

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

*Trabajo de titulación previo
a la obtención del título de
Ingeniera Ambiental*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DEL
SUBPRODUCTO GLICEROL PROCEDENTE DE LA
TRANSFORMACIÓN DE ACEITES USADOS DE PALMA A BIODIESEL”**

AUTORAS:

MARÍA CRISTINA ASTUDILLO FAJARDO

LIGIA ELIZABETH OLMEDO GARCÍA

TUTOR:

ING. JORGE BRAULIO AMAYA PINOS, Ph.D

CUENCA - ECUADOR

2021

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotras, María Cristina Astudillo Fajardo con documento de identificación N° 0105966766 y Ligia Elizabeth Olmedo García con documento de identificación N° 0302270111, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación: **“OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DEL SUBPRODUCTO GLICEROL PROCEDENTE DE LA TRANSFORMACIÓN DE ACEITES USADOS DE PALMA A BIODIESEL”**, mismo que ha sido desarrollado para obtener el título de: *Ingeniera Ambiental*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En la aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, noviembre de 2021



María Cristina Astudillo Fajardo

C.I. 0105966766



Ligia Elizabeth Olmedo García

C.I. 0302270111

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DEL SUBPRODUCTO GLICEROL PROCEDENTE DE LA TRANSFORMACIÓN DE ACEITES USADOS DE PALMA A BIODIESEL”**, realizado por María Cristina Astudillo Fajardo y Ligia Elizabeth Olmedo García, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, noviembre de 2021



Ing. Jorge Braulio Amaya Pinos, Ph.D.

C.I. 0103444923

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Nosotras, María Cristina Astudillo Fajardo con documento de identificación N° 0105966766 y Ligia Elizabeth Olmedo García con documento de identificación N° 0302270111, autoras del trabajo de titulación: **“OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DEL SUBPRODUCTO GLICEROL PROCEDENTE DE LA TRANSFORMACIÓN DE ACEITES USADOS DE PALMA A BIODIESEL”**, certificamos que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de nuestra exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, noviembre de 2021



María Cristina Astudillo Fajardo

C.I. 0105966766



Ligia Elizabeth Olmedo García

C.I. 0302270111

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación se lo dedico en primer lugar a Dios por haberme dado la paciencia, el empeño, las ganas y las fuerzas necesarias para poder culminar con mi carrera universitaria y con esto uno de mis más grandes anhelos.

A mis padres Héctor Rodrigo Astudillo y Rosa Victoria Fajardo por haberme amado, formado, comprendido y apoyado en todo lo que fue mi travesía y vida universitaria.

Gracias por siempre creer en mí y por haber luchado a mi lado. ¡Lo logramos!

A mis hermanos, Diana, Luis, Daniela, por confiar que siempre podía dar un poco más especialmente a mi hermano Luis, gracias por todos los consejos y el ánimo que me dabas. Tus palabras siempre me ayudaron en las noches de desvelo, a mis hermanas por darme a los mejores sobrinos Jordy, Anthony y Mateo que siempre con sus locuras me sacaba de la monotonía, son los mejores hermanos.

Principalmente se lo dedico a mi hijo Thiago. Gracias a ti todo cambio. Gracias por darme la energía, las ganas de superarme día a día. Todos mis logros llevan al frente tu nombre, tu esencia, y tu vida. Te amo y doy gracias por tu existencia esto es por ti y para ti.

A mis abuelitos Julia y Miguel por cuidarme y enseñarme todo lo que ahora se.

A mis amigos Fernando, Pablo, Xavier, Pamela, Omar, Giovanni y Adrián por estar a mi lado en todo este trayecto llamado universidad. Gracias por hacer que todo valiera la pena.

A mi compañera de tesis Ligia por haberme apoyado y entendido muchos aspectos que atravesé en mi vida.

María Cristina Astudillo Fajardo

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres Felipe Olmedo y Norma García que son mi más grande orgullo. Los mejores padres que puedo tener que con su amor, tenacidad, ternura, consejos y apoyo incondicional me han formado y guiado para ser la persona que soy.

A mis hermanos Fernando y Erika por estar siempre pendientes de mí. A mi querido sobrino Erick por alegrarme en los momentos difíciles.

También dedico este logro a mi compañero de vida Sebastián Guartatanga, quién ha sido mi motor, apoyo e inspiración durante todo este tiempo para poder alcanzar esta meta.

A nuestro hijo Mathias, el regalo más hermoso que me dio la vida, tus llenas todos los días de luz y alegría, verte crecer me inspira a seguir superándome para dar todo lo mejor de este mundo. Tú hijo mío y tu papito hacen de mi vida todo un sueño.

No pueden faltar ustedes abuelitos, Gonzalo Olmedo, Elizabeth Briones, Luis García y Ligia García. Este logro también es de ustedes, ya que han sido ejemplo de vida y superación.

A todos ustedes les dedico con mucho amor este trabajo de investigación. GRACIAS por ser parte de mi vida.

Ligia Elizabeth Olmedo García

AGRADECIMIENTO

Tras haber concluido con este proceso de titulación quiero agradecer a Dios y la Virgen María por haberme permitido llegar hasta donde he llegado, por haber cuidado y guiado mi camino para cumplir poco a poco cada una de mis metas.

A mis Padres, Hector y Victoria, porque sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible, a mi hijo Thiago y a su papá por impulsar mi vida y estar para mí siempre.

A mi amigo Fernando, gracias por ser el mejor amigo que la vida me pudo dar, gracias por tus consejos, por tu ayuda, por tu apoyo y por todas las ganas que me enseñaste a tener para poder lograr todo lo que me proponga, eres parte de mi familia.

Un agradecimiento especial a la Universidad Politécnica Salesiana por la formación que recibí durante todo este trayecto.

A los docentes de esta institución principalmente a mi tutor de tesis, el Ing. Jorge Amaya. Gracias por las enseñanzas, por la paciencia, y la sabiduría que compartió con nosotros para poder culminar con este proceso.

María Cristina Astudillo Fajardo

AGRADECIMIENTO

Agradezco a muchas personas por este gran logro:

A Dios por estar presente en mi vida, darme salud y sobre todo llenarla de bendiciones.

A mis padres Felipe Aurelio Olmedo Briones y Norma Piedad García García por ser ese pilar fundamental en mi vida para cumplir esta primera meta “Mi carrera universitaria”.

A mis hermanos y sobrino Luis Fernando, Erika Dayana y a Erick Aurelio, quienes siempre están a mi lado llenando mi vida de dicha.

También agradezco a mí amado esposo Eduardo Sebastián Guartatanga Caivinagua y a mi querido hijo Mathias Sebastián, quienes han sido mi fuerza y apoyo para culminar este proyecto.

Quiero agradecer a mis abuelitos, Gonzalo Olmedo y Elizabeth Briones, Luis García y Ligia García. Aunque abuelita Ligia no estás en este momento conmigo siempre estarás presente en mi vida. Ustedes son esa alegría que nunca se apaga. A toda mi familia tíos, tías, primos y a ustedes familia política que estuvieron apoyándome y alentándome,

Gracias

A la Universidad Politécnica Salesiana, a todos los docentes de la carrera y en particular a mi tutor, Ing. Jorge Amaya, por haberme brindado todo el apoyo necesario para poder culminar con este trabajo de investigación.

Ligia Elizabeth Olmedo García

RESUMEN

La presente investigación tuvo como propósito la producción del polímero poli (3 hidroxibutirato) empleando aceite usado de palma como materia inicial. Este aceite se caracterizó mediante métodos físico-químicos obteniendo los siguientes resultados: densidad (0.939g/ml), pH (5.5), viscosidad cinemática a 40 °C (200.97 mm²/s), viscosidad dinámica a 40°C (0.1869 N*s/m²), índice de saponificación (196.35 mgNaOH/g), índice de acidez (1.25 mgNaOH/g), y porcentaje de humedad (0.3%). También, se realizó el proceso de transesterificación del aceite dando como resultado 1140ml de glicerina a la cual se le efectuó una purificación en cuatro etapas: acidificación (1510 ml glicerol con un pH=3), neutralización (1485 ml de glicerol con un pH=7), destilación (1276ml de glicerol), y decoloración (1595ml de glicerol) consiguiendo glicerol al 80.13%, mismo que se empleó como fuente de carbono en conjunto con la cepa bacteriana *Bacillus megaterium* para realizar el proceso fermentativo bajo condiciones controladas (pH=7, temperatura= 35°C, agitación= 200rpm) obteniendo 40.30 g de biomasa seca. A partir de esta biomasa se ejecutó la extracción del polímero usando la metodología de dispersión de cloroformo e hipoclorito de sodio alcanzando 30.45g de poli (3 hidroxibutirato) (P3HB), que representa un 60.24% de porcentaje de recuperación del polímero. Este polímero se lo estructuró a un film plástico para poder realizar la caracterización física determinando que su densidad es de 0.9156 g/ml, es insoluble en agua, etanol, metanol y acetona, ópticamente es un plástico translucido y mecánicamente semirrígido y flexible. Además, se analizó la degradabilidad del plástico mediante el método de gravimetría usando la normativa LAB-GYE-ME-651 BASADO EN COVENIN 1155 DETERMINCIÓN DE CENIZA dando como resultado un porcentaje de degradación del 99.95%, es decir se degrada casi en su totalidad. Finalmente, se realizó un análisis de factibilidad empleando el método costo-beneficio concluyendo que la producción

del poli (3 hidroxibutirato) no es factible debido a sus altos costos de producción (1kg de polímero a \$983.96).

Palabras clave: residuo, glicerol, producción, biopolímero, *Bacillus megaterium*, polihidroxibutirato.

ABSTRACT

The purpose of this research was the production of the poly (3 hydroxybutyrate) polymer using used palm oil as starting material. This oil was characterized by physical-chemical methods obtaining the following results: density (0.939g / ml), pH (5.5), kinematic viscosity at 40 °C (200.97 mm² / s), dynamic viscosity at 40 ° C (0.1869 N * s / m²), saponification index (196.35 mgNaOH / g), acid index (1.25 mgNaOH / g), and humidity percentage (0.3%). Also, the oil transesterification process was carried out, resulting in 1140 ml of glycerin, which was purified in four stages: acidification (1510 ml glycerol with a pH = 3), neutralization (1485 ml of glycerol with a pH = 7), distillation (1276ml of glycerol), and decolorization (1595ml of glycerol) obtaining glycerol at 80.13%, which was used as a carbon source in conjunction with the bacterial strain *Bacillus megaterium* to carry out the fermentation process under controlled conditions (pH = 7, temperature = 35 ° C, stirring = 200rpm) obtaining 40.30 g of dry biomass. From this biomass, the extraction of the polymer was carried out using the chloroform and sodium hypochlorite dispersion methodology, reaching 30.45g of poly (3 hydroxybutyrate) (P3HB), which represents a 60.24% recovery percentage of the polymer. This polymer was structured into a plastic film to be able to carry out the physical characterization, determining that its density is 0.9156 g / ml, it is insoluble in water, ethanol, methanol and acetone, optically it is a translucent and mechanically semi-rigid and flexible plastic. In addition, the degradability of the plastic was analyzed by the gravimetry method using the standard LAB-GYE-ME-651 BASED ON COVENIN 1155 DETERMINATION OF ASH, resulting in a degradation percentage of 99.95%, that is, it degrades almost entirely. Finally, a feasibility analysis was carried out using the cost-benefit method, concluding that the production of poly (3 hydroxybutyrate) is not feasible due to its high production costs (1kg of polymer at \$ 983.96).

Keywords: residue, glycerol, production, biopolymer, *Bacillus megaterium*, polyhydroxybutyrate.

ÍNDICE GENERAL

1	CAPÍTULO: INTRODUCCIÓN	1
1.1	Problemática	1
1.2	Antecedentes	1
1.3	Justificación	3
1.4	Objetivos	4
1.4.1	Objetivo General	4
1.4.2	Objetivos Específicos	4
1.5	Aceite de palma	5
1.6	Producción de aceite de palma en Ecuador.....	5
1.6.1	Reutilización de aceites de palma	6
1.6.2	Propiedades fisicoquímicas del aceite de palma	7
1.7	Transesterificación de aceites usados	8
1.7.1	Biodiesel como producto de la transesterificación	9
1.7.2	Glicerina como subproducto de la transesterificación	9
1.8	Purificación de la glicerina	9
1.8.1	Biotransformaciones del glicerol	10
1.9	Producción del polihidroxitirato	11
1.9.1	Polihidroxicanoatos PHA.....	11
1.9.1.1	Polihidroxitirato PHB	11
1.9.1.2	Propiedades físico-químicas del poli (3-hidroxitirato) P3HB... 12	

1.9.2	Microorganismos (bacterias) productores de polihidroxi butirato PHB	12
1.9.2.1	Biosíntesis de PHA en microorganismos.....	13
1.9.3	Microorganismo empleado para la producción de PHB	15
1.9.3.1	<i>Bacillus megaterium</i>	15
1.9.4	Proceso fermentativo.....	17
1.9.5	Extracción y purificación de PHB	17
2	CAPÍTULO: MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1	Caracterización fisicoquímica del aceite de palma usado.....	22
2.1.1	pH.....	22
2.1.2	Densidad.....	23
2.1.3	Viscosidad cinemática y dinámica	24
2.1.4	Índice de saponificación.....	25
2.1.5	Índice de acidez.....	27
2.1.6	Porcentaje de humedad	29
2.2	Obtención de la glicerina	30
2.2.1	Proceso de filtración.....	30
2.2.2	Preparación del metóxido de sodio	31
2.2.3	Proceso de transesterificación del aceite.....	31
2.2.4	Proceso de sedimentación y extracción de la glicerina.....	33
2.2.5	Análisis FTIR de la glicerina	33
2.3	Purificación de la glicerina	34
2.3.1	Acidificación.....	35

2.3.2	Neutralización	35
2.3.3	Destilación	36
2.3.4	Decoloración	37
2.4	Propiedades físico-químicas del glicerol	38
2.4.1	Color.....	38
2.4.2	pH.....	39
2.4.3	Absorbancia	39
2.4.4	FTIR del glicerol.....	40
2.4.5	Densidad.....	40
2.4.6	Viscosidad cinemática y dinámica.....	41
2.5	Proceso fermentativo	42
2.5.1	Preparación de medios de cultivos.....	42
2.5.2	Activación de la bacteria " <i>Bacillus megatherium</i> ."	43
2.5.3	Identificación de la bacteria <i>Bacillus megatherium</i>	44
2.5.4	Fermentación con <i>Bacillus megatherium</i>	44
2.6	Determinación de biomasa.....	46
2.6.1	Peso húmedo	47
2.6.2	Peso seco	47
2.7	Proceso de extracción y purificación del polihidroxi- butirato (PHB).....	47
2.8	Cálculo del rendimiento y porcentaje de recuperación del P3HB	50
2.9	Estructuración del biopolímero (P3HB)	50
2.10	Propiedades físico químicas y degradación del P3HB	51

2.10.1 Densidad.....	51
2.10.2 Solubilidad	52
2.10.3 Mecánicas.....	52
2.10.4 Ópticas	53
2.10.5 Degradabilidad	53
2.11 Análisis estadístico del producto	53
2.12 Análisis de factibilidad en la producción del PHB	54
3 CAPÍTULO: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
3.1 Caracterización físico-química del aceite de palma usado	55
3.2 Análisis de la glicerina proveniente del proceso de transesterificación e interpretación del espectro (Espectroscopia infrarroja FTIR).....	57
3.3 Análisis del proceso de purificación del glicerol y caracterización físico-química.....	59
3.3.1 Acidificación	59
3.3.2 Neutralización	59
3.3.3 Destilación	60
3.3.4 Decoloración e interpretación del espectro del glicerol (Espectroscopia infrarroja FTIR)	61
3.3.5 Caracterización físico-química del glicerol	62
3.4 Análisis del proceso fermentativo para la producción del polihidroxibutirato	

3.5	Caracterización física, interpretación del espectro del P3HB (Espectroscopia infrarroja FTIR), estructuración y degradabilidad	63
3.5.1	Caracterización física del P3HB	63
3.5.2	Interpretación del espectro del P3HB en polvo.	64
3.5.3	Interpretación del espectro del film plástico de P3HB.	65
3.5.4	Estructuración del biopolímero	65
3.5.5	Lectura del análisis de la degradabilidad	66
3.6	Análisis del estadístico del producto	68
3.6.1	Resultados de la biomasa obtenida, extracción, purificación y rendimiento del polihidroxibutirato (PHB)	68
	<i>Extracción, purificación y rendimiento del polihidroxibutirato (PHB)</i>	<i>69</i>
3.6.2	Análisis estadístico descriptivo de la biomasa húmeda, biomasa seca, biomasa total, polímero obtenido, rendimiento y porcentaje de recuperación del polímero	72
3.7	Análisis de factibilidad del PHB	77
3.8	Discusión	82
4	CAPÍTULO: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	84
4.1	Conclusiones	84
4.2	Recomendaciones	86
5	BIBLIOGRAFÍA	87
6	ANEXOS	93
6.1	Glicerina obtenida a partir de aceite de palma usado	93

6.2	Interpretación de resultados IR de la glicerina	93
6.3	Interpretación de resultados IR del glicerol decolorado	94
6.4	Biomasa húmeda y seca obtenida	96
6.5	Interpretación IR del P3HB	98
6.6	Lectura del análisis de degradabilidad	99
6.7	Link y resultado de las encuestas realizadas a las empresas.....	104
6.8	Costos de inversión, costos fijos y costos variables y valor de nuestro producto	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Propiedades físico químicas del aceite de palma.....	7
Tabla 2	Propiedades térmicas y mecánicas del polihidroxitirato.	12
Tabla 3	Métodos de extracción y purificación.....	18
Tabla 4	Dosificación para la preparación de metóxido de sodio.....	31
Tabla 5	Dosificación para realizar el proceso de transesterificación.....	32
Tabla 6	Composición del caldo nutritivo.....	42
Tabla 7	Composición de TSA.....	42
Tabla 8	Nutrientes necesarios para el fermento.....	45
Tabla 9	Relación empleada para la extracción y purificación del PHB.	48
Tabla 10	Resultados de la caracterización fisicoquímica del aceite de palma usado.	55
Tabla 11	Resultados de la caracterización físico- química del glicerol.....	62

Tabla 12 Caracterización física del P3HB.	63
Tabla 13 Condiciones de análisis para la degradación del plástico.	67
Tabla 14 Valores obtenidos de biomasa húmeda y seca.	69
Tabla 15 Valores empleados para la obtención del poli 3 hidroxibutirato.	70
Tabla 16 Análisis estadístico descriptivo.	73
Tabla 17 Pruebas de normalidad.	73
Tabla 18 Resumen de las encuestas realizadas al mercado.	77
Tabla 19 Valores de la inversión inicial y costos fijos.	78
Tabla 20 Indicadores financieros del 1° escenario.	78
Tabla 21 Flujo proyectado para 5 años en el escenario pesimista.	79
Tabla 22 Indicadores financieros del 2° escenario.	79
Tabla 23 Flujo proyectado para 5 años en el escenario normal.	80
Tabla 24 Indicadores financieros del 3° escenario.	81
Tabla 25 Flujo proyectado para 5 años en el escenario optimista.	81

ÍNDICE DE TABLA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Estructura del $(C_4H_6O_2)_n$ Poli (3hidroxibutirato).	2
Ilustración 2 Reacción de transesterificación del aceite.	9
Ilustración 3 Ruta general de síntesis de polihidroxibutirato (PHB) a partir acetil-CoA.	15
Ilustración 4 Medición con tiras de pH.	22
Ilustración 5 Medición de la densidad del aceite.	24

Ilustración 6 Viscosímetro rotacional.	25
Ilustración 7 Sistema del índice de saponificación.	26
Ilustración 8 Proceso del índice de saponificación del aceite de palma usado. a) valoración de la muestra con HCL, b) valoración del blanco con HCL, c) producción del viraje de rosa intenso a incoloro.	27
Ilustración 9 Proceso del índice de acidez del aceite de palma usado. a) Titulación del aceite de palma usado con KOH, b) Viraje de color transparente a incoloro....	28
Ilustración 10 Proceso para obtener el porcentaje de Humedad.	30
Ilustración 11 Proceso de filtración.....	30
Ilustración 12 Preparación del metóxido de sodio.	31
Ilustración 13 Proceso de transesterificación del aceite.....	32
Ilustración 14 Proceso de sedimentación (biodiesel-glicerina).....	33
Ilustración 15 Análisis IR de la muestra.	34
Ilustración 16 Proceso de acidificación del glicerol.	35
Ilustración 17 Proceso de neutralización del glicerol.....	36
Ilustración 18 Proceso de destilación, a) equipo de destilación simple, b) productos procedentes de la destilación el glicerol y el metanol	37
Ilustración 19 Proceso de decoloración del glicerol, a) glicerol antes de decolorar, b) glicerol en proceso de decoloración, c) glicerol decolorado.	38
Ilustración 20 Colorímetro.	39
Ilustración 21 Thermo Spectronic GENESYS 20.....	40
Ilustración 22 Medición de la densidad del glicerol.	41
Ilustración 23 Viscosidad del glicerol medida en el equipo.....	41
Ilustración 24 Bacterias recién activadas.	43

Ilustración 25 <i>Bacillus megaterium</i> después de un día de incubación: a) cajas petri, b) tubos de ensayo.	44
Ilustración 26 Medios de cultivo autoclavados.	45
Ilustración 27 Inoculación de los medios para la fermentación.	46
Ilustración 28 Fermentación de nuestra bacteria en el orbital.	46
Ilustración 29 Biomasa, a) biomasa húmeda, b) biomasa seca.	47
Ilustración 30 Digestión de la biomasa húmeda y seca con cloroformo e hipoclorito de sodio.	48
Ilustración 31 Separación de las tres fases mediante el método de decantación.	49
Ilustración 32 Se puede ver en esta fotografía en la parte a) evaporación del cloroformo y b) precipitación del PHB en metanol frío.	49
Ilustración 33 a) Producto secándose b) biopolímero obtenido.	50
Ilustración 34 a) Proceso de dilución del P3HB en polvo con el cloroformo, b) retiro del recipiente del biopolímero seco.	51
Ilustración 35 Espectro IR de $C_3H_8O_3$ (1, 2,3 trihidroxipropano).	58
Ilustración 36 Espectro del $C_3H_8O_3$ (1, 2,3-propanotriol) después de la decoloración.	61
Ilustración 37 Vista en el microscopio del <i>B. Megaterium</i>	63
Ilustración 38 Espectro del biopolímero poli (3-hidroxibutirato).	64
Ilustración 39 Espectro FTIR del Poli (3hidroxibutirato) plástico.	65
Ilustración 40 Polímero con diferentes solventes: a) polímero con etanol, b) polímero con acetona, c) polímero con acetato de butilo, d) polímero sin disolvente, e) polímero con cloroformo.	66
Ilustración 41 Poli (3 hidroxibutirato) total obtenido.	71

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Glicerina obtenida en el proceso de transesterificación.	57
Gráfica 2 Resultado del proceso de acidificación.	59
Gráfica 3 Resultados del proceso de neutralización.	60
Gráfica 4 Resultado del proceso de destilación.	60
Gráfica 5 Resultado del proceso de decoloración.	61
Gráfica 6 Resultado de la prueba gravimétrica en porcentajes.	67
Gráfica 7 Resultado de la prueba gravimétrica en gramos.	68
Gráfica 8 Biomasa obtenida con sus respectivos valores de media aritmética, mediana, media geométrica y varianza.	69
Gráfica 9 Biomasa empleada y polímero obtenido.	71
Gráfica 10 Histogramas de la distribución gaussiana.	74
Gráfica 11 Regresión lineal de la biomasa húmeda, seca, polímero obtenido, rendimiento y porcentaje de recuperación.	75
Gráfica 12 Diagramas de caja de la biomasa húmeda, seca, polímero obtenido, rendimiento y porcentaje de recuperación.	76

1 CAPÍTULO: INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática

En la actualidad, la contaminación es un problema que se vive a diario a nivel mundial. Gran parte de los factores que contribuyen a esta es la mala utilización de los plásticos sintéticos debido a su lenta descomposición en los ecosistemas, los cuales han logrado causar a través de los años un deterioro notable al medio ambiente y que van en aumento tanto en países desarrollados o en vías de desarrollo. Es por eso que frente a dicho problema es necesario la utilización de nuevas tecnologías y mecanismos para la creación de nuevos materiales que den la oportunidad a residuos de sustancias como el aceite usado de palma, como fuente de carbono para la creación de glicerol que al entrar en contacto con microorganismos como *Bacillus Megaterium* es capaz de almacenar dentro de su citoplasma poliésteres, dando lugar a un nuevo biopolímero denominado P3HB, el cual posee características físicas similares a un plástico sintético con la diferencia de que este es completamente biodegradable.

Por tal motivo, este proyecto está basado principalmente en el análisis y reutilización de aceite de palma usado en el proceso de fritura con la finalidad de que a través del proceso de transesterificación se pueda obtener el subproducto glicerol que será utilizado como fuente de carbono para producir el biopolímero, polihidroxibutirato (PHB), que en un futuro se puede presentar como una de las alternativas sostenibles en la disminución de la contaminación.

1.2 Antecedentes

Como es de conocimiento general, el plástico es la tercera aplicación más extendida del petróleo después de la energía y el transporte. Los plásticos derivados del petróleo llamados también polímeros sintéticos por su creciente consumo generan una fuente significativa de

contaminación ya que estos no son biodegradables convirtiéndose en una problemática ambiental de gran importancia. Por tal motivo se ve necesaria la idea de crear un biopolímero que pueda sustituir a los plásticos derivados del petróleo.

Estos biopolímeros se pueden producir mediante varios microorganismos. En 1927 se reportó que algunas bacteria del género *Bacillus* debido a la fermentación son capaces de producir bioplásticos (Jimenez Lopez Jimmy Andres, 2011) y es por este motivo que los biopolímeros se los llama de manera genérica polihidroxicanoatos (PHA). Actualmente, los biopolímeros polihidroxibutirato (PHB) y polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato P(3HBco3HV) se producen a escala comercial. (González García, Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013, p.78)

En la ilustración 1 se observa la estructura del poli (3hidroxibutirato) $(C_4H_6O_2)_n$ que es un biopoliéster de la familia de los polihidroxicanoatos (PHAs). Es un biopolímero que ha cobrado gran importancia en el campo de la industria durante los últimos años por sus propiedades físico-químicas y ha sido considerado como posible sustituto de plásticos derivados del petróleo como, el polietileno y el polipropileno, pero sus altos costos de producción los hacen en la actualidad poco competitivos. Los costos de producción de estos biopolímeros dependen principalmente de la materia prima (sustratos utilizados) y del consumo energético. (Jiménez Lopez Jimmy Andres, 2011)

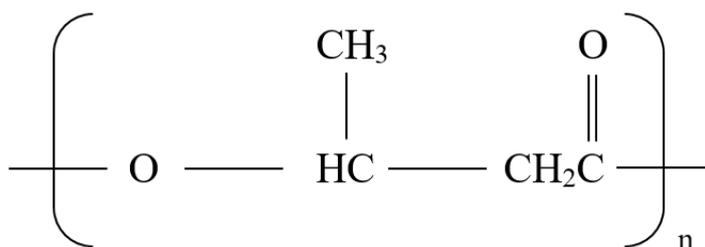


Ilustración 1 Estructura del $(C_4H_6O_2)_n$ Poli (3hidroxibutirato).

