

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE UN PHA, OBTENIDO DE
RESIDUOS DE CASCARAS DE YUCA Y PIÑA MEDIANTE PROCESOS DE
FERMENTACIÓN; Y SU APLICACIÓN EN LA FABRICACIÓN DE FIBRAS
POR ELECTROSPINNING.**

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OBTENER EL TITULO DE

DOCTOR EN INGENIERIA.

POR

OSCAR ALFONSO VEGA CASTRO

74186050

TUTOR

Ph.D. JOSE DEL CARMEN CONTRERAS CALDERON

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

FACULTAD DE INGENIERIA

OCTUBRE 19 DE 2016.

**ESTE TRABAJO DE GRADO FUE FINANCIADO CON RECURSOS DE COLCIENCIAS A TRAVES DEL
CONVENIO CONTRATO 630-2011, ENTRE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA Y COLCIENCIAS.**

AGRADECIMIENTOS.

- A Cada uno de mis estudiantes de pregrado que con su apoyo a nivel de laboratorio y de expresiones de cariño, siempre fortalecieron mi energía, en especial a Emilson y Lizeth; sin dejar de lado las contribuciones de Yesica, Erika, Diosa, Gustavo, Sofia, Danilo, Fernanda, Faver, Yaquelin, Edwin.
- Especiales agradecimientos a la Profesores Lizeth Wilches y Almir Segura, grandes conocedores de sus campos, Microbiología y Análisis Instrumental.
- En especial a los estudiantes de Operaciones Unitarias III, Semestre 2014-2, Diseño y Formulación de Alimentos Semestre 2016-1; quienes en mis tiempos de pasantía siempre me apoyaron y con sus mensajes de aliento ayudaron al cumplimiento de este objetivo: Marlon, Jhonny, Alzate, Viviana, Aristizabal, Barba, Bilbao, Carmargo, Milena, Catherin, Adelaida, Diana Cruz, Esteban, Gil, Alexis, Patricia, Gordon, Guisao, Luisa, Santiago, Alejandra, Loaiza, Sofia Lopez, Paula, Jito, Alan, Oquendo, Lucia, Egreis, Ospina, Fidel, Yanina, Piedrahita, Juanes, Saldarriaga, Ana, Carlos. Nuestra amistad quedo sellada en Bogotá. A Liliana.
- A los Profesores Teresa Cesario y Frederico Ferreira y María da Fonseca, gracias por sus enseñanzas y hacer agradable mi estancia en el Instituto Superior Técnico, de la Universidad de Lisboa-Portugal.
- A mis Profesores, Colegas y Amigos de la Universidad Técnica Federico Santa María en Valparaíso-Chile, Ricardo, Cristian, Pedro, Alejandra y Sergio, muchas gracias por sus enseñanzas y por la estancia en tan maravilloso país. Especial agradecimiento a Helena Y Marlen.
- Al profesor Álvaro Días, Camila y Bastian Monsalve, en el laboratorio de reactores de la Universidad Católica de Valparaíso.
- A los Técnicos de los Laboratorios de Biotecnología y Microbiología, de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias. Jorge y Jhony. Además del técnico del Laboratorio de Ciencias de Materiales, Carlos.
- Al personal Técnico y Profesorado del Laboratorio de Análisis y Calidad de Alimentos, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, a María Isabel y el Profesor Misael Cortes.
- Al personal Técnico y Profesorado del Laboratorio de Separaciones Químicas, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Profesor Jesús Gil y Marcela.

- Al personal Técnico y Profesorado del Laboratorio de Biotecnología, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, a Felipe y el Profesor Mario Arias.
- Al personal del Centro de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, en especial a Bernarda y Teresita, además de los Jefes de Centro el Profesor Edison y Profesora Diana, gran apoyo logístico para ejecución del proyecto.
- A mis amigos y colegas Jhoncito, Aurelio, y Chucho. Y a mis profes Pola, Nelly, Gloria Posada y Olga Lucia. Y mis profesoras de Ingeniería de Materiales Esperanza y Claudia, gracias por todos sus consejos y apoyo.
- A mi tutor José Contreras, gran apoyo en momentos claves de este proceso, gracias por su comprensión.
- A mi Tío Leonel Vega, mi profe Hugo Restrepo y Héctor Ciro, grandes inspiradores para seguir esta ruta Académica. Profe León Darío Pérez, motivador inicial de esta travesía.
- A mi Familia, Mi Padre Vicente Vega, Mi Madre María Nelly, Mis Hermanos Javier y Mónica, Mi sobrino Samuelito y cuñada Martha; A la memoria de mi Abuelo Jorge Castro, conocedor de los secretos del campo.
- A Vero, gracias por estar ahí mi amor....

.

TABLA DE CONTENIDO

LISTADO DE FIGURAS.....	8
LISTADO DE TABLAS.....	10
RESUMEN.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	12
HIPOTESIS	13
1. MARCO TEORICO	14
1.1 YUCA.....	14
1.1.1 Generalidades	14
1.1.2 Producción de Yuca.	14
1.1.3 Aplicaciones de la Yuca	16
1.2 PIÑA.....	17
1.2.1 Generalidades de la Piña.....	17
1.2.2 Producción de Piña	18
1.2.3 Aplicaciones de la Piña	19
1.3 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES	20
1.3.1 Generalidades.....	20
1.3.1.1 Residuos Agroindustriales.....	21
1.3.1.2 Residuos inorgánicos.....	21
1.3.1.3 Residuos orgánicos o biodegradables.....	21
1.3.1.4 Residuos Urbanos o Municipales.....	21
1.3.2 Generación de Residuos.....	22
1.3.3 Valoración de residuos Agroindustriales.....	24
1.3.3.1 Producción de combustibles alternativos.....	25
1.3.3.2 Extracción de Pectinas.....	25
1.3.3.3 Producción de Enzimas.....	25
1.3.3.4 Extracción de Aceites esenciales.....	26
1.3.3.5 Extracción de Flavonoides y carotenoides.....	26
1.3.3.6 Extracción de Fibra dietaría.....	26
1.3.3.7 Producción de Hongos comestibles	27
1.4 BIOPOLIMEROS	27
1.4.1 Generalidades.....	27

1.4.2	Obtención de Biopolímeros	28
1.4.3	Polihidroxicanoatos	29
1.4.3.1	Propiedades de los PHAs.....	30
1.4.3.2	Aplicaciones de los PHAs.....	32
1.4.4	Caracterización de Biopolímeros.	33
1.4.4.1	Espectrometría de absorción en el Infrarrojo.	33
1.4.4.2	Calorimetría Diferencial del Barrido.....	35
1.4.4.3	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	36
1.4.4.4	Espectrometría de Masas (MS).	38
1.5	ELECTROSPINING.	39
2	OBJETIVOS	43
2.1.	OBJETIVO GENERAL.....	43
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3	METODOLOGÍA	44
3.1	MATERIA PRIMA	45
3.1.1.	ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MATERIA PRIMA	45
3.2	PROCESO DE FERMENTACIÓN	45
3.2.1	Preparación del sustrato (residuos de yuca y piña).	45
3.2.2	Determinación de Azúcares Reductores por HPLC.	46
3.2.3	Preparación del pre-inoculo y del inoculo.	46
3.2.4	Condiciones Proceso de Fermentación.	46
3.2.5	Centrifugación y Liofilización.	48
3.3	EXTRACCIÓN DEL BIOPOLÍMERO.	48
3.4	CARACTERIZACIÓN DEL BIOPOLÍMERO	49
3.4.1	Espectrofotometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).	49
3.4.2.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	49
3.4.3	Resonancia Magnética Nuclear RMN.....	50
3.4.4	Espectrofotometría de Gases-Masas (GCM).	50
3.5	OBTENCIÓN FIBRAS POR ELECTROSPINNING.	50
3.5.1.	Caracterización de las Fibras.	51
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	51
4.	RESULTADOS	52

4.1 ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MATERIA PRIMA.....	52
4.2 PROCESO DE FERMENTACIÓN Y OBTENCIÓN DEL BIOPOLIMERO.	53
4.3 CARACTERIZACION DEL BIOPOLIMERO.....	60
4.3.1 ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	60
4.3.2 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).	64
4.3.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	73
4.3.4 ESPECTROFOTMETRÍA DE GASES-MASAS (GCM).	82
4.3 CARACTERIZACIÓN DE FIBRAS OBTENIDAS POR ELECTROSPINNING.	87
5. CONCLUSIONES.....	93
6. BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXO 1. ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR ¹H.	118
ANEXO 2. ESPECTROS DE CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADO A MASAS.	126
ANEXO 3. FOTOGRAFIAS DE LAS MICROFIBRAS OBTENIDAS POR ELECTROESPINNING.....	144
ANEXO 4. ESPECTROS FTIR.	151
ANEXO 5. PRODUCTOS ACADEMICOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACION.....	161

LISTADO DE FIGURAS.

Figura 1. Corte transversal de la raíz de la yuca.	14
Figura 2. Mapa de la producción promedio mundial de yuca entre 1993-2013..	15
Figura 3. Mapa de la producción promedio mundial de piña entre 1993-2014.	18
Figura 4 Fórmulas estructurales de los biopolímeros PLA (ácido poliláctico), PHB polihidroxibutirato)	28
Figura 5. Esquema de la estructura general de los polihidroxicanoatos.....	30
Figura 6. Espectro FTIR, para unos PHBs obtenidos de residuos de: soya y melaza (PHB _{SM}), Soya (PHB _{SOY}) comparados con un PHB comercial.	35
Figura 7 Termograma típico de un polímero.	35
Figura 8. Termograma de un PHA.	36
Figura 9 Espectro RMN ¹ H, para β-polihidroxibutirato y β-polihidroxicvalerato.....	37
Figura 10 Espectro de RMN ¹³ C, para un PHA obtenido a partir de aceite de coco.....	38
Figura 11. Espectrómetro de masas típicos de esteres de metil, de un 4-hidroxibutirato (a), 4-hidroxicvalerato (b) y 4-hidroxyhexanoato (c).....	39
Figura 12. Esquemas básicos de un sistema electrospinning (a) Equipos físicos y nano-fibras formadas (b).	41
Figura 13. Micrografías de SEM para unas fibras obtenidas por electrospinning. PHB (a,d); mezcla de PHB/nHA (b,e).	42
Figura 14 Esquema general del proceso de Extracción del biopolímero.	49
Figura 15. Consumo de glucosa y producción de PHAs, para la condición de fermentación 8 de los residuos de cascara de piña.	53
Figura 16. Consumo de glucosa y producción de PHAs, para la condición de fermentación 8 de los residuos de cascara de yuca.....	54
Figura 17 Espectros FTIR, para las condiciones de fermentación 1, 2, 3, 4, 5 de los residuos de cascara de piña y muestra patrón.....	60
Figura 18 Espectros FTIR, para las condiciones de fermentación 6, 7, 8, de los residuos de cascara de piña y muestra patrón.....	61
Figura 19 Espectros FTIR, para las condiciones de fermentación 6, 7, 8, 9 de los residuos de cascara de yuca y muestra patrón.	61
Figura 20. Espectros FTIR, para las condiciones de fermentación 6, 7 y 8 de los residuos de cascara de yuca y muestra patrón.	62
Figura 21. Termo-gramas obtenidos por DSC, para las condiciones de fermentación 1, 2, 3, 4 de los residuos de cascara de piña y muestra patrón.....	65
Figura 22. Termo-gramas obtenidos por DSC, para las condiciones de fermentación 5, 6, 7, 8, 9 de los residuos de cascara de piña y muestra patrón.....	65
Figura 23. Termo-gramas obtenidos por DSC, para las condiciones de fermentación 1, 2, 3, 4 de los residuos de cascara de yuca y muestra patrón.	66
Figura 24. Termo-gramas obtenidos por DSC, para las condiciones de fermentación 5, 6, 7, 8 de los residuos de cascara de yuca y muestra patrón.	66

Figura 25. Espectros de RMN ^1H , para las condiciones de fermentación 1 y 9 de los residuos de cascara de piña.....	74
Figura 26 Espectros de RMN ^1H , para las condiciones de fermentación 1 y 8 de los residuos de cascara de yuca	75
Figura 27. Espectros de RMN ^{13}C , para las condiciones de fermentación 8 y 9 de los residuos de cascara de piña.....	79
Figura 28. Espectros de RMN ^{13}C , para las condición de fermentación 1 de cascara de yuca.....	80
Figura 29. Posible estructura del copolímero PHBHV, obtenido.Y: PHV X: PHB en el presente trabajo.	81
Figura 30. Tiempos de retención para los PHAs extraídos en las condiciones de fermentación 1, 4 y 9 de los residuos de cascara de piña obtenidos por GCM.....	83
Figura 31. Tiempos de retención para los PHAs extraídos en las condiciones de fermentación 1, 7 y 8 de los residuos de cascara de yuca obtenidos por GCM.	83
Figura 32. Tiempos de retención para una muestra de Patrón obtenidos por GCM.....	84
Figura 33. Espectros de masas de las relaciones m/z para los PHAs obtenidos de los residuos de piña, la figuras a, b y c corresponden a las m/z del PHB; d) relaciones m/z del PHV.	85
Figura 34. Espectros de masas de las relaciones m/z para los PHAs obtenidos de los residuos de yuca, la figuras a,b y c corresponden a las m/z del PHB ; d) relaciones m/z del PHV.....	86
Figura 35. Espectro de masas de las relaciones m/z para el PHB patrón.....	87
Figura 36. Análisis histografico de los diámetro de las microfibras y beads, para las microfibras aleatorias, obtenidas de PHA a partir de residuos de cascara de yuca	88
Figura 37. Fotografías SEM para las microfibras aleatorias, obtenidas de PHB a partir de residuos de cascara de yuca.....	88
Figura 38. Análisis histografico de los diámetro de las microfibras y beads, para las microfibras alineadas, obtenidas de PHB a partir de residuos de cascara de yuca.....	89
Figura 39. Fotografías SEM para las microfibras alineadas. obtenidas de PHB a partir de residuos de cascara de yuca.....	90

LISTADO DE TABLAS.

Tabla 1. Datos de Producción de Yuca para Colombia, año 2014.....	16
Tabla 2. Datos de producción para el cultivo de piña en Colombia.....	19
Tabla 3. Fuentes y tipos de residuos sólidos generados.	22
Tabla 4. Cantidad de Residuos Producidos Por Región.....	23
Tabla 5. Residuos generados por las empresas agroindustriales en Medellín y el sur del Valle de Aburra, Colombia.	24
Tabla 6. Algunos de los Sustratos y Cepas utilizados para obtener PHAs.....	29
Tabla 7. Algunas propiedades Físicas de PHAs vs Polipropileno.	31
Tabla 8. Aplicaciones de PHAs en medicina.	33
Tabla 9. Tabla abreviada de frecuencias de grupos funcionales.....	34
Tabla 10. Tiempos de retención para algunos PHAs	39
Tabla 11. Diámetros de fibras obtenidas por electrospinning con diferentes PHAs.	42
Tabla 12. Condiciones de fermentación para los residuos de Cascara de Piña	47
Tabla 13. Condiciones de fermentación para los residuos de Cascara de yuca.....	47
Tabla 14. Análisis proximal de residuos de cascara de Piña	52
Tabla 15. Análisis proximal de residuos de cascara de Yuca.....	52
Tabla 16. Valores de producción de PHA, a partir de Residuos de Piña	55
Tabla 17. Valores de producción de PHA, a partir de Residuos de yuca.....	57
Tabla 18. Bandas de FTIR para los PHAs extraídos de los residuos de cascara de yuca y piña, y tipo de vibración según literatura.	62
Tabla 19. Temperaturas de Fusión (T_m), y Temperatura de transición vítrea (T_g) para los PHAs obtenidos de cascaras de Piña y PHB patrón.	67
Tabla 20. Temperaturas de Fusión (T_m), y Temperatura de transición vítrea (T_g) para los PHAs obtenidos de cascaras de yuca y PHB patrón.	67
Tabla 21. Entalpías (ΔH) de Fusión, para los PHAs obtenidos de los residuos de cascaras de Piña y PHB Patrón.	70
Tabla 22. Entalpías (ΔH) de Fusión, para los PHAs obtenidos de residuos de cascaras de Yuca y PHB patrón.....	71
Tabla 23. Cristalinidad (X) para los PHAs obtenidos de cascaras de Piña y patrón.....	72
Tabla 24. Cristalinidad (X) para los PHAs obtenidos de cascaras de Yuca y patrón.	72
Tabla 25. Resultados de RMN- ^1H , señales características observadas y valores simulados para biopolímeros de yuca y piña.	76
Tabla 26. Resultados de RMN- ^{13}C y Señales características observadas.	81
Tabla 27. Composición molar porcentual de HV para diferentes condiciones de fermentación de los PHAs obtenidos de residuos de Yuca y Piña.	82

RESUMEN.

Actualmente la industria de alimentos, es una de las de mayor generación de residuos en sus diferentes niveles, producción primaria, procesamiento y pos consumo. En este sentido, la industria de piña y yuca, no son la excepción, y generan residuos por producto dañado en poscosecha. Sin embargo estos residuos agroindustriales son de potencial uso, dado su contenido de carbohidratos, los cuales son susceptibles de transformación en azúcares y estos a su vez, ser usados para la producción de materiales tales como los Polihidroxialcanoatos (PHAs). Los PHAs son biopolímeros biodegradables con propiedades similares a los polímeros derivados del petróleo, pero con la ventaja de tener aplicaciones en la industria de farmacia, alimentos y biomedicina, además de ser biodegradables. El objetivo de la presente investigación fue extraer y caracterizar estructuralmente un PHA, obtenido de residuos de cascara de yuca y piña mediante procesos de fermentación con la cepa *Ralstonia eutropha* y su aplicación en la fabricación de fibras por electrospinning. La metodología incluyó la fermentación de los residuos de cascara de piña y yuca bajo diferentes condiciones variando el pH, tiempo de fermentación (TF), y las relaciones Carbono/Fosforo y Carbono /Nitrógeno. Posteriormente de la extracción del PHA, se caracterizó mediante técnicas como el FTIR, DSC, GC-MS y RMN. Las fibras se obtuvieron por electrospinning para el PHA extraído de los residuos de cascara de yuca. Como resultados principales se obtuvo que las mejores condiciones de fermentación para la producción de PHAs, para el caso de la piña fueron con pH=9, C/N=11, C/P= 6 (relaciones másicas) y un TF de 60 horas y para la yuca con pH=9, C/N=11, C/P= 7 y TF de 60 horas. Los análisis del FTIR muestran que en general todos los espectros tienen los grupos funcionales característicos propios de un PHA, tales como grupos OH, C-H, C=O, C-O. Los termogramas obtenidos con el DSC, mostraron que los PHAs tienen diferentes temperaturas de fusión, entre 110 a 165°C. Con respecto a los análisis de GC-MS, se encontraron relaciones masa/carga que varían entre 117, 131, lo que corresponde a estructuras de un PHB y PHV respectivamente para ambos tipos residuos. Finalmente en los análisis de RMN ^1H , se pudo corroborar la presencia de dos cadenas de polímeros (PHB y PHV); para el caso del PHB los grupos CH_3 y CH mostraron desplazamientos de 1.26 y 5.34 ppm; en tanto que para el PHV los desplazamientos asociados a los grupos CH_3 y CH fueron 0.88 y 5.27 ppm, respectivamente. Con respecto al diámetro de las fibras alineadas y aleatorias en promedio fue de 1.7 micras. En general se puede concluir que es posible obtener Polihidroxialcanoatos a partir de residuos de cascara de yuca y piña, a través de procesos de fermentación, utilizando la bacteria *Ralstonia eutropha*, los cuales tienen características similares a los Polihidroxialcanoatos comerciales. Además es posible obtener fibras de tamaño micrométrico a partir del PHA obtenido de los residuos de yuca, por medio de la técnica del electrospinning.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La industria del banano lleva posicionada en el Urabá Antioqueño alrededor de unos 50 años (Agudelo, 2011), lo que ha hecho que sea una región de un solo cultivo, lo cual puede ser de alguna manera negativo ya que la población no tiene otras formas de diversificación de la economía. En este sentido y para diversificar los procesos de producción de esta zona del país, se han empezado a impulsar cultivos de yuca, piña, pescados, algunas especias y finalmente la ganadería (Caballero, 2008; Portafolio, 2006).

Dentro de estos últimos los de mayor crecimiento ha sido la yuca y la piña, pero para que se dé un desarrollo completo de estas cadenas agroindustriales, es necesario que estén apalancadas con aplicaciones tecnológicas que los hagan competitivos y que les permitan usar la mayor cantidad del recurso y obtener diferentes productos de valor agregado, además de los alimentos en sí (Ceballos y Ospina, 2002; Olmos, 2015). Es así como muchas de las agroindustrias nacientes, generalmente no hacen una buena gestión de residuos sólidos, ya que los ven como simples desechos sin valor agregado, generando contaminación de suelos y aguas debido a los lixiviados que estos generan, además los residuos mal manejados son generadores de plagas como sancudos, y malos olores; por ende estos desechos se convierten en un problema ambiental (Montalvo, 2001; Solorzano, 2003).

Estos materiales de desecho contienen altos porcentajes de carbono y altas relaciones C/N que favorecen la proliferación microbiana, adicionalmente, la presencia de elementos tales como potasio, magnesio, fósforo, hierro y otros en forma de sales garantizan un medio propicio para su crecimiento (Yepes et al., 2008). Dentro de las múltiples aplicaciones que se pueden proponer para el uso amigable ambientalmente de los residuos de piña y yuca se puede nombrar la obtención de biopolímeros (polihidroxialcanoatos, PHAs), materiales que presentan un alto valor agregado debido a que en cuanto a su resistencia mecánica son comparables a los polímeros convencionales como el polipropileno pero son completamente biodegradables bajo condiciones ambientales normales, presenta un alto potencial, dado su impacto económico y ambiental favorable (Steinbüchel, 2001).

Los materiales plásticos son parte de la vida diaria, en diferentes formas: utensilios desechables, en empaques, en muebles, accesorios para la vivienda, y son usados para mejorar la calidad vida y el confort. El uso de los plásticos ha crecido en las últimas décadas, alrededor de 150 millones de toneladas de plásticos son consumidos anualmente en el mundo entero, por ejemplo en Estados Unidos y algunos países Europeos el consumo anual per cápita oscila entre 60 y 80 Kg (Góngora 2014). Como resultado de esta gran cantidad de plástico usado y dada su baja tasa de degradación, en promedio 100 años, se generan serios problemas ambientales relacionados con la disposición de los desechos, los cuales saturan los rellenos sanitarios, los ríos y mares (Perdomo, 2002).

Aunque a través del reciclaje muchos de los materiales son recuperados y reincorporados a ciclos de producción industrial, tal como ocurre con los metales, por ejemplo, en el caso de los polímero

el panorama no es tan alentador puesto que los polímeros por cada ciclo de procesamiento pierden propiedades y esto hace que cada vez que se reciclen sean empleados en una aplicación en donde se requiera un menor desempeño mecánico, adicionalmente, los procesos de separación e identificación de los plásticos son complicados, la mala separación puede llevar a que se obtengan materiales que no cumpla con las características requeridas para la aplicación específica (Singh et al., 2016).

El uso de materiales poliméricos biodegradables es una alternativa frente a los serios problemas de degradación asociados con los polímeros convencionales. Por ejemplo, polímeros como el ácido poliláctico y algunos polihidroxicanoatos presentan propiedades mecánicas equiparables a polímeros tales como polipropileno (Ojumo et al., 2014; Steinbüchel y Fächtenbusch, 1998; Sudesh et al., 2000). Sin embargo, una de los principales desafíos asociados a la masificación de los biopolímeros es su alto costo (Choi y Lee, 2000). En el caso específico de los polihidroxicanoatos, el alto costo se debe a los sustratos y a los procesos de extracción del polímero de la biomasa (Dietrich et al., 2016).

En definitiva, hay dos problemas grandes, el primero de ellos es la mala disposición de residuos sólidos que existen en las nuevas industrias que crecen en el Urabá, como es la de la piña y la yuca; por otro lado se tiene los plásticos de origen petroquímico, los cuales tienen baja tasa de degradación y que día a día se acumulan más; en ambos sentidos se afecta la salud de planeta.

El objetivo de la presente propuesta fue explorar la producción de PHAs, a partir de los residuos hidrolizados de cascaras de piña y yuca, por medio de procesos de fermentación con la bacteria *Ralstonia eutropa*; además de realizar una caracterización de los PHAs obtenidos por técnicas tales como FTIR, DSC, GCMS y RMN, para poder establecer características estructurales y térmicas de los PHAs obtenidos. Finalmente buscar una aplicación de los biopolímeros obtenidos que tenga posibilidades de uso en la industria de biomedicina.

HIPOTESIS

A partir de residuos agroindustriales de yuca y piña es posible obtener PHAs por procesos de fermentación bacteriana.

1. MARCO TEORICO.

1.1 YUCA.

1.1.1 Generalidades.

La yuca (*Manihot esculenta Crantz*) también conocida como mandioca (manioc) y casaba (cassava) es originaria de la región amazónica y se han encontrado muestras que datan del año 800 A.C. Con el descubrimiento de América, el cultivo de la yuca se extendió rápidamente a África y Asia, siendo actualmente, estos continentes los mayores productores. La temperatura media ideal para su desarrollo oscila entre los 18°C y los 35°C y la temperatura mínima que puede tolerar es de 10°C. Bajo estas condiciones puede desarrollarse en alturas de hasta 2.000 metros, con una precipitación mínima de 500 milímetros por año (Bajes, 1998).

La yuca junto con el maíz, la caña de azúcar y el arroz, constituyen las fuentes de energía más importantes en las regiones tropicales del mundo. Aunque el principal producto de la yuca es las raíces, las hojas de la yuca también tienen un excelente potencial y son extensivamente utilizadas en África y Asia, ya sea para la alimentación animal o humana. Finalmente, la yuca es el cuarto producto básico más importante después del arroz, trigo y maíz, siendo un componente básico en la dieta de más de 1000 millones de personas (Ceballos 2002).

En general la raíz de la yuca se compone de tres tejidos: el periderma o cascarilla, el parénquima cortical o corteza y el parénquima interior (Figura 1). El 80% del peso fresco de la raíz, corresponde a la pulpa, que es el tejido en que la planta almacena el almidón, en tanto que el contenido de materia seca de la raíz fluctúa entre el 30% y el 40% (Alarcón y Dufour, 1998). Las raíces de yuca tienen un alto contenido de almidón, que las convierte en buena fuente de energía. También tiene un contenido relativamente alto de vitamina C (Bajes, 1998).

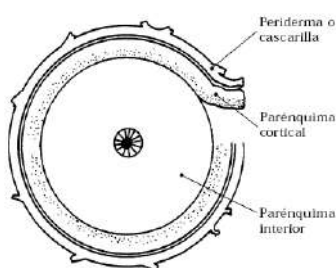


Figura 1. Corte transversal de la raíz de la yuca. Fuente: Alarcón y Dufour, 1998

1.1.2 Producción de Yuca.

De acuerdo a los datos estadísticos de la FAO (2016), en su plataforma de FAOESTAT, el porcentaje promedio de producción de yuca por región del mundo entre los años 1993-2013, lo lidera África, seguido de Asia, Las Américas y Oceanía, que corresponde a un 53.6%, 30.5%, 15.8% y 0.1%, respectivamente. Los datos anteriores, traducidos en Millones de Toneladas producidas equivalen a 107.994.585,43 para el continente Africano, en tanto que Asia, Las Américas y Oceanía en este

periodo de tiempo en promedio produjeron 61.376.604,00, 31.784.122,14 y 213.592,48 toneladas, respectivamente.

El promedio de los cinco países con mayor producción de yuca en el mundo, en el periodo de 1993-2013, lo lidera Nigeria, Brasil, Tailandia, Indonesia y la República Democrática del Congo, estos países en promedio lograron una producción en millones de toneladas de 40, 23, 23, 18 y 16, respectivamente. En ese mismo sentido, los países con mayores rendimientos de producción en Miles de Hectogramos (hg)/Ha, lo lideran India, Islas Cook, Suriname, Taiwán provincia de China y Barbados, con aproximadamente 300, 210, 200, 198 y 197 Mil hg/Ha, respectivamente. En la Figura 2, se muestra un mapa acerca de la producción mundial de yuca.

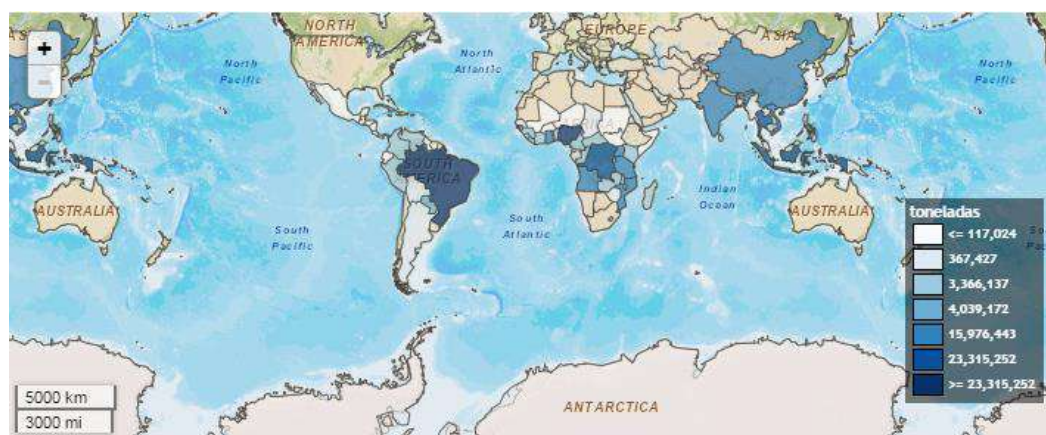


Figura 2. Mapa de la producción promedio mundial de yuca entre 1993-2013. Fuente: FAO, 2016.

En América, para el año 2007 los países con mayor área sembrada y producción son Brasil, Paraguay y Colombia. El área sembrada en estos países es de 1.944.834 Ha para Brasil, en tanto que Paraguay y Colombia tenían un total de 320.000 Ha y 185.000 Ha, respectivamente. Los rendimientos en estos países en Ton/Ha eran de 14, 15.9 y 11.35 para Brasil, Paraguay y Colombia, respectivamente (Alzate, 2009).

En la Tabla 1, se pueden observar diferentes valores de área sembrada, cosechada, niveles de producción y de rendimiento, así como de Unidades Productoras (UP) de yuca en diferentes Departamentos de Colombia productores de yuca para el año 2014, esto según los datos reportados por el DANE como resultado de la Encuesta Nacional Agropecuaria. Como resultados totales se tiene que el país tiene alrededor de unas 70000 Unidades Productoras, las cuales produjeron aproximadamente 517.488,8 T de yuca y el total de área cosechada de 41596.4 Ha con un rendimiento de 395.2 T/Ha AGRONET (2016). Sin embargo la FAO (2016), reporta que la producción de yuca en Colombia pasó de 1. 900.190 T a 2.634.521 T en el periodo de 1993 a 2014; en ese mismo periodo de tiempo el rendimiento del cultivo de yuca se incrementó levemente, pasando de 101.888 hg/Ha a 102.263 hg/Ha

Tabla 1. Datos de Producción de Yuca para Colombia, año 2014.

Departamento	Area Sembrada (Ha)	Area Cosechada (Ha)	Produccion (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	No. UP
Antioquia	1.591,6	803,5	7.875,4	18,6	2.563,9
Atlántico	2.292,9	1.383,6	11.361,6	14,4	1.811,9
Bolívar	14.201,2	5.268,5	52.469,4	18,2	6.093,3
Boyacá	1.502,3	408,5	3.537,3	20,4	5.782,5
Caldas	26,6	0,7	1,1	1,6	65,3
Cauca	6.136,7	3.259,8	34.202,6	20,7	9.162,9
Cesar	2.762,9	2.765,7	18.396,0	13,1	1.930,0
Córdoba	7.044,6	2.245,3	22.116,7	18,1	7.766,2
Cundinamarca	341,9	221,2	2.607,4	18,9	1.606,4
Huila	2.246,0	587,6	1.459,7	7,1	1.914,9
La Guajira	2.340,1	621,8	3.848,3	12,3	789,5
Magdalena	11.301,5	4.598,0	64.428,0	17,9	3.373,9
Meta	5.983,9	7.062,1	174.104,9	50,8	1.926,9
Nariño	665,9	195,8	1.353,6	15,1	2.162,1
Norte de Santander	2.072,7	887,1	6.213,1	14,2	3.952,6
Quindío	1.454,9	1.344,7	23.363,9	37,4	203,0
Risaralda	94,3	329,5	2.424,7	7,4	162,0
Santander	1.868,1	1.167,0	13.923,8	17,3	4.118,4
Sucre	7.427,5	6.929,8	56.548,8	12,5	8.127,0
Tolima	717,5	701,0	6.924,3	11,8	1.134,4
Valle	296,1	395,6	4.511,4	27,6	679,9
Casanare	2.424,7	419,8	5.816,9	20,0	4.321,7
TOTAL	74.793,9	41.596,4	517.488,8	395,2	69.648,8

Fuente: DANE-Encuesta Nacional Agropecuaria ENA 2014, tomado de: www.agronet.gov.co

1.1.3 Aplicaciones de la Yuca.

En general las raíces de la yuca que se cosechan son destinadas para el consumo humano, sin embargo tiene usos a nivel de alimentos para animales o en la industria en general para la producción de almidón, tanto nativo como agrio; el nativo tiene aplicaciones como espesante, aglutinante, estabilizante y mejorador de textura; por otro lado el almidón agrio se usa en la industria panadera y de elaboración de snacks Alzate (2009). Otras aplicaciones que se tienen para el almidón obtenido a partir de la raíz de yuca, es el empleo de este en la fabricación de pegantes, tintas y pinturas, además de la industria textil Bajes (1998).

La yuca, tiene diversas aplicaciones en la industria de alimentos, debido en parte a sus propiedades fisicoquímicas. Padonou et al. (2005), analizaron 20 diferentes especies de yuca cultivadas en Benin (Continente Africano), y encuentran contenidos de humedad, proteína, fibra y Lípidos entre 61.3-87.1%, 1.67-3.47%, 2.63-4.92% y 0.42-0.65%, respectivamente. Sanchez et al. (2016), determinaron el contenido de carotenoides y cianuro para diferentes variedades de yuca, encontrando contenidos de carotenoides totales y de β -caroteno de 25.5 y 16.6 $\mu\text{g/g}$ (materia seca).

A nivel industrial el uso de la yuca, es reportado para la obtención de nuevas formas de energía, como son los biocombustibles, biogás y etanol; algunos de estos trabajos son descritos por Shanavas et. al. (2011), quienes optimizaron la producción de bioetanol obtenido a partir de almidón de yuca, usando enzimas amigables con el ambiente; en ese mismo sentido Elemike et. al. (2015), utilizaron celulosa proveniente de residuos de yuca para la producción de bio-etanol; Moshi et al. (2014), lograron producir Biogás y Bioetanol a partir de la yuca variedad *Manihot glaziovii*; Nguyen et al. (2014), lograron la producción de etanol a partir de harina de yuca en una planta piloto.

Con respecto al uso de residuos agroindustriales de la yuca y en especial de la cascara, se tienen diversas aplicaciones, las cuales incluyen producción de ácido cítrico, el diseño de alimentos para animales e incluso diseño de ladrillos para construcción. Es así como Ismanto et al. (2010), desarrollaron un capacitor con cascara de yuca; Ríos et al. (2012), determinaron algunas propiedades de compresión de un ladrillo elaborado con cenizas de carbón y cascara de yuca. Por otro lado, Simate y Ndlovu (2015) y Kurniawan et al. (2011), utilizaron las cascara de yuca como absorbentes de metales pesados (Cr^{3+} , Co^{2+} y Ni). Otros autores han reportado el uso en la obtención de ácido cítrico, diseño de empaques activos y alimentación de ovejas (Adeoye et al., 2015; Debiagi et al., 2014; Santos et al., 2015).

Por otro lado, también se ha empleado la yuca para la obtención de biopolímeros; es así como Natthaporn et al. (2014) lograron obtener un Polihidroxialcanoato (PHA) a partir de almidón de yuca, usando la cepa *Cupriavidus sp.* KKU38; Cristhiane et al. (2012), usaron la cepas de *Bacillus* para obtener un PHA a partir de residuos de almidón de yuca y Nitinard et al. (2014), obtuvieron un PHA en un Sistema de reactor en Batch, utilizando como sustrato el almidón de yuca. Para el caso colombiano, se tiene un trabajo de Rojas et al. (2016), donde se usó la harina de yuca variedad HCM1 para la obtención de PHAs con la bacteria *Ralstonia eutropa*.

1.2 PIÑA.

1.2.1 Generalidades de la Piña.

La piña hace parte del reino vegetal, es de la clase Angiosperma y tiene por subclase Monocotiledónea, su origen es Farinosae de la familia de las *Bromeliaceae* y por género Ananas; el nombre científico que recibe este fruto es el de *Ananas Sativus* (Estrada et al., 2010). Actualmente existen alrededor de 1400 especies de piña en el mundo, muchos de los miembros de esta familia son Epifíticos, es decir, viven encima de otras plantas en zonas de clima tropical, en tanto que la piña crece y se desarrolla en tierra firme (Olmos, 2015).

La piña es una planta típica de las zonas tropicales: altura máxima de 800 msnm, temperatura entre los 26° y 30° C y precipitación pluvial anual entre 1.500 y 2.000 mm. En el mundo se han identificado diferentes grupos de cultivares de piña, como son el de la Cayenne, con las variedades Smooth Cayenne, Champaka, Euville, Hilo y la Rotchild; el grupo denominado Queen, en el que se destaca la variedad Victoria, la Golden MD2 la Pernambuco y la Black Riplay; y otros grupos relevantes son el Spanish, con las variedades española, Blood, Puerto Rico y la perolera, de alta presencia en Brasil y Colombia (CCI, 2002).

La piña de buena calidad se distingue por la uniformidad de tamaño y forma, por no presentar deterioro, quemaduras de sol, resquebrajamiento, daños por golpes o insectos, rompimiento interno, manchas endógenas de color café; las hojas de la corona deben tener un color verde intenso, tamaño mediano y estar rectas. El rango apropiado de sólidos solubles es de 11 a 18%, acidez (principalmente ácido cítrico) 0.5 – 1.6% y ácido ascórbico 20 – 65 mg/100 g de peso en fresco, dependiendo de la variedad y estado de maduración (Misión Rural, 2008).

1.2.2 Producción de Piña.

A nivel mundial, la piña es el segundo cultivo tropical de mayor importancia después del banano, aportando más del 20% del volumen mundial de frutos tropicales. El 70% de la piña producida en el mundo, es consumida como fruta fresca en el país que la produce. Dentro del subgrupo de frutas tropicales, la piña domina el comercio internacional de frutos tropicales con el 47% del comercio total, seguida del mango con el 25%, el aguacate con el 11% y la papaya con el 7% (Olmos, 2015).

De acuerdo a los datos estadísticos de la FAO (2016), en su plataforma de FAOESTAT, el porcentaje promedio de producción de piña por región del mundo entre los años 1993-2014, lo lidera Asia, las Américas, África y Oceanía, que corresponde a un 48,6; 34,1; 16,4 y 0,9%, respectivamente. Los datos anteriores, traducidos en Millones de T producidas equivalen a 8.416.057,33 para el continente Asiático, en tanto que, las Américas, África y Oceanía en este periodo de tiempo en promedio produjeron 5.893.801,29, 2.833.454,71, 153.672,33 T respectivamente.

El promedio de los cinco países con mayor producción de piña en el mundo, en el periodo de 1993-2014, lo lidera Tailandia, Brasil, Filipinas, Costa Rica e India, estos países en promedio lograron una producción en Millones de T de 2.208.867,71, 2.049.503,29, 1.848.389,90, 1.331.975,24 y 1.228.214,29, respectivamente. En ese mismo sentido, los países con mayores rendimientos de producción en Miles de hg/Ha, lo lideran Indonesia, Costa Rica, Benin, Panamá y Taiwán provincia de China con aproximadamente 715, 655, 482, 472 y 443 Mil hg/Ha, respectivamente. En la Figura 3, se muestra un mapa sobre de la producción mundial de piña.

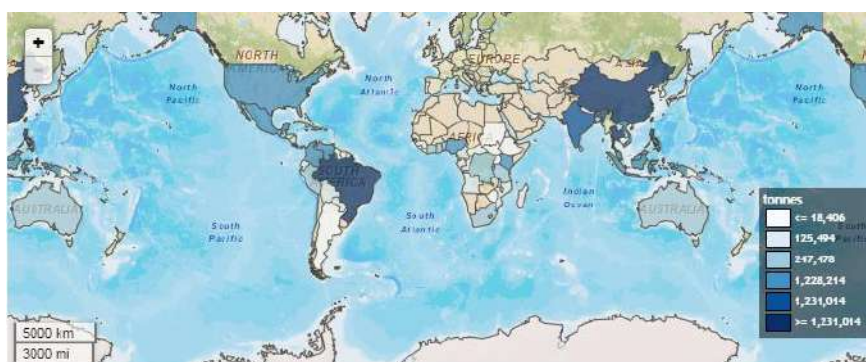


Figura 3. Mapa de la producción promedio mundial de piña entre 1993-2014. Fuente: FAO (2016).

En la Tabla 2, se pueden observar diferentes valores de área plantada, área en edad productiva, niveles de producción y de rendimiento del cultivo de piña en diferentes Departamentos de Colombia, donde se reporta que el país tiene alrededor de unas 9.340 Has sembradas, las cuales produjeron aproximadamente unas 163.679 T de piña con un rendimiento aproximado de 39,4 T/Ha AGRONET (2016). Sin embargo la FAO (2016), reporta que la producción de piña en Colombia

pasó de 381.346 T a 643.039 T en el periodo de 1993 a 2013; en ese mismo periodo de tiempo el rendimiento del cultivo de piña disminuyó de 523.342 hg/Ha a 447.799 hg/Ha.

Tabla 2. Datos de producción para el cultivo de piña en Colombia.

Departamento	Area Plantada (Ha)	Area en edad productiva (Ha)	Produccion (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)
Antioquia	217	217	8.156	37,5
Boyacá	8	8	0	-
Cauca	1.828	756	37.123	49,1
Córdoba	27	24	284	11,7
Cundinamarca	98	2	38	20,0
Huila	1	1	0	-
Meta	479	403	19.876	49,3
Nariño	157	93	511	5,5
Norte de Santander	6	0	0	-
Quindío	917	490	10.423	21,3
Risaralda	201	28	1.135	40,0
Santander	2.379	163	4.325	26,5
Tolima	1.391	1.369	54.741	40,0
Valle del Cauca	1.079	573	25.632	44,7
Casanare	552	25	1.434	57,1
TOTAL	9.340	4.153	163.679	39,4

Fuente: DANE-Encuesta Nacional Agropecuaria ENA 2014, tomado de: www.agronet.gov.co

1.2.3 Aplicaciones de la Piña.

Inicialmente se puede decir que la piña es una de las frutas tropicales de mayor demanda en el mundo, por su agradable sabor y alto contenido de fibra, además de ser una fuente importante de Vitaminas C, B1, B6, Ácido Fólico y minerales tales como el potasio. También se le conoce por ser una fruta diurética que contribuye a la eliminación de toxinas por medio de la orina además de prevenir el estreñimiento; por otro lado los tallos de las piñas contienen bromelina, una enzima proteolítica digestiva que actúa como sustituto de los jugos gástricos, mejora la digestión y destruye los parásitos intestinales es también utilizada en la industria alimenticia, como ablandador de carnes (Cerrato, 2013). De los desechos vegetales como las hojas, tallos y cáscaras de la fruta se pueden aprovechar para la alimentación animal o fabricación de abonos orgánicos (Cerrato, 2013)

Con respecto al análisis de propiedades fisicoquímicas de los residuos de piña, Dhanasekaran et al. (2011), determinaron la humedad, azúcares reductores y proteína, encontrando valores de 85, 10.8 y 0.6% respectivamente. Hajar et al. (2012) también estudian los sólidos solubles, pH y de acidez para cáscaras de piña. Así mismo existen reportes del contenido de fibra dietaria total, fibra insoluble y fibra soluble para piña con valores de 70, 41.15 y 28.2%, respectivamente (Martinez et al., 2012). Así mismo, se han realizado estudios de contenido antioxidante en piña (Martinez et al., 2012; Da Silva et al., 2013).

