

**UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ
CARRIÓN**



**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALÚRGICA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
QUÍMICO**

**APLICACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR
SOLVENTES PARA OBTENER POLIHIDROXIALCANOATOS
(PHAS) EN LA EMPRESA AGRO INDUSTRIAL PARAMONGA
S.A.A.**

AUTOR

GRADOS DÍAZ, JULIO GERARDO

ASESOR

Ing. IMAN MENDOZA, JAIME

HUACHO, PERÚ

2020

**APLICACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR
SOLVENTES PARA OBTENER POLIHIDROXIALCANOATOS
(PHAS) EN LA EMPRESA AGRO INDUSTRIAL PARAMONGA
S.A.A.**

DEDICATORIA

Dedicado a todas las personas que lograron que el desarrollo de la tesis sea posible, a todas las personas que estuvieron presente en mi desarrollo personal, a todas las personas presentes en mi desarrollo profesional y a todas las personas que me hicieron sentir que no estoy solo e hicieron de mi mundo más feliz.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por haberme guiado y enseñado que a pesar de todo siempre habrá un camino feliz.

A mis familiares que en ningún momento me dejaron solo, siempre apoyándome, alentándome a seguir y a no rendirme que a pesar de todo el tiempo siempre enseña.

A mis amigos de la escuela y la universidad por el apoyo constante de sobresalir y vivir siempre un paso adelante.

A mis amigos del trabajo por ayudarme en todo momento, no solo laboralmente sino también personalmente, a las risas incesantes, a las noches de películas de anti – estrés y a las conversaciones profundas sobre temas muy importantes para mí.

A la empresa Agro Industrial Paramonga S.A.A. por la oportunidad de desarrollarme profesionalmente en industrias.

INDICE

1	<u>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	12
1.1	DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA	12
1.2	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	13
1.2.1	PROBLEMA GENERAL	13
1.2.2	PROBLEMA ESPECÍFICOS	13
1.3	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	13
1.3.1	OBJETIVO GENERAL	13
1.3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	13
1.4	JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	14
1.5	DELIMITACIÓN DEL ESTUDIO	14
1.5.1	DELIMITACIÓN DE ENFOQUE	14
1.5.2	DELIMITACIÓN DE OBJETO DE ESTUDIO	14
1.5.3	DELIMITACIÓN ESPACIAL	14
1.5.4	DELIMITACIÓN TEMPORAL	14
1.6	VIABILIDAD DEL ESTUDIO	15
1.6.1	VIABILIDAD TÉCNICA	15
1.6.2	VIABILIDAD ECONÓMICA	15
1.6.3	VIABILIDAD AMBIENTAL	15
2	<u>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</u>	16
2.1	ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	16
2.1.1	INVESTIGACIONES INTERNACIONALES	16
2.1.2	INVESTIGACIONES NACIONALES	17
2.2	BASES TEÓRICOS	18
2.2.1	POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS)	18
2.3	DEFINICIONES CONCEPTUALES (DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS)	24
2.4	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	29
3	<u>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</u>	30

3.1	DISEÑO METODOLÓGICO	30
3.1.1	TIPO DE INVESTIGACIÓN	30
3.1.2	NIVEL DE INVESTIGACIÓN	30
3.1.3	DISEÑO	30
3.1.4	ENFOQUE	30
3.2	POBLACIÓN Y MUESTRA	30
3.2.1	POBLACIÓN	30
3.2.2	MUESTRA	30
3.3	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	30
3.3.1	TÉCNICAS A EMPLEAR	30
3.3.2	DESCRIPCIÓN DE LOS INSTRUMENTOS	30
3.4	TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN	30
4	<u>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</u>	<u>31</u>
4.1	MÉTODO DE OBTENCIÓN DE RESULTADOS	31
4.1.1	REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS	31
4.1.2	EXTRACCIÓN DE PHAS	31
4.2	ANÁLISIS DE RESULTADOS	33
4.2.1	CLASIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS A EVALUAR	33
4.2.2	RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE EXTRACCIÓN	34
5	<u>CAPÍTULO V: DISCUSION</u>	<u>36</u>
5.1	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
5.1.1	SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS ACUMULADORES DE PHAS	36
5.1.2	CONDICIONES AMBIENTALES DE DESARROLLO	36
5.1.3	EQUIPOS PARA EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOLVENTES	37
5.1.4	MATERIALES Y REACTIVOS PARA EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOLVENTES	37
5.1.5	CANTIDAD DE REACTIVOS PARA EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOLVENTES	37
5.1.6	PROCEDIMIENTO ADECUADO PARA DESARROLLAR EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOLVENTES	38

5.1.7	RENDIMIENTO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOLVENTES	39
5.1.8	DIFERENCIAS DE RESULTADOS BAJO EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOLVENTES	39
6	<u>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</u>	40
6.1	CONCLUSIONES	40
6.2	RECOMENDACIÓN	41
7	<u>CAPÍTULO VII: REFERENCIAS</u>	42
7.1	FUENTES BIBLIOGRÁFICAS	42
8	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	42
	<u>ANEXOS</u>	44
8.1	MATRIZ DE CONSISTENCIA	45

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 1 Cuadro de resumen de experimentos</i>	35
<i>Ilustración 2 Muestras de PHA</i>	47
<i>Ilustración 3 Muestra de PHA</i>	48
<i>Ilustración 4 Tubos de centrífuga</i>	49
<i>Ilustración 5 Pesaje de tubos centrífuga</i>	50
<i>Ilustración 6 Toma de muestra de 10 ml de cultivo de PHA</i>	51
<i>Ilustración 7 Toma de muestra de 10 ml de cultivo de PHA</i>	52
<i>Ilustración 8 Tubos de centrífuga con muestra de 10 ml de cultivo de PHA</i>	53
<i>Ilustración 9 Primera centrifugación del proceso para separar pellets de sobrenadante</i>	54
<i>Ilustración 10 Tubo de centrífuga con muestra centrifugada</i>	54
<i>Ilustración 11 Tubo centrífuga con muestra separada</i>	55
<i>Ilustración 12 Tubo centrífuga con pellets sin sobrenadante</i>	56
<i>Ilustración 13 Tubo centrífuga con pellet e hidróxido de sodio concentrado</i>	57
<i>Ilustración 14 Tubos centrífuga con pellets e hipoclorito de sodio concentrado</i>	58
<i>Ilustración 15 Tubo centrífuga en mufla para proceso de incubación durante 2 horas</i>	58
<i>Ilustración 16 Segunda centrifugación para separar células sometidas a lisis celular</i>	59
<i>Ilustración 17 Tubos centrífuga después de centrifugar</i>	60
<i>Ilustración 18 Tubos centrífuga con cloroformo para solubilización de PHA</i>	60
<i>Ilustración 19 Muestra después de 15 horas de secado a 60°C ensayo 1</i>	61
<i>Ilustración 20 Muestra después de 15 horas de secado a 60°C ensayo 2</i>	62
<i>Ilustración 21 Muestra después de 15 horas de secado ensayo 3</i>	63

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 2-1 Tabla de operacionalización de variables</i>	29
<i>Tabla 4-1 Tabla de microorganismos evaluados</i>	33
<i>Tabla 4-2 Tabla de experimentos realizados y promedios</i>	34

RESUMEN

Los Polihidroxialcanoatos (PHAs) son biopolímeros sintetizados y que han sido acumulados por grupos de microorganismos como reserva de carbono y energía. Estos poliésteres presentan características físico – químicas similares a plásticos de origen sintético con la ventaja de ser biodegradables, biocompatibles y con un proceso de producción compatible con fuentes de carbono renovables. En esta investigación evaluamos la metodología de extracción por solventes empleando diferentes microorganismos aislados de los suelos de Paramonga en diferentes sustratos. El empleo del método de extracción por solventes (hipoclorito – cloroformo) se evalúa para encontrar el punto de rendimiento máximo de producción debido a que diferentes trabajos poseen altos rendimientos de extracción de PHAs utilizando la metodología. Se evaluaron sustitutos de sustrato para la producción de PHAs, además de encontrarse tres tipos de microorganismos acumuladores de PHAs las cuales fueron (C6, C7 y C8). Estas elecciones se sometieron al proceso de extracción por el método de solventes orgánicos obteniéndose valores de máximos de 3.32, 1.2 y 2.99 g/L respectivamente para las cepas C6, C7 y C8, además de obtenerse valores mínimos de 1.69, 1.18 y 1.38 para los sustratos de caldo nutricio, medio sin sales y medio con sales respectivamente. Evaluando el potencial de producción local a nivel de las cepas obtenidas tomando como patrón máximo la cepa con mayor producción de PHA se logró un rendimiento mínimo de 30% y evaluando la producción con respecto a otros trabajos a diferentes condiciones se logró un rendimiento de 86%. Entonces se concluye que existen microorganismos de los suelos de Paramonga capaces de producir PHAs y además que poseen un rendimiento óptimo para la escala industrial.

Palabras claves: Biopolímero, polihidroxialcanoato, solventes orgánicos, extracción, producción.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biopolymers synthesized and that have been accumulated by groups of microorganisms as carbon and energy reserves. These polyesters have physical-chemical characteristics similar to plastics of synthetic origin with the advantage of being biodegradable, biocompatible and with a production process compatible with renewable carbon sources. In this investigation, we evaluated the solvent extraction methodology using different microorganisms isolated from Paramonga soils on different substrates. The use of the solvent extraction method (hypochlorite - chloroform) is evaluated to find the maximum production yield point because different works have high PHA extraction yields using the methodology. Substrate substitutes were evaluated for the production of PHAs, in addition to finding three types of PHAs accumulating microorganisms which were (C6, C7 and C8). These choices were submitted to the extraction process by the organic solvent method, obtaining maximum values of 3.32, 1.2 and 2.99 g / L respectively for strains C6, C7 and C8, in addition to obtaining minimum values of 1.69, 1.18 and 1.38 for the nutrient broth substrates, medium without salts and medium with salts respectively. Evaluating the potential of local production at the level of the strains obtained, taking as a maximum standard the strain with the highest production of PHA, a minimum yield of 30% was achieved and evaluating the production with respect to other works at different conditions, a yield of 86% was achieved. . Then it is concluded that there are microorganisms from the Paramonga soils capable of producing PHAs and also that they have an optimal performance for the industrial scale.

Key words: Biopolymer, polyhydroxyalkanoate, organic solvents, extraction, production.

