 1*. 122-127.

- Martucci & Ruseckaite. (2009). Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. *Polymer degradation and Stability*. 94. 1307-3113.
- Magrama. (2003). Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. Manual de interpretación y elaboración de informes, 133. Recuperado a partir de [http://www.magrama.gob.es/ca/agua/publicaciones/03\\_Manual\\_Directiva\\_91\\_271\\_CEE\\_tcm8-28959.pdf](http://www.magrama.gob.es/ca/agua/publicaciones/03_Manual_Directiva_91_271_CEE_tcm8-28959.pdf).
- Martínez-Sanz, M., Villano, M., Oliveira, C., Albuquerque, M. G., Majone, M., Reis, M. & Lagaron, J. M. (2014). Characterization of polyhydroxyalkanoates 46 synthesized from microbial mixed cultures and of their nanobiocomposites with bacterial cellulose nanowhiskers. *New biotechnology*, 31(4), 364-376.
- Martins, P.; Pagilla, K.; Heijnen, J.; van Loosdrecht, M. (2003). Effect of dissolved oxygen concentration on sludge settleability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 586–593.
- Matthys, D. (2003). Producing Biodiesel A Simple Affair? A Practical Guide To Read Before Building Your Plant. Ghent, Bélgica: American Soybean Association. 23 pp.
- Meher, L. C., Vidya Sagar, D., & Naik, S. N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 10, Issue 3, pp. 248–268). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>.
- Melo J. 2006. Producción de biodiesel, A&G 62 Tomo XIV. Vol 1, 64-68.
- Meneses, J., Corrales, C., Valencia, M. (2007). Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Revista EIA*, ISSN 1794-1237 Número 8, p. 57-67.
- Mengmeng, C., Hong, C., Qingliang, Z., Shirley, S. N., Jie, R. (2009). Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation. *Bioresource Technology*, 100(3), 1399–1405. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.014>.
- Metcalf & Eddy (1995). Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Tercera edición. McGraw-Hill, New York.
- Mittelbach, M., Remschmidt, C. (2004). Biodiesel, the Comprehensive Handbook. Boersedruck Ges.m.b.H. Viena.
- Mohamad Fauzi, H., Chua, M., Yoon, W., Nittami, T., Yeoh, K. (2019). Enrichment of PHA-accumulators for sustainable PHA production from crude glycerol. *Process Safety and Environmental Protection*, 122, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.12.002>.
- Mohd, F., Mohanadoss, P., Ujang, Z., van Loosdrecht, M., Yunus, S. M., Chelliapan, S., Zambare, V., Olsson, G. (2012). Development of Bio-PORec® system for polyhydroxyalkanoates (PHA) production and its storage in mixed cultures of palm oil mill effluent (POME). *Bioresource Technology*, 124, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.036>.
- Moralejo-Garate, H., Martusalihat, E., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M. (2011). Microbial community engineering for biopolymer production from glycerol. *Applied*

microbiology and biotechnology, 92(3), pp.631–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674168>.

- Moralejo-Gárate, H., Kleerebezem, R., Mosquera-Corral, A., Van Loosdrecht, M. C. M. (2013). Impact of oxygen limitation on glycerol-based biopolymer production by bacterial enrichments. *Water Research*, 47(3), 1209–1217. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.039>.
- Morgan-Sagastume, F., Karlsson, A., Johansson, P., Pratt, S., Boon, N., Lant, P., Werker, A. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates in open, mixed cultures from a waste sludge stream containing high levels of soluble organics, nitrogen and phosphorus. *Water Research*, 44(18), 5196–5211. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.043>.
- Moser, B. R. (2009). Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 45(3), 229–266. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9204-z>.
- Mota, A., Silva, D., Gonçalves, C. (2009). Glycerochemistry: New Products and Processes from Glycerin of Biodiesel Production. *Quimica Nova*, 32(3), 639–648. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000300008>.