Fuente: (MS. Gezira de Ávila, 2014)

Actualmente, para la obtención de este biopolímero (polihidroxiбутirato) hay diversas formas. Una de ellas es a partir el subproducto glicerol proveniente principalmente de la transesterificación de aceites usados de palma. Aunque este compuesto en estado puro es utilizado en diversas industrias tales como: la farmacéutica, la alimenticia, la cosmética, etc. La sobreproducción acoplada a la producción de biodiesel hace que la oferta de glicerol sea mayor que la demanda. (Ramos F; Estrada V; Marcelo A; Villar M y Diaz M, 2014)

1.3 Justificación

En la actualidad, la mala gestión de los aceites usados es un grave problema ambiental debido a que contiene características tóxicas, baja biodegradabilidad, tienden a bioacumularse, y cada vez es más su volumen de producción. Estos suelen ser liberados a los cuerpos de agua, suelo o inclusive quemados hacia la atmósfera sin un tratamiento previo, lo que produce efectos nocivos en la salud humana y en los ecosistemas.

El aceite de palma presenta diferentes alteraciones ambientales debido a que sus extensas plantaciones pueden resultar agresivas para el suelo en el que son cultivadas y al mismo tiempo se puede ocasionar incendios que exterminan flora y fauna.

Según los datos de ETAPA, al momento el Programa recolecta aproximadamente 40.000 galones de aceite usado por mes, los cuales se envían a la Fundación ECOTECNO adscrita a HOLCIM, en donde se realiza una destrucción térmica de los desechos con el aval de la Entidad Ambiental de Control local y regional. Este valor equivale a recolectar el 57 % del aceite que se genera en el cantón de Cuenca.

Otro de los problemas que afecta al medioambiente es el uso excesivo del plástico ya que este es realizado a partir del petróleo y no es de fácil degradación. Además, actúa como un imán de sustancias tóxicas como el DDT o los PCB. Esta contaminación ha aumentado un

190% llegando al mar y matando a más de un millón de aves marinas y unos 100.000 mamíferos y tortugas marinas cada año.

Por este motivo se ha propuesto desarrollar el polihidroxitirato, que es un tipo de plástico biodegradable y amigable con el medio ambiente. Además, se estaría empleando una materia prima que procede de la transesterificación de aceites usados para la producción de biodiesel. Este subproducto es el glicerol que es otra problemática ya que en producción a gran escala del biodiesel se produce este residuo y no saben cómo emplearlo. Por esta razón se han hecho estudios en los que se puede emplear el glicerol como materia prima para sintetizar otros productos amigables con el ambiente tales como: 1,3-propanodiol, n-butanol, 2,3-butanodiol, ácido cítrico, ácidos docosahexaenoico (DHA), y eicosapentaenoico (EPA), lípidos y polihidroxicanoatos (PHA). Esto se puede realizar mediante procesos fermentativos empleando bacterias, hongos o microalgas que utilizan este producto como fuente única o complementaria de carbono. Estas síntesis pueden ser empleadas en condiciones aeróbicas, anaeróbicas o condiciones de microaerofilia (atmósferas con un 5 % de oxígeno y entre 5 y 10 % de dióxido de carbono). (Lafuente Aranda, 2017)

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Obtener polihidroxitirato (PHB) a partir del subproducto glicerol procedente de la transformación de aceites usados de palma a biodiesel.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Analizar las características físico-químicas del aceite de la palma.
- Obtener el subproducto glicerol por medio de la transesterificación de aceites usados de palma.
- Purificar el glicerol obtenido en el proceso anterior por acidificación y destilación.

- Fermentar el glicerol mediante la bacteria *Bacillus megaterium* para la obtención del PHB.
- Analizar las características físicas y degradabilidad del PHB
- Realizar un análisis estadístico del producto obtenido.
- Realizar una propuesta de factibilidad en la producción del PHB.

1.5 Aceite de palma

La palma africana (*Elaeis guineensis*) es una especie que pertenece a la familia *Arecaceae*. El fruto de la palma es una drupa de cuyo mesocarpio se extrae del 40 al 50% de aceite. Esta especie botánica es la más cultivada para la extracción de aceites comestibles debido a su mejor rendimiento y bajos costos de producción. (Díaz Quishpe Miryam Lorena, 2016)

1.6 Producción de aceite de palma en Ecuador

Las primeras siembras realizadas en el Ecuador comenzaron en La Concordia ubicada en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. De este lugar empezó a expandirse a la provincia de Esmeraldas (Quinindé y Las Golondrinas) y Los Ríos (Luz de América, Patricia Pilar, Buena Fe, Quevedo). Por último se ha destinado la provincias de Orellana, Sucumbíos y San Lorenzo (área fronteriza con Colombia) para el desarrollo de este cultivo. (Díaz Quishpe Miryam Lorena, 2016)

En medio de sus vecinos más grandes, Colombia y Perú, el pequeño país, Ecuador, ha elegido al aceite de palma como su aceite vegetal preferido y en los últimos tiempos como un posible biocombustible debido a que en la actualidad Ecuador ocupa el segundo lugar en Latinoamérica después de Colombia en la producción de aceite crudo de palma y es el séptimo productor a nivel mundial. (Potter, 2010)

El aceite de palma se extrae del mesocarpio del fruto de la semilla de la palma africana *Elaeis guineensis* a través de procedimientos mecánicos. Está constituido por una mezcla de ésteres de glicerol (tri-glicéridos) y es fuente natural de carotenos y vitamina E. Gracias a su versatilidad dada por su composición de ácidos grasos saturados e insaturados y su aporte nutricional, el aceite de palma y las fracciones líquida (oleína) y sólida (estearina) son empleadas en la elaboración de mezclas de aceites y margarinas para mesa y cocina, grasas de repostería y confitería, entre otras. (Rincón & Martínez, 2009).

El Ecuador ocupa el segundo lugar en Latinoamérica en la producción de aceite crudo de palma y es el séptimo productor a nivel mundial, produciendo aproximadamente 480.000 toneladas anualmente de las cuales el consumo en el país es de 240.000 toneladas. (Potter, 2010)

1.6.1 Reutilización de aceites de palma

Para la reutilización del aceite de palma se toma en cuenta dos aspectos ambientales: la explotación mundial del aceite de palma como insumo renovable y la contaminación por el aceite de fritura desechado de grandes industrias y hogares ecuatorianos.

De acuerdo con datos de la compañía quiteña Arc y Pieper se desechan 54 millones de litros de aceites usados al año en el Ecuador. El 70% (9,45 millones de galones) corresponde a uso doméstico y el resto (4,05 millones) al sector automotor e industrial. (El Comercio, 2018) Este sistema de reutilización de aceites usados (según ETAPA EP, 2021 Cuenca recolecta aproximadamente 40.000 galones de aceite usado por mes; los cuales se envían a la Fundación ECOTECNO adscrita a HOLCIM, que utiliza el aceite mineral usado en producción de cemento y en co-procesamiento de desecho, en donde se realiza una destrucción térmica de los desechos con el aval de la Entidad Ambiental de Control local y regional) ayuda a solucionar el daño del suelo producido por la siembra de la palma debido a los importantes daños ambientales que ocasionan. (María & Álvarez, 2015). Según la FAO

a lo largo del tiempo ha estudiado las ventajas y desventajas de estas plantaciones en el mundo, evidenciando que prevalecen los efectos negativos como: pérdida de biodiversidad, incremento del cambio climático y contaminación del aire, destrucción y deterioro de hábitats naturales, erosión y pérdida del suelo para próximas plantaciones.(Guido Reinhardt, 2010)

1.6.2 Propiedades fisicoquímicas del aceite de palma

El aceite de palma contiene 49.3% de ácidos grasos saturados, 37% de ácidos grasos monoinsaturados, y 9.3% de ácidos grasos poliinsaturados, lo cual lo hace muy estable y poco oxidable. Es sólido o semisólido a temperatura ambiente y tiene un sabor suave. Por fraccionamiento del aceite de palma se obtiene la oleína de palma (líquido) y la estearina de palma (sólido).(Catalina, 2013)

Las características fisicoquímicas principales del aceite crudo y refinado de palma se describen en la tabla 1 de acuerdo con la normativa nacional e internacional.

Tabla 1 Propiedades físico químicas del aceite de palma.

Parámetro	Aceite de palma	Normativa
Densidad	0,891 – 0,914	NTE INEN 1640
Viscosidad dinámica	37,8 Cp	-----
Porcentaje de Humedad	0,5%	NTE INEN 1640
Índice de Saponificación	Mínimo: 180mgNaOH/g Maximo:270 mgNaOH/g	NTE INEN 1640

Índice de Acidez	0,2mgNaOH/g	NTE INEN 1640
------------------	-------------	------------------

Fuente: (Serna & Betancourt, 2015)

1.7 Transesterificación de aceites usados

La esterificación o transesterificación de aceites genera grandes beneficios fomentando un desarrollo sostenible debido a que es un combustible renovable de baja toxicidad, es decir, amigable con el ambiente y adecuado para reemplazar el diésel proveniente de combustibles fósiles no renovables como es el petróleo. (Marcela, 2006)

En la ilustración 2 se observa el proceso de transesterificación el cual consiste en reemplazar el glicerol por un alcohol simple (metanol o etanol) para producir ésteres metílicos o etílicos de ácidos grasos. Este proceso permite disminuir la viscosidad del aceite, la cual es principalmente ocasionada por la presencia de glicerina en la molécula. La alta viscosidad del aceite impide su uso directo en motores a diésel, la cual se supera mediante el proceso de transesterificación. Para lograr esta reacción se requiere de temperaturas que oscilan entre 40 y 60°C, así como la presencia de un catalizador que puede ser la sosa o potasa cáustica (NaOH o KOH) respectivamente. (Saavedra, 2008)

En la reacción de transesterificación de un aceite o grasa animal, los triglicéridos reaccionan con un alcohol (metanol o etanol) produciendo ésteres (biodiesel) y glicerina. Para que la reacción transcurra a una velocidad adecuada es necesaria la presencia de un catalizador en el medio.

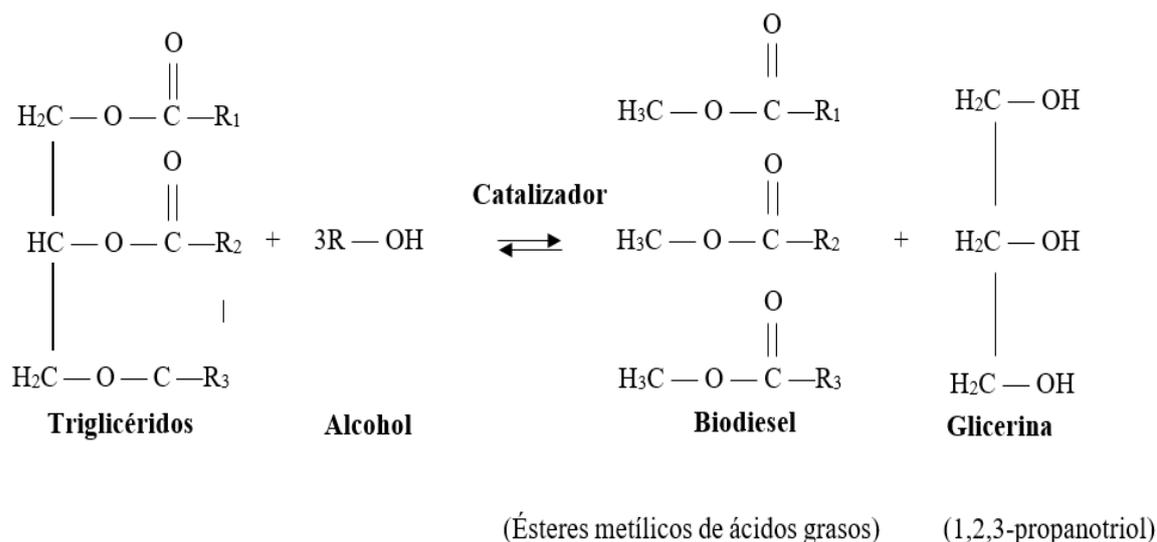


Ilustración 2 Reacción de transesterificación del aceite.

Fuente: (Pardal, 2012)

1.7.1 Biodiesel como producto de la transesterificación

El biodiesel corresponde a un combustible renovable derivado de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales obtenido a través de un proceso industrial simple de transesterificación del aceite vegetal o animal. (Tejeda & Monroy, 2013)

1.7.2 Glicerina como subproducto de la transesterificación

La glicerina o glicerol se encuentra formando parte de los aceites y grasas vegetales y animales. En la actualidad, el precio del glicerol ha descendido considerablemente debido a su excedente como resultado de la producción de biodiesel y de la industria oleoquímica. (Lafuente Aranda, 2017)

1.8 Purificación de la glicerina

La purificación de la glicerina se realiza en cuatro etapas: acidificación, neutralización, destilación y decoloración.

Acidificación o adición con ácido clorhídrico (HCl).- En la acidificación se precalienta la muestra y se mezcla con una solución de HCL 1N hasta llegar a un pH=3 para eliminar

sales, jabones y grasas, facilitando las sucesivas operaciones de separación del glicerol de la fase de metiléster.(Romero et al., 2012)

Neutralización.- La fase de glicerol se neutraliza hasta $\text{pH}=7$ con una solución de hidróxido de sodio para eliminar los ácidos grasos que quedan disueltos en la misma.(Romero et al., 2012)

La destilación. - Es el método más comúnmente utilizado para purificar la glicerina. Esta metodología produce glicerina de alta pureza y con altos rendimientos sin embargo, la destilación de la glicerina es un proceso de alto consumo energético debido a su alta capacidad calorífica, lo que demanda un alto suministro de energía para su vaporización.(Alexander Posada-Duque & Ariel Cardona-Alzate, 2010)

Decoloración. - Como etapa final del proceso, el glicerol purificado se decolora con carbón activado, peróxido de hidrógeno, bentonitas y otros. La glicerina purificada pasa de color marrón claro y aspecto cristalino hasta lograr un tenue color ámbar y de aspecto cristalino brillante.(Romero et al., 2012)

1.8.1 Biotransformaciones del glicerol

Biotransformación. - Suma de reacciones bioquímicas que operan sobre un XB (xenobiótico) a cargo de los sistemas enzimáticos de un organismo. Será pues el proceso de transformaciones metabólicas que sufre un XB a lo largo de su paso por un organismo. Este ha sido el proceso más estudiado para muchos xenobióticos en diferentes tipos de organismos (fundamentalmente microorganismos). (Fern & Cabeza, 2017)

Las células vivas pueden llevar a cabo reacciones favorables termodinámicamente en condiciones de concentración, temperatura, pH , y presión que difieren grandemente de las empleadas por el químico orgánico. La clave de este fenómeno reside en que virtualmente todos los procesos intracelulares están catalizados por enzimas.(Pilar, 2004)

1.9 Producción del polihidroxi butirato

1.9.1 Polihidroxi alcanoatos PHA

Los PHAs son comúnmente producidos por bacterias y son polímeros semicristalinos con un grado de cristalinidad 60 a 80 % sin embargo, en el citoplasma celular estos poliésteres son amorfos. Al momento de extraer el polímero una vez que las células son rotas ocurre un cambio rápido en la morfología del polímero pasando de amorfo a cristalino. Esto implica que los gránulos del polímero en el interior de la célula son muy pequeños y que la probabilidad de nucleación conlleva a una cristalización. (Alexandra et al., 2012)

Los biopolímeros o polihidroxi alcanoatos (PHA) son considerados una muy buena opción para reemplazar a los polímeros sintéticos que al ser obtenidos mediante la metabolización de microorganismos con sustratos de bajo costo económico y de fuentes reutilizables tienen características físicas similares a las de los plásticos que ya se encuentran en el mercado (polipropileno y polietileno). (Ana Carolina Lemos Delgado & Alexis Mina Cordoba, 2015)

1.9.1.1 Polihidroxi butirato PHB

El poli (3- hidroxibutirato) (P3HB o PHB) es uno de los PHA más comunes y conocidos, es quebradizo y rígido sin embargo, tienen propiedades mecánicas que lo asemejan al polipropileno con la discrepancia de que este polímero es biodegradable. (Rámirez & Sánchez, 2019)

El poli (3-hidroxibutirato) con fórmula molecular $(C_4H_6O_2)_n$ (Ver ilustración 1) es un termoplástico que puede ser obtenido mediante diferentes técnicas (extrusión e inyección). Tiene el punto de fusión de 180 °C y se lo puede usar con temperaturas que van desde -30 °C hasta 120°C. Se lo emplea para empaque de productos, cosas de aseo personal y otros. (Álvarez, 2015)

Los microorganismos más empleados para la producción del polihidroxitirato son las bacterias como: *Cupriavidus necator* y *Bacillus megaterium* cultivadas en condiciones de estrés nutricional o *Escherichia coli recombinante* y *Alcaligenes latus* que producen y acumulan PHB para poder crecer. (Labeaga, 2018)

Una de los beneficios de trabajar con la cepa bacteriana *Bacillus megaterium* según la literatura expuesta anteriormente, radica en que tienen la capacidad de poder sintetizar copolímeros de manera natural (sin adición de sustratos precursores) (González Gutiérrez, 2008) ya que al ser microorganismos *gram positivos* no poseen lipo-polisacaridos (LPS) por lo que son más convenientes para la producción y análisis del PHB. (Rámirez & Sánchez, 2019)

1.9.1.2 Propiedades físico-químicas del poli (3-hidroxitirato) P3HB

Según (Rámirez & Sánchez, 2019) el polihidroxitirato es un material termoplástico semicristalino y es un biopolímero con mayor punto de fusión. Tiene varias propiedades térmicas y mecánicas que se pueden observar a continuación en la siguiente tabla 2.

Tabla 2 Propiedades térmicas y mecánicas del polihidroxitirato.

Propiedades	Valor
Temperatura de fusión	179 °C
Temperatura de transición	4 °C
Módulo de Young	3.5 GPa
Fuerza tensil	40 MPa
Elongación	5%
Cristalinidad	50%

Fuente: (González García et al., 2013)

1.9.2 Microorganismos (bacterias) productores de polihidroxitirato PHB

Existen más de 250 microorganismos productores naturales de PHB, pero las principales limitaciones de las bacterias respecto a la producción natural de PHB a escala industrial son:

el complicado deterioro de las células para liberación de moléculas (lisis) para la extracción final del polímero, una baja densidad celular y un excesivo tiempo en alcanzar la máxima densidad. Además, para abaratar los costos de producción surge la necesidad de utilizar como sustratos o materia prima simple y/o barata, reutilizar los residuos de otras industrias. (Verlinden, Hill, Kenward, Williams, & Radecka, 2007)

Las bacterias utilizadas para la producción de PHA pueden ser divididas en dos grupos basados en las condiciones de cultivo para la biosíntesis de PHA. El primer grupo son bacterias que producen PHA en condiciones de limitación nutrientes esenciales como N, P, O, Mg, K o S y exceso de fuente de carbono. El segundo grupo se refiere a bacterias que no necesitan limitación de nutrientes y acumulan PHA durante su crecimiento. (Yáñez Díaz, 2013)

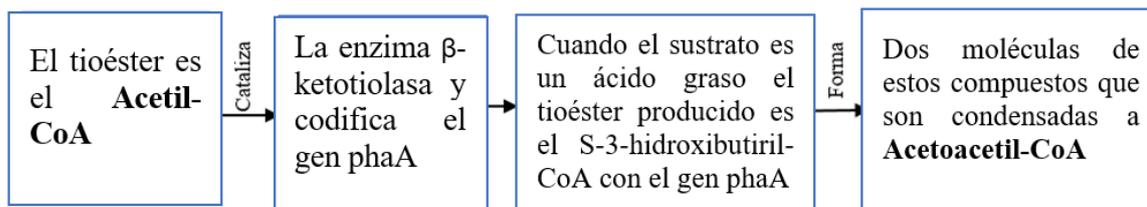
Actualmente, la producción de PHB es liderada por bacterias Gram negativas como *Cupriavidus necátor* (Chen, 2009) sin embargo, estos microorganismos contienen en su membrana exterior endotoxinas pirógenas de tipo lipopolisacáridos (LPS) que comúnmente se co-purifican junto con los PHB. Los LPS pueden causar reacciones inmunológicas haciendo que el PHB producido por bacterias Gram negativas sean indeseables para su utilización en el campo biomédico. Por otra parte, las bacterias Gram positivas como el género *Bacillus* no contienen LPS en su membrana, tienen un rápido crecimiento en sustratos económicos, toleran altas temperaturas, tienen altas presiones osmóticas y han sido utilizados para la producción industrial de PHB (Valappil, Boccaccini, Bucke, & Roy, 2007).

1.9.2.1 Biosíntesis de PHA en microorganismos

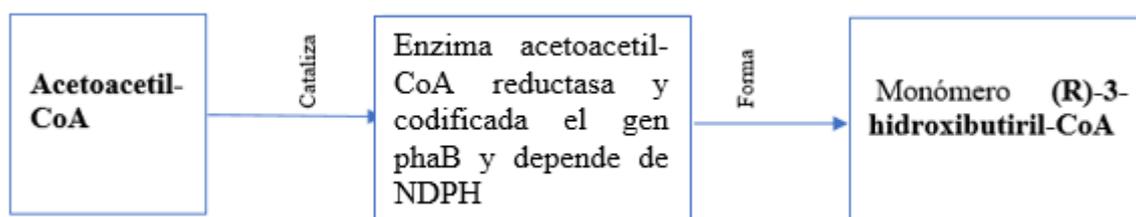
En la ilustración 3 se observa la ruta general de síntesis de polihidroxibutirato (PHB) a partir acetil-CoA el cual se puede dividir en tres etapas: 1) Condensación de dos moléculas de tioésteres catalizado por su respectiva enzima ketiolasas, 2) Reducción del Acetoacetyl-

CoA al monómero (R)-3-hidroxi-butiril-CoA catalizado por la enzima acetoacetyl-CoA reductasa, 3) Polimerización del monómero (R)-3-hidroxi-butiril-CoA catalizado por la enzima PHA sintetasa la cual es codificada con el gen phaC.

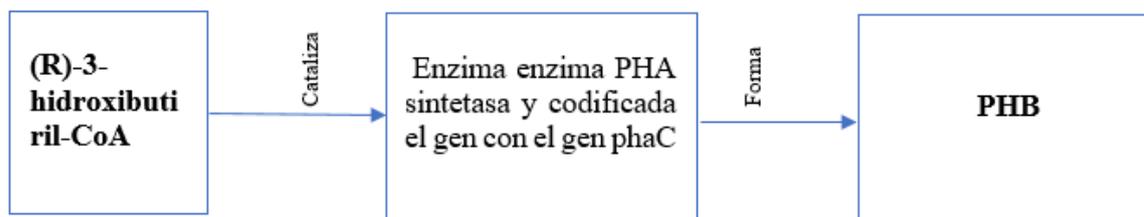
1. Condensación de dos moléculas de tioésteres catalizado por su respectiva enzima ketiolasas.



2. Reducción del Acetoacetyl-CoA al monómero (R)-3-hidroxi-butiril-CoA catalizado por la enzima acetoacetyl-CoA reductasa



3. Polimerización del monómero (R)-3-hidroxi-butiril-CoA catalizado por la enzima PHA sintetasa, la cual es codificada con el gen phaC



Se distinguen tres clases de PHA: 1) PHA scl “short chain length” o “longitud de cadena corta”, 2) PHA mcl “medium chain length” o “longitud de cadena media” y 3) PHA lcl “long chain length” o “longitud de cadena larga” donde la cadena lateral alquílica varía de 1 a 14 carbonos de acuerdo con las especificaciones del sustrato a emplear (fuente de carbono) y

las estructuras primarias del microorganismo. (Ana Carolina Lemos Delgado & Alexis Mina Cordoba, 2015)

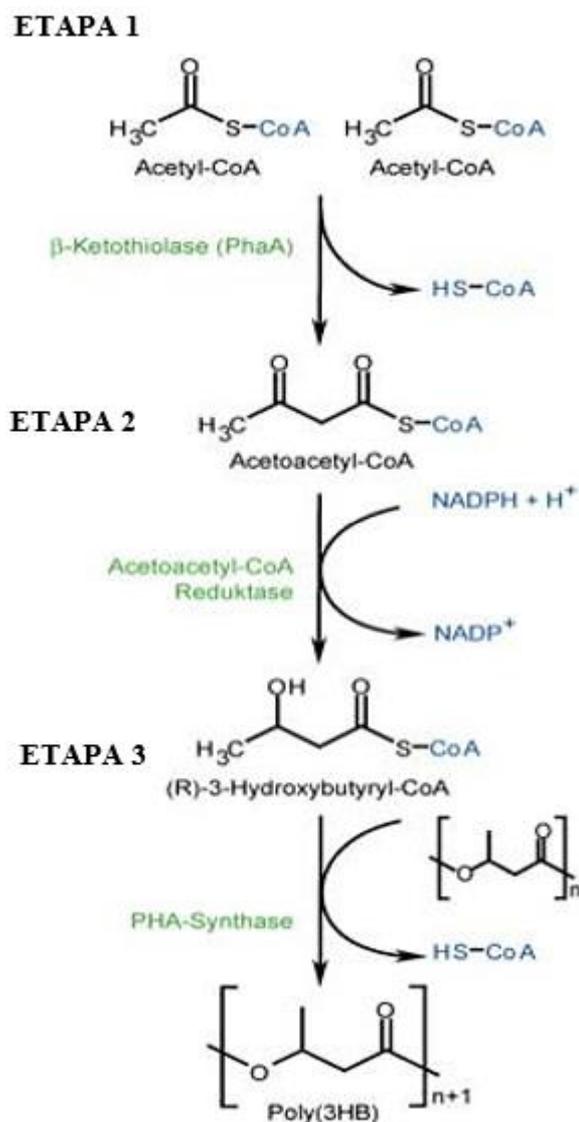


Ilustración 3 Ruta general de síntesis de polihidroxibutirato (PHB) a partir acetil-CoA.

Fuente: (Tanadchangsaeng & Yu, 2012)

1.9.3 Microorganismo empleado para la producción de PHB

1.9.3.1 *Bacillus megaterium*

B. Megaterium es un microorganismo que puede metabolizar el glicerol y tomarlo como fuente de carbono para poder vivir obteniendo a momento de su deterioro el

polihidroxibutirato PHB. Además, la bacteria *Bacillus megaterium* es un bacilo Gram positivo, aerobio, esporulado y en ocasiones se agrupa en cadenas cortas. Esta bacteria se encuentra comúnmente en suelos y tiene una gran variedad de usos en la industria entre los que sobresalen la producción de enzimas como la α y β -amilasa y la síntesis de compuestos como las ciclodextrinas. A más de su uso como probiótico acuático este microorganismo ha sido identificado como productor de PHB (López et al., 2012)

Debido a las enzimas que poseen todos los microorganismos gram positivos y sumándole las enzimas que tiene esta cepa bacteriana se convierte en un organismo muy versátil ofreciendo una gran facultad de supervivencia en diversos medios de cultivo.(Gustavo, 2005)

Esta cepa bacteriana *B. megaterium* se viene usando en varios procesos industriales debido a que puede crecer en diferentes medios y puede cambiar muy fácilmente su material genético para incrementar su producción. No es un organismo patógeno y tiene la facultad de producir poli (3-hidroxibutirato) (P3HB) en condiciones limitantes de nitrógeno, fosfatos, azufre o potasio. (Gustavo, 2005)

El compuesto de reserva más importante en esta especie es el poli (3-hidroxibutirato) (PHB) que se acumula en condiciones limitantes de nitrógeno, fosfatos, azufre o potasio.