En lo relacionado con aplicaciones o desarrollo de productos utilizando los subproductos de la piña, existen aplicaciones para la producción de celulosa, ácido cítrico, extracción de bromelina y etanol. En este sentido, Saravan et al. (2013), mejoraron el proceso de obtención de celulosa

aplicando la metodología de superficie de respuesta, usando el *Trichoderma reesei*; así mismo Omojasola et al. (2008), lograron producir celulasa a partir de residuos de piña pero usando las cepas de *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*. Bandaru et al. (2008), lograron producir ácido cítrico por procesos de fermentación en estado sólido (FSS), utilizando la cepa *Yarrowia lipolitica* NCIM 3589; Kumar et al. (2003), reportan que mezclando residuos de piña con residuos de otras frutas, obtuvieron ácido cítrico usando *Aspergillus niger* DS1por FSS. Los residuos de piña también se han usado para la obtención de etanol, es así como Nigam (2000) logró obtener una producción de etanol de 42.8 g/Lh utilizando la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24553. De igual manera Ishizaki et al. (1999), produjeron 59 gr de etanol/L, utilizando jugos de piña, esto con la bacteria *Zymomonas mobilis*. Una importante aplicación que tienen los residuos de piña, en especial la cascara, es la extracción de bromelina, ya que esta es usada para diversas aplicaciones en alimentos y en especial para romper cadenas de proteína. Raghavarao et al. (2008), usaron un sistema de micelas en fase reversa para obtener bromelina; Rawdkuen et al. (2012) determinaron que la mejor temperaturas para extracción de bromelina de las cascara y tallos de la piña era entre 50-60°C.

Finalmente, en lo que respecta a la obtención de Polihidroxialcanoatos a partir de productos con piña, se tiene un estudio realizado por Kaewkannetra et al. (2015), quienes lograron extraer un PHA, obtenido a partir de procesos de fermentación de jugos de piña usando la bacteria *Bacillus sp* SV13. Así mismo, Jaturapiree et al. (2014), obtuvieron un PHB, usando jugo obtenido a partir de cascara de piña, usando la bacteria *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599. Otras aplicaciones para los residuos de piña, tales como contenidos de antioxidantes fenólicos, producción de ácidos orgánicos, remoción de metales pesados, diseño de agentes anti-teñidos entre otras han sido mencionadas por Tawata et al. (2010).

1.3 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.

1.3.1 Generalidades.

Se define residuo como cualquier sustancia u objeto del cual su poseedor desprenda o tenga la intención u obligación de desprenderse (Moreno y Moral, 2008). Otra definición la da la NTC 5720 (2009), un residuo es cualquier objeto, material, sustancia, elemento o producto que se encuentra en estado sólido o semisólido, líquido o gas contenido en recipientes o depósitos resultante del consumo o uso de un bien en la actividad industrial, que el generador descarta, rechaza o entrega y que es susceptible de aprovechamiento o transformación en un nuevo bien, con valor económico o de disposición final. Diferentes autores como Moreno y Moral (2008), NTC 5720 (2009), Barradas (2009) y Saval (2012), clasifican los residuos como inorgánico, orgánicos, urbanos, domiciliarios y agroindustriales, a continuación se darán algunas definiciones para cada uno de estos.

1.3.1.1 Residuos Agroindustriales.

La agroindustria se refiere a la sub-serie de actividades de manufacturación, mediante las cuales se elaboran materias primas y productos intermedios derivados del sector agrícola. La agroindustria significa así, la transformación de productos procedentes de la agricultura, la actividad forestal y la pesca. Por ende los residuos que se generan a partir de esta transformación se consideran residuos agroindustriales (FAO, 1997).

En general los Residuos Agroindustriales, son materiales en estado sólido o líquido, que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial o social. Teniendo en cuenta que la materia orgánica es su principal componente, en la práctica se les denomina “residuos orgánicos”, materias primas provenientes de la Agroindustria (FAO, 1997).

1.3.1.2 Residuos inorgánicos.

Incluye todos aquellos de origen mineral y sustancias o compuestos sintetizados por el hombre, provienen generalmente de la extracción, procesamiento o utilización de los recursos minerales. Algunos ejemplos son metales, plásticos, vidrios, agrotóxicos, agroquímicos, fitosanitarios y agro-veterinarios; todos en su mayoría de origen sintético y con un gran efecto residual sobre el ambiente. En este sentido, se dice que los residuos no orgánicos son los que por sus características químicas sufren una descomposición lenta (de 10 a 500 años). Aunque la mayoría de los residuos inorgánicos, provienen de materias primas que se encuentran disponibles en el planeta, los procesos de transformación y de ingeniería aplicados por el hombre, los convierten en no degradables, por ejemplo, el petróleo es un combustible fósil, que por diferentes métodos se extraen cadenas poliméricas y de la unión de estas se obtiene el plástico (Sztern y Pravia, 1999).

1.3.1.3 Residuos orgánicos o biodegradables.

Se refiere a todos aquellos que tienen su origen en los seres vivos, animales o vegetales; tienen la característica de poder desintegrarse o degradarse rápidamente de forma aerobia o anaerobia (de 3 semanas a 4 meses), como por ejemplo los restos de comida, frutas, verduras, cáscaras, huevos, carne, entre otros, transformándose en otro tipo de materia orgánica (Sztern y Pravia, 1999).

1.3.1.4 Residuos Urbanos o Municipales.

Son los generados en los domicilios particulares, comercio, oficina, servicios, las fracciones de residuos biodegradables de cocinas, restaurantes, aceites y grasas comestibles; residuos de parques, jardines y mercados, dentro de los cuales se encuentran los restos de alimentos, periódicos, revistas, cajas, como también hojas, tallos, ramas, frascos, bolsas, botellas y latas (Sztern y Pravia, 1999).

1.3.2 Generación de Residuos.

A nivel mundial, las tasas de generación de Residuos Sólidos Urbanos (**RSU**) se ven influidas por el desarrollo económico, el grado de industrialización y los hábitos públicos. Generalmente, cuanto mayor es el desarrollo económico y tasa de urbanización, mayor es la cantidad de residuos sólidos producidos. Esta tendencia, va en aumento debido a la demanda constante por nuevos productos y servicios por parte de los consumidores, que al consumirlos los desechan, por el afán desbordado de adquirir las nuevas tendencias generadas por las diferentes industrias (alimentarias, electrónicas, del pastico, etc.), generando así un ciclo interminable de residuos (Hoornweg y Bhada, 2012).

Para finales del siglo XX e inicios del XXI, se generaban aproximadamente, 0.68 billones de T de RSU por año, que equivalían a 0.64 Kg/día/persona; actualmente se estima la generación de RSU en 1.3 billones de T al año, es decir, 1.2 Kg/día/persona, lo anterior equivale aproximadamente a un incremento de un 53%, en la generación de RSU a nivel mundial, en la última década. Se espera que para el 2025, se generen 1.42 Kg por persona al día, lo que se traduce en 2.2 billones de toneladas de RSU (Hoornweg y Bhada, 2012). En la Tabla 3, se muestran algunas de las fuentes generadores y tipos de residuos sólidos.

De los 1,3 billones de T de RSU que son generados actualmente, el 44% corresponden a los países agremiados a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (**OECD**), el 21% se generan en el Asia oriental y el Pacífico (**EAP**), el 12% en América Latina y el Caribe (**LAC**), el 7% en Europa y Asia Central (**ECA**), el 6% en el Medio Oriente y África del Norte (**MENA**), en Asia del Sur (**SAR**) un 5% y finalmente en África del Sur (**AFR**) un 5% (Hoornweg y Bhada, 2012). En la Tabla 4, se muestran las toneladas y los rangos de producción por persona de RSU, para las diferentes regiones del mundo.

Tabla 3. Fuentes y tipos de residuos sólidos generados.

Fuente	Generador	Tipo de residuo solido
Residencial	Viviendas	Comidas, papel, cartón, plásticos, textiles, jardín.
Servicios municipales	Limpiezas varias, paisajes, parques, plantas de tratamiento de aguas	árboles, lodo, hojas, maleza, hierba
Agricultura	Cultivos, huertos, viñedos, lecherías, lotes de alimentación, granjas	Alimentos, Agrícolas y plaguicidas.

Fuente: Hoornweg y Bhada (2012).

Tabla 4. Cantidad de Residuos Producidos Por Región

REGIÓN	Población urbana total (millones)	Residuos (Millones Ton/año)	Residuos (Kg/día/persona)
AFR	260	62	0.09 – 3
EAP	777	270	0.44 – 4.3
ECA	227	93	0.29 – 2.1
LAC	399	160	0.1 – 14
MENA	162	63	0.16 – 5.7
OECD	729	572	1.1 – 3.7
SAR	426	70	0.12 – 5.1

Fuente: Hoornweg y Bhada (2012).

Para el caso Colombiano, en la última década se han generado aproximadamente 30.886 T diarias de residuos, de las cuales 28.580 T (92,54% de la producción nacional) se disponen en sistemas de relleno sanitario o plantas integrales de tratamiento de residuos sólidos y 2.305 T (7,46% de la producción total) en sitios inadecuados (botaderos a cielo abierto, quema, cuerpos de agua y enterramientos). El Departamento de Antioquia cuenta con 125 municipios, los cuales producen en promedio 4.807 T/día. Medellín, la capital del departamento genera aproximadamente 1.392 T/día de residuos sólidos (Forero y Ochoa, 2009).

Según las estadísticas del Ministerio de Agricultura en el 2009, a escala nacional, Antioquia reportó una producción de 59.061 T que representan un 30% en la producción total por departamentos. En relación con la producción de las empresas agroindustriales en el ámbito local (Medellín y el Sur del Valle de Aburrá), la cantidad total de residuos generados está alrededor de 1,2 T/día, donde los desechos de naranja y guayaba son los que tiene la mayor participación (Restrepo et al., 2011). Unos de los residuos más representativos que se producen en la ciudad de Medellín son los que provienen de naranja, guayaba, guanábana y mango (Restrepo et al., 2012).

Según Inter Aseo S.A., E.S.P el total de residuos de frutas del sector agroindustrial que esta empresa recoge es de 27 T/día en el Sur del Valle del Aburra y 136 T/día en Medellín, es decir, 163 T/día (Yepes et al. 2008). Además, en el año 2002 sólo en Medellín existían aproximadamente 212 T/día de residuos de frutas que recogía Empresas Varias de Medellín (Yepes et al. 2008). En la Tabla 5, se muestran las cantidades diarias de residuos generados por algunas empresas del sector agroindustrial.

Tabla 5. Residuos generados por las empresas agroindustriales en Medellín y el sur del Valle de Aburra, Colombia.

EMPRESA	FRUTA	TOTAL DE RESIDUOS (Kg/día)
1	Guayaba, piña	3,3
2	Tomate de árbol, mango, papaya, sandía, durazno, pera, uchuva, melón, manzana, guayaba	1000
3	Maracuyá, mango, piña, guayaba	8000
4	Naranja, guayaba	1233
5	Mango, lulo, guanábana, guayaba, curuba, papaya, piña	2000
6	Guayaba	1200
7	Guanábana, mango, maracuyá, guayaba, tomate de árbol.	133
8	Guayaba, limón, papaya, piña, sandía	150
9	Maracuyá, naranja, mandarina, mango, lulo, guanábana	133
10	Varios	200
11	Guanábana, mango, lulo, maracuyá, tomate de árbol, piña.	27
12	Guanábana, mango, maracuyá, tomate de árbol, piña, mandarina, lulo	90

Fuente: Yepes et al., (2008).

Los 1.129 municipios de Colombia producen en promedio 28.800 T de residuos sólidos por día. Aproximadamente el 35%, o 10.000 T/día de estos residuos se generan en Bogotá, Cali, Medellín y Barranquilla, mientras que las ciudades medianas y pequeñas municipios generan el restante 65%, o 18.800 T/día. Se estima que una gran parte de estos residuos, se eliminan inadecuadamente en botaderos a cielo abierto, cuerpos de agua y otras zonas ecológicamente insostenibles (World Bank, 2009).

1.3.3 Valoración de residuos Agroindustriales.

Los residuos agroindustriales, se pueden procesar por diferentes métodos tales como: digestión aeróbica y anaeróbica (Parawira et al., 2004; Arvanitoyannis et al., 2008), incineración (Autret et al., 2007), electrodiálisis (Lameloise y Lewandowski, 2012; Huang et al., 2007), fermentación en estado sólido (Santis-Navarro et al., 2011; Bansal et al., 2012), lombricultura y compostaje (Pratap et al., 2011; Wu et al., 2012) y Pirolisis (Yanik et al., 2007); los cuales pueden ser considerados para la obtención de productos de valor agregado y en función del tipo de proceso ser aplicados a la industria alimentaria, química o industria en general. En la actualidad, el uso y aprovechamiento de residuos agroindustriales ha tomado cada vez más importancia, debido a la potencialidad de estos por su contenido en diversos compuestos, que pueden ser útiles en la elaboración de nuevos productos alimenticios o no alimenticios. Algunos ejemplos son la obtención de Combustibles Alternativos, Biopolímeros, Enzimas, Compuestos bioactivos tales como: Pectinas, Aceites Esenciales, Flavonoides y carotenoides, Hongos comestibles y Fibra dietaria. A continuación se describirán algunos de estos:

1.3.3.1 Producción de combustibles alternativos.

Pueden entenderse como gases combustibles generados durante la gasificación de biomasa que se prevén como combustibles, estos pueden derivarse de materia vegetal y animal, así como de sus residuos, es además una energía renovable, abundante, descentralizada y limpia (Yepes et al., 2008). Dentro de los combustibles alternativos, que se obtienen usando residuos está el biogás y el metanol. Sanchez et al. (2010), utilizaron subproductos agroindustriales lignocelulosicos para la producción de bioetanol; así mismo Aimaretti et al. (2011), concluyeron que es posible obtener bioetanol de segunda generación a partir de desechos provenientes de zanahoria, utilizando como biocatalizador *Saccharomyces cerevisiae* descartada de la elaboración de la cerveza. Por otro lado Rivera et al. (2009), lograron disminuir los costos de producción de biodiesel, ya que lo obtuvieron a partir de residuos grasos de animales por vías enzimáticas, por ultimo Wisniewski et al. (2010), usaron residuos de aceite de pescado, para la obtención de biocombustibles por medio de la pirolisis. Otras fuentes de energía obtenidas a partir de residuos, es el hidrogeno lo cual es reportado por Al-Shorgani et al. (2013), quienes lo obtuvieron a partir de residuos agroindustriales de arroz, aceite de palma y de palmito, usando la bacteria *C. saccharoperbutylacetonicum N1-4*.

1.3.3.2 Extracción de Pectinas.

Las pectinas son polisacáridos que se componen principalmente de unidades de ácido galacturónico unidas por enlaces glicosídicos α -D-1-4. Son sustancias blancas amorfas que forman en agua una solución viscosa; combinadas en proporciones adecuadas con azúcar y ácidos, forman una sustancia gelatinosa utilizada como espesante (Badui, 2006; Potter y Hotchkiss, 2007). Trabajos con respecto a la extracción de pectinas han sido reportados por diversos autores; así Happi et al. (2008), extrajeron y caracterizaron pectinas extraídas de las cascara de banano; Gamboa (2009), obtuvo pectinas a partir de residuos agroindustriales de mango.

1.3.3.3 Producción de Enzimas.

Las enzimas se pueden definir como grandes moléculas de proteínas que actúan como catalizadores biológicos, llevando a cabo reacciones bioquímicas de alta velocidad, no se consumen durante la reacción y en general presentan un alto grado de especificidad (Badui, 2006; Potter y Hotchkiss, 2007).

Con respecto a la producción de Enzimas, a partir de residuos agroindustriales, autores como Costa et al. (2009 y 2010), obtuvieron la enzima fitaza y algunas enzimas hidrolíticas, respectivamente por procesos de fermentación sumergido y en estado sólido, usando residuos agroindustriales y cepas de *Aspergillus ficuu*. Además, se reporta la obtención de celulasas (Bansal et al., 2012), Xilanasas y Proteasas (Oliveira et al., 2006), y enzimas ligninolíticas (Gassara et al., 2008), a partir de sustratos agroindustriales y diversas cepas bacterianas.

1.3.3.4 Extracción de Aceites esenciales.

Son líquidos oleosos volátiles obtenidos de las plantas (semillas, flores, raíces, hojas y frutos) por algún método físico de extracción y comúnmente son llamados esencias. Están constituidos principalmente por terpenos, son sustancias resinosas, muy perfumadas, volátiles, casi siempre coloreadas y más livianas que el agua; tienen aplicación como correctores de sabor en los alimentos (Badui, 2006). Navarrete et al. (2009) y Ceron y Cardona (2011), lograron extraer aceites esenciales de mandarina y naranja respectivamente, obtenidos de las cascaras y residuos.

1.3.3.5 Extracción de Flavonoides y carotenoides.

Los flavonoides o bio-flavonoides son compuestos fenólicos y pigmentos naturales presentes en las frutas y en los vegetales, así como en el café, la cocoa y la cerveza, que dada a su capacidad de capturar radicales libres tienen una actividad antioxidante alta. Los flavonoides se utilizan como suplemento alimenticio para animales y humanos, ingredientes de bebidas refrescantes y confites, desodorización, desinfección, inhibidores de trombosis, antiinflamatorios, inhibidores de cáncer, antialérgicos, edulcorantes, bioflavonoides (vitamina P) y antioxidantes. Al igual que los flavonoides, los carotenoides son pigmentos y también poseen propiedad antioxidante (Badui, 2006).

Con respecto a la obtención de flavonoides y carotenoides, existen varios trabajos reportados en la literatura; en este sentido se han extraído flavonoides y carotenoides de los residuos de la industria de la seda tailandesa amarilla, (Prommuak et al., 2008); en tanto que Katalinic et al. (2010) y Cetkovic et al. (2012), extrajeron diferentes compuestos fenólicos tales como: flavonoides, flavonoles, catequinas, antocianinas y ácidos fenólicos, a partir de extractos de cascara de uvas y de cascaras de tomate de diferentes variedades, respectivamente.

1.3.3.6 Extracción de Fibra dietaria.

Está constituida por los componentes estructurales de las paredes celulares de los vegetales, entre los que se destacan la celulosa, hemicelulosa y las pectinas, las cuales dan firmeza y textura fuerte a las estructuras externas de las frutas (Badui, 2006). La fibra dietaria es obtenida principalmente de las cortezas de las frutas, consta de polisacáridos estructurales (celulosa, hemicelulosa, pectinas, rafinosa y estafinosa), polisacáridos no estructurales (gomas y mucílagos), sustancias estructurales no polisacáridas (lignina) y de otras sustancias como cutina, taninos y suberina (Beres et al., 2016).

Gutierrez et al. (2002), Nawirska et al. (2005) y Ajila et al. (2010), han utilizado residuos de naranja, limón, mandarina, piña, maracuyá, manzana, pera, cereza, grosella negra, zanahoria, mango, sandía y melón, para la obtención y caracterización de polvos con diferentes contenidos de fibra dietaria. Así mismo, estudios de revisión realizados por Elleuch et al. (2011) y Cañas et al. (2011), informan que la pulpa y las cascaras de algunas frutas, verduras y cereales como la de las toronjas, melocotón, uva, durazno, coco, cacao, tomate, patata, espárragos, repollo, coliflor, arvejas,

calabaza, frijol, remolacha, guisantes, arroz, avena, trigo, maíz, avellana, maní, bagazo de caña, son una fuente abundante de fibra dietética soluble e insoluble, las cuales son útiles y aplicables para enriquecer los alimentos, reemplazar harinas, aumentar la de fibra dietética de alimentos, desarrollo de productos saludables bajos en calorías, colesterol y grasa.

1.3.3.7 Producción de Hongos comestibles.

Son organismos heterótrofos, es decir, que requieren del material orgánico para subsistir. Poseen el doble del contenido de proteínas que los vegetales y disponen de nueve aminoácidos esenciales, contando además con leucina y lisina (ausente en la mayoría de los cereales) (Baltes, 2007).

Parati et al. (2011), utilizaron residuos sólidos de aceitunas y paja de trigo en compost, para el cultivo a escala industrial de setas de *Agaricus bisporus*. Kurbanoglu et al. (2004), produjeron setas comestibles de *Agaricus bisporus* por fermentación sumergida, a partir de cuernos de carnero molidos provenientes de plantas de beneficio, además estos autores también informan que las proteínas fibrosas provenientes de plumas, uñas y pelo, pueden convertirse en sustratos para el crecimiento de hongos comestibles.

1.4 BIOPOLIMEROS.

La obtención de polímeros biodegradables a partir de fuentes renovables representa una alternativa frente a los altos precios del petróleo y obedece al aumento de la conciencia pública sobre los problemas ambientales que generan los plásticos. Polímeros de origen biológico tales como los derivados de almidón, ácido poliláctico, polímeros celulósicos y los polihidroxiálcanohatos juegan un papel importante, además de ser biodegradables, tienen la ventaja de ser producidos a partir de fuentes renovables (Demirbas, 2007; Nath 2008). Los poliésteres más conocidos son los polihidroxiálcanohatos (PHAs) los cuales son principalmente producidos en procesos de fermentación microbiana (Nath, 2008), debido a su gran versatilidad estructural y a sus propiedades, son materiales promisorios en diversas aplicaciones tales como: biomedicina, alimentos, envases, textiles y materiales para el hogar (Roy y Tajalli, 2010).

1.4.1 Generalidades.

Un biopolímero se puede definir como una “*variedad de macromoléculas, producidas por sistemas biológicos, como animales, plantas o microorganismos*”. Los biopolímeros pueden ser sintetizados químicamente, pero como requisito sus unidades poliméricas deben ser derivadas de sistemas biológicos, como: aminoácidos, azúcares, lípidos, entre otros. En general los biopolímeros naturales provienen de cuatro grandes fuentes: origen animal (colágeno/gelatina), origen marino (quitina/quitosano), origen agrícola (lípidos, grasas, hidrocoloides, proteínas y polisacáridos) y origen microbiano (ácido poliláctico (PLA) y polihidroxiálcanoatos (PHAs)) (Tharanathan, 2003). Algunas de estas estructuras se pueden ver en la Figura 4.

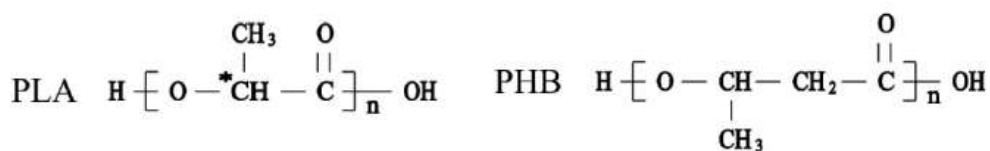


Figura 4 Fórmulas estructurales de los biopolímeros PLA (ácido poliláctico), PHB (polihidroxibutirato) Fuente: (Calvo, 2013).

Otra definición de biopolímero, es aquel material cuyo fin es el de interactuar con un sistema biológico, generando interacciones tales como: evaluar, curar, corregir o reemplazar algún tejido, órgano o función del organismo. Además un biopolímero, puede ser una sustancia sólida tipo orgánico, inorgánico o inerte con la propiedad de ser biocompatible con el ser vivo, normalmente el cuerpo humano (Calvo, 2013). Los biopolímeros, al igual que los polímeros, son macromoléculas que han sido formadas mediante un proceso de polimerización (unión covalente) de moléculas más pequeñas denominadas monómeros (Calvo, 2013).

Finalmente, Gallur (2011), define un polímero degradable, como aquellos que experimentan reacciones de degradación resultantes de la acción de microorganismos, tales como bacterias y hongos, bajo condiciones que naturalmente ocurren en la biosfera en un periodo corto de tiempo.

1.4.2 Obtención de Biopolímeros.

La obtención de polímeros biodegradables a partir de fuentes renovables representa una alternativa frente a los obtenidos a partir de petróleo y obedece al aumento de la conciencia pública sobre los problemas ambientales que generan los plásticos (Castilho et al., 2009).

Los polímeros de origen biológico tales como los derivados de almidón, ácido poliláctico, polímeros celulósicos y los PHAs juegan un papel importante, además de ser biodegradables, tienen la ventaja de ser producidos a partir de fuentes renovables (Demirbas, 2007; Nath, 2008). Los poliésteres más conocidos son los PHAs los cuales son exclusivamente producidos en procesos de fermentación microbiana (Nath, 2008). Debido a su gran versatilidad estructural y a sus propiedades, son materiales promisorios en diversas aplicaciones tales como: biomedicina, alimentos, envases, textiles y materiales para el hogar (Roy y Tajalli, 2010). En la Tabla 6, se muestran valores de producción de polihidroxialcanoatos así como sustratos y cepas utilizadas para la obtención de los mismos, además se puede ver la concentración de PHA expresada en g/L, la productividad definida como la concentración del polímero dividida entre el tiempo total de fermentación requerido para llegar a dicha concentración, y el rendimiento Y, expresado en la relación producto/ sustrato (g polímero/ g sustrato).

Tabla 6. Algunos de los Sustratos y Cepas utilizados para obtener PHAs

Organismo	Sustrato	Tiempo de Cultivo (h).	[PHA] (g/L)	Contenido de PHA (%)	Productividad de PHA (g/L/h)	Y (g/g)
<i>Azotobacter vinelandi</i>	Melaza de Remolacha	40	23.0	66.0	1.40	0.12
	Glucosa + Pectonas de Pescado	47	25.0	85.0	1.00	0.65
	Glucosa+ Acido propionico	46	114	74.0	2.55	---
<i>Azotobacter choroococcum</i>	Glucosa	48	10.2	78.3	---	0.28
	Sacarosa	18	71.4	50.0	4.94	0.42
<i>Alcaligenes latus</i>	Malta	50	22.7	36.3	---	---
	Soya	50	6.00	70.1	---	---
<i>E. coli recom.</i>	Glucosa	49	157	77.0	3.20	---
	Sacarosa	48	34.3	27.5	0.71	---
	Suero	49	69.0	80.0	1.40	---

Fuente: Hoyos (2003).

1.4.3 Polihidroxialcanoatos.

Los polihidroxialcanoatos son poliésteres microbianos de ácidos hidroxialcanoicos, los cuales son acumulados intracelularmente por microorganismo procarióticos (Eubacteria, archaea); son sintetizados en ambientes con exceso de carbono, y carencia de otros nutrientes esenciales como nitrógeno, azufre, oxígeno o fósforo (Steinbüchel y Lütke, 2003; Anderson y Dawes, 1990). El peso molecular y la estructura química del polímero son controladas por el tipo de cepa y por las características de los sustratos (Anderson y Dawes, 1990; Sim et al., 1997). El primer PHA identificado fue el poli(3-hidroxiбутírate) obtenido a partir del *Bacillus megaterium* por Maurice Lemoigne en 1926; 50 años después Wallen y Rohwedder (1974), depuraron en unidades monoméricas el 3HV y el 3HHx, 3-hidroxyvalerato y 3-hidroxyhexanoato, respectivamente.

Los PHAs son algunos de los productos que se producen a partir de biomasa, los desarrollos en esta área se enfocan a la sustitución de derivados del petróleo y a la formulación de materiales con propiedades funcionales (Frazzetto, 2003; Young, 2003). En la literatura se reportan alrededor de 150 tipos de PHAs (Steinbüchel, 2001), los cuales cubren una amplia gama de propiedades y aplicaciones que dependen de la composición química del material (Cornibert y Marchessault, 1972; Doi et al., 1995; Jendrosseck y Handrick, 2002). De acuerdo con estudios reportados por varios autores, los PHAs pueden presentar características similares a las de polímeros sintéticos tales como el polipropileno (Steinbüchel y Fächtenbusch, 1998; Madison y Huisman, 1999; Sudesh et al., 2000).

1.4.3.1 Propiedades de los PHAs.

Las propiedades de los PHAs, varían considerablemente. Pueden tener diferentes puntos de fusión, temperatura de transición vítrea, y grados de cristalinidad. En general tienen baja permeabilidad al O₂, pueden ser procesables por los métodos empleados para materiales termoplásticos y sus propiedades mecánicas son altamente dependientes de su estructura química (Steinbüchel y Valentin, 1995). En la Figura 5, se esquematiza la estructura general de los PHAs. Estos se pueden clasificar en tres grupos, basados en el número de carbono que tienen por cada unidad de monómero. Los PHAs de cadena corta (sclPHAs) que tienen de 3 a 5 carbonos, los de cadena media que tienen entre 6-14 carbonos (MCLPHAs) y los de cadena larga que contienen más de 14 carbonos (lclPHAs) (Steinbüchel y Valentin, 1995). Las propiedades del material de MCL-PHA están claramente determinadas por la longitud de los grupos laterales (R en la Figura 5), su comportamiento mecánico puede asemejarse al de un elastómero o al de un plástico rígido (Steinbüchel y Valentin, 1995; Dawes y Senior, 1973) lo cual potencia su uso en campos tales como la medicina.

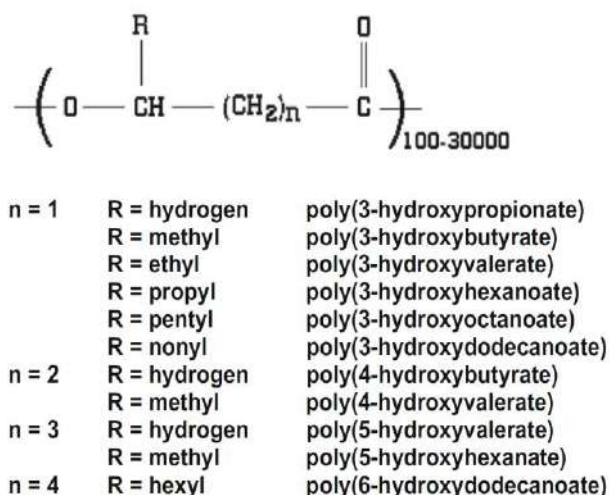


Figura 5. Esquema de la estructura general de los polihidroxicanoatos. Fuente: Oliveira (2004).

Los PHAs convencionalmente son polímeros de alto peso molecular, en el rango de 100 - 1000 KDa, presentan propiedades equiparables a polímeros termoplásticos sintéticos tales como el polipropileno, pero a diferencia del polipropileno, presentan la ventaja de ser biocompatibles y biodegradables, por lo cual presentan aplicaciones en la industrias tales como la biomédica y la farmacéutica (Steinbüchel y Lütke, 2003; Chen y Wu, 2005; Misra et al., 2006; Wu et al., 2009a). Según Zinn et al. (2001), aplicaciones en dichos campos requieren que los PHAs se produzcan con características reproducibles, lo cual se logra mediante la producción de bacterias en modo de cultivo continuo donde las condiciones se mantienen constantes.

Los PHAs de cadena corta pueden ser rígidos y por tanto quebradizos, por lo que sus propiedades mecánicas no son apropiadas para varias aplicaciones. Por otro lado, los MCLPHAs (PHAs de cadena media, por sus siglas en ingles). pueden ser elastoméricos y presentar baja resistencia

mecánica, la formación de copolímeros a partir de los dos tipos de monómero es una alternativa viable para lograr las características mecánicas deseadas, tales como tenacidad, rigidez y resistencia tensil (Hazer y Steinbüchel, 2007).

Modificaciones en la estructura del material polimérico pueden dar lugar a diferentes aplicaciones, por ejemplo si se incrementa el carácter hidrofílico del polímero, el material puede usarse en aplicaciones en donde se requiera contacto con la sangre, haciéndolo útil para aplicaciones médicas. De manera similar, la inclusión de insaturaciones en la estructura incrementa su uso como elastómeros y permite que se obtengan estructuras termofijas, las cuales presentan mayor estabilidad mecánica y mayor resistencia (Hazer y Steinbüchel, 2007).

En la Tabla 7 se comparan las propiedades físicas de los principales PHAs y el polipropileno. Se observa que el homopolímero PHB es un termoplástico rígido y relativamente quebradizo. Estudios estructurales de este polímero han demostrado que la biosíntesis es 100% estereoespecífica y que la configuración obtenida para el carbono quiral es D(-) (Doi et al., 1995; Steinbüchel, 2001), lo cual incide en la alta cristalinidad del PHB. Adicionalmente, su alta temperatura de fusión (175°C), ligeramente inferior a la temperatura de degradación (185°C), dificulta su procesamiento por técnicas convencionales como moldeo por inyección Ojumu et al., (2004). A pesar de estas limitaciones el PHB tiene varias propiedades útiles, como resistencia a la humedad, insolubilidad en agua, pureza óptica y también buena impermeabilidad al oxígeno, adicionalmente, puede ser degradado en presencia de enzimas hidrolíticas (Lindsay, 1992; Holmes, 1988).

Tabla 7. Algunas propiedades Físicas de PHAs vs Polipropileno.

Propiedad	PHB	P(HB-HV)**			Polipropileno
		3% mol	14% mol	25% mol	
Punto de Fusión (°C)	175	169	150	137	176
Temperatura Transición Vítrea (°C)	15	-	-	-1	-10
Cristalinidad	80	-	-	40	70
Módulo de Young	3.5	2.9	1.5	0.7	1.7
Resistencia a la tracción.	40	38	35	30	34.5
% de elongación.	6	-	-	-	400

Fuente: Ojumu et al., (2004). - Datos no disponibles. ** Poli(-3-hydroxybutirato-co-3-hidroxivalerato).

Aunque los PHAs son biodegradables y pueden ser obtenidos de fuentes renovables (Castilho et al., 2009), son costosos respecto a los plásticos no biodegradables (Choi y Lee, 2000). Por ejemplo, 1 kg de polihidroxibutirato cuesta entre US 15-30 mientras 1 kg de polipropileno vale aproximadamente US 0,70 (Witholt y Kessler, 1999). Si bien los costos de producción son un problema, su aplicación en objetos de uso masivo de bajo costo se está convirtiendo en una realidad (Roy y Tajalli, 2010). Sin embargo estudios mas recientes reportan que 1 Kg de PHA puede costar entre 2 a 5 euros, esta reducción de costos se ha logrado debido al mejoramiento de las cepas utilizadas, además de los bajos costos en las materias primas utilizadas y del mejoramiento de los métodos de extracción del biopolímero González et al., (2013) y Dietrich et al., (2016).

1.4.3.2 Aplicaciones de los PHAS.

En la literatura se encuentran reportes del uso de los PHAs en aplicaciones tales como empaques para productos cosméticos y de aseo (Hocking, 1994; Weiner, 1997), en artefactos de bajo costo tales como bolígrafos, peines (Chen y Qiong, 2005) y para la producción de productos químicos a granel obtenidos a partir de la despolimerización de los PHAs (Brandl et al., 1988; Lee et al., 1999).

Sin embargo, la alta relación costo beneficio ha motivado que se explore su uso como materiales funcionales en aplicaciones del sector farmacéutico y en el diseño de dispositivos biomédicos. La Tabla 8 presenta algunos de los usos que han sido reportados en este campo, los cuales incluyen productos cardiovasculares, scaffolds para la regeneración de los tejidos, injertos vasculares, stents cardiovasculares y válvulas cardíacas, pro-fármacos, tratamientos dentales y maxilofaciales (tejidos rectores y la regeneración ósea), administración de medicamentos (pastillas, implantes), nutrición (tanto para el hombre y animal), ortopedia, urología y materiales para el manejo de heridas (suturas y apósitos) (Zinn, 2001; Williams y Martin, 2002).

El potencial de los PHAs para convertirse en compuestos importantes en aplicaciones médicas es ratificado por diferentes reportes que demuestran que este tipo de biopolímero es biocompatible, lo cual no es sorprendente puesto que el ácido R-3-hidroxibutírico se encuentra disuelto en la sangre en concentraciones que oscilan entre 0,3 y 1,3 mM (Adams et al., 1987; Yanik, 1997) y también se encuentra en la membrana de las células eucariotas (Reusch, 2000). Sin embargo, el PHB tiene una tasa de degradación baja en el cuerpo en comparación con heteropolímeros como por ejemplo, el poli (lactato co-glicolato) (Pouton, 1996). Una de las razones es su alta cristalinidad (60-90%) (Holmes, 1985; Holmes, 1988), lo que dificulta el ataque enzimático (Iwata et al., 1997).

Actualmente, uno de los mayores intereses en este campo es el diseño de biomateriales que estimulen el crecimiento de las células para la reparación de tejidos, y puedan ser reabsorbidos por el cuerpo (Brandl, 1995; Byrom, 1987). Algunos de los sistemas poliméricos que se usan en aplicaciones relacionadas con la medicina y son aceptados por la FDA se basan principalmente en el poli (ácido láctico) (PLA), el poli (ácido glicólico) (PGA) y sus copolímeros (Lee, 1996). En ese sentido el uso de P4HB ya fue aprobado por la FDA para el desarrollo de aplicaciones en Biomedicina (Martin y Williams 2003).

Sin embargo para determinar si un biopolímero es apto para el uso en aplicaciones biomédicas, se hace necesario realizar pruebas de biocompatibilidad y de biodegradabilidad; dentro de las primeras existen test de citotoxicidad, alergénicas, mutagenicas y cancerígenas (Saad et al., 1997; Guo et al., 2010; Volova et al., 2010).

Tabla 8. Aplicaciones de PHAs en medicina.

Tipo de aplicación.	Productos
Manejo de heridas	Suturantes, sustitutos de piel, nervios para las manos, mallas quirúrgicas, hisopos.
Sistemas Vasculares	Válvulas para corazón, parches para el pericardio, injertos vasculares.
Ortopedia	Scalfoods, capsulas para la columna vertebral, sustitutos de huesos, regeneración de meniscos,
Urología	Stens Urológicos
Odontología	Regeneración de tejidos en casos periodontales.

Fuente: Zinn (2001).

1.4.4 Caracterización de Biopolímeros.

1.4.4.1 Espectrometría de absorción en el Infrarrojo.

La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12800 y 10 cm⁻¹, que corresponden a longitudes de onda entre los 0.78 a 1000 μm. El espectro se puede dividir en tres regiones, infrarrojo cercano, medio y lejano; en general las medidas en el infrarrojo cercano se hacen con un fotómetro y sus principales aplicaciones están en el análisis cuantitativo de materiales industriales agrícolas y en los procesos de control (Skoog et al., 2001). En cuanto al infrarrojo medio inicialmente eran del tipo dispersivo; sin embargo hoy en día existen equipos que son del tipo de transformada de Fourier, lo que ha traído beneficios ya que se aumentó la relación señal/ruido, además de los límites de detección (Skoog et al., 2001). En ese sentido la espectrometría en el infrarrojo medio se utiliza en el análisis cuantitativo de muestras complejas mediante espectrometría de absorción y emisión; otras aplicaciones son los estudios microscópicos de superficies y análisis de sólidos mediante reflectancia total atenuada (Skoog et al., 2001).

El análisis cualitativo de esta técnica, se puede hacer mediante las frecuencias de grupo, se explica que la frecuencia aproximada, o el número de onda, a la que un grupo funcional, tal como: C=O, C=C, C-H o O-H, absorbe radiación en el infrarrojo, se puede calcular a partir de las masas de los átomos y de la constante de fuerza del enlace entre ellos (ver ecuaciones 1 y 2).

$$\nu = \nu_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1) \quad \bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} = 5,3 \times 10^{-12} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2)$$

Donde $\bar{\nu}$ es el número de onda, en cm⁻¹, correspondiente a un pico de absorción; k , es la constante de fuerza del enlace en Newton por metro (N/m); c , es la velocidad de la luz en cm/s, y la masa reducida, μ , que se define mediante la ecuación 3, la cual tiene unidades de kg. Donde, m , son las masa de los electrones.

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (3)$$

Estas frecuencias, denominadas frecuencias de grupo, rara vez permanecen invariables, debido a las interacciones con otras vibraciones asociadas a uno o a los dos átomos que forman el grupo. En la Tabla 9, se enumeran las frecuencias de grupo, para algunos de los grupos funcionales más comunes.

Tabla 9. Tabla abreviada de frecuencias de grupos funcionales.

Enlace	Tipo de Compuesto	Intervalo de frecuencias, cm^{-1}	Intensidad
C-H	Alcanos	2850-2970; 1340-1470	Fuerte; Fuerte.
C-H	Alquenos	3010-3095; 675-995	Media; Fuerte
C-H	Alquinos	330	Fuerte
C-H	Anillos Aromáticos	3010-3100; 690-900	Media; Fuerte.
O-H	Alcoholes y fenoles	3590-3650	Variable
	Ácidos Carboxílicos	3500-3650	Media
N-H	Aminas, Amidas	3300-3500	Media
C=C	Alquenos	1610-1680	Variable
C-O	Alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres.	1050-1300	Fuerte
C=O	Aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres.	1690-1760	Fuerte.

Fuente: Skoog et al. (2001).

Con respecto a la caracterización de polihidroxialcanoatos, utilizando la técnica de FTIR, por infrarrojo se tienen diversos autores. En general se buscan las señales típicas de este material, OH ($3200\text{-}3500\text{cm}^{-1}$) COC ($1185\text{-}1228\text{ cm}^{-1}$) (Wang et al., 2011), CH ($2922 - 2929\text{cm}^{-1}$), CO ($1000\text{-}1300\text{cm}^{-1}$) (Silverstein et al., 2005); C=O ($1600\text{-}1850\text{cm}^{-1}$) (Hong et al., 1999).

Oliveira et al. (2007) y López-Cortes et al. (2010), obtuvieron un PHB y diversos PHAs a partir de residuos de tortas de soya y de aceites de canola, quienes reportaron la presencia del grupo OH entre los 3444 cm^{-1} y 3449 cm^{-1} , respectivamente. Así mismo Barbosa et al. (2005) y Hong et al. (1999), reportaron a una longitud de onda de 2928 cm^{-1} la presencia de grupos C-H, para PHAs, obtenidos de frutuosos con diferentes tipos de cepas bacterianas. Otros autores como López-Cortes et al. (2010), López-Cuellar et al. 2011 y Misra et al. (2000), encontraron que la extensión 1724 cm^{-1} , correspondía al grupo C=O, esto para diferentes tipo de PHAs, obtenidos con diferentes sustratos y cepas bacterianas. Finalmente, Gáscue et al. (2000), reporta que algunos PHAs, pueden tener flexiones asimétricas del grupo CH, correspondientes al CH_2 y CH_3 , a longitudes de onda entre los $1379\text{-}1384\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. En la Figura 6 se muestra un espectro típico de FTIR, para un PHAs.