- Munir, S., Iqbal, S., Jamil, N. (2015). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using paper mill wastewater as carbon source in comparison with glucose. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9(Special Edition 1), 453–460.
- McNAIR, M., MILLER J. (1997). *Basic Gas Chromatography*, ed. I. JOHN WILEY & SONS.
- Nadais, H., Capela, I., Arroja, M., Hung, T. (2010). Anaerobic treatment of milk processing wastewater. *Handbook of Environmental. Engineering*, 555-559.
- Noda I, Lindsey S, Caraway D. (2010). Nodax™ Class PHA Copolymers: Their Properties and Applications. *Plastics from Bacteria*:237-55.
- Noureddini, H., Zhu, D. (1997). Kinetics of tranesterification of soybean oil. *Biocatalysis articles. JOCS* 74. 1459-1463.
- Ni C, Luo R, Xu K, Chen G-Q. Thermal and Crystallinity Property Studies of Poly (L- Lactic Acid) Blended with Oligomers of 3-Hydroxybutyrate or Dendrimers of Hvdroxyalkanoic Acids. (2009). *Journal of Applied Polymer Science*.111(4):1720- 1727.
- OCLA (Observatorio de la cadena lactea Argentina). (2018). *Produccion de leche; Argentina 2018*.
- Organización Mundial de la Salud. (2003). *Informe de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo: Agua para todos, agua para la vida* (2003). París, Nueva York y Oxford, UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura) y Berghahn Books.
- Organización Mundial de la Salud. y Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. (2000). *Informe "Global Water Supply and Sanitation Assessment Report. Geneva and New York, World Health Organization and United Nations Children`s Fund"* Disponible en: <http://www.unicef.org/wash/files/gafull.pdf> Consultado Noviembre 2013

- Orhon, D. y Artan, N. (1994). "Modelling of activated sludge systems." Technomic Publishing Company, INC. Lancaster, USA 2da Edición.
- Orozco, A (2005). Bioingeniería de aguas residuales. Teoría y diseño.
- Orozco, C., Pérez, A., González, M., Rodríguez, F., Alfayate, J. (2002). "Contaminación ambiental. Una visión desde la química." Internacional Thomson Editores Spain Paraninfo S.A., España.
- Papadakis, N., Veranis, N., Arvanitidis, N. (2007). Sustainable development of natural resources in Northern Greece, focusing on water supply reliability and public health protection. *Desalination*, 213(1-3), pp.199–204.
- Papageorgiou, A., Barton, R., Karagiannidis, A. (2009). Assessment of the greenhouse effect impact of technologies used for energy recovery from municipal waste: A case for England. *Journal of environmental management* 90, 2999-3012.
- Pascault, P., Sautereau, H., Verdu, J., Williams, R. (2002). *Thermosetting Polymers*. Boca Raton: CRC Press, <https://doi.org/10.1201/9780203908402>
- Pittmann, T., Steinmetz, H. (2017). Polyhydroxyalkanoate production on waste water treatment plants: Process scheme, operating conditions and potential analysis for german and european municipal waste water treatment plants. *Bioengineering*, 4(2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020054>.
- Posada, A., Naranjo, M., López, A., Higuera, C., Cardona, A. (2011). Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*, 46(1), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.003>.
- Pratt, S., Werker, A., Morgan-Sagastume, F., Lant, P. (2012). Microaerophilic conditions support elevated mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) yields, but result in decreased PHA production rates. *Water Science and Technology*, 65(2), 243–246. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.086>.
- Prazeres, A., Carvalho, F., Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- Predojević, J. (2008). The production of biodiesel from waste frying oils: A comparison of different purification steps. *Fuel*, 87(17–18), 3522–3528. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2008.07.003>.
- Prieto, A., de Eugenio, I., Galán, B., Luengo, M. Witholt, B. (2007) Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. En: *Pseudomonas: a Model System in Biology*. Pseudomonas, vol. V. Eds: J. L. Ramos y A. Filloux. Springer. pp. 397-428.