De todas las bacterias Gram positivas, el género *Bacillus* sp., a más de tener la capacidad de acumular PHB puede hacerlo a partir de fuentes de carbono simple como glicerol. El inconveniente respecto a este tipo de microorganismos es la implementación industrial debido a la formación de esporas, cualidad que poseen cuando se encuentran en condiciones de cultivo desfavorables, las mismas que estimulan la formación de PHAs intracelulares en esta cepa.(Ramos F; Estrada V; Marcelo A; Villar M y Diaz M, 2014)

1.9.4 Proceso fermentativo

La fermentación es un proceso metabólico llevado a cabo por microorganismos bajo condiciones aeróbicas y anaerobias obteniendo una fuente de energía, la cual potencia el crecimiento de la biomasa, sintetiza y acumula el biopolímero (Bailon Neira, 2012) mediante factores como: la temperatura, pH, sustrato y medio de crecimiento con el fin de aumentar los rendimientos en el proceso de fermentación. La estrategia de alimentación es muy importante para obtener una alta densidad celular y una alta producción de PHB. (Álvarez-da Silva, 2016)

1.9.5 Extracción y purificación de PHB

La extracción y purificación del biopolímero son muy importantes en el proceso, ya que de eso depende el costo final del producto en el mercado.

Primeramente, se inicia separando las células bacterianas del medio de cultivo usado en la fermentación. Para esto se pueden usar diferentes procesos tales como: filtración o centrifugación. Luego, se seca la biomasa obtenida mediante un tratamiento térmico o un proceso de liofilización. Seguido, se extrae el polímero de la matriz celular, se separa el polímero de la biomasa no polimérica y se retira los residuos de lípidos y otros metabolitos secundarios producidos en la fermentación. (Ramos Farf, 2019)

Para lograr este proceso, por lo general se combinan diferentes técnicas de purificación que combinan la purificación con solventes orgánicos polares, la extracción con solventes, la digestión química de la biomasa, los métodos mecánicos para la lisis celular y los métodos enzimáticos entre otros. (Ramos Farf, 2019)

La selección de los métodos de purificación depende de varios factores: la cepa microbiana, el tipo de PHA producido, la carga intracelular de PHA, la pureza requerida del producto la cuál es determinada por la aplicación final que se le va a dar a este, la disposición

final de los productos químicos usados en el proceso como los solventes y el impacto del método de purificación en la calidad del polímero.

En la tabla 3 se hace una descripción de los principales métodos de extracción y purificación usados para el tratamiento de los PHAs producidos mediante fermentaciones bacterianas.

Tabla 3 Métodos de extracción y purificación.

Método	Tipo de solventes	Descripción
Extracción solvente	Disolventes de hidrocarburos clorados como cloroformo, 1,2-dicloroetano, cloruro de metileno o algunos carbonatos cíclicos como carbonatos de propileno y etileno.	El uso de disolventes destruye la morfología natural de los gránulos de PHA que es útil en ciertas aplicaciones como la producción de fibras fuertes. Pero contrario de algunos otros métodos de recuperación la extracción con solvente no degrada el polímero y puede ser útil para algunas aplicaciones médicas mediante la eliminación de endotoxinas que se pueden encontrar en bacterias Gram negativas.
	Los dioles (1,2-propanodiol: recuperación 79%, pureza 99,1%, 140°C).	
	Trioles acetalizados (glicerol formal: recuperación 85%, pureza 99,7%, 120°C)	
	Ésteres de ácido di- o tricarbóxico (succinato de dietilo: recuperación 90%, pureza 100%, 110 ° C)	
	Butirolactona (recuperación 90%, pureza 99,5%, 110 ° C).	
Métodos de digestión	Digestión por tensioactivos.	Los tensioactivos como el dodecilsulfato de sodio aniónico (SDS), alteran las células incorporándose a la membrana de la bicapa lipídica. La ventaja de este método proviene del hecho de que los tensioactivos lisan las células sin degradar los gránulos de polímero.

Digestión por hipoclorito de sodio	El hipoclorito de sodio causa una degradación severa de P (3HB) que resulta en una reducción del 50% en el peso molecular.
Digestión o dispersión por hipoclorito de sodio y cloroformo.	Al usar este método la degradación del polímero se reduce significativamente. Se sugirió que el cloroformo disuelve inmediatamente el P(3HB) liberado por el tratamiento con hipoclorito y, por lo tanto protege al polímero de la degradación obteniendo una pureza > 97% y recuperación 98 al 99%
Digestión de surfactante-hipoclorito.	Pureza del 98% y una recuperación del 86,6%. Las ventajas de este método son su bajo costo operativo y su degradación limitada de PHA,
Digestión de quelato-tensioactivo.	Pureza del 98,7% y un rendimiento de recuperación del 93,3% alta calidad de producto y baja contaminación ambiental, se produce un gran volumen de aguas residuales durante la recuperación.
Tratamiento quelato-peróxido de hidrógeno.	Tratamiento en un copolímero de poli-3-hidroxitirato / 3-hidroxitirato, pureza del 99,5%.
Disolución selectiva de la masa celular que no es PHA por protones.	Los resultados son los siguientes: P (3HB) pureza: 97,9% en peso y recuperación: 98,7% en peso.
Digestión enzimática	el uso de enzimas conduce a buenos niveles de recuperación, su alto costo es un gran inconveniente en esta tecnología.

Interrupción mecánica	Interrupción del molino de perlas	El molino de perlas consta de una cámara de trituración cilíndrica vertical que tiene un cilindro concéntrico con rotor de velocidad variable para agitación. Se puede lograr una interrupción completa en ocho pasadas también mostró que el diámetro de las perlas de molienda no afecta la tasa de rotura, pero la tasa depende en gran medida de la carga de perlas.
	Homogeneización a alta presión	La homogeneización a alta presión (HPH) es uno de los métodos más conocidos para la disrupción celular a gran escala. El rendimiento del homogeneizador depende de la concentración de biomasa.
	Interrupción mediante el uso de ultrasonidos	Este método se llevó a cabo en la extracción de PHA. Se estableció un modelo teórico que vincula la fracción de supervivencia celular, la potencia acústica, el índice de alteración del tamaño y el tiempo de operación.
	Centrifugación y tratamiento químico	Se alcanzó una pureza del 98,5% (p / p) y una recuperación de P (3HB) del 80% con un total de tres etapas de centrifugación.
Fluido supercrítico (SC)	Los fluidos supercríticos tienen propiedades fisicoquímicas únicas, como altas densidades y bajas viscosidades, que los hacen adecuados, capaces como disolventes de extracción. La recuperación obtenido mediante el uso de CO supercrítico (SC) ₂ es bastante similar a la recuperación obtenida por otros métodos: 89%.	
Usando fragilidad celular	El producto final consistió en 94% de P (3HB), 2% de proteína y 4% de masa residual no proteica.	

Clasificación de aire	Las primeras células se tratan con un sonicador ultrasónico para crear una suspensión de gránulos de polímero. Luego, la suspensión se liofiliza y se pulveriza, se clasifica al aire para producir una fracción fina del 38% y una fracción gruesa del 62%. A continuación, la fracción fina se somete a extracción con cloroformo seguida de precipitación con metanol para producir partículas de P (3HB) que tienen una pureza de aproximadamente el 95% o superior y un rendimiento de aproximadamente el 85% o superior.
Flotación por aire disuelto	Esta flotación está controlada por una interacción de las interacciones partícula-partícula, interacciones partícula-burbuja e hidrodinámica que conduce a la formación de agregados. Para controlar estas interacciones, se deben tener en cuenta las propiedades de las partículas como el tamaño de las partículas, la hidrofobicidad y la carga superficial (potencial zeta). Se obtuvo una pureza del 86% (p / p) para PHA en tres pasos consecutivos de flotación por lotes.
Liberación espontánea	Estos experimentos indicaron que podría ser posible el uso de un proceso de purificación más simple, como el centrifugado / lavado en un solo paso con agua destilada.

Fuente: (Jacquel, Lo, Wei, Wu, & Wang, 2008)

2 CAPÍTULO: MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención del PHB a partir del Glicerol como subproducto de la síntesis de biodiesel se utilizó como materia prima el aceite de palma usado suministrado por la micro empresa “Secos Mamita Michi” ubicada en la Ciudad de Cuenca al cual se realizó diferentes pruebas físico-químicas para analizar sus propiedades.

2.1 Caracterización fisicoquímica del aceite de palma usado

Para la caracterización fisicoquímica del aceite de palma se analizaron las siguientes variables: Absorbancia, densidad, viscosidad cinemática, índice de saponificación, índice de acidez; pH y porcentaje de humedad para comparar los resultados obtenidos con los valores establecidos en las diferentes normativas las cuales están descritas a continuación.

2.1.1 pH

Se define como una medida que expresa el grado de acidez o basicidad de una solución en una escala que varía entre 0 y 14. Se considera que una solución es ácida cuando el pH < 7 , solución básica cuando el pH > 7 y solución neutra cuando pH=7.(Goyenola, 2007)

Para realizar este procedimiento se utilizó tiras para medir el pH del aceite de palma usado. (Ver ilustración 4)



Ilustración 4 Medición con tiras de pH.

Fuente: Autores.

2.1.2 Densidad

La densidad es una propiedad de la materia que se define como la masa dividida por unidad de volumen. Se dice que la densidad es una medida que en el caso de los aceites es constante cuando este se encuentra puro y fresco, pero puede cambiar cuando este es tratado o por el tiempo que tenga.(OILM, 2011)

Para este procedimiento se utilizó como normativa la NTE INEN 2421 en la cual se establece los requisitos que debe tener el aceite de palma (NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2421, 2012), empleando el método descrito en la NTE INEN 0035 de aceites y grasas de origen animal y vegetal. (NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 0035, 2012).

Para el análisis y determinación de la densidad del aceite de palma usado se necesita, el picnómetro y la masa del mismo en tres situaciones diferentes, balanza digital y la materia prima.

En esta fase se calibró la balanza analítica para pesar el picnómetro seco y sin contenido (40,3gr). Posterior a esto, se enraso el picnómetro con agua destilada evitando la formación de burbujas en su interior. (141gr) Del mismo modo se enraso el picnómetro con la materia prima utilizada (132,5g) y se anotó las diferentes masas de las tres etapas. Este proceso se repitió 3 veces a fin de obtener un resultado más confiable. (Ver ilustración 5)



Ilustración 5 Medición de la densidad del aceite.

Fuente: Autores.

En la ecuación 1 se observa la fórmula que se usó para el cálculo de la densidad relativa.

$$\rho_{rel} = \frac{m_{pic+mues} - m_{pic}}{m_{pic+agua} - m_{pic}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

En donde:

m_{pic} : masa del picnómetro vacío

$m_{pic+agua}$: masa del picnómetro más agua destilada

$m_{pic+mues}$: masa del picnómetro más la muestra

2.1.3 Viscosidad cinemática y dinámica.

La viscosidad de las sustancias varía de forma importante con la temperatura y en menor grado con la presión; es por esto que si esta constante solo depende de temperatura y presión se la puede denominar líquidos con movimiento newtonianos, de lo contrario al no seguir esta relación proporcional son denominados fluidos no-Newtonianos. (Domingo, 2011)

Se determinó la viscosidad dinámica para lo cual se utilizó el viscosímetro rotacional marca Fungilab (Ver ilustración 6), se especificó los datos de densidad 0,93g/ml revoluciones 150 rpm y temperatura 40°C, se acopló el usillo número R2 con el muelle al eje del rotor y este se sumergió en 450ml de la muestra obteniendo resultados. Cabe destacar

que la unidad de medida es centipoise “cP”. El procedimiento se lo repitió por tres veces para sacar un promedio y mejorar la efectividad de los resultados.



Ilustración 6 Viscosímetro rotacional.

Fuente: Autores.

En la ecuación 2 se puede observar la fórmula de la viscosidad cinemática y la unidad es centi Stoke “cSt”:

$$\text{Viscosidad cinemática (centistoke)} = \frac{\text{viscosidad dinámica}}{\text{densidad}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

2.1.4 Índice de saponificación

El índice de saponificación se define como el peso en miligramos de hidróxido de potasio necesario para saponificar 1 gramo de grasa (Sánchez Paz & Figueroa Barrera, 2013). Se emplea el sistema de calcificación de los aceites y grasas si la grasa es pura ya que el índice de saponificación esta inversamente relacionado con la longitud de los ácidos grasos constituyentes de los glicéridos de la grasa. (Anco Tacuri, 2011)

Para realizar este procedimiento se utilizó: 1 matraz de fondo redondo de 100ml, 1 pipeta de 10 ml, 1 cocina, 2 refrigerantes, cuenta gotas, bureta de 25ml, baño de agua, 2 vasos de precipitado, espátula y balanza analítica.

Primeramente, se pesó y preparó los reactivos: 1,5 g de aceite de palma usado, 20 ml hidróxido potásico (KOH) 0,5 M en disolución etanólica, 6,1ml de ácido clorhídrico (HCl) 0,5 M y 2 gotas de fenolftaleína al 5%.

Procedimiento:

1) Se pesó 1,5g de aceite de palma usado y se le añadió 20 ml de una disolución etanólica de KOH (0,5 M) agregando una varilla agitadora y acoplando el matraz a un refrigerante poniéndolo a reflujo en un baño de agua (Ver ilustración 7) durante 30 min siempre con agitación continua. 2) Se preparó otro balón sin la muestra de aceite. Esta segunda preparación se utilizó como blanco. 3) Pasado el tiempo de reacción se enfriaron los balones y se añadió 2 ml de agua destilada y dos gotas de fenolftaleína en el contenido de cada balón para posteriormente valorar con HCl a 0,5 M, para esto se llenó la bureta con el HCl y se dejó caer sobre el balón poco a poco. El final de la valoración se dio cuando se produjo el viraje de rosa intenso a incoloro. 4) Por último se anotó los ml restados para calcular los ml de disolución gastados. (Ver ilustración 8)



Ilustración 7 Sistema del índice de saponificación.

Fuente: Autores.

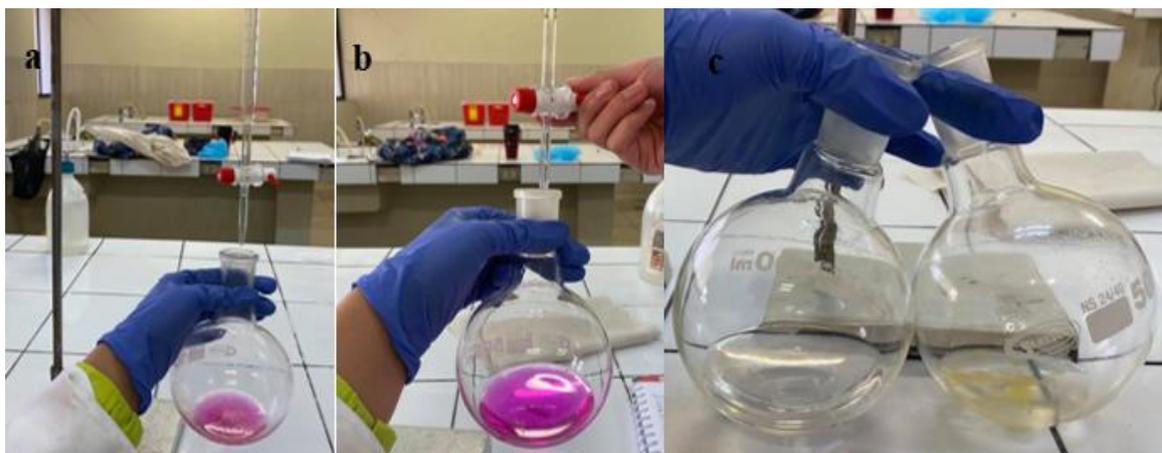


Ilustración 8 Proceso del índice de saponificación del aceite de palma usado. a) valoración de la muestra con HCL, b) valoración del blanco con HCL, c) producción del viraje de rosa intenso a incoloro.

Fuente: Autores.

En la ecuación 3 se puede observar la fórmula para calcular el índice de saponificación

$$\text{índice de saponificación} = \frac{V_B - V_M * N}{\text{Peso de la muestra}} * 56,1 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

V_B : Volumen de HCl 0,5 gastado para titular el blanco.

V_M : Volumen de HCl 0,5 gastado para titular la muestra.

2.1.5 Índice de acidez

Se define como índice de acidez (IA) a la cantidad de miligramos de hidróxido de potasio necesaria para neutralizar los ácidos grasos libres presentes en un gramo de aceite o grasa. (Arzave et al., 2016)

Esta acidez puede variar debido a que las grasas frescas no contienen ácidos grasos libres o los tienen en pequeñas cantidades y al decaer por acción de la acción de la luz y el aire su acidez crece poco a poco con el paso del tiempo. (Heras Naranjo & Lojano Criollo, 2020)

Para la determinación de la acidez del aceite de palma usado se pesó en la balanza analítica 1,4gr de hidróxido de potasio y se mezcló con 50ml de agua destilada en un vaso de precipitación de 250 ml hasta diluirlo para luego pasar al matraz aforado y llenarlo completamente hasta los 250ml con agua destilada. Luego se adecuó y lleno una bureta con 25ml de la muestra de KOH. Seguido, se tomó 7,89gr de la materia prima (aceite de palma) y se lo vertió en un matraz erlenmeyer de 250 ml para luego agregarle 20ml de agua destilada y agitar agregando 4 gotas de fenolftaleína para proceder a titular con el KOH 0,5M hasta que la muestra se torne de un color rosa instantáneamente y se anotó el desgaste del titulante. Este proceso se realizó dos veces con la finalidad de sacar un promedio de titulante gastado y poder establecer el grado de acidez de la materia prima.

Se repitió el procedimiento dos veces para sacar un promedio y que el resultado sea más efectivo. (Ver ilustración 9)



Ilustración 9 Proceso del índice de acidez del aceite de palma usado. a) Titulación del aceite de palma usado con KOH, b) Viraje de color transparente a incoloro.

Fuente: Autores.

En la ecuación 4 se puede observar la fórmula del índice de acidez.

$$\text{índice de acidez } (i) = \frac{V * N * 0,0561 * 100}{\text{muestra}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

En donde:

i = índice de acidez del producto (mg KOH/g)

V = Volumen de la solución de hidróxido de potasio empleado en la titulación en ml.

N = Normalidad de la solución de hidróxido de potasio.

m = masa de la muestra analizada (gr)

2.1.6 Porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad hace referencia a la cantidad de agua contenida en una muestra es decir, es el valor porcentual del peso total de la muestra que corresponde a la concentración de agua presente. (Limoncocha, 2016)

Para la determinación de este parámetro se usó la normativa NTC 287. En primer lugar, se pesó 150g de aceite de palma usado para posteriormente calentarlo en un vaso de precipitación en una estufa eléctrica por un lapso de 30 min controlando la temperatura. Luego, se pesó nuevamente la muestra para poder anotar la diferencia. Si no se nota un cambio en el peso se recomienda repetir el proceso. (Ver ilustración 10)

En la ecuación 5 se observa la fórmula para el cálculo del porcentaje de humedad.

$$\text{Humedad } \% = \frac{P-A}{P} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

En donde:

P = peso de la muestra tomada inicialmente (g).

A = peso de la muestra después de calentar (g).



Ilustración 10 Proceso para obtener el porcentaje de Humedad.

Fuente: Autores.

2.2 Obtención de la glicerina

Para obtener la glicerina se realizó la transesterificación del aceite de palma usado. Cabe destacar que este aceite es un subproducto derivado de los diferentes procesos para la elaboración de frituras. Para ello se empleó metanol al 99% y el catalizador básico homogéneo, hidróxido de sodio.

2.2.1 Proceso de filtración

Al no ser un aceite puro sino derivado de varios procesos de fritura se realizó un filtrado. Para este proceso se utilizó papel filtro y un embudo para separar las impurezas y obtener así una materia prima más limpia para el siguiente proceso. (Ver ilustración 11)

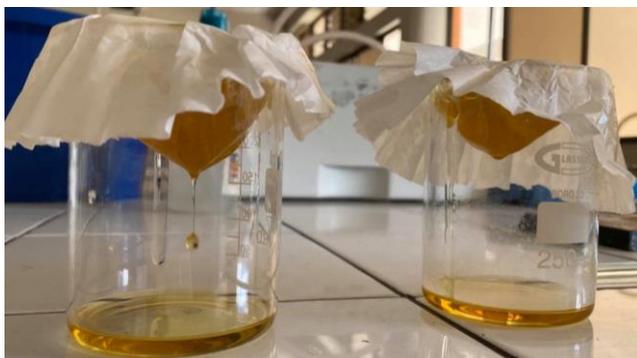


Ilustración 11 Proceso de filtración.

Fuente: Autores.

2.2.2 Preparación del metóxido de sodio

Para establecer las concentraciones necesarias de NaOH y metanol se realizaron distintas pruebas destacando como valores finales las siguientes. (Ver tabla 4)

Tabla 4 Dosificación para la preparación de metóxido de sodio

Nº de muestras	Concentración del catalizador (NaOH)	Concentración de metanol al 99%
1	2,45g	140ml
2	1,225g	70ml
3	1,4g	80ml

Fuente: Autores

Al tener las concentraciones finales, se mezcló en un vaso de precipitación sobre un agitador magnético durante 30 minutos hasta que se haya disuelto completamente el catalizador. (Ver ilustración 12)

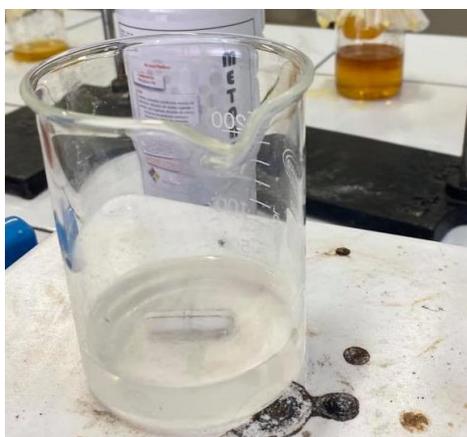


Ilustración 12 Preparación del metóxido de sodio.

Fuente: Autores.

2.2.3 Proceso de transesterificación del aceite

La transesterificación o alcoholisis es una reacción química en la que una mol de triglicérido reacciona con tres moles de alcohol (generalmente de bajo peso molecular)

para formar una mol de glicerina y tres moles de esteres grasos respectivamente.(Marcela, 2006)

Para este proceso se emplearon balones de tres y dos bocas cada uno de 500ml adaptados a refrigerantes en la parte central para evitar la evaporación del metanol. A un lateral se colocó el termómetro para poder controlar la temperatura en el proceso y el otro lado sirvió para la adición de la muestra (aceite usado de palma) y el metóxido sellando con un corcho para evitar fuga del producto. (Ver ilustración 13)

Se trabajó tres muestras con diferentes dosificaciones (Ver tabla 5). Primeramente, se empezó calentando la muestra por un lapso de 10min. Luego, se adicionó el metóxido y se colocó el termómetro y el corcho. En todas las pruebas el proceso duró una hora a 800rpm y temperatura de 70 a 75 °C para obtener mejor rendimiento.

Tabla 5 Dosificación para realizar el proceso de transesterificación.

Pruebas	Hidróxido de Sodio (gr)	Metanol (ml)	Aceite de Palma (ml)
1	1.4	80	400
2	1.225	70	350
3	2.45	140	350

Fuente: Autores.



Ilustración 13 Proceso de transesterificación del aceite.

Fuente: Autores.

2.2.4 Proceso de sedimentación y extracción de la glicerina

Al concluir con el proceso de transesterificación se procedió con la fase de sedimentación para lo cual se utilizaron decantadores de 500ml y se decantó por 24h cada muestra por separado obteniéndose dos fases: una en la parte inferior correspondiente a la glicerina y otra en la parte superior que es el biodiesel (Ver ilustración 14). Posteriormente, se procedió a extraer y anotar los mililitros de glicerina obtenidos. Dicho proceso se realizó por varias veces hasta obtener los ml de glicerina necesarios para el siguiente proceso.

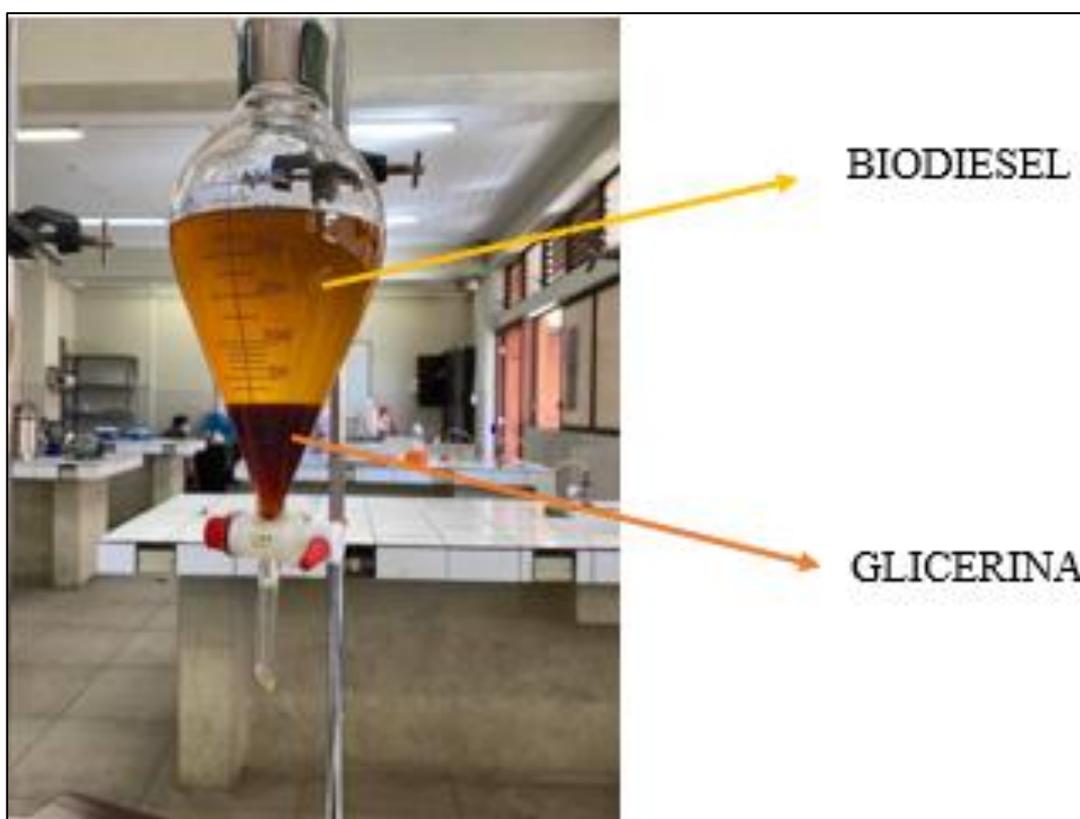


Ilustración 14 Proceso de sedimentación (biodiesel-glicerina).

Fuente: Autores.

2.2.5 Análisis FTIR de la glicerina

La glicerina obtenida del proceso de sedimentación fue analizada en espectrómetro Thermo Scientific Nicolet TM S10 FTIR que puede ser empleado para análisis de mezclas, piedras preciosas, polímeros, farmacéuticos y forense. Su rango de longitud de onda varía

entre 400 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} . (López-Díaz, Ríos-Corripio, Ramírez-Corona, López-Malo, & Palou, 2018)

El equipo fue utilizado para la obtención de las gráficas IR de las sustancias obtenidas en los procesos anteriores. (Ver ilustración 15)

El infrarrojo midió la Transmitancia (T) o Absorbancia (Abs) de las respectivas muestras de glicerina que fueron colocadas en el punto de paso del haz de luz en donde el instrumento compara la intensidad de la luz que logra atravesar la muestra (I) con la intensidad de luz que se detecta sin la muestra (I_0).

Finalmente, se observa las curvas generadas y se analiza los resultados.



Ilustración 15 Análisis IR de la muestra.

Fuente: Autores.

2.3 Purificación de la glicerina

La purificación hace referencia a quitar las impurezas o la suciedad de un líquido. En esta fase se purifico 1080ml de glicerina obtenido del proceso anterior empleando cuatro

etapas: acidificación, neutralización, destilación y decoloración (Aguzín, Bedogni, Okulik, & Padró, 2015).

2.3.1 Acidificación

La acidificación es un proceso químico por el que algunas sustancias se transforman adquiriendo características ácidas.