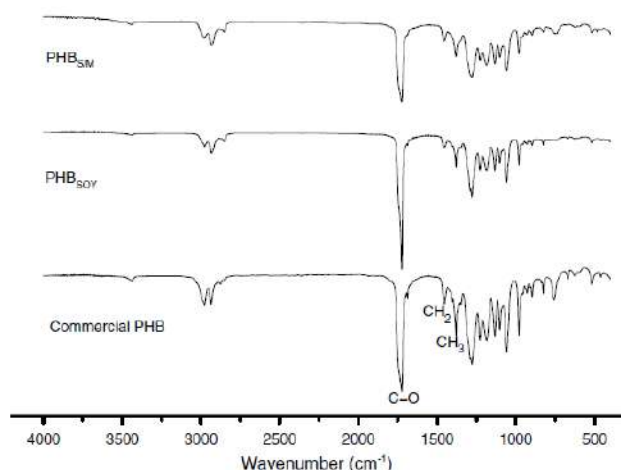


Figura 6. Espectro FTIR, para unos PHBs obtenidos de residuos de: soya y melaza (PHB_{SM}), Soya (PHB_{SOY}) comparados con un PHB comercial. Fuente: Oliveira et al. (2007).

1.4.4.2 Calorimetría Diferencial del Barrido.

El análisis térmico, se refiere a una variedad de técnicas en las que una o más propiedades de una muestra se determinan continuamente a medida que la muestra se programa, a través de un perfil de temperatura predeterminado (Cheremisinoff, 1996). Las técnicas comúnmente usadas son el TGA y el DSC, análisis termo-gravimétrico y de calorimetría diferencia del barrido, respectivamente. En el DSC, se mide la diferencia de energía que se aporta a una muestra y a una referencia, mientras ambas son sometidas a un programa de temperatura controlado. En el DSC, la medida de la diferencia de energía, se refiere al calor contenido por la muestra (entalpía), o al calor específico de la misma. El DSC, es una técnica ampliamente usada para determinar Temperatura de transición vítrea (T_g), Temperatura de fusión (T_m) y la Temperatura de Cristalización (T_c), además del calor de fusión en polímeros. En la Figura 7, se pueden ver las principales propiedades que se determinan en un DSC (Cheremisinoff, 1996).

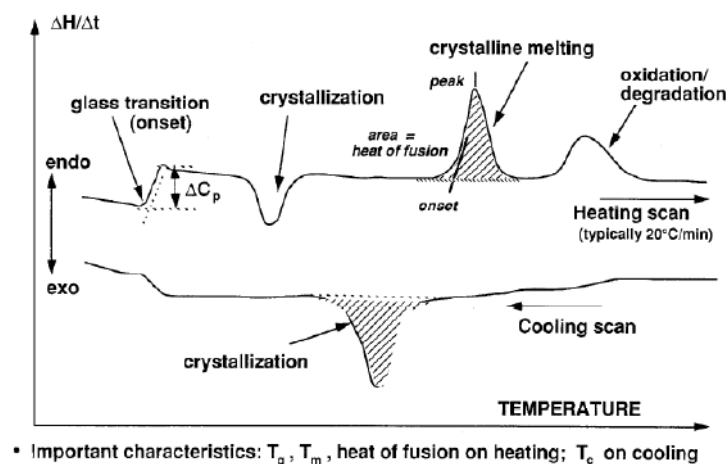


Figura 7 Termograma típico de un polímero Fuente: (Cheremisinoff, 1996).

Otra propiedad importante a determinar en polímero es el grado de cristalinidad, la cual se obtiene si la entalpía de fusión del polímero completamente cristalino es conocida, entonces la cristalinidad de un polímero desconocido puede ser determinada como dice la ecuación 4:

$$\text{Grado de cristalinidad (\%)} = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_u} \times 100 \quad (4)$$

Donde ΔH_u es la entalpía de fusión de un polímero completamente cristalino y ΔH_f es la entalpía de fusión de un polímero desconocido (Murillo, 2012).

En la literatura existen varios estudios con respecto a la aplicación de la técnica del DSC para caracterización de biopolímeros, los cuales están reportados en función del tipo de sustrato y microorganismo utilizado para la obtención del PHA. En ese sentido, Simon-Colin et al. (2012), encontraron que la T_m para un polihidroxialcanoato obtenido a partir de glucosa fue de 55°C; Matsusaki et al. (2000), obtuvieron un Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxiacalcanoato), a partir de diferentes cepas de *Pseudomonas* y combinadas con *E.Coli*, quienes al caracterizarlo obtuvieron dos T_m (42 y 178°C), debido a la presencia de diferentes cadenas de biopolímeros. Langlois et al. (2003), reportaron que la T_m para un PHOs vario entre los 40 a 52°C, estos biopolímeros producidos por diferentes cepas de *Pseudomonas*, también reportaron una ΔH_f de 17,3 (J/g). Finalmente, en la Figura 8, se puede ver un termograma de DSC, obtenido por López-Cortés et al. (2010), para un polihidroxialcanoato obtenido a partir de la cepa *Paracoccus seriniphilus* E71.

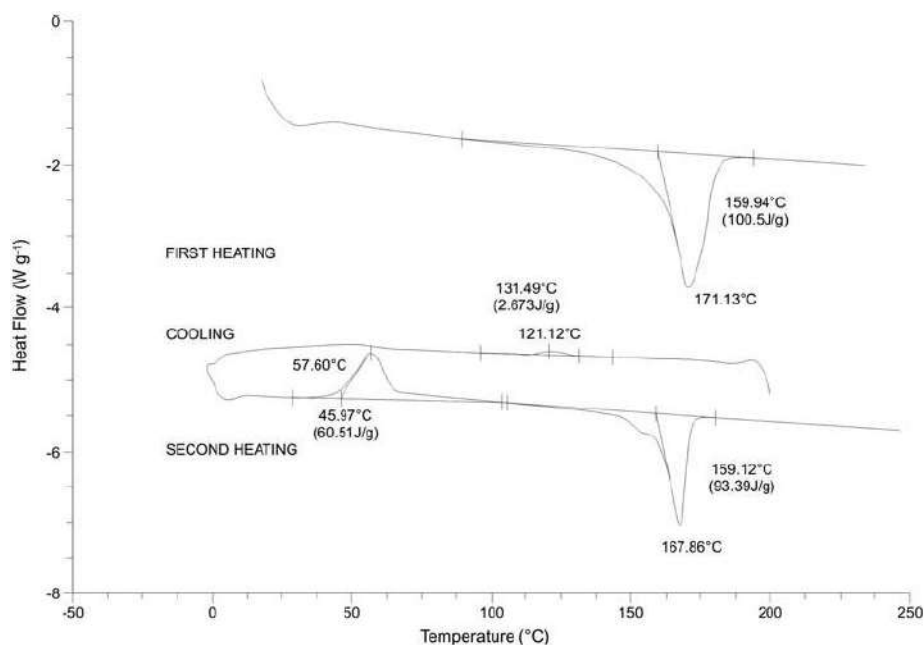


Figura 8. Termograma de un PHA. Fuente: López-Cortés (2010).

1.4.4.3 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La resonancia magnética nuclear (RMN), se basa en la medida de la absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias aproximadamente de 4 a 900 MHz. Es una técnica, en donde la absorción están implicados los núcleos de los átomos, y se requiere de un

analito en un intenso campo magnético, con el fin de que aparezcan los estados de energía de los núcleos que hagan posible la absorción (Skoog et al., 2001).

Es una técnica que solo se usa para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones; lo anterior solo se da en los átomos ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . Lo anterior se debe a que son núcleos magnéticamente activos, es decir poseen spin que hace que tengan un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran imanes. Cuando no hay campo magnético, los espines se orientan al azar, sin embargo cuando una determinada muestra se coloca ante un campo magnético, los núcleos con spin positivo se orientan en la misma dirección del campo, esto se conoce como estado de mínima energía o estado del espín α , en tanto que los espines con carga negativa se orientan en dirección contraria, este estado es de mayor energía y es un estado de espín β (Skoog et al., 2001).

Diversos autores han usado la RMN, para la caracterización de PHAs alrededor del mundo, tanto con ^1H y el ^{13}C ; En este sentido Simon-Colin et al. (2008) determinaron que la señal del grupo CH estaba a 5,2ppm, para un MCLPHA obtenido a partir de residuos de aceite de copra utilizando la cepa *P.guezennei* biovar. *Tikehau*, quienes además encontraron que la resonancia para el grupo CH_3 fue de 0,89ppm. Mishra et al. (2010), también reporta un espectro de RMN de un PHA obtenido de las cepas SM-P-3M y SM-P-1S, cuyas señales de resonancia fueron de 5,30 ppm para el CH y de 2,50ppm para el $-\text{CH}_2-\text{COOH}$. En la Figura 9, se observa un espectro de RMN ^1H para una combinación de β -polihidroxibutirato y β -polihidroxivalerato (Doi et al., 1986).

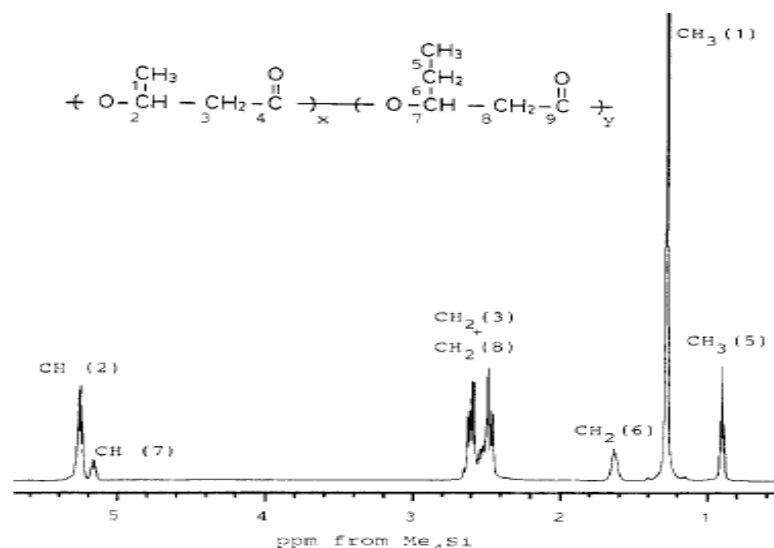


Figura 9 Espectro RMN ^1H , para β -polihidroxibutirato y β -polihidroxivalerato. Fuente: Doi et al (1986).

Existen varios trabajos respecto al análisis de ^{13}C en PHAs (Abd-El-haleem et al., 2007; Ashby et al., 2000). En la Figura 10, se muestra un espectro de RMN para el ^{13}C , obtenido por Thakor et al. (2005), para un PHA, obtenido durante la fermentación de la cepa *C. testosteroni* en aceite de coco. Se puede apreciar que hay presencia del grupo CH_3 para los desplazamientos $\delta = 13.7, 13.8$ y 13.9 ; en tanto que el grupo $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ $\delta = 18.2, 22.4, 22.5$; $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3)$ $\delta = 31.4, 31.7, 31.8$; $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2)$ $\delta = 29.1, 29.2, 29.4$; $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH})$ $\delta = 25$; (CH_2-CH) $\delta = 33.7, 35.8$; $(-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O})$ $\delta = 39$; $(\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2)$ $\delta = 70.5, 70.8$ y finalmente el grupo $(-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O})$ $\delta = 169.3$.

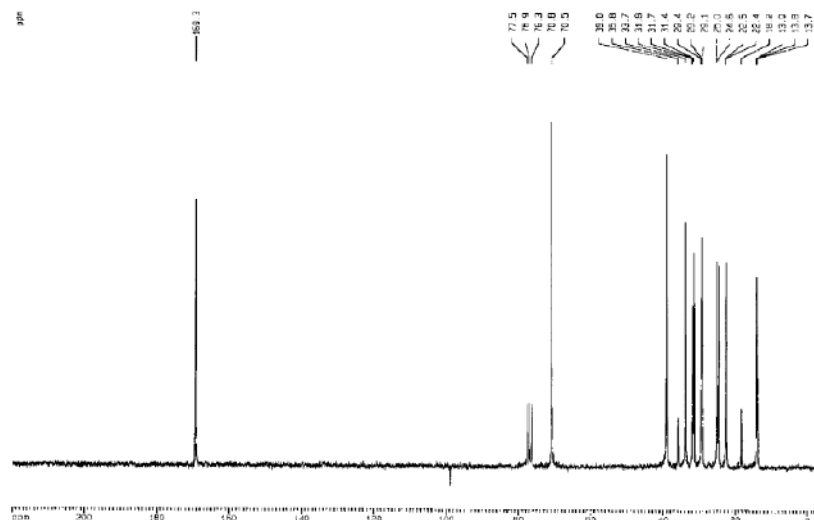


Figura 10 Espectro de RMN ^{13}C , para un PHA obtenido a partir de aceite de coco. Fuente: Thakor et al. (2005)

1.4.4.4 Espectrometría de Masas (MS).

Esta técnica de análisis proporciona diferentes tipos de información de una muestra, dentro de los que se encuentran: proporcionar la composición elemental de las muestras, además de las estructuras de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas; composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas; proporciona información de la estructura y composición de superficies sólidas y de las relaciones isotópicas de átomos en las muestras (Skoog et al., 2001).

Según Cheremisinoff (1996), en la espectrometría de masas convencional, los iones de interés son de carga positiva. En general las funciones de un espectrómetro de masas son: 1. producir iones a partir de las moléculas del material que se está trabajando; 2. Separar estos iones, en función de su relación masa a carga; 3. Medir la abundancia relativa de cada ion.

Diferentes autores han trabajado la espectroscopia de masas, para el análisis de biopolímeros, encontrando diferentes magnitudes como las relaciones masa/carga y el peso molecular del biopolímero. Dentro de estos trabajos están el de Choi y Lee (1997), dan diferentes relaciones de masa/carga (m/z), características de diversos PHAs, quienes reportan que las m/z para el metil éster de un 4-Hidroxyvalerato (4HV), 4-Hidroxyhexanoato (4HHx) y de un 4- Hidroxybutirato (4HB) son de 131, 145 y 101 respectivamente (Figura 11). Otros estudios similares han sido reportados por Thakor et al. (2005), Ashby et al. (2005) y Simon-Colin et al. (2012).

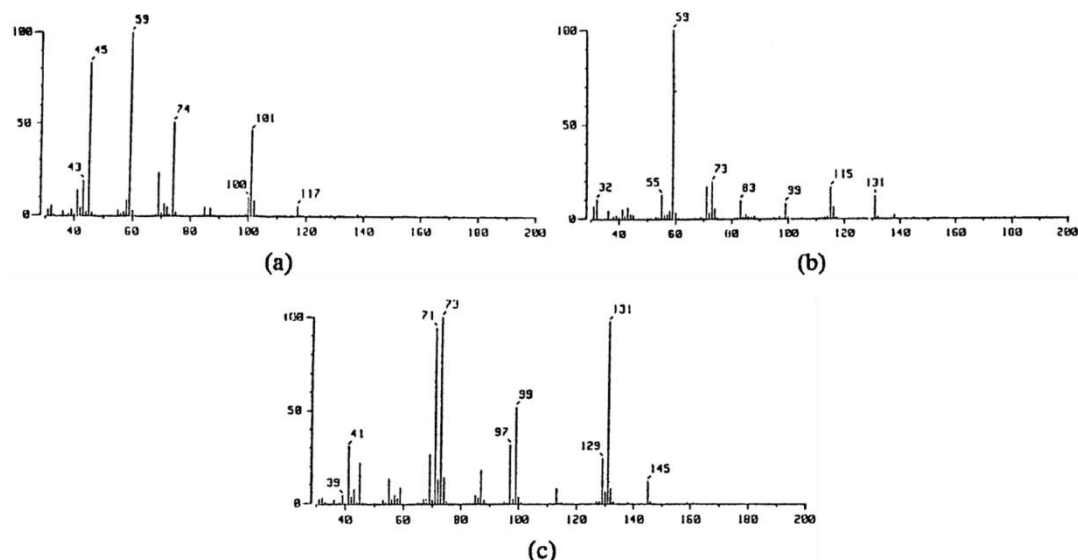


Figura 11. Espectrómetro de masas típicos de esteres de metil, de un 4-hidroxibutirato (a), 4-hidroxivalerato (b) y 4-hydroxyhexanoato (c). Fuente: Choi y Lee (1997).

Por otro lado, Wang et al. (2014), reporta que los tiempos de aparición de los picos están relacionados con el número de carbonos que debe tener el biopolímero, dichos resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Tiempos de retención para algunos PHAs

Monómero	Tiempo de Retención Observado (min).	Polímero	Tiempo de Retención Observado (min).
C ₄	4,69±0,01	C ₄ (PHB)	4,69±0,00
C ₈	10,88±0,03	C ₄ (PHBHV)	4,66±0,01
C ₁₀	13,67±0,03	C ₅ (PHBHV)	6,22±0,00
C ₁₂	16,09±0,03	C ₁₀ (MCL-PHA)	13,58±0,01
C ₁₆	20,28±0,01		

Fuente: Wang et al. (2014).

1.5 ELECTROSPINNING.

El electrospinning es un proceso que permite obtener fibras a través de un estiramiento coaxial de una solución viscoelástica. Los diámetros de las fibras obtenidas por electrospinning están desde las micras a rangos nanométricos, estas fibras presentan algunas características como son: alta área superficial, flexibilidad en la superficie, alta porosidad y poros interconectados (Duque et al. 2014). Estas propiedades hacen que tengan diversas aplicaciones tales como: Textiles (Pant et al. 2011); sistemas de filtración (Zhang et al., 2010; Yun et al., 2007); sin embargo las mayores aplicaciones están en la ingeniería de tejidos (Sangkert et al., 2016; Chahal et al., 2016; Lu et al., 2016), en biomedicina tales como reemplazo de huesos, implantes vasculares, mejoramiento de vasos sanguíneos, prótesis medicas etc. (Buchko et al., 1999; Stenoinen et al., 1999; Hohman et al.,

2001), entre otras aplicaciones de las nanofibras en diferentes campos de la industria (Huanga et al., 2003; Khan, 2012).

El principio de la técnica consiste en hacer pasar soluciones de un polímero a través de un campo eléctrico; la técnica se basa en que la fuerza eléctrica aplicada debe superar la fuerza de tensión superficial de la solución de polímero, de esta forma a un voltaje determinado, finos chorros de solución son expulsados desde un capilar hasta un plato colector. Posteriormente el chorro se mueve en la dirección del campo eléctrico, elongándose de acuerdo a las fuerzas externas e internas y experimentando inestabilidad en algunas ocasiones, finalmente el disolvente se evapora y los segmentos de fibras son depositados al azar en un sustrato o de forma alineada (Duque et al., 2014).

En general toda unidad de electrospinning requiere de los siguientes componentes: fuente de alto voltaje, una bomba para jeringa de micro-volúmenes, una jeringa con un capilar de diámetro pequeño y un sistema metálico colector. El plato colector se conecta al electrodo negativo de la fuente y el electrodo positivo se conecta al capilar (Khan, 2012) (Figura 12a y Figura 12b).

Aunque la configuración de un equipo de electrospinning es sencilla, existen diversos factores que afectan la fabricación de las fibras, dentro de estos factores están: concentración del polímero, flujo y viscosidad de la solución, intensidad del campo eléctrico, distancia de trabajo (distancia entre el colector y la punta del capilar) y humedad relativa. Normalmente, al aumentar la concentración del polímero o al agregarle a la solución algún porcentaje de tensoactivo se tiene como consecuencia que las fibras contienen un menor número de esferas o bolas, lo que en general representa un problema (Chuan et al., 2014).

Mientras los polímeros sean solubles, se pueden procesar mediante el electrospinning y obtener fibras; sin embargo es necesario tener en cuenta propiedades del polímero, la solución y condiciones de operación del equipo; dentro de las propiedades del polímero se tiene: peso molecular, solubilidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea; en cuanto a la solución es importante conocer: concentración, viscosidad, tensión superficial y temperatura de la misma; y los parámetros de proceso, como campo eléctrico, tasa de alimentación, humedad relativa, etc. La combinación de cada uno de estos factores, pueden dar lugar a la formación de diferentes tipos de fibras con características y propiedades propias (Chuan et al., 2014).

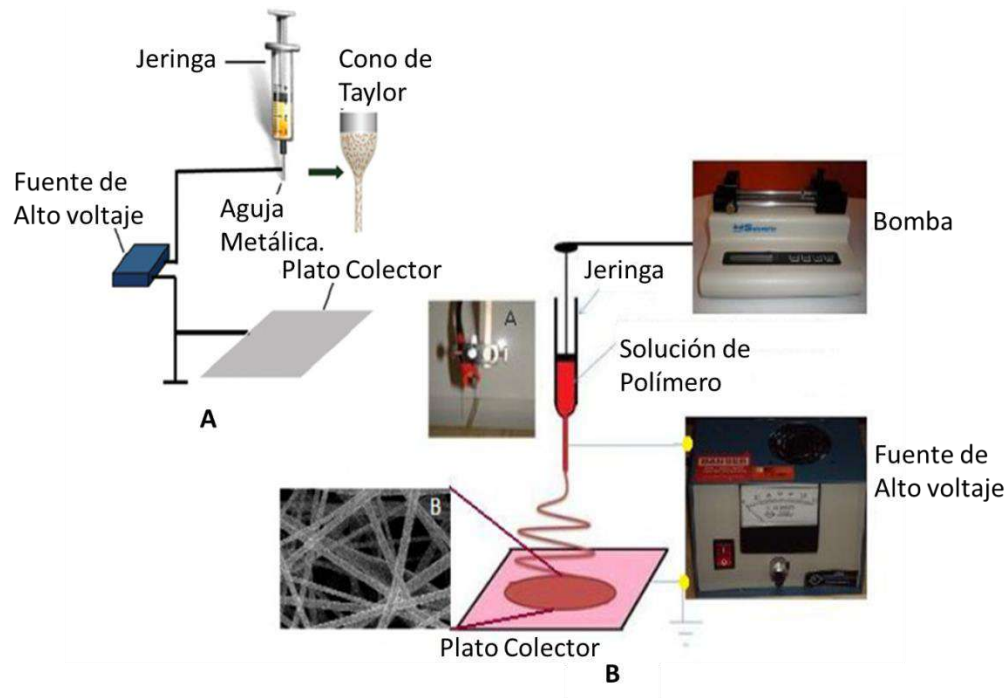


Figura 12. Esquemas básicos de un sistema electrospinning (a) Fuente: Chuan et al. (2014); Equipos físicos y nano-fibras formadas (b) Fuente: Khan (2012).

Por ejemplo la viscosidad de la solución es importante, ya que puede determinar si esta se puede someter al proceso o no; en general la viscosidad se ve afectada por el peso molecular del polímero. En principio, si el polímero es de alto peso molecular la viscosidad de la solución tiende a ser mayor y favorece el proceso de electrospinning; en tanto que si el peso molecular del polímero es demasiado bajo, la viscosidad de la solución polimérica tiende a ser pequeña, así se trabaje con alta concentración del polímero, en consecuencia la tensión superficial hará que el polímero se rompa en gotitas antes de llegar al plato colector. Por otro lado, si el polímero es de alto peso molecular, y si se aumenta en exceso la viscosidad de la solución esta sería tan alta que es imposible de cargarla energéticamente, y por tanto incapaz de formar las fibras. En conclusión cada polímero, tiene un rango de peso molecular/concentración óptimo en el cual se puede hacer el electrospinning para obtener las fibras. Por ende, no es posible hacer una recomendación general en cuanto a viscosidades, concentraciones óptimas etc., ya que los valores ideales de estos parámetros varían considerablemente con el sistema de disolvente de polímero (Chuan et al., 2014). Diversos autores han obtenido diferentes tipos de fibras a partir de PHAs (Tabla 11) donde se muestra el tipo de PHA utilizado, así como las relaciones de solventes utilizados por cada uno de estos autores, así como el diámetro de fibra obtenido. Así mismo en la Figura 13, se pueden ver algunas fibras obtenidas por electrospinning.

Tabla 11. Diámetros de fibras obtenidas por electrospinning con diferentes PHAs.

Polihidroxialcanoato	Solvente	Diámetro	Autor
Poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)	DMF/CHCl ₃	430 ± 150 – 1000±70 nm	Sun et al. (2008)
P(3HB-11.4%4HB-3.5%3HV)	CHCl ₃	350 to1140 nm	Canadas et al. (2014)
CF-PHA	DMF/ CHCl ₃	150-200nm	Xing et al. (2014)
PHAs	CHCl ₃	0.45 to 3.14 μm	Volova et al. (2014)
poly(3-hydroxybutyrate)/nHA	CHCl ₃ /DMF	640 ± 80 nm	Ramier et al. (2014)

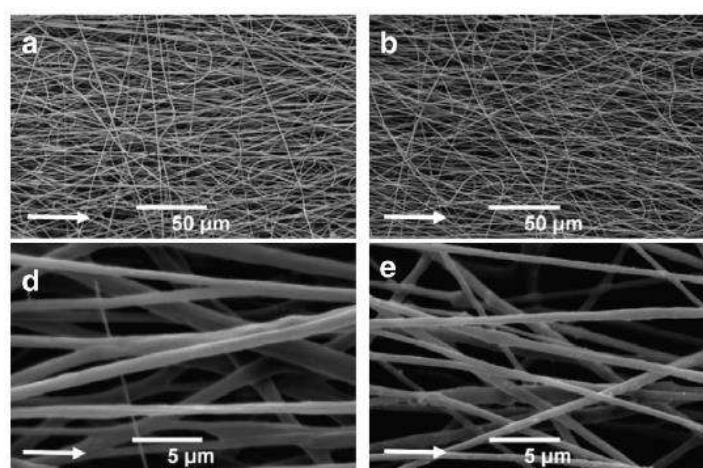


Figura 13. Micrografías de SEM para unas fibras obtenidas por electrospinning. PHB (a,d); mezcla de PHB/nHA (b,e).
Fuente: Ramier et al. (2014)

2 OBJETIVOS.

2.1. OBJETIVO GENERAL.

Extraer y caracterizar las propiedades fisicoquímicas de un polihidroxialcanoato, obtenido por medio de procesos de fermentación bacteriana, con la bacteria *Ralstonia eutropha* a partir de cáscaras de piña y yuca.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar las características fisicoquímicas de los residuos de yuca y piña y su potencial para la obtención de PHAs en procesos de fermentación bacteriana.
2. Evaluar el efecto de diferentes condiciones de fermentación sobre la producción de polihidroxialcanoato, de acuerdo al tipo de sustrato.
3. Establecer el efecto del tipo de sustrato y sus modificaciones sobre las propiedades estructurales de los biopolímeros obtenidos en el proceso de fermentación bacteriana.
4. Determinar algunas propiedades de fibras alineadas y aleatorias, obtenidas a partir de PHAs por medio de electrospinning

3 METODOLOGÍA.

Antes de describir cada uno de los pasos, se hará una breve descripción de todo el proceso metodológico. Inicialmente, se recolectaron los residuos de cascaras de piña y yuca para posteriormente caracterizarlos desde el punto de vista proximal y establecer que potencialidades podrían tener para ser aplicados en el desarrollo de procesos fermentativos en la obtención de PHAs. Con lo anterior se da cumplimiento al objetivo específico 1.

Una vez caracterizados los residuos de cascaras de piña y yuca se estableció un protocolo de hidrólisis ácida para poder desdoblar los diferentes carbohidratos en azúcares disponibles para la cepa a usar en el proceso fermentativo. Los hidrolizados obtenidos se caracterizaron desde el punto de vista de contenidos de azúcares tales como glucosa. La determinación del contenido de glucosa se usó para determinar las relaciones C/N, C/P las cuales fueron condiciones de fermentación. Para el proceso fermentativo, inicialmente se activó la bacteria *Rashtonia eutropha*, (se seleccionó esta cepa, porque de acuerdo a diferentes reportes de literatura es la que mayor PHAs puede producir con diferentes sustratos (Wang et al., 2007; Riedel et al., 2015), una vez activada se procedió a hacer las diferentes fermentación que conllevaran a determinar cuáles condiciones favorecían la producción de PHAs obtenidos a partir de residuos de cascaras de piña y yuca. En total se hicieron 9 fermentaciones para los hidrolizados de los residuos de cascaras de piña y 8 fermentaciones para los hidrolizados de los residuos de cascaras de yuca, cada fermentación tenía diferentes parámetros de tiempo de fermentación, relaciones C/N, C/P y pH. Cada condición de fermentación se hizo por triplicado, y los datos se analizaron mediante un diseño de experimentos libre al azar, tomando como único factor la condición de fermentación, la cual tuvo 8 y 9 niveles para los residuos de yuca y piña respectivamente y se tomó como variable respuesta la producción de biopolímero. De esta forma se dio cumplimiento al objetivo específico 2.

Posterior a realizar las fermentaciones, se estableció el protocolo de extracción del biopolímero, para posteriormente caracterizar el mismo por diferentes técnicas tales como FTIR, DSC, RMN, GC-MS, dando cumplimiento al objetivo específico 3. Por último y en busca de darle un potencial aplicación al biopolímero obtenido, se aplicó la técnica de electrospinning para obtener microfibras aleatorias y alineadas, con fines de aplicaciones en biomedicina; para lograr lo anterior se diluyó el PHA en diclorometano para luego someterlo a un diferencial de voltaje, las microfibras colectadas se caracterizaron mediante SEM y fotografías determinado su diámetro. Con esto se da cumplimiento al objetivo específico 4.

3.1 MATERIA PRIMA.

Los residuos de cascara, fueron obtenidos a partir de piña y yuca de descarte (originarias del Urabá Antioqueño) fueron adquiridas en la Plaza Minorista de Medellín (Antioquia). La cascara fue separada manualmente con cuchillo dejando aproximadamente 1 cm de pulpa. Seguidamente las cascaras se sometieron a un lavado, para eliminar la tierra y eliminar algunos trozos golpeados o afectados. Posteriormente las cascaras se cortaron en trozos más pequeños aproximadamente de 3 cm de lado y fueron sometidos a un proceso de molienda en una licuadora, hasta que se obtuvo una pasta homogénea. Finalmente, todo el producto molido, se almacenó en bolsas de polietileno a -20°C, para su posterior tratamiento. Las variedades de piña usada fue la oro miel, y la de yuca fue la conocida popularmente como piel de sapo.

3.1.1. ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MATERIA PRIMA.

El contenido de Humedad, Cenizas, Grasa, Nitrógeno Total y la Proteína Total con un factor de 6.25, fueron determinados según la (AOAC, 2005). Los carbohidratos totales se calcularon por diferencia y los minerales tales como Magnesio (Mg), Potasio (K), y Zinc (Zn), se determinaron por espectrometría de absorción atómica con llama, basados en la AOAC 985.35.

3.2 PROCESO DE FERMENTACIÓN.

A continuación se describirán los diferentes pasos para realizar las fermentaciones respectivas que conllevan a la acumulación del biopolímero en las células de la cepa *Ralstonia eutropha* (Se seleccionó esta cepa, debido a que de acuerdo a diversos estudios, es la cepa que mayor PHA, puede producir). Los pasos incluyeron la preparación de los sustratos (residuos de piña y yuca), determinación de los azúcares reductores de la muestra, preparación del inóculo, cálculos de fermentación, preparación del material para la fermentación y montaje de la fermentación. Se estudiaron 9 condiciones de fermentación para los residuos de cascara de piña y 8 para los residuos de cascara yuca (Tabla 16 y 17), las cuales fueron seleccionadas de un total de 64 fermentaciones diferentes para cada sustrato, sin embargo estos datos no se muestran debido a que hacen parte de un trabajo de maestría. Se seleccionaron las condiciones de fermentación que arrojaron la mayor producción de PHA.

3.2.1 Preparación del sustrato (residuos de yuca y piña).

La preparación del sustrato incluyó la hidrólisis ácida del material (el cual fue previamente, separado, lavado, picado, congelado y descongelado). Para realizar la hidrólisis se mantuvo una relación de 1 g de material por cada 5 ml de H₂SO₄ al 2%. Posteriormente, el material y la solución se introdujeron en un recipiente el cual se tapó con papel aluminio dejando un espacio de cabeza y se llevó a una autoclave; el proceso de autoclavado se realizó durante 70 minutos a 121°C y 15 PSI. Una vez terminado este proceso, se dejó enfriar y el pH se ajustó a 5 con lentejas de NaOH, el hidrolizado se llevó a almacenamiento a 4±0,5°C para evitar contaminación hasta su posterior utilización (Razaghi et al., 2016).

3.2.2 Determinación de Azúcares Reductores por HPLC.

Se cuantificó glucosa y fructuosa siguiendo la metodología propuesta por Zhang et al. (2005) con algunas modificaciones. El equipo usado fue un HPLC Agilent 1200 Series, con detector de índice de refracción y software ChemStation Rev.B.02.01. La columna cromatográfica usada fue una Supelcogel C-610H, como fase móvil se usó ácido sulfúrico 0.008N a un flujo de 0,6 mL/min, la temperatura del horno fue de 35°C, con un volumen de inyección de 20 µL. Los tiempos de retención para la glucosa y fructuosa fueron de 9.463 y 10.291 minutos, respectivamente. Se realizaron 4 repeticiones por punto.

3.2.3 Preparación del pre-inoculo y del inoculo.

Antes de iniciar el cálculo y los métodos de preparación del pre-inoculo y del inoculo, fue necesario definir el volumen de la fermentación ya que el volumen del inoculo fue el 10% del volumen final y el volumen del pre-inoculo fue el 10% del volumen del inoculo. Además se tuvo en cuenta que todas las preparaciones e inoculaciones se hicieran en una ambiente estéril e inocuo además de todo el material que se utilizó, así como el matraz de cada uno de las preparaciones debe fue de un volumen mayor al que contuvo (Barbosa et al. 2005).

Para la preparación del pre-inoculo se utilizó un caldo nutritivo (OXID®) y H₂O destilada, teniendo en cuenta la siguiente relacion: 13 g de caldo nutritivo se diluyeron en 1000ml de H₂O destilada (esta relación se determinó en funcion de lo recomendado por la casa comercial del caldo). Una vez se preparó el volumen requerido se agitó el sistema, se tapó con papel aluminioy se llevó a esterilizar a 121°C y 15 psi por 15 minutos; despues del proceso, se almacenó hasta su posterior utilización. Una vez este caldo esta a temperatura ambiente se procedió a la inoculacion de preinoculo, lo cual consistió en en sembrar el microorganismo en ambiente esteril, tras lo cual el matraz se tapó con papel aluminio e se incubó a 30°C y 200 rpm por 24 horas.

Seguidamente se preparó de nuevo caldo de cultivo, como se indicó con anterioridad y se tomó del pre-inoculo con una micropipeta (con punta esterilizada) un volumen correspondiente al 10% del volumen del inoculo, tras lo cual se tapó el matraz con papel aluminio y se incubó a 30°C y 200 rpm por 24 horas (Barbosa et al., 2005).

3.2.4 Condiciones Proceso de Fermentación.

En la Tabla 12 y 13, se muestran las condiciones de fermentación para los residuos de piña y yuca respectivamente. Estas condiciones fueron seleccionadas de un estudio previo, en el cual se realizaron 64 fermentaciones para cada tipo de hidrolizado, para esto se usó la metodología de superficie de respuesta con un diseño tipo Box-Benken, tomando cuatro factores: pH, tiempo de fermentación, C/N y C/P, tomando como variable respuesta la producción de PHAs en gr/L. Una vez hechas estas fermentaciones y de determinar la producción de biopolímero de cada una de estas se seleccionaron las condiciones de fermentación que arrojaron una producción mayor a 0.010 gr/L; sin embargo estos datos no se muestran ya que hicieron parte de otro trabajo de posgrado.

Tabla 12. Condiciones de fermentación para los residuos de Cascara de Piña

Ensayo	pH	C/N	C/P	Tiempo Fermentación (h).
1	6	3	6	12
2	8	9	2	12
3	7	1	4	30
4	8	9	6	12
5	7	6	1	30
6	9	6	4	30
7	6	9	6	48
8	6	3	2	12
9	9	11	6	60

Tabla 13. Condiciones de fermentación para los residuos de Cascara de yuca

Ensayo	pH	C/N	C/P	Tiempo Fermentación.
1	7	11	4	30
2	7	1	4	30
3	7	6	1	30
4	7	6	4	30
5	9	6	4	30
6	6	3	2	12
7	7	6	4	60
8	9	11	7	60

Antes de hacer el montaje de las fermentaciones, y con el inóculo ya preparado, se tuvieron que hacer unos ajustes al hidrolizado de cada sustrato, el primero de ellos fue ajustar el pH de cada hidrolizado, para ello se utilizaron diferentes concentraciones de NaOH hasta lograr el pH deseado. Por otro lado, para calcular las relaciones Carbono/Nitrógeno (C/N) y Carbono Fosforo (C/P), se tuvo en cuenta el contenido inicial de glucosa de cada hidrolizado, además del volumen final a fermentar. La fuente de nitrógeno utilizada fue el Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y como fuente de fósforo el Fosfato diácido de potasio KH_2PO_4 , ahora los cálculos se realizaron como sigue, para la fuente nitrógeno ecuación 5 y para la fuente de fósforo ecuación 6:

$$N = \frac{[G]}{[C/N]} \quad (5) \quad P = \frac{[G]}{[C/P]} \quad (6)$$

Donde N , es la cantidad en g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a usar según el volumen a fermentar; P es la cantidad en g/L de KH_2PO_4 a usar según el volumen a fermentar; $[G]$, concentración de glucosa presente en el hidrolizado del sustrato a fermentar; $[C/N]$ y $[C/P]$, relaciones Carbono/Nitrogeno y Carbono/Fosforo, que se requieren en cada etapa de fermentación.

Una vez realizados, estos calculos, se procedió a agregar cada sal al volumen a fermentar, y con el pH ajustado según cada condicion, se esterilizó (121°C por 15 minutos a 15 PSI) y una vez estuvieron a temperatura ambiente y en un medio esteril, se sembró el inculo y se llevó a fermentar cada condicion según el tiempo; las condiciones de agitacion y temperatura para todas las condiciones fueron 200 rpm y 30°C, respectivamente (Barbosa et al., 2005).

3.2.5 Centrifugación y Liofilización.

Una vez terminada la fermentación se llevaron a tubos falcón de 50ml y se dejaron en refrigeración a $4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 12 horas, posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 30 minutos, se descartó el sobrenadante y las muestras se llevaron a un ultra congelador a -80°C , tras lo cual se liofilizaron por 48 horas y almacenaron para su posterior uso (Cavalherio et al., 2009).

3.3 EXTRACCIÓN DEL BIOPOLÍMERO.

Para iniciar la extracción del biopolímeros, se pesó la muestra liofilizada en una balanza analítica, posteriormente se agregó a un Erlenmeyer y se adicionó cloroformo en exceso, en general por cada gramo de biomasa se deben agregar 100 mL de cloroformo, luego se tapó el erlenmeyer con papel aluminio para evitar la evaporación del cloroformo. Seguidamente se llevó a agitación a 250 rpm con una temperatura de 30°C por 12 horas. Terminado el proceso de extracción, la mezcla se sometió a un proceso de filtración en un papel Watman No.1, lo anterior para separar la biomasa agotada, del cloroformo que contiene disuelto el biopolímero a extraer. Después de haber filtrado, el cloroformo se llevó a rota evaporación, con una velocidad de 90-100 rpm, una presión de vacío de 479 mbar y una temperatura de 55°C . La rota evaporación finalizó cuando el volumen que quedó en el balón fue de aproximadamente 50mL; seguidamente el cloroformo se pasó a un erlenmeyer de 500 ml y se agregó etanol frio (el etanol debe estar aproximadamente a -20°C , doce horas antes), en una proporción de 4 veces al volumen de cloroformo, tras lo cual se agitó y llevó a refrigeración por 12 horas para precipitar el polímero. Luego, se sometió a un proceso de filtración a vacío con un papel filtro de 0.45 micras y el filtro se lleva a secado a una temperatura de 65°C , hasta peso constante; por último se raspa y se pesa el biopolímero obtenido, finalmente se almacenó en micro-viales hasta los análisis correspondientes (Ashby et al., 2004); (Cavalherio et al., 2009). En la Figura 14, se muestra un esquema general del proceso para extracción del biopolímero.

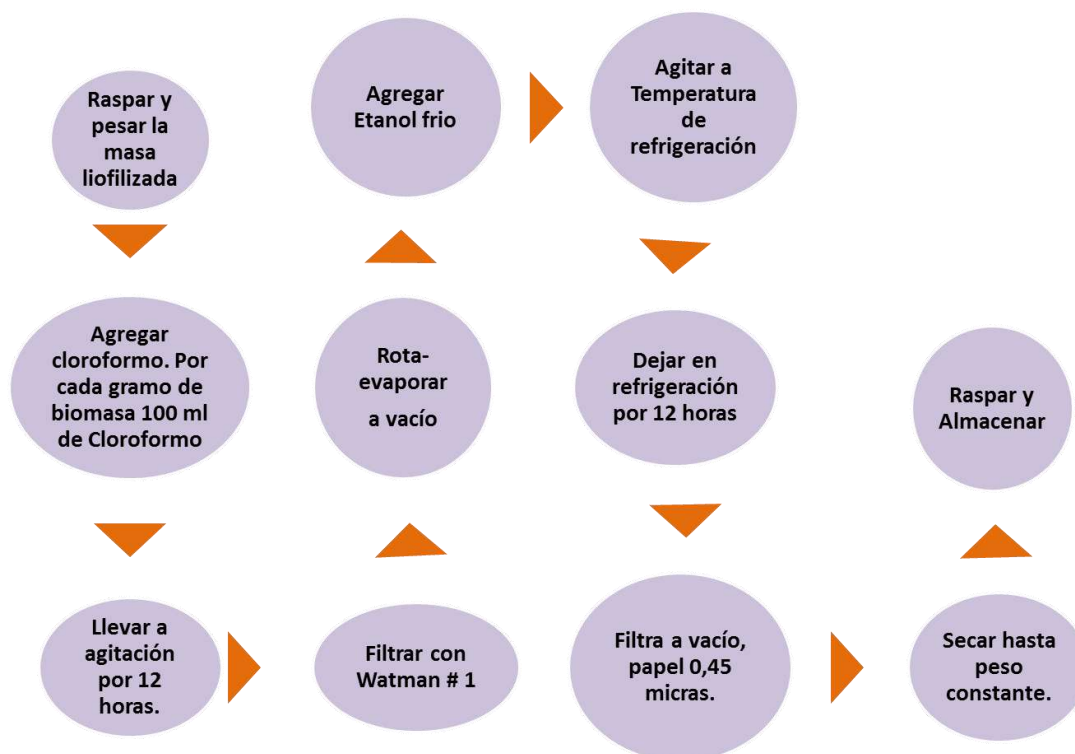


Figura 14 Esquema general del proceso de Extracción del biopolímero. Fuente: Ashby et al. 2004; Cavalherio et al., 2009.

3.4 CARACTERIZACIÓN DEL BIOPOLÍMERO.

3.4.1 Espectrofotometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).

Para la determinación de los grupos funcionales asociados a los PHAs, tales como O-H, C-H, C=O, C-O-C; se usó un equipo de Infrarrojo de Transformada de Fourier, Marca Perkín Elmer, Modelo Spectrumone, con un detector DTGS; la temperatura para cada ensayo fue de 22°C; en total se realizaron 16 barridos con una resolución de 4cm⁻¹; el rango de longitud de onda utilizado fue de (v) 4000-450 cm⁻¹. Para analizar la estructura del biopolímero se hicieron tabletas de KBR con una relación de 100mg KBR/1mg de muestra; para la elaboración de las pastillas el KBR estaba totalmente seco, en un mortero se realizó la mezcla de biopolímero y KBR, una vez hecha la mezcla, se formó la pastilla en una prensa usando una presión de 5 T. Una vez formada la pastilla se introdujo en la cámara del equipo y se procedió a hacer la lectura (Misra et al., 2000; Hong et al., 1999).