- Plan de Gestión Ambiental. (1995). "Informe de la Auditoria General de la Nación. Anexo F. Argentina".
- Plastics – the Facts. (2019).
- Puig, S., Corominas, L., Balaguer, D., Colprim, J. (2005). Development and implementation

- of a real-time control system for nitrogen removal using OUR and ORP as endpoints. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44 (9), 3367-3373.
- Ranalli, G., Andreoni, V., Bonfanti, P., Corradini, S., Sordini, C. (1995). Anaerobic digestion of cheese whey in a two stage reactor. *American Society of Agricultural Engineers*. Vol. 7, pp. 347-356.
- Ramadhani, S., Jayaraj, S., Muraleedharan, C., (2005). Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. *Fuel* 84, 335– 340.
- Ramallo, R. (1993). *Tratamiento de aguas residuales*. Reverté S.A. Barcelona, España.
- Ramchandran, L., Vasiljevic, T. (2012). *Whey Processing in Membrane Processing: Dairy and Beverage Applications*. (ed A. Y. Tamime), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. DEC, doi: 10.1002/9781118457009.ch92013: 193-207. 14.
- Rashid, U., Anwar, F. (2008). Production of biodiesel through optimized alkaline-catalyzed transesterification of rapeseed oil. *Fuel*, 87(3), 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2007.05.003>.
- Ravve, A. (2012). *Principles of Polymer Chemistry*. In *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 76, Issue 10). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2212-9>.
- Refaat, A. (2010). Different techniques for the production of biodiesel from waste vegetable oil. *INT. J. Environ.Sci. Tech.*, 7(1), 183–213.
- Reglamento Técnico Centroamericano: Biocombustibles. Biodiesel (B100) y sus mezclas con aceite combustible diesel. Especificaciones. RTCA 75.02.43:07 Anexo a la resolución N° 198-2007 (comieco-XLIV).
- Rehm, H. (2008) *En: Microbial production of biopolymers and polymer precursors. Applications and perspectives*. Caister Academic Press Book Systems Plus.
- Richard, M.; Brown, S.; Collins, F. (2003). Activated sludge microbiology problems and their control. In *Proceedings of the 20th Annual USEPA National Operator Trainers Conference*, Buffalo, NY, USA.
- Rivas, J., Prazeres, R., Carvalho, F., Beltrán, F. (2010). Treatment of cheese whey wastewater: Combined Coagulation - Flocculation and aerobic biodegradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 7871–7877. <https://doi.org/10.1021/jf100602j>
- Rivero, S., García, M.A., Pinotti, A. (2013). Physical and chemical treatments on chitosan matrix to modify film properties and kinetics of biodegradation. *J. Mater. Physics Chem.* 1(3), 51-57.
- Rivero, S., Damonte, L., García, M. A., y Pinotti, A. (2016). An insight into the role of glycerol in chitosan films. *Food Biophysics*, 11(2), 117-127. Rivero,
- Rivero, S., Lecot, J., Pinotti, A. (2017). Impregnation of kraft paper support with polylactic acid multilayers. *Adv. Mater. Lett.* 8(6), 741-751.

- Rocca-Smith, R., Chau, N., Champion, D., Brachais, H., Marcuzzo, E., Sensidoni, A., Piasente, F., Karbowski, T., Debeaufort, F. (2017). Effect of the state of water and relative humidity on ageing of PLA films. *Food Chem.* 236, 109-119.
- Rodriguez, L., Orrego, C. (2016). Aplicaciones de mezclas de biopolímeros y polímeros sintéticos: revisión bibliográfica. *Revista Científica*, VI 2. doi.10.14483/udistrital.jour.RC2016.25.a.9.