Ilustración 16 Proceso de acidificación del glicerol.

Fuente: Autores.

En esta fase se efectuó un proceso de acidificación empleando HCL 1N como catalizador controlado por un pHmetro con el fin de mantener un pH óptimo. Para empezar, se preparó 720ml de la disolución de HCl 1 N a temperatura ambiente y esta se le fue adicionando a la materia prima hasta que se obtuvo un pH de 3 pudiendo así eliminar sales y jabones presentes en el glicerol. Posteriormente, se dejó sedimentar el producto obtenido por 24h y se procedió a filtrar. (Ver ilustración 16)

2.3.2 Neutralización

Para el proceso de neutralización se utilizó como catalizador NaOH 1N y el pHmetro como instrumento de medida. En esta fase primeramente se preparó 100ml del NaOH que

es el catalizador para posteriormente agregarlo gota a gota en el glicerol obtenido. Esto se realizó con el propósito de eliminar los ácidos grasos que quedasen disueltos en la misma y a su vez se fue controlando con un pHmetro las distintas variaciones de pH hasta que sea óptimo, es decir pH 7 a temperatura ambiente y se procedió a filtrar. (Ver ilustración 17)



Ilustración 17 Proceso de neutralización del glicerol.

Fuente: Autores.

2.3.3 Destilación

La destilación es un proceso que consiste en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasan a la fase de vapor y a continuación enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación. (J. Rodríguez, 2015)

En esta fase se armó el equipo de destilación simple y se procedió a pesar 250ml de glicerol, la misma que fue vertida en el balón de destilación provista de un termómetro de 100°C ajustado firmemente con la ayuda de un corcho. Posterior a esto se insertó en el balón de destilación el condensador y a la salida de este tubo se colocó un vaso de precipitado en la cual se midió la muestra, se aplicó calor por el lapso de 2 horas hasta que la muestra

alcanzó una temperatura de 90°C pudiendo así eliminar el metanol excedente presente en la misma. (Ver ilustración 18)



Ilustración 18 Proceso de destilación, a) equipo de destilación simple, b) productos procedentes de la destilación el glicerol y el metanol

Fuente: Autores.

2.3.4 Decoloración

En el proceso de decoloración se utiliza una sustancia decolorante o material que separa colores por reacción física o química como son: carbones, arcillas, tierras u otras materias de gran poder absorbente que se usan para quitar colores indeseables como en el proceso de refinamiento de azúcar, de verduras y grasas animales y aceites, etc. (Parra, Marín, Jácome, & Sinche, 2018)

Como etapa final del proceso de purificación del glicerol se realizó la decoloración del mismo, proceso en el cual se utilizó peróxido de hidrógeno al 60% con una relación 4:1 (glicerol: peróxido).

Se decoloró la muestra del glicerol purificado con peróxido de hidrógeno H_2O_2 a una temperatura de 80°C y 400 rpm en un lapso de 30 min. Posteriormente se procedió a filtrar la sustancia obtenida con la finalidad de remover las impurezas presentes en la muestra. (Ver ilustración 19)



Ilustración 19 Proceso de decoloración del glicerol, a) glicerol antes de decolorar, b) glicerol en proceso de decoloración, c) glicerol decolorado.

Fuente: Autores.

2.4 Propiedades físico-químicas del glicerol

La caracterización del glicerol obtenido de los procesos anteriores se realiza con la finalidad de precisar sus propiedades fisicoquímicas como son: color, pH, absorbancia, FTIR, densidad, viscosidad cinemática y dinámica.

2.4.1 Color

Para la determinación del color del glicerol se manejó el colorímetro (Ver ilustración 20) y en el procedimiento se preparó un tubo colorímetro con una muestra de 10ml de agua desmineralizada que sirvió como blanco y posteriormente en otro tubo colorímetro se colocó la muestra de aceite de palma filtrado a 430nm de longitud de onda en modo absorbancia para introducirlo al equipo que instantáneamente midió la cantidad de luz que viajaba a través de la muestra convirtiendo la medida a una lectura digital.



Ilustración 20 Colorímetro.

Fuente: Autores.

2.4.2 pH

Para este proceso se utilizó la metodología antes mencionada para el aceite de palma usado en donde se emplearon tiras de pH que permitieron medir los niveles de ácido del glicerol.

2.4.3 Absorbancia

El análisis de la absorbancia se realiza antes y después del proceso de decoloración del glicerol lo cual nos servirá como referencia al momento de analizar el producto final.

La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y de la concentración de éste. La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración. A mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución a igual concentración. Cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará. Por último, depende de ϵ una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción que es específica de cada cromóforo.(Abril Diaz Nieves, 1984)

Para este proceso se utilizó el equipo Thermo Spectronic GENESYS 20 (Ver ilustración 21) a 540nm debido a que nos permite ver la luz visible en una gama de colores azul, verde, amarillo y en este rango se encuentra el color que se obtuvo del glicerol decolorado y en el cual se midió primero la absorbancia del agua (conocido como blanco) y al que se le asignó el valor de cero mediante el ajuste del mando de forma que, la intensidad incidente y transmitida sean iguales ($I_o = I_t$) y por lo tanto la absorbancia es cero. Posterior a esto se pone en la celdilla la cubeta con la muestra y se lee la absorbancia de la misma.



Ilustración 21 Thermo Spectronic GENESYS 20.

Fuente: Autores.

2.4.4 FTIR del glicerol

El análisis del glicerol se realizó en el espectrómetro Thermo Scientific Nicolet TM S10 FTIR para verificar que no se hayan cambiado sus propiedades.

2.4.5 Densidad

Para el proceso de esta fase se aplicó la metodología empleada para el aceite de palma aplicando la normativa NTE-INEN 0035 (Ver ilustración 22) y utilizando la misma ecuación (ver ecuación 1) para realizar los cálculos de densidad relativa.

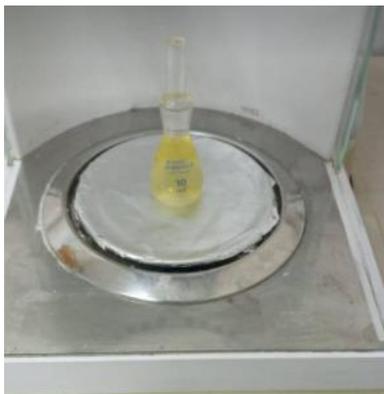


Ilustración 22 Medición de la densidad del glicerol.

Fuente: Autores.

2.4.6 Viscosidad cinemática y dinámica

Para este parámetro se realizó el mismo procedimiento utilizado con el aceite de palma (Ver ilustración 23). Se determinó primero la viscosidad dinámica empleando el dato de la densidad 1,14 g/ml y el número de husillo R2 y se usó la ecuación 2 para determinar la viscosidad cinemática.

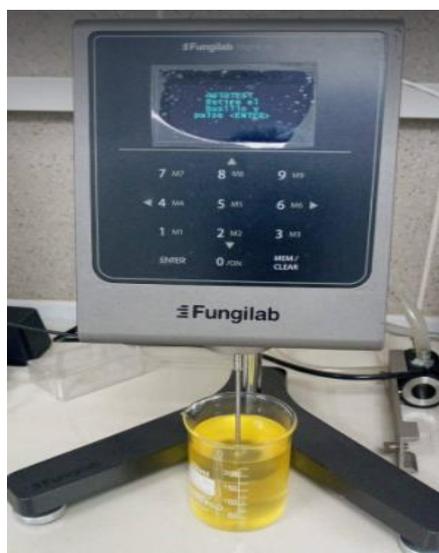


Ilustración 23 Viscosidad del glicerol medida en el equipo.

Fuente: Autores.

2.5 Proceso fermentativo

2.5.1 Preparación de medios de cultivos

Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas permiten el crecimiento de los microorganismos. Estos medios son esenciales en el laboratorio de microbiología por lo que un control en su fabricación, preparación, conservación y uso, asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos. (Álvarez, 2015)

Para este procedimiento se utilizó tres tubos de ensayo de 9ml y un matraz Erlenmeyer en los cuales se colocó 130 ml de caldo nutritivo compuesto de (ver tabla 6) autoclavado a 1 atmósfera y 121°C por 15min.

Tabla 6 Composición del caldo nutritivo

Ingredientes	Cantidad (g/L)
Digestión péptica de tejido animal	5
Cloruro de sodio	5
Extracto de remolacha	1.5
Extracto de levadura	1.5

Fuente: (Titan Biotech Ltd, 2020)

Posterior a dicho procedimiento se preparó en cinco cajas petri y un matraz erlenmeyer 50 ml de agar de soya tríptico (TSA) compuesto de (Ver tabla 7), autoclavado a 1 atmósfera y 121°C por 15min.

Tabla 7 Composición de TSA

Ingredientes	Cantidad (g/L)
Digestión enzimática de caseína	15
Digestión enzimática de harina de soya	5

Cloruro de sodio	5
Agar	15

Fuente:(Neogen Corporation, 2019)

2.5.2 Activación de la bacteria “*Bacillus megatherium*.”

La cepa de *Bacillus megatherium* usada es caracterizada como productor de PHB en la presencia de un exceso de fuente de carbono y la restricción de la fuente de nitrógeno. (Álvarez, 2015)

Para el proceso de activación se empleó la bacteria *Bacillus megatherium* ATCC 14581 adquirida en el laboratorio MEDIBAC, la cual se activó en los 3 tubos de ensayo y en 2 cajas petri poniéndole a incubar por 24 h a temperatura constante de 35°C en una estufa. (Microbiologics, 2020) (Ver ilustración 24, 25)

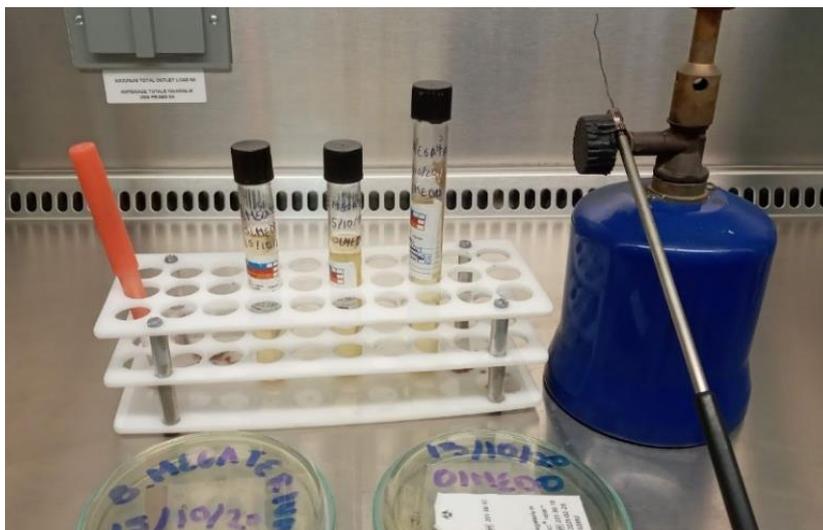


Ilustración 24 Bacterias recién activadas.

Fuente: Autores.



Ilustración 25 *Bacillus megaterium* después de un día de incubación: a) cajas petri, b) tubos de ensayo.

Fuente: Autores.

2.5.3 Identificación de la bacteria *Bacillus megaterium*

Se realizó la identificación de la bacteria mediante el microscopio de marca Micros Austria. Primero, se realizó una tinción con unas gotas de cristal violeta y se mantuvo cubierta por 1 min, después se lavó con agua destilada. Luego se aplicó gotas de lugol por 1 min, se volvió a lavar y se puso gotas de alcohol cetona por 30 seg y se enjuagó. Por último, se colocó safranina por 1 min, se lavó y se colocó un cubre objeto sobre el portaobjeto y se lo llevo a enfocar en el microscopio con el lente Micros Achro 40x /0.65- 160 /0.17 para después observarlo con Micros Achro 100x /1.25 - 160 /0.17 con aceite de inmersión. (Ver ilustración 37)

2.5.4 Fermentación con *Bacillus megaterium*

Se realizó la fermentación en varios matraces erlenmeyer siguiendo la metodología de (Valentina, Sara, Javier, María, & Amanda, 2018) que contenía un volumen de nutrientes conformado por distintos elementos, fuente de carbono, y suplemento de nitrógeno (Ver tabla 8) para mejorar las condiciones del sustrato.

Una vez preparado el medio de cultivo con los nutrientes necesarios (Ver tabla 9) se ajustó el pH a 7 utilizando NaOH 1N, se autoclavó y después se procedió a inocular el medio dentro de una cabina laminar para posteriormente llevarlo a fermentar a una temperatura de 35°C, 200 rpm por 72 horas (Gómez Cardozo, Mora Martínez, Yepes Pérez, & Correa Londoño, 2016) y sin presencia de luz en un agitador orbital marca Thermo Scientific MAXQ 4000. (Ver ilustración 26, 27, 28)

Tabla 8 Nutrientes necesarios para el fermento.

Elemento	Cantidad
Dihidrógeno fosfato de sodio NaH_2PO_4	3.6 g/L
Dihidrógeno fosfato de potasio KH_2PO_4	1.5 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/L
Oligoelementos (NULANZA)	1 ml/L
Glicerol	60 g/L
Glucosa	15 g/L
Suplemento de nitrógeno $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$	0.8g/L
Inóculos de la cepa <i>B. Megaterium</i>	2% /v

Fuente: (Valentina et al., 2018)

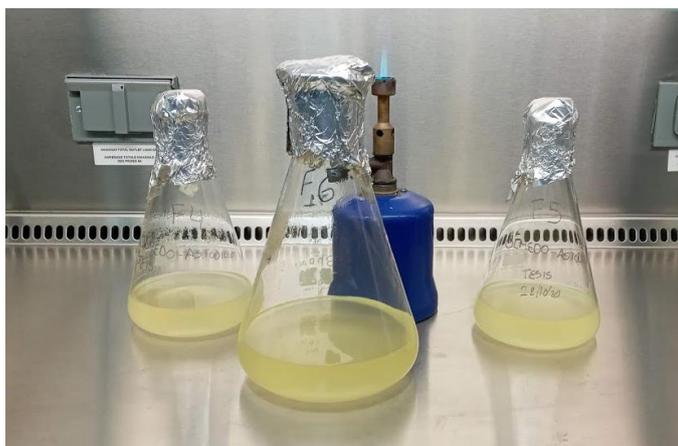


Ilustración 26 Medios de cultivo autoclavados.

Fuente: Autores.



Ilustración 27 Inoculación de los medios para la fermentación.

Fuente: Autores.



Ilustración 28 Fermentación de nuestra bacteria en el orbital.

Fuente: Autores.

2.6 Determinación de biomasa

Se evaluaron dos parámetros, peso húmedo y peso seco. Para ello se procedió a separar la biomasa del medio mediante filtración por membrana empleando microfiltros de vidrio Watman 934-AHTM y diámetro 47mm dentro de una cabina laminar para lo cual se empleó un kitosato, mangueras y bomba para realizar al vacío.

2.6.1 Peso húmedo

Para el peso húmedo se pesó el filtro en una balanza analítica. Después se realizó la filtración por membrana del medio y se volvió a pesar de nuevo el filtro con la biomasa. (Ver ilustración 29)

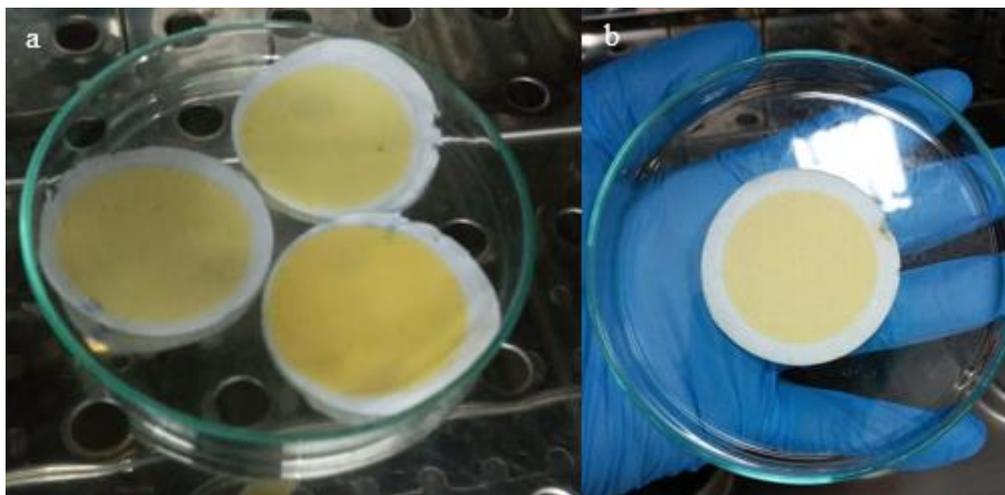


Ilustración 29 Biomasa, a) biomasa húmeda, b) biomasa seca.

Fuente: Autores.

2.6.2 Peso seco

Para el peso seco se procedió a introducir la muestra en una estufa por 12h a 50°C para extraerle toda el agua y se volvió a pesar. (Ver ilustración 29)

2.7 Proceso de extracción y purificación del polihidroxibutirato (PHB)

Para realizar el proceso de extracción y purificación del biopolímero se usó el método de dispersión de cloroformo e hipoclorito de sodio.

Para este proceso se empleó el método descrito por (Moreno-Sarmiento; Malagón-Romero; Cortázar; Espinosa-Hernández, 2006) con algunas modificaciones las cuales se presentan a continuación: una relación de 0,02g de biomasa seca suspendida en los microfiltros de vidrio Watman 934-AHTM: 0,3 g de biomasa líquida: 1ml de volumen de dispersión (mitad cloroformo al 99% y mitad hipoclorito de sodio al 10%). (Ver tabla 9)

Tabla 9 Relación empleada para la extracción y purificación del PHB.

Número de pruebas	Biomasa líquida (g)	Biomasa seca inicial (g)	Volumen total (ml)	
			Volumen cloroformo	Volumen hipoclorito de sodio
1	15	1.0101	25	25
2	30	2.0592	50	50

Fuente: Autores.

Esta digestión se realizó en un matraz erlenmeyer dentro de un agitador orbital por una hora y 30 minutos a 30°C y 250rpm. (Ver ilustración 30)

Al terminar el proceso de digestión se procedió a decantar la muestra por 24 horas a temperatura ambiente bajo a cámara de extracción en donde se pueden observar tres fases: fase superior (hipoclorito de sodio), fase intermedia (biomasa muerta), fase inferior (cloroformo con PHB) (Ver ilustración 31). Posteriormente se retiró la fase inferior abriendo la llave de paso del decantador a tubos falcon en donde se evaporó a baño maría el cloroformo a 70°C hasta obtener un 20% del volumen inicial y poder precipitarlo en metanol frío (refrigerado una noche antes) en un volumen de 1:5 (cloroformo: metanol) por 1h. (Ver ilustración 32). Después se procedió a centrifugar la muestra por 10 min a 3500rpm quitando el sobrenadante y dejando a secar la muestra a 37°C por 48h. (Ver ilustración 33). Este proceso se repitió varias veces hasta obtener el biopolímero en polvo necesario para la siguiente fase.



Ilustración 30 Digestión de la biomasa húmeda y seca con cloroformo e hipoclorito de sodio.

Fuente: Autores.



Ilustración 31 Separación de las tres fases mediante el método de decantación.

Fuente: Autores.

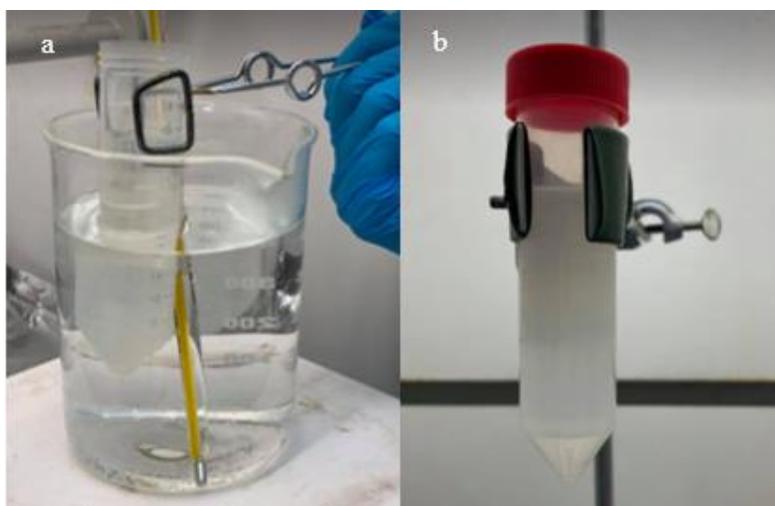


Ilustración 32 Se puede ver en esta fotografía en la parte a) evaporación del cloroformo y b) precipitación del PHB en metanol frío.

Fuente: Autores.

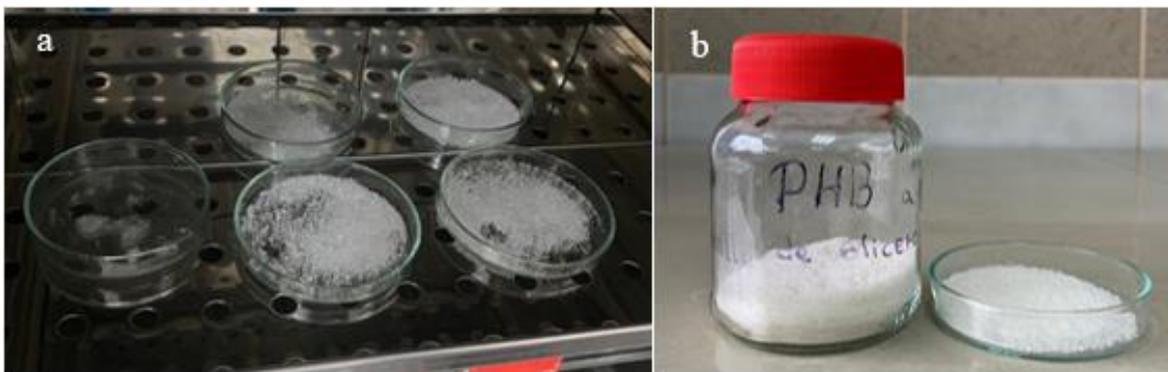


Ilustración 33 a) Producto secándose b) biopolímero obtenido.

Fuente: Autores.

2.8 Cálculo del rendimiento y porcentaje de recuperación del P3HB

Se usó como valor estándar 98 % para evaluar el porcentaje de recuperación obtenido en el proceso.

En la ecuación 5 y 6 se pueden observar las fórmulas para calcular el rendimiento del proceso y el porcentaje de recuperación.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Polímero obtenido}}{\text{Biomasa inicial}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Rendimiento método Evaluado}}{\text{Rendimiento método estandar}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

2.9 Estructuración del biopolímero (P3HB)

Para el proceso de estructuración del biopolímero se empleó la relación: P3HB polvo: cloroformo (1g: 20ml respectivamente), se calentó la muestra hasta 50°C por 10min obteniendo una solución maleable después se dejó secar en recipientes hasta que el cloroformo se evaporó en su totalidad. (Ver ilustración 34)



Ilustración 34 a) Proceso de dilución del P3HB en polvo con el cloroformo, b) retiro del recipiente del biopolímero seco.

Fuente: Autores.

2.10 Propiedades físicas y degradación del P3HB

Se determinó varias propiedades físicas del P3HB tales como: densidad, solubilidad, óptica, mecánica y degradación.

2.10.1 Densidad

La normativa empleada es ASTM C 693-93 (2019) mediante el método de “densidad por desplazamiento de agua” (densidad de Arquímedes). Este método permite determinar la densidad en el aire en comparación con su desplazamiento en el agua. Primero se pesó la muestra con precisión y después se pesó mientras estuvo suspendida en agua de tal manera que la muestra se hunda. El volumen de la muestra se calcula a partir del efecto de desplazamiento de líquido con densidad conocida en este caso el agua. (ASTM INTERNATIONAL, 2019).

Se tomó una muestra del biopolímero plástico y se pesó en la balanza analítica. Luego se tomó una probeta de 250 ml y se colocó 200ml de agua destilada. Después se introdujo la

muestra del biopolímero hasta que quede completamente sumergido. Se registró cuanto subió el nivel del agua. Este es el volumen del plástico en ml. Después con la siguiente fórmula se calculó la densidad.

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde:

ρ : densidad (g/ml)

m: masa (g)

V: volumen (ml)

2.10.2 Solubilidad

La disolución de un polímero es un proceso lento que ocurre en dos etapas. En la primera etapa, las moléculas del disolvente se difunden dentro del polímero produciendo el hinchamiento del mismo y en la segunda etapa el polímero hinchado se desintegrará gradualmente convirtiéndose en una verdadera disolución. En un polímero puede darse varios casos de solubilidad: a) insolubilidad total en el disolvente, b) insolubilidad parcial, c) solubilidad parcial, d) solubilidad total en el disolvente. (Machado, 2010)

Para realizar este ensayo se introdujo la muestra en el disolvente (agua, etanol, metanol y acetona) y se dejó por 24h a temperatura ambiente y si se observa algún cambio hay disolución caso contrario, no hay disolución.

2.10.3 Mecánicas

Consiste en determinar el grado de resistencia que presenta la muestra al doblarse y estas pueden ser: a) rígidos, b) semirrígidos, c) flexibles (Alaniz, 2016). Para realizar este ensayo se flexionó, golpeó, presionó, se rayó y dejó caer la pieza para determinar el tipo de plástico.

2.10.4 Ópticas

Estas propiedades determinan el grado de luz que puede dejar pasar un cuerpo a través de él. Los plásticos se clasifican en: a) transparentes, b) translúcidos, c) opacos (Alaniz, 2016). Aquí se observó si se puede ver a través de ellos, si permite el paso de una pequeña cantidad de luz produciendo sombras y si no es posible apreciar luz.

2.10.5 Degradabilidad

La degradabilidad del plástico se realizó en el Laboratorio SGS del Ecuador S.A. mediante el método de gravimetría usando la normativa LAB-GYE-ME-651 - BASADO EN COVENIN 1155 DETERMINACIÓN DE CENIZA. Según (E. Rodríguez & Villegas, 2012; Yolanda & Fiallo, 2012) en un análisis gravimétrico se debe evaluar la pérdida de agua hasta los 100°C, pérdida del material orgánico hasta los 550°C y el residuo del material inorgánico pasada la temperatura antes mencionada.

2.11 Análisis estadístico del producto

Para el análisis estadístico del producto obtenido se realizó un “*Análisis de Estadística descriptiva*” empleando como herramienta de trabajo el programa SPSS el cual según (Pedro, Carlos, & Julio, 2018) se basa en determinar 4 puntos principales : a) Tamaño muestral (n), b) Medidas de centralización, c) Medidas de dispersión y d) Representaciones gráficas. Para esto nos enfocamos en la biomasa obtenida y en proceso de extracción, purificación y rendimiento del polihidroxibutirato.

- a) Tamaño muestral (n): El número de muestreos realizados en el experimento.
- b) Medidas de centralización: Determinación de media aritmética, mediana.
- c) Medidas de dispersión: Identifica la dispersión de los datos en donde se calculó la varianza y desviación estándar.

- d) Representaciones gráficas: Facilitan la observación de los resultados obtenidos, tras el análisis matemático.

2.12 Análisis de factibilidad en la producción del PHB

Para realizar el análisis de factibilidad se ha empleado la metodología de Costo-Beneficio (VAN y TIR) en el cual se presentan los costos de inversión, gastos fijos y gastos variables del PHB (Ver tabla 18 y anexo 6.8). Además se ha propuesto para el análisis la venta del biopolímero por kilogramo y se han realizado encuestas digitales para saber si el producto es aceptado en el mercado.