3.4.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Para la determinación de las temperaturas de transición de fase así como las entalpías del biopolímero, se utilizó un equipo Differential Scanning Calorimeters (DSC), marca TA Instruments, Modelo Q100. Para la realización de la prueba se utilizaron 3.4 mg de biopolímero, la prueba se realizó en capsulas de aluminio Standard. Así mismo, el análisis se realizó en una atmosfera de

nitrógeno tipo 4.5. El barrido térmico de la muestra se hizo a una velocidad de 20°C/min desde 25°C, bajando a -80°C, y se calentó nuevamente hasta 150°C y finalmente enfriando hasta -80°C; posteriormente el barrido de la muestra se realizó a una velocidad de calentamiento de 10°C/min desde -80°C hasta 200°C, modificando brevemente la metodología repostada por Chen et al. (2006).

3.4.3 Resonancia Magnética Nuclear RMN.

Para determinar el desplazamiento de protones asociados a los átomos de ^1H y ^{13}C , se usó un equipo Bruker Fourier con una frecuencia de 300 MHz y 75 MHz para el ^1H y ^{13}C , respectivamente. Las muestras de biopolímero fueron disueltas en cloroformo deuterado, posteriormente fueron llevadas al equipo para el análisis correspondiente. La solución utilizada fue de una relación de 7 mg biopolímero por 1 ml de cloroformo deuterado (Mishra et al., 2010).

3.4.4 Espectrofotometría de Gases-Masas (GCM).

Para determinar los tiempos de retención y las relaciones masa carga de los componentes estructurales del biopolímero, se usó un equipo GC QP2010 MS Shimadzu, además se utilizó una ultra-columna SH-Rxi-5Sil Ms (30 metros, 0.25 mm ID, 0.25 μm df); la temperatura del horno fue de 60°C, la temperatura de inyector 120°C y la temperatura del detector de 150°C. Previo al uso del equipo las muestras se sometieron a un proceso de metanolisis, se tomaron 7 mg de biopolímero y se disolvieron en cloroformo, un mililitro de la suspensión fue mezclado con 1 mL de solución de ácido metanólico (97mL de metanol, 3 mL de H_2SO_4 95–97% y 0.3 gramos de ácido hexanoico); luego la solución se llevó a un vortex por un minuto y la mezcla fue llevada a incubación durante 5 horas a 100°C en estufa hasta que se logró la hidrólisis del monómero. Una vez fría la muestra se agregó 1ml de solución de 60 g/L de Na_2CO_3 , para neutralizar la solución. Una vez formadas las dos fases, estas se llevaron a vortex por dos minutos, para favorecer la extracción de los grupos de ester de metil de la fase orgánica. Después, las muestras se centrifugaron a 4500 rpm por 5 minutos, posteriormente 400 μl de la fase orgánica fueron colectados y se mantuvieron a -20°C, hasta su análisis (Cavalherio et al., 2009).

3.5 OBTENCIÓN FIBRAS POR ELECTROSPINNING.

Inicialmente se preparó una solución del biopolímero en Diclorometano (DCM) al 4% en tubos falcón de 15 ml y se llevó a agitación hasta completa disolución. Una vez disuelto el polímero se pasó a una jeringa plástica y se llevó a un sistema de bombeo, el cual se ajustó entre 1 a 3 mL/hora, posteriormente se estableció una distancia entre 15 a 20 cm entre el plato colector (para las fibras aleatorizadas), platos paralelos (para la fibras lineales) y el capilar metálico. Una vez se terminó este montaje se conectaron los polos positivo y negativo a los platos colectores y al capilar metálico; posteriormente se inició el sistema de bombeo; teniendo en cuenta que la fuente de voltaje no se debe encender hasta verificar que no existen burbujas en el sistema de conducción, una vez se verificó lo anterior y que ya salen gotas de solución del polímero a través del capilar, el voltaje se varió entre 10 a 15 kV y se inició la colección de fibras, tanto aleatorias como lineales (Canadas et al., 2014).

3.5.1. Caracterización de las Fibras.

Para la caracterización de la fibras se analizaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM), el equipo utilizado fue un JEOL JSM 6490LV. Para realizar el análisis las muestras se colocaron en una fina capa de grafito y luego se sometieron a un baño con oro (Au), este procedimiento se realizó en un equipo DENTON VACUUM Desk IV, donde se llevaron las muestras al microscopio y se sometieron a alto vacío para obtener imágenes de alta resolución. Luego se sometieron a un segundo detector para evaluar la morfología y topografía de las muestras. Las fotografías se analizaron usando el software ImageJ (Canadas et al., 2014).

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis de la producción de biopolímero, se utilizó un diseño de experimentos libre al azar, tomando como único factor la condición de fermentación, para el caso de la piña se contó con 9 niveles y para el caso de los residuos de la yuca con 8; se tomó como variable respuesta la producción de polímero. Inicialmente los datos se analizaron mediante una tabla ANOVA con un nivel de significancia del 95%, una vez se estableció que existían diferencias significativas entre los diferentes niveles, se procedió a hacer un análisis de diferencia de medias, mediante una prueba de mínimas diferencias significativas por el método de Fisher con un alfa del 95%, para establecer entre que tratamientos existían diferencias significativas.

Para el análisis de las imágenes, se tomaron 50 mediciones aleatorias del diámetro de las fibras, y se analizaron mediante estadística descriptiva, a través de la construcción de histogramas, para determinar el diámetro promedio de las fibras, además de los diámetros de las burbujas (beads). También se lograron determinar diferentes frecuencias de diámetros, por medio de un análisis de estadística descriptiva. En ambos casos el paquete estadístico utilizado fue el StathGraphtics Versión XVI®.

4. RESULTADOS.

4.1 ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MATERIA PRIMA.

En la tabla 14 y 15 se muestran los resultados de los análisis realizados a los residuos agroindustriales (cascara) de la piña y yuca respectivamente. Con respecto a los valores mostrados en la tabla 14, se puede decir que valores similares de contenidos de proteínas para cascara de piña a los reportados en este estudio fueron encontrados por Dhanasekaran et al. (2011), quien determinó un contenido de 0.6% de proteína para cascara de piña.

Tabla 14. Análisis proximal de residuos de cascara de Piña

Parámetro	Valor	Unidades
Humedad	70.97±0.84	%m/m
Cenizas Totales	1.10±0.075	%m/m
Grasas	0.21±0.085	%m/m
Proteínas Totales (Nx6.25)	0.63±0.02	%m/m
Carbohidratos Totales	27.08	%m/m
Mg*	1.894±0.756	mg Mg /Kg
K*	26.096±0.446	mg K /Kg
Zn*	298.184±9.756	mg Zn/Kg

Por otro lado, Macagnan et al. (2015), evaluaron diferentes propiedades fisicoquímicas para cascara de manzana, naranja y maracuyá, encontrando valores para el contenido de grasas, proteínas y cenizas de 1.26 – 8.19, 4.89 – 6.98 y 1.26 – 6.04 respectivamente, valores superiores a los encontrados en la cascara de piña de este estudio. Es de resaltar que existe poca bibliografía acerca de valores de análisis proximal sobre cascara de piña, siendo los aquí mostrados un aporte a la literatura en cuanto a caracterización de residuos de este fruto.

Tabla 15. Análisis proximal de residuos de cascara de Yuca

Parámetro	Valor	Unidades
Humedad	78.05±0.1	%m/m
Cenizas Totales	1.24±0.07	%m/m
Grasas	0.08±0.02	%m/m
Proteínas Totales (Nx6.25)	0.88±0.04	%m/m
Carbohidratos Totales	19.75	%m/m
Mg*	1.902±0.013	mg Mg /Kg
K*	32.361±0.423	mg K /Kg
Zn*	509.276±0.016	mg Zn/Kg

Autores como Ki et al. (2013), determinaron el contenido de proteína y Cenizas en cascara de yuca cultivada en Indonesia, con fines de producción de energías renovables, encontrando valores de 1.2 y 2.3 % respectivamente, siendo estos valores ligeramente superiores a los reportados en la tabla 15; así mismo Moshi et al. (2015), reportan valores de contenido de proteína entre el 7.1 a 8.1% y de cenizas del 3.1 al 9% para diferentes tipo de cascara de yuca cultivadas en Tanzania, de

la variedad *Manihot glaziovii*, valores muy superiores a los encontrados en este estudio. Sudaryanto et al. (2006), encontraron contenidos de proteína y cenizas de 2.06 y 0.30%, respectivamente, en cascara de yuca cosechadas en Indonesia provenientes de la industria del almidón, valores superiores para proteína e inferiores para cenizas en comparación a los encontrados en el presente estudio. Por ultimo Aderemi y Nworgu (2007), analizaron el efecto que tenía en el tiempo la adición de *Aspergillus niger*, en el mejoramiento de algunos parámetros nutricionales de la cascara de yuca, en ese sentido reporta que el contenido inicial de proteína de la cascara de yuca fue de 5.35% y que el contenido inicial de potasio fue de 0.003 mg/kg, valores muy superiores en el caso de la proteína pero muy inferiores para el contenido de potasio, con respecto a la cascara analizada en este estudio (Tabla 15).

En general se puede decir que aunque algunos parámetros proximales encontrados en este trabajo, tanto para los residuos de cascara de piña y yuca, están en acuerdo con lo reportado por otros autores, es de notar que existen otros valores que están por encima o por debajo de los mismos; lo que puede ser debido a la variedad del producto y al lugar de procedencia, condiciones de cosecha, cultivo etc.; sin embargo muestran el potencial que tienen estos residuos para obtener productos de valor agregado.

4.2 PROCESO DE FERMENTACIÓN Y OBTENCIÓN DEL BIOPOLIMERO.

En la Figuras 15 y 16, se muestra el comportamiento de consumos de glucosa y de producción de polímero, para las condiciones de fermentación 9 y 8 de los residuos de cascara de piña y yuca respectivamente. Se seleccionaron estas condiciones, debido a que corresponden a las condiciones óptimas de producción, del total de las 128 fermentaciones hechas en un estudio previo, dichas condiciones fueron el resultado de un análisis por superficie de respuestas (datos no mostrados). Estos ensayos se hicieron por triplicado y cada ensayo se denominó con la letra E de ensayo.

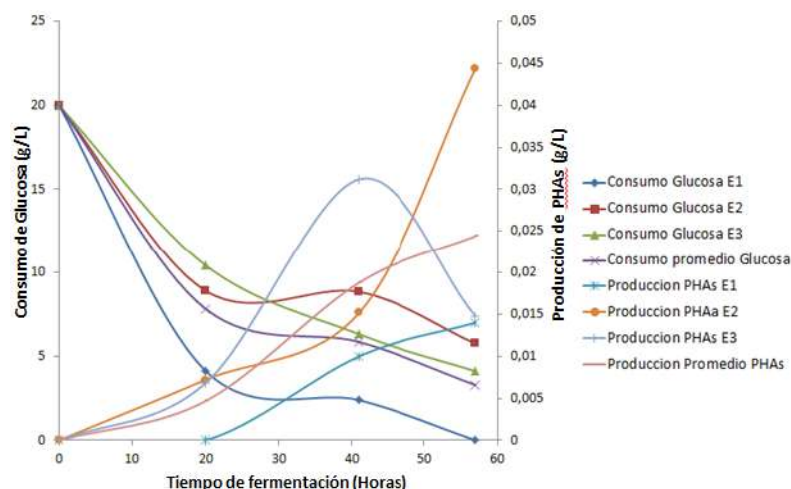


Figura 15. Consumo de glucosa y producción de PHAs, para la condición de fermentación 8 de los residuos de cascara de piña.

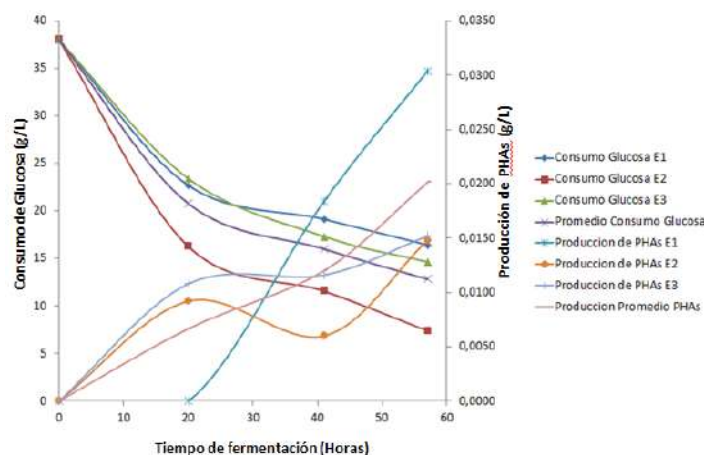


Figura 16. Consumo de glucosa y producción de PHAs, para la condición de fermentación 8 de los residuos de cascara de yuca.

Para el caso de la fermentación de los residuos de piña, la concentración inicial de glucosa fue de 20 g/L y en promedio después de 57 horas de fermentación la concentración final fue de 3.29g/L; en promedio la cepa de *Ralstonia eutropha*, consumió el 83.56% de la glucosa disponible. En tanto que la concentración de glucosa en la fermentación de residuos de yuca, pasó de 38 g/L a una concentración promedio final de 12.8 g/L, lo que corresponde a un consumo de glucosa del 66.25%, después de 57 horas de fermentación. Además se puede observar en las figuras 14 y 15, que durante las primeras 20 horas es donde se presenta el mayor consumo de glucosa, debido probablemente a que la bacteria está en su fase de crecimiento y por ende requiere de mayor consumo energético. En este sentido, diversos autores reportan el consumo de azúcares en la producción de PHAs, usando la *Ralstonia eutropha*, es así como Oh y Saratale (2015), reportan que dicha cepa consumió en promedio 70, 72, 68 y 84 % de los azúcares disponibles de unos residuos hidrolizados de cascarilla de girasol, soya, aserrín y cascarilla de arroz paddy en la producción de PHB, en un tiempo de fermentación que oscilo entre las 12 y 96 horas, estos porcentajes de consumo coinciden con los halladas en este estudio. Casella et al., (2010), reportan que para un periodo de 100 horas de fermentación, el consumo de glucosa por parte de la cepa *Cupriavidus necator* (= *Ralstonia eutropha*), fue del 100%, en tanto que para un periodo de 60 horas el consumo aproximado de glucosa fue del 62%, este último valor es aproximado al encontrado en esta investigación para consumo de glucosa por parte de la *Ralstonia eutropha* en los residuos de yuca en un tiempo de 57 horas. Con respecto al consumo de glucosa en la producción de PHAs, pero con otras bacterias, Anderson et al., (1990), determinaron que el consumo de glucosa, para producción de PHAs, usando diferentes fuentes de carbono fue del 93% aproximadamente en un tiempo de 8 horas de proceso, usando la cepa de *Pseudomonas* sp. Strain NCIMB 40135; Koller et al., (2005), reportan que la concentración de glucosa paso de 5 g/L a 1 g/L aproximadamente en 25 horas de fermentación, usando microorganismos altamente osmofílicos. Yezza et al., (2007), obtuvo un PHB a partir de la savia de arce, usando la cepa de *Alcaligenes latus*, dicha cepa consumió bajo condiciones controladas en un reactor en batch de 20 L, 4 g/L de glucosa en 9 horas

de fermentación. En general los consumos de glucosa, están en función del tipo de bacteria, tiempo de fermentación, medio de cultivo entre otros factores.

En las Tablas, 16 y 17 se muestran los valores de producción de biopolímero en gramos, además de la cantidad de polímero producido por cada 100 gramos de cascara fresca. Así mismo, se muestran las condiciones de fermentación (Tablas 12 y 13) para las cuales existieron o no diferencias significativas para la producción de PHA (letras iguales no existen diferencias significativas; letras diferentes existen diferencias significativas $p<0,05$). En la Tabla 16, se muestran los valores correspondientes a las fermentaciones de residuos de piña y en la Tabla 17, se muestran los valores correspondientes a las fermentaciones de residuos de yuca. Todos los ensayos por triplicado.

Tabla 16. Valores de producción de PHA, a partir de Residuos de Piña

Condición	Repetición	Biopolímero (gr/L)	grPHA/100grPiña	Promedio Polímero (gr/L)
1	1	0.0308	0.0154	0.029±0.002(a,b)
	2	0.0228	0.0114	
	3	0.034	0.017	
2	1	0.0344	0.0172	0.035±0.001 (b)
	2	0.038	0.019	
	3	0.034	0.017	
3	1	0.0436	0.0218	0.037±0.003 (b)
	2	0.028	0.014	
	3	0.0388	0.0194	
4	1	0.0348	0.0174	0.028±0.004 (a,b)
	2	0.0188	0.0094	
	3	0.0312	0.0156	
5	1	0.0264	0.0132	0.027±0.0005 (a,b)
	2	0.0264	0.0132	
	3	0.0284	0.0142	
6	1	0.026	0.013	0.025±0.002(a,b)
	2	0.0288	0.0144	
	3	0.0204	0.0102	
7	1	0.0108	0.0054	0.021±0.008(a,b)
	2	0.0412	0.0206	
	3	0.0112	0.0056	
8	1	0.0236	0.0118	0.019±0.002 (a)
	2	0.0128	0.0064	
	3	0.0196	0.0098	
9	1	0.0688	0.0344	0.087±0.008 (c)
	2	0.102	0.051	
	3	0.0904	0.0452	

En la Tabla 16, se puede observar que la condición que mayor producción de polímero arrojó fue la condición 9, la cual corresponde a un pH de 9, con relaciones de C/N y C/P de 11 y 6 respectivamente y un tiempo total de fermentación de 60 horas; se puede apreciar que la condición 9 de fermentación tiene diferencias significativas con las demás condiciones ($p < 0.05$); en promedio dicha condición logró una producción de 0.022 ± 0.008 gr/250ml, lo que equivale a 0.088 gr/L, aproximadamente; en tanto que las condiciones de fermentación 1,2,3,4,5,6,7 y 8 el promedio de producción de PHAs extraído osciló entre los 0.005 ± 0.002 gr/250ml a 0.009 ± 0.003 gr/250ml, siendo estos datos equivalentes a una producción de PHAs de 0.02 gr/L a 0.036 gr/L, aproximadamente.

Con respecto a la obtención de biopolímeros usando residuos agroindustriales de piña, Kaewkannetra et al., (2015), obtuvieron un biopolímero utilizando los residuos agroindustriales provenientes de la industria de los jugos de piña, por medio de la cepa *Bacillus* sp SV13, con unas condiciones de fermentación de 37°C y una agitación de 250 RPM con diferentes tasas de inyección de aire 0, 0.5, 1.5 y 2.5 vvm, obteniendo entre 0.1 a 0.6 gr de biopolímero/L de volumen de fermentación. Jaturapiree et al., (2014), reportan el uso de la cepa *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599, para la obtención de PHB, tomando como sustrato el jugo de la cascara de la piña, bajo unas condiciones de fermentación de 120 RPM, a 37°C durante 24 horas, el autor no reporta producción en gr/L, pero reporta que el contenido de polímero dentro de las células es del 1.2% aproximadamente. Es de destacar que al momento, no se encuentran reportes en la literatura sobre producción de polihidroxialcanoatos a partir de cascara de piña, lo cual le da una relevancia al presente trabajo, aportando a la valorización de la cadena agroindustrial de esta fruta, ya que con el aumento de la industria de procesamiento de esta fruta se tiene una aplicación de alto valor agregado para el aprovechamiento de los residuos de la misma.

En la tabla 17, se puede observar que la condición que mayor producción de polímero arrojó fueron las condiciones 1 y 8, la primera con condiciones de un pH de 7, con relaciones de C/N y C/P de 11 y 4 respectivamente y un tiempo total de fermentación de 30 horas, en tanto que las condiciones de la segunda son a un pH de 9, con relaciones de C/N y C/P de 11 y 7 respectivamente y 60 horas de tiempo total de fermentación. Así mismo, en la tabla 17, se puede apreciar que la condición 1 de fermentación tiene diferencias significativas con las demás condiciones ($p < 0.05$), excepto con la condición 8; en promedio dichas condiciones lograron una producción de 0.014 ± 0.002 gr/250ml, para la primera y para la condición 8 de 0.013 gr/250ml, lo que equivale a 0.056 gr/L y 0.052 gr/L, respectivamente; en tanto que las condiciones de fermentación 2,3,4,5,6, el promedio de producción de PHAs extraído osciló entre los 0.008 ± 0.002 gr/250ml a 0.010 ± 0.003 gr/250ml, siendo estos datos equivalentes a una producción de PHAs de 0.032 gr/L a 0.04 gr/L, aproximadamente. Como se puede observar, el pH alcalino tiene un influencia en los valores de producción del biopolímero, esto indica que entre más alcalino este el pH, mejor va a ser la acumulación de la bacteria; similar a lo reportado por Huang et al. (2016).

No existen reportes en la literatura sobre producción de PHAs a partir de cascara de yuca como sustrato. Sin embargo Natthaporn et al. (2014) lograron obtener un Polihidroxialcanoato (PHA) a

partir de almidón de yuca, usando la cepa *Cupriavidus sp.* KKU38 alcanzando producciones entre los 0.27gr/L a 2.81gr/L. Otros autores que usaron el almidón de yuca como sustrato fueron Nitinard et al. (2014), quienes obtuvieron un PHA, en una fermentación en batch, por medio de la cepa *Bacillus tequilensis* MSU 112, en función de las condiciones de aireación y de las demandas químicas de oxígeno los autores obtuvieron diferentes rendimientos de PHA, que varían aproximadamente entre 0.02 gr/L a los 3.3 gr/L. Finalmente, Cristhiane et al. (2012), usaron la diferentes cepas de *Bacillus* para obtener un PHA a partir de residuos de almidón de yuca, alcanzando producciones en función del tipo de cepa y de la concentración de residuo de almidón; en ese sentido para la cepa 075, 095, 262 y 265 con una concentración del 20% v/v de almidón, las producciones en gr/L fueron de 0.27; 1.07; 0.10 y 0.35 respectivamente; en tanto que para una concentración del 40% v/v de almidón, las producciones fueron de 1.02; 1.48; 0.19 y 0.52 gr/L, para las cepas 075, 095, 262 y 265, respectivamente. Finalmente Rojas et al. (2016), reporta una producción entre los 0.46 g/L a 0.62 g/L de biopolímero a partir de harina de yuca, usando la cepa *Ralstonia eutropa*.

Tabla 17. Valores de producción de PHA, a partir de Residuos de yuca

Condición	Repetición	Biopolímero (gr/L)	grPHA/100graYuca	Promedio Polímero (gr/L)
1	1	0.0516	0.0258	0.055±0.002 (c)
	2	0.064	0.032	
	3	0.0484	0.0242	
2	1	0.05	0.025	0.036±0.003 (a,b)
	2	0.0352	0.0176	
	3	0.0224	0.0112	
3	1	0.0404	0.0202	0.034±0.001 (a)
	2	0.0308	0.0154	
	3	0.0312	0.0156	
4	1	0.0316	0.0158	0.036±0.001(a,b)
	2	0.0428	0.0214	
	3	0.0332	0.0166	
5	1	0.0232	0.0116	0.031±0.002 (a)
	2	0.0288	0.0144	
	3	0.0416	0.0208	
6	1	0.0232	0.0116	0.04±0.003(a,b,c)
	2	0.042	0.021	
	3	0.0536	0.0268	
7	1	0.0272	0.0136	0.034±0.002 (a)
	2	0.0392	0.0196	
	3	0.0344	0.0172	
8	1	0.0492	0.0246	0.052±0.001 (b,c)
	2	0.0464	0.0232	
	3	0.0608	0.0304	

En general, los valores de producción de biopolímero expresados en gr/L, reportados en esta investigación, tanto para los residuos de piña y yuca, son mucho menores a los reportados para otros autores los cuales trabajaron con residuos de esta mismas materias primas; sin embargo las diferencias en producción se pueden deber a que en la presente investigación las condiciones de fermentación no fueron controladas en el tiempo, además solo se alimentó la cepa con el residuo, a diferencia de las otras investigaciones donde las cepas tuvieron suplemento de minerales y las condiciones de fermentación fueron controladas. Finalmente se puede agregar que el mayor consumo de glucosa y producción de polímero se dio en los residuos de piña (condición 9), debido a que el hidrolizado de este residuo tiene una menor concentración de este azúcar 20 g/L, con respecto al de hidrolizado yuca que tiene alrededor de 38g/L, pues según Khanna y Srivastava (2005), la *Ralstonia eutropha* puede disminuir su rendimiento cuando se encuentra en medios de concentraciones altas de glucosa, debido a que presumiblemente esta cepa está en la incapacidad de usar estos azúcares ya que contienen ciertos iones y minerales, que tienen un efecto perjudicial sobre el crecimiento microbiano y la síntesis de producto, además los residuos de piña tienen una mayor concentración de fructosa que los residuos de yuca, lo cual puede influir en la mayor producción de biopolímero, finalmente es posible que algunos compuesto tales como el los cianógenos, presentes en la yuca puedan ser inhibidores del crecimiento de la cepa.

En general las diferencias significativas mostradas en las tablas 16 y 17, se deben a dos causas, la primera de ellas a que las mayores producciones se lograron con mayores tiempos de fermentación, en especial la condición 9 para los residuos de Piña y la condición 8 para los residuos de yuca. La segunda causa, que generó una mayor producción fue que las relación C/N fuese la mayor, para este caso una relación de 11, lo que implica que el nitrógeno termine antes, mientras existe todavía C en el medio para la producción de polímero en lugar de para crecimiento celular. Lo cual se ve reflejado en la condición 9 para los residuos de piña y para los residuos de yuca en las condiciones de fermentación 1 y 8.

Con respecto a la producción de PHAs, usando la cepa de la *Ralstonia eutropha* con diferentes sustratos y condiciones de fermentación, se tienen diferentes estudios, Obruca et al., (2010), lograron producciones entre los 2.0 a 7.7 gr/L, usando la cepa *Cupriavidus necator*, en diferentes tipos de residuos de aceites tales como aceite de soya, de girasoles y residuos de aceites provenientes de restaurantes y comedores universitarios. Budde et al., (2011), lograron producir aproximadamente 8 gr/L de PHB, obtenidos a partir de la fermentación controlada de aceite de palma emulsificado con la bacteria *Ralstonia eutropha* en un tiempo total de 72 horas. Wong et al., (2012), produjeron PHAs usando como sustratos aceites de: palmiste, jatrofa, maíz y de coco, por medio de la cepa modificada de *Cupriavidus necator* Re2160/pCB113, logrando producciones de 3.8, 2.5 , 2.6 y 3.3 gr/L, respectivamente, además reportan que la producción de PHAs varía en el tiempo, por ejemplo para la fermentación del aceite de palmistes se lograron producciones de 1, 2, 1.6 y 1.8 gr/L a las 12, 24, 36 y 72 horas, respectivamente. Chen et al., (2003), usaron tres tasas de alimentación de una mezcla de ácidos orgánicos, para un sistema de fermentación, 1.2, 1.8 y 2.5 gr/h para la producción de PHAs usando la cepa *Ralstonia eutropha*. Las mayores producciones en gr/L de cada una de estas tasas fueron 2.5, 3.8 y 2.1 gr/L, respectivamente, en un tiempo de 42 horas para la primera tasa y 36 horas, para las restantes. Finalmente autores como

Riedel et al., (2015) y Tsuge et al., (2004), reportan producciones de PHAS de aproximadamente 30 gr/L y de 80 gr/L, respectivamente, usando cepas de *Ralstonia eutropha* H16, la cual ha sufrido algunas modificaciones genéticas, lo cual maximiza la producción de PHAs. Estos valores reportados con anterioridad son mayores a los obtenidos en este trabajo, tanto para los residuos de cascara de yuca y piña, debido a que se hicieron en reactores bajo condiciones controladas de pH, aireación, agitación temperatura, alimentación continua y caldos de sales nutritivas para la cepa. Sin embargo un estudio realizado por Khanna y Srivastava (2005), obtuvieron una producción de PHB de 0.0031 gr/L, para un proceso de fermentación no controlado en un volumen de 250ml, usando como sustrato glucosa y la cepa *Ralstonia eutropha*, este valor obtenido está más acorde con los valores obtenidos en este trabajo.

Por otro lado también existen reportes de producción de PHAs, usando otro tipos de cepas y sustratos; en ese sentido Díaz et al., (2015), reportan diferentes tasas de producción de un Poli-3-hidroxibutirato, en función de diferentes condiciones de fermentación, usando la cepa *Azotobacter vinilandii* y como sustrato el glicerol, logrando producciones de aproximadamente 5 gr/L en un tiempo de fermentación entre las 50 y 60 horas. Por otro lado Lee (1998), utilizó la cepa de *Escherichia coli*, para la producción de Poli-3-hidroxibutirato, a partir de Xilosa, alcanzando una producción del biopolímero entre los 0.05 gr/L a los 1.70 gr/L; sin embargo el autor logró mejorar la producción del mismo con el agregado de suplementos de nitrógeno, consiguiendo una producción de hasta 4.4 gr/L. Brandl et al., (1988), uso diferentes fuentes de carbono para la producción de PHAs, a partir de la cepa *Pseudomonas oleovorans*, consiguiendo una producción entre los 0.018 gr/L a 0.265 gr/L, esto usando como fuente de carbono el octanato; sin embargo no lograron producir biopolímero cuando usaron como sustrato octanol y no fue posible determinar la producción de biopolímero cuando el sustrato fue 1-Bromaoctano y octalamina al 10%.

Las producciones de PHAs obtenidas en este trabajo coinciden con algunas de las reportadas en la literatura, sin embargo son bastante más bajas en la mayoría de los casos, estas producciones tan bajas se pueden deber a diversas circunstancias como son: que la *Ralstonia eutropha* es una bacteria aeróbica (López-Cuellar et al., 2011) y en este estudio nunca se adicionó aire durante la fermentación, lo que pudo influir en el rendimiento de la cepa. Sin embargo existen algunos reportes donde se dice que la *Ralstonia eutropha* puede desarrollarse bajo ambientes anaeróbicos (Park et al., 2013; Cramm, 2009; Pohlmann et al., 2007). No se adicionó oxígeno, debido a que la fermentación se realizó en erlenmeyer de 250 ml donde se dificulta el control de entrada de oxígeno, y en esta investigación se pretendía explorar la producción de PHAs a partir de estos residuos, para a futuro llevarlo a un sistema controlado. Por otro lado el proceso nunca tuvo control de pH debido a que implicaba un alto riesgo de contaminación del proceso ya que el laboratorio donde se realizó la experimentación no es totalmente estéril, lo que podría favorecer la contaminación de los erlenmeyer y afectar el proceso fermentativo. Khanna y Srivastava (2005) encuentran que con el tiempo de fermentación el pH decrece, lo cual es debido a la posible formación de ácidos tales como el H_2SO_4 , consecuencia del consumo de los iones de amonio por parte de la bacteria. La presencia de ácidos es algo desfavorable para el desarrollo de la bacteria y

por ende para la producción del PHA. Por último es de resaltar que las producciones de biopolímero logradas en esta investigación se lograron solamente con el sustrato del residuo, es decir sin el agregado de diversos minerales ni suplementos alimenticios para la cepa, mostrando así que los residuos de yuca y piña son una fuente promisorio para la obtención de biopolímeros, lo que a futuro puede facilitar y disminuir costos de escalamientos.

Se puede decir que la producción de biopolímero, es afectada por el tipo de sustrato y cepa utilizada, además de que es de suma importancia tener las condiciones de fermentación constante y controlada en el tiempo. Sin embargo, con los resultados aquí obtenidos se muestra que los residuos de piña y yuca son una fuente promisorio para la producción de PHAs, debido a que se lograron obtener sin condiciones controladas y sin el agregado de suplementos de minerales. Es decir se logró la producción del biopolímero con los recursos propios de los residuos.

4.3 CARACTERIZACION DEL BIOPOLIMERO.

Se aclara que los PHAs aquí obtenidos, fueron comparados con un patrón comercial marca BIOMERK®.

4.3.1 ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).

En las Figuras 17 y 18, se muestran los diferentes espectros de infrarrojo, para los PHAs obtenidos para las diferentes condiciones de fermentación de los residuos de cascara de piña, en tanto que en las Figuras 19 y 20, se muestran los diferentes espectros de infrarrojo, para los PHAs obtenidos para las diferentes condiciones de fermentación de los residuos de cascara de yuca. Los espectros con cada señal identificada se pueden ver en el anexo 4.

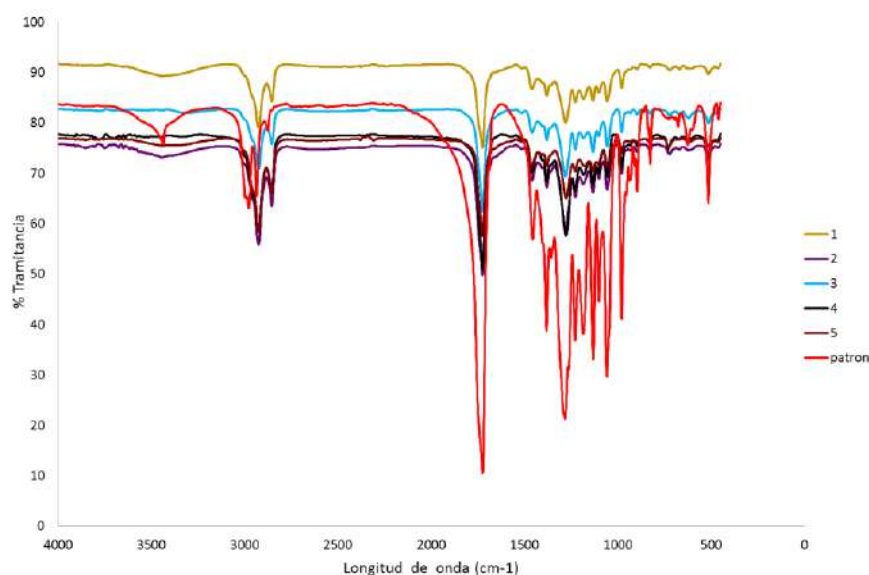


Figura 17 Espectros FTIR, para las condiciones de fermentación 1, 2, 3, 4, 5 de los residuos de cascara de piña y muestra patrón.

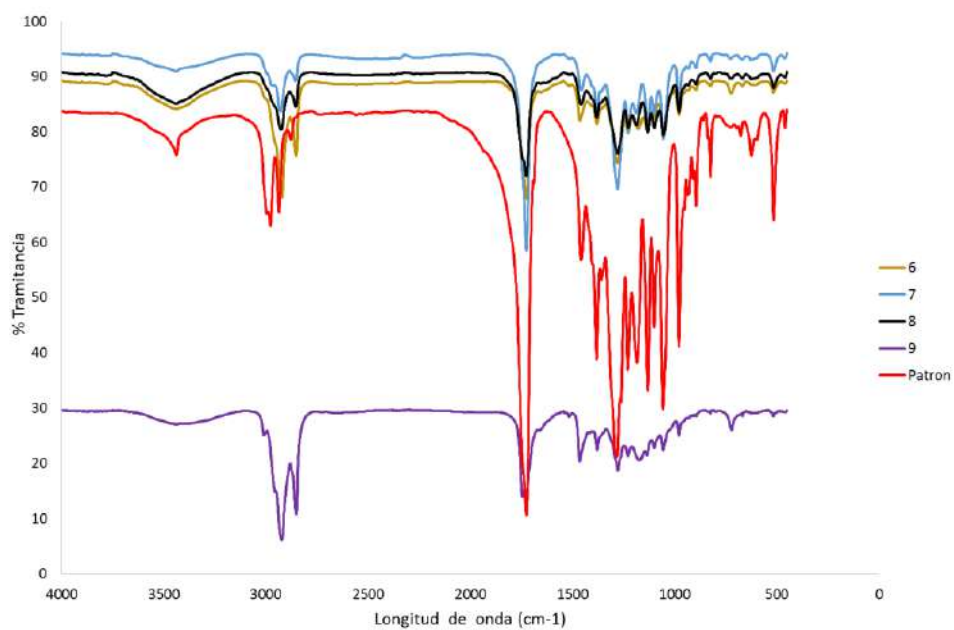


Figura 18 Espectros FTIR, para las condiciones de fermentación 6, 7, 8, de los residuos de cascara de piña y muestra patrón.

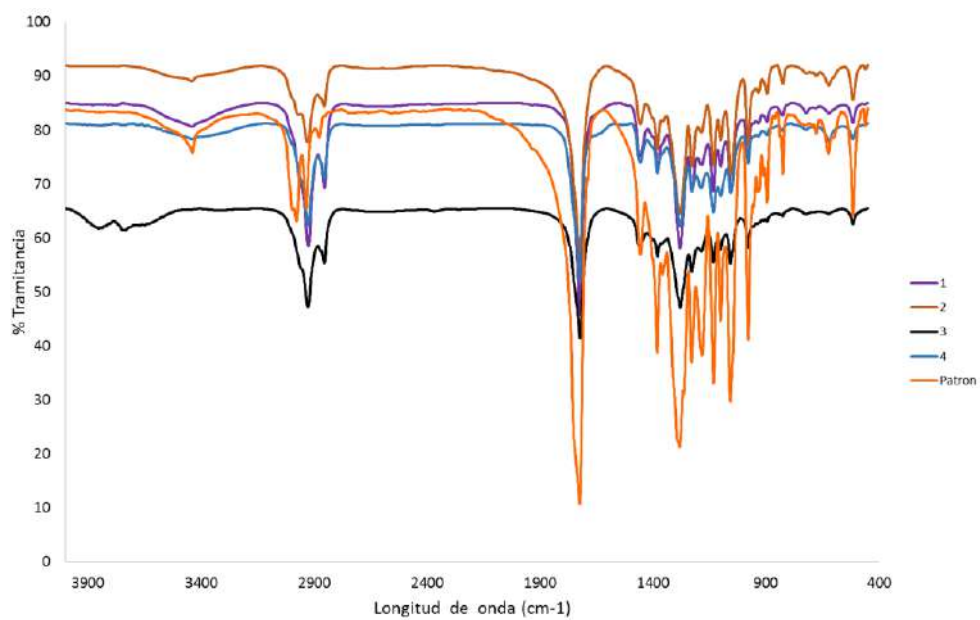


Figura 19 Espectros FTIR, para las condiciones de fermentación 6, 7, 8, 9 de los residuos de cascara de yuca y muestra patrón.

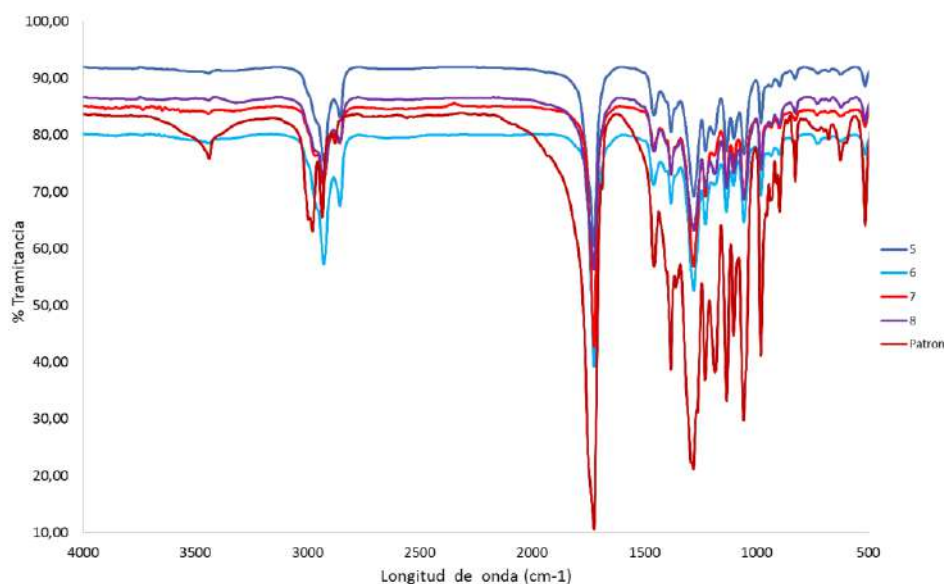


Figura 20. Espectros FTIR, para las condiciones de fermentación 6, 7 y 8 de los residuos de cascara de yuca y muestra patrón.

Con respecto a los espectros de los PHAs, mostrados en las figuras 17 - 20, se puede evidenciar que tanto los PHAs extraídos de los procesos de fermentación de los residuos de cascara de yuca y piña, estos mostraron comportamientos similares ya que ambos presentaron las bandas típicas (Tabla 18) que deben tener este tipo de estructuras de acuerdo a la literatura, es decir OH ($3200\text{-}3500\text{cm}^{-1}$) COC ($1185\text{-}1228\text{ cm}^{-1}$) (Wang et al., 2011), CH ($2922 - 2929\text{cm}^{-1}$), CO ($1000\text{-}1300\text{cm}^{-1}$) (Silverstein et al., 2005); C=O ($1600\text{-}1850\text{cm}^{-1}$) (Hong et al., 1999).

Tabla 18. Bandas de FTIR para los PHAs extraídos de los residuos de cascara de yuca y piña, y tipo de vibración según literatura.

Banda (cm^{-1})	Tipo de vibración	Fuente
3200-3500	Extensión O-H	Wang et al., (2011)
2922 – 2929	Extensión C-H metilénico (CH_2) del R	Silverstein et al., (2005)
1724	Extensión C=O de PHB	Hong et al., (1999)
1742 -1749	Extensión C=O de MCL PHA	Hong et al., (1999)
1452-1457	Flexión asimétrica C-H en grupos CH_2	Oliveira et al., (2007)
1379-1384	Flexión asimétrica C-H en grupos CH_3	Oliveira et al., (2007)
1279-1284	Flexión C=O en PHB (1277)	Oliveira et al., (2007)
1185-1187	Flexión asimétrica C-O-H	Wang et al., (2011)
1000 a 1300	Flexiones C-O asociadas al grupo ester	Silverstein et al., (2005)

Con respecto a las diferentes bandas obtenidas en esta investigación y que también son reportadas por otros autores, se tiene que la banda OH la cual está ubicada en entre los $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, también fue encontrada por Wang et al. (2011) en PHAs de índole industrial, así mismo Lim et al. (2003), encontraron el grupo OH en el espectro de los 3436 cm^{-1} para un PHB en polvo de la marca Aldrich Chemical, USA. Oliveira et al. (2007) y López-Cortes et al. (2010) también

reportan la extensión OH, para un PHB y un PHA obtenidos a partir de aceite de soya y de canola, respectivamente, reportando esta vibración en 3444 cm^{-1} y 3449 cm^{-1} , respectivamente para cada biopolímero.

En esta investigación la extensión del C-H, para los PHAs obtenidos de los residuos de yuca y piña se encontró entre los $2922\text{--}2929\text{ cm}^{-1}$, esta misma señal es reportada a una longitud de onda de 2928 cm^{-1} para un PHB y un PHA obtenidos a partir de fructuosa con *Ralstonia eutropha* ATCC 17697 (Barbosa et al., 2005), *Azotobacter vinelandii* UWD, *Pseudomonas mendocina* AS 1.2329 y *Pseudomonas pseudoalkaligenes* (Hong et al., 1999). Por último, Langlois et al. (2003) aseguran que la presencia del C-H está cercana a los 2900 para un Polihidroxialcanoato PHO obtenido a partir de la *Pseudomona sp.* Gol 105816.

Para la extensión 1724 cm^{-1} , la cual mostraron los PHAs, obtenidos en esta investigación y que le fue asignada una extensión del grupo C=O, también es reportada para PHAs obtenidos a partir de diferentes cepas y fuentes de carbono tales como: *Paracoccus seriniphilus* E71 (López-Cortes et al., 2010), *Wautersia eutropha* con aceite de canola como fuente de carbono (López-Cuellar et al., 2011), *Alcaligenes eutrophus* MTCC 1285, *Escherichia coli* DR40 y *Methylobacterium extorquens* MTCC 298 (Misra et al., 2000). Con respecto a la presencia de esta banda, Chen et al. (2006), explica que el PHA puede ser de carácter cristalino.