INTRODUCCIÓN

La fabricación de plásticos está basada en el uso de recursos que no son renovables y ante esta situación surge la necesidad de buscar tecnologías que minimizar los impactos ambientales, siendo los polihidroxialcanoatos (PHAs) una vía alternativa para la sustitución de los plásticos sintéticos debido a la similitud de sus propiedades termoplásticas y biocompatibilidad. Ante esta situación se evalúa la capacidad de acumulación de PHAs en diversos microorganismos aislados de los suelos de Paramonga utilizando la extracción para obtener este dato y que se convierte en punto de partida para una producción a escala industrial.

Ante la existencia de diversas formas de extracción de diferentes fuentes se optó por utilizar la extracción por solventes orgánicos debido a su capacidad de extraer la mayor cantidad de PHAs en los ensayos realizados, evaluándose la aplicación y adaptación del método a las pruebas con microorganismos de los suelos de Paramonga.

En los capítulos posteriores se detallará las fuentes de ensayo aplicando el método de extracción por solventes y el desarrollo de la metodología de solventes orgánicos aplicado a los microorganismos de los suelos de Paramonga, así como también el rendimiento local y universal de la producción de PHAs y la viabilidad de escalarlo industrialmente.

Capítulo I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

El desarrollo de la civilización ha provocado un aumento de la población en todo el mundo, la cual ha tenido como consecuencia una gran acumulación de materiales desechables. Se conoce que en el mundo existe, más del 30% de desechos que originados por las industrias petroquímicas como son los plásticos.

La fabricación de estos materiales, se basa en utilizar un recurso no renovable como lo es el petróleo y ante esta situación se analiza buscar nuevas rutas tecnológicas de producción amigables con el medio ambiente, siendo los polihidroxicanoatos (PHAs) una alternativa para la sustitución de los plásticos de origen petroquímico, debido a sus propiedades biodegradables, termoplásticas y biocompatibilidad.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una familia de poliésteres totalmente biodegradables que son sintetizados por diversos microorganismos y acumulados en forma de inclusiones citoplasmáticas discretas e insolubles como reserva de carbono y energía.

En la empresa Agro Industrial Paramonga S.A.A. se ha logrado determinar y clasificar los microorganismos acumuladores de PHAs.

Por esa razón se está en la búsqueda de un método de extracción de polihidroxicanoatos (PHAs), la cual servirá para cuantificar la producción de este biopolímero y determinar el proceso a escala industrial.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema General

- ¿Se podrá aplicar el método de extracción por solventes para obtener polihidroxicanoatos (PHAs) a partir de los microorganismos acumuladores de PHAs clasificados por la empresa Agro Industrial Paramonga S.A.A.?

1.2.2 Problema Específicos

- ¿Qué equipos son necesarios para desarrollar el método de extracción por solventes?
- ¿Qué materiales y reactivos se necesitan para el proceso experimental?
- ¿Cuál es el procedimiento adecuado para desarrollar el método de extracción por solventes?

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo General

- Aplicar el método de extracción por solventes para obtener polihidroxicanoatos (PHAs) a partir de los microorganismos acumuladores de PHAs clasificados por la empresa Agro Industrial Paramonga S.A.A.

1.3.2 Objetivo Específico

- Seleccionar los equipos necesarios para desarrollar el método de extracción.
- Seleccionar los materiales y reactivos necesarios para desarrollar el método de extracción.
- Establecer el procedimiento para desarrollar el método de extracción.

1.4 Justificación de la investigación

El presente trabajo contribuye a la aplicación del método de extracción por solventes para obtener el polihidroxicanoato(biopolímero), material que ostenta un alto valor biotecnológico, y que sirve como sustituto de los plásticos de origen petroquímico. Además, que la aplicación del método de extracción sirve de base para escalar el proceso industrialmente.

1.5 Delimitación del estudio

1.5.1 Delimitación de enfoque

El proyecto de investigación busca establecer un método de extracción de biopolímero para escalar de manera industrial el proceso de obtención de polihidroxicanoatos (PHAs).

1.5.2 Delimitación de objeto de estudio

El proyecto de investigación se centrará en la aplicación del método de extracción por solventes para culminar el proceso de producción y obtención de polihidroxicanoatos(biopolímero).

1.5.3 Delimitación espacial

El proyecto de investigación se realizará en la empresa Agro Industrial Paramonga S.A.A, ubicada en la provincia de Barranca, en el distrito de Paramonga, Av. Ferrocarril N° 212

1.5.4 Delimitación temporal

El proyecto se realizará en el mes de abril 2020.

1.6 Viabilidad del estudio

1.6.1 Viabilidad técnica

Los materiales, reactivos, equipos y espacio requeridos para realizar el trabajo de investigación son proporcionados y factibles para el tesista.

1.6.2 Viabilidad económica

Las necesidades de recursos y ejecución que se utiliza para el desarrollo de la tesis son aporte de la empresa Agro Industrial Paramonga S.A.A.

1.6.3 Viabilidad ambiental

Dada la naturaleza del estudio, no se generan impactos ambientales negativos, por tratarse de un estudio que contribuye a obtener un producto biodegradable para el medio ambiente.

Capítulo II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

2.1.1 Investigaciones Internacionales

(Molina Viramontes, 2016), realizó su investigación titulada “Evaluación de desechos marinos como sustrato de bajo costo para la producción de biomasa bacteriana y polihidroxicanoatos (PHAs), aprobada por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., México; que se centró en explorar el potencial de dos desechos alimenticios marinos como sustrato de bajo costo para la generación de biomasa bacteriana y para la producción de PHAs. Usando el método de extracción por solventes propuesto por Law y Slepecky (1961) con algunas modificaciones. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: Para medio elaborado con desecho de almeja chocolatada (CAC) con adición de pulsos, la cepa Y01A1 mostró valores a las 72 horas de $2.23(\pm 0.49)$ mg mL⁻¹ Y A LAS 144 horas de $2.9 (\pm 0.5)$ mg mL⁻¹ y sin adición de pulsos los valores fueron de $2.2(\pm 1.3)$ mg mL⁻¹ y de $3.02 (\pm 1.01)$ mg mL⁻¹ a las mismas horas.

(González Gutiérrez, 2008), realizó su investigación titulada “Producción de polihidroxicanoatos por bacterias del género *Bacillus* de origen marino” aprobado por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., México; que tuvo como objetivo evaluar la producción de PHAs en 3 cepas bajo diferentes condiciones de cultivo. Usando el método de extracción por solventes dado por (Rawte y Mavinkurve, 2002) comparando con el método de extracción química (digestión) propuesto por kim et al., 2003 empleando SDS (sodium dodecyl sulfate) como surfactante.

Los valores obtenidos indican que el método de mayor porcentaje en la recuperación de PHAs fue la extracción por solventes dando resultados de 1.61, 1.72 y 1.53 g/L de PHA para cada tratamiento respectivamente. En conclusión, los porcentajes de recuperación empleando el método de extracción por digestión no fueron tan bajos, pero a nivel industrial, la pérdida ascendería al 30% del producto total representando una pérdida económica. Con base a los resultados se determinó que el método de extracción por solventes sería utilizado en investigaciones posteriores.

2.1.2 Investigaciones Nacionales

(Garnique Capuñay & Sandoval Sánchez, 2016), realizó su investigación titulada “Rendimiento de polihidroxicanoatos producidos por bacterias aisladas de bagazo de *Saccharum officinarum* L. en Lambayeque, 2015” aprobada por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú; que tuvo como objetivo aislar bacterias del bagazo de *Saccharum officinarum* L, y determinar su rendimiento de PHA. Se uso el método de extracción por solventes según Gonzáles et al., 2013.

Los diez cultivos de bacterias que presentaron mayores números de gránulos de PHA se seleccionaron para determinar el rendimiento; la cual los valores corresponden a un rango de 0.087 – 0.788 gramos de PHA/gramo de peso seco.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Polihidroxicanoatos (PHAs)

2.2.1.1 Definición

“Los PHA son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos que algunas bacterias, arqueas y microalgas acumulan intracelularmente como material de reserva, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía” (González García , Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013)

2.2.1.2 Estructura

“La polimerización de los ácidos hidroxialcanoicos, por acción de enzimas intracelulares, tiene lugar mediante condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxialcanoico), con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster de allí que también se les conozca como biopolíesteres” (Khanna y Srivastava 2005).

Los poliésteres se acumulan en el citoplasma microbiano rodeados de fosfolípidos en la cual contienen enzimas polimerasas y despolimerasas.

2.2.1.3 Propiedades

Los PHA poseen características que se asemejan a los plásticos de origen petroquímico, como el propileno y polietileno, aunque la diferencia radica en que estos pueden ser sintetizados a partir de fuentes de carbonos renovables, son biodegradables y son biocompatibles.

2.2.1.4 Condiciones de síntesis

Las condiciones bajo las cuales ocurre los procesos de formación de los PHA se dan en el caso de una limitación de N, P, S, Mg u oxígeno, además de la presencia de un exceso de fuente de carbono en el medio donde se cultiva.

También existen microorganismos que forman PHA bajo una respuesta de crecimiento (biomasa).

2.2.1.5 Clasificación

La clasificación de los PHA va a variar de acuerdo a su estructura monomérica, es decir de acuerdo a la longitud de la cadena por la cual están constituidos.

Los PHA de cadena corta (PHA – scl) están compuesto de unidades monoméricas de 3 a 5 átomos de carbono. Estos suelen ser demasiados rígidos y frágiles. Tal y como nos menciona “Los PHA de cadena corta son típicamente polímeros termoplásticos, que pueden ser moldeables arriba de sus puntos de fusión. La temperatura de fusión es relativamente alta (180°C) y su temperatura de transición está entre -5 a 20°C.” (González García , Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013)

Los PHA de cadena media (PHA – mcl) están compuestos por unidades monoméricas de 6 a 14 átomos de carbono. Estos suelen ser elásticos y con poca fuerza mecánica. Tal y como nos menciona “Los PHA de cadena media son altamente amorfos con una temperatura de transición entre -62 y -26 °C y una temperatura de fusión de 42 a 58 °C, por lo cual se clasifican como elastómeros” (González García , Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013)

Los PHA de cadena mixta están compuesto por unidades monoméricas de cadena corta y unidades monoméricas de cadena media.

También puede variar de acuerdo a la naturaleza de sus unidades monoméricas.

Los polímeros formados por un solo tipo de unidad monomérica se le denomina homopolímero.

Los polímeros formados por varios tipos de unidades monoméricas se les denomina copolímero.