- Ronco, A., Peluso, L., Jurado, M., Bulus Rossini, G., Salibian, A. (2008). "Screening of Sediment Pollution in Tributaries from the Southwestern Coast of the Río de la Plata Estuary." *Latin American journal of sedimentology and basin analysis* 15: 67-75.
- Rosenwinkel, H., Austermann-Haun, U., Meyer, H. (1999). Industrial wastewater sources and treatment strategies. Dairy industry. In: Rehm HJ, Reed G, Pühler A, Stadler P, editors. *Environmental processes I*, vol. 11a. Biotechnology. Weinheim, Germany: Wiley. pp. 208–9.
- Ross P., Morales-Caselles C. (2015). Learned Discourses: Timely scientific opinions. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 11(4), 519–519. <https://doi.org/10.1002/ieam.1711>.
- Rhu, H., Lee, H., Kim, Y., Choi, E. (2003). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste. *Water Science and Technology*. Vol 48. N° 8 PP 221-228.
- Ruth, K., Roo, G. De, Egli, T., Ren, Q. (2008). Identification of Two Acyl-CoA Synthetases from *Pseudomonas putida* GPo1: One is Located at the Surface of Polyhydroxyalkanoates Granules. 1652–1659. <https://doi.org/10.1021/bm8001655>.
- RSA-CONICET. (2019). Evaluación de riesgos de quesos artesanales elaborados con leche caprina.
- Sabokbar, N., Khodaiyan, F. (2015). Characterization of pomegranate juice and whey based novel beverage fermented by kefir grains. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3711–3718. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1412-9>
- Sajjadi B, Raman A, Arandiyani H. (2014). A comprehensive review on properties of edible and non-edible vegetable oil-based biodiesel: Composition, specifications and prediction models. *Renewable and Sustainable Energy reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.05.035>.
- Sathiyarayanan, G., Bhatia, K., Song, S., Jeon, M., Kim, J., Lee, K., Kim, G., Yang, Y. H. (2017). Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer from Arctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. PAMC 28620. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 710–720. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.053>.
- Satoh, H., Iwamoto, Y., Mino, T., Matsuo, T. (1998), *Water Sci Technol* 38:103–109
- Secretaría de Ambiente y Desarrollo sustentable. (2020). Recuperación y valorización de lacto suero en PYMES de la cuenca láctea Argentina, a través de la asociación público-privada.

- Serafim, S., Lemos, C., Levantesi, C., Tandoi, V., Santos, H., Reis, M. (2002). Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 51, 1–18.
- Serafim, S., Lemos, C., Oliveira, C., Reis, M. (2004). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 87, 145e160.
- Serafim, S., Lemos, C., Albuquerque, E., Reis, M. (2008). Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 81, Issue 4, pp. 615–628). <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1757-y>.
- Serra, E., Toschi, O., Anvaría, O., Altieri, A., Orlando, M. y Bazán, M. (1994). "Río de La Plata. Calidad de Aguas Franja Costera Sur." OSN-AGOSBA-SIHN, Argentina.
- Seviour., J., Blackall, L. (1999). *The Microbiology of Activated Sludge*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands; pp219~220.
- Singh, B., Sharma, N. (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. 93. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008>.
- Singh, P., Singh, D. (2010). Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (1): p. 200-216.
- Silva, G., Mack, M., Contiero, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>.
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., Rosa, M. D. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19(12), 634–643. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.003>.
- Sivan, A. (2011) New perspectives in plastic biodegradation. *Curr Opin Biotechnol* 22: 422
- Schmidell W., Soares H., Etchebehere C., Menes J., Bertola N., Contreras., E. (2007) Tratamento biológico de águas residuárias. Editora Tribo da Ilha. Florianópolis-SC. Brasil.
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., and Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol Adv* 26: 246–265.
- Shahidi, F. (2005). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products Edible Oil and Fat Products: Processing Technologies*, Volume 5, 6th Edition John Wiley & Sons.