Otra banda típica de los PHAs, y que fue observada en los espectros de los biopolímeros obtenidos a partir de residuos de yuca y piña, es el espectro de bandas que está entre los $1742\text{--}1749\text{ cm}^{-1}$ y que es asignada al grupo C=O, esta es también reportada por Chen et al. (2006), para diversos PHAs obtenidos de cepas de *Ralstonia eutropha* PHB⁴, quienes reportan que corresponde a un grupo C=O y puede dar indicios de que el PHA puede contener un estado semicristalino. Thakor et al. (2005), también encontraron a una longitud de onda de 1743 cm^{-1} la presencia del grupo C=O para una MCL-PHA obtenido de la cepa *Comamonas testosteroni*, usando como fuente de carbono diferentes tipos de aceites vegetales. Otros autores también reportan la presencia del grupo C=O, pero en longitudes de onda que difieren a las encontradas en esta investigación; es así como Dominguez et al. (2015), encontró que el grupo C=O está ubicado entre las longitudes de onda de $1718\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$, debido a que es un biopolímero con alto componente cristalino. Así mismo Mc Naughten et al. (2000), expresan que el grupo C=O, debe estar exactamente en la vibración 1735 , pero que su posición puede variar en función de la cristalinidad del polímero.

En cuanto a las flexiones asimétricas encontradas para los grupos CH_2 y CH_3 , las cuales se encuentran entre los $1452\text{--}1457\text{ cm}^{-1}$ y $1379\text{--}1384\text{ cm}^{-1}$ respectivamente, las cuales son reportadas para PHAs, también fueron halladas en los PHAs extraídos en la presente investigación, dichas flexiones son también reportadas por Oliveira et al. (2007) y Gáscue et al. (2000), este último trabajo con un PHB obtenido en una industria de caña azucarera. Así mismo, Mc Naughten et al. (2000), afirman que estas flexiones corresponden a los PHBs. Finalmente, estas flexiones también fueron encontradas en estudios a nivel celular por Manfait et al. (1994).

En esta investigación se encontró una flexión del grupo C=O entre los $1279\text{--}1284\text{ cm}^{-1}$, en ese sentido Oliveira et al., (2007) también encontró que en la extensión 1277 existe una flexión del

grupo C=O, para PHAs obtenidos a partir de residuos de melazas y de tortas de soya, por procesos de fermentación en estado sólido, usando la bacteria *Cupriavidus necator*.

Los PHAs obtenidos a partir de los residuos de yuca y piña, mostraron en sus espectros de FTIR flexiones asimétricas asociadas al grupo C-O-C, las cuales están ubicadas entre los 1226-1228 cm^{-1} y los 1185-1187 cm^{-1} ; flexiones también reportadas por Martínez et al.(2013), quienes explican que a una menor intensidad de esta banda (1185 cm^{-1}), la cristalinidad del material aumenta, por lo que el hecho de que esta banda este en los diferentes espectros indica que las condiciones de fermentación pueden incidir en la cristalinidad del PHA obtenido; así mismo Langlois et al. (2003), reporta la presencia de las flexiones asimétricas del grupo C-O-C en los 1185 cm^{-1} , para un PHB extraído en procesos de fermentación con la cepa B. cepacia LMG 122.

Por último, en el presente trabajo se encontró la flexión C-O asociada al grupo ester, en el rango de 1000 a 1300 cm^{-1} , esta flexión también es encontrada por Tripathi et al. (2013), quienes la reportan para un PHB obtenido de la cepa *Alcaligenes* sp, utilizando como sustratos la melaza de caña y como fuente de nitrógeno urea. Esta vibración también es reportada por Silverstein et al. (2005).

Se puede decir que los espectros de los PHAs obtenidos a partir de los residuos agroindustriales de yuca y piña a través de procesos de fermentación con la cepa *Ralstonia eutropha*, muestran los grupos funcionales típicos para un PHA, los cuales están en las longitudes de ondas reportadas en otros estudios para diversos PHAs extraídos con diferentes cepas y sustratos; lo que muestra que los residuos de yuca y piña cuando son sometidos a procesos de fermentación con la cepa *Ralstonia eutropha*, pueden ser usados para producir PHAs con grupos estructurales similares a los de otros PHAs y PHB de tipo industrial, siendo una alternativa viable para la producción de nuevos materiales y como solución al problema ambiental que están generando. Sin embargo las diferentes condiciones de fermentación si pueden tener una influencia en la cristalinidad de los PHAs obtenidos para ambos tipos de residuos, ya que de acuerdo a los resultados aquí obtenidos las bandas de 1724 cm^{-1} (Extensión C=O de PHB), 1742 -1749 cm^{-1} (Extensión C=O de MCL PHA) y la de 1185 cm^{-1} (Flexión asimétrica C-O-C), pueden dar un indicio de que el polímero aquí obtenido no es completamente cristalino, pudiendo contener fases amorfas, lo que puede llegar a pensar en la formación de diferentes cadenas poliméricas, sin embargo no es posible concluir en esta sección, ya que se requiere de análisis de RMN y DSC para comprobar esta hipótesis inicial. Sin embargo la posible presencia de fases amorfas, podría influir en que el PHA obtenido sea más flexible y pueda facilitar su aplicación en diversas áreas.

4.3.2 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).

En las Figuras 21 y 22 se pueden observar los diferentes termogramas obtenidos por DSC, para los PHAs extraídos de los residuos de piña; así mismo en las Figuras 23 y 24 se pueden ver los diferentes termogramas obtenidos por DSC, para los PHAs extraídos de los residuos de yuca, además en las figuras 21, 22, 23 y 24 se puede apreciar el comportamiento térmico de un PHB patrón.

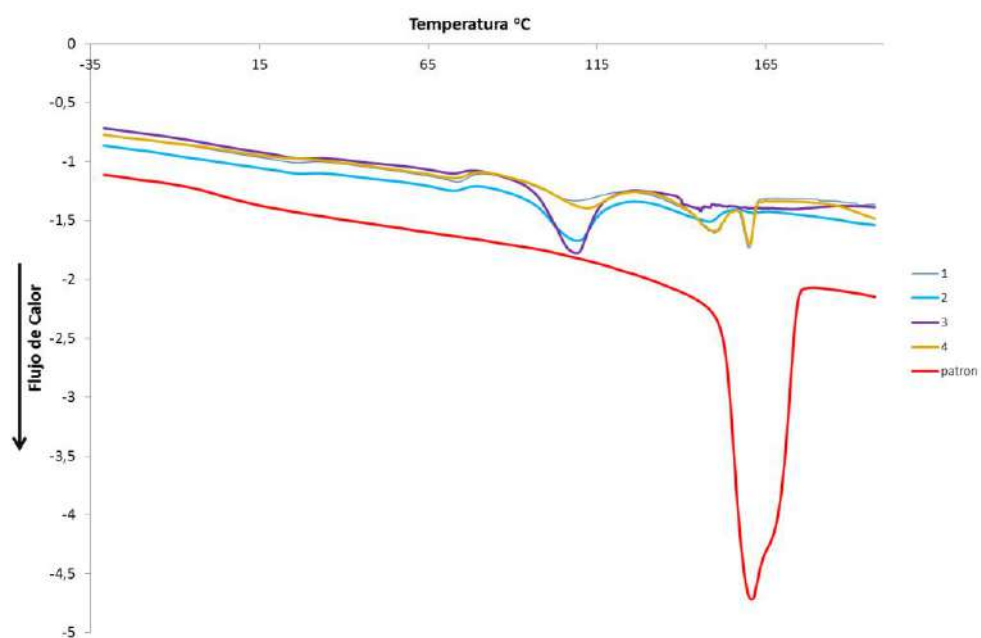


Figura 21. Termo-gramas obtenidos por DSC, para las condiciones de fermentación 1, 2, 3, 4 de los residuos de cascara de piña y muestra patrón.

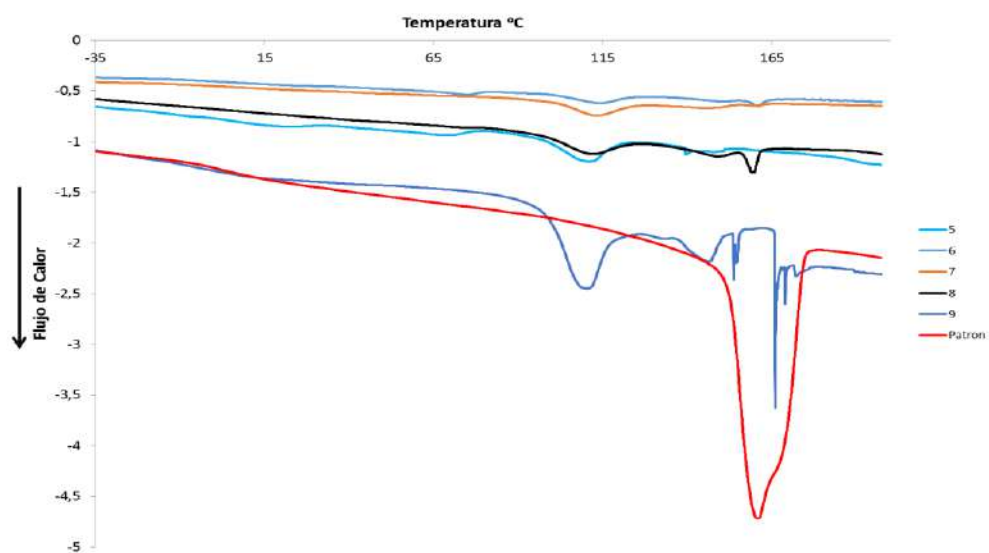


Figura 22. Termo-gramas obtenidos por DSC, para las condiciones de fermentación 5, 6, 7, 8, 9 de los residuos de cascara de piña y muestra patrón.

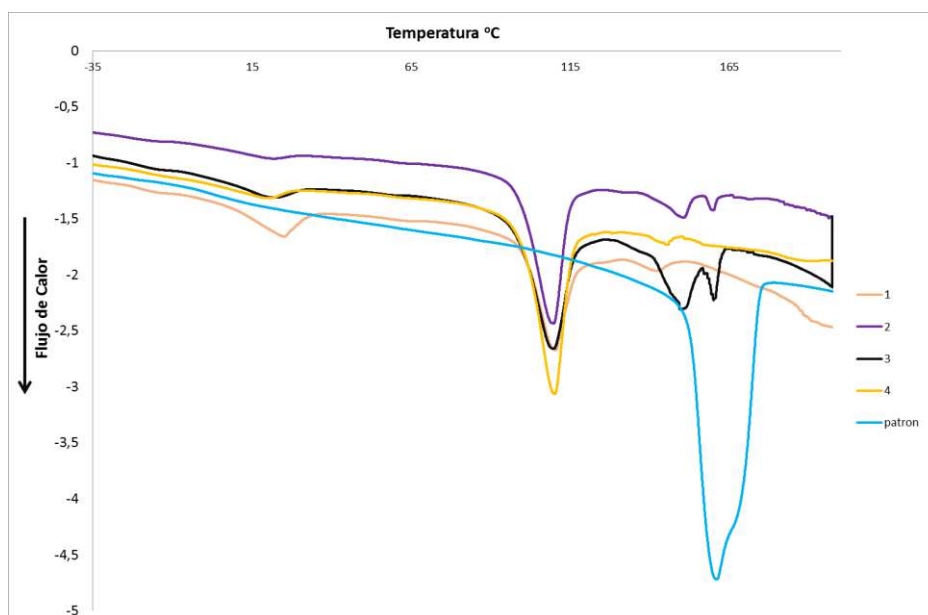


Figura 23. Termo-gramas obtenidos por DSC, para las condiciones de fermentación 1, 2, 3, 4 de los residuos de cascara de yuca y muestra patrón.

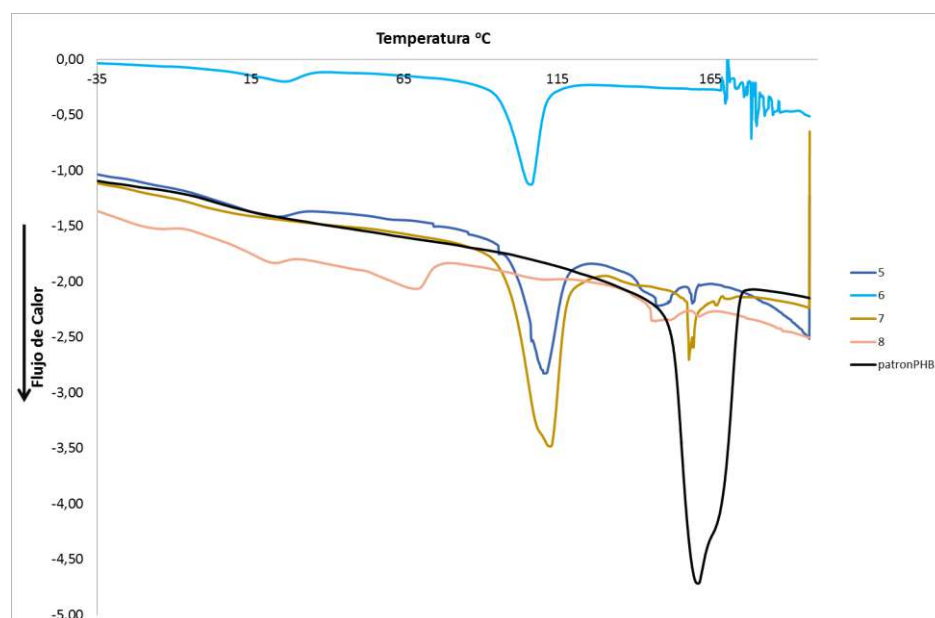


Figura 24. Termo-gramas obtenidos por DSC, para las condiciones de fermentación 5, 6, 7, 8 de los residuos de cascara de yuca y muestra patrón.

Por otro lado en las Tablas 19 y 20 se muestran las diferentes temperaturas de fusión obtenidas para los PHAs, extraídos de los residuos agroindustriales de piña y yuca, respectivamente, además de la temperatura de fusión de la muestra patrón.

Tabla 19. Temperaturas de Fusión (T_m), y Temperatura de transición vítrea (T_g) para los PHAs obtenidos de cascara de Piña y PHB patrón.

Muestra PHAs	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	T_{m3} (°C)	T_g (°C)
1	73.28	106.03	149.40	-23.16
2	71.41	108.71	147.70	-31.23
3	71.49	107.90	-----	-37.81
4	109.86	148.50	-----	-43.44
5	15.72	109.55	-----	-48.03
6	74.72	113.30	149.48	-40.06
7	112.22	146.41	-----	-32.13
8	109.84	148.02	-----	-32.38
9	108.22	146.49	-----	-31.67
PHB PATRON	160,83	-----	-----	2.47

Tabla 20. Temperaturas de Fusión (T_m), y Temperatura de transición vítrea (T_g) para los PHAs obtenidos de cascara de yuca y PHB patrón.

Muestra PHAs	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	T_{m3} (°C)	T_g (°C)
1	24.38	109.34	141.90	-19.33
2	18.25	109.02	150.36	-19.70
3	19.09	108.83	149.34	-19.49
4	19.22	109.67	-----	-19.52
5	19.06	100.49	147.31	-21.71
6	25.23	106.15	-----	-20.47
7	111.87	-----	-----	-21.97
8	18.32	69.48	-----	-24.19
PHB PATRON	160,83	-----	-----	2.47

Con respecto a los análisis de DSC, se puede decir que tanto los termogramas obtenidos para los PHAs de piña y yuca (figuras 21, 22, 23 y 24) mostraron un comportamiento similar entre las diferentes condiciones de fermentación; en general las muestras presentan más de una temperatura de fusión claramente observable, lo anterior debido posiblemente a la presencia de diferentes longitudes de cadena en la muestra. En tanto que la muestra patrón mostró solo un punto de temperatura de fusión con un valor de 160.83°C. La presencia de dos o más temperaturas de fusión o de transición vítrea implica que el PHA está conformado por al menos dos tipos de cadenas poliméricas, Srien y Kelley (1999).

De acuerdo a los datos mostrados en la Tablas 19 y 20 y con base a los termogramas, es posible ver que las PHAs obtenidos a partir de los residuos de piña y yuca, tienen tres puntos de temperatura de fusión: T_{m1} (71.41 – 109.86), la T_{m2} (106.03-148.50) y la T_{m3} (147.70 -149.48), (tabla 19); en tanto que las T_m para los biopolímeros extraídos de los residuos de cascara de yuca las temperaturas de fusión variaron para T_{m1} (18.25 – 111.87), la T_{m2} (69.48-109.67) y la T_{m3} (141.90 - 150.36); en ambos casos las temperaturas de fusión de los PHAs, obtenidos en esta investigación estuvieron por debajo de la T_m medida para el PHB patrón. Con respecto a la T_g esta osciló entre los

-48 a -32°C, para los PHAs obtenidos de los residuos de piña, en tanto que la T_g para los PHAs extraídos de los residuos de yuca variaron entre los -24 a -19°C, estas T_g claramente menores a las del PHB comercial, la cual fue de aproximadamente 2.47°C; estos valores son lógicos ya que a menores temperaturas de fusión la temperatura de transición vítrea se desplaza hacia la izquierda, indicando un posible menor grado de cristalinidad del PHAs obtenido en esta investigación, lo cual se relaciona con lo reportado por Dominguez et al. (2015).

Algunos estudios reportan T_m superiores, a los reportados en este estudio, es así como Oh y Saratale (2015), reportan una T_m aproximadamente de 172°C, para diferentes PHBs, obtenidos de sustratos como cascarilla de girasol, soya, aserrín y cascarilla de arroz paddy, los cuales fueron sometidos previamente a un tratamiento alcalino e hidrólisis enzimática, lo anterior con *Ralstonia eutropha*. Oliveira et al. (2007), caracterizaron por DSC un PHB extraído a partir de la fermentación de la melaza con torta de soya, usando la cepa *Cupriavidus necator* (también se clasifica como *Ralstonia eutropha*), encontrando que la T_m fue de 170°C, sin embargo la forma de fermentación fue por estado sólido. Sin embargo, Chen et al. (2007), con *Ralstonia eutropha* y en diferentes tipos de medios de cultivos obtuvieron PHAs, tales como 3-hidroxibutirato, el 3-hydroxi octanoato, 3-hydroxidecanoato entre otros, obteniendo diversos valores de T_m que oscilaron entre los 134°C a 151°C, rangos en los cuales se encuentra las T_{m3} , obtenidas para los PHAs extraídos de los residuos de yuca; en tanto que en este rango de T_m obtenidos por Chen et al. (2007), son similares a las T_{m2} de las condiciones de fermentación 7, 8 y 9 y las T_{m3} de las condiciones de fermentación 1, 2 y 6 de los PHAs obtenidos de los residuos de piña.

Otros reportes de temperaturas de fusión, para PHAs, obtenidos con otras cepas diferentes a la *Ralstonia eutropha*, Dominguez et al. (2015), quienes extrajeron diferentes tipos de PHBs con numerosas cepas de *Azotobacter vinelandii*, obteniendo T_{ms} que varían alrededor de 151-178°C, siendo el valor inferior aproximado a los obtenidos en la T_{m3} de la condición 1 y 6 de fermentación para los PHAs extraídos de las cascaras de piña; así mismo este valor es similar al de la T_{m3} de la condición de fermentación 2 y 3 para los residuos de yuca. Otros valores de caracterización térmica de PHAs, los da Ashby et al. (2002), quienes a través de la cepa *Pseudomonas oleovorans* y con sustratos como glucosa, ácido nonaico, ácido oleico y ácido octanoico, obtuvieron varias clases de copolímeros de cadena media-larga, arrojando T_{ms} entre los 161-178°C; valores superiores a los reportados en este trabajo; sin embargo al separar los PHAs, las temperaturas de fusión de los PHAs asociados a la glucosa y ácido octanoico fueron bastante menores, alrededor de 40°C, lo que puede sugerir que estos sustratos pueden influir en la formación de PHAs de cadena media, por ende con menor T_m , haciendo que el PHA tenga propiedades más elásticas. Matsusaki et al. (2000), con diferentes sustratos como glucosa y ácidos dodecanoicos y con cepas recombinadas de *Pseudomonas* sp 61-3, obtuvieron 22 tipos de PHAs, los valores arrojados por los DSC para las T_m de los biopolímeros obtenidos por estos autores, oscilaron en el rango de 42-146°C; estos valores son similares a las T_m obtenidas para los PHAs de residuos de piña, en específico a las T_{m1} de las condiciones de fermentación 1, 2, 3, 4, 6 y 8; otros copolímeros obtenidos por estos autores, están en acuerdo con las T_{m2} de las condiciones de fermentación 7 y 9, de los PHAs extraídos de los residuos de piña; así mismo los valores reportados por Matsusaki et al. (2000) son similares a los

valores de las T_{m2} de los PHAs obtenidos de los residuos de cascaras de yuca. Otros valores de T_m , similares a los obtenidos en esta investigación, son dados por López-Cuellar et al. (2011), quienes a partir de aceite de canola y la cepa de *Wautersia eutropha*, generaron un PHA de cadena media con una T_m de 133°C. Simon-Colin et al. (2012), a partir de la cepa *Pseudomonas guezenei*, obtuvieron diferentes tipos de PHAs, variando las fuentes de carbono entre glucosa, ocatanato de sodio y el ácido 10-undecenoico, en general las temperaturas de fusión estuvieron en el intervalo de los 46-55°C, sugiriendo que el biopolímero obtenido es de carácter semi-cristalino. Finalmente, Langlois et al. (2003), lograron obtener un PHO usando como sustrato octanato de sodio, con las cepas: *Pseudomonas* Sp Gpo1 105816, *Pseudomonas aureofaciens* LM1245, *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50083, *Pseudomonas fluorescens* DSM 50415, con T_{ms} de 50.2, 50, 52 y 40°C, respectivamente. Finalmente, Martínez et al. (2013), mezclaron un PHB con diferentes porcentajes de hidroxivalerato (HV), encontrando dos temperaturas de fusión, asociadas a las diferentes cadenas presentes en cada biopolímero, ellos reportan que a medida que hay más presencia de HV, las temperaturas y entalpías de fusión del biopolímero decrece, en ese sentido los valores de T_m hallados por estos autores están en el intervalo de los 56.8 a 142.06°C; valores más acordes con los reportados en esta investigación, lo que nos puede indicar que en el proceso de fermentación y extracción se pudo formar un copolímero entre PHB y PHV.

Varios autores reportan T_g para PHAs; es así como Ashby et al. (2002), utilizando la cepa *Pseudomonas oleovorans* y con sustratos como glucosa, ácido nonaico, ácido oleico entre otros obtuvieron varias clases de copolímeros de cadena media-larga, arrojando T_g entre 3 y 4°C; valores superiores a los reportados en este trabajo; sin embargo al separar algunos PHAs con acetona, la T_g de los PHAs asociados al ácido oleico y ocatotanoico fueron bastante menores, alrededor de -53°C, lo que puede sugerir que estos sustratos pueden influir en la formación de PHAs con menores puntos de fusión y por ende con menor T_g , haciendo que el PHA tenga propiedades más elásticas, siendo esto último acorde a lo encontrado en esta investigación. Por otro lado, Oh y Saratale (2015), extrajeron PHBs a partir de residuos de cascarilla de girasol, soya, aserrín entre otros reportando valores de T_g alrededor de 10°C usando la cepa *Ralstonia eutropa*, siendo este valor superior al reportado en este trabajo. Oliveira et al. (2007), caracterizaron por DSC un PHB extraído a partir de la fermentación de la melaza con torta de soya, usando la cepa *Cupriavidus necator* (también se clasifica como *Ralstonia eutropa*), encontrando que las T_g oscilaron entre -0.3 y -0.2, relacionando este valor con una alta cristalinidad del PHB. Lo anterior podría sugerir que el PHA extraído en esta investigación tenga propiedades amorfas y con menores grados de cristalinidad dadas las T_g obtenidas. Valores similares de T_g a los hallados en este trabajo fueron encontrados por Simon-Colin et al. (2012), quienes a partir de la cepa *Pseudomonas guezenei* obtuvieron diferentes tipos de PHAs, variando las fuentes de carbono entre glucosa, ocatanato de sodio y el ácido 10-undecenoico; en general las T_g estuvieron en el intervalo de los -50 a -39°C, siendo correspondientes con las T_g encontradas para los PHAs extraído de los residuos de piña sugiriendo que el biopolímero obtenido es de carácter semi-cristalino y con características elastoméricas. Así mismo, Chen et al. (2007), reportan valores de T_g de -24°C, para un PHB obtenido con la cepa *Ralstonia eutropa*, dichos autores sugieren que este valor corresponde a un polímero con características amorfas; lo anterior podría indicar que los PHAs extraídos de los

residuos de yuca, también tendrían estas características ya que las T_g reportadas en la tabla 20 son aproximadas a lo reportado por este autor.

Se podría decir que en general los PHAs aquí obtenidos tanto por los procesos de fermentación de los residuos de piña y yuca, muestran claramente diferentes temperaturas de fusión. Estas diferentes temperaturas de fusión se pudieron haber formado debido a diferentes factores, el primero de ellos, es que una vez fueron hirrolizados los residuos de cascara de piña y yuca probablemente se generaron algunos subproductos tales como ácidos orgánicos de cadena corta con un número impar de carbonos) (Razaghi et al., 2016), los que al ser consumidos por la bacteria y en presencia de glucosa pudieron dar lugar a la formación de diferentes cadenas poliméricas y en específico formaron el monómero 3HV (Keasling et al., 2002); como segundo aspecto se tiene el tiempo de fermentación también pudo influir en los diferentes puntos de fusión de cada cadena, ya que según el tiempo de fermentación puede haber mayor o menor consumo de sustrato o inclusive del mismo biopolímero por parte de la cepa, lo que también puede incidir en las propiedades de biopolímero. Por otro lado, al ser temperaturas de fusión menores a los de los PHB comerciales, da a entender que el polímero podría tener comportamientos cristalinos y amorfos, siendo estas características asociadas a la presencia de un PHB y PHV, respectivamente; lo anterior a que con la presencia del PHV, las temperaturas de fusión disminuyen. Esta hipótesis se podría reforzar con el hecho de que las T_g tienen valores desplazados hacia la izquierda lo cual sugiere que tanto el PHA obtenido de los residuos de piña y yuca tiene características amorfas y elastoméricas. Lo dicho antes, es una gran ventaja ya que en general los PHBs son quebradizos y frágiles, y si lo que se obtiene es un copolímero PHBHV, este es un material más flexible lo cual abre la puerta a buscar aplicaciones en el campo de biomedicina y empaques. Sin embargo para poder determinar la cristalinidad del polímero es necesario analizar las entalpías de fusión, y se requieren además análisis de GCM y RMN, para verificar la presencia del PHB y PHV.

En las Tablas 21 y 22 se muestran las diferentes entalpías de fusión obtenidas para los PHAs, extraídos de los residuos agroindustriales de piña y yuca respectivamente; además de la entalpía de fusión de la muestra patrón.

Tabla 21. Entalpías (ΔH) de Fusión, para los PHAs obtenidos de los residuos de cascara de Piña y PHB Patrón.

Muestra PHAs	ΔH_1 (J/g)	ΔH_2 (J/g)	ΔH_3 (J/g)
1	2.46	4.88	5.36
2	1.34	13.85	3.79
3	0.61	17.70	-----
4	6.64	4.35	-----
5	1.14	8.36	-----
6	2.14	7.76	1.49
7	18.32	2.82	-----
8	16.97	4.27	-----
9	19.04	3.64	-----
PHB PATRON	71.42	-----	-----

Tabla 22. Entalpías (ΔH) de Fusión, para los PHAs obtenidos de residuos de cascara de Yuca y PHB patrón.

Muestra PHAs	ΔH_1 (J/g)	ΔH_2 (J/g)	ΔH_3 (J/g)
1	9.49	22.65	1,46
2	2.01	29.12	3.30
3	4.33	25.75	6.05
4	2.43	32.60	-----
5	3.41	31.71	5.41
6	4.97	23.43	-----
7	44.87	-----	-----
8	2.28	3.44	-----
PHB PATRON	71.42	-----	-----

Con respecto a los valores de entalpías de fusión, obtenidos tanto para los PHAs de residuos de piña y yuca, estas están muy por debajo de la mostrada por la muestra patrón, lo que indica que los PHAs obtenidos requieren de baja energía para cambiar de estado, lo que refuerza la hipótesis de que el polímero tiene una fase más amorfa que cristalina. Autores como Chen et al. (2007), por medio de la *Ralstonia eutropha* y en diferentes tipos de medios de cultivos obtuvieron PHAs, tales como el 3-hidroxibutirato, el 3-hydroxiocetanoato, 3-hydroxidecanoato, encontrando entalpías de fusión que oscilaron entre los 8 a 58 J/g, valores similares a los reportados en este trabajo, específicamente para la ΔH_2 del PHA de la condición de fermentación 5 de los residuos de cascara de piña; en tanto que para el caso de los PHAs obtenidos con los residuos de yuca coinciden con las ΔH_2 , de las condiciones de fermentación 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Matsusaki et al. (2000), con diferentes sustratos como glucosa y ácidos dodecanoicos y con cepas recombinadas de *Pseudomonas* sp 61-3, obtuvieron varios tipos de Poly(3.hidroxibutiratos-co-3-hidroxialcanoatos), los valores arrojados por los DSC para las ΔH_f , fueron de 10 a 39 J/g; este rango de valores contiene las ΔH_1 , ΔH_2 , de los PHAs obtenidos de los residuos de piña para las condiciones de fermentación 7, 2 y 3 (Tabla 21). En tanto que para el caso de las entalpías de fusión de los PHAs extraídos de los residuos de cascara de yuca, este rango contiene las ΔH_2 , asociadas a las condiciones de fermentación 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (Tabla 22). Simon-Colin et al. (2012), a partir de la cepa *Pseudomonas guzezei*, obtuvieron diferentes tipos de PHAs, variando las fuentes de carbono entre glucosa, octanoato de sodio y el ácido 10-undecenoico, en general las ΔH_f oscilaron entre 3 a 35 J/g, dando como resultado un PHA, semi-cristalino; este rango de valores de entalpías de fusión, contiene algunos de los valores encontrados en los PHAs extraídos de los residuos de piña y yuca, reportados en las tablas 25 y 26. Finalmente Langlois et al. (2003) lograron obtener PHO usando como sustrato octanoato de sodio, con las cepas: *Pseudomonas* Sp Gpo1 105816, *Pseudomonas aureofaciens* LM1245, *Pseudomonas chlororaphis* DSM 50083, *Pseudomonas fluorescens* DSM 50415, con valores de ΔH_f , entre 7.9 y 8.6 J/g, valores aproximados a los encontrados para la ΔH_2 del PHA extraído de la condición de fermentación 6 de los residuos de cascara de piña. Por último, Martínez et al. (2013), mezclaron un PHB con diferentes porcentajes de hidroxivalerato (HV), encontrando diferentes entalpías de fusión, asociadas a las diferentes cadenas presentes en cada biopolímero, reportando que a medida que hay más presencia de HV, las entalpías de fusión del biopolímero decrece; en ese sentido los valores ΔH_f , hallados por estos autores están en el

intervalo de los de 4.6 a 27.2 J/g; valores más acordes con los reportados en esta investigación, lo que nos puede indicar que en el proceso de fermentación y extracción se pudo formar un copolimero entre PHB y PHV.

En general los resultados de T_m y ΔH_f , asociados a los PHAs obtenidos y extraídos de las diferentes condiciones de fermentación tanto para los residuos de piña y yuca sugieren que se formó un copolimero el cual puede contener un mayor comportamiento amorfo, debido a la posible presencia de un PHV; se hace entonces necesario calcular el grado de cristalinidad del PHA obtenido para cada condición de fermentación, esto por medio de la ecuación 4 y tomando como $\Delta H_f = 146 \text{ J/Kg}$, que es la entalpía de fusión para un PHB completamente cristalino (Dominguez et al., 2015); sin embargo se habla de cristalinidad parcial, ya que en esta investigación no se separaron las muestras de copolimero, lo anterior debido a la baja producción del mismo. En ese sentido en la Tablas 23 y 24 se muestra la cristalinidad parcial de los PHAs obtenidos a partir de los residuos de piña y yuca, para cada punto de entalpía de fusión encontrado.

Tabla 23. Cristalinidad (X) para los PHAs obtenidos de cascaras de Piña y patrón

Muestra PHAs	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)
1	1.68	3.34	3.67
2	0.92	9.49	2.60
3	0.42	12.12	-----
4	4.55	2.98	-----
5	0.78	5.73	-----
6	1.47	5.32	1.02
7	12.55	1.93	-----
8	11.62	2.92	-----
9	13.04	2.49	-----
PHB PATRON	48.92	-----	-----

Tabla 24. Cristalinidad (X) para los PHAs obtenidos de cascaras de Yuca y patrón.

Muestra PHAs	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)
1	6.50	15.51	1.00
2	1.38	19.95	2.26
3	2.97	17.64	4.14
4	1.66	22.33	-----
5	2.34	21.72	3.71
6	3.40	16.05	-----
7	30.73	-----	-----
8	1.56	2.36	-----
PHB PATRON	48.92	-----	-----

Con relación al porcentaje de cristalinidad varios autores reportan este parámetro, para diversos PHAs obtenidos con variadas cepas y sustratos. En este sentido López-Cortéz et al. (2010), reportan que lograron obtener un PHB a partir de la cepa *Paracoccus seriniphilus* con cristalinidades similares a la del polipropileno, la cual es más alta que las reportadas en las tablas

23 y 24. Por otro lado, Oliveira et al. (2007), encontraron valores de cristalinidad del 46 y 45% para PHBs obtenidos de residuos de soya y melazas, valores superiores a los encontrados en esta investigación; sin embargo reportan un valor de cristalinidad para un PHB comercial de 53%, la cual es similar a la reportada por el PHB comercial usado como referencia en este trabajo. Así mismo, Dominguez et al. (2015), reportan el porcentaje de cristalinidad para diversos PHBs sintetizados a partir de la *Azotobacter vinelandii*, dicho parámetro oscilo entre el 38 y 71%, para los biopolímeros analizados, estos valores también son superiores a los obtenidos en este trabajo. Aunque, no se encuentran valores de % de cristalinidad para copolímeros de PHBHV, Langlois et al. (2003), Chen et al. (2006) y Chen et al. (2007), coinciden en que la cristalinidad de los PHAs disminuye en la medida que aumenta la longitud de la cadena, esto puede apoyar el argumento de que los procesos de fermentación, aplicados a los residuos de piña y yuca, pudieron formar un copolímero PHBHV. El hecho de que en los PHAs obtenidos en este trabajo, prevalezca la fase amorfa es reafirmado por Zhijiang y Zhihong (2007), quienes aseguran que el hecho de que en el termograma no se visualice la Tg o este desplazada hacia la izquierda (lo cual se evidencia en las figuras 21, 22, 23 y 24), implica de que la fase amorfa del polímero ha desplazado a la fase cristalina del biopolímero.

Dado lo anterior se podría afirmar que los PHAs, extraídos de los residuos de piña y yuca, pueden ser un copolímero PHBHV o un MCL-PHA, dado la baja cristalinidad y temperaturas de fusión y de transición vítrea determinadas, lo cual es una ventaja ya que son polímeros con buena elasticidad que pueden tener aplicaciones en diversos campos; sin embargo a manera de desventaja el hecho de presentar baja cristalinidad empeora las propiedades de barrera del polímero, lo que podría limitar sus aplicaciones para el diseño de empaques.

4.3.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

En las Figuras 25 y 26, se muestran algunos espectros obtenidos por RMN ^1H , para los PHAs extraídos de la fermentación de los residuos de cascara de piña y yuca y respectivamente, los demás espectros se pueden consultar en el Anexo 1 de resonancia magnética nuclear.

En general los espectros de RMN ^1H , de los PHAs extraídos de los residuos de yuca y piña, para todas las condiciones de fermentación tuvieron un comportamiento similar, lo anterior se puede explicar debido a que en general era la misma fuente de carbono (glucosa y fructuosa) y el mismo tipo de microorganismo; se tienen variaciones mínimas en algunas intensidades de algunas señales, pero más asociadas posiblemente al tiempo de fermentación. Sin embargo las señales encontradas, tanto para los PHAs extraídos de los residuos de yuca y piña, están asociadas a los desplazamientos de grupos funcionales tales como CH_3 , CH_2 , y grupos CH , los cuales son típicos para un PHA. Sin embargo es de resaltar que los espectros, muestran desplazamientos asociados a la formación de dos tipos de biopolímeros un PHB y PHV, lo cual comprueba la hipótesis descrita en los análisis de FTIR y DSC. En la tabla 25, se muestran los resultados obtenidos para el análisis ^1H RMN, donde se observan desplazamientos asociados al PHB y PHV, obtenidos de las diferentes condiciones de fermentación tanto para los residuos de yuca como para los de piña (los resultados de las señales se muestran unificados, ya que las señales son similares para los PHAs extraídos de ambos tipos de residuos). Así mismo, con los datos obtenidos se sometieron a diferente software para verificar la señal asociada a cada grupo funcional y polímero obtenido.

Para el análisis de los espectros RMN ^1H y RMN ^{13}C se utiliza el programa MestRe-C versión 4.8.6.0 y se simulan los espectros con ayuda de ChemDraw versión 15.0.0.106, MarvinSketch 15.4.20.0 y ACD/Labs 10.05.

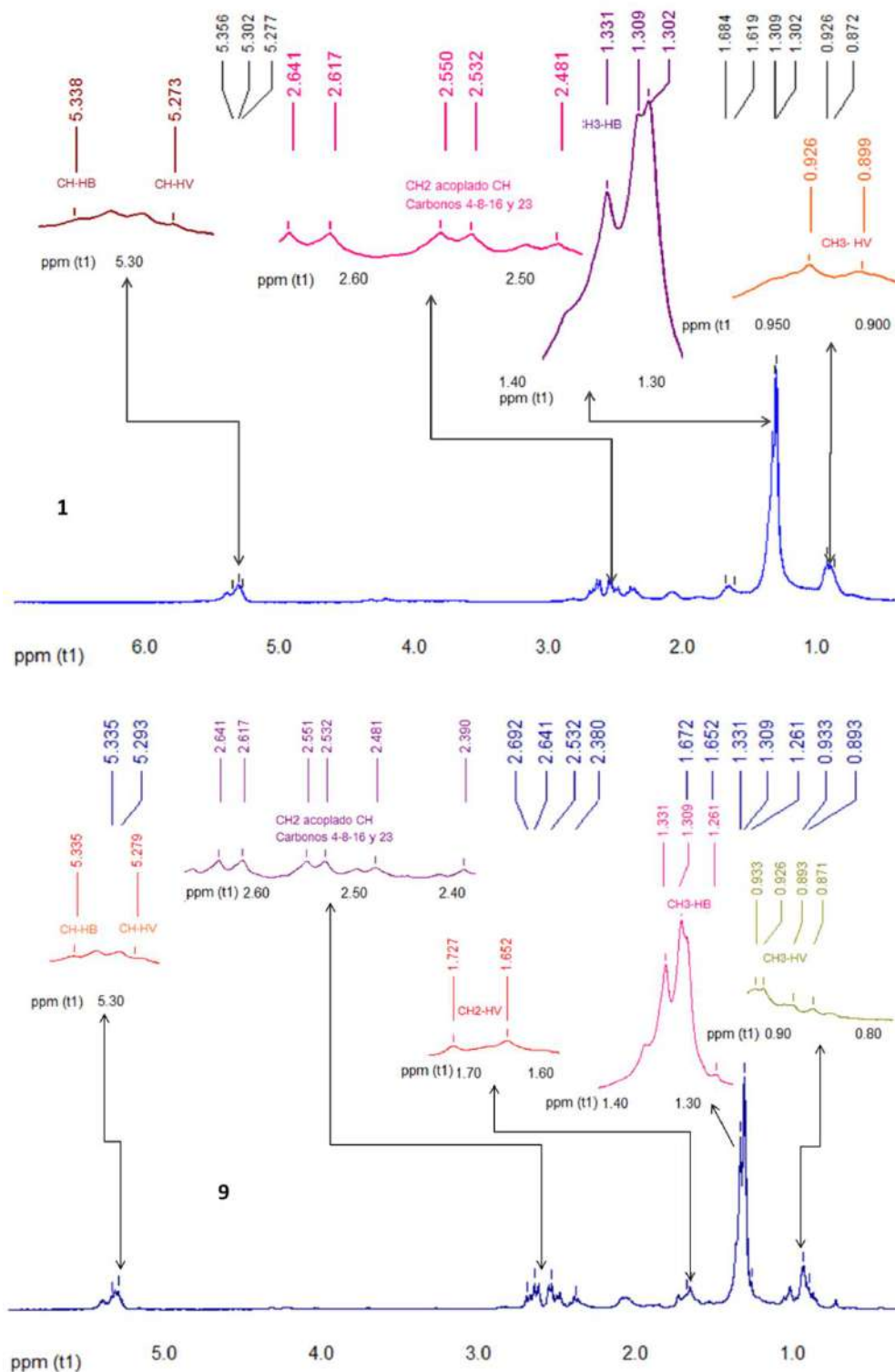


Figura 25. Espectros de RMN ^1H , para las condiciones de fermentación 1 y 9 de los residuos de cascara de piña.

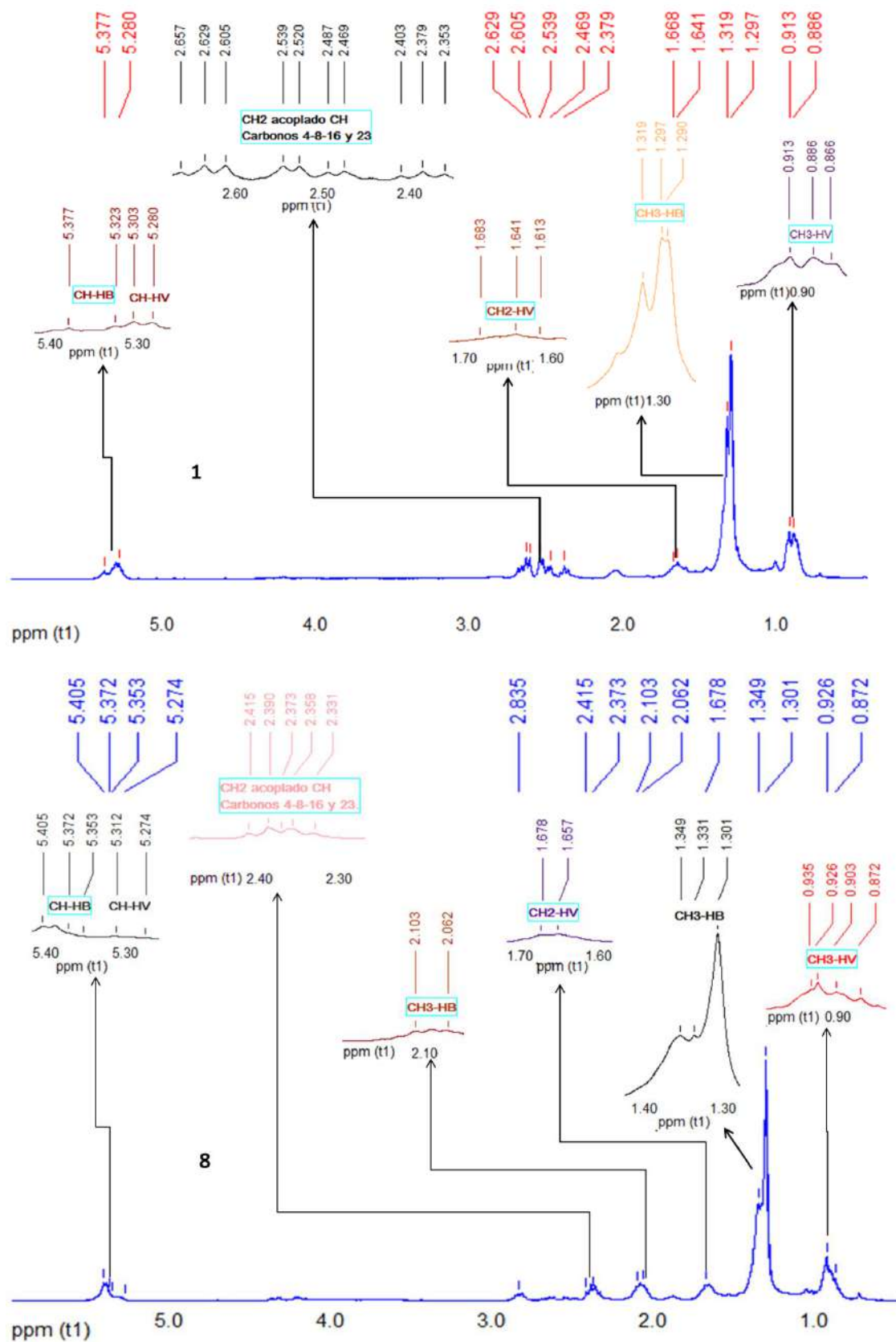


Figura 26 Espectros de RMN ^1H , para las condiciones de fermentación 1 y 8 de los residuos de cascara de yuca

Tabla 25. Resultados de RMN-¹H, señales características observadas y valores simulados para biopolímeros de yuca y piña.