3 CAPÍTULO: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización físico-química del aceite de palma usado

En la tabla 10 se encuentran establecidos los resultados obtenidos en el proceso de caracterización físico-química del aceite de palma usado de acuerdo a su normativa y límites establecidos seguidamente de su respectiva explicación

Tabla 10 Resultados de la caracterización fisicoquímica del aceite de palma usado.

Parámetro	Unidad	Resultados	Norma	Límite
Densidad	g/mL	0,939	NTE INEN 2421	Mínimo: 0,891 Máximo: 0,914
pH	-----	5,5	-----	-----
Viscosidad cinemática a 40 °C	mm ² /s	200,978	-----	-----
Viscosidad dinámica a 40°C	N*s/m ²	0,18691	-----	-----
Índice de saponificación	mgNaOH/g	196,35	NTE INEN 1640	Mínimo: 180 Máximo: 270
Índice de acidez	mgNaOH/g	1,25	NTE INEN 1640	Maximo:0,2 Mínimo: 0
Porcentaje de humedad	%	0,3	NTE INEN 1640	0,5

Fuente: Autores.

Absorbancia: La absorbancia del aceite de palma usado a 540nm fue de 0,123 A debido a la concentración de la solución y los factores que influyen para la variación de dicho valor.

pH: El p H del aceite de palma usado fue de 5,5 debido a que este no se encuentra en su estado natural y ya ha pasado por algunos procesos industriales.

Viscosidad Cinemática: La viscosidad del aceite de palma obtenida es alta debido a que las altas temperaturas que alcanzan los aceites durante el proceso de fritura produce una compleja serie de reacciones que resultan en la oxidación y polimerización del aceite, del

mismo modo los residuos de la comida que frecuentemente alcanzan valores de 25% de compuestos polares y su respectiva degradación también afectan la calidad del aceite.(Amado & Mora, 2006)

Densidad: De acuerdo a los resultados obtenidos y luego de la comparación con la normativa, se establece que el aceite usado de palma no cumple con el parámetro ya que supera el rango de los valores establecidos debido a que al ser aceite previamente utilizado en frituras aumentará el índice de ácidos grasos existentes presentes que influirán directamente en el incremento del peso molecular y al mismo tiempo a mayor cantidad de frituras que esté sometido el aceite mayor será la rancidez del mismo.

Índice de Saponificación: De acuerdo a los resultados obtenidos y luego de la comparación con la normativa NTE INEN 1640, se establece que el índice de saponificación de 196,35 obtenido se encuentra dentro del rango (Mínimo=180 y Máximo= 270) de los parámetros establecidos debido a que, a mayor IS mayor concentración de ácidos grasos de bajo peso molecular (IS es mayor para una grasa dada, en la medida que aumenta el número de funciones éster saponificables/ g de la misma). (Guillermo D. Manrique, 2009)

Índice de Acidez: De acuerdo a los resultados obtenidos y luego de la comparación con la normativa NTE INEN 1 640 se puede establecer que el índice de acidez del aceite de palma usado se encuentra por encima de los rangos establecidos debido a que la calidad del aceite se relaciona directamente con el grado de hidrólisis de los triglicéridos(Michelle, 2003) . Esto se debe principalmente a que el aceite es de origen industrial, por lo tanto, presenta una acidez alta deduciéndose que dicho aceite fue reutilizado durante su proceso para la obtención de frituras.

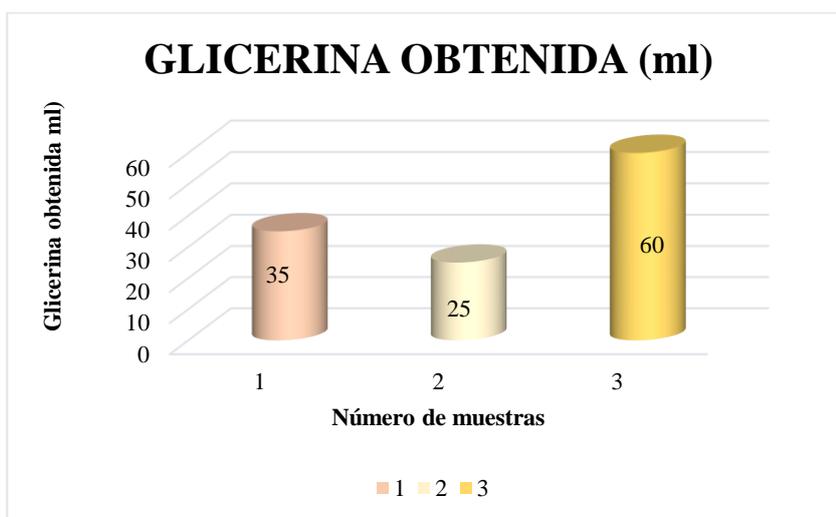
Porcentaje de humedad: El porcentaje de humedad analizado se encontró dentro de los parámetros establecidos ya que según la normativa el porcentaje de humedad mínimo es de 0% y

el máximo de 0.5%, dando como resultado 0.3% que nos favoreció para los próximos procesos a realizar.

3.2 Análisis de la glicerina proveniente del proceso de transesterificación e interpretación del espectro (Espectroscopia infrarroja FTIR)

Se realizaron alrededor de 3 pruebas en el laboratorio con la finalidad de establecer las cantidades necesarias para la obtención de mayor cantidad de glicerina.

Como se puede observar en la gráfica 1 la prueba 3 dio mejores resultados empleando 140 ml de metóxido, 350ml de aceite de palma obteniendo como resultado 60ml de glicerina. En total se realizaron 25 repeticiones del proceso obteniendo un total de 1140ml de glicerina para trabajar. Ver anexo 6.1



Gráfica 1 Glicerina obtenida en el proceso de transesterificación.

Fuente: Autores.

En la ilustración 35 se observa el espectro FTIR de la glicerina y sus principales

bandas de absorción obtenida como subproducto durante el proceso de sedimentación.

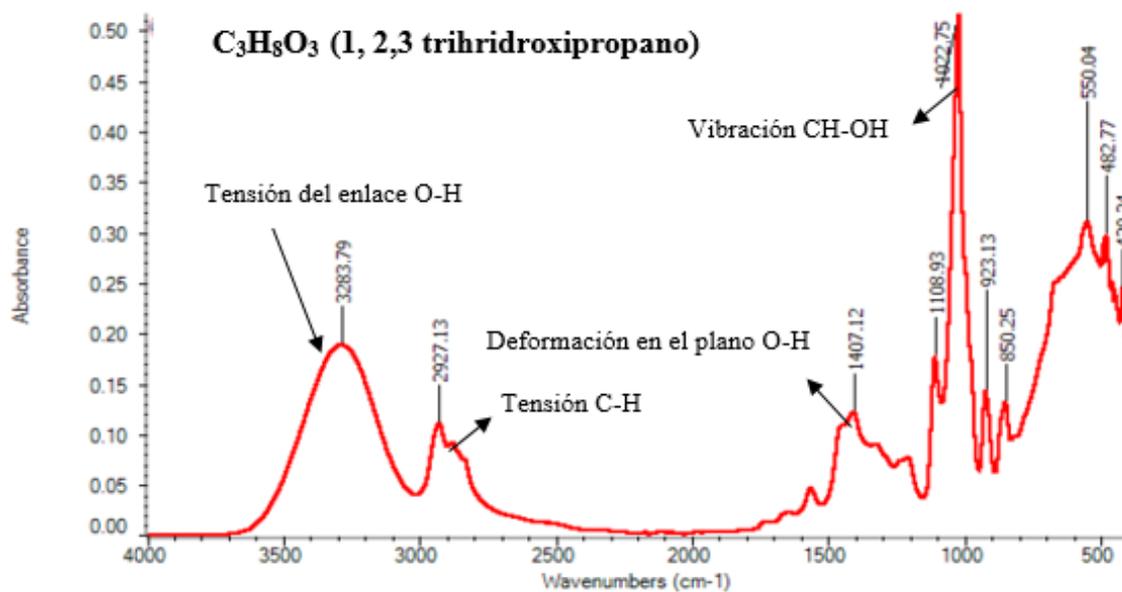


Ilustración 35 Espectro IR de C₃H₈O₃ (1, 2,3 trihidroxipropano).

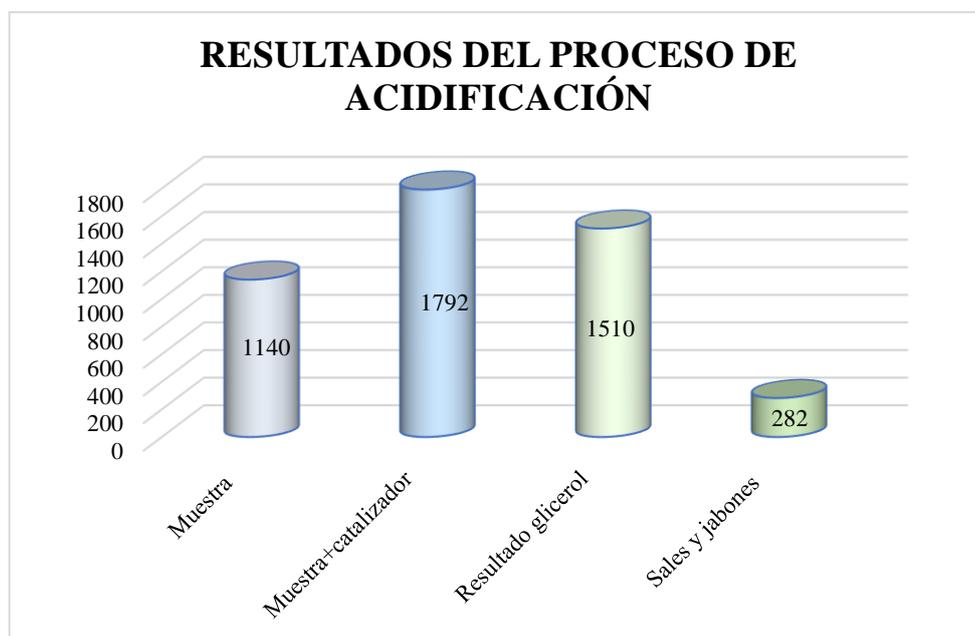
Fuente: Autores.

En la región 3295-3500 cm⁻¹ se puede observar los picos que hacen referencia a los compuestos presentes en su composición como es el grupo hidroxilo que pertenece a la banda de tensión O-H que contiene la glicerina con un espesor apreciable debido a la formación de puentes de hidrógeno. Además se visualiza una curvatura poco pronunciada referente al grupo de hidrocarburos alifáticos que va de 2924-3000 cm⁻¹, las bandas de enlace CH propias de los alcanos del mismo modo se puede diferenciar una curvatura referente al grupo de furanos que va desde 1405 a 1500 cm⁻¹, se observa también la banda con un estiramiento que va de 1000 - 1024 cm⁻¹ es característica del grupo de alcoholes alifáticos y en la curva de 932 - 1000 cm⁻¹ se encuentra la tensión por flexión del C-O que pertenece al grupo ester (Ver anexo 6.2).

3.3 Análisis del proceso de purificación del glicerol y caracterización físico-química

3.3.1 Acidificación

En el proceso de acidificación se partió de la glicerina obtenida en el proceso anterior que fue 1140ml. Se usó 652ml de HCl 1N, obteniendo como resultado 1792ml de glicerina de los cuales 282ml representan a sales y jabones presentes en el producto final quedándonos como resultado 1510ml de glicerol. (Ver gráfica 2)

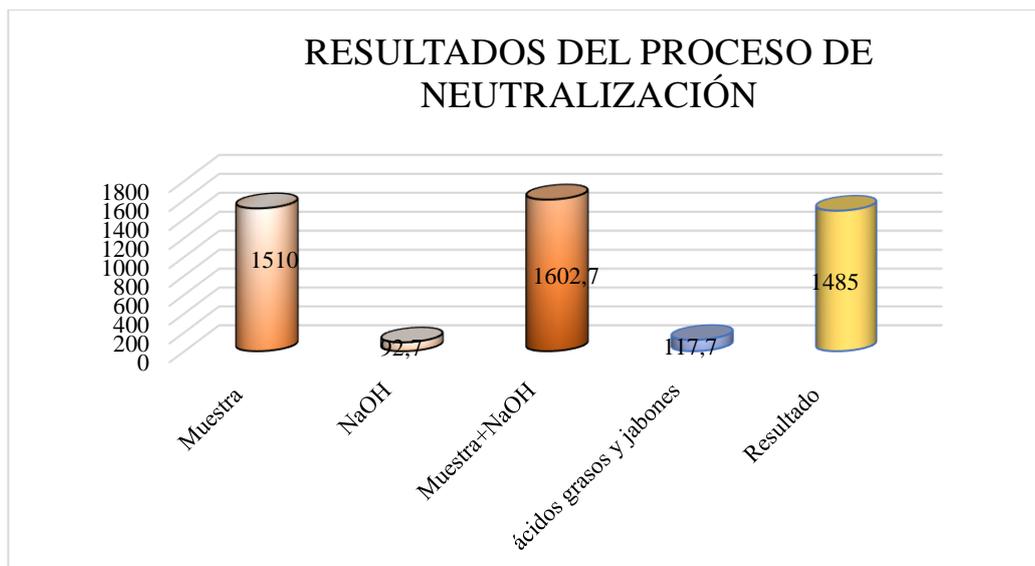


Gráfica 2 Resultado del proceso de acidificación.

Fuente: Autores.

3.3.2 Neutralización

En el proceso de neutralización para eliminar los ácidos grasos presentes en 1510 ml de muestra se empleó 92,7ml de NaOH 1N obteniendo 1485ml de glicerol con un pH de 7. (Ver gráfica 3)

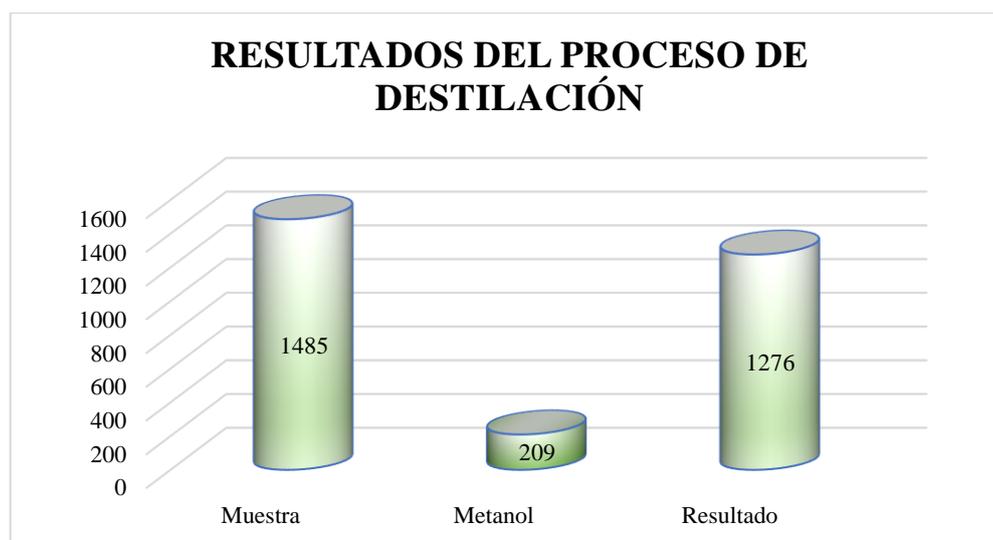


Gráfica 3 Resultados del proceso de neutralización.

Fuente: Autores

3.3.3 Destilación

Como resultado del proceso de destilación y con la finalidad de eliminar el metanol excedente de la muestra en un lapso de 2h a una temperatura de 90°C se logró obtener del total de 1485ml de producto 209ml de metanol quedando como resultado final 1276ml de glicerol. (Ver gráfica 4)

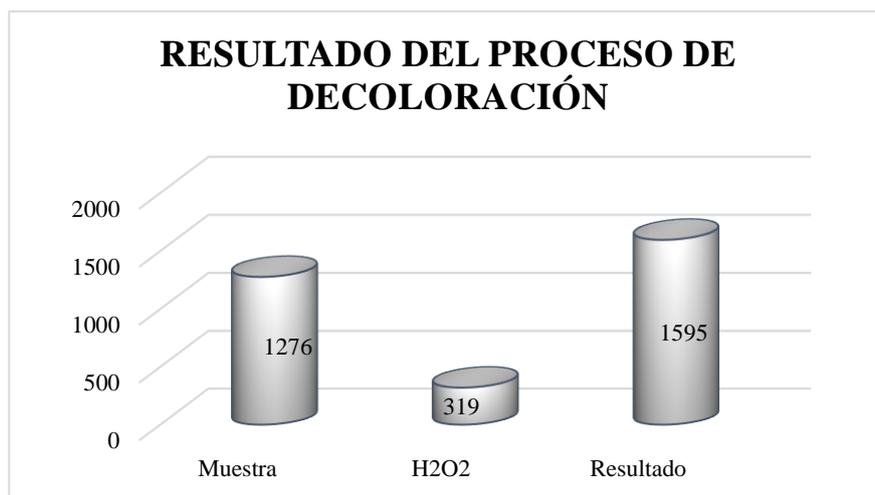


Gráfica 4 Resultado del proceso de destilación.

Fuente: Autores.

3.3.4 Decoloración e interpretación del espectro del glicerol (Espectroscopia infrarroja FTIR)

En el proceso de decoloración se empleó 319 ml de peróxido de hidrogeno al 60% y se obtuvo como resultado final 1595 ml de glicerol. Este glicerol paso de un color marrón oscuro a un color amarillo pastel y aspecto cristalino brillante. (Ver gráfica 5)



Gráfica 5 Resultado del proceso de decoloración.

Fuente: Autores.

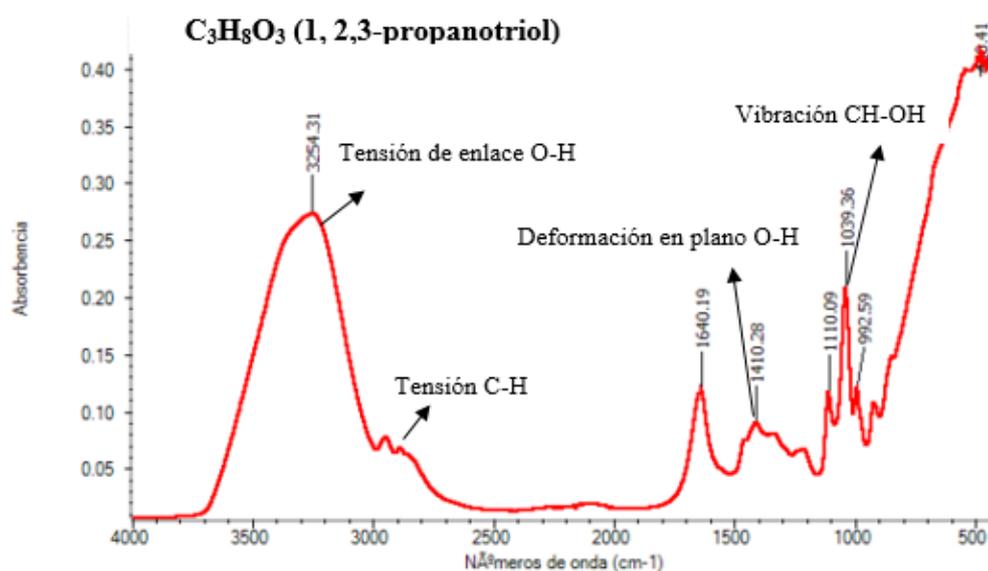


Ilustración 36 Espectro del C₃H₈O₃ (1,2,3-propanotriol) después de la decoloración.

Fuente: Autores.

En la ilustración 36 y el anexo 6.3 se comprobó que el espectro FTIR del glicerol y sus principales bandas de absorción no cambian al momento de decolorar la muestra. En la región uno denominada huella dactilar se muestran bandas en el intervalo de 860 y 992 cm^{-1} , las cuales son correspondientes a vibraciones del enlace C-C del esqueleto del glicerol. También se observan bandas a 850 y 930 cm^{-1} pertenecientes a las vibraciones de los grupos O-O y C-O, respectivamente. En el intervalo de 1125- 1100 cm^{-1} se observa la vibración del enlace CH-OH y la deformación en el plano del enlace O-H se presenta en el intervalo de 1400 a 1200 cm^{-1} . Las señales en 1029 cm^{-1} están asociadas a las vibraciones correspondientes al enlace C-O de los carbonos C1 y C3 (carbonos extremos), mientras que la banda en 1109 cm^{-1} se asocia al enlace C-O del carbono C2 (carbono intermedio). Las bandas en 3000-2800 cm^{-1} y 3650-3200 cm^{-1} corresponden a la tensión de los enlaces C-H y O-H.

3.3.5 Caracterización físico-química del glicerol

En la tabla 11 se puede observar los resultados obtenidos del proceso de caracterización físico- química del glicerol.

Tabla 11 Resultados de la caracterización físico- química del glicerol

Parámetro	Unidad	Resultado	Norma	Límite
<i>Color</i>	-----	781	-----	-----
<i>pH</i>	-----	7	-----	-----
<i>Absorbancia 540nm</i>	A	0,114	-----	-----
<i>Densidad</i>	g / ml	1,14	ASTM D 4052	Mínimo 0,89 Máximo 1,15
<i>Viscosidad Cinemática</i>	mm^2/s	32.9564	-----	-----
<i>Viscosidad dinámica</i>	N*s/m^2	0.03757	-----	-----

Fuente: Autores.

La absorbancia del glicerol antes de la decoloración fue 0.589 A y como resultado final fue de 0.114 A, interpretándose que hubo un cambio en el color de café a amarillo.

3.4 Análisis del proceso fermentativo para la producción del polihidroxibutirato

Para verificar que se realizó la fermentación del glicerol empleando la bacteria *Bacillus megaterium* se verificó que el microorganismo adquirido en el laboratorio MEDIBAC es el *B. Megaterium* mediante una identificación microscópica (Ver en la ilustración 37).



Ilustración 37 Vista en el microscopio del *B. Megaterium*.

Fuente: Autores.

3.5 Caracterización física, interpretación del espectro del P3HB (Espectroscopia infrarroja FTIR), estructuración y degradabilidad

3.5.1 Caracterización física del P3HB

En la tabla 12 se puede observar los resultados obtenidos en la caracterización física del P3HB.

Tabla 12 Caracterización física del P3HB.

Propiedades	Unidades	Resultado	Normativa
Densidad	g/ml	0.9156	ASTM C 693

Solubilidad	-----	Insoluble en agua, etanol, metanol, acetona,	-----
Ópticas	-----	Translucidas	-----
Mecánicas	-----	Semirrígidos y flexibles	-----

Fuente: Autores.

3.5.2 Interpretación del espectro del P3HB en polvo.

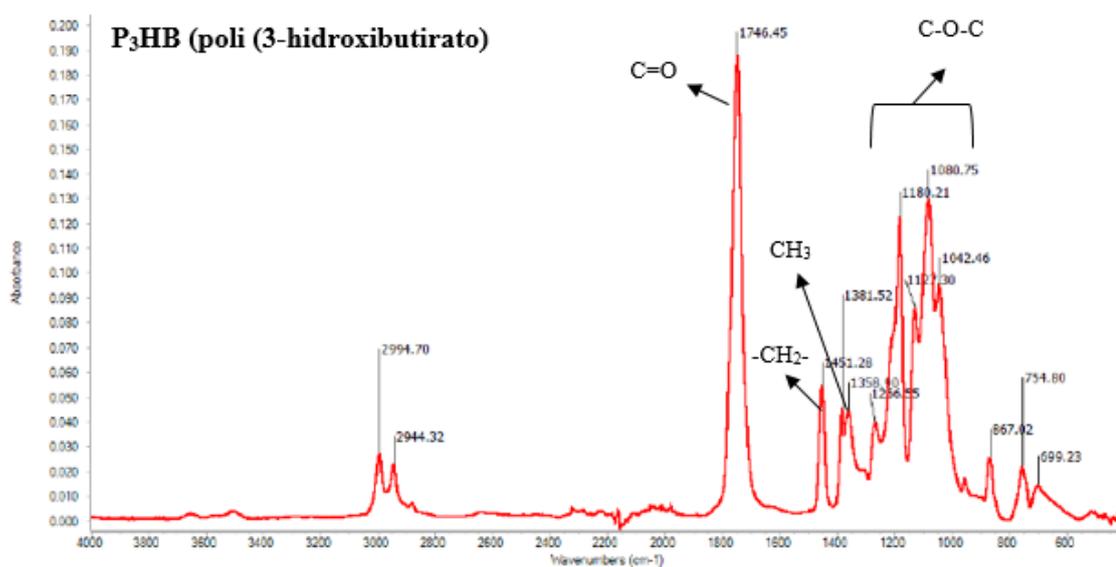


Ilustración 38 Espectro del biopolímero poli (3-hidroxitubirato).

Fuente: Autores.

En la ilustración 38 y anexo 6.5 se presenta el espectro FTIR del P3HB en polvo, en donde se muestra las bandas más importantes para el biopolímero teniendo así que a 1746 cm^{-1} hay características similares del estiramiento del enlace $\text{C}=\text{O}$ en compuestos orgánico (carbonílicos) y se observaron una serie de bandas intensas entre 1000 y 1300 cm^{-1} producidas por estiramiento del enlace $\text{C}-\text{O}$ del grupo éster, los mismos que conforman los monómeros de esteres. Del mismo modo se presentaron bandas intensas a 1451 cm^{-1} debida a la deformación asimétrica del enlace CH_3 , las otras bandas en el rango de 1000 a 1500 cm^{-1} son ocasionadas por vibraciones o al estiramiento del enlace CH_2 , y por último se observó una banda ancha entre 3000 y 3300 cm^{-1} ocasionada por estiramiento de CH_3 y CH_2 .

3.5.3 Interpretación del espectro del film plástico de P3HB.

En la ilustración 39 y anexo 6.5 se observa que al convertir el poli (3 hidroxibutirato) en polvo a plástico el espectro FTIR y sus principales bandas de absorción no presentan alteraciones.

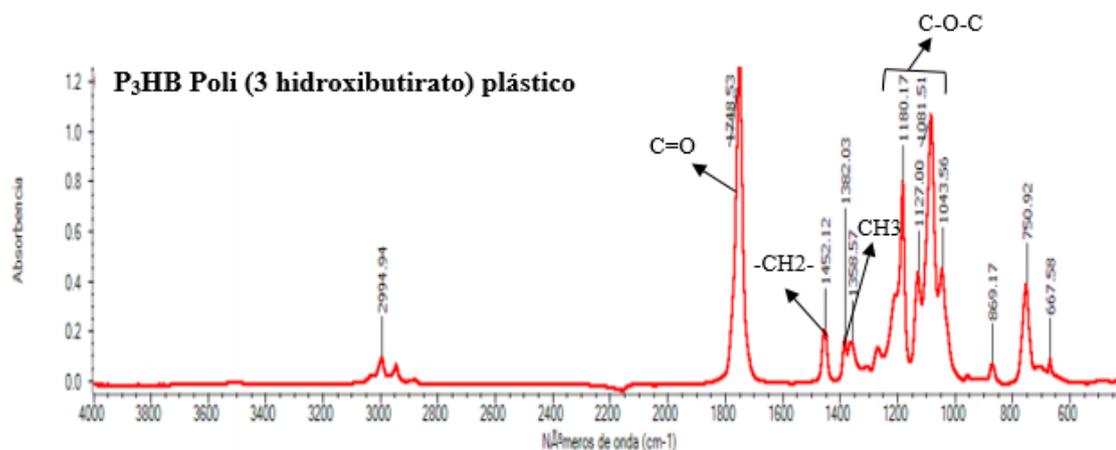


Ilustración 39 Espectro FTIR del Poli (3hidroxibutirato) plástico.

Fuente: Autores.