La importancia de la composición monomérica va a resultar en las propiedades físicas que el biopolíéster presentará.

2.2.1.6 Tipo de PHA sintetizado

Los tipos de producto (PHA) sintetizado va a depender de los microorganismos utilizados y de las fuentes de carbono utilizadas; cabe mencionar que la mayoría de microorganismos produce biopolímero de cadena corta o de cadena media y una pequeña parte produce cadenas mixtas.

2.2.1.7 Clasificación de PHA sintetas

“Los PHA sintetas son las enzimas que catalizan la conversión de sustratos (R)-3-hidroxiacil-CoA a PHAs con la liberación de CoA, es decir una los monómeros formando el polímero” (Serrano Riaño, 2010).

Estas enzimas se encuentran en la superficie de los gránulos y además poseen un sustrato específico.

Los PHA sintetas de clase I están compuestos de una sola clase de subunidad (PhaC) y actúan sobre tioésteres CoA de biopolíésteres de cadena corta.

Los PHA sintetas de clase II se componen de una sola subunidad (PhaC) y actúan sobre tioésteres CoA de biopolíésteres de cadena media.

Los PHA sintetas Clase III están compuestos por 2 subunidades (PhaC y PhaE) y actúan sobre tioésteres de cadena corta.

Los PHA sintetas clase IV están compuestos por 2 subunidades (PhaC y PhaR) y actúan sobre tioésteres de cadena corta.

2.2.1.8 Producción de PHA

Se sabe que los PHA poseen ventajas ambientales frente a los plásticos de origen petroquímico, aunque el mayor problema que afronta la producción de este biopolímero es su elevado costo.

Investigaciones sobre producción dan lugar a obtención de una concentración de polímero de más de 80 g/L y una productividad de 2g/L/h, en sistemas continuos.

En sistemas mediante procesos de fermentación, se puede efectuar el cultivo puro o cultivos mixtos; sin embargo, va a depender en los costos de materia y en los costos de asepsia del cultivo.

En cultivos mixtos se eliminan los costos de asepsia debido a que los procesos de esterilidad no son requeridos. Aunque es necesario establecer los valores óptimos en temperatura, pH y el tiempo de fermentación.

2.2.1.9 Técnicas analíticas para la detección PHA

La detección de gránulos de PHA en células se lleva a cabo por medio de la tinción con el colorante Sudán B, debido a la naturaleza lipídica de los PHA.

Actualmente existen colorantes como el Azul Nilo A y el Rojo Nilo.

2.2.1.10 Procedimientos de purificación

Tratamiento con hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio es un compuesto oxidante que destruye las membranas biológicas y demás componentes de la célula, bajo algunas condiciones que se puedan controlar, puede también ser usado para la purificación de PHAs a una relación de 1:15 con la solución tratante al 5.25%

Este método es económico, alcanzando altos grados de pureza, aunque posee un inconveniente la cual es la degradación parcial del polímero disminuyendo el peso molecular promedio.

También existe posibilidades de combinación con EDTA o bisulfito de sodio para aislamiento del biopolímero. Tales como nos indica algunas investigaciones.

“Se partió de una suspensión al 1% (p/v) con solución de hipoclorito de sodio al 5% (v/v) y pH 12. El tratamiento con EDTA (10 mmol) una vez realizada la mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C en tanto con el biosulfito de sodio (2%) la suspensión celular se mantuvo durante 5 minutos a 25°C antes de su adicción, incubándose seguidamente a 37°C durante 1 hora. En ambos tratamientos se separó el precipitado por centrifugación a temperatura ambiente, lavándose sucesivamente con agua, acetona y etanol. El producto final fue liofilizado.” (Ortega Arias Carbajar & Bell García, 2014)

Tratamiento con agentes surfactantes

Los agentes surfactantes son utilizados en proceso de extracción y purificación de biopolímero.

El principio que utilizan se basa en la dependencia de la concentración respecto a la capa lipídica de la célula y su ruptura; es decir, que a bajas concentraciones las moléculas se insertan en la capa de grasa de la membrana que compone a la célula, conforme va en aumento la concentración se va incrementando las moléculas surfactantes a la membrana, una vez que se haya saturado el sistema; el exceso producirá la ruptura de la membrana. Se usa generalmente dodecil sulfato de sodio y el tritón X-100.

Existen dos maneras de utilizar le método con agentes surfactantes:

“Las células liofilizadas fueron resuspendidas en solución de dodecil sulfato de sodio al 1% (p/v), pH 10.2 y solución de Tritón X-100 al 1% (p/v) pH 12.5 incubada a 37°C durante 15 minutos, centrifugada y el precipitado mantenido con agitación a temperatura ambiente durante 1 minuto en solución de hipoclorito de sodio 5% (v/v), pH 12.0, separación del precipitado, lavado y liofilizado del producto final de PHB” (Ortega Arias Carbajar & Bell García, 2014).

Otro procedimiento desarrollado por Chavati y colaboradores es:

“ El sedimento obtenido fue lavado varias veces con Tris 0.05M, pH 7.5 o agua destilada, tratada con hipoclorito de sodio 0.5% + EDTA a 37°C durante 1 – 2 horas, disruptado, el precipitado de PHB lavado con agua, acetona y alcohol, secado hasta peso constante” (Ortega Arias Carbajar & Bell García, 2014).

El rendimiento del método utilizando surfactante e hipoclorito de sodio al 5% se obtienen purezas entre 97 y 98%, a diferencia con células tratadas solo con surfactante la cual reporto una pureza 10% menor.

Extracción con solventes orgánicos

Debido a la naturaleza lipídica del PHAs se justifica el uso de solventes orgánicos para aislamiento y purificación, el cual tiene como principio la solubilización de los gránulos de PHAs con cloroformo, cloruro de metileno y precipitados con metanol o etanol, seguidos de lavado con otros solventes. Una de la metodología que se usa frecuentemente en extracción de PHA es el uso de compuestos clorados especialmente la técnica de hipoclorito y cloroformo.

2.2.1.11 Aplicaciones biotecnológicas

Fabricación de objetos, envases y envoltorios

Se puede usar en objetos que se usan cotidianamente como envases y botes de champú, también como films de embalaje, otros como artículos desechables como envases cosméticos, tazas, tapas etc.

Materiales para bio-implantes y dispositivos médicos

Se utilizan para desarrollar dispositivos médicos, en las cuales encontramos como productos finales para suturas, placas de hueso, mallas quirúrgicas, válvulas y dispositivos cardiacos etc.

Fuente de biocombustible

Otro punto importante dentro de los PHAs es el uso como biocombustibles debido a la semejanza entre las moléculas del biopolímero y los metil ésteres de ácidos grasos que forma parte del biodiesel. Comparando los resultados con otras propiedades que se usan para determinar el potencial del combustible da valores entre 27 y 30 kJ/h igualando a lo producido por el biodiesel que es de 30 o 35 kJ/h, haciéndolo una buena alternativa competitiva.

2.3 Definiciones conceptuales (definición de términos básicos)

Polihidroxicanoatos: Son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos que algunas bacterias, arqueas y microalgas acumulan intracelularmente como material de reserva, para usarlo posteriormente como fuente de carbono.

Polímeros: Son macromoléculas formadas por la unión mediante enlaces covalentes de una o más unidades simples llamadas monómeros.

Biopoliésteres: Polímeros biodegradables que se pueden sintetizar de varias maneras, incluyendo la condensación directa de alcoholes y ácidos, apertura de anillo (ROP), y las reacciones de polimerización catalizada por metales.

Polimerización: Proceso mediante el cual las moléculas simples, iguales o diferentes, reaccionan entre sí por adición o condensación y forman otras moléculas de peso doble, triple, etc.

Monómero: Molécula simple, generalmente de peso molecular bajo, que forma cadenas lineales o ramificadas de dos, tres o más unidades.

Hidroxilo: Es un grupo funcional formado por un átomo de oxígeno y otro de hidrógeno, característicos de los alcoholes, fenoles y ácidos carboxílicos entre otros compuestos orgánicos.

Enzimas: Son moléculas orgánicas que actúan como catalizadores de reacciones químicas, es decir, aceleran la velocidad de reacción. Comúnmente son de naturaleza proteica, pero también de ARN.

Citoplasma: Parte de la célula que rodea el núcleo y que está limitada por la membrana exterior.

Fosfolípidos: Son un tipo de lípidos saponificables que componen las membranas celulares, compuesto por una molécula de alcohol, a la que se unen dos ácidos grasos.

Polietileno: Polímero preparado a partir de etileno.

Biodegradable: Adjetivo que permite calificar a la sustancia que se puede degradar mediante el accionar de un agente biológico.

Biocompatible: Capacidad de un biomaterial para desempeñar la función deseada de acuerdo al procedimiento, sin provocar ningún efecto indeseable.

Microorganismo: También llamado microbio, es un ser vivo, o un sistema biológico que solo puede visualizarse con el microscopio.

Biomasa: Cantidad total de materia viva presente en una comunidad o ecosistema.

Temperatura de fusión: Se define como la temperatura a la que se produce la transición de fase del estado sólido al líquido a presión atmosférica normal.

Temperatura de transición: Es la transición gradual y reversible en materiales amorfos, desde un estado “vitreo” duro y relativamente quebradizo a un estado viscoso o gomoso a medida que aumenta la temperatura.

Fuerza mecánica: Se denomina a cualquier acción o influencia capaz de modificar el estado de movimiento o de reposo de un cuerpo, es decir, de imprimirle una aceleración modificando su velocidad.

Elastómeros: Son aquellos tipos de compuesto que incluye no metales en su composición y que muestra comportamiento elástico.

Homopolímero: Polímero constituido por la repetición de un único monómero.

Copolímero: Polímero constituido por dos o más monómeros.

Fermentación: Proceso bioquímico por el que una sustancia orgánica se transforma en otra, generalmente más simple, por la acción de un fermento.

Sudan B: Es un no fluorescente, relativamente termoestable utilizado para la tinción de neutros triglicéridos y lípidos en secciones congeladas y algunas lipoproteínas en secciones de parafina.

Lípido: Grasa, sustancia orgánica insoluble en agua que se encuentra en el tejido adiposo y en otras partes del cuerpo de los animales, así como en los vegetales.

EDTA: También denominado ácido etilendiaminotetraacético, es una sustancia utilizada como agente quelante que puede crear complejos con un metal que tenga una estructura de coordinación octaédrica.

Bisulfito de sodio: Se trata de una sal ácida muy inestable que al reaccionar con el oxígeno se convierte en sulfato de sodio.