- Sharma, C., Singh, B., Upadhyay, N. (2008). Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel*, 87(12), 2355–2373. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2008.01.014>.
- Skoog, A., Holler, F., Stanley, R. (2008). *Principios de analisis instrumental*. Editorial: Paraninfo. Thomson Learning.

- Smithers, W. (2015). Whey-ing up the options - Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011>
- Spierling, S., Röttger, C., Venkatachalam, V., Mudersbach, M., Herrmann, C., Endres, J. (2018). Bio-based Plastics - A Building Block for the Circular Economy? *Procedia CIRP*, 69, 573–578. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2017.11.017>.
- Steinbüchel, A. (2001). Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromolecular Bioscience*, 1(1), 1–24. [https://doi.org/10.1002/1616-5195\(200101\)1:1<1::AID-MABI1>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1616-5195(200101)1:1<1::AID-MABI1>3.0.CO;2-B).
- Talebian-Kiakalaieh, A., Amin, S., Mazaheri, H. (2013). A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. *Applied Energy*, 104, 683–710. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.11.061>.
- Tan, G., Chen, C., Li, L., Wang, L., Razaad, N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., Wang, J. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. 706–754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>.
- Tomasevic V., Marinkovic S. (2003). «Methanolysis of used frying oils». *Fuel Process Technology* 81: 1–6.
- Third, K. (2003). Oxygen Management for Optimisation of Nitrogen Removal in a Sequencing Batch Reactor Katie Third, (January), 222.
- Thellen, C., Coyne, M., Froio, D., Auerbach, M., Wirsén, C., Ratto, A. (2008). A processing, characterization and marine biodegradation study of melt-extruded polyhydroxyalkanoate (PHA) films. *Journal of Polymers and the Environment*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10924-008-0079-6>.
- Thompson, J. C., & He, B. B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture*, 22(2), 261–265.
- Tsuge, T. (2002). Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6), 579–584. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80198-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80198-0).
- Urtasun, N., Baieli, F., Hirsch, B., Miranda, V., Cascone, O. (2018). Challenges in dairy whey protein purification; Nova Science Publishers; 2018, 1-18
- Uzum, B., Kiliç, M., Özbay, N., Pütün, A., Pütün, E. (2012). Biodiesel production from waste frying oils: Optimization of reaction parameters and determination of fuel properties. *Energy* 44, 347-351.
- Valerio, O., Horvath, T., Pond, C., Misra, M., Mohanty, A., (2015). Improved utilization of crude glycerol from biodiesel industries: synthesis and characterization of sustainable biobased polyesters. *Ind. Crops Prod.* 78, 141–147.
- Valero-Valdivieso, F., Ortigón, Y., Uscategui, Y. (2013). Biopolímeros: Avances y perspectivas. *DYNA (Colombia)*, 80(181), 171–180.

- Venkateswar Reddy, M., Nikhil, G. N., Venkata Mohan, S., Swamy, Y. V., & Sarma, P. N. (2012). *Pseudomonas otitidis* as a potential biocatalyst for polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis using synthetic wastewater and acidogenic effluents. *Bioresource Technology*, 123, 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.077>.
- Venkata Mohan, S., Venkateswar Reddy, M., Venkata Subhash, G., Sarma, N. (2010). Fermentative effluents from hydrogen producing bioreactor as substrate for poly( $\beta$ -OH) butyrate production with simultaneous treatment: An integrated approach. *Bioresource Technology*, 101(23), 9382–9386. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.109>.
- Villarruel, S., Giannuzzi, L., Rivero, S., Pinotti, A. Changes induced by UV radiation in the presence of sodium benzoate in films formulated with polyvinyl alcohol and carboxymethyl cellulose. (2015). *Mater. Sci. Eng. C*. 56, 545-554.
- Vives, T., Balaguer, D., García, S., García, R., Colprim, J. (2003). Textile dyeing wastewater treatment in a sequencing batch reactor system. *Journal of Environmental science and health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* A38(10), 2089-2099.