Cabe destacar que las propiedades del biopolímero transformado en plástico no cambian teniendo así los mismos picos característicos del PHB en polvo.

3.5.4 Estructuración del biopolímero

Para la estructuración de la película plástica se probó diversos solventes y se comprobó de forma visual que con: a) etanol no se observó ninguna reacción, b) acetona se enlazaban las partículas, pero al momento de secarse se cuarteaba, c) acetato de butilo reaccionó igual que el anterior, d) cloroformo se disolvió el polímero en el medio líquido formando un polímero maleable, y por último se experimentó calentar el polímero sin disolvente resultando una costra dura. (Ver ilustración 40)



Ilustración 40 Polímero con diferentes solventes: a) polímero con etanol, b) polímero con acetona, c) polímero con acetato de butilo, d) polímero sin disolvente, e) polímero con cloroformo.

Fuente: Autores.

3.5.5 Lectura del análisis de la degradabilidad

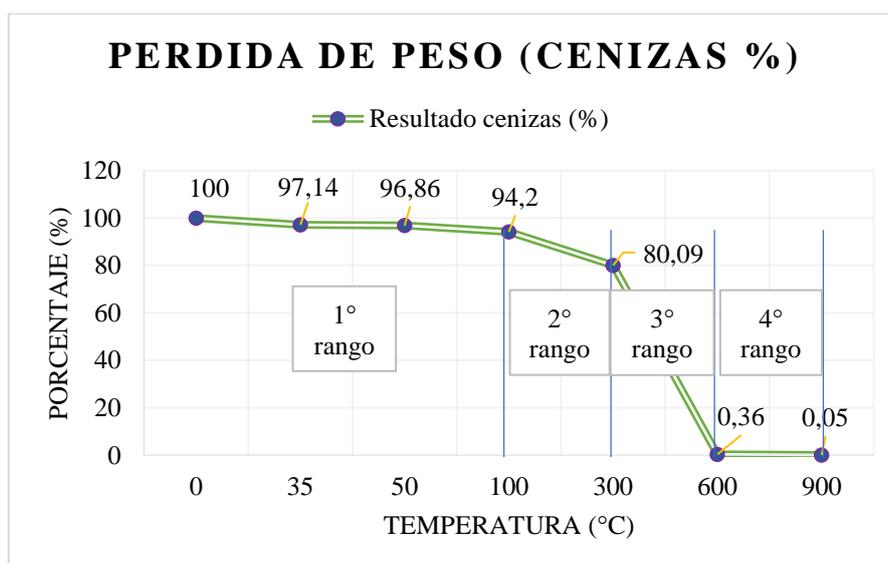
El análisis de degradabilidad se realizó en el Laboratorio SGS del Ecuador S.A. mediante el método de gravimetría usando la normativa LAB-GYE-ME-651 - BASADO EN COVENIN 1155 DETERMINACIÓN DE CENIZA

Para realizar este ensayo se empleó una muestra de 2g y el proceso duró aproximadamente 2 horas. En la tabla 13 se puede observar las condiciones en las que se realizó el ensayo de degradación del plástico en donde se aprecian 4 rangos significativos para la pérdida de masa: primer rango (0°C a 100°C) segundo rango (100° a 300°C), tercer rango (300°C a 600°C), y el cuarto rango (600°C a 900°C).

Tabla 13 Condiciones de análisis para la degradación del plástico.

Temperatura (°C)	Resultado cenizas (%)	Resultado cenizas (g)
0	100.00	2.000
35	97.14	1.943
50	96.86	1.937
100	94.20	1.884
300	80.09	1.602
600	0.36	0.007
900	0.05	0.001

Elaborado: (SGS del Ecuador S.A., 2021)

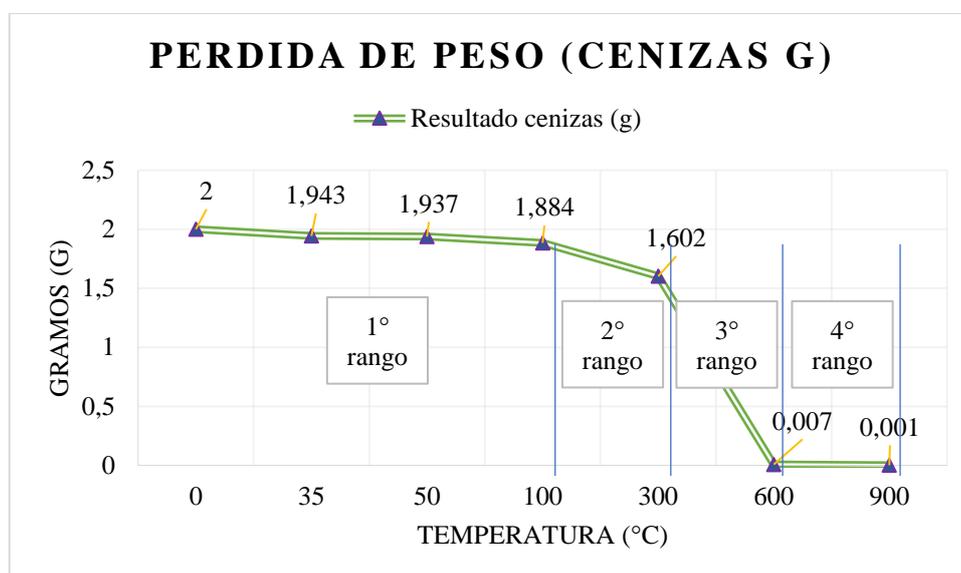


Gráfica 6 Resultado de la prueba gravimétrica en porcentajes.

Fuente: Autores.

En la gráfica 6 y 7 se puede ver los cuatro rangos: en el primer rango generalmente se relaciona con la pérdida de humedad, el segundo y tercer rango se relaciona con la quema del material orgánico como se puede apreciar, el plástico ha empezado a degradarse y se ha

degradado casi en su totalidad y en el cuarto rango nos queda como residuo el material inorgánico que en nuestro caso corresponde al 0.001 g del plástico total a degradar.



Gráfica 7 Resultado de la prueba gravimétrica en gramos.

Fuente: Autores.

3.6 Análisis del estadístico del producto

Para esta investigación se aplicó un análisis de estadística descriptiva. Se realizó un análisis de la biomasa obtenida en el proceso de fermentación y análisis del proceso de extracción, purificación y rendimiento del polihidroxibutirato.

3.6.1 Resultados de la biomasa obtenida, extracción, purificación y rendimiento del polihidroxibutirato (PHB)

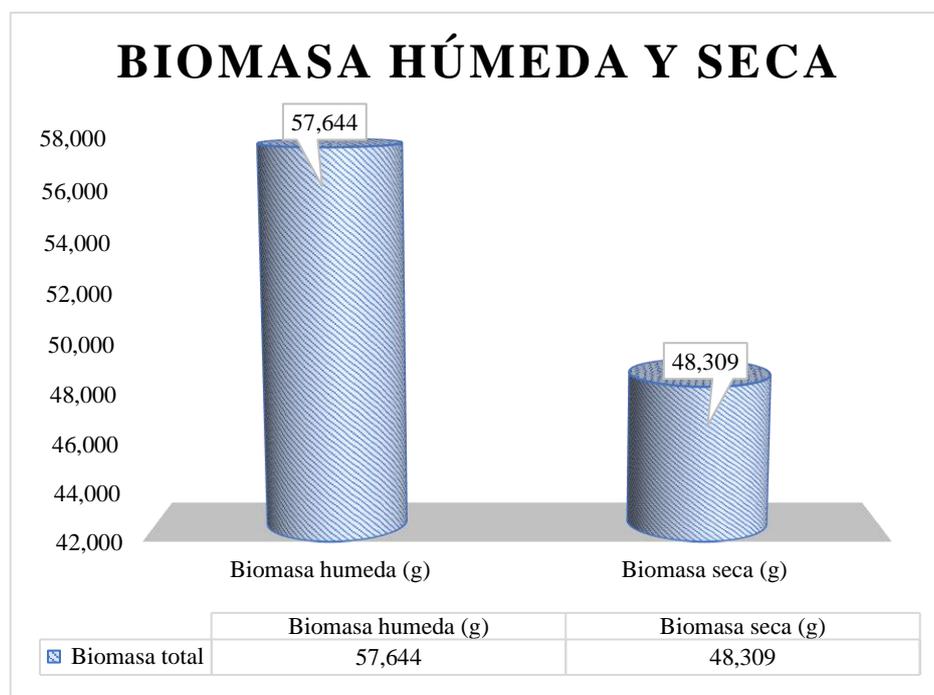
Biomasa obtenida

El número de muestras analizadas fueron 88 (Ver anexo 6.4). En la tabla 14 se puede observar los valores de la biomasa total húmeda y seca obtenida de 1250 ml de medio de cultivo.

Tabla 14 Valores obtenidos de biomasa húmeda y seca.

Biomasa húmeda	Biomasa seca
57.6435g	48.3088g

Fuente: Autores.

**Gráfica 8** Biomasa total húmeda y seca.

Fuente: Autores.

En la gráfica 8 se puede observar los valores de la biomasa total húmeda y seca (57.644g y 48.309 g respectivamente) lo que nos indica que hay una diferencia notable de pérdida de humedad.

Extracción, purificación y rendimiento del polihidroxibutirato (PHB)

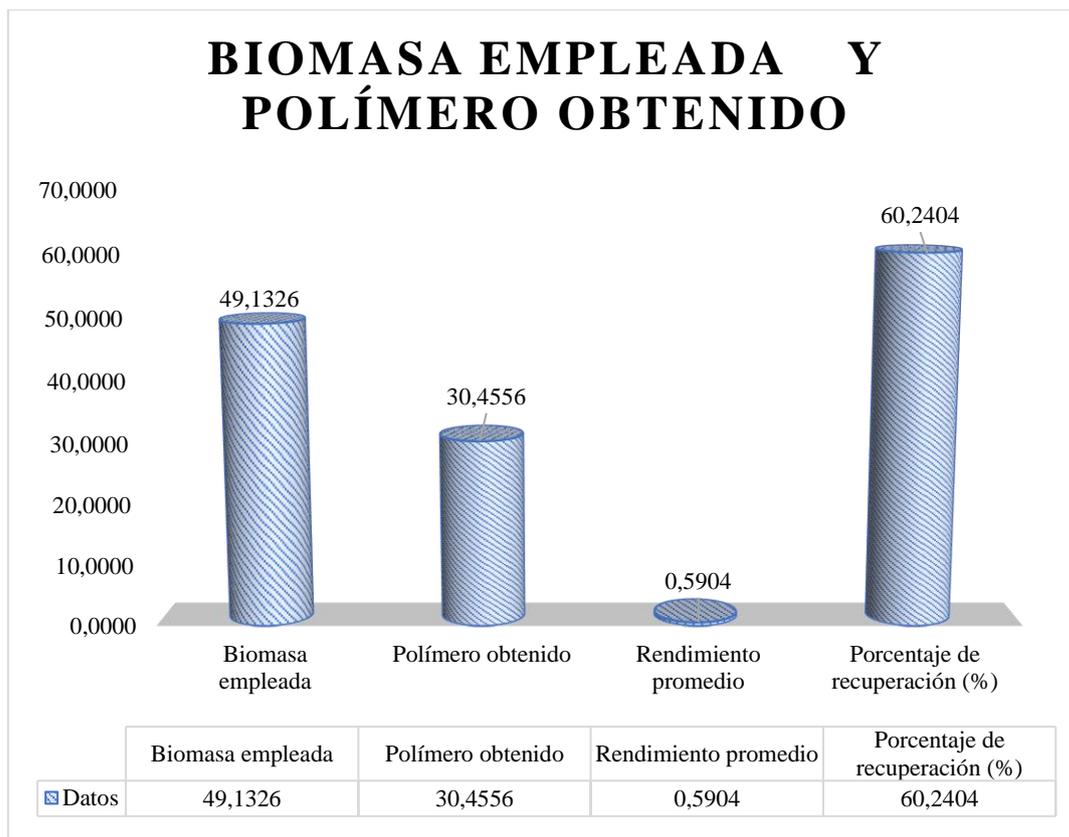
Para el proceso de extracción y purificación del polímero se determinó que la metodología empleada con una relación de 0.02g de biomasa seca suspendida en los micro filtros de vidrio Watman 934-AH TM: 0.3 g de biomasa líquida: 1ml de volumen de dispersión (mitad cloroformo al 99% y mitad hipoclorito de sodio al 10%) fue la que mejor resultado se obtuvo ya que se aplicó otras metodologías y no dio resultados óptimos.

En la tabla 15 se puede observar el polímero obtenido y su porcentaje de recuperación por cada prueba. Según (Jacquel et al., 2008) la metodología empleada tiene hasta un 98% a 99% de porcentaje de recuperación. En nuestro análisis hemos utilizado las ecuaciones 5 y 6 para el cálculo del rendimiento y porcentaje de recuperación respectivamente tomando en cuenta que el rendimiento estándar es de 98%.

Tabla 15 Valores empleados para la obtención del poli 3 hidroxibutirato.

N° pruebas	Biomasa con medio de cultivo (g)	Biomasa líquida (g)	Biomasa seca inicial (g)	Volumen total (ml)		Biomasa total	Polímero obtenido (g)	Rendimiento	Porcentaje recuperación (%)
				Volumen CHCl ₃	Volumen NaClO				
1	15	0.0995	1.1701	25	25	1.2696	0.7238	0.5701	58.1736
2	15	0.0933	1.2223	25	25	1.3156	0.7895	0.6001	61.2353
3	30	0.1477	2.2581	50	50	2.4058	1.3396	0.5568	56.8185
4	30	0.1503	2.1802	50	50	2.3305	1.3417	0.5757	58.7463
5	30	0.1465	2.0465	50	50	2.1930	1.2918	0.5890	60.1069
6	30	0.1482	2.1556	50	50	2.3038	1.3589	0.5899	60.1898
7	30	0.1482	2.1683	50	50	2.3165	1.3993	0.6041	61.6384
8	30	0.1482	2.2487	50	50	2.3969	1.3317	0.5556	56.6939
9	30	0.1482	2.3262	50	50	2.4744	1.3592	0.5493	56.0523
10	30	0.1482	2.1657	50	50	2.3139	1.2987	0.5613	57.2723
11	30	0.1482	2.1769	50	50	2.3251	1.3527	0.5818	59.3663
12	30	0.1482	2.0917	50	50	2.2399	1.3143	0.5868	59.8751
13	30	0.1482	2.0422	50	50	2.1904	1.4529	0.6633	67.6851
14	30	0.1482	2.0994	50	50	2.2476	1.3725	0.6107	62.3123
15	30	0.1482	2.0362	50	50	2.1844	1.2959	0.5933	60.5360
16	30	0.1482	2.0348	50	50	2.1830	1.3587	0.6224	63.5112
17	30	0.1482	2.0527	50	50	2.2009	1.3642	0.6198	63.2497
18	30	0.1482	2.0736	50	50	2.2218	1.3896	0.6254	63.8212
19	30	0.1482	2.1859	50	50	2.3341	1.2994	0.5567	56.8072
20	30	0.1482	2.3084	50	50	2.4566	1.3298	0.5413	55.2372
21	30	0.1482	2.3964	50	50	2.5446	1.3599	0.5344	54.5340
22	30	0.1482	2.3883	50	50	2.5364	1.6591	0.6541	66.7461
23	30	0.1482	2.4805	50	50	2.6287	1.6724	0.6362	64.9200
TOTAL	630	3.3042	45.8283	1100	1100	49.1326	30.4556	0.5904	60.2404

Fuente: Autores.



Gráfica 9 Biomasa empleada y polímero obtenido.

Fuente: Autores.

En la gráfica 9 e ilustración 41 se puede observar que empleando 49.13255g de biomasa seca se pudo obtener 30.4556g de nuestro polímero poli (3hidroxibutirato) con un rendimiento de 0,5904 y un porcentaje de recuperación del 60,2404%.



Ilustración 41 Poli (3 hidroxibutirato) total obtenido.

Fuente: Autores.

3.6.2 Análisis estadístico descriptivo de la biomasa húmeda, biomasa seca, biomasa total, polímero obtenido, rendimiento y porcentaje de recuperación del polímero

Para el análisis estadístico descriptivo, el número de muestras analizadas para la biomasa húmeda y biomasa seca fueron 88 y para la biomasa total, polímero obtenido, rendimiento y porcentaje de recuperación fueron 23. Se plantearon dos hipótesis, “hipótesis nula y alternativa” para los 6 parámetros (biomasa húmeda, biomasa seca, biomasa total, polímero obtenido, rendimiento y porcentaje de recuperación del polímero) que se muestra a continuación:

H_0 : El conjunto de datos se comportan de forma normal.

H_1 : El conjunto de datos no se comportan de forma normal.

Los resultados finales de aceptación de hipótesis nula y alternativa fueron los siguientes:

- Para la biomasa húmeda y biomasa seca se aceptó la hipótesis nula, aceptando que los datos se comportan de forma normal.
- Para la biomasa total y polímero obtenido se aceptó la hipótesis alternativa aceptando que los datos no tienen un comportamiento normal.
- Para el rendimiento y porcentaje de recuperación del polímero se aceptó la hipótesis nula, aceptando que los datos tienen un comportamiento normal.

A continuación, se demuestran la aceptación de hipótesis nula y alternativa de los 6 parámetros analizados (biomasa húmeda, biomasa seca, biomasa total, polímero obtenido, rendimiento y porcentaje de recuperación del polímero).

En la tabla 16 se puede observar los valores de media, mediana, varianza y desviación estándar de la biomasa húmeda, biomasa seca, biomasa total, polímero obtenido, rendimiento y porcentaje de recuperación del polímero.

Tabla 16 Análisis estadístico descriptivo

ANALISIS ESTADISTICO DESCRIPTIVO					
N° muestras	Parámetros descriptivos	Media	Mediana	Varianza	Desviación estándar
88	Biomasa húmeda	0,655	0,660	0,003	0,057
88	Biomasa seca	0,549	0,544	0,003	0,053
23	Biomasa total	2,244	2,314	0,106	0,326
23	Polímero obtenido	1,324	1,353	0,042	0,204
23	Rendimiento	0,590	0,589	0,001	0,035
23	Porcentaje de recuperación	60,240	60,107	13,045	3,612

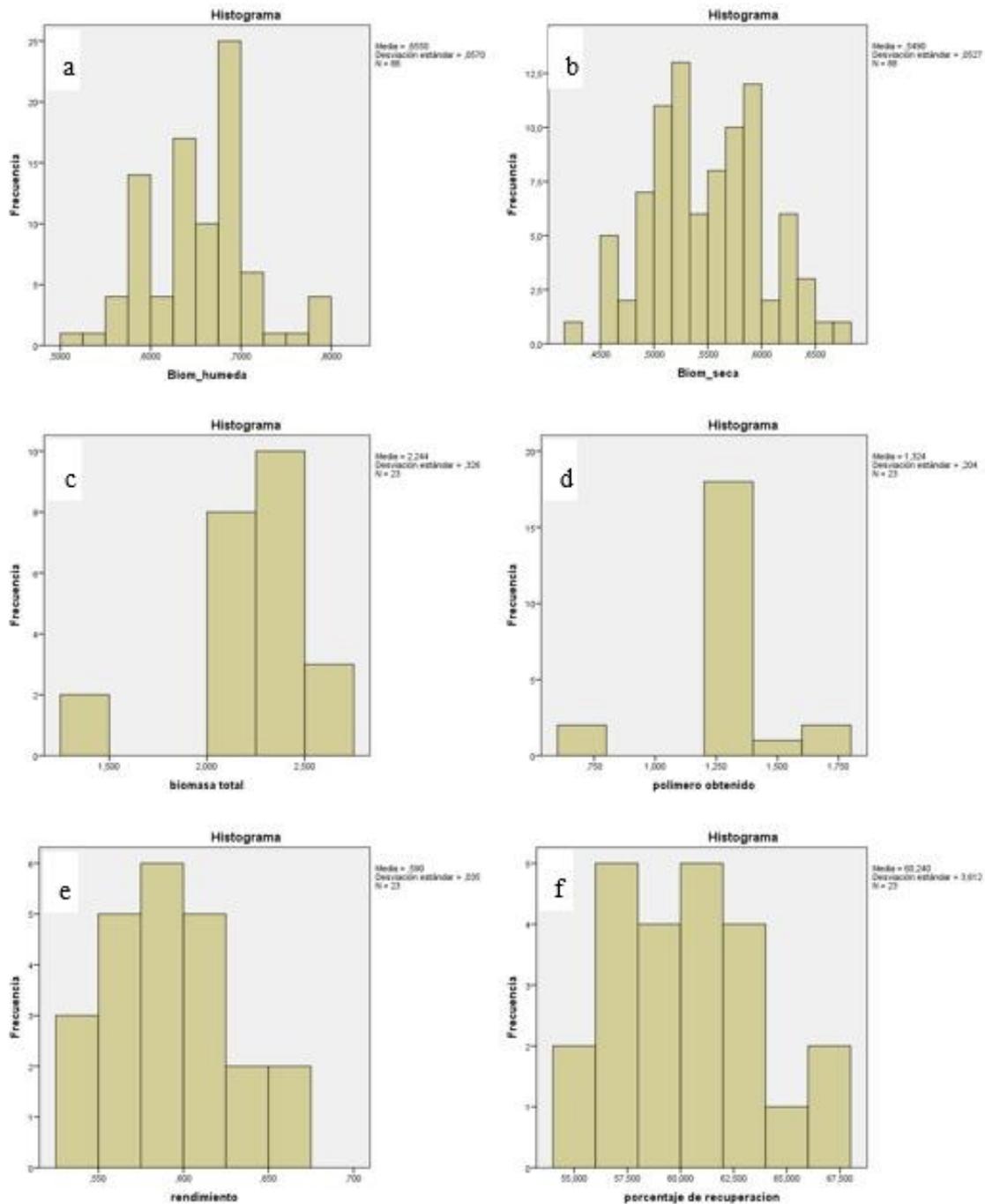
Fuente: Autores.

En la tabla 17 se muestran los resultados de las pruebas de normalidad aplicada a los 6 parámetros de análisis.

Tabla 17 Pruebas de normalidad

PRUEBAS DE NORMALIDAD							
N° muestras	Parámetros descriptivos	Kolmogorov-Smirnov^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
88	Biomasa húmeda	0,085	88,000	0,17	0,973	88,000	0,060
88	Biomasa seca	0,081	88,000	0,20	0,988	88,000	0,590
23	Biomasa total	0,339	23,000	0,00	0,701	23,000	0,000
23	Polímero obtenido	0,350	23,000	0,00	0,707	23,000	0,000
23	rendimiento	0,099	23,000	0,20	0,970	23,000	0,691
23	Porcentaje de recuperación	0,099	23,000	0,20	0,970	23,000	0,691

Fuente: Autores.

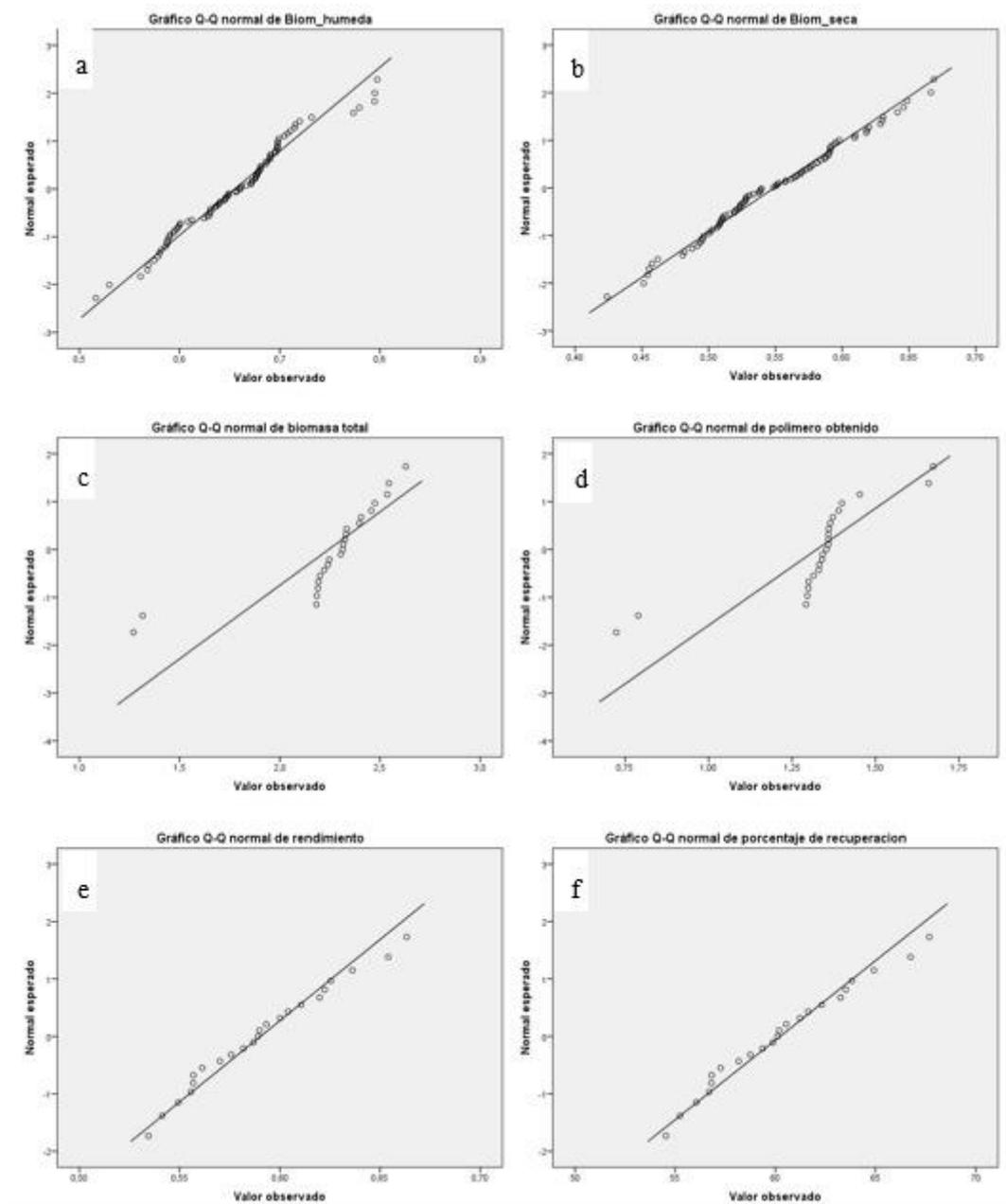


Gráfica 10 Histogramas de la distribución gaussiana.

Fuente: Autores.

En la gráfica 10 se puede observar los histogramas con la distribución gaussiana: a y b representan la biomasa húmeda y la biomasa seca. Estas cumplen con la prueba de normalidad, c y d ilustran la biomasa total y polímero obtenido que no cumple con la prueba

de normalidad, e y f describen el rendimiento y el porcentaje de recuperación del polímero, cumpliendo con la prueba de normalidad.