Desplazamiento químico observado (ppm)	Forma de la señal	Tipo de hidrógeno unido al C numerado	Marvin Sketch	Chem Draw	ACD/Labs
0.88 – 0.97	M	CH ₃ (18) HV	0.94	0.89	0.94
1.26 – 1.28	M	CH ₃ (11, 13, 24) HB	1.28; 1.29	1.16; 1.32	1.25-1.31
1.61-1.68	M	CH ₂ (17) HV	1.46, 1.68	1.55	1.73; 1.79
2.02	M	CH ₃ (26)	2.18	2.10	2.16
2.31-2.37	DD	CH ₂ acoplado a CH (4, 8, 16)	2.59; 2.39	2.59; 2.70	2.30; 2.66
2.57-2.65	DD	CH ₂ acoplado a CH (23)	2.69; 2.71	2.54; 2.79	2.85;2.88
3.65	M	Posible CH ₃ -COR (1)	3.39	3.41	3.28
4.17-4.27	M	Posible -O-CH ₂ -R (3)	4.03	4.84	3.90
5.27	M	CH (15) HV	5.12	5.20	5.11; 5.14
5.34	M	CH (7, 22) HB	5.28	5.30;4.89	5.24

De los datos mostrado en la tabla 25, se podría decir que tanto en los procesos de fermentación de los residuos agroindustriales de cascara de yuca y piña, se pudo haber generado un copolimero o dos tipos de polímeros, ya que las señales indican la presencia de estructuras de un PHB y un PHV. En ese sentido, se reporta que la señal de 5.27 y 5.34 ppm corresponden al grupo CH, la primera asociada a un HV y la segunda un HB, similar a lo expuesto por Doi et al. (1986b); estas señales son reportadas para el grupo CH por diversos autores analizando los espectros de ¹H para diferentes PHAs obtenidos con diferentes sustratos y cepas. Doi et al. (1986b) asignaron la señal de 5.26 ppm al CH para un PHB obtenido de la cepa del *Bacillus megaterium*. Mishra et al. (2010) analizaron el espectro de ¹H RMN para un PHB, obtenido a partir de los residuos de la industria del biodiesel de la jatrofa, usando las cepas SM-P-3M y SM-P-1S, asignando la señal de 5.30 ppm al grupo CH, lo cual también se corresponde con lo encontrado en este trabajo. Simon-Colin et al. (2008) caracterizaron un MCL-PHA, obtenido a partir del aceite de copra usando la cepa *P.guezennei*, obteniendo señales de 5.20 ppm asociadas al grupo CH, señal también reportada por Simon-Colin et al. (2012) para el espectro de un PHA obtenido de sustratos como la glucosa y el ácido octanoico. Ballistreri et al. (2011) fermentaron con la cepas *Pseudomonas aeruginosa* pastos de la familia de las *brassica*, las cuales son ricas en ácidos y cadenas grasas obteniendo un poli (3-hidroxialcanoato), el cual mostro señales de ¹H de RMN entre 5.2 a 5.5 ppm, asignando este intervalo al grupo CH. Koller et al. (2013) obtuvieron las mismas señales anteriormente mencionadas, pero para un MCL-PHA, obtenido de residuos de la industria animal con la cepa *Ps citronellolis*. Abd-El-haleem et al. (2007), también reportan la obtención de un copolimero PHBHV obtenido a partir de levaduras tradicionales y modificadas genéticamente como son la *Saccharomyces cerevisiae* y la *Kloeckera sp*, con señales que corresponden a un HV para el CH a 5.24, lo cual es similar a lo reportado en la tabla 25. Finalmente O'Connor et al. (2015), reportan la señal del CH con el mismo desplazamiento químico que los reportados en la tabla 29 para varios

PHAs obtenidos a partir del manitol presente en los jugos de ensilados, usando diversas cepas como la *Burkholderia sacchari* IPT101 y *Pseudomonas chlororaphis* IMD555. En general la caracterización de los PHAs en el ^1H RMN, mostró señales típicas del CH, el cual fue encontrado en el rango de señales entre los 5,21-5,29 ppm.

En la tabla 25, se pueden ver diferentes desplazamientos químicos del proton ^1H , asociados a señales de grupos de átomos CH_3 , y CH_2 ; para el primer grupo se asignaron desplazamientos de 0.88 a 0.97 ppm cuando están en la cadena del HV y entre 1.26 a 1.28 asignados al PHB; por otro lado los desplazamientos entre los 2.31 a 2.37 y 2.57 a 2.65 ppm se asignaron al grupo CH_2 acoplados a un CH. Las señales anteriores han sido reportadas para esos grupos funcionales por varios autores, cuando caracterizaron PHAs por ^1H RMN; en ese sentido Doi et al. (1986b), asignaron la señal 1.274 ppm al CH_3 , para un PHB obtenido de la cepa del *Bacillus megaterium*. Mishra et al. (2010) para PHBs extraídos de residuos de la industria del biodiesel de la jatrofa, fermentados con las cepas SM-P-3M and SM-P-1S, concluyeron que el grupo CH_2 estaba en el desplazamiento de 2.50 ppm, los grupos CH_3 los asociaron a las bandas en el rango de los 1.25 a 1.57 ppm y el grupo terminal del CH_3 en la región de los 0.9 ppm. Simon-Colin et al. (2008), analizaron un espectro de ^1H RMN, para una MCL-PHA obtenido a partir del aceite de copra usando la cepa *P. guzei*, encontrando que las señales de 0.89, 2.47-2.6 ppm, fueron asignadas al grupo CH_3 y CH_2 , respectivamente; estas mismas señales son reportadas por Simon-Colin et al. (2012), pero para el espectro de un PHA, obtenido de sustratos como la glucosa y ácido octanoico; estos resultados en concordancia con los obtenidos para los PHAs extraídos de los residuos de cascara yuca y piña. De igual modo, Ballistreri et al. (2011) reportan la presencia del grupo CH_3 en la señal de 0.96 ppm, lo anterior para un poli (3-hidroxialcanoato) obtenido a partir de procesos de fermentación de pastos de la familia básica con la cepas *Pseudomonas aeruginosa* pastos de la familia de las *brassica*. Trivedi et al. (2016), optimizaron y caracterizaron el proceso de obtención de un PHA derivado del proceso de fermentación de residuos de glicerol con la cepa *Pannonibacter phragmitetus* ERC8, determinando que los desplazamientos para el grupo CH_3 estaban a los 0.832 ppm. O'Connor et al. (2015), encontraron en diferentes PHAs sintetizados a partir del manitol presente en los jugos de ensilados, usando diversas cepas como la *Burkholderia sacchari* IPT101 y *Pseudomonas chlororaphis* IMD555 desplazamientos químicos entre los 1.28-1.26, 2.44-2.6 ppm, los cuales fueron asignadas a los grupos funcionales del CH_3 y CH_2 respectivamente. Abd-El-haleem et al. (2007), también reportan la obtención de un copolímero PHBHV, usando levaduras tradicionales y modificadas genéticamente como son la *Saccharomyces cerevisiae* y la *Kloeckera sp*, dichos autores asignan los desplazamientos de CH_2 a 1.6 ppm y el CH_3 a 0.9 ppm para el HV, en tanto que la señal de 1.3 ppm se asigna al CH_3 del PHB, valores en concordancia con los encontrados en este trabajo (tabla 25). En general todos los estudios que reportan ^1H RMN para PHAs, obtenidos con distintos sustratos y cepas, obtienen valores similares de desplazamiento químicos, a los obtenidos en esta investigación. Otros autores también reportan resultados similares a los mostrados en este trabajo (Nomura et al., 2016); Simon-Colin et al., 2009; Nakas et al., 2004).

En general de los análisis de los espectros ^1H RMN, para los PHAs, extraídos de los procesos de fermentación de los hidrolizados de los residuos de cascaras de yuca y piña, muestran grupos funcionales típicos asociados a la formación de un copolímero PHBHV o a la presencia de dos polímeros HB y HV; estos resultados de RMN confirman las hipótesis trazadas en los análisis de FTIR y DSC. En ese sentido, la literatura reporta que para que se pueda formar este copolímero por procesos de fermentación con la *Ralstonia eutropha*, se requiere hacer la fermentación con adición de glucosa y propionato (ácido popanioco) (Keasling et al., 2002). Sin embargo en este trabajo no se agregó propionato en ningún caso. Por otro lado, algunos autores reportan que al someter residuos de vegetales y frutas a procesos de hidrolisis acida, pueden obtenerse diversos ácidos grasos (Razaghi et al., 2016). Así mismo Wong et al. (2016), a partir de procesos de hidrolisis acido-genica, aplicada el residuos de alimentos, reporta la presencia de ácidos grasos tales como el propionico, butírico y acético. Kumar et al. (2016) hidrolizaron residuos de cascara de papas y cebollas encontrando la presencia de ácidos grasos volátiles tales como el acético el propanioco y el butírico. Dado lo anterior, se puede inferir que en los procesos de hidrolisis aplicados tanto a los residuos de cascaras de yuca como de piña, se pudieron haber formado ácidos grasos volátiles, dentro de los que se pueden encontrar el ácido propanoico que junto con la glucosa y la bacteria *Ralstonia eutropha*, pudieron favorecer la síntesis del copolímero PHBHV. Siendo esto un valor agregado importante ya que a futuro, estos residuos podrán ser usados como precursores del HV, disminuyendo los costos de producción del mismo, además obtenido un copolímero con propiedades elastomericas el cual tiene aplicaciones en diferentes campos de la industria, como la de medicina.

En las Figuras 27 y 28, se muestran los diferentes espectros obtenidos por RMN ^{13}C , para los PHAs extraídos para las diferentes condiciones de fermentación de los residuos de cascaras de piña y yuca respectivamente.

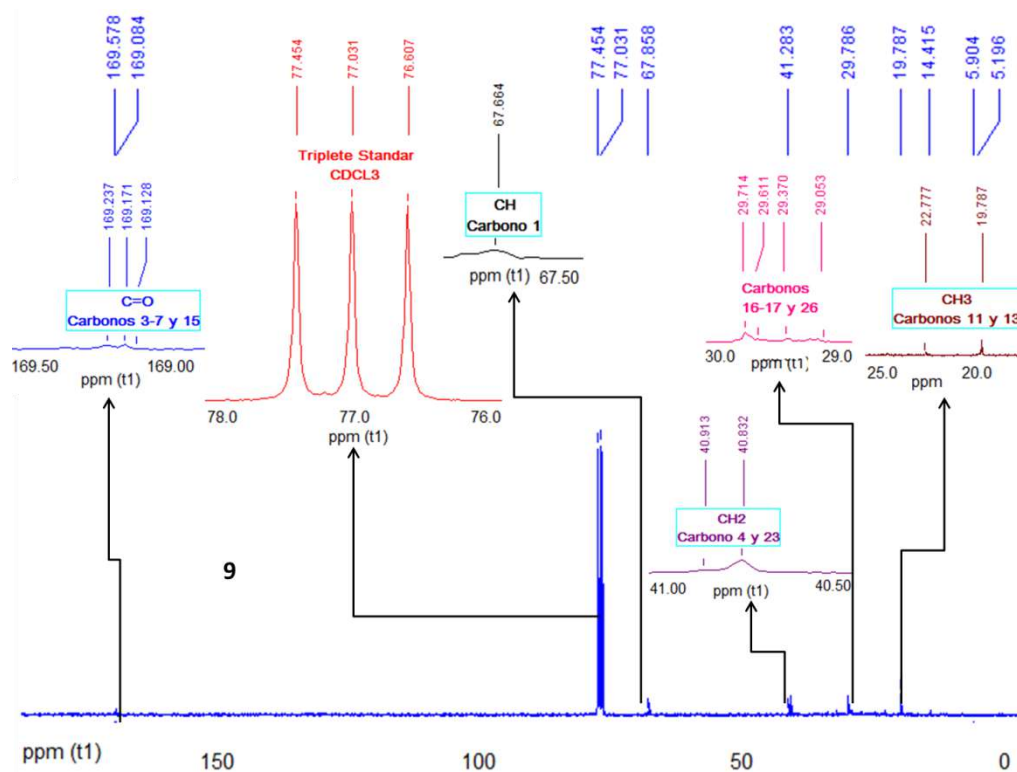
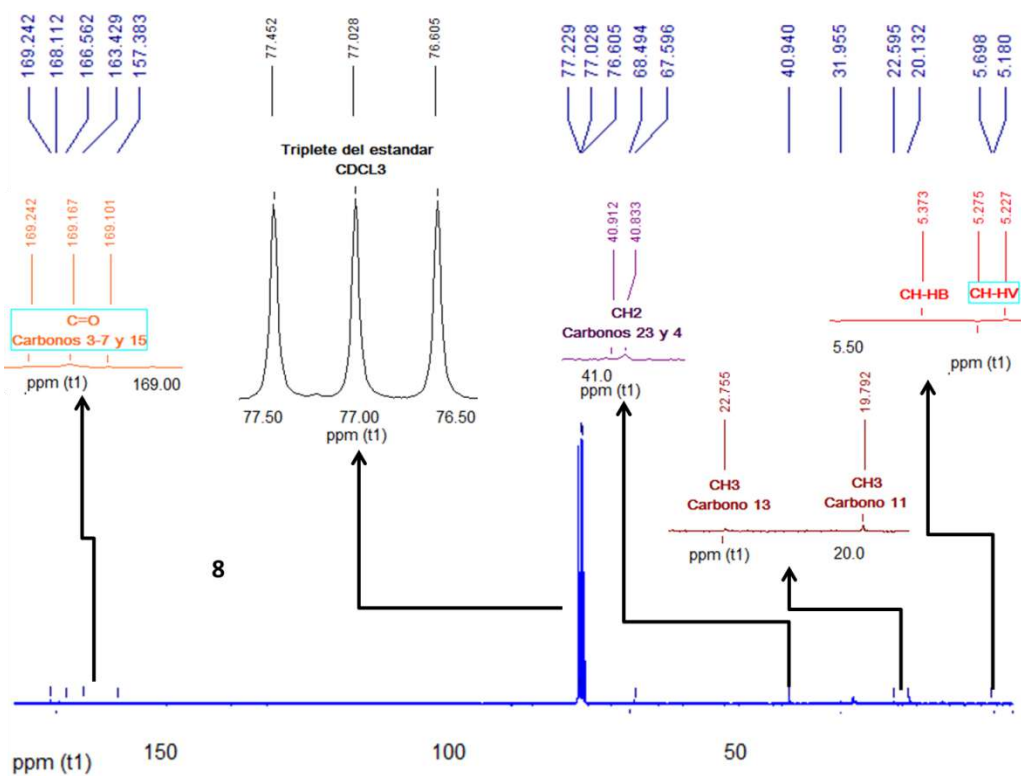


Figura 27. Espectros de RMN ^{13}C , para las condiciones de fermentación 8 y 9 de los residuos de cascara de piña.

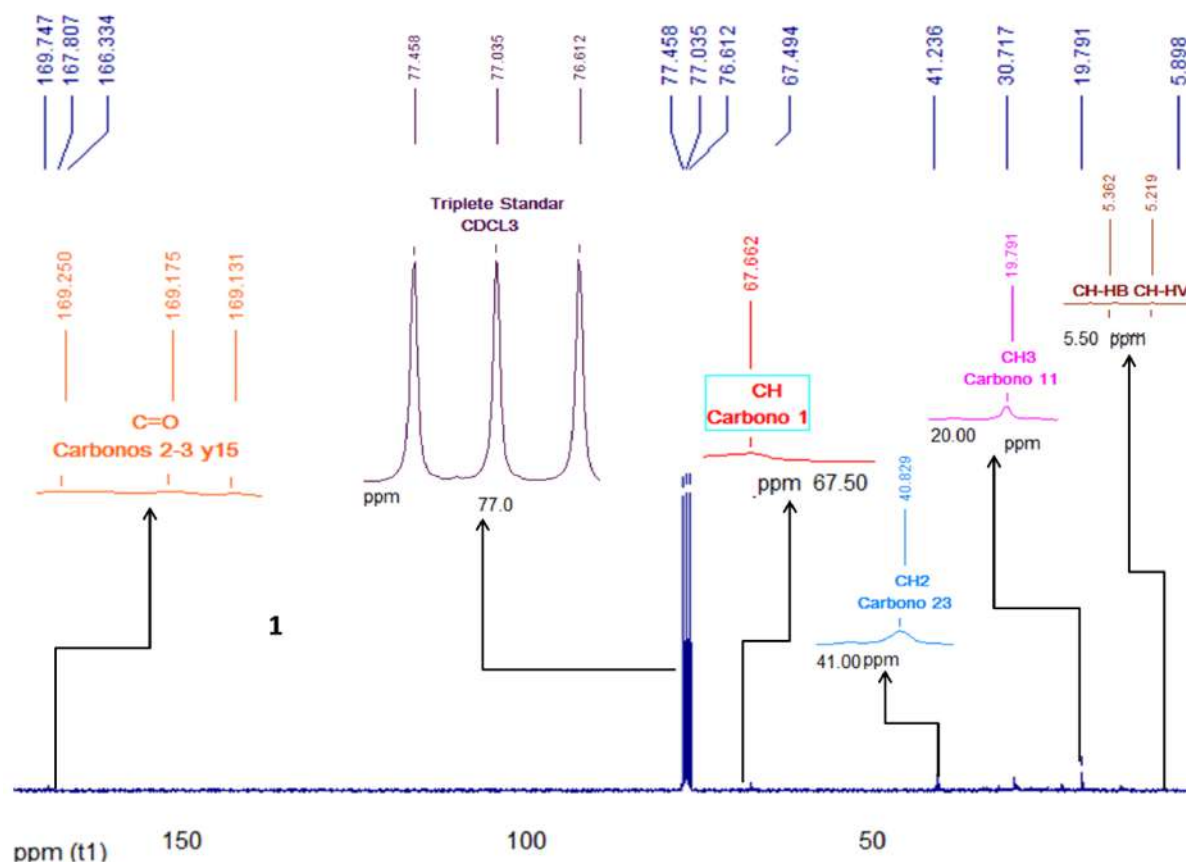


Figura 28. Espectros de RMN ^{13}C , para las condición de fermentación 1 de cascara de yuca.

En general tanto los espectros de RMN ^{13}C , de los PHAs extraídos de los residuos de yuca y piña, para todas las condiciones de fermentación tuvieron un comportamiento similar, las señales encontradas, tanto para los PHAs extraídos de los residuos de yuca y piña, están asociadas a los desplazamientos de grupos funcionales tales como CH_3 , CH_2 , CH y C=O , los cuales son típicos para un PHA. Con los espectros de carbono 13, se evidencia nuevamente que existen desplazamientos asociados a formación de un copolímero conformado por un PHB y PHV, tanto para los PHAs extraídos de los residuos de yuca como de piña. En la tabla 26 se muestran los resultados obtenidos para el del análisis RMN ^{13}C , donde se observan los desplazamientos asociados y el número de carbono al cual corresponde en la estructura general del polímero (los resultados de las señales se muestran unificados, ya que las señales son similares para los PHAs extraídos de ambos tipos de residuos). En general los desplazamientos químicos entre 19, 40, 67 y 169 ppm, corresponde a los grupos CH_3 , CH_2 , CH y C=O , respectivamente.

Tabla 26. Resultados de RMN-¹³C y Señales características observadas.

Desplazamiento químico (ppm)	Numero de Carbono.
14.11	18
19.80	11
22.70	13
27.22	24
29.07	17
29.34	26
29.68	16
31.91	8
40.80	4
40.88	23
67.63	1
77.20	22
169.1	7
169.2	15
169.14	3

Los desplazamientos encontrados en el presente trabajo coinciden con los reportados en literatura, confirmando la presencia de PHAs y en especial la formación del copolímero PHBHV. Es así como Doi et al. (1986) sintetizaron un PHBHV a partir de la cepa *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17699, reportando desplazamientos de 19.79, 40.82, 67.64 y 169.16 ppm, asociados a los grupos CH₃, CH₂, CH y C=O, respectivamente; estas mismas asignaciones fueron dadas por Abd-El-haleem et al. (2007) para un copolímero de PHB y PHV obtenido a partir de *Saccharomyces cerevisiae* y la *Kloeckera sp.* Doi et al. (1986) reportan el grupo CH₂ en los desplazamientos 26, 38 y 40.8 ppm y CO en 169.14; 169.32 y 169.52 ppm. Abd-El-haleem et al. (2007) reportan que los desplazamientos típicos de un copolímero PHBHV son 19.87, 40.87, 67.64 y 169.21 ppm para el PHB, en tanto que para los PHV son de 22.10 señales que coinciden a las reportadas en este estudio (tabla 26).

Otros desplazamientos químicos que se encuentran alrededor de 27 y 14.3 ppm y que son reportados en la tabla 26, son relacionados con el CH₂ y el CH₃ (Ballistreri et al., 2011), desplazamientos que se asignaron a los carbonos 18 y 24 de la estructura del copolímero obtenido en el presente estudio (Figura 29); Casini et al. (1997) también reportan señales similares a las encontradas en este estudio.

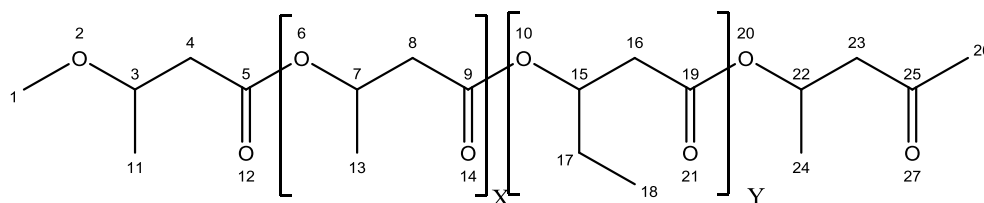


Figura 29. Posible estructura del copolímero PHBHV, obtenido. Y: PHV X: PHB en el presente trabajo.

Finalmente, para la cuantificación de la relación molar entre las unidades HB y HV se seleccionaron dos señales exclusivas de los monómeros que guarden la proporcionalidad de intensidades, estas son 5.36 ppm (CH HB) y 5.24 ppm (CH HV) Doi et al. (1986, y con la ecuación 7 se obtuvieron las

relaciones de HB y HV para los PHAs obtenidos a partir de los residuos de yuca y piña, los cuales se muestran en la tabla 27.

$$X = \frac{\gamma_1}{\gamma_1 + \gamma_2} \quad (7)$$

Donde: X es la fracción molar del HV, γ_1 y γ_2 corresponden a la señal de las áreas de 5.24 y 5.36 ppm en la relación al grupo CH de resonancia del HV y HB, respectivamente.

Tabla 27. Composición molar porcentual de HV para diferentes condiciones de fermentación de los PHAs obtenidos de residuos de Yuca y Piña.

PHAs Residuos de Yuca		PHAs Residuos de Piña	
Condición de Fermentación	% HV	Condición de Fermentación	% HV
1	72,6	1	64.0
3	82,0	2	68.0
4	76,1	3	64.0
5	73,1	4	70.2
6	67,4	5	55.2
7	78,3	6	68.2
8	73,1	8	74,2
----	----	9	--

De la Tabla 27, se puede concluir que en general, el copolímero obtenido tiene un mayor contenido de HV, lo cual está relacionado con los resultados de DSC, los cuales muestran que los polímeros tenían una fase más amorfa, lo anterior asociado a las bajas temperaturas de fusión y de T_g , ya que en general los PHV, son biopolímeros del tipo elastoméricos. En general para el caso de los PHAs, obtenidos a partir de residuos de yuca, la condición de fermentación 3 arrojó el mayor contenido de PHV, en tanto que la de menor contenido fue la condición 6. Para el caso de los PHAs, obtenidos con los residuos de piña, la condición 9 fue la de mayor concentración de HV y la de menor contenido de HV, fue la 5. La anterior diferencia se debe a que el no control del pH, pudo inducir a que la cepa consumiera en mayor o menor grado los ácidos orgánicos que se pudieron haber producidos en la hidrólisis, lo que eventualmente influiría en la producción de 3HV.

De los análisis de ^{13}C RMN, se confirman las hipótesis trazadas con los análisis de DSC, donde se evidenciaba la presencia de más de una cadena polimérica; en general se obtuvo un polímero con contenidos de HV entre el 67 al 82%, para el caso de los PHAs, extraídos con residuos de yuca; y un contenido de HV entre el 55 y 83% para los PHAs, extraídos con residuos de piña.

4.3.4 ESPECTROFOTOMETRÍA DE GASES-MASAS (GCM).

En las Figuras 30 y 31 se muestran los cronogramas donde se observan los diferentes tiempos de retención obtenidos por GCM para distintas cadenas estructurales de los PHAs extraídos para las diferentes condiciones de fermentación de los residuos de cáscaras de piña y yuca respectivamente. Los demás cronogramas se pueden ver en el Anexo 2 de cromatografía. En la Figura 32, se muestra el tiempo de retención para un PHB patrón.

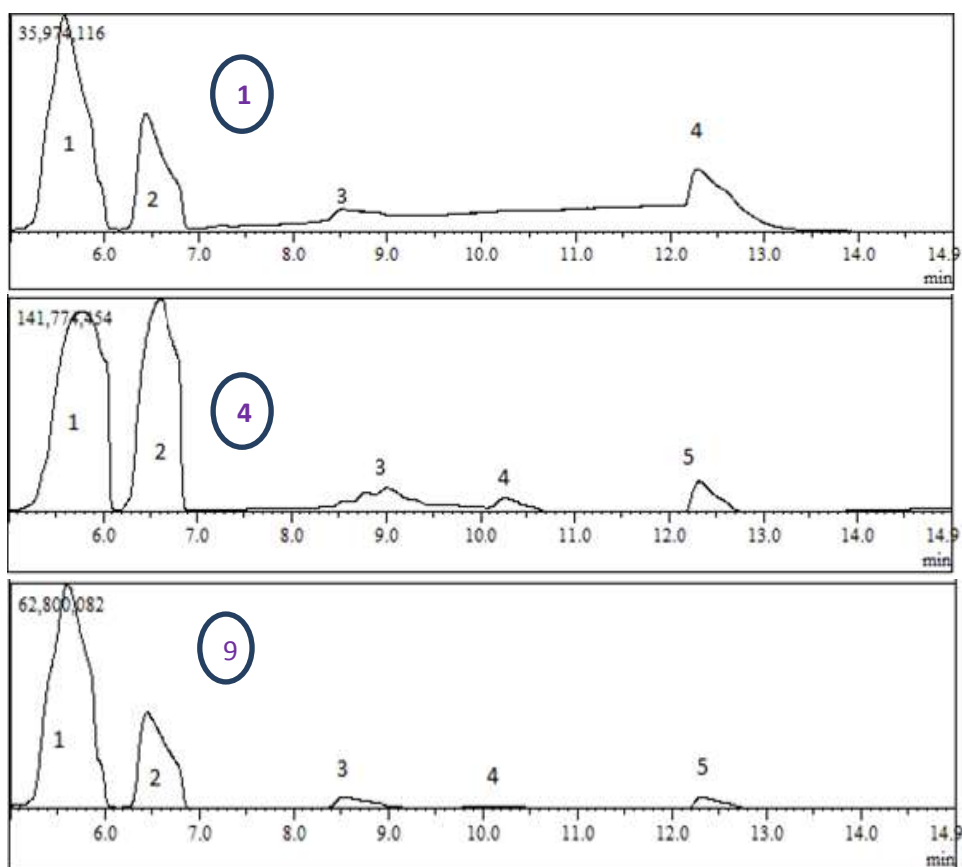


Figura 30. Tiempos de retención para los PHAs extraídos en las condiciones de fermentación 1, 4 y 9 de los residuos de cascara de piña obtenidos por GCM

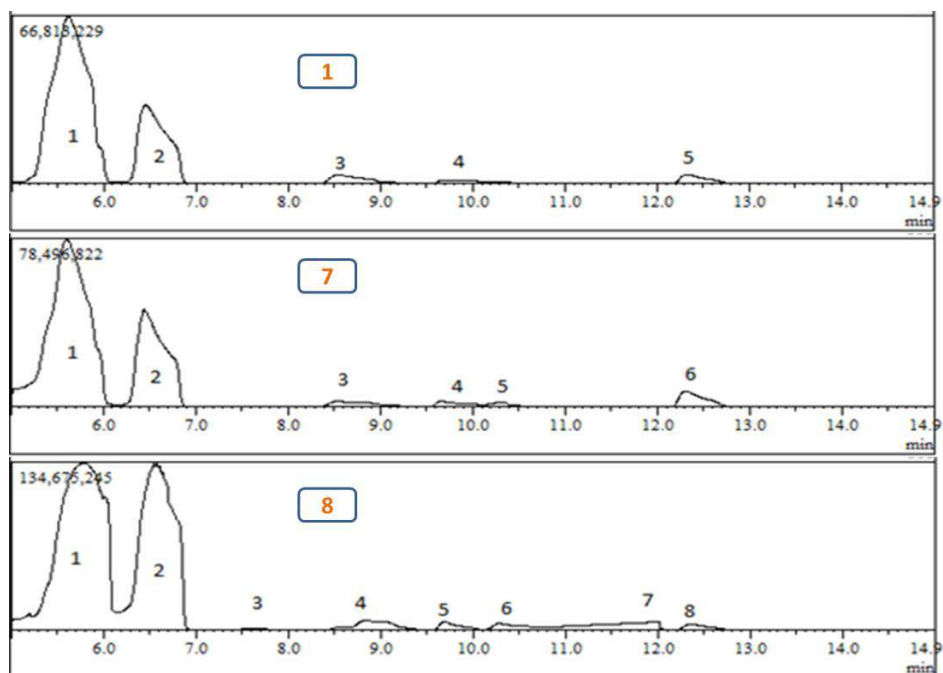


Figura 31. Tiempos de retención para los PHAs extraídos en las condiciones de fermentación 1, 7 y 8 de los residuos de cascara de yuca obtenidos por GCM.

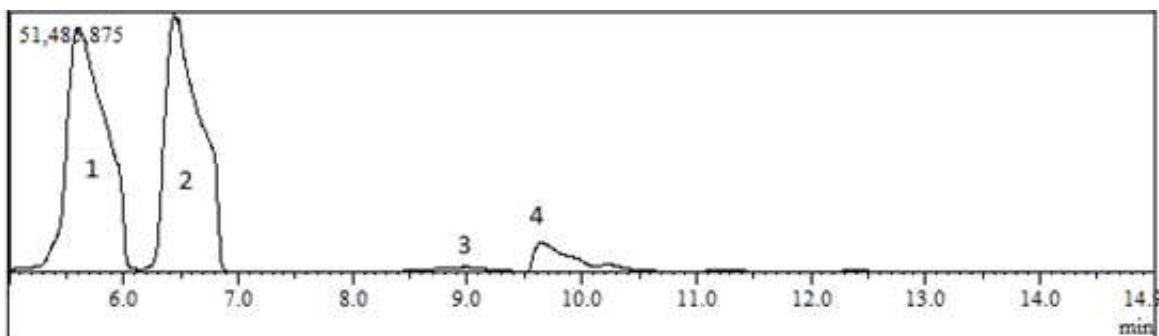


Figura 32. Tiempos de retención para una muestra de Patrón obtenidos por GCM.

En los cronogramas para los residuos de piña (figura 30) se observan entre 4 y 5 picos, de los cuales 4 picos se presentan en todas las muestras, con tiempo de retención aproximados de 5.5, 6.5, 8.5 a 9 y 12.4 min. Comparando con el cronograma patrón (figura 32) se observan los mismos picos en estos tiempos de retención, excepto por el pico a los 12.4 min, el cual puede hacer referencia a la presencia de lípidos de la membrana de la cepa *Ralstonia eutropha*. En el caso de los PHAs, obtenidos de residuos de Yuca, (figura 31), se observan picos con tiempos de retención de 5.5, 6.5, 8.4 y 12.4 min; estos tiempos de retención también son similares a los mostrados por el PHB patrón. Se podría decir que los cromatogramas obtenidos por los PHAs extraídos de los residuos de piña y yuca, tienen los mismos picos y orden de aparición, similares a los mostrados por el patrón. En general todos los tiempos de retención coinciden con lo reportado en la literatura para PHAs de longitudes de cadena entre 4 a 8 carbonos Wang et al. (2014).

Finalmente es de destacar, que el pico de los 8.4 minutos, el cual no aparece en la muestra patrón corresponde al monómero formado a partir del ácido propionico (Mkhize et al., 2014), lo cual refuerza la tesis de que al tener presencia de este ácido se dio la formación del copolímero PHBHV, sin embargo en los cronogramas que no se observa este pico, se puede deber a que este ácido puede perderse en los procesos previos al análisis, tales como derivatización y metanolisis, lo cual es reportado por Zhu et al. (2016). Finalmente se puede decir que el hecho de que se presenten diversos tiempos de retención, implica la presencia de diversas cadenas poliméricas, lo cual está en concordancia con lo observado en los análisis de DSC.

Con respecto a los análisis de GCM, se puede decir que independientemente del tipo de residuo y de la condición de fermentación, los tiempos de aparición de los picos característicos de los PHB, están entre 6, 7, 9 minutos, lo cual puede dar indicios de un PHA, con monómeros de cadenas de 4 y 8 carbonos, en este caso el pico 1 corresponde al 3HB y el pico 3 al 3HV. Confirmando la formación de un PHB y PHV, lo que es acorde a lo reportado por Wang et al. (2014). Aunque, los tiempos de retención, están en función de las condiciones de metanolisis, de las temperaturas usadas en el equipo y de la columna usada, y que no son comparables entre sí, es de destacar que los picos y su orden de aparición son similares al PHB patrón y al reportado en bibliografía. En este sentido Wang et al. (2014), en un estudio que hicieron a diferentes tipos de PHAs, a través de la de GCM, determinaron que el tiempo de retención para un PHBHV podría aparecer en el rango de los 6.22 a 6.62 minutos, dicho tiempo en general se puede apreciar en el pico 2 de las figuras

30, 31 y 32. Choi y Lee (1997), también detallan que los tiempos de retención para el 4HB y el 4HV son de 6,89 y 6,68 min, respectivamente, estos valores se pueden apreciar en el segundo pico de los cronogramas de PHAs extraídos de los residuos de piña y yuca. Otros tiempos de retención similares a los mostrados en las figuras 30, 31 y 32 los da Campos et al. (2014) quienes evaluaron el efecto que tenían diferentes concentraciones de nitrógeno y glicerina sobre algunas características de un P3HB obtenido con la cepa *Cupriavidus necator*, reportando que el tiempo de retención para el biopolímero fluctuó entre los 5.79 y 5.87 minutos, los cuales son similares a los obtenidos en el pico 1 de los cronogramas del presente estudio. Huang et al. (2016), también determinaron que los tiempos de retención para un P3HB era de 5.15 minutos, esto para PHAs obtenidos a partir de xilosa, por medio de un consorcio bacteriano; tiempos que también corresponden a los mostrados en los picos de las figuras 30, 31 y 32. Otros autores como Thakor et al. (2005), encontraron que el tiempo de retención del 3HB estaba alrededor de los 9 minutos para PHAs obtenidos de diferentes tipos de aceites vegetales, usando la cepa *Comamonas testosteroni*, aunque de menor intensidad, estos picos también aparecen en los cronogramas reportados en este trabajo.

En las figuras 33a, 33b, 33c y 33d se muestran diferentes relaciones de masa/carga (m/z) obtenidas para los PHBs, extraídos de algunas condiciones de fermentación de los residuos de piña. Las figuras 33a, 33b y 33c muestran las relaciones m/z correspondientes al pico 2 de los PHBs extraídos en las condiciones de fermentación 1, 3 y 4 respectivamente. Finalmente la figura 33d muestra las relaciones de carga del pico 5 de la condiciones de fermentación 6 la cual corresponde a un PHV. Los valores de las relaciones masa carga que se reportan en las figuras antes mencionadas, corresponden al grupo metil ester, el cual hace parte de la estructura general de los PHAs Choi y Lee (1997).

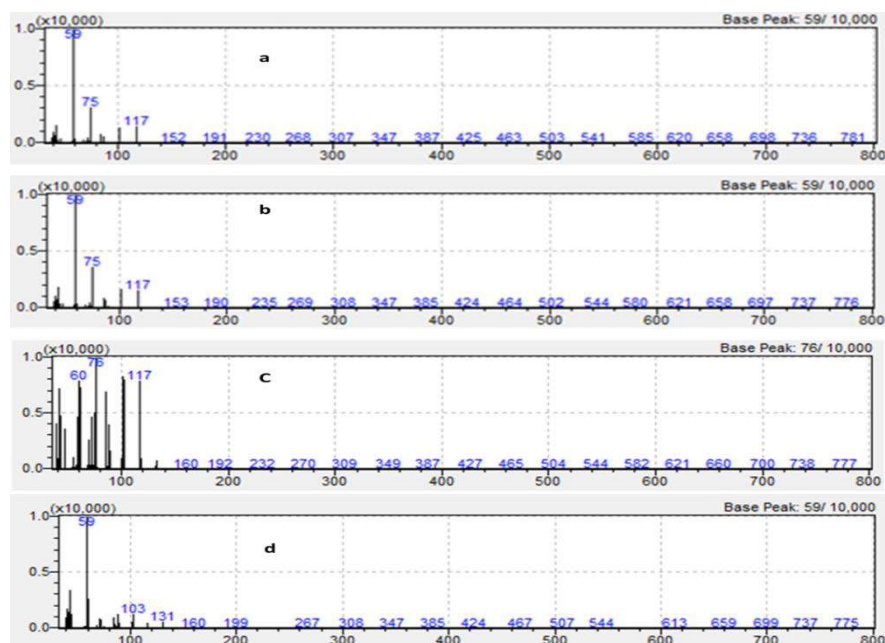


Figura 33. Espectros de masas de las relaciones m/z para los PHAs obtenidos de los residuos de piña, la figuras a, b y c corresponden a las m/z del PHB; d) relaciones m/z del PHV.

En las figuras 34a, 34b, 34c y 34d se muestran diferentes relaciones de m/z obtenidas para los PHBs extraídos de algunas condiciones de fermentación de los residuos de yuca. La figura 34a, y 34b muestra las relaciones de m/z correspondientes al pico 2 del PHB, extraído de la condiciones de fermentación 1 y 7, respectivamente; en tanto que la figura 34c muestra las relaciones de m/z correspondientes al pico 4 del PHB, extraído de la condición de fermentación 4; estas corresponden a estructuras de un PHB. Finalmente la figura 34d muestra las relaciones de m/z del pico 5 de la condiciones de fermentación 7, la cual corresponde a la estructura de un PHV. En la figura 35 se observan las relaciones de carga m/z del PHB patrón.

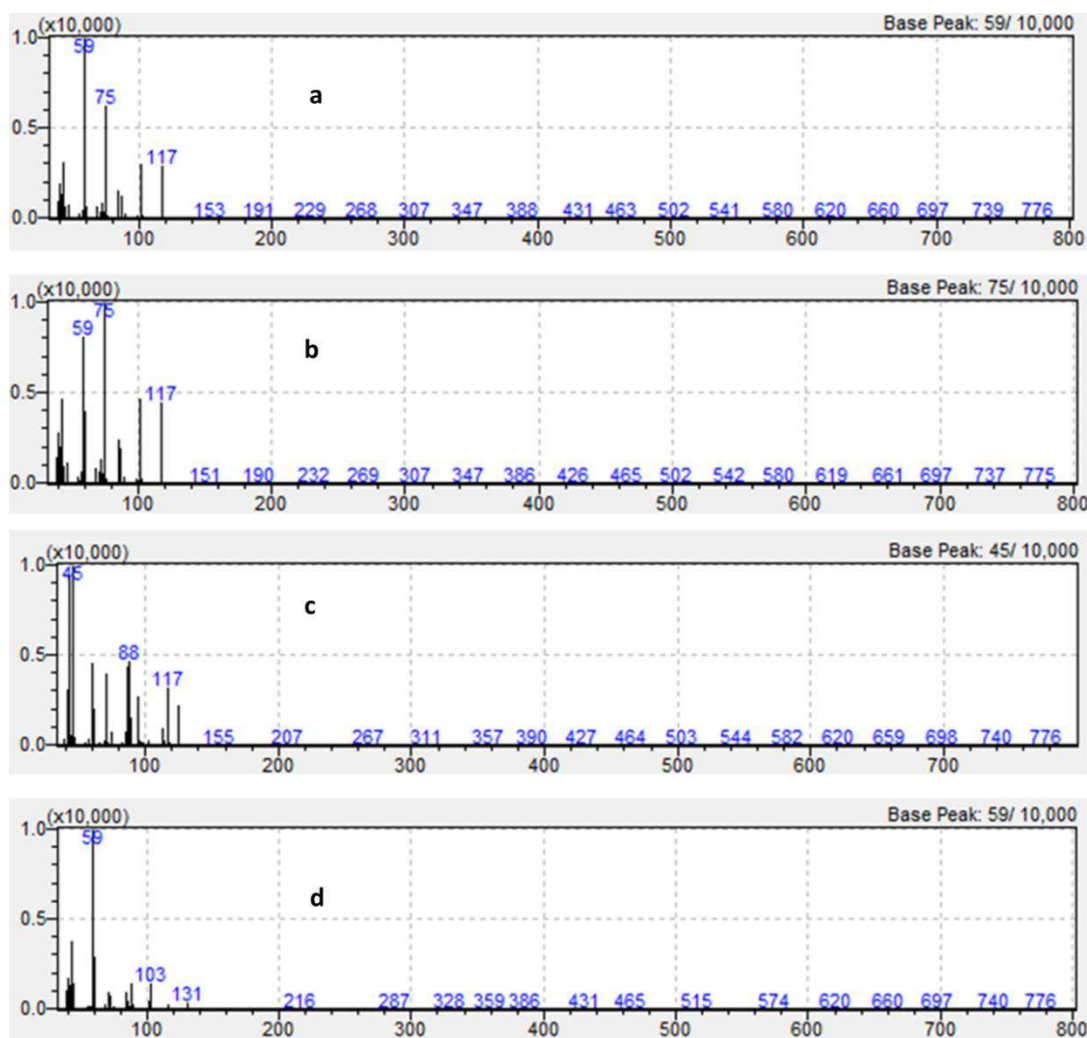


Figura 34. Espectros de masas de las relaciones m/z para los PHAs obtenidos de los residuos de yuca, la figuras a,b y c corresponden a las m/z del PHB ; d) relaciones m/z del PHV.