- Vogel, C., Siesler, W. (2008). Thermal degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone), poly(L-lactic acid) and their blends with poly(3-hydroxy-butyrate) studied by TGA/FT-IR spectroscopy. *Macromolecular Symposia*. 265:183-194.
- Volova, G., Shishatskaya, I., Nikolaeva, D., Sinskey, J. (2014). In vivo study of 2D PHA matrices of different chemical compositions: tissue reactions and biodegradations. 30(5), 549–557. <https://doi.org/10.1179/1743284713Y.0000000470>.
- Waltz, E. (2008). Do biomaterials really mean business. *Nature Biotechnology*, 26(8), 851–853. <https://doi.org/10.1038/nbt0808-851>.
- Wanner, J. (1994). Activated sludge population dynamics. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 30 No 11 pp. 159-169.
- Wang, Y., Chen, R., Cai, J. Y., Liu, Z., Zheng, Y., Wang, H., Li, Q., He, N. (2013). Biosynthesis and Thermal Properties of PHBV Produced from Levulinic Acid by *Ralstonia eutropha*. *PLoS ONE*, 8(4), 4–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060318>.
- Water, W. C. o. (1999). "World's Rivers in Crisis Some are Dying; Others Couldie. World Water Council." World Commision on Water.
- Wentzel, C. (1990) "Phosphorous removal from sewage in activated sludge systems". Seminar of Association of Water Treatment Personnel. Western Cape Group.
- Wilén, B.M.; Balmer, P. (2000).The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Water Res.* 33, 391–400.
- Wolfe, H., Patz, J. (2002). Reactive Nitrogen and Human Health: Acute and Long term Implications. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(2), 120-125. <http://doi.org/10.1579/0044-7447-31.2.120>
- Wu, X., Leung, C. (2011). Optimization of biodiesel production from camelina oil using

- orthogonal experiment. *Appl Energy*; 88:3615–24.
- WWAP (World Water Assessment Programme). (2012). *World Water Development Report Volume 4: Managing Water under Uncertainty and Risk (Vol. 1)*. <https://doi.org/10.1608/FRJ-3.1.2>.
- Yang, F., Hanna, A., Sun, R. (2012). Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 1–10.
- Yang, F., Wang, S., Li, H., Wang, G., Wang, Y., Yang, J., Chen, Y., Yan, P., Guo, J., Fang, F. (2023). Differences in responses of activated sludge to nutrients-poor wastewater: Function, stability, and microbial community. *Chemical Engineering Journal*, 457(August 2022). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.141247>.
- Yin, C. (2012). Microwave-assisted pyrolysis of biomass for liquid biofuels production. *Bioresource Technology*, 120, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.016>
- Zanette, A., Barrella, R., Pergher, S., Treichel, H., Mazutti, M., Silva, E., Oliveira, J., Oliveira, D. (2011). Screening, optimization and kinetics of *Jatropha curcas* oil transesterification with heterogeneous catalysts. *Renewable energy* 36, 726-731.
- Zang Y, Dube A, McLean D, Kates M. (2003). Biodiesel production from waste cooking oil: Process desing and technological assessment. *Bioresource Technology* 89, 1-16.
- Zhang, M., Thomas, L. (2011). Blending polylactic acid with polyhydroxybutyrate: The effect on thermal, mechanical, and biodegradation properties. *Advances in Polymer Technology*, 30(2), 67–79. <https://doi.org/10.1002/adv.20235>.
- Zhang, L., Xiong, C., Deng, X. (1996). Miscibility, crystallization and morphology of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)/poly(d,l-lactide) blends. *Polymer*. 37(2):235-241.
- Zhu, C., Chiu, S., Nakas, J. P., Nomura, C. T. (2013). Bioplastics from waste glycerol derived from biodiesel industry. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/app.39157>.