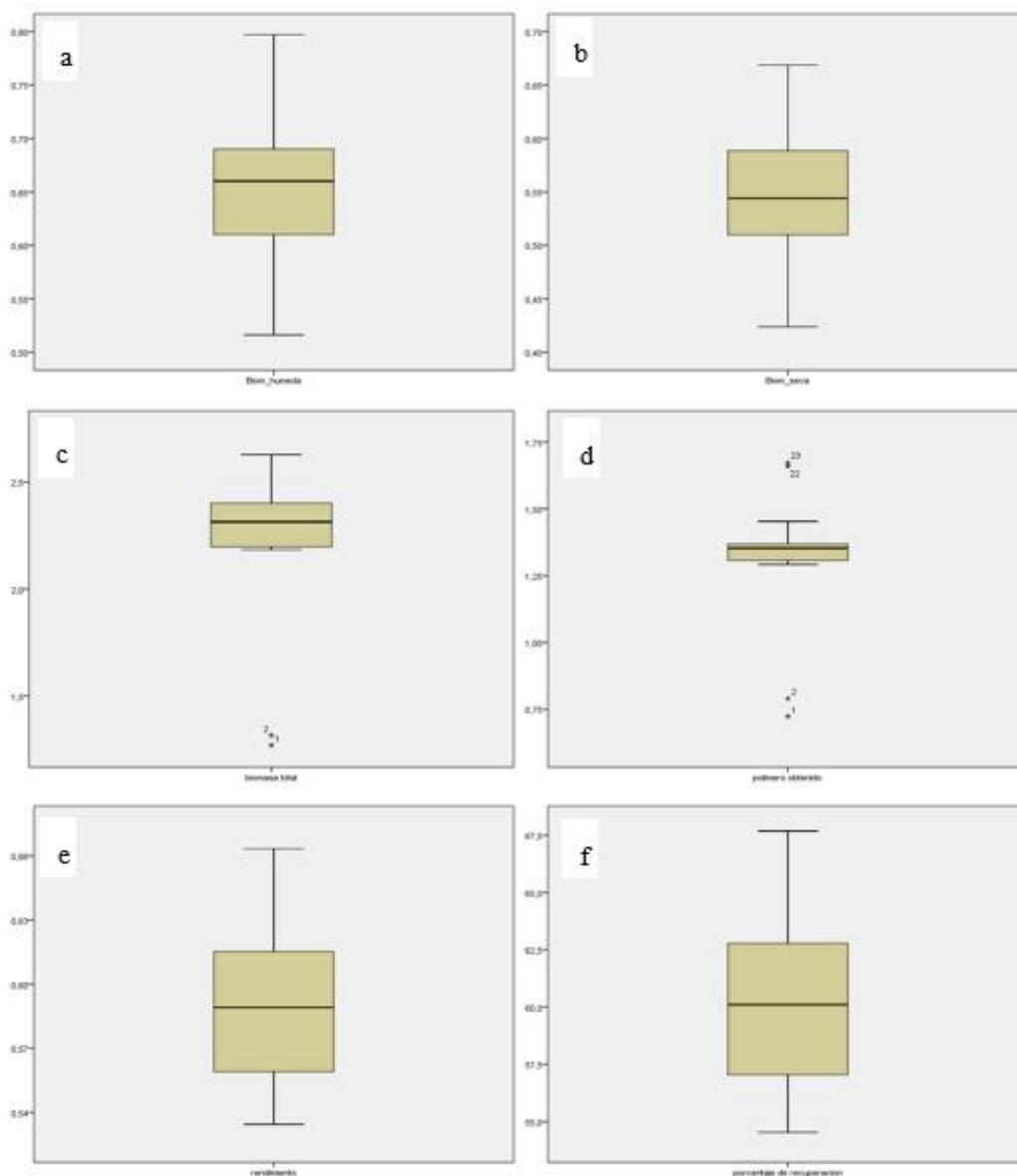


Gráfica 11 Regresión lineal de la biomasa húmeda, seca, polímero obtenido, rendimiento y porcentaje de recuperación.

Fuente: Autores.

En la gráfica 11 se puede observar las regresiones lineales de los parámetros analizados representando a y b la biomasa húmeda y la biomasa seca teniendo una distribución normal

de los datos, es decir cumplen con la prueba de normalidad, c y d nos indican que los datos están muy dispersos y no cumplen con una distribución normal debido a falta de datos, e y f describen el rendimiento y el porcentaje de recuperación del polímero teniendo esta una distribución normal de los datos por lo tanto, cumplen la prueba de normalidad.



Gráfica 12 Diagramas de caja de la biomasa húmeda, seca, polímero obtenido, rendimiento y porcentaje de recuperación.

Fuente: Autores.

En la gráfica 12 se puede observar los diagramas de caja de los parámetros analizados. a y b representan la biomasa húmeda y la biomasa seca en donde se visualiza que la media se encuentra dentro del rango establecido, en c y d se observa la media de cada uno de los

parámetros en donde se puede diferenciar que hay valores que se encuentran fuera del rango lo que nos confirma que no tiene un comportamiento normal por falta de datos, e y f describen el rendimiento y el porcentaje de recuperación del polímero visualizando la media de cada parámetro y que todos los datos se encuentran dentro del rango, lo que nos confirma que los datos tienen una distribución normal.

3.7 Análisis de factibilidad del PHB

En la tabla 18 se presenta un resumen de las encuestas realizadas a las empresas (ver anexo 6.6) en la cual se muestra las posibles restricciones para impedir que el producto sea factible.

Tabla 18 Resumen de las encuestas realizadas al mercado.

INFORMACIÓN GENERAL	
PRODUCTO	POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DEL SUBPRODUCTO GLICEROL PROCEDENTE DE LA TRANSFORMACIÓN DE ACEITES USADOS DE PALMA A BIODIESEL
MERCADO	Empresas dedicadas a la producción y venta de plásticos en el Ecuador
UBICACIÓN	Provincia del Azuay, Cuenca
COMPETENCIA	No hay proveedores de PHB en el Ecuador
SUSTITUTOS	Polietileno de alta densidad; Polipropileno y Polietileno de baja densidad
POSIBLES RESTRICCIONES PARA INGRESAR AL MERCADO	El tercer atributo más importante al momento de elegir un material base para la producción de plásticos es el Precio, y el 50% de los encuestados están dispuestos a pagar hasta \$600 por Kg de PHB. Mientras que nuestros costos de producción de 1 Kg es de \$983.96 no permiten igualar las expectativas de precio de nuestro mercado.

Desconocimiento del Polihidroxitirato (PHB) en el
mercado Ecuatoriano.

Temor del mercado por falta de pruebas de producción y
no conocen si su maquinaria podría funcionar con esta
materia prima.

Fuente: Autores.

En la tabla 19 se detalla la inversión inicial y los costos fijos considerados en el análisis de factibilidad.

Tabla 19 Valores de la inversión inicial y costos fijos.

INVERSIÓN INICIAL	\$ 23,459.63
Muebles y equipos	19271.79
Suministros de operación	1977.84
Gastos legales	2000
Publicidad	210
COSTOS FIJOS	
Arriendo	\$540.00
Gastos de operación	392.77
Personal	1270.00
Gastos de publicidad	210.00

Fuente: Autores.

Para este análisis se desarrolló tres escenarios como se observa a continuación: un escenario pesimista, escenario normal, y un escenario optimista.

a) Escenario pesimista

En la tabla 20 se muestran los indicadores financieros del primer escenario y como se observa que tanto el VAN como el TIR cumplen las condiciones de factibilidad $VAN \geq 0$ y $TIR > 10\%$.

Tabla 20 Indicadores financieros del 1° escenario.

INDICADORES FINANCIEROS	
COSTO DE PRODUCCIÓN POR Kg de PHB	\$983.96

MARGEN COMERCIAL	10%
TIR	20%
VAN	\$ 7,024

Fuente: Autores.

En la tabla 21 se muestra el flujo proyectado para 5 años con una demanda mínima anual de 360kg del biopolímero con un incremento del 3%.

Tabla 21 Flujo proyectado para 5 años en el escenario pesimista.

Descripción	Inversión Inicial	FLUJO PROYECTADO A 5 AÑOS				
		1 año	2 años	3 años	4 años	5 años
Ventas		\$ 389,648	\$ 401,337	\$ 413,377	\$ 425,778	\$ 438,552
Costo de Ventas		\$ 354,225	\$ 364,852	\$ 375,797	\$ 387,071	\$ 398,683
Utilidad Bruta		\$ 35,423	\$ 36,485	\$ 37,580	\$ 38,707	\$ 39,868
Gastos Operativos		\$ 29,339	\$ 29,350	\$ 29,362	\$ 29,374	\$ 29,387
Arriendo		\$ 6,480	\$ 6,480	\$ 6,480	\$ 6,480	\$ 6,480
Gastos de Operación		\$ 4,713	\$ 4,713	\$ 4,713	\$ 4,713	\$ 4,713
Gastos de personal		\$ 15,240	\$ 15,240	\$ 15,240	\$ 15,240	\$ 15,240
Fletes		\$ 386	\$ 397	\$ 409	\$ 421	\$ 433
Gastos de Publicidad		\$ 2,520	\$ 2,520	\$ 2,520	\$ 2,520	\$ 2,520
UTILIDAD DIRECTA	\$ -23,460	\$ 6,084	\$ 7,135	\$ 8,218	\$ 9,333	\$ 10,482

Fuente: Autores.

b) Escenario normal

En la tabla 22 se muestran los indicadores financieros del segundo escenario y se observa que tanto el VAN como el TIR cumplen las condiciones de factibilidad $VAN \geq 0$ y $TIR > 10\%$.

Tabla 22 Indicadores financieros del 2° escenario.

INDICADORES FINANCIEROS	
COSTO DE PRODUCCIÓN POR Kg de PHB	\$983.96
MARGEN COMERCIAL	10%

TIR	48%
VAN	\$ 29,778

Fuente: Autores.

La tabla 23 demuestra el flujo proyectado para 5 años del escenario normal en el cual la producción mínima anual es de 504kg que representa un 40% del aumento en la producción frente al escenario pesimista (en base a las encuestas) y con un incremento del 3% como en el caso anterior.

Tabla 23 Flujo proyectado para 5 años en el escenario normal.

Descripción	Inversión Inicial	FLUJO PROYECTADO A 5 AÑOS				
		1 año	2 años	3 años	4 años	5 años
Ventas		\$ 545,507	\$ 561,872	\$ 578,728	\$ 596,090	\$ 613,972
Costo de Ventas		\$ 495,915	\$ 510,793	\$ 526,116	\$ 541,900	\$ 558,157
Utilidad Bruta		\$ 49,592	\$ 51,079	\$ 52,612	\$ 54,190	\$ 55,816
Gastos Operativos		\$ 38,289	\$ 38,305	\$ 38,321	\$ 38,338	\$ 38,355
Arriendo		\$ 6,480	\$ 6,480	\$ 6,480	\$ 6,480	\$ 6,480
Gastos de Operación		\$ 5,892	\$ 5,892	\$ 5,892	\$ 5,892	\$ 5,892
Gastos de personal		\$ 22,860	\$ 22,860	\$ 22,860	\$ 22,860	\$ 22,860
Fletes		\$ 537	\$ 553	\$ 570	\$ 587	\$ 604
Gastos de Publicidad		\$ 2,520	\$ 2,520	\$ 2,520	\$ 2,520	\$ 2,520
UTILIDAD DIRECTA	\$ -23,460	\$ 11,303	\$ 12,774	\$ 14,290	\$ 15,852	\$ 17,460

Fuente: Autores.

c) *Escenario optimista*

En la tabla 24 se demuestran los indicadores financieros del tercer escenario y como se observa que tanto el VAN como el TIR cumplen las condiciones de factibilidad $VAN \geq 0$ y $TIR > 10\%$.

Tabla 24 Indicadores financieros del 3° escenario.

INDICADORES FINANCIEROS	
COSTO DE PRODUCCIÓN POR Kg de PHB	\$983.96
MARGEN COMERCIAL	10%
TIR	52%
VAN	\$ 34,045

Fuente: Autores.

En la tabla 25 se muestra el flujo proyectado para 5 años del escenario optimista en el cual la producción mínima anual es de 648kg que representa un 80% del aumento en la producción frente al escenario pesimista (en base a las encuestas) y con un incremento del 3% como en los casos antes mencionados.

Tabla 25 Flujo proyectado para 5 años en el escenario optimista.

Descripción	Inversión Inicial	FLUJO PROYECTADO A 5 AÑOS				
		1 año	2 años	3 años	4 años	5 años
Ventas		\$ 701,366	\$ 722,407	\$ 744,079	\$ 766,401	\$ 789,393
Costo de Ventas		\$ 637,605	\$ 656,733	\$ 676,435	\$ 696,728	\$ 717,630
Utilidad Bruta		\$ 63,761	\$ 65,673	\$ 67,644	\$ 69,673	\$ 71,763
Gastos Operativos		\$ 52,115	\$ 52,136	\$ 52,157	\$ 52,179	\$ 52,201
Arriendo		\$ 6,480	\$ 6,480	\$ 6,480	\$ 6,480	\$ 6,480
Gastos de Operación		\$ 9,426	\$ 9,426	\$ 9,426	\$ 9,426	\$ 9,426
Gastos de personal		\$ 30,480	\$ 30,480	\$ 30,480	\$ 30,480	\$ 30,480
Fletes		\$ 689	\$ 709	\$ 730	\$ 752	\$ 775
Gastos de Publicidad		\$ 5,040	\$ 5,040	\$ 5,040	\$ 5,040	\$ 5,040
UTILIDAD DIRECTA	\$ -23,460	\$ 11,645	\$ 13,537	\$ 15,487	\$ 17,494	\$ 19,562

Fuente: Autores.

Al analizar los tres escenarios posibles se puede decir que el proyecto es viable siempre y cuando se tenga por lo menos un cliente que requiera de esa mínima demanda de compra, tomando en cuenta que los costos de producción son muy elevados en consideración a

productores internacionales. Además, que el mercado ecuatoriano no tiene pruebas que este biopolímero sea adaptable a las maquinarias que utilizan en sus procesos productivos.

3.8 Discusión

Según (Saavedra, 2008), para el proceso de transesterificación se reemplaza el glicerol por un alcohol simple como etanol o metanol que al ser mezclados con Hidroxido de sodio (NaOH) dan lugar al metoxido o etoxido para producir esteres metilicos o etilicos de ácidos grasos que permiten disminuír la viscosidad de la muestra. De acuerdo con el autor (Saavedra) para el proceso de transterificacion de aceite de palma usado, en esta investigación se empleo como alcohol el metanol debido a que el NaOH se disolvió con mayor facilidad en este medio y se obtuvo una semejanza del 90.19% a la glicerina pura (Ver anexo 6.2).

Según (Parra, Marin, Jácome & Siche, 2018) se estudió la decoloración del glicerol a través de tres métodos: ozonización, adsorción con carbón activado (CA) y adición de peróxido. De acuerdo con (Parra, Marin, Jácome & Siche) el mejor método para la decoloración fue la adsorción con carbón activado, se rechazó dicha conclusión debido a que la técnica de decoloración del glicerol que mejor funcionó en nuestro proyecto fue la adición de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) con una concentración del 60% a una temperatura de 80°C y 400 rpm durante 30 minutos en el cual, se observó un cambio en la coloración del glicerol. (Ver ilustración 19)

Según (López et al., 2012; Naranjo, Posada, Higueta, & Cardona, 2013; Naranjo Vasco, 2010; Vishnuvardhan Reddy, Thirumala, & Mahmood, 2009) empleando *Bacillus megaterium* fueron capaces de obtener un porcentaje de recuperación de biopolímero (P3HB) del 60%, 62.4%, 62.3%, 62.43% respectivamente empleando glicerol como fuente de carbono. En nuestro trabajo práctico-experimental se corroboró que al emplear como

organismo productor de poli(3hidroxibutirato) a la bacteria *Bacillus megaterium* y como fuente de carbono el glicerol se puede obtener un porcentaje de acumulación del polímero del 60.24%, que es un valor similar a los ensayos de los autores mencionados (López et al., 2012; Naranjo et al., 2013; Naranjo Vasco, 2010; Vishnuvardhan Reddy et al., 2009)

4 CAPÍTULO: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

El presente estudio se realizó con la finalidad de presentar una alternativa para aprovechar los aceites usados, con el objeto de desarrollar un biopolímero que sea amigable con el ambiente y con propiedades parecidas al polipropileno y polietileno para reducir el consumo de los plásticos producidos a partir del petróleo.

Se observó que el aceite usado tiene características como: densidad de 0.939 g/ml que supera los límites establecidos (Mínimo: 0.891 y Máximo: 0.914) en la normativa INEN 2421 debido a que es un producto ya tratado, el índice de saponificación de 196.35mgNaOH/g que está dentro de los parámetros establecidos (Mínimo: 180 y Máximo: 270) por la normativa INEN 1640; mientras que el índice de acidez es 1,25mgNaOH/g y se encuentra muy por encima del parámetro establecido (Mínimo: 0 y Máximo: 0.2) por la normativa INEN 1640 debido a que es más ácido que el aceite virgen.

Dentro del análisis expuesto en el proceso de transesterificación del aceite se obtuvo mayor cantidad de glicerina cuando el proceso se realizó con mayor cantidad de metóxido de sodio y con similitud del 90.19% de glicerina pura. En el proceso de purificación se realizaron cuatro etapas: acidificación, neutralización, destilación y decoloración. En esta última etapa se determinó que la relación óptima para que el glicerol no perdiera sus propiedades fue de 1:4 (peróxido de hidrógeno: glicerina) con similitud del 80.13% al glicerol.

Para el proceso de fermentación se empleó la bacteria *Bacillus megaterium* y se determinó que las condiciones óptimas para el crecimiento de las bacterias fue el pH de 7, temperatura 35°C, agitación de 200 rpm durante 72 horas.

Se determinó mediante análisis espectroscópico infrarrojo FTIR que el producto obtenido es el poli(3hidroxibutirato) (Ver ilustración 40) con densidad de 0.9156g/ml y no es soluble en agua, etanol, metanol y acetona. Para determinar la degradabilidad se aplicó el método gravimétrico en el que se constató que, con el cambio de la temperatura hay un registro de pérdida del peso es decir que en el transcurso de tiempo a mayor temperatura se evidencio mayor desintegración del biopolímero llegando a un máximo de 600°C en donde la materia orgánica se degrada casi en su totalidad, obteniendo una degradación del 99.95% de la película del bioplástico.

Aplicando el método de extracción y purificación mencionado anteriormente se logró muy buenos resultados obteniendo 30.4556g del polímero poli(3hidroxibutirato), un rendimiento de 0.5904, y un porcentaje de recuperación de 60.24% semejantes a los resultados obtenidos por otros autores. Para obtener las películas plásticas de P3HB maleable se utilizó el cloroformo como solvente en relación 1g:20ml (polímero: solvente).

Luego de realizar el análisis estadístico se demostró que los parámetros de biomasa total y polímero obtenido no cumplen con una normalidad, debido a que el número de muestras no es suficiente para afirmar o rechazar la hipótesis. De igual manera se concluyó que para la biomasa húmeda, la biomasa seca, el rendimiento y porcentaje de recuperación del polímero, cumplen con una distribución normal validando el método aplicado.

Por último, se puede concluir que, no es factible producir este biopolímero por el momento debido a que el mercado ecuatoriano no tiene conocimiento de este producto y sobre todo desconocen si sus maquinarias son aptas para este tipo de plástico, pero lo más importante es porque es el costo de producción es muy elevado en consideración a los plásticos derivados del petróleo producidos por las grandes empresas trasnacionales. Por tal

motivo se depende de los posibles clientes que estén dispuestos a emplear un producto amigable con el ambiente.

4.2 Recomendaciones

- Para el proceso de acidificación de la glicerina se recomienda utilizar ácidos no concentrados con la finalidad de obtener un pH óptimo para los siguientes procesos.
- Para el proceso de fermentación con *Bacillus Megaterium* se recomienda tener en cuenta que el nitrógeno y la oxigenación es un limitante para el crecimiento de la bacteria y producción de P3HB.
- Para la determinación de la biomasa se recomienda realizar la filtración por membrana utilizando microfiltros de vidrio Watman 934-AHTM de diámetro 47mm debido a que permite una mayor retención de biomasa.
- Para el proceso de extracción de P3HB al manipular sustancias tóxicas como el cloroformo se recomienda utilizar el equipo de protección personal adecuado y trabajar bajo la campana de extracción cerrada para así evitar el derrame de dichas sustancias y accidentes que perjudiquen al personal.
- Para el proceso de estructuración del biopolímero se recomienda utilizar como solvente el cloroformo ya que gracias a sus propiedades permite la desintegración del subproducto para formar un plástico maleable.
- Para que el producto sea viable se recomienda realizar una campaña de sensibilización hacia el mercado sobre los beneficios del P3HB.

5 BIBLIOGRAFÍA

- Abril Diaz Nieves, B. R. J. A. (1984). Series flow tandem fan: A high-speed V/STOL propulsion concept. *SAE Technical Papers*, 1–8. <https://doi.org/10.4271/841496>
- Aguzín, F. L., Bedogni, G. A., Okulik, N. B., & Padró, C. L. (2015). Purificación de glicerol crudo y sus usos en catálisis. Retrieved from http://www.aaiq.org.ar/SCongresos/docs/06_029/papers/02a/02a_1635_649.pdf
- Alaniz, E. (2016). MANUAL PARA IDENTIFICACION DE PLASTICOS Memoria de Experiencias Profesionales Que para obtener el Título de INGENIERO QUIMICO INDUSTRIAL p r e s e n t a.
- Alexander Posada-Duque, J., & Ariel Cardona-Alzate, C. (2010). Análisis de la refinación de glicerina obtenida como coproducto en la producción de biodiésel Validation of Glycerin Refining Obtained as a by-Product of Biodiesel Production Análise do refino da glicerina obtida como subproduto na produção de biodiesel. *Univ. Bogotá (Colombia)*, 14(141), 9–27.
- Alexandra, S., Moreno, S., Alejandro, M., Montoya, M., Lucía, A., Martínez, M., & Yepes, S. (2012). Identificación de bacterias productoras de Polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 89–100.
- Álvarez-da Silva, L. (2016). Bioplásticos: obtención y aplicaciones de polihidroxicanoatos. *Universidad de Sevilla*, 38.
- Álvarez, C. (2015). *Análisis de la producción de polihidroxibutirato usando lactosuero como materia prima*.
- Amado, E., & Mora, L. (2006). aceite vegetal en función de la temperatura ANALYSIS OF THE VARIATION OF THE VEGETABLE, 4(2), 54–56.
- Ana Carolina Lemos Delgado, & Alexis Mina Cordoba. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico*, 79(1), 93–101. Retrieved from http://revistas.sena.edu.co/index.php/inf_tec/article/view/139/195
- Anco Tacuri, F. (2011). *Determinación de los parámetros óptimos de elaboración de jabón a partir de grasa de ovino (Ovis aries) en la provincia de Janín*. Universidad Nacional Del Centro del Perú. Universidad Nacional del Centro del Peru. Retrieved from [http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/3053/Anco Tacuri.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/3053/Anco_Tacuri.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Arzave, R., Loaiza, R., Santoyo Stephano, L., Velásquez, M. L., Barragán Pedro de Alba, M. L., Universitaria, C., ... León, N. (2016). Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ Y ACIDEZ TOTAL DE CINCO MAYONESAS RESUMEN, 1(2), 843–849. Retrieved from <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/10/146.pdf>
- ASTM INTERNATIONAL. (2019). ASTM D1505 - Laboratorio de pruebas de densidad - TRL. Retrieved April 28, 2021, from <https://www.trl.com/density-testing/>

- Bailon Neira, R. C. (2012). Fermentaciones Industriales. *Revista de La Universidad de Callao*, 1(2), 17–24. Retrieved from https://unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/IF_MAYO_2012/IF_BAILON_NEYRA_FIPA.pdf
- Catalina, W. G. (2013). Comportamiento del Aceite de Palma (*Elaeis Guineensis* Jacq) y el aceite de Oliva, en el Metodo de Coccion: Fritura Profunda. *Analisis Pendapatan Dan Tingkat Kesejahteraan Rumah Tangga Petani*, 53(9), 1689–1699.
- Chen, G. Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*. <https://doi.org/10.1039/b812677c>
- Diaz Quishpe Miryam Lorena. (2016). *ESTUDIO DEL CONTENIDO DE ESTEROLES EN LAS ETAPAS DE REFINACIÓN DE LOS ACEITES COMESTIBLES DE PALMA Y SOYA Informe*. Universidad Central del Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9903/1/T-UCE-0008-QA001-2016.pdf>
- Domingo, M. A. (2011). Agustin Martin Domingo. *Apuntes de Mecanica de Fluidos*. Retrieved from <http://oa.upm.es/6531/1/amd-apuntes-fluidos.pdf>
- El Comercio. (2018). *Convenios en cinco ciudades del Ecuador para reciclar aceites usados*. Retrieved from <https://www.elcomercio.com/actualidad/ecuador/convenios-ciudades-ecuador-reciclar-aceites.html>
- ETAPA EP. (2021). *Programa de recolección y disposición de aceites usados*. Retrieved from <https://www.etapa.net.ec/informacion/gestion-ambiental/gestion-de-desechos-y-calidad-ambiental/programa-de-recoleccion-y-disposicion-de-aceites-usados>
- Fern, L., & Cabeza, N. (2017). Biotransformación Bacteriana.
- Gómez Cardozo, J. R., Mora Martínez, A. L., Yepes Pérez, M., & Correa Londoño, G. A. (2016). Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates and Native Microorganisms Synthesized from Fatty Waste. *International Journal of Polymer Science*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6541718>
- González Gutiérrez, M. G. (2008). Producción de poli-hidroxialcanoatos por bacterias del género *Bacillus* de origen marino, 4–19. Retrieved from https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/288/1/gonzalez_m.pdf
- González García, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., & Córdova López, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 29(1), 77–115. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v29n1/v29n1a7.pdf>
- Goyenola, G. (2007). Determinación del pH. *Public Health*, 1(315025), 0–1. Retrieved from [http://imasd.fcien.edu.uy/difusion/educamb/propuestas/red/curso_2007/cartillas/tematicas/Determinacion del pH.pdf](http://imasd.fcien.edu.uy/difusion/educamb/propuestas/red/curso_2007/cartillas/tematicas/Determinacion%20del%20pH.pdf)
- Guido Reinhardt. (2010). Desafíos de la sostenibilidad del biodiésel de aceite de palma Challenges of palm oil biodiesel sustainability Introducción, 31, 153–161. Retrieved from <file:///C:/Users/HP/Downloads/1562-Texto-1562-1-10-20120719.pdf>
- Guillermo D. Manrique. (2009). CARACTERIZACIÓN DE GRASAS Y ACEITES, 1–18. Retrieved from

https://www.fio.unicen.edu.ar/usuario/gmanrique/images/Grasas_y_Aceites.pdf

- Gustavo, V. (2005). *Análisis genético y bioquímico del metabolismo del poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) en Bacillus megaterium*.
- Heras Naranjo, Y. C., & Lojano Criollo, D. J. (2020). *Estudio de la factibilidad de los aceites usados de palma y lubricantes para la elaboración de combustibles*. Cuenca- Ecuador. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18776/1/UPS-CT008776.pdf>
- Jacquel, N., Lo, C. W., Wei, Y. H., Wu, H. S., & Wang, S. S. (2008). Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.029>
- Jimenez Lopez Jimmy Andres. (2011). Biopolímeros de interés industrial. Síntesis y Caracterización de polihidroxi-butirato (PHB). Retrieved from file:///C:/Users/HP/Desktop/BIOPOLÍMEROS DE INTERÉS INDUSTRIAL. SÍNTESIS Y CARACTERIZACION DE PHB.pdf
- Labeaga, A. (2018). Polímeros biodegradables. Importancia y potenciales aplicaciones. *Files.Bartolomevazquezbernal*. ..., 1–50.
- Lafuente Aranda, G. (2017). “GLICEROL: SÍNTESIS Y APLICACIONES.” Universidad Nacional de Educación a Distancia. Retrieved from http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Glafuente/Lafuente_Aranda_Gustavo_TFM.pdf
- Limoncocha, P. D. E. (2016). Cuantificación del porcentaje de humedad y cenizas contenidos en los residuos sólidos urbanos de la parroquia de limoncocha ”.
- López-Díaz, A. S., Ríos-Corripio, M. A., Ramírez-Corona, N., López-Malo, A., & Palou, E. (2018). Effect of short wave ultraviolet radiation on selected properties of edible films formulated with pomegranate juice and chitosan. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, 17(1), 63–73. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/Lopez>
- López, J. A., Naranjo, J. M., Higuera, J. C., Cubitto, M. A., Cardona, C. A., & Villar, M. A. (2012). Biosynthesis of PHB from a new isolated Bacillus megaterium strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(2), 250–258. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0448-1>
- Machado, M. (2010). Materiales Y Métodos 30 Materiales Y Métodos, 1–20.
- Marcela, R. S. M. L. (2006). *TRANSESTERIFICACIÓN DEL ACEITE DE PALMA CON METANOL POR MEDIO DE UNA CATÁLISIS HETEROGÉNEA EMPLEANDO UN CATALIZADOR ACIDO*. Universidad de los Andes. Retrieved from file:///C:/Users/HP/Downloads/Transesterificacion_del_aceite_de_palma_con_metano.pdf
- María, A., & Álvarez, C. (2015). *Plan de negocio para la comercialización de biodiesel derivado de la reutilización de aceites de frituras hacia Chile bio is better*. Universidad de La Salle /Ciencia Unisalle Finanzas. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1170&context=finanzas_comercio

- Michelle, E. C. J. (2003). *Implementación y Validación de una Metodología de Análisis de aceite de palma para un Laboratorio de Referencia Nacional*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Retrieved from http://www.biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2667.pdf
- Microbiologics. (2020). Microbiologics : 0201P Bacillus megaterium derived from ATCC® 14581™* KWIK-STIK. Retrieved October 26, 2020, from <https://www.microbiologics.com/0201P>
- Moreno-Sarmiento; Malagón-Romero; Cortázar; Espinosa-Hernández; (2006). RECUPERACIÓN DE POLI- b -HIDROXIHEXANOATO- putida MEDIANTE EL USO DE DISPERSIONES H I P O C L O R I T O - C L O R O F O R M O , 11, 41–48.
- Naranjo, J. M., Posada, J. A., Higueta, J. C., & Cardona, C. A. (2013). Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using Bacillus megaterium. *Bioresource Technology*, 133, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.129>
- Naranjo Vasco, J. M. (2010). *Producción de Polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MANIZALES. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/2315/1/javiermauricionaranjovasco.2010.pdf>
- Neogen Corporation. (2019). Tryptic Soy Agar. Retrieved October 15, 2020, from <https://www.neogen.com/en-gb/categories/microbiology/acumedia-tryptic-soy-agar/>
- NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 0035. (2012). *NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 0035:2012 Primera revisión ACEITES Y GRASAS DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA. Primera edición*. Retrieved from https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_35-1.pdf
- NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2421. (2012). *INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN*. Quito - Ecuador. Retrieved from <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2421-2.pdf>
- OILM. (2011). Medición De Densidad. *Organisation Internationale De Métrologie Légale, 201083–15*, 92. Retrieved from <https://www.oiml.org/en/publications/other-language-translations/spanish/g014-es11.pdf>
- Pardal, A. C. D. V. (2012). *Obtención De Biodiesel Por Tramsesterificación De Aceites Vegetales*. 2012. Universidad de Extremadura. Retrieved from https://repositorio.ipbeja.pt/handle/20.500.12207/738%0Ahttp://dehesa.unex.es:8080/xmlui/bitstream/handle/10662/326/TDUEX_2012_Pardal.pdf?sequence=1
- Parra, T., Marín, F., Jácome, G., & Sinche, M. (2018). Clarification of used cooking oil and decolorization of red palm oil with the use of ozone, activated carbon and hydrogen peroxide. *Enfoque UTE*, 9(2), 77–88. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n2.192>
- Pedro, Ro. A., Carlos, L. G., & Julio, G. L. (2018). Estadística: Descriptiva e Inferencial Aplicaciones. (pp. 166–176).
- Pilar, C. Z. (2004). *Enzimas*. □□□□□ □□□□□□□ □□□ □□□□□□ □□□□□□ □□□□

□□ □□□□□□ □□□□□.