Hipoclorito de sodio: Es un compuesto químico fuertemente oxidante, contiene cloro en estado de oxidación; debido a esa característica se utiliza como desinfectante.

Centrifugación: Es un método por el cual se pueden separar sólidos de líquidos de diferente densidad por medio de una fuerza giratoria.

Surfactante: Son compuestos orgánicos anfifílicos que en medios acuosos migran hacia las superficies acuosas para que su componente hidrosoluble permanezca en la fase acuosa y el hidrófobo quede fuera de esa fase.

Liofilizado: Es un proceso de conservación de los alimentos en el que se congela y se descongela el alimento pasando por el vacío y a presión atmosférica baja.

Solvente orgánico: Son compuestos orgánicos volátiles que se utilizan solos o en combinación con otros agentes, para disolver materias primas, productos o materiales residuales, utilizándose como agente de limpieza, para modificar la viscosidad, como agente tensoactivo, como plastificante, como conservante, etc.

Compuesto clorado: Es un compuesto químico orgánico, es decir, compuesto por un esqueleto de átomos de carbono, en el cual, algunos de los átomos de hidrógeno

unidos al carbono, han sido reemplazados por átomos de cloro, unidos por enlaces covalentes al carbono.

Cloroformo:

Metanol: Líquido incoloro y muy tóxico, obtenido por destilación de la madera a baja temperatura o median la reacción del monóxido de carbono y el hidrógeno, que se emplea para desnaturalizar el alcohol etílico y como aditivo de combustibles líquidos.

Etanol: Compuesto químico conocido como alcohol etílico, es un alcohol que en condiciones normales de presión y temperatura se presenta como un líquido incoloro e inflamable con una temperatura de ebullición de 78.4°C.

Biocombustible: Es una mezcla de sustancias orgánicas que se utiliza como combustible en los motores de combustión interna.

Biodiesel: Es un líquido que se obtienen a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, con o sin uso previo, mediante procesos industriales de esterificación y transesterificación y que se aplica en la preparación de sustitutos locales o parciales del petrodiesel o gasóleo.

2.4 Operacionalización de las variables

Tabla 2-1

Tabla de operacionalización de variables

Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensión
Aplicación del método de extracción por solventes	La aplicación de la extracción por solventes se da debido a la naturaleza lipídica de los gránulos de PHAs para poder aislarlo y purificarlo	Para el aprovechamiento de la lisis celular, la extracción por solvente es aplicable a las células una vez centrifugadas para dar comienzo a la dispersión que dejo la lisis celular y emplear el solvente para la extracción del biopolímero con un alto grado de pureza.	<ul style="list-style-type: none"> • Condiciones ambientales • Equipos de aplicación • Materiales y reactivos de aplicación de método • Variables de proceso • Cantidad de reactivos • Procedimiento experimental • Rendimiento de método
Obtención de polihidroxicanoatos	Los polihidroxicanoatos son poliésteres ópticamente activos de naturaleza lipídica que se acumulan en el citoplasma de algunos microorganismos	Las bacterias producen polihidroxicanoatos como mecanismo de almacenamiento de carbono y energía	<ul style="list-style-type: none"> • Microorganismos acumuladores de PHAs • Condiciones ambientales • Materiales y reactivos de producción de PHAs

Fuente 2-1 Propia

Capítulo III: METODOLOGÍA

3.1 Diseño metodológico

3.1.1 Tipo de Investigación

- Aplicada

3.1.2 Nivel de Investigación

- Correlacional

3.1.3 Diseño

- Experimental

3.1.4 Enfoque

- Cuantitativo

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

- Microorganismos acumuladores de PHAs

3.2.2 Muestra

- Microorganismos acumuladores de PHAs clasificados por la empresa Agro Industrial Paramonga S.A.A.

3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.3.1 Técnicas a emplear

- Observación experimental

3.3.2 Descripción de los instrumentos

- Hoja de registro de datos

3.4 Técnicas para el procesamiento de la información

- Organizadores visuales (Tablas, listas y gráficos)

Capítulo IV: RESULTADOS

4.1 Método de obtención de resultados

4.1.1 Reactivación de las cepas

Las cepas utilizadas para el estudio fueron aisladas previamente de los suelos de Paramonga y pertenecen al laboratorio de microbiología de Agro Industrial Paramonga S.A.A.

Las muestras de cepas fueron sometidas a proceso de crecimiento de biomasa y control de contaminantes, para luego ser puestas a proceso de extracción y posteriormente cuantificarlos.

El medio que se usó para el crecimiento fueron los medios mínimos de sales, el medio de caldo de fermentación, caldo nutricio, el medio de caldo de melaza y medio caldo sin sales.

4.1.2 Extracción de PHAs

4.1.2.1 Clasificación de microorganismos acumuladores de PHAs

Una vez sometidas a las pruebas de crecimiento de biomasa y control de contaminantes, se eligieron las cepas adecuadas con valores óptimos y con posibilidad de acumulación de PHAs.

Las cepas seleccionadas (C6, C7, C8) se trasladaron al laboratorio de química de la empresa Agro Industrial Paramonga S.A.A. para su extracción y cuantificación.

4.1.2.2 Extracción por solventes

La extracción de PHAs es un paso importante en los procesos de producción de polihidroxialcanoatos, por esta razón se decide evaluar el método de extracción empleando las cepas seleccionadas (C6, C7 y C8).

Se extrajeron 50 mL de muestra de cada ensayo la cual ha estado cultivada a 32°C y en diferente medio de cultivo (caldo melaza y caldo mínimo de sales y caldo nutritivo) con la finalidad de evaluar el método de extracción a diferentes condiciones de cultivo.

Para el método se tomaron 10 ml de muestra de cada cepa de acuerdo al medio de cultivo y se colocaron en tubos de ensayos previamente pesados para centrifugar a 4700 RPM por 20 minutos.

Se descartó el sobrenadante y se agregó 3 ml de hipoclorito de sodio concentrado al sedimento (pellet), la cual se dejó incubando a 37°C por 2 horas.

Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 4700 RPM por 20 minutos y el pellet obtenido se suspendió en cloroformo puro y se colocó en la mufla 60°C por 15 horas para acelerar el proceso de volatilización del solvente.

4.1.2.3 Cuantificación de PHAs

Finalmente, una vez pasada las 15 horas se deja enfriar en el desecador y se procede a realizar el pesaje correspondiente para determinar por gravimetría la cantidad de PHAs obtenido por muestra a diferentes medios de cultivo.

4.2 Análisis de resultados

4.2.1 Clasificación de microorganismos a evaluar

Tabla 4-1

Tabla de microorganismos evaluados

# Prueba	Microorganismo
1	AZO(X)
2	BH1
3	BH2
4	BH3
5	CONTROL
6	CQ1
7	CQ2
8	CQ3
9	M1
10	M3
11	RZ3
12	AZO(X)
13	BH1
14	BH2
15	BH3
16	CONTROL
17	CQ1
18	CQ2
19	CQ3
20	M1
21	M3
22	RZ3

Fuente 4-1 Propia

4.2.2 Resultados de las pruebas de extracción

Tabla 4-2

Tabla de experimentos realizados y promedios

Medio	Bacteria	Peso de tubo de ensayo (gramos)	Peso de tubo final (gramos)	Peso de PHA en gramos/10 ml	gramos de PHA/L
Caldo nutritivo	6	3.5046	3.5378	0.0332	3.32
	7	3.5033	3.5202	0.0169	1.69
	8	3.4795	3.4972	0.0177	1.77
Medio sin sales	6	3.4654	3.4774	0.012	1.2
	7	3.4767	3.4885	0.0118	1.18
	8	3.505	3.5168	0.0118	1.18
Medio con sales	6	3.8072	3.8371	0.0299	2.99
	7	3.4217	3.4408	0.0191	1.91
	8	3.4843	3.4981	0.0138	1.38