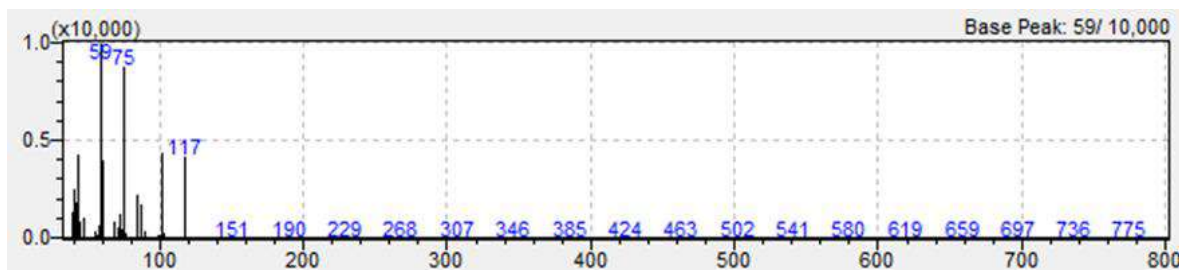


Figura 35. Espectro de masas de las relaciones m/z para el PHB patrón.

De la figura 35 se puede observar que las relaciones de m/z para el grupo metil ester del PHB patrón como son la de 59, 75 y 117, corresponden a las mostradas en las figuras 33 y 34 de los PHBs extraídos de los residuos de piña y yuca, respectivamente, lo cual corresponde a los citados por Choi y Lee (1997). En las figuras 33d (piña) y 34d (yuca) se muestra que las relaciones de m/z para el pico 5 con mayor abundancia fueron las de 59 y 131, las cuales corresponden a un PHV; estas relaciones de m/z están en concordancia con lo expuesto por Choi y Lee (1997) quienes determinaron que las relaciones m/z con un valor de 117 y 131, corresponden a un PHB y PHV respectivamente, lo cual está en concordancia con lo encontrado en este trabajo. Otras relaciones de carga similares o cercanas a las reportadas en este trabajo y que confirman la presencia de un PHB son reportadas por Ashby et al., (2005), quienes con unas cepas de *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 y *Pseudomonas corrugata* 388 y usando como sustrato glicerol, sintetizaron un P3HB, con relaciones m/z de 45, 73 y 117. En ese mismo sentido, Thakor et al. (2005) obtuvieron diferentes espectros para varios PHAs obtenidos de aceites vegetales, reportando relaciones de carga m/z de 43, 72 y 110, que aunque no son iguales a las reportadas en este trabajo si están cercanas. Simon-Colin et al. (2012) expresan que algunas relaciones de m/z para grupo funcional 3-hidroxil son 73, 131 y 159, algunas de estas señales se encuentra en los cronogramas del presente trabajo, otras cercanas o con muy baja abundancia, sin embargo muestran que corresponden a la literatura reportada. Ashby et al. (2002) reportan una m/z de 131, para un PHV sintetizado de la *Pseudomonas oleovorans*, lo cual está en concordancia con las m/z que se reportan en los espectros de la figuras 33d (piña) y 34d (yuca) para el pico 5.

En general se puede decir, que los PHAs obtenidos de los residuos de piña y yuca por procesos de fermentación, mostraron los tiempos típicos de retención para este tipo de estructuras, indicando que pueden contener cadenas de carbono entre 6 a 8, además se confirma la presencia de dos tipos de unidades monoméricas como son el PHB y PHV, reforzando las hipótesis manejadas con los análisis de DSC y RMN ^1H y ^{13}C . Por último, las relaciones de m/z para el grupo metil ester, corresponden con la formación de dos estructuras monoméricas del tipo PHB y PHV.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE FIBRAS OBTENIDAS POR ELECTROSPINNING.

En la Figura 36 se muestran las fotografías de las microfibras a 100 micras (36a), longitud de beads (36b), tamaño de fibra (36c) y diámetro de beads (36d), correspondientes a las micro-fibras aleatorias obtenidas a partir del polihidroxialcanoato obtenido por residuos de cascara de yuca.

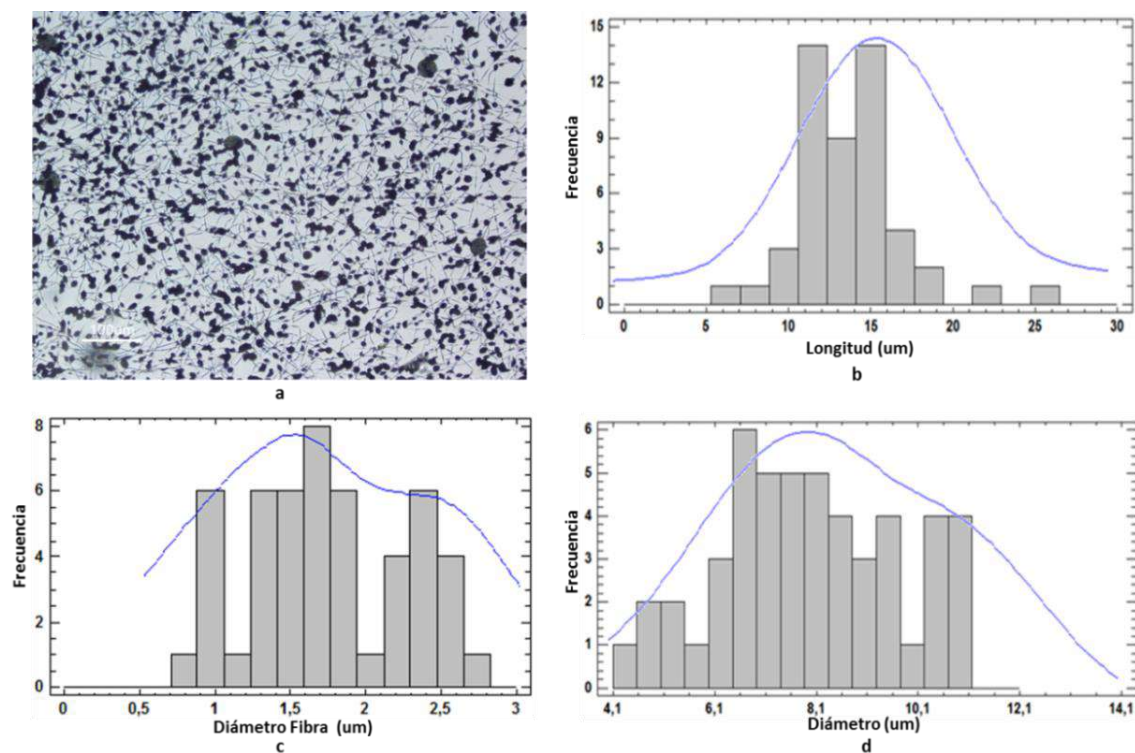


Figura 36. Análisis histografico de los diámetro de las microfibras y beads, para las microfibras aleatorias, obtenidas de PHA a partir de residuos de cascaras de yuca

En las Figura 37 se muestran las fotografías de SEM correspondientes a las nanofibras aleatorizadas obtenidas a partir del PHA obtenido por residuos de cascaras de yuca.

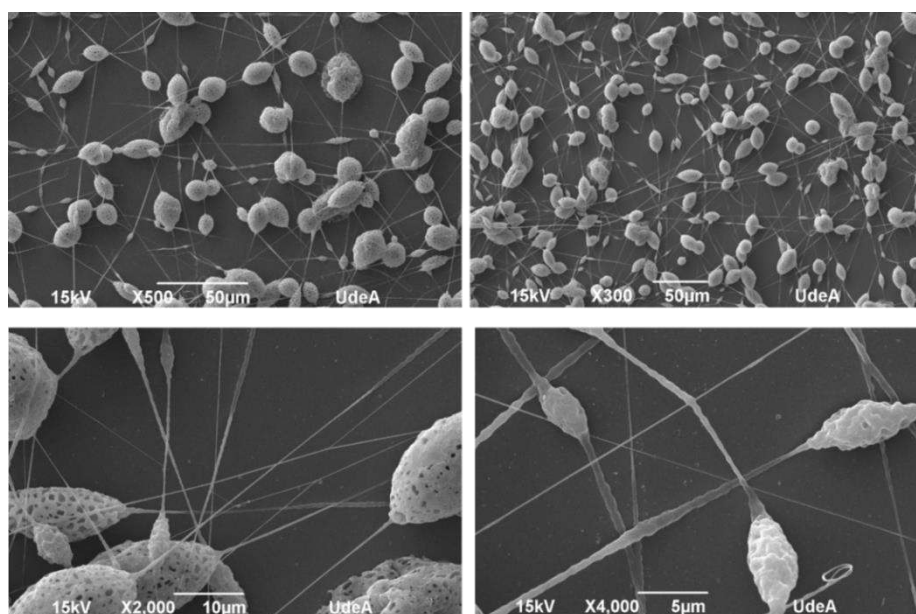


Figura 37. Fotografías SEM para las microfibras aleatorias, obtenidas de PHB a partir de residuos de cascaras de yuca.

De las figuras 36a y 37, se puede observar que fue posible obtener unas fibras que estructuralmente se conocen como scaffold, estos contienen dos tipos de estructuras, fibras y beads, las fibras son las líneas continuas en orden aleatorio, los beads son las formas geométricas de forma elíptica que interrumpen las fibras, también los “beads”, pueden ser definidos o ser considerados como una desintegración capilar de los chorros del polímero por la acción de la tensión superficial (Chronakis y Frenot 2003). De la figura 37 se puede ver que las fibras son de tamaño micrométrico y que algunos beads son de estructura porosa. Además se observa un alto % de beads en la estructura general del scaffold. En promedio el tamaño de las fibras fue de 1.7 micras (fig. 37c), en tanto que el diámetro y longitud promedio de los beads fue de 6.2 y 15 micras, (fig. 37d) y (fig. 37b) respectivamente.

En las Figura 38 se muestran las fotografías de las microfibras a 100 micras (38a), longitud de beads (38b), tamaño de fibra (38c) y diámetro de beads (38d), correspondientes a las micro-fibras lineales obtenidas a partir del polihidroxialcanoato obtenido por residuos de cascaras de yuca.

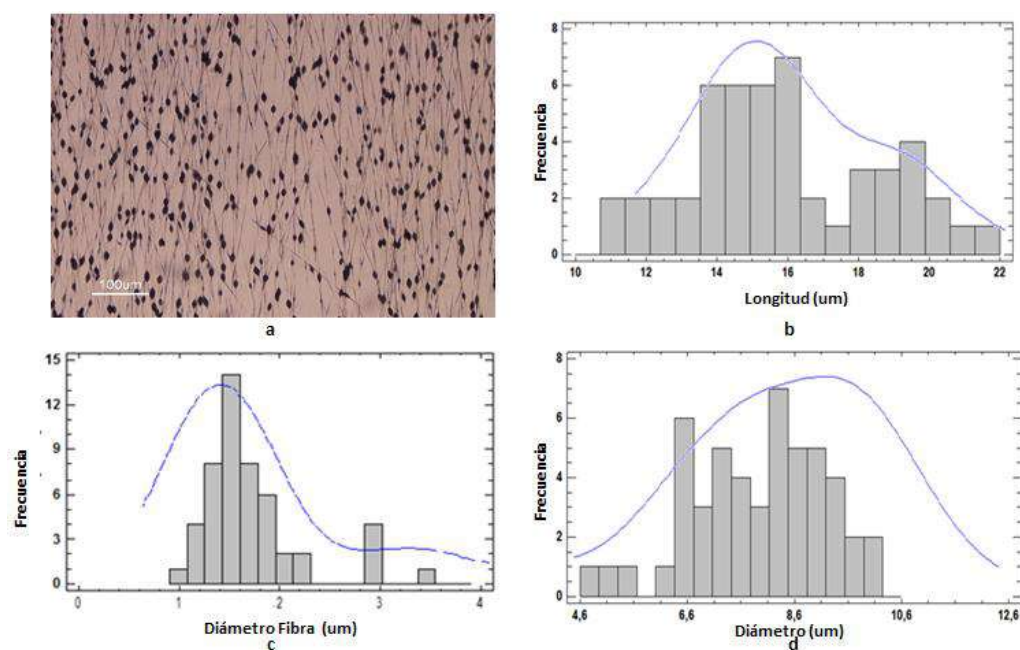


Figura 38. Análisis histografico de los diámetro de las microfibras y beads, para las microfibras alineadas, obtenidas de PHB a partir de residuos de cascaras de yuca

En las Figura 39 se muestran las fotografías de SEM correspondientes a las nanofibras lineales obtenidas a partir del polihidroxialcanoato obtenido por residuos de cascaras de yuca. De la figuras 38a y 39, se puede observar que fue posible obtener unos scaffolds conformados por microfibras de tipo lineal que contienen dos tipos de estructuras, De la figura 39, se puede ver que las fibras son de tamaño micrométrico y que algunos beads son de estructura porosa. Además se observa un alto % de beads en la estructura general del scaffold. En promedio el tamaño de las fibras lineales fue de 1.8 micras (fig. 38c), en tanto que el diámetro y longitud promedio de los beads fue de 6.2 y 14 micras, (fig. 38d) y (fig. 38b) respectivamente.

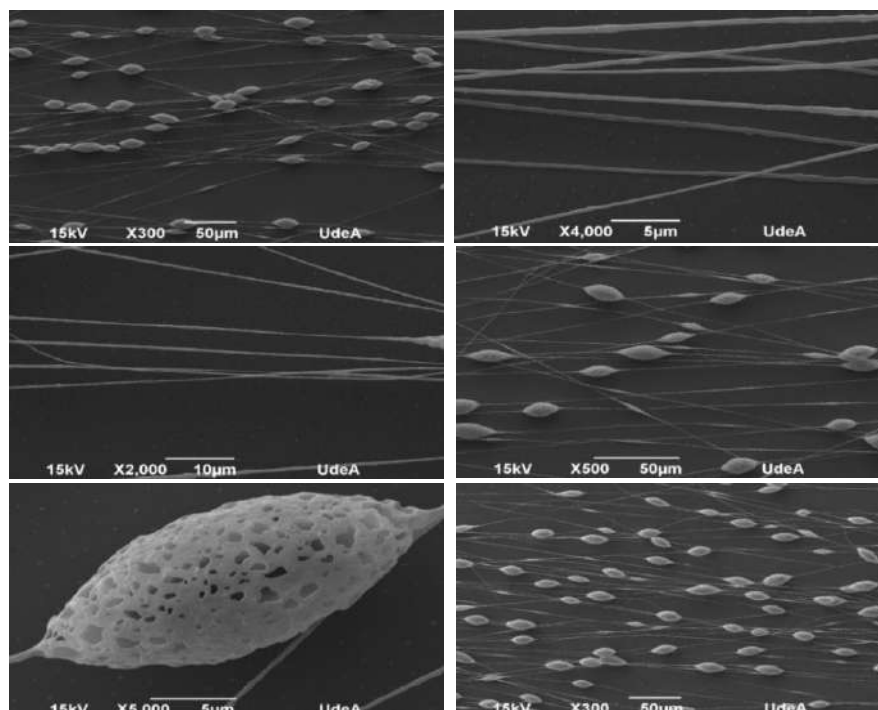


Figura 39. Fotografías SEM para las microfibras alineadas. obtenidas de PHB a partir de residuos de cascara de yuca

En las Figuras 36c y 37c, se pueden ver las distribuciones de los diferentes tamaños de las microfibras obtenidas de los scaffolds tanto para las estructuras aleatorias como las lineales, en general el diámetro promedio de las microfibras alineadas osciló en los siguientes valores: 1.72, 2.05, 1.84 y 1.85 μm (estos valores corresponden a diferentes fotografías tomadas a varias microfibras lineales obtenidos, ver Anexo 3 de electrospinning); en tanto que el diámetro de las microfibras aleatorias osciló entre 1.56, 1.24 ± 0.25 , 1.75 y 1.61 μm (estos valores corresponden a diferentes fotografías tomadas a varias scaffold aleatorios obtenidos, ver Anexo 3 de electrospinning); sin embargo diversos autores reportan que el tamaño de la fibras, que se obtienen por electrospinning se ve afectado por la viscosidad del sistema, tipo de polímero y, el tipo de disolvente, peso molecular del biopolímero, temperatura, humedad relativas, flujo de alimentación etc (Li y Wang, 2013; Ramakrishna et al., 2005). Dado lo anterior se obtendrán diámetros diferentes en función de las variables de proceso, sin embargo valores similares de diámetro de fibra a los obtenidos en este trabajo son reportados por Misra et al. (2014), quienes mezclaron diferentes tipos de biopolímeros como son el Poli(ácido L-láctico) (PLA)/Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), en CHCl_3 y DMF, logrando microfibras entre 0.45 y 1.517 μm , este último valor similar al obtenidos para las fibras alineadas y aleatorias del presente trabajo. Volova et al. (2014) obtuvieron fibras de tamaños similares a las obtenidas en el presente estudio, con tamaños entre los 0.45 a 3.14 μm a partir de muchos tipos de PHAs como el P3HB, P(3HB-co-4HB), P(3HB-co-4HV) y el P(3HB-co-4HHx), variando condiciones de proceso tales como, concentraciones del polímero, flujo de alimentación, distancia de trabajo, y voltaje aplicado; concluyendo que ninguna de las fibras obtenidas presentaron problemas cuando se usaron en ratones, para recuperar tejidos, por lo que se pueden usar como scaffolds.

En la literatura se reportan diversos diámetros de las fibras obtenidas por electrospinning, estos de menor diámetro a los reportados en este estudio, los cuales están en función del tipo de PHA, tipo de solvente, diámetro del capilar, entre otras condiciones del procesos de electrospinning; en general los valores de diámetro reportados por la mayoría de trabajos están en la escala de los nanómetros; en ese sentido Sudesh et al. (2015) obtuvieron nanofibras de un diámetro entre 400 a 1700 nm, para una fibras formadas a partir de Paclitaxel entre un 0-5% de concentración y P(3HB-co-95 mol% 4HB) concentrado al 10%, usando como solventes el CHCl_3 y DMF. Xing et al. (2014) lograron conseguir unas nanofibras de un diámetro de 150-200 nm, mezclando Fibras de Carbono-PHA, usando una distancia entre el capilar y el plato colector de 16 cm y un voltaje que varió entre 5 a 20Kv. Ramier et al. (2014) consiguieron unas nanofibras de 640 ± 80 nm de diámetro, al mezclar hidroxiapatita con un poli (3-hidroxibutirato), con el fin de aplicarlo como tejido en huesos. Sun et al. (2014) caracterizaron el diámetro de nanofibras obtenidas a partir de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato), los cuales fueron disueltos en DMF/ CHCl_3 , con diámetros que oscilaron entre los 430–1000 nm; sin embargo estos autores determinaron que a mayor adición de DMF el tamaño de la nanofibra se podía reducir, en ese sentido lograron ajustar el tamaño de las fibras de 300 a 500 nm, manteniendo una disolución del polímero del 3% y una mezcla de 20% de DMF y 80% de Cloroformo. Canadas et al. (2014), determinaron diámetros de nanofibras entre 600-1400 nm, las cuales se lograron desarrollar a partir de un PHB obtenido de la cepa *Cupriavidus necator* DSM 545, las condiciones de dicho ensayo fueron una disolución del polímero al 4% en cloroformo, la distancia entre el plato colector y el capilar entre los 15 a 20 cm, el flujo de polímero de 1.2 ml/h y un voltaje que oscilo entre 20 a 30Kv.

En las figuras 37 y 39, se puede apreciar que las microfibras obtenidas también están conformadas por “beads”, lo cual en muchos casos no es deseable, ya que se consideran como un defecto de las fibras (Deitzel et al., 2001); Se puede decir que los “beads” formados tienen una longitud promedio de 15.02 , 15.86, 15.60 y 14.97 μm , para el caso de las microfibras alineadas (fig. 38b) ; en tanto que la longitud de los “beads” para las fibras aleatorias oscilo entre 14.12, 11.77, 13.46 y 13.50 μm (fig. 37b). Para el caso de los diámetros de los “beads”, estos fueron de 7.34, 6.52, 7.98 y 7.49 μm para las fibras aleatorias (fig. 37d); en el caso de la fibras alineadas los diámetros estuvieron en el rango de 7.92, 8.13, 6.71 y 7.10 μm (fig. 38d). se podría decir que los tamaños de los beads, tanto en las fibras aleatorias como alineadas tuvieron tamaños similares, lo que puede implicar que en las disoluciones quedaron preparadas de igual manera y que las condiciones de procesos fueron similares para la obtención de ambos tipos de fibras; aunque la literatura no reporta valores de mediciones de beads, estos se pueden formar debido a que la estabilidad del chorro a la salida del capilar disminuye a medida que aumenta la tensión superficial de la disolución del polímero, además por la densidad y la carga de neutralización de la misma (Deitzel et al. (2001). Sin embargo la forma de los “beads” está influenciada por el voltaje aplicado en términos de la tensión superficial critica, pudiéndose forma esféricas o en forma de huso, así mismo a una mayor tensión superficial tenderán a existir una mayor densidad de “beads” además de que el diámetro de las mismas se incrementará (Ramakrishna et al., 2005). En cuanto al voltaje aplicado Demir et al. (2002) y Deitzel et al. (2001), coinciden en que a mayor voltaje se incrementa la posibilidad de obtener “beads” en las fibras. Por otro lado la tensión superficial del sistema es

afectada según el tipo de solvente; autores como Yang et al. (2004), recomiendan mantener fija la concentración y evaluar la tensión superficial con diferentes tipos de solventes, con la menor tensión superficial se podrán obtener fibras más lisas y con menos “beads”. Según Eda y Shivkumar (2007) y Lee et al. (2003) una alta concentración de polímero puede dar lugar a la formación de nanofibras y “beads”; así mismo Li y Wang (2013) y Ramakrishna et al. (2005) coinciden en que a mayor flujo también hay un mayor tamaño en la fibra y en los “beads”; los problemas anteriormente mencionados también son reportados por Larrondo y Manley (1981) y Fong y Reneker (1999). Sin embargo autores como Fong et al. (1999) y Chronakis y Frenot (2003) proponen incrementar la temperatura de la solución para disminuir la cantidad de beads en las fibras. Finalmente Misra et al. (2014) encontraron que al incrementar la concentración de ácido poliláctico, en la mezcla de biopolímeros para la obtención de fibras, la formación de beads, también disminuye.

5. CONCLUSIONES.

En general se puede concluir que los residuos de yuca y piña tienen potencial uso para la producción de polihidroxicanoatos, ya que el análisis proximal de los mismos mostraron un contenido apropiado de carbohidratos, los cuales son susceptibles de transformación en azúcares por procesos de hidrólisis; además los minerales encontrados, pueden ser usados por la cepa para su crecimiento. Así mismo, el proceso de hidrólisis ácida fue un método adecuado para el pretratamiento de los residuos de cascara de piña y yuca, ya que transformó los mismos en azúcares los cuales sirvieron de fuente de carbono para los procesos de fermentación. Se concluye que las condiciones de fermentación que arrojaron las mayores producciones de PHA fueron la 8 y 9, para los residuos de yuca y piña, respectivamente.

Con respecto a la caracterización del biopolímero, se puede concluir tanto los PHAs obtenidos a partir de los residuos hidrolizados de yuca y piña, mostraron en el FTIR los grupos funcionales característicos de este tipo de biopolímeros, los cuales corresponden a los grupos OH, C-H, C=O, C-O-C, C-O; para el caso del DSC ambos tipos de PHAs, las muestras presentan más de una temperatura de fusión claramente observable, lo anterior debido a la presencia de diferentes longitudes de cadena en el polímero, lo que puede dar indicios de la presencia de un copolímero o de dos tipos de polímeros formados; también se concluye que los PHAs obtenidos tienen una mayor fase amorfa y de características elastoméricas, esto en función de los valores de cristalinidad arrojados, además la T_g está desplazada a puntos donde indica una fase más amorfa. Por otro lado, el análisis de ^1H RMN permite evidenciar que las señales concuerdan con la obtención de un copolímero PHBHV o la formación de dos tipos de biopolímeros PHB y PHV, lo cual se confirma con los desplazamientos encontrados para los grupos CH_3 y CH. Así mismo, los resultados de RMN ^{13}C , evidencian desplazamientos típicos asociados a los grupos CH_3 , CH_2 , CH y C=O, correspondientes a la presencia del PHB y PHV. Aunque las señales mostradas para los espectros de ^1H RMN muestran señales de desplazamiento similares para los diferentes grupos funcionales de cada PHA obtenidos por ambos tipos de residuos, se evidencia que la composición molar de HV y HB sí varía en función de la condición de fermentación. Por último, El análisis de GCM, sugiere que el PHA obtenido para los dos residuos y condiciones de fermentación puede ser un monómero de 4 carbonos asociado al PHB o de 5 Carbonos asociado al PHV.

Finalmente se puede concluir que es posible obtener microfibras, tanto alineadas como aleatorias por medio de la técnica de electrospinning, usando el PHA obtenido de los residuos hidrolizados de las cascara de yuca. Las microfibras, están conformadas por dos tipos de estructuras, una parte lineal o fibras propiamente dichas y por unas estructuras denominadas beads. Es deseable construir microfibras sin beads; sin embargo se puede decir que es posible construir un scaffold con las microfibras de PHA, los cuales tienen potencial aplicación en la industria de biomedicina.

Quedan como retos, establecer protocolos de fermentación en reactores de 5 litros, para aumentar la capacidad de producción del biopolímero, que aseguren condiciones constantes a las bacterias. Con respecto a las aplicaciones del biopolímero, se debe mejorar el proceso de electrohilado con miras a disminuir el tamaño de la fibra y reducir el porcentaje de “beads”, que se

formaron en el scaffod, además de buscar las formas de emulsionar ya sea agentes bioactivos para aplicaciones en alimentos o farmacéuticos. Otra aplicación a desarrollar es la siembra de células madres en las fibras y desarrollar aplicaciones para recuperación de pieles o huesos.

6. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abd-El-haleem, D., Amara, A., Zaki, S., Abuelhamd, A., Abuelreesh, G., 2007. Biosynthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates biopolymers in genetically modified yeasts. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 4, 513-520.
2. Adams J.H., Irving, G., Koeslag, J.H., Lochner, J.D., Sandell, R.C., Wilkinson, C., 1987. Beta-adrenergic blockade restores glucose's antiketogenic activity after exercise in carbohydrate-depleted athletes. *J. Physiol. Lond.* 386, 439-454.
3. Adeoye, A., Lateef, A., Gueguim-Kana, E., 2015. Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus Niger* on cassava peel substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4, 468-574.
4. Aderemi, F., Nworgu, F., 2007. Nutritional Status of Cassava Peels and Root Sieviate Biodegraded With *Aspergillus niger*. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 2 (3), 308-311.
5. Agudelo, L. 2011. La industria bananera y el inicio de los conflictos sociales del siglo XX. Banco de la Republica. En: <http://www.banrepcultural.org/blaavirtual/revistas/credencial/junio2011/industria-bananera-agudelo>.
6. AGRONET. <http://www.agronet.gov.co/Paginas/estadisticas.aspx>. Febrero 2 de 2016.
7. Aimaretti, N., Ybalo, C., Escorcía, M., Codevilla, A., Rojas, M. L., Plou, F., 2011. Obtención de bioetanol de segunda generación a partir de residuos agroindustriales. Disponible en: http://fich.unl.edu.ar/CISDAV/upload/Ponencias_y_Posters/Eje06/Aimaretti_Ybalo_Escorcía_Cod evilla_Rojas_Plou_Yori/Aimaretti_OBTENCION_DE_BIOETANOL_DE_SEGUNDA.pdf
8. Ajila, C., Aalami, M., Leelavathi, K., Prasada, U., 2010. Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11, 219-224.
9. Alarcón, F., Dufour, D., 1998. Almidón agrio de yuca en Colombia: producción y recomendaciones. CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
10. Al-Shorgani, N., El-Mubarak, T., Ehsan, A., Hamid, A., Mohtar, W., 2013. Biohydrogen production from agroindustrial wastes via *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4(ATTC 13564). *Clean Technology Environmental Policy*. DOI 10.1007/s10098-013-0586-6.
11. Alzate, A., 2009. Variabilidad genética y grado de adopción de la yuca (*Manihot esculenta* crantz) cultivada por pequeños agricultores de la costa atlántica colombiana. Universidad Nacional de Colombia-Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Postgrados, Palmira.
12. Anderson, A., Haywood, G., Ewing, D., Dawis, E., 1990. Accumulation of a Polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-Hydroxydecanoate from simple Carbohydrate

Substrates by *Pseudomonas* sp. Strain NCIMB 40135. *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 3354-3359.

13. Anderson, J., Dawes, E., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev*. 54, 450-472.
14. AOAC. Official Method 985.35. AOAC Official Methods of Análisis. 2005. Cp 50, p 15
15. Arvanitoyannis, I., Kassaveti, A., Ladas, D., 2008. Food waste treatment methodologies. *Waste Management for the Food Industries*. 345-359.
16. Ashby, R., Foglia, T., Solaiman, D., Liu, C., Nuñez, A., Eggink, G., 2000. Viscoelastic properties of linseed oil-based medium chain length poly (hydroxyalkanoate) films: effects of epoxidation and curing. *International Journal of Biological Macromolecules*. 27, 355-361.
17. Ashby, R., Solaiman, D., Foglia, T., 2004. Bacterial Poly(hydroxyalkanoate) Polymer Production from the Biodiesel Co-Product Stream. *Journal of Polymers and the environment*. 12 (3),105-112.
18. Ashby, R., Solaiman, D., Foglia, T., 2005. Synthesis of Short-/Medium-Chain-Length Poly(hydroxyalkanoate) Blends by Mixed Culture Fermentation of Glycerol. *Biomacromolecules*. 6, 2106-2112.
19. Ashby, R., Solaiman, D., Foglia, T., 2002. The synthesis of short and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) mixtures from glucose -or alkanoic acid-grown *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of industrial Microbiology and biotechnology*. 28, 147-153.
20. Autret, E., Berthier, F., Luszezanec, A., Nicolas, F., 2007. Incineration of municipal and assimilated wastes in France: Assessment of latest energy and material recovery performances. *Journal of Hazardous Materials*. 139, 569–574.
21. Badui, S., 2006. Química de los alimentos. Cuarta edición. Editorial Pearson Adisson Wesley. pp. 92-96.
22. Bajes, F., 1998. La yuca: un ingrediente estratégico en la fabricación de alimentos balanceados. Colección de documentos IICA serie competitividad No. 11 para animales.
23. Ballistreri, A., Impallomeni, G., Carnemolla, G., Guglielmino, S., Nicolò, M., Cambriac, M., 2011. Synthesis and characterization of poly(3-hydroxyalkanoates) from *Brassica carinata* oil with high content of erucic acid and from very long chain fatty acids. *International Journal of Biological Macromolecules*. 48, 137–145.
24. Baltes, W., 2007. Química de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 178-181.

25. Banco Interamericano De Desarrollo. 2010. Disponible en: <http://www6.iadb.org/Residuos/informacion/InfoPais.bid;jsessionid=76DD112901D5986B3BCB68C813E181B9>.
26. Bandaru, V., Imandi, S., Somalanka, R., Bandaru, S., Garapati, R., 2008. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. *Bioresource Technology*. 99, 4445–4450.
27. Bansal, N., Tewari, R., Soni, R., 2012. Production of cellulases from *Aspergillus Niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*. 32, 1341-1346.
28. Bansal, N., Tewari, R., Soni, R., 2012. Production of cellulases from *Aspergillus Niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*. 32, 1341-1346.
29. Barbosa, M., Espinosa, A., Malagón, D., Moreno, N., 2005. Produccion de Poli- β -hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Revista de la Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana*. 10, 45-54.
30. Barradas, A., 2009. Gestión integral de los residuos sólidos municipales Estado del arte. Tesis Doctoral Ciencias en Ingeniería Ambiental por la Universidad Politécnica de Madrid. pp. 167. Disponible en: oa.upm.es/1922/1/Barradas_MONO_2009_01.pdf
31. Beres, C., Fernanda, F., Simas-Tosin, J., Cabezudo, I., Freitas, S., Lacomini, M., Mellinger-Silva, C., Cabral, M., 2016. Antioxidant dietary fibre recovery from Brazilian Pinot noir grape pomace. *Food Chemistry*. 201, 145–152.
32. Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., Fuller, R.C., 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(B-hydroxyalkanoates) for potential application as biodegradable polyester. *Appl Environ Microbiol*. 54,1977-1982.
33. Brandl, H., Bachofen, R., Mayer, J., Wintermantel, E., 1995. Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates, *Can. J. Microbiol*. 41, 143–153.
34. Buchko, C.J., Chen, L.C., Shen, Y., Martin, D.C., 1999. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*. 40, 7397–407.
35. Budde, C., Riedel, S., Hübner, F., Risch, S., Popovic, M., Rha, C., Sinskey, A., 2011. Growth and polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* in emulsified plant oil medium. *Applied microbiology Biotechnology*. 9, 1611-1619.
36. Byrom, D., 1987. Polymer synthesis by microorganisms: Technology and economies, *Trends Biotechnol*. 5, 246–250.

37. Caballero, H. 2008. "Municipio de San Pedro de Urabá Potencial Agroindustrial, Turismo – Ventajas y Financiación". Plan de desarrollo Municipio San pedro de Uraba 2008-2011.
38. Cavalheiro, J., Fonseca, M., Grandfils, C., Almeida, C. 2009. Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. Process Biochemistry. 44, 509-515.
39. Calvo, A., 2013. Análisis y simulación numérica del proceso de biodegradación por hidrólisis de biopolímeros en aplicaciones biomédicas. Departamento Mecánica de Medios Continuos y Teoría de Estructuras. Escuela Técnica Superior de ingeniería. Universidad de Sevilla. Proyecto fin de carrera, ingeniería industrial.
40. Campos, M., Figueiredo, T., Sousa, L., Druzian, J., 2014. The influence of crude glycerol and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. Industrial Crops and Products. 52, 338-346.
41. Canadas, R., Ferreira, F., Cavalheiro, J., Guerreiro, J., Almeida, C., Pollet, E., Da Silva, C., Fonseca, M., 2014. Polyhydroxyalkanoates: Waste glycerol upgrade into electrospun fibrous scaffolds for stem cells culture. International Journal of Biological Macromolecules. 71, 131-140.
42. Cañas, Z., Restrepo, D., Cortés, M., 2011. Revisión: Productos Vegetales como Fuente de Fibra Dietaria en la Industria de Alimentos. Revista Facultad Nacional Agraria Medellín. 64, 6023-6035.
43. Casella, S., Basaglia, M., Toffano, P., Povolo, S., 2010. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. Bioresource Technology. 101, 7902-7907.
44. Casini, E., Rijk, T., Waard, P., Eggink, G., 1997. Synthesis of Poly(hydroxyalkanoate) from Hydrolyzed Linseed oil. Journal of environmental polymer Degradation. 5, 153-158.
45. Castilho, L. R., Mitchell, D. A., Freire, D. M. G., 2009. Bioresource Technology. 100, (23), 5996-6009.
46. Ceballos, H., 2002. La yuca en Colombia y el Mundo: Nuevas Perspectivas para un Cultivo Milenario. CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
47. Ceballos, H., Ospina B., 2002. La yuca en el tercer milenio, Sistemas Modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
48. Cerón, I., Cardona, C., 2011. Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja. Ingeniería y Ciencias. 13, 65-86.

49. Cerrato, I., 2013. Estudio de mercado para la comercialización de piña Md2. Secretaria de Agricultura y ganadería. Programa Nacional de Desarrollo Agroalimentario.
50. Cetkovic, G., Savatovic, S., Canadanovic-Brunet, J., Djilas, S., Vulic, J., Mandic, A., Cetojevic- D. S. 2012. Valorization of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. Food Chemistry. 133, 938-945.
51. Chahal, S., Hussain, F., Kumar, A., Rasad, M., Yusoff, M., 2016. Fabrication, characterization and in vitro biocompatibility of electrospun hydroxyethyl cellulose/poly (vinyl) alcohol nanofibrous composite biomaterial for bone tissue engineering. Chemical Engineering Science. 144, 17–29.
52. Chen, G., Luo, R., Chen, J., Zhang, L., 2006. Polyhydroxyalkanoate copolyesters produced by *Ralstonia eutropha* PHB-4 harboring a low-substrate-specificity PHA synthase PhaC2_{ps} from *Pseudomonas stutzeri* 1317. Biochemical Engineering Journal. 32, 218-225.
53. Chen, G., Luo, R., Chen, J., Zhang, L., 2006. Polyhydroxyalkanoate copolyesters produced by *Ralstonia eutropha* PHB-4 harboring a low-substrate-specificity PHA synthase PhaC2_{ps} from *Pseudomonas stutzeri* 1317. Biochemical Engineering Journal. 32, 218-225.
54. Chen, G.Q., Wu, Q., 2005. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials. 26, 6565-6578.
55. Chen, J., Yan, Q., Du, G., 2003. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by *Ralstonia eutropha*. Process Biochemistry. 39, 387-391.
56. Chen, J., Zhang, L., Chen, J., Chen, G., 2007. Biosynthesis and characterization of Polyhydroxyalkanoate copolyesters in *Ralstonia eutropha* PHB-4 harboring a low-substrate specificity PHA synthase PhaC2_{ps} from *Pseudomonas stutzeri* 1317. Chin. Journal Chemical Eng.
57. Cheremisinoff, N., 1996. Polymer Characterization, Laboratory Techniques and Analysis. Edt. Noyes Publications. Westwood, New Jersey, U.S.A.
58. Choi, C., Lee, E., 1997. Structural identification of polyhydroxyalkanoic acid (PHA) containing 4-hydroxyalkanoic acids by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and its application to bacteria screening. Biotechnology Techniques. 11 (3), 167–171.
59. Choi, J., Lee, S.Y., 2000. Economic considerations in the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial fermentation. Appl Microbiol Biotechnol. 53, 646-649.

60. Chronakis, I., Frenot, A., 2003. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 8, 64–75.
61. Chuan, S., Zhang, L., Hong Yu, S., 2014. Nanoparticles meet electrospinning: recent advances and future prospects. *Chem Soc Rev*. 43, 4423-4448.
62. Cornibert, J., Marchessault, R., 1972. Physical properties of poly-hydroxybutyrate. IV. Conformational analysis and crystalline structure. *J Mol Biol*. 71, 735-756.
63. Costa, M., Torres, M., Magariños, H., Reyes, A., 2010. Producción y purificación parcial de las enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuu* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2, 163-175.
64. Costa, M., Lerchundi, G., Villarroel, F., Torres, M., Schobitz, R., 2009. Producción de la enzima fitasa de *Aspergillus ficuu* con residuos agroindustriales en fermentación sumergida y sobre sustrato sólido. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 1, 73-83.
65. Cramm, R., 2009. Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 16: 38–52.
66. Cristhiane, K., Claudemir, R., Amanda, B., Ida, M., Marcus, A., Carlos, R., Regina, V., André, O., 2012. Bioconversion of cassava starch by-product into *Bacillus* and related bacteria polyhydroxyalkanoates. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458 DOI: 10.2225/vol15-issue3-fulltext-6.
67. Da Silva, D., Nogueira, G., Duzzioni, A., Barrozo, M., 2013. Changes of antioxidant constituents in pineapple (*Ananas comosus*) residue during drying process. *Industrial Crops and Products*. 50, 557– 562.
68. Dawes, E.A., Senior P.J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol*. 10, 135-266.
69. Debiagi, F., Kobayashi, R., Nakazato, G., Panagio, L., Mali, S., 2014. Biodegradable active packaging based on cassava bagasse, polyvinylalcohol and essential oils. *Industrial Crops and Products*. 52, 664– 670.
70. Deitzel, J., Kleinmeyer, J., Harris, D., Tan, N., 2001. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*. 42, 261–272.
71. Demir, M.M., Yilgor, I., Yilgor, E., Erman, B., 2002. Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer*. 43,11: 3303–3309.
72. Demirbas, A., 2007. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects. 29, (5), 419 - 424.

73. Dhanasekaran, D., Lawanya, S., Saha, S., Thajuddin, N., Panneerselvam, A., 2011. Production of single cell protein from pineapple waste using yeast. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 8, 26-32.
74. Diaz, A., Andler, R., Martinez, I., Peña, C., 2016. Poly-3-hydroxybutyrate production by *Azotobacter vinilandii* strains in batch cultures at different oxygen transfer rates. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*. 91, 1063-1071.
75. Dietrich, K., Dumont, M., Del Rio, L., Orsat, V., 2016. Producing PHAs in the bioeconomy — Towards a sustainable bioplastic. *Sustainable Production and Consumption*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.spc.2016.09.001>. Artículo en edición.
76. Doi, Y., Kitamura, S., Abe, H., 1995. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*. 28, 4822-4828.
77. Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., Soga, K.' 1986. H. Analysis of Poly(/3-hydroxybutyrate) Isolated from *Bacillus megaterium* and I3C NMR. *Macromolecules*. 19, 1274-1276.
78. Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., Soga, K., 1986. Nuclear Magnetic Resonance Studies on Poly(&hydroxybutyrate) and a Copolyester of P-Hydroxybutyrate and P-Hydroxyvalerate Isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Macromolecules*. 19, 2860-2864.
79. Dominguez, M., Meneses, A., Romo, A., Peña, C., Segura, D., Espin, G., 2015. Thermo-mechanical properties, microstructure and biocompatibility in poly- β -hydroxybutyrates (PHB) produced by OP and OPN strains *Azotobacter vinelandii*. *European Polymer Journal*. 63, 101-112.
80. Duque, L., Rodríguez, L., López, M., 2014. ELECTROSPINNING: LA ERA DE LAS NANOFIBRAS. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 14, 10-27.
81. Eda, G., Shivkumar, S., 2007. Bead-to-fiber transition in electrospun polystyrene. *J Appl Polym Sci*. 106 (1), 475–487.
82. Elemike, E., Oseghale, C., Okoye, A., 2015. Utilization of cellulosic cassava waste for bio-ethanol production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 3, 2797–2800.
83. Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., Attia, H., 2011. Dietary fiber and fiber-rich by-products of food processing: Characterization, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*. 124, 411-421.
84. Estrada, L., Fonnegra, C., Martinez, J., 2010. Plan de exportación de piña deshidratada con destino a Alemania. Trabajo de grado, Administración de Empresas Facultad de Administración Universidad del Rosario. Bogotá D.C.