- Potter, L. P. (2010). La Industria Del Aceite De Palma En Ecuador: ¿Un Buen Negocio Para Los Pequeños Agricultores? *Eutopía - Revista de Desarrollo Económico Territorial*, 39–54. <https://doi.org/10.17141/eutopia.2.2010.1028>
- Rámirez, L., & Sánchez, D. (2019). *EVALUACIÓN DE DIFERENTES MEZCLAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO (P3HB) CON ADITIVOS PARA LA OBTENCIÓN DE UN MATERIAL POLIMÉRICO. FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA*. Retrieved from <https://media.neliti.com/media/publications/112355-ID-pengaruh-struktur-aktiva-ukuran-perusaha.pdf> %0Aacholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Funcionalidad+Familiar+en+Alumnos+de+1°+y+2°+grado+de+secundaria+de+la+institución+educativa+parroquial+“Peq
- Ramos F; Estrada V; Marcelo A; Villar M y Diaz M. (2014). Producción de Poli(β -hidroxibutirato) utilizando Glicerol como Fuente de Carbono. *Planta Piloto de Ingeniería Química*, 72. Retrieved from file:///C:/Users/HP/Downloads/Dialnet-ProduccionDePoliHidroxibutiratoUtilizandoGlicerolC-5069947.pdf
- Ramos Farf, F. A. (2019). *Extracción, purificación y modificación de un biopolímero del tipo poli (3-hidroxibutirato) obtenido de la fermentación de ácidos grasos con B. cepacia*. Universidad Nacional de Colombia Facultad. Retrieved from <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7396/1/6112776-2019-1-IQ.pdf>
- Rincón, M., & Martínez, D. (2009). Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria. *Revista Palmas*, 30(2), 11–24. Retrieved from <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1432>
- Rodríguez, E., & Villegas, E. (2012). Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. *Métodos y Materiales*, 2(1), 25–32. <https://doi.org/10.15517/mym.v2i1.13470>
- Rodríguez, J. (2015). Obtención de las funciones de transferencia de las temperaturas del tope y fondeo de una destilación binaria. *Revista Digital de Investigación y Postgrado*, 5(2), 795–802.
- Romero, L., Cortez, R., Sánchez, L., Piracoca, M., Ayala, L., & Becerra Castro, Y. (2012). Proceso integral de obtención de glicerol como subproducto de la producción de biodiésel, a partir del aceite de higuera. *Ingeniería Investigación y Desarrollo: I2+D*, 12(2), 9–14. Retrieved from https://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ingenieria_sogamoso/article/view/3380/3013
- Saavedra, J. (2008). Transesterificación de los ácidos grasos de (*eiaeis guineensis jacq*) aceite de palma con metanol para la obtención de biodiésel. *Universidad Nacional Agraria de La Selva*, 1, 67–70. Retrieved from file:///C:/Users/HP/Downloads/T.FRS-66.pdf
- Sánchez Paz, I. M. J., & Figueroa Barrera, M. del R. (2013). “Extracción y caracterización fisicoquímica de aceite fijo obtenido por Expresión de 5 especies nativas y cultivadas en Guatemala: *Crescentia cujete* (Morro), *Mammea americana* (Mamey), *Pachira*

aquatica (Zapotón), Cucumis melo (Melón) y Acrocomia mexicana (.

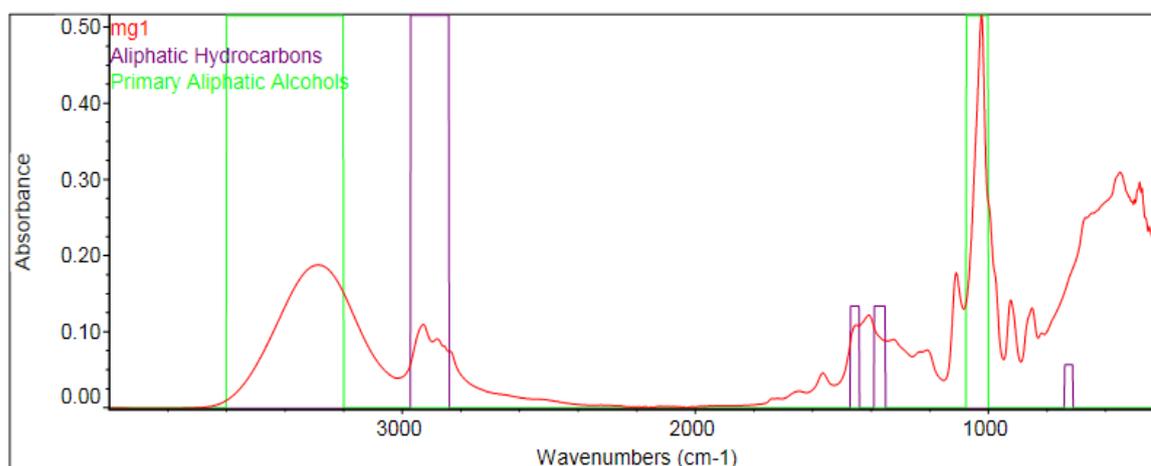
- Serna, A. M., & Betancourt, C. P. (2015). Aceite de palma alto oleico: propiedades fisicoquímicas y beneficios para la salud humana. *Revista Palmas*, 36(4), 57–66. Retrieved from <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/11645>
- SGS del Ecuador S.A. (2021). SGS DEL ECUADOR S.A. | ConnectAmericas. Retrieved April 28, 2021, from <https://connectamericas.com/es/company/sgs-del-ecuador-sa>
- Tanadchangsang, N., & Yu, J. (2012). Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: Gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(11), 2808–2818. <https://doi.org/10.1002/bit.24546>
- Tejeda, L., & Monroy, L. (2013). Obtención De Biodiesel a Partir De Diferentes Tipos De Grasa Residual De Origen Animal. *Luna Azul*, (36). <https://doi.org/10.17151/luaz.2013.36.2>
- Titan Biotech Ltd. (2020). Manufacturer & Exporter of Biological Products. Retrieved October 15, 2020, from <https://titanbiotechltd.com/>
- Valappil, S. P., Boccaccini, A. R., Bucke, C., & Roy, I. (2007, January). Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: Insights from the genera Bacillus and Streptomyces. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9095-5>
- Valentina, B., Sara, B., Javier, G., María, Y., & Amanda, M. (2018). Evaluación de la capacidad de Bacillus megaterium recombinante BmGD para la producción de polihidroxibutirato a partir de glicerol residual.
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437–1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- Vishnuvardhan Reddy, S., Thirumala, M., & Mahmood, S. K. (2009). Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by Bacillus megaterium strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 391–397. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9903-3>
- Yáñez Díaz, C. J. (2013). *Extracción y caracterización de Polihidroxibutirato producido a partir de Bacillus megaterium ATCC 14581 utilizando glicerol residuo de la industria de biodiesel como fuente de carbono*. UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER. Retrieved from <http://noesis.uis.edu.co/bitstream/123456789/2935/1/147174.pdf>
- Yolanda, L., & Fiallo, V. (2012). *Prácticas de laboratorio de Análisis Químico I*. Colombia: UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER. Retrieved from http://matematicas.uis.edu.co/9simposio/sites/default/files/V00Man04AnalQcoI-MFOQ-AQ.01_14122012.pdf

6 ANEXOS

6.1 Glicerina obtenida a partir de aceite de palma usado

GLICERINA OBTENIDA A PARTIR DE ACEITE DE PALMA USADO						
pruebas	Número de muestras	Hidróxido de Sodio (gr)	Metanol (ml)	Aceite de Palma (ml)	Glicerina Obtenido (ml)	Total (ml)
1	3	1.4	80	400	35	105
2	3	1.225	70	350	25	75
3	16	2.45	140	350	60	960
TOTAL						1140

6.2 Interpretación de resultados IR de la glicerina



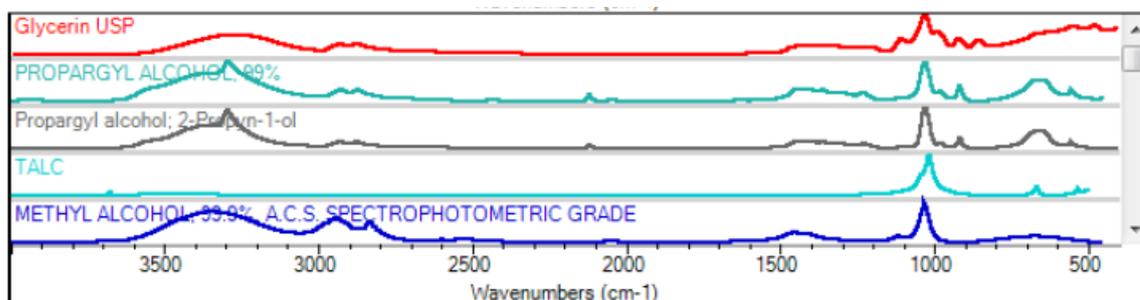
Interpretación de Resultados IR de la glicerina			
Región	Altura (absorbancia)	Numero de onda cm^{-1}	Grupo Funcional Enlaces
1	0,19	3271-3500	Alcoholes Alifáticos Primarios
2	0,11	2927-3000	Hidrocarburos Alifáticos
3	0,12	1407- 1500	Furanos
4	0,18	1108 - 1500	Sales de ácido carboxílico alifático
5	0,52	1000-1022	Alcoholes Alifáticos

6

0,14

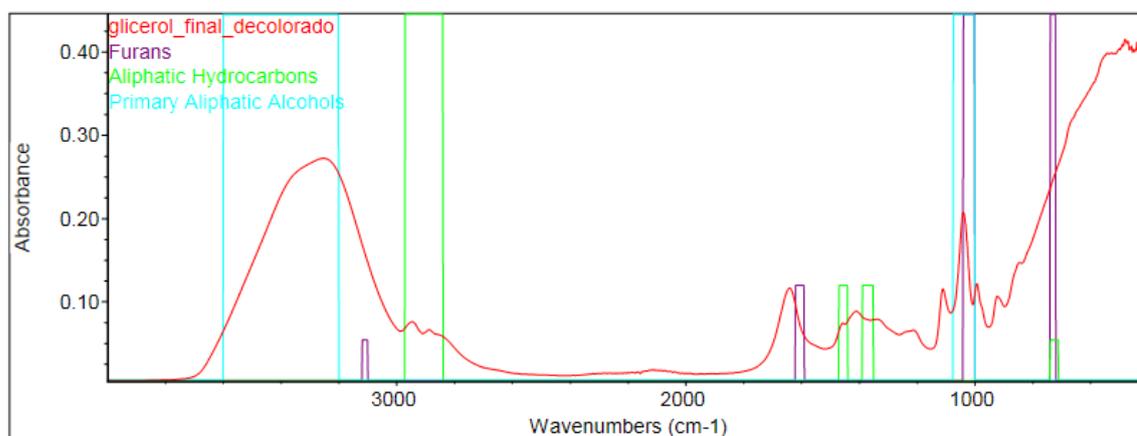
923-1000

Alcohol –R–OH Éter
alifático y
cíclico



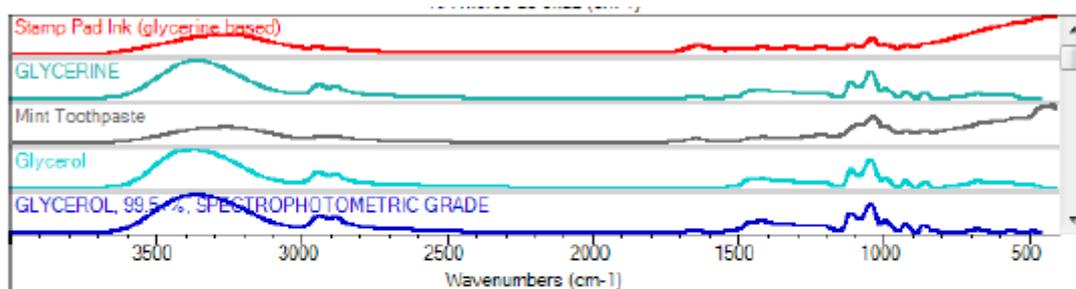
Match	Title	Range	Folder	Filename	Index	
1	90.19	Glycerin USP	4000.0-400.0	Common Materials	c:\my documents\om nic\libs\sea263.lbd	204
2	67.44	PROPARGYL ALCOHOL, 99%	4000.0-441.5	HR Aldrich Dyes, Indicators, Nitro and Azo Compounds	c:\my documents\om nic\libs\sea417.lbd	484
3	65.44	Propargyl alcohol; 2-Propyn-1-ol	4000.0-400.0	HR Hummel Polymer and Additives	c:\my documents\om nic\libs\sea406.lbd	1213
4	64.06	TALC	4000.0-492.0	HR Spectra IR Demo	c:\my documents\om nic\libs\sea470.lbd	38
5	63.75	METHYL ALCOHOL, 99.9%, A.C.S. SPECTROPHOTOMETRIC GRADE	4000.0-441.5	HR Aldrich Alcohols and Phenols	c:\my documents\om nic\libs\sea414.lbd	2

6.3 Interpretación de resultados IR del glicerol decolorado



Interpretación de Resultados FTIR del glicerol decolorado

Región	Altura (absorbancia)	Numero de onda cm ⁻¹	Grupo Funcional Enlaces
1	0,12	992	Enlace Carbono-Carbono (C-C)
2	0,21	1125-1100	Enlace de hidrocarburos Alifáticos (CH-OH)
3	0,09	1200-1410	Enlaces (OH)
4	0,21	1000-1039	Enlaces Carbono-Oxigeno (C-O)
5	0,12	1110	Alcoholes Primarios Alifáticos (C-CO)
6	0,21	2800-3000	Enlaces (C-H y O-H)



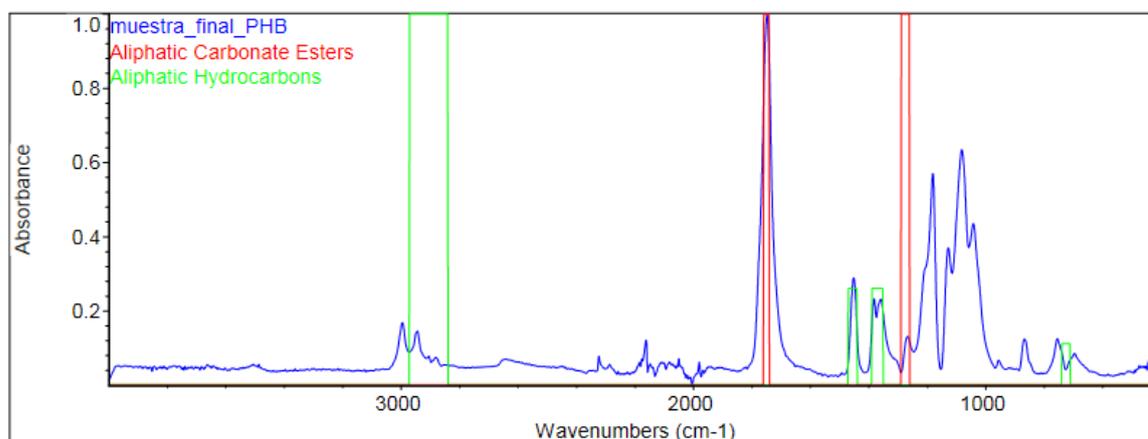
Match	Title	Range	Folder	Filename	Index
1	Stamp Pad Ink (glycerine based)	4000.0-575.0	Common Materials	c:\my documents\omnic\libs\sea263.lbd	238
2	GLYCERINE	4000.0-575.5	HR Industrial Coatings	c:\my documents\omnic\libs\sea431.lbd	1090
3	Mint Toothpaste	4000.0-575.0	Common Materials	c:\my documents\omnic\libs\sea263.lbd	176
4	Glycerol	4000.0-575.0	HR Hummel Polymer and Additives	c:\my documents\omnic\libs\sea406.lbd	1361
5	GLYCEROL, 99.5+%, SPECTROPHOTOMETRIC GRADE	4000.0-575.5	HR Aldrich Alcohols and Phenols	c:\my documents\omnic\libs\sea414.lbd	422

6.4 Biomasa húmeda y seca obtenida

Número de filtros	Biomasa húmeda (g)	Biomasa seca (g)
1	0.6306	0.5287
2	0.7948	0.6414
3	0.6862	0.5937
4	0.7106	0.6286
5	0.7793	0.6459
6	0.6952	0.5813
7	0.6805	0.5030
8	0.6565	0.5279
9	0.6754	0.5757
10	0.5872	0.5087
11	0.6768	0.5895
12	0.6084	0.5063
13	0.5747	0.4819
14	0.6979	0.5732
15	0.5884	0.4916
16	0.5678	0.4998
17	0.5974	0.4936
18	0.6783	0.5654
19	0.6901	0.5689
20	0.6406	0.5277
21	0.5950	0.5094
22	0.6007	0.5196
23	0.6903	0.5869
24	0.6809	0.5524
25	0.6476	0.5307
26	0.7972	0.6687
27	0.5998	0.5104
28	0.6397	0.5389
29	0.6782	0.5513
30	0.6975	0.5709
31	0.6863	0.5839
32	0.7154	0.6201
33	0.5298	0.4965
34	0.6957	0.5617
35	0.6979	0.5572
36	0.6664	0.5503
37	0.6459	0.5157
38	0.6490	0.5194
39	0.6801	0.5639
40	0.6906	0.5779
41	0.6455	0.5234
42	0.5609	0.5076
43	0.6299	0.5396
44	0.6385	0.5211
45	0.5817	0.4543
46	0.6726	0.5909
47	0.5783	0.4956
48	0.5873	0.5014
49	0.6597	0.5249
50	0.6607	0.5384
51	0.5799	0.5084
52	0.6306	0.5277
53	0.6489	0.5667
54	0.6562	0.5337

55	0.5689	0.4553
56	0.5938	0.4805
57	0.6119	0.5232
58	0.5854	0.4576
59	0.5163	0.4238
60	0.7316	0.6302
61	0.6308	0.5123
62	0.5903	0.4876
63	0.5986	0.4619
64	0.6726	0.5909
65	0.6279	0.4950
66	0.6616	0.5374
67	0.5898	0.4513
68	0.6719	0.5899
69	0.6243	0.5105
70	0.6306	0.5264
71	0.6760	0.5579
72	0.6899	0.5911
73	0.6363	0.5238
74	0.7735	0.6664
75	0.6711	0.5486
76	0.6974	0.5696
77	0.7198	0.6181
78	0.6978	0.5877
79	0.6352	0.5813
80	0.7148	0.6093
81	0.6863	0.5764
82	0.6767	0.5978
83	0.6989	0.6186
84	0.7045	0.5955
85	0.6445	0.6306
86	0.6809	0.5914
87	0.7945	0.6487
88	0.7077	0.6098
TOTAL	57.6435	48.3088
Media aritmética	0.655	0.549
Mediana	0.660	0.544
Media geométrica	0.653	0.546
Varianza	0.003	0.003

6.5 Interpretación IR del P3HB



Interpretación de Resultados FTIR del Polihidroxibutirato (P3HB)

Región	Altura (absorbancia)	Numero de onda cm ⁻¹	Grupo Funcional Enlaces
1	0,13	1000-1300	Ester (C-O)
2	0,05	1300-1500	Enlace de hidrocarburos Alifáticos (CH ₂)
3	0,05	1451	Enlaces (CH ₃)
4	0,19	1500-1746	Enlaces Carbonilicos (C=O)
5	0,03	1800-1994	Alifáticos (C-CO)
6	0,13	3000-3300	Enlaces de moléculas de H ₂ O

6.6 Lectura del análisis de degradabilidad



SGS del Ecuador S.A.
Sede: Av. República de El Salvador 1501 102 y Bamba
 QUITO, Ecuador - Cód. Postal: 1701 270 2710
 Teléfono: +593 2 253 3000 ext. 2000
 Fax: +593 2 253 3000 ext. 2000
 Correo: info.ec@sgs.com
 Sitio Web: www.sgs.com.ec

INFORME ANALÍTICO

LABORATORIO AFL

GU21-00718.001

Página 1 de 2

A SOLICITUD DE : LIGIA OLMEDO
 ASUNTO : Análisis Físico Químico
 PRODUCTO : PLÁSTICO
 CANTIDAD DE MUESTRAS : 01 muestra
 LUGAR Y FECHA DE RECEPCIÓN : Guayaquil, Abril 19 de 2021
 CARACTERÍSTICAS : POLIHIDROXIBUTIRATO (P3HB)
 LUGAR DE TOMA DE MUESTRAS : -
 REFERENCIA DEL CLIENTE : Muestra entregada en el laboratorio.
 FECHA DE INICIADO EL ENSAYO : Abril, 19 de 2021
 FECHA DE FINALIZADO EL ENSAYO : Abril, 22 de 2021

DETERMINACIÓN	MÉTODO DE ENSAYO
Nombre	Norma/Referencia/Nombre
Ceniza	LAB-GYE-ME-651 - BASADO EN COVENIN 1155 DETERMINACION DE CENIZA

DETERMINACIÓN		RESULTADO
NOMBRE	UNIDAD	
CENIZAS A 35°C	%	97,14
CENIZAS A 50°C	%	96,86
CENIZAS A 100°C	%	94,20
CENIZAS A 300°C	%	80,09
CENIZAS A 600°C	%	0,36
CENIZAS A 900°C	%	0,05
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:		POLIHIDROXIBUTIRATO (P3HB)
OBSERVACIONES:		"El muestreo no fue realizado por SGS, la referencia de identificación de las muestras han sido proporcionadas por el cliente y es de su exclusiva responsabilidad".

Emitted in Guayaquil (Ecuador), el 22 de Abril de 2021



 QF. Mauricio Mateo Ortega
 Coordinador de Laboratorio CQFG 3025

Válido solo el informe original.

LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN AL ENSAYO SOLICITADO EN LA MUESTRA RECIBIDA.
 Este informe no podrá ser reproducido, parcialmente sin autorización de SGS del Ecuador S.A.

Este documento es emitido, a pedido del cliente, bajo las condiciones generales de servicio de la compañía impresas en el reverso. El cliente debe tener en cuenta las definiciones de limitación de responsabilidad, indemnización y jurisdicción contenidos en el citado documento.
 Se informa a cualquier otro usuario del presente documento que la información contenida en el mismo refleja los hallazgos de la compañía solo al momento de su intervención y dentro de los límites de las instrucciones del Cliente, si hubiera alguna. La Compañía es únicamente responsable ante su Cliente y el presente documento no exime a las partes de una transacción de ejercer todos sus derechos y obligaciones en virtud de los documentos de la transacción.
 La validez, cumplimiento e interpretación de estas Condiciones Generales de Servicio se rigen por las Leyes del Ecuador.

LAB-R-P08-01
Rev01

6.7 Link y resultado de las encuestas realizadas a las empresas

https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSfReQAnu338j8tcVdSMdb4vKvgyEkXbHO6yQ1yg6z8nP64uaQ/viewform?usp=sf_link



6.8 Costos de inversión, costos fijos y costos variables y valor de nuestro producto

INVERSIÓN INICIAL	
DESCRIPCIÓN	COSTO TOTAL
MAQUINARIA	18826.84
INSTRUMENTOS DE PRODUCCIÓN	1060.09
MUEBLES	444.95
EQUIPOS DE OFICINA	917.75
GASTOS DE APERTURA	210.00
Total	21459.63

COSTOS FIJOS	
DESCRIPCION	COSTO TOTAL
ARRIENDO	540
SERVICIOS BÁSICOS	192.77
PERSONAL	1270
SUMINISTROS DE OFICINA	200
Total	2202.77

COSTOS VARIABLE	
DESCRIPCION	COSTO TOTAL
OBTENCION Y PURIFICACION DEL GLICEROL	544.32
ACTIVACIÓN DE LA BACTERIA	1349.25
FERMENTACIÓN	526.17
EXTRACCION Y PURIFICACION DEL PHB	20211.30
Total	22631.05

VALOR DE NUESTRO PRODUCTO	
Kg producidos por año	23
Valor unitario del producto por kg	983.96