Fuente 4-2 Propia

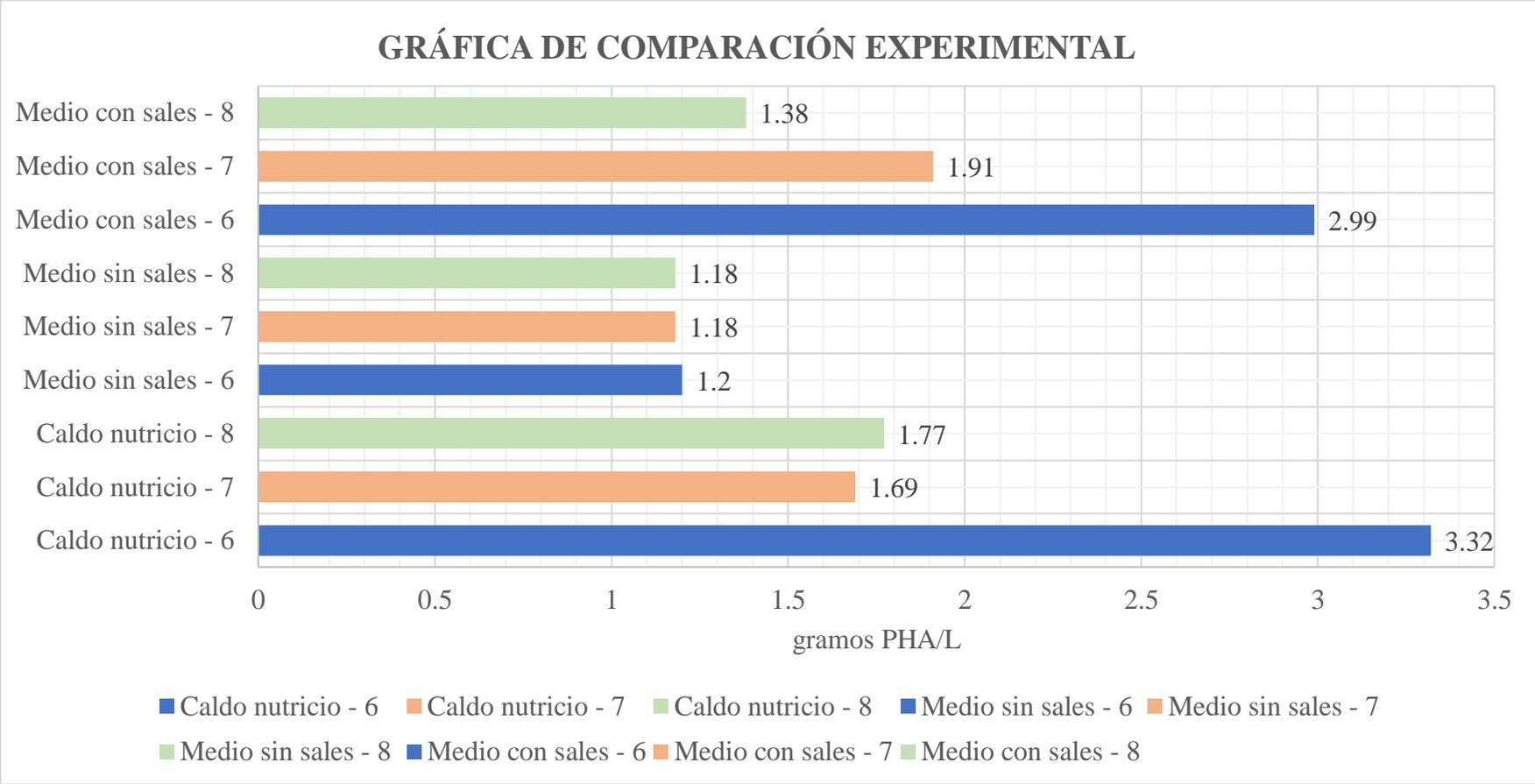


Ilustración 1 Cuadro de resumen de experimentos

Capítulo V: DISCUSION

5.1 Discusión de resultados

5.1.1 Selección de microorganismos acumuladores de PHAs

La selección de microorganismos para la producción de biopolíesteres (PHAs) incluyen múltiples factores, la cual se encuentra la diversidad del sustrato, su crecimiento, y producción del polímero.

Del grupo de microorganismos que fueron evaluados se tomó en consideración la evaluación de sustrato y el crecimiento de biomasa, así como también la saturación por días de crecimiento en la cual se eligió los microorganismos clasificados como C6, C7 y C8.

Estos microorganismos seleccionados obtuvieron una adaptación al sustrato y un alto crecimiento de biomasa, así como también se observó la producción del polímero a través del método de coloración Sudan Negro B.

5.1.2 Condiciones ambientales de desarrollo

La producción del microorganismo se dio en un ambiente controlado dentro del laboratorio de microbiología.

La extracción del polímero desde su traslado hasta su extracción se dio a condiciones ambientales controlables dentro del laboratorio de química y en el laboratorio de calidad.

Se tomó estas medidas para poder evitar cualquier variabilidad en los futuros resultados.

5.1.3 Equipos para el método de extracción por solventes

Centrífuga

Según (González Gutiérrez, 2008) nos indica que la muestra debe ser centrifugada a 4700 RPM durante 15 minutos; aunque la centrifugadora usada en el procedimiento es de RPM indefinidos, se optó por centrifugarlo por 20 minutos tomando en cuenta la observación del sedimento al finalizar cada ensayo.

Mufla

Según (González Gutiérrez, 2008) nos indica utilizar una incubadora y una campana de extracción como indica (Rawte y Mavinkure, 2002) para seguir el desarrollo del procedimiento de extracción; se optó por acondicionar la mufla de acuerdo a las condiciones adecuadas para el procedimiento dando resultados favorables para el desarrollo del proceso.

5.1.4 Materiales y reactivos para el método de extracción por solventes

Los materiales utilizados en el desarrollo del procedimiento se limpiaron y desinfectaron antes de comenzar el procedimiento, con la finalidad de evitar cualquier variación a la muestra debido a que esta es biológica.

En cuanto a los reactivos se trabajó con hojas de seguridad necesaria para su almacenamiento, utilización y desecho de estos.

5.1.5 Cantidad de reactivos para el método de extracción por solventes

La cantidad de reactivos usados para el procedimiento se calculó de acuerdo a las muestras a analizar, según (González Gutiérrez, 2008) trabaja con una muestra de 50 ml, con 15 ml de hipoclorito de sodio y cloroformo necesario para la solubilidad.

Para evitar cualquier variación entre ambos procedimientos se procedió a calcular la cantidad de reactivos necesarios.

En nuestro caso se trabajó con 10 ml, cantidad máxima de los tubos centrífuga usados para el procedimiento, 3 ml de hipoclorito de sodio y 3 ml de cloroformo según nos indica (Molina Viramontes, 2016).

5.1.6 Procedimiento adecuado para desarrollar el método de extracción por solventes

Se tomó con referencia el procedimiento descrito por (González Gutiérrez, 2008), la cual fue validada por el centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C.

Se modificó el procedimiento sin mucha variabilidad de acuerdo a los equipos, materiales y reactivos que se tienen en los laboratorios.

Es por eso que el procedimiento que se siguió fue el siguiente:

Primero se toma 10 ml del medio de cultivo y colocarlo en tubos de centrífuga previamente pesado, luego centrifugar a 4700 RPM por 20 minutos, al finalizar descartar sobrenadante y agregarle 3 ml de hipoclorito de sodio concentrado. Luego incubar a 37°C durante 2 horas para luego centrifugarlo a 4700 RPM por 20 minutos y suspender en cloroformo. Para finalizar secar la muestra colocando en mufla a 60°C durante 15 horas, realizar el pesado de la muestra y anotarlo.

5.1.7 Rendimiento del método de extracción por solventes

Se le realizó la prueba 9 veces de las cuales se tuvieron que el caldo nutritivo con microorganismo (C6) se obtuvo el mayor valor (3.32 g/L), seguido por el medio con sales (C6) con la cual se obtuvo (2.99 g/L); en el caso del medio sin sales se obtuvieron resultados sin mucha variabilidad entre su 3 repeticiones (C6, C7 y C8) dando resultados 1.2, 1.18 y 1.18 g/L respectivamente.

5.1.8 Diferencias de resultados bajo el método de extracción por solventes

Según (González Gutiérrez, 2008) nos indica que, entre ambos métodos desarrollados, el método por solventes logra una recuperación mayor que la extracción con SDS la cual se recuperaron 1.72 g/L y 1.00 g/L respectivamente.

Según (Molina Viramontes, 2016) nos indica que sus máximos valores obtenidos bajo el método de extracción por solventes en medio CAC^o (medio CAC in extracto de levadura) fue de 2.9 g/L y en un medio CAC sin pulsos fue de 2.20 g/L y en un medio sin pulsos fue de 3.02 g/L.

Según (Garnique Capuñay & Sandoval Sánchez, 2016) nos indica que a partir de microorganismos aislados de la caña de azúcar se obtiene una producción máxima de 0.308 g/L y un valor mínimo de 0.087 g/L, valores que van de acuerdo a la selección de generación de biomasa.

El proyecto de investigación dio como resultados valores entre 3.32 g/L (microorganismo C6) y 1.2 g/L (microorganismo C8), estos valores comparados con otros trabajos mencionados anteriormente pueden competir en un escalamiento industrial aplicando un diseño factorial adecuado para poder determinar los valores críticos y optimizar la producción y minimizar gastos económicos.

Capítulo VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

La aplicación del método de extracción por solventes para obtener polihidroxicanoatos (PHAs) a partir de microorganismos aislados de los suelos de Paramonga es viable y da resultados competitivos con otros trabajos mencionados, así como también la posibilidad de competir industrialmente en producción de biopolímeros.

La evaluación de microorganismos determinó que es posible utilizar 3 tipos de microorganismo (C6, C7 y C8) las cuales dieron valores óptimos en adaptación y producción de PHAs.

Las condiciones ambientales a las cuales se desarrolló el procedimiento, fueron efectivos, mostrando resultados competitivos con respecto a otros trabajos mencionados.

La adaptación de equipos, materiales y reactivos en el desarrollo del procedimiento experimental resultaron viables, tomando en consideración las condiciones de trabajo donde se desarrolló el experimento.

El establecimiento de un procedimiento para desarrollar el método de extracción por solventes, resultó ser efectivo debido a los cambios que se tuvieron que aplicar para realizar las pruebas con las mínimas variabilidades posibles.

El método logró valores máximos de 3.32 g/L y valores mínimo de 1.02 g/L teniendo como rendimiento mínimo de 30% con respecto al valor máximo y un rendimiento de 86 % con respecto a otros trabajos mencionados.

6.2 Recomendación

La selección de microorganismos se debe tener en cuenta la producción de PHAs , en un microscopio electrónico no se puede apreciar de manera clara la acumulación de PHAs , como lo haría una barrido de la muestra.

La toma de muestra se debe homogenizar y crear un ambiente de esterilidad antes de traspasar hacia los tubos de ensayo.

El método de extracción por solventes se debe tener en consideración el uso de EPPs adecuados en todo momento, debido a la contaminación de la muestra y la exposición al cloroformo.

Capítulo VII: REFERENCIAS

7.1 Fuentes bibliográficas

Bibliografía

- Cerrone, F. (Febrero de 2011). Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alperoujo por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno. Granada, Andalucía, España: Universidad de Granada.
- Garnique Capuñay, L. F., & Sandoval Sánchez, J. L. (2016). Rendimiento de polihidroxicanoatos producidos por bacterias aisladas de bagazo de *Saccharum officinarum* L. en Lambayeque, 2015. Lambayeque, Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- González García , Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., & Córdova López, J. A. (2013). Síntesis y Biodegradación de polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29(1), 77-115.
- González Gutiérrez, M. G. (Diciembre de 2008). Producción de poli-hidroxicanoatos por bacterias del género *Bacillus* de origen marino. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Molina Viramontes, J. P. (Diciembre de 2016). Evaluación de desechos marinos como sustrato de bajo costo para la producción de biomasa bacteriana y polihidroxicanoatos (PHAs). La paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Obeso Rodríguez, J. I. (2017). Síntesis de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: estudios bioquímicos, genéticos y ultraestructurales. León, León, España: Universidad de León.

Ortega Arias Carbajar, G. M., & Bell García, A. (2014). Separación, purificación y caracterización de poli-hidroxibutirato. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*, 7-15.

Serrano Riaño, J. Y. (Julio - Diciembre de 2010). Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Teoría y Praxis Investigativa*, Volumen 5 - No. 2 (79-84).

ANEXOS

ANEXO A

8.1 Matriz de Consistencia

Problema	Objetivos	Variable y Dimensiones	Metodología
Formulación del problema	Objetivos de la Investigación	Variable Independiente	Diseño metodológico
Problema General	Objetivo General	Aplicación del método de extracción por solventes	Tipo de Investigación
<ul style="list-style-type: none"> ¿Se podrá aplicar el método de extracción por solventes para obtener polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de los microorganismos acumuladores de PHAs clasificados por la empresa Agro Industrial Paramonga S.A.A.? 	<ul style="list-style-type: none"> Aplicar el método de extracción por solventes para obtener polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de los microorganismos acumuladores de PHAs clasificados por la empresa Agro Industrial Paramonga S.A.A. 	Dimensiones: <ul style="list-style-type: none"> Condiciones ambientales Equipos de aplicación Materiales y reactivos de aplicación de método VARIABLES DE PROCESO Cantidad de reactivos Procedimiento experimental Rendimiento de método 	<ul style="list-style-type: none"> Aplicada
Problema Específicos	Objetivo Específico	Variable dependiente	Nivel de Investigación
<ul style="list-style-type: none"> ¿Cuáles son los microorganismos acumuladores de PHAs para aplicar el método de extracción por solventes? ¿Cuáles son las condiciones ambientales necesarias para aplicar el método de extracción por solventes? ¿Qué equipos son necesarios para desarrollar el método de extracción por solventes? ¿Qué materiales y reactivos se necesitan para el proceso experimental? ¿Se podrá determinar la cantidad de reactivos para un proceso experimental adecuado? ¿Cuál es el procedimiento adecuado para desarrollar el método de extracción por solventes? ¿Cuánto es el rendimiento del método con respecto a la muestra procesada? ¿De acuerdo a los resultados cuál es la diferencia que existe con respecto a otros trabajos usando el método de extracción? 	<ul style="list-style-type: none"> Clasificar los microorganismos acumuladores de PHAs que se van a utilizar para aplicación del método de extracción. Evaluar las condiciones ambientales necesarias para aplicar el método de extracción. Seleccionar los equipos necesarios para desarrollar el método de extracción. Seleccionar los materiales y reactivos necesarios para desarrollar el método de extracción. Determinar la cantidad de reactivo para desarrollar el proceso experimental. Establecer el procedimiento para desarrollar el método de extracción. Calcular el rendimiento del método de extracción por solventes. Comparar el rendimiento del proceso con respecto a otros trabajos usando el método de extracción por solventes. 	Obtención de polihidroxialcanoatos Dimensiones: <ul style="list-style-type: none"> Microorganismos acumuladores de PHAs Condiciones ambientales Materiales y reactivos de producción de PHAs 	<ul style="list-style-type: none"> Correlacional
			Diseño
			<ul style="list-style-type: none"> Experimental
			Enfoque
			<ul style="list-style-type: none"> Cuantitativo
			Población y muestra
			Población
			<ul style="list-style-type: none"> Microorganismos acumuladores de PHAs
			Muestra
			<ul style="list-style-type: none"> Microorganismos acumuladores de PHAs clasificados por la empresa Agro Industrial Paramonga S.A.A.
			Técnicas e instrumentos de recolección de datos
			Técnicas a emplear
			<ul style="list-style-type: none"> Observación experimental
			Descripción de los instrumentos
			<ul style="list-style-type: none"> Hoja de registro de datos
			Técnicas para el procesamiento de la información
			<ul style="list-style-type: none"> Organizadores visuales (Tablas, listas y gráficos)

ANEXO B

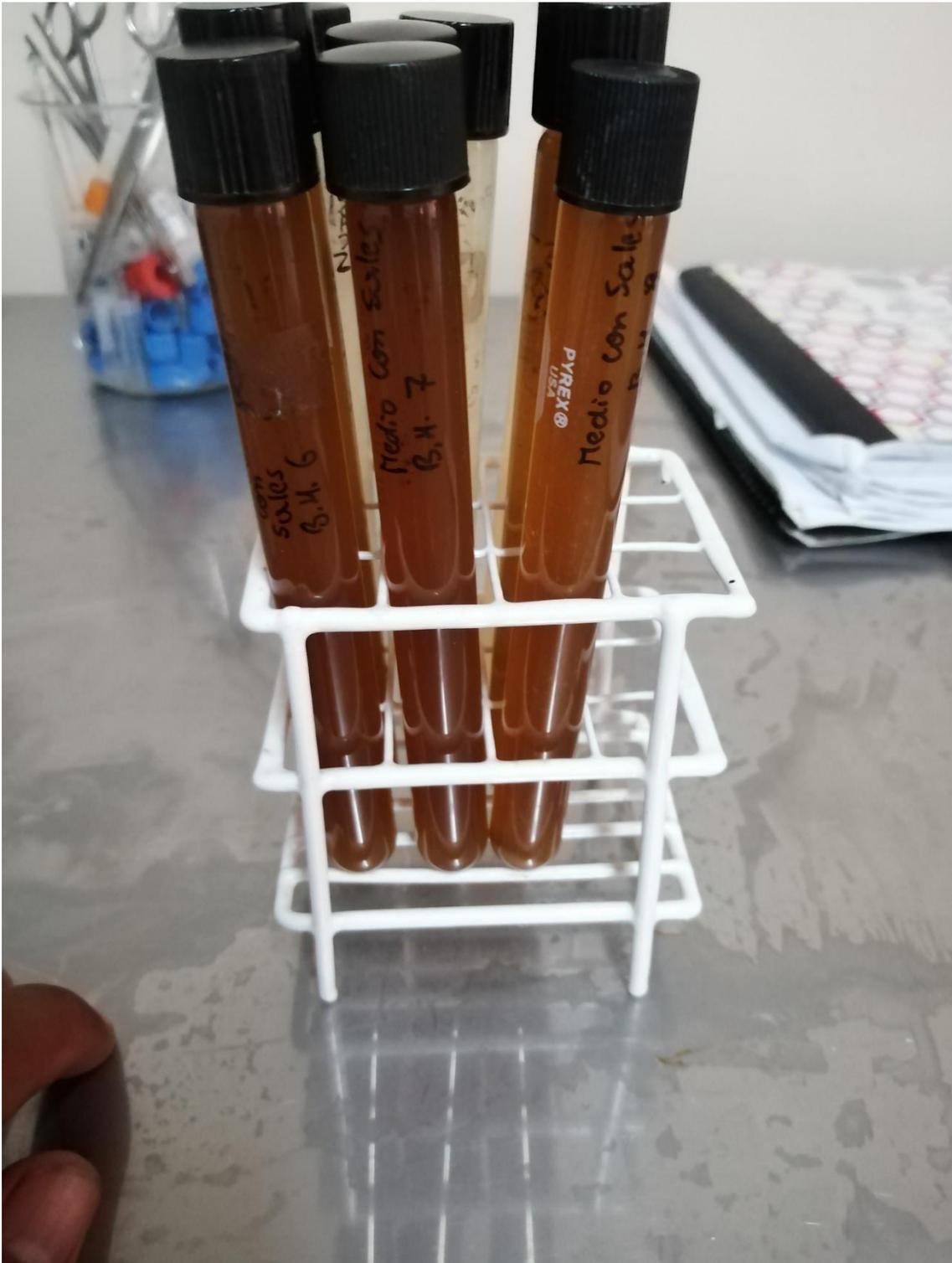


Ilustración 2 Muestras de PHA

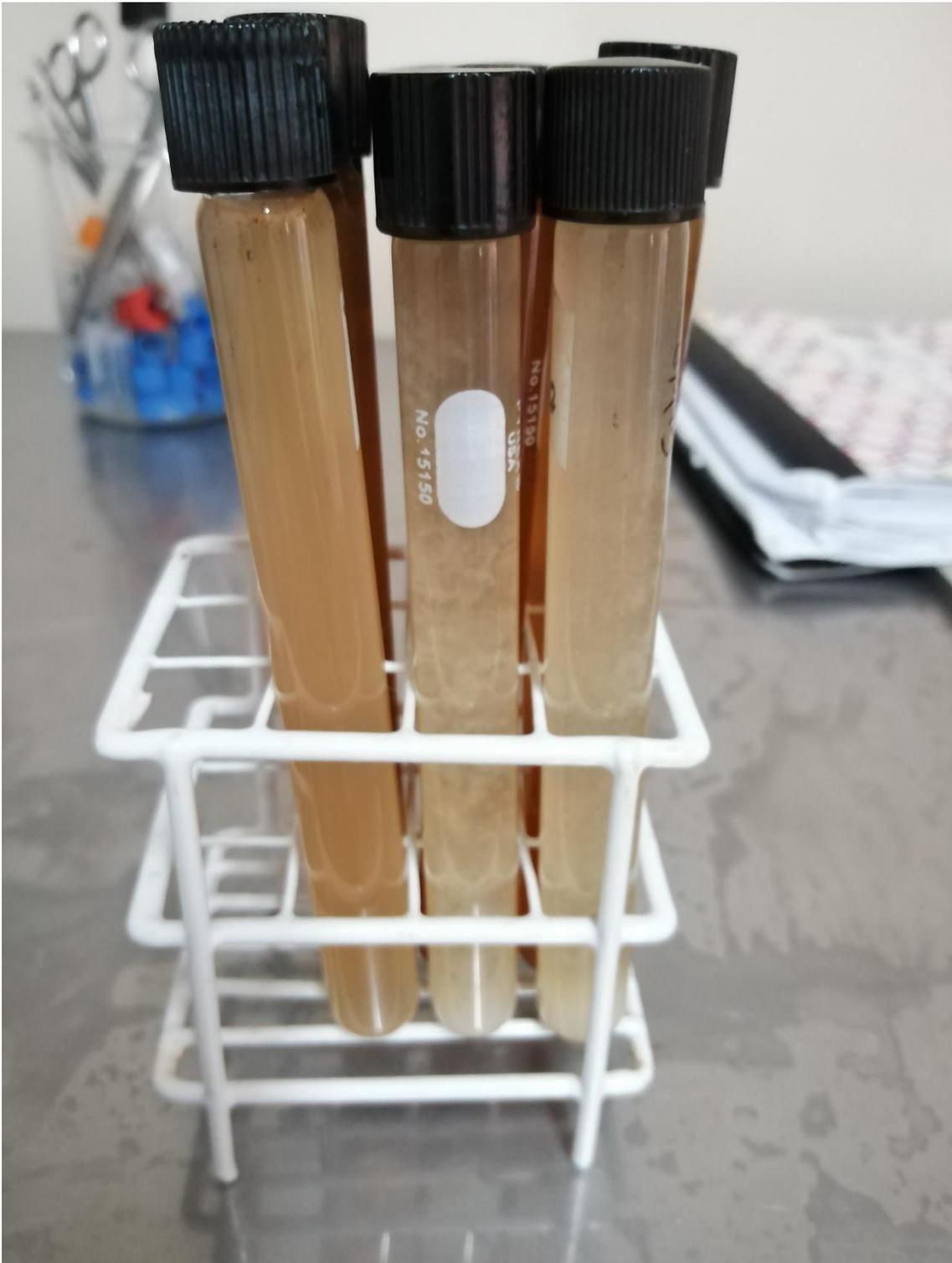


Ilustración 3 Muestra de PHA

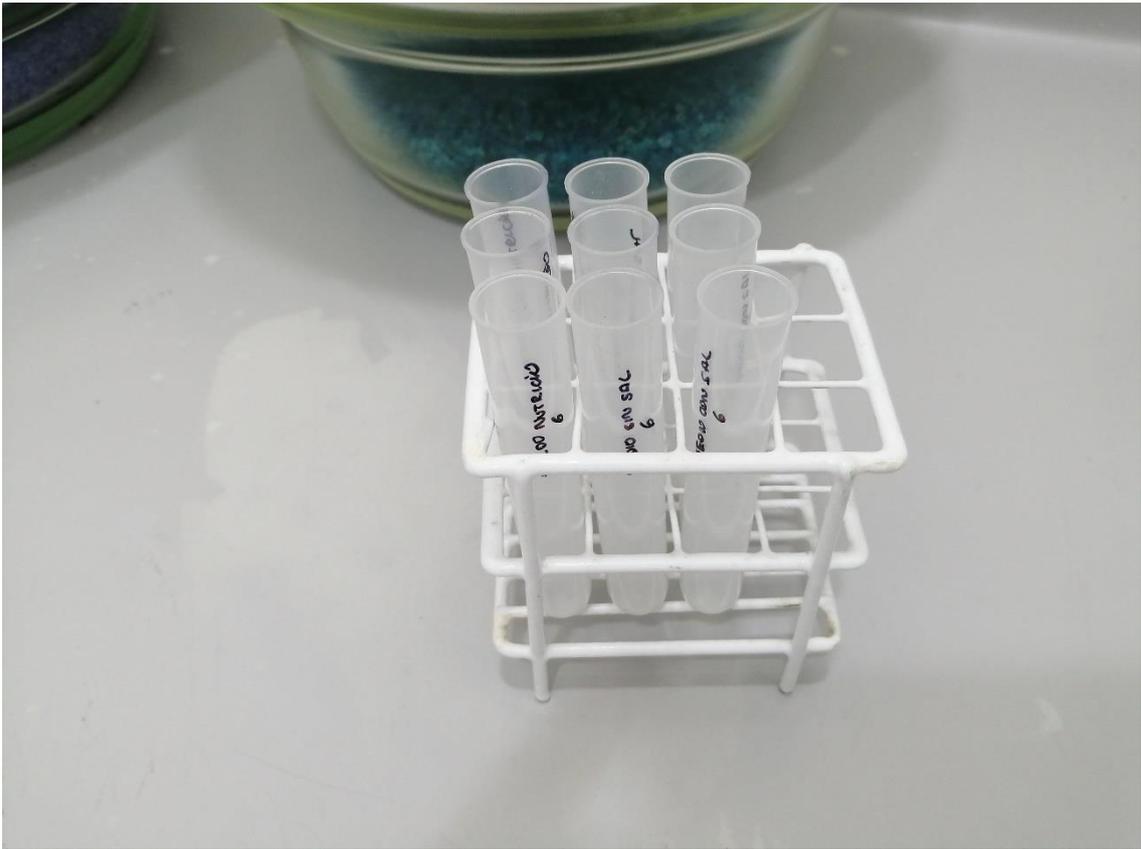


Ilustración 4 Tubos de centrifuga

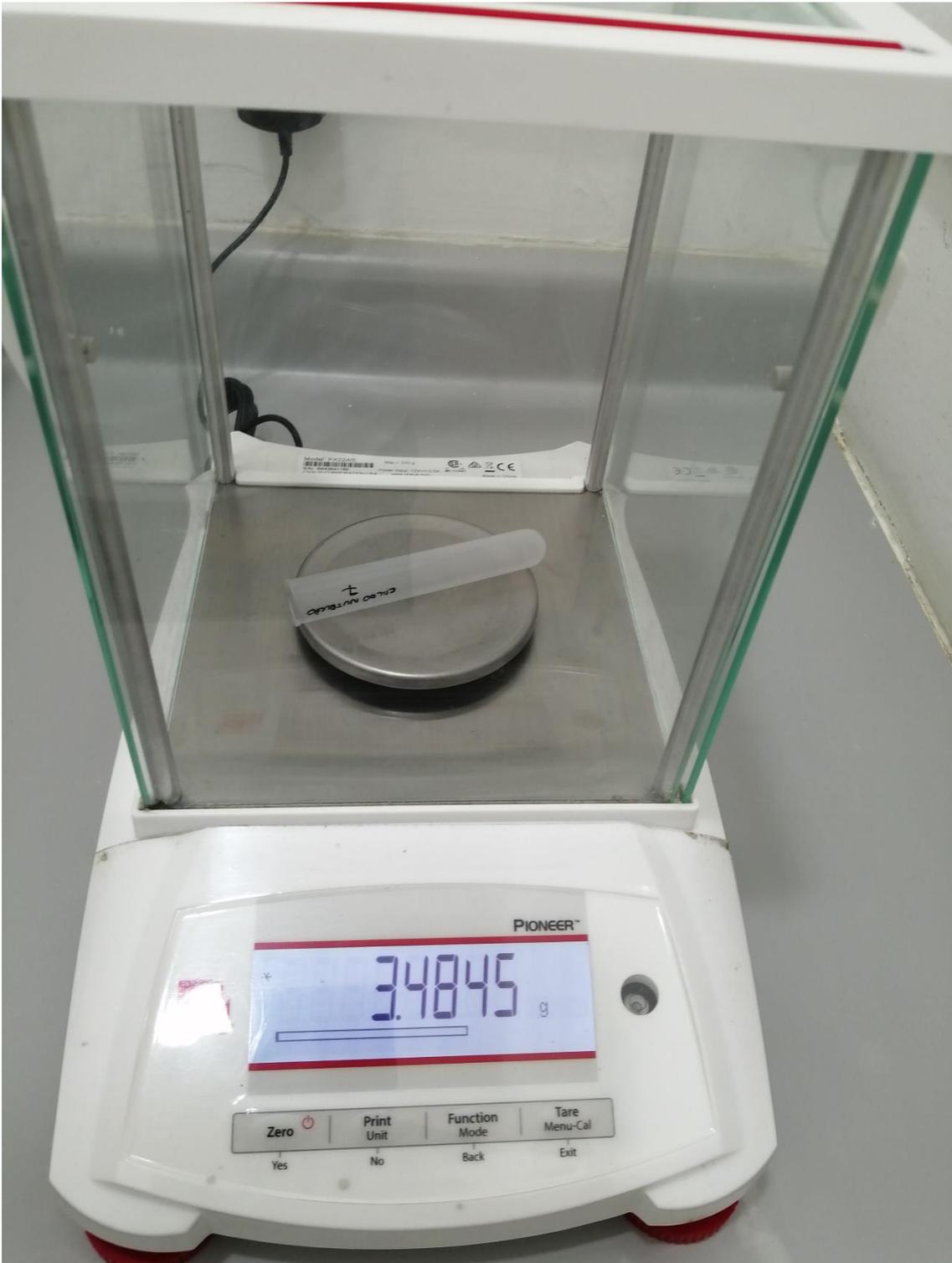


Ilustración 5 Pesaje de tubos centrífuga



Ilustración 6 Toma de muestra de 10 ml de cultivo de PHA

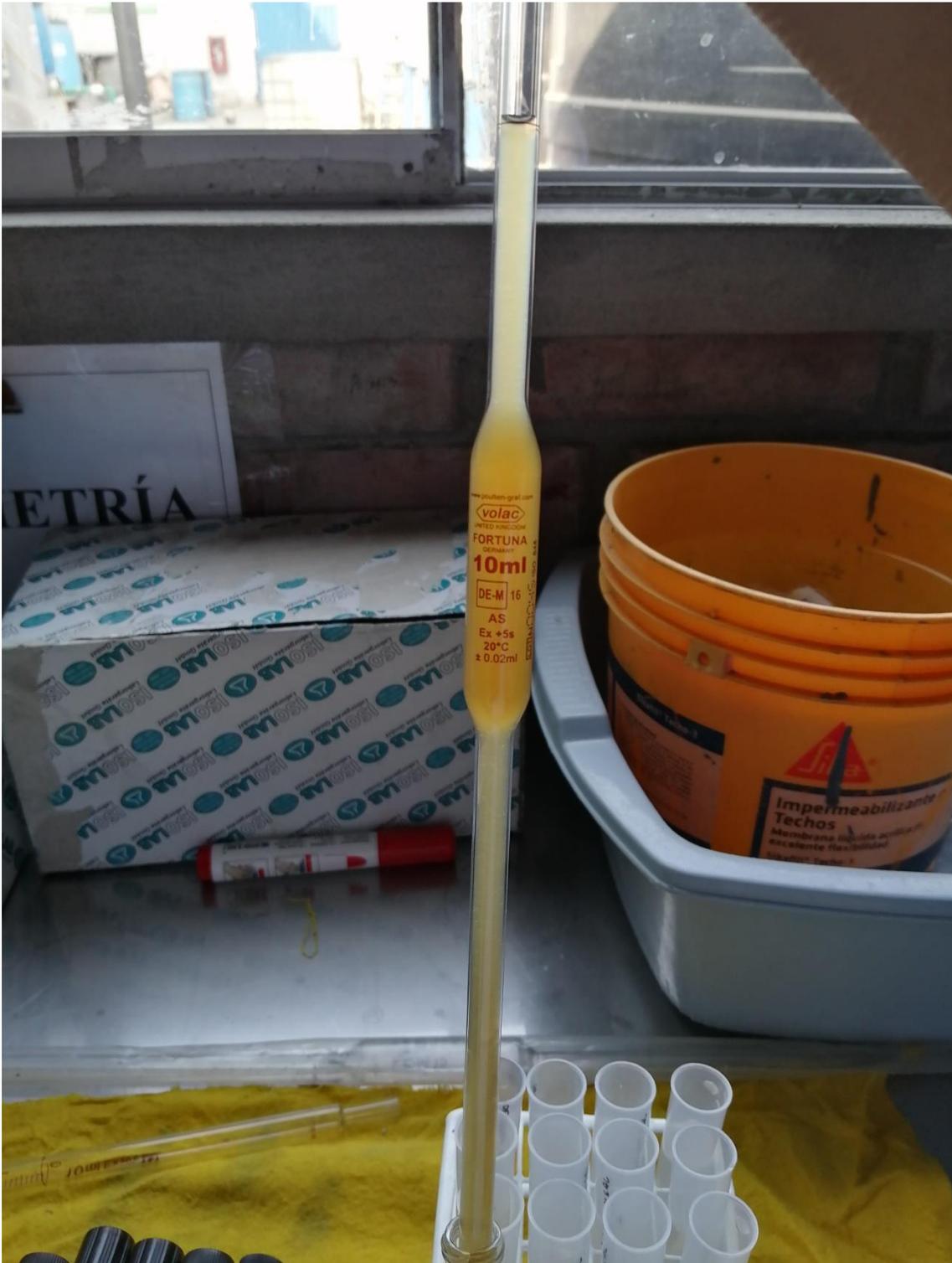


Ilustración 7 Toma de muestra de 10 ml de cultivo de PHA



Ilustración 8 Tubos de centrifuga con muestra de 10 ml de cultivo de PHA



Ilustración 9 Primera centrifugación del proceso para separar pellets de sobrenadante



Ilustración 10 Tubo de centrifuga con muestra centrifugada

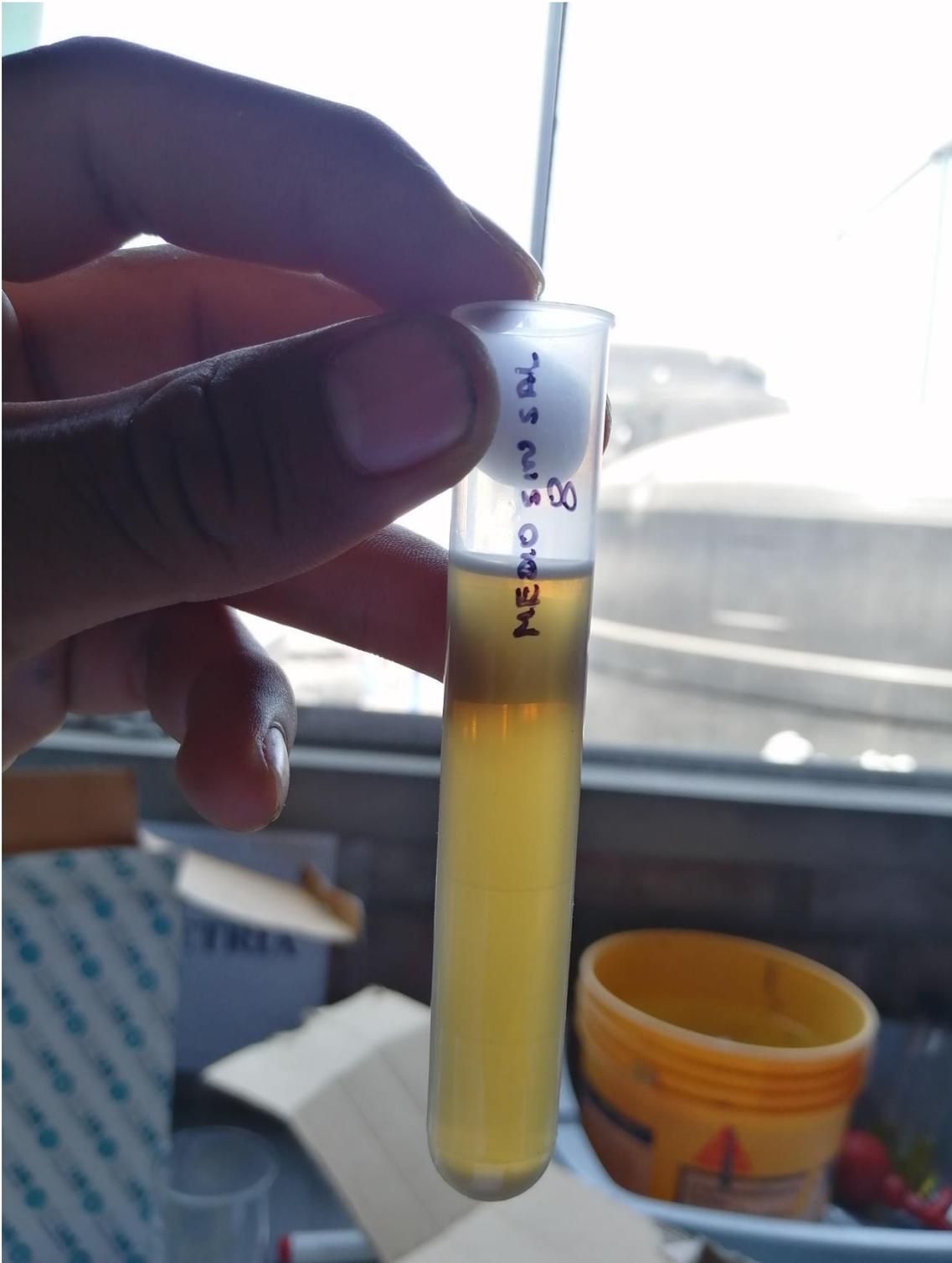


Ilustración 11 Tubo centrifuga con muestra separada



Ilustración 12 Tubo centrifuga con pellets sin sobrenadante



Ilustración 13 Tubo centrifuga con pellet e hidróxido de sodio concentrado



Ilustración 14 Tubos centrífuga con pellets e hipoclorito de sodio concentrado



Ilustración 15 Tubo centrífuga en mufla para proceso de incubación durante 2 horas

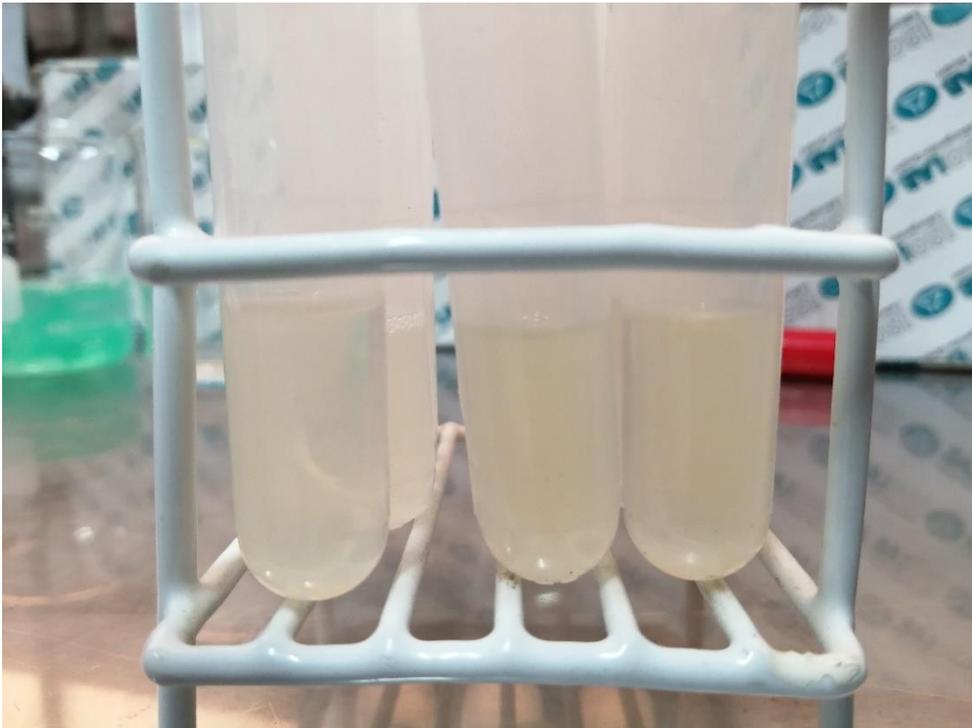


Ilustración 17 Tubos centrífuga después de centrifugar

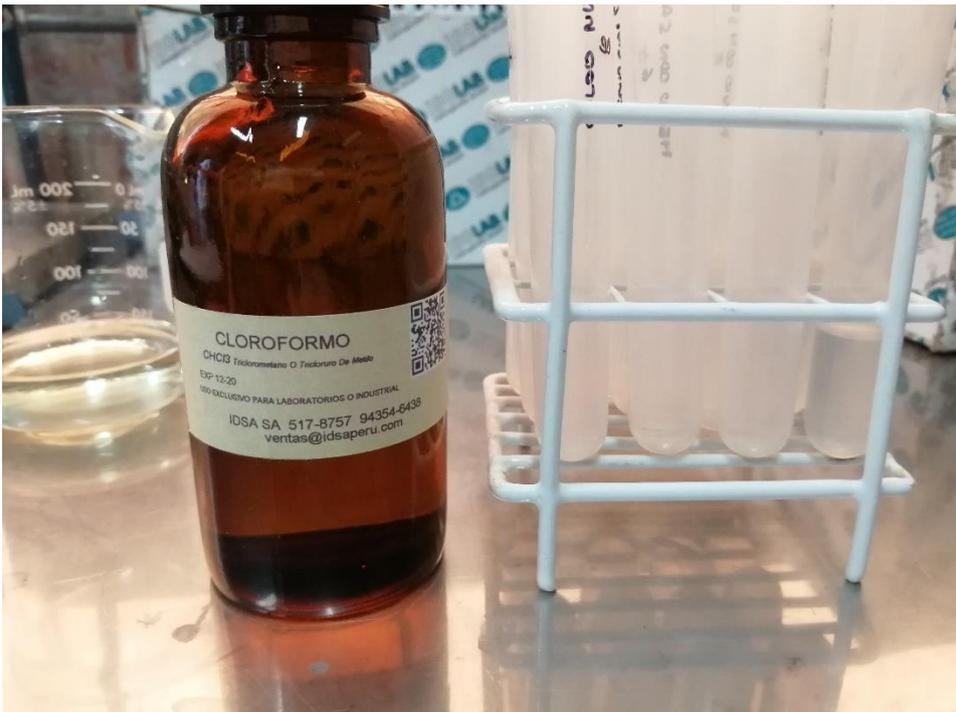


Ilustración 18 Tubos centrífuga con cloroformo para solubilización de PHA



Ilustración 19 Muestra después de 15 horas de secado a 60°C ensayo 1



Ilustración 20 Muestra después de 15 horas de secado a 60°C ensayo 2



Ilustración 21 Muestra después de 15 horas de secado ensayo 3