85. FAO. (1997). Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w5800s/w5800s12.htm>. Febrero 2 de 2016
86. FAO. <http://www.fao.org/statistics/es/>. Febrero 2 de 2016.
87. Fong, H., Chun, I., Reneker, D., 1999. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*. 40, 4585–4592.
88. Fong, H., Reneker, D., 1999. Elastomeric Nanofibers of Styrene–Butadiene–Styrene Triblock Copolymer. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*. 37, 3488–3493.
89. Forero, S., Ochoa, M., 2009. Situación de la disposición final de residuos sólidos en Colombia – diagnostico. Superintendencia de Servicios Públicos de Colombia. Disponible en: http://www.superservicios.gov.co/home/c/document_library/get_file?uuid=bcd04c23-976c-4244-9ed5-1685b66824fe&groupId=10122.
90. Frazzetto, G., 2003. White biotechnology? the application of biotechnology to industrial production holds many promises for sustainable development, but many products still have to pass the test of economic viability. *EMBO Rep*. 4, 835-837.
91. Gallur, M., 2011. Biopolímeros como material de envase. Caso práctico: Sector cosmético. Instituto Tecnológico de Embalaje Transporte y Logística. ITENE. Barcelona.
92. Gamboa, B., 2009. Aprovechamiento de los residuos obtenidos del proceso de despulpado del mango (*mangifera indica L.*), de las variedades *smith*, *tommy atkins*, *haden* y *bocado* como materias primas para la obtención de pectinas. Tesis de Maestría Ciencias de los Alimentos. Puerto La Cruz. Universidad de Oriente Núcleo de Anzoátegui Postgrado en Ciencias e Ingeniería de los Alimentos.
93. Garcia, M., Vidal, T., Tibério de Jesus, A., Rodrigues, S., 2013. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. *Food Chemistry*. 139, 261–266.
94. Gáscue, B., Manosalva, J., Liendo, G., Nonato, R., Rosse, C., 2000. Caracterización a partir de la microscopía óptica de luz polarizada, las propiedades térmicas y la espectroscopía del termoplastico biodegradable poli(hidroxibutirato). *Revista latinoamericana de metalurgia y materiales*. 20, 47-53.
95. Gassara, F., Brar, S., Tyagi, R., Verma, M., Surampalli, R., 2008. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*. 49, 388-394.
96. Gongora, J. 2014. La industria del plástico en México y el mundo. *Comercio Exterior*. 64, 6-9.

97. González, Y., Meza, J., González, O., Córdova, J., 2013. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29: (1) 77-115.
98. Guo, W., Tao, J., Chao, Y., Zhao, Q., Song, C., Wang, S., 2010. The rapid evaluation of material biodegradability using an improved ISO 14852 method with a microbial community. *Polymer Testing.* 29, 832–839.
99. Gutiérrez, E., Medina, G., Roman, M., Florez, O., Martínez, O., 2002. Obtención y cuantificación de fibra dietaria a partir de residuos de algunas frutas comunes en Colombia. *VITAE.* 9, 5-14.
100. Hajar, N., Zainal, S., Nadzirah, K., Roha, S., Atikah, O., Tengku, M., 2012. Physicochemical Properties Analysis of Three Indexes Pineapple (*Ananas Comosus*) Peel Extract Variety N36. *ICAAA 2012. APCBEE Procedia.* 4, 115 – 121.
101. Hajar, N., Zainal, S., Nadzirah, K., Roh, S., Atikah, O., Tengku, M., 2012. Physicochemical Properties Analysis of Three Indexes Pineapple (*Ananas Comosus*) Peel Extract Variety N36. *APCBEE Procedia.* 4, 115 – 121.
102. Happi, E., Ronkart, T., Robert, C., Wathelet, B., Paquot, M., 2008. Characterization of pectins extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design. *Food Chemistry.* 108, 463-471.
103. Hazer, B., Steinbüchel, A., 2007. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74, 1-12.
104. Hocking, P.J., Marchessault, R.H., 1994. Biopolyesters: In *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*. Edited by Griffin GJL. Blackie Academic & Professional. 48-96.
105. Hohman, M.M., Shin, M., Rutledge, G., Brenner, M.P., 2001. Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. *Physics of Fluids.* 13, 2221–2236.
106. Holmes, P., 1988. Biologically produced PHA polymers and copolymers. In: *Developments in crystalline polymers*, Bassett DC (ed), Elsevier. 2, 1-65.
107. Holmes, P.A., 1985. Applications of PHB — a microbially produced biodegradable thermoplastic, *Phys. Technol.* 16, 32–36.
108. Holmes, P.A., 1988. Biologically produced (*R*)-3-hydroxy-alkanoate polymers and copolymers, Elsevier.

109. Hong, K., Sun, W., Tian, Q., Chen, H., 1999. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51, 523-526.
110. Hoornweg, D., Bhada-Tata, P., 2012. What a waste. A global review of solid waste management. *World Bank.* 15, 8-22.
111. Hoyos, D., 2003. Polihidroxiálcanoatos. Monografía para optar por el título de Especialista en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Postgrado en Biotecnología. Medellín.
112. Huang, C., Xu, T., Zhang, Y., Xue, Y., Chen, G., 2007. Application of electrodialysis to the production of organic acids: State-of-the-art and recent developments. *Journal of Membrane Science.* 288, 1-12.
113. Huang, L., Liu, C., Liu, Y., Jia, X., 2016. The composition analysis and preliminary cultivation optimization of a PHA-producing microbial consortium with xylose as a sole carbon source. *Waste Management.* DOI: 10.1016/j.wasman.2016.03.020. In Press.
114. Huang, Z., Zhang, Y., Kotaki, M., Ramakrishn, S., 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology.* 63, 2223–2253.
115. Ishizaki, A., Tanaka, K., Zakpaa, H., 1999. Investigation of the Utility of Pineapple Juice and Pineapple Waste Material as Low-Cost Substrate for Ethanol Fermentation by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 87(5), 642-646.
116. Ismanto, A., Wang, S., Soetaredjo, F., Ismadji, S., 2010. Preparation of capacitor's electrode from cassava peel waste. *Bioresource Technology.* 101, 3534–3540.
117. ISO 14852. INTERNATIONAL STANDARD. Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium — Method by analysis of evolved carbon dioxide.
118. Iwata, T. Y., Doi, T., Tanaka, T., Akehata, M., Siromo, S., Teramachi. 1997. Enzymatic degradation and adsorption on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] single crystals with two types of extracellular PHB depolymerases from *Comomonas acidovorans* YM1609 and *Alcaligenes faecalis* T1. *Macro molecules.* 30, 5290–5296.
119. Jaturapiree, P., Phathiphotikun, R., Piwpan, P., Jaturapiree, A., 2014. Polyhydroxybutyrate (PHB), production by *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 from low-cost substrate as carbon source. *KKU Res. Journal.* 19, 53-59.
120. Jendrossek, D., Handrick, R., 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol.* 56, 403-432.

121. Kaewkannetra, P., Suwannasing, W., Imai, T., 2015. Cost-effective defined medium for the production of polyhydroxyalkanoates using agricultural raw materials. *Bioresource Technology*. 194, 67–74.
122. Katalinic, V., Mozina, S., Skroza, D., Generalic, I., Abramovic, H., Miloš, M., Ljubenkov, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., Boban, M., 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*. 119, 715-723.
123. Keasling, J., Aldor, I., Kim, S., Prather, K., 2002. Metabolic Engineering of a novel propionate-Independent Pathway for the Production of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 3848-3854.
124. Khan, N., 2012. Applications of electrospun nanofibers in the biomedical field. *Studies by undergraduate researchers at Guelph*. 5, 63-73.
125. Khanna, S., Srivastava, A., 2005. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*. 40, 2173–2182.
126. Ki, L., Alfin, K., Chun, X., Yi-Hsu, J., Suryadi, I., 2013. Bio-oil from cassava peel: A potential renewable energy source. *Bioresource Technology*. 145, 157–161.
127. Koller, M., Bona, R., Braunegg, G., Hermann, C., Horvat, P., Kroutil, M., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., Varila, P., 2005. Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and Surplus Materials. *Biomacromolecules*. 6, 561-565.
128. Koller, M., Mittelbach, M., Schober, S., Strohmeier, K., Kowalczyk, M., Adamus, G., Kwiecien, M., Schiller, M., Reiterer, A., Salerno, A., Rechberger, E., Muhr, A., 2013. Biodegradable latexes from animal-derived waste: Biosynthesis and characterization of mcl-PHA accumulated by *Ps citronellolis*. *Reactive & Functional Polymers*. 73, 1391-1398.
129. Kumar, D., Jain, V., Shanker, G., Srivastava, A., 2003. Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 38, 1725-1729.
130. Kumar, P., Ray, S., Kalia, V., 2016. Production of co-polymers of polyhydroxyalkanoates by regulating the hydrolysis of biowastes. *Bioresource Technology*. 200, 413-419.
131. Kurbanoglu, E., Algur, O., Zulkadir, A., 2004. Submerged production of edible mushroom *Agaricus bisporus* mycelium in ram horn hydrolysate. *Industrial Crops and Products*. 19, 225-230.

132. Kurniawana, A., Kosasiha, A., Febriantia, J., Jub, Y., Sunarsoc, J., Indraswatia, N., Suryadi, I., 2011. Evaluation of cassava peel waste as lowcost biosorbent for Ni-sorption: Equilibrium, kinetics, thermodynamics and mechanism. *Chemical Engineering Journal*. 172, 158– 166
133. Lameloise, M., Lewandowski, R., 2012. Recovering l-malic acid from beverage industry waste water: Experimental study of the conversion stage using bipolar membrane electrodialysis. *Journal of Membrane Science*. 403-404, 196– 202.
134. Langlois, V., Randriamahefa, S., Renard, E., Guérin, P., 2003. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Screening and Quantifying Production of PHAs by *Pseudomonas* Grown on Sodium Octanoate. *Biomacromolecules*. 4, 1092-1097.
135. Larrondo, L., Manley, J., 1981. Electrostatic Fiber Spinning from Polymer Melts. III Electrostatic Deformation of a Pendant Drop of Polymer Melt. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*. 19, 933-940.
136. Lee, K., Kim, H., Bang, H., Jung, Y., Lee, S., 2003. The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers. *Polymer*. 44, 14, 4029–4034.
137. Lee, S., 1998. Poly (3-hydroxybutyrate) production from xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess Engineering*. 18, 397-399.
138. Lee, S.Y., 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioeng*. 49, 1–14.
139. Lee, S., Lee, Y., Wang, F., 1999. Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnol Bioeng*. 65, 363-368.
140. Li, Z., Wang, C., 2013. One-Dimensional Nanostructures. In: Chapter 2 Effects of Working Parameters on Electrospinning. Edit. Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-36427-3_2. pp 15-28.
141. Lim, S., Hyun, Y., Lee, C., Choi, H., 2003. Preparation and characterization of microbial biodegradable poly(3-hydroxybutyrate)/organoclay nanocomposite. *Journal of Materials Science Letters*. 22, 299-302.
142. Lindsay, K., 1992. 'Truly degradable' resins are now truly commercial. *Modern Plastics*. 2, 62-64.
143. López-Cortés, A., Rodriguez, O., Latisnere, H., Mejía, H., Gonzalez, G., Lomelí, C., 2010. Characterization of polyhydroxyalkanoate and the *phaC* gene of *Paracoccus seriniphilus* E71 strain isolated from a polluted marine microbial mat. *World J Microbiol Biotechnol*. 26, 109-108.

144. Lopez-Cuellar, M., Flores, J., Graciada, J., Perez, F., 2011. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbón source. *International Journal of Biological Macromolecules*. 48, 74-80.
145. Lu, T., Qi, H., Ye, Z., Ren, H., Chen, N., Zeng, Q., Wu, X., 2016. Bioactivity assessment of PLLA/PCL/HAP electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Life Sciences*. 148, 139–144.
146. Macagnan, F., Rodrigues, L., Sampaio, B., De Moura, F., Bizzani, M., Da Silva, L., 2015. Biological properties of apple pomace, orange bagasse and passionfruit peel as alternative sources of dietary fibre. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 6, 1–6.
147. Madison, LL., Huisman, G., 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63, 21–53.
148. Manfait, M., Zeroual, W., Choisy, C., Doglia, S., Bobichon, H., Angiboust, J., 1994. Monitoring of bacterial growth and structural analysis as probed by FT-IR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1222, 171-178.
149. Martin, D., Williams, F., 2003. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*. 16, 97–105.
150. Martinez, M., Villano, M., Oliveira, C., Albuquerque, M., Majone, M., Reis, M., Lopez, A., Lagaron, J., 2013. Characterization of polyhydroxyalkanoates synthesized from microbial mixed cultures and of their nanobiocomposites with bacterial cellulose nonowhiskers. *New Biotechnology*. 00, 1-13.
151. Martínez, R., Torres, P., Meneses, M., Figueroa, J., Pérez-Álvarez, J., Viuda-Martos, M., 2012. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*. 135, 1520–1526.
152. Matsusaki, H., Abe, H., Doi, Y., 2000. Biosynthesis and Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by Recombinant Strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromolecules*. 1, 17-22.
153. Mc Naughten, D., Billman, H., Kansiz, M., 2000. Quantitative determination of the biodegradable polymer Poly(β -hydroxybutyrate) in a Recombinant *Escherichia coli* strain by use of Mid-Infrared Spectroscopy and multivariate statistics. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 3415-3420.
154. Mishra, S., Shrivastav, A., Bhumi, S., Imran, P., Deepti, J., Sandhya, M., 2010. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. *International Journal of Biological macromolecules*. 47, 283-287.

155. Misión Rural. Alianzas de paz para producción y comercialización de piña golden entre familias campesinas del norte del Departamento del Cauca y empresarios del suroccidente colombiano. Producto: piña golden ubicación: Santander de Quilichao, Buenos Aires y Caldon en el Departamento del Cauca.2008.
156. Misra, M., Wagner, A., Poursorkhabi, V., Mohanty, A., 2014. Analysis of Porous Electrospun Fibers from Poly(L-lactic acid)/Poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Blends. ACS Sustainable Chem. Eng. 2, 1976–1982.
157. Misra, SK., Valappil, SP., Roy, I., Boccaccini, A., 2006. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. Biomacromolecules. 7, 2249-2258.
158. Misra, A., Thakur, M., Srinivas, P., Karanth, N., 2000.Screening of poly-hydroxybutyrate-producing microorganisms using Fourier transform infrared spectroscopy. Biotechnology Letters. 22,1217–1219.
159. Mkhize, N., Msagati, T., Mamba, B., Momba, M., 2014. Determination of volatile fatty acids in wastewater by solvent extraction and gas chromatography. Physics and Chemistry of the earth. 67-69, 86-92.
160. Montalvo, L. 2001. Manejo de los residuos sólidos domiciliarios: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Plaza y Valdes.
161. Moreno, C., Moral, R., 2008. Compostaje. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa,pp 570.
162. Moshi, P., Crespo, F., Badshah, M., Hosea, K., Mshandete, A., Elisante, E., Mattiasson, B., 2014. Characterisation and evaluation of a novel feedstock, *Manihot glaziovii*, Muell. Arg, for production of bioenergy carriers: Bioethanol and biogas. Bioresource Technology. 172, 58–67.
163. Moshi, P., Temu, G., Nges, I., Malmo, G., Hosea, K., Elisante, E., Mattiasson, B.,2015. Combined production of bioethanol and biogas from peels of wild cassava *Manihot glaziovii*. Chemical Engineering Journal. 279. 297–306.
164. Murillo E. Notas de clase, Caracterización de Polímeros. 2012.
165. Nakas, J., Stipanovic, A., Tanenbaum, S., Keenan, T., 2004. Production and characterization of Poli- β -hydroxyalkanoate copolymers from *Burkholderia cepacia* Utilizon xylose and Levulinic Acid. Biotechnol Prog. 20, 1697-1704.
166. Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A., Chavda, S., Desai, A., 2008. Bioresource Technology. 99, 5749-5755.

167. Natthaporn, P., Alissara, R., Pensri, P., 2014. Polyhydroxyalkanoates production from cassava starch hydrolysate by *Cupriavidus* sp. KKU38. *International Journal of Biological Macromolecules*. 65, 51–64.
168. Navarrete, C., Gil, J., Durango, D., García, C., 2009. Extracción y caracterización del aceite esencial de mandarina obtenido de residuos agroindustriales. *DYNA*. 162, 85-92.
169. Nawirska, A., Kwasniewska, M., 2005. Dietary fiber fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry*. 91, 221-225.
170. Nguyen, C., Le, T., Chu-Ky, S. 2014. Pilot scale simultaneous saccharification and fermentation at very high gravity of cassava flour for ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 56, 160–165.
171. Nigam, J., 2000. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *Journal of Biotechnology*. 80, 189–193.
172. Nitinard, C., Kannika, C., Somchai, D., 2014. Production of PHA from Cassava Starch Wastewater in Sequencing Batch Reactor Treatment System. *APCBEE Procedia* 8, 167 – 172.
173. Nomura, C., Heberlig, G., Levine, A., 2016. Use of thiol-ene click chemistry to modify mechanical and thermal properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *International Journal of Biological Macromolecules*. 83, 358-365.
174. NTC 5720. Norma técnica Colombiana. Etiquetas ambientales tipo I. Sello ambiental Colombiano. Criterios ambientales de tableros y celdas para alojar equipos eléctricos y electrónicos de baja y media tensión. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). 2009. pp 1-11.
175. O'Connor, K., O'Kiely, P., Babu, R., Tuohy, M., Gupta, V., O'Donovan, A., Woods, T., Kenny, S., Davis, R., Cerrone, F. 2015. Use of a mannitol rich ensiled grass press juice (EGPJ) as a sole carbon source for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production through high cell density cultivation. *Bioresource Technology*. 191, 45-52.
176. Obruca, S., Marova, I., Snajdar, O., Mravcova, L., Svoboda, Z., 2010. Production of poly(3-hydroxybutyrate -co-3- hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator*, from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters*. 32, 1925-1932.
177. Oh, M., Saratale, G., 2015. Characterization of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) produced from *Ralstonia eutropha* using an alkali-pretreated biomass feedstock. *International Journal of Biological Macromolecules*. 80, 627-635.

178. Ojumu, T., Yu, J., Solomon, B., 2004. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*. 3,18-24.
179. Oliveira, L., Porto, A., Tambourgi, E., 2006. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technology*. 97, 862-867.
180. Oliveira, F., Dias, M., Castilho, L., Freire, D. 2007. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. 98, 633-638.
181. Oliveira, F.C., 2004. Produção de Polihidroxialcanoatos por fermentação no estado sólido. M.Sc. Thesis. COPPE/UFRJ (Federal University of Rio de Janeiro), Rio de Janeiro, Brazil, p. 116
182. Olmos A. 2015. CADENA REGIONAL DE PIÑA DEPARTAMENTO DE CASANARE. Secretaria de Agricultura Ganadería y Medio Ambiente. GOBERNACION DE CASANARE 2015.
183. Omojasol, F., Jilani, P., Ibiyemi, S., 2008. Cellulase Production by some Fungi Cultured on Pineapple Waste. *Nature and Science*. 6, 64-79.
184. Ortolan, F., Brites, L., Montenegro, F., Schmieles, M., Steel, C., Clerici, M., Almeida, E., Chang, Y. 2015. Effect of extruded wheat flour and pre-gelatinized cassava starch on process and quality parameters of French-type bread elaborated from frozen dough. *Food Research International*. 76, 402-409.
185. Padonou, W., Mestres C., Nago M., 2005. The quality of boiled cassava roots: instrumental characterization and relationship with physicochemical properties and sensorial properties. *Food Chemistry*. 89, 261-270
186. Pant, H., Bajgai, M., Nam, K., Seo, Y., Pandeya, D., Hong, S., Kim, H., 2011. Electrospun Nylon-6 Spider-Net Like Nanofiber Mat Containing TiO₂ Nanoparticles: A Multifunctional Nanocomposite Textile Material. *J. Hazard. Mater.* 185, 124-130.
187. Parati, F., Altieri, R., Esposito, A., Lobianco, A., Montesi, L., Nair, T., 2011. Validation of thermal composting process using olive mill solid waste for industrial scale cultivation of *Agaricus bisporus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65, 160-163.
188. Parawira, W., Murto, M., Zvauya, R., Mattiasson, B., 2004. Anaerobic batch digestion of solid potato waste alone and in combination with sugar beet leaves. *Renewable Energy*. 29, 1811-1823.
189. Park, S., Jang, Y., Lee, H., Park, A., Yang, J., Shin, J., Young, H., Song, B., Jegal, J., Lee, S., Lee, S. 2013. Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the biosynthesis of 2-hydroxyacid-containing polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering*. 20: 20-28.

190. Perdomo, G., 2002. Plásticos y Medio Ambiente. Revista Iberoamericana Polímeros. 3: 1-13.
191. Pohlmann A, Wolfgang F, Reinecke F, Kusian B, Liesegang H, Cramm R, Eitingen T, Ewering C, Potter M, Schwartz E, Strittmatter A. 2007. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*. 25: 1-6.
192. Portafolio. 2006. Urabá apuesta a cultivos diferentes al del banano. En: <http://www.portafolio.co/economia/finanzas/uraba-apuesta-cultivos-diferentes-banano-236534>
193. Potter, N., Hotchkiss, J., 2007. Ciencia de los alimentos. Quinta edición. Editorial Acirbia. 456-457. Zaragoza España.
194. Pouton, C., Akhtar, S., 1996. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery, *Advan. Drug.Deliv. Rev.* 18, 133–162.
195. Pratap, R., Singh, P., Araujo, A., Hakimi, M., Sulaiman, O., 2011. Management of urban solid waste: Vermicomposting a sustainable option. *Resources, Conservation and Recycling*. 55, 719-729
196. Prommuak, C., De-Eknamkul, W., Shotipruk, A., 2008. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. *Separation and Purification Technology*. 62, 444-448.
197. Raghavarao, K., Hebbar, H., Sumana, B., 2008. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresource Technology*. 99. 4896–4902.
198. Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W., Lim, T., Ma, Z., 2005. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers. In: Chapter 3 Electrospinning Process. Edit. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore. pp 90-127.
199. Ramier, J., Boudierlique, T., Stoilova, O., Manolova, N., Rashkov, I., Langlois, V., Renard, E., Albanese, P., Grande, D., 2014. Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hidroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Materials science Engineering*. 38, 161-169.
200. Rawdkuen, S., Ketnawa, S., Chaiwut, P., 2012. Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and Bioproducts Processing*. 90, 385–391.
- Razaghi, A., Karthikeyan, O., Nguyen, H., Heimann, K., 2016. Hydrolysis treatments of fruit and vegetable waste for production of biofuel precursors. *Bioresource Technology*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.041>.

201. Restrepo A., Rodríguez E., K. 2011. Cortezas de naranja comestibles: una aproximación al desarrollo de productos con valor agregado a partir de residuos agroindustriales. *Producción + Limpia*. 2, 47-57.
202. Restrepo A., Arredondo A., Morales C., Tamayo M., Benavides Y., Bedoya V. Aplicación de la técnica de impregnación a vacío en el desarrollo de cáscaras de naranja mínimamente procesadas fortificadas con potasio, sodio, y vitaminas B1, B6 y B9. *Journal of Engineering and Technology*. 2012. 1, 8-16.
203. Reusch, R., 2000. Transmembrane ion transport by polyphosphate–poly-(R)-3-hydroxybutyrate complexes. *Biochem. Engl. Trans.* 65,280–295.
204. Riedel, S., Jahns, S., Koenig, S., Bock, M., Brigham, C., Bader, J., Stahl, U., 2015. Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* low quality waste animal fats. *Journal of Biotechnology*. 214, 119-127.
205. Ríos, C., Niño, M., Araque, V., Sandoval, R., 2012. Effect of the addition of coal-ash and cassava peels on the engineering properties of compressed earth blocks. *Construction and Building Materials*. 36, 276–286.
206. Rivera, I., Villanueva, G., Sandoval, G., Producción de biodiesel a partir de residuos grasos animales por vía enzimática. *GRASAS Y ACEITES*. 2009. 5, 468-474.
207. Rojas E, Hoyos J, Mosquera S. 2016. Producción de Polihidroxialcanoatos (phas) a partir de *Ralstonia eutropha* en un medio con harina de yuca como fuente de carbono. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol 14: 1 (19 - 26)
208. Roy, I., Tajalli, K., 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda *Current Opinion in Microbiology*. 13, 321-326.
209. Saad, B., Keiser, O., Welti, M., Uhlschmid, G., Neuenschwander, P., Suter, W., 1997. Multiblock copolyesters as biomaterials: in vitro biocompatibility testing *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 8, 497-505.
210. Sánchez, A., Gutiérrez, A., Muñoz, A., Rivera, C., 2010. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*. 5, 61-91.
211. Sánchez, T., Ceballos, H., Dufour, D., Ortiz, D., Morante, N., Calle, F., Felde, T., Domínguez, M., Davrieux, F., 2014. Prediction of carotenoids, cyanide and dry matter contents in fresh cassava root using NIRS and Hunter color techniques. *Food Chemistry*. 151, 444–451.
212. Sangkert, S., Kamonmattayakul, S., Chai, W., Meesane, J., 2016. A biofunctional-modified silk fibroin scaffold with mimic reconstructed extracellular matrix of decellularized pulp/collagen/fibronectin for bone tissue engineering in alveolar bone resorption. *Materials Letters*. 166, 30–34.

213. Santis-Navarro, A., Gea, T., Barrena, R., Sánchez, A., 2011. Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. *Bioresource Technology*. 102, 10080-10084.
214. Santos, V., Ferreira, M., Siqueira, M., Melo, T., Silva, J., Andrade, I., Soares, A., Costa, C., 2015. Rumen parameters of sheep fed cassava peel as a replacement for corn. *Small Ruminant Research*. 133, 88–92.
215. Saravan, P., Muthuvelayudham, R., Viruthagiri, T., 2013. Enhanced production of cellulase from Pineapple waste by response Surface methodology. *Journal of Engineering*. 1-8
216. Saval, S., 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Biotechnología*. 2, 14-46.
217. Shanavas, S., Padmaja, G., Moorthy, S., Sajeev, M., Sheriff, J., 2011. Process optimization for bioethanol production from cassava starch using novel eco-friendly enzymes. *Biomass and Bioenergy*. 35, 901-909.
218. Silverstein, R., Webster, F., Kiemle, D., 2005. *Spectrometric Identification of organic Compounds*. Seventh Edition. Edit. John Wiley & Sons, Inc.
219. Sim, SJ., Snell, KD., Hogan, SA., Stubbe, J., Rha, C., Sinskey, AJ., 1997. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. *Nat Biotechnol*. 15, 63-67.
220. Simate, G., Ndlovu, S., 2015. The removal of heavy metals in a packed bed column using immobilized cassava peel waste biomass. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 21, 635–643.
221. Simon-Colin, C., Alain, K., Raguénes, G., Schmitt, S., Kervarec, C., Crassous, P., Costa, B., Guezennec, J., 2009. Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates)(mcl PHAs) from cosmetic co-products by *Pseudomonas ragenessii* sp.nov. isolated from Tetiaroa, French Polynesia. *Bioresource Technology*. 100, 6033-6039.
222. Simon-Colin, C., Gouin, C., Lemechko, P., Schmitt, S., Senant, A., Kervarec, N., Guezennec, J., 2012. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezennei* from alkanoates and glucose. *International Journal of Biological Macromolecules*. 51, 1063-1069.
223. Simon-Colin, C., Ragénes, G., Crassous, P., 2008. A novel mcl-PHA produces on coprah oil by *Pseudomonas guezennei* biovar, *tikehau*, isolated from a “kopara” mat of French Polynesia. *International Journal of Biological Macromolecules*. 43, 176-181.
224. Singh, R., Singh, N., Fabbrocino, F., Fraternali, F., Ahuja, I., 2016. Waste management by recycling of polymers with reinforcement of metal powder. *Composites Part B*. 105: 23-29.

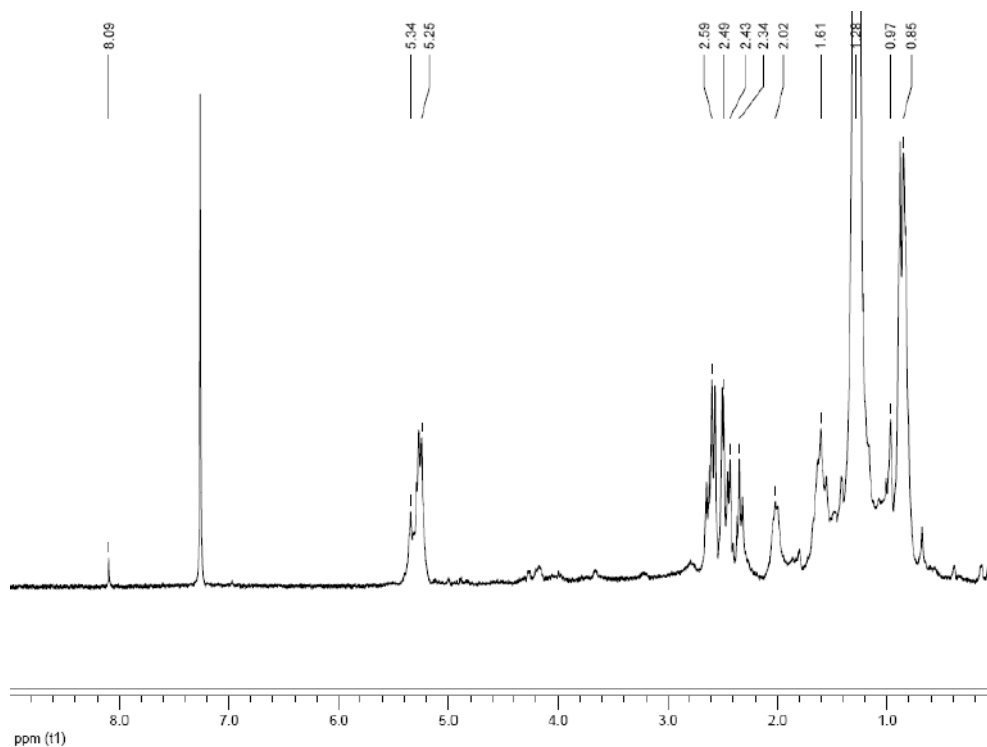
225. Skoog D, Holler F, Nieman T. Principios de análisis instrumental. Quinta Edición. 2001. McGraw-Hill/INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A.U.
226. Solorzano G. 2003. Aportación de gases de efecto invernadero por el manejo de residuos sólidos en México. Gaceta ecológica: 7.
227. Srienc, F., Kelley, A., 1999. Production of two phase polyhydroxyalkanoic acid granules in *Ralstonia eutropha*. International Journal of Biological Macromolecules. 25, 61-67.
228. Steinbüchel, A., Fächtenbusch, B., 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. Trends Biotechnol. 16, 419-427.
229. Steinbüchel, A., Valentin, H., 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. FEMS Microbiol. Lett. 128, 219-228.
230. Steinbüchel, A. 2001. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. Macromol. Biosci. 1, 1-24.
231. Steinbüchel, A., Lütke-Eversloh, T., 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. Biochemical Engineering Journal. 16, 81-96.
232. Stenoien, MD., Drasler, WJ., Scott, RJ., Jenson, ML., 1999. US patent. 5866217.
233. Sudaryanto, Y., Hartono, S., Irawaty, W., Hindarso, H., Ismadji, S., 2006. High surface area activated carbon prepared from cassava peel by chemical activation. Bioresource Technology. 97, 734-739.
234. Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog Polym Sci. 25, 1503-1555.
235. Sudesh, K., Lee, Y., Sridewi, N., Ramanathan, S., 2015. The Influence of Electrospinning Parameters and Drug Loading on Polyhydroxyalkanoate (PHA) Nanofibers for Drug Delivery. International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. 4, 103-113.
236. Sun, Y., Cheng, M., Lin, C., Su, H., Chen, P., 2008. Processing and characterization of electrospun poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) nanofibrous membranes. Polymer. 49, 546-553.
237. Sztern, D., Pravia, M., 1999. Manual para la elaboración de compost bases conceptuales y procedimientos. Organización Panamericana de la salud. Organización mundial de la Salud.
238. Tawata, S., Upadhyay, A., Lama, J., 2010. Utilization of Pineapple Waste: A Review. J. Food Sci. Technol. 6, 10-18.

239. Thakor, N., Ujjval, T., Patel, K., 2005. Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) by *Comamonas testosteroni* during cultivation on vegetable oils. *Bioresource Technology*. 96, 1843–1850.
240. Tharanathan, R., 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*. 14, 71–78.
241. Tripathi, A., Srivastava, S., Singh, R., 2013. Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes* sp. *Biomass and Bioenergy*. 243-250.
242. Trivedi, U., Patel, K., Prajapati, V., Ray, S., 2016. Optimization and characterization of PHA from isolate *Pannonibacter phragmitetus* ERC8 using glycerol waste. *International Journal of Biological Macromolecules*. 86, 741-749.
243. Tsuge, T., Kahar, P., Taguchi, K., Doi, Y., 2004. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability*. 83, 79-86.
244. Urquiza M. Experimentos De Fisicoquímica. Editorial LIMUSA. WILEY S.A. (1969), México.
245. Volova, T., Boyandin, A., Vasiliev, A., Karpov, V., Prudnikova, S., Mishukova, O., Boyarskikh, M., Filipenko, V., Xuân, Bui., Dung, Việt., 2010. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria. *Polymer Degradation and Stability*. 95, 2350-2359.
246. Volova, T., Goncharov, D., Sukovaty, A., Shabanov, A., Nikolaeva, E., Shishatskaya, E., 2014. Electrospinning of polyhydroxyalkanoate fibrous scaffolds: effect in electrospinning parameters on structure and properties. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 25, 370-393.
247. Waard, P., Van der Wal, H., Huijberts, G., Eggink, G., 1993. Heteronuclear NMR Analysis of Unsaturated Fatty Acids in Poly(3-hydroxyalkanoates) study of p-oxidation in *Pseudomonas putida*. *The journal of biological chemistry*. 268, 315-319.
248. Wallen, L., Rohwedder, W., 1974. Poly-β-hydroxyalkanoates from activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* 8, 576-579.
249. Wang, J., Tan, G., Chen, C., Ge, L., Li, L., Wang, L., Zhao, L., Mo, Yu., Tan, S., 2014. Enhanced gas chromatography-mass spectrometry method for bacterial polyhydroxyalkanoates (PHAs) analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 117, 379-382.
250. Wang, Y., Weng, Y., Wang, X., 2011. Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. *Polymer Testing*. 30, 372–380.

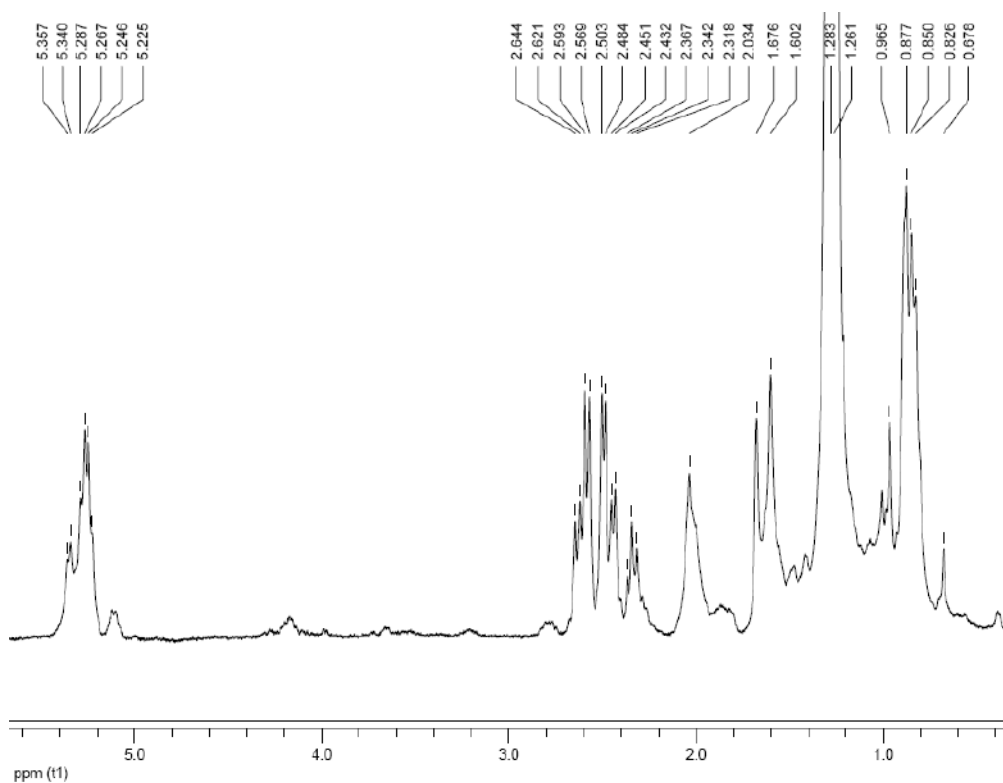
251. Wang, Jin., Fang, F., Yu H., 2007. Substrate consumption and biomass growth of *Ralstonia eutropha* at various S₀/X₀ levels in batch cultures. *Bioresource Technology*. 98, 2599–2604
252. Weiner, M., 1997. Biopolymers from marine Prokaryotes. *Trends in Biotechnology*. 15, 390-394.
253. Williams, SF., Martin, DP., 2002. Applications of PHAs in medicine and pharmacy. In *Biopolymers*. Edited by Doi Y, Steinbuchel A. Weinheim: Wiley/VCH. 91-127.
254. Wisniewski Jr, A., Wiggers, V., Simionatto, E., Meier, H., Barros, A., Madureira, L., 2010. Biofuels from waste fish oil pyrolysis: Chemical composition. *Fuel*. 89, 563-568.
255. Witholt, B., Kessler B., 1999. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr. Opin. Biotechnol*. 10, 279-285.
256. Wong, J., Selvam, A., Karthikeyan., O., 2016. Hydrolysis-acidogenesis of food waste in solid-liquid-separating continuous stirred tank reactor (SLS-CSTR) for volatile organic acid production. *Bioresource Technology*. 200, 366-373.
257. Wong, Y., Sudesh, K., Sinskey, A., Rha, C., Brigham, C., 2012. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing high 3-hydroxyhexanoate monomer fraction from crude palm kernel oil by recombinant *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*. 121, 320-327.
258. World Bank. PROJECT INFORMATION DOCUMENT (PID) APPRAISAL STAGE Report No: AB4816. 2009.
259. Wu, Q., Wang, Y., Chen, GQ., 2009. Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artif Cell Blood Sub Biot*. 37, 1-12.
260. Wu, T., Guan, Y., Ye, J., 2007. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*. 100, 1573-1579.
261. Wu, Y., Zhang, N., Wang, J., Sun, Z., 2012. An integrated crop-vermiculture system for treating organic waste on fields. *European Journal of Soil Biology*. 51, 8-14.
262. Xing, J., Ying, F., Yanming, X., Liwei, W., Ying, L., Jinpeng, C., Xuepeng, W., Dongmei, D., Fanbin, M., Yuebin, L., Jeffery, T., Chengchun, T., 2014. Electrospun CF-PHA Nanocomposites: Effect of Surface Modifications of Carbon Fibers. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 63, 262-267.

263. Yang, Q., Li, Z., Hong, Y., Zhao, Y., Qiu, S., Wang, C., Wei, Y., 2004. Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning. *J Polym Sci, Part B: Polym Phys.* 42, 3721–3726.
264. Yanik, C., Sardesai, B., Bhat, D., Naik, S., Raut, K., K.M. Shelgikar, H., Orskov, K., Alberti, T., 1997. Hockaday Ketosis resistance in fibrocalculous pancreatic diabetes: II. Hepatic ketogenesis after oral medium-chain triglycerides. *Metabolism.* 1997. 46, 1–4.
265. Yanik, J., Kornmayer, C., Saglam, M., Yüksel, M., 2007. Fast pyrolysis of agricultural wastes: Characterization of pyrolysis products. *Fuel Processing Technology.* 88, 942-947.
266. Yepes, S., Montoya, L., Orozco, F., 2008. Valorización de residuos agroindustriales frutas en Medellín y el sur del Valle de Aburrá, Colombia. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín.* 1, 4422-4431.
267. Yezza, A., Halasz, A., Levadoux, W., Hawari, J., 2007. Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77, 269–274.
268. Young, A., 2003. Biotechnology for food, energy, and industrial products? new opportunities for bio-based products. *Environ Sci Pollut R.* 10, 273-276.
269. Yun, K., Hogan, C., Matsubayashi, Y., Kawabe, M., Iskandar, F., Okuyama, K., 2007. Nanoparticle filtration by electrospun polymer fibers. *Chemical Engineering Science.* 62, 4751–4759.
270. Zhang, Q., Welch, J., Park, H., Wu, C., Sigmund, W., Marijnissen, J., 2010. Improvement in Nanofiber Filtration by Multiple Thin Layers of Nanofiber Mats. *J. Aerosol Sci.* 41, 230-236.
271. Zhang, W., Chen, K., Zhang, B., Chong, De Sun., Cai, Chong., Zhou, C., Xu, W., Zhang, W., Ferguson, I., 2005. Postharvest responses of Chinese bayberry fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 37, 241–251.
272. Zhijiang, C., Zhihong, W., 2007. Preparation of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and poly(ethylene glycol) (PEG) graft copolymer. *Journal Mater Sci.* 42, 5886-5890.
273. Zhu, Z., Liu, Z., Zhang, Y., Li, B., Lu, H., Duan, N., Si, B., Shen, R., Lu, J., 2016. Recovery of reducing sugars and volatile fatty acids from cornstalk at different hydrothermal treatment severity. *Bioresource Technology.* 199, 220-227.
274. Zinn, M., Witholt, B., Egli, T., 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* 53, 5-21.

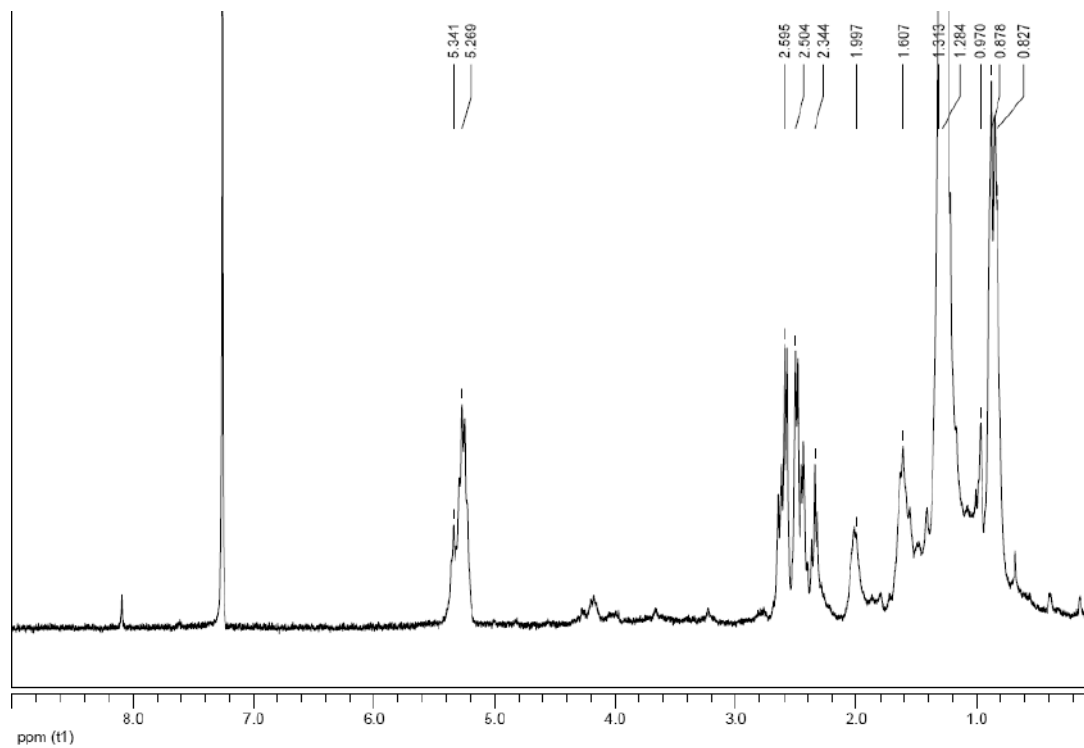
ANEXO 1. ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR ^1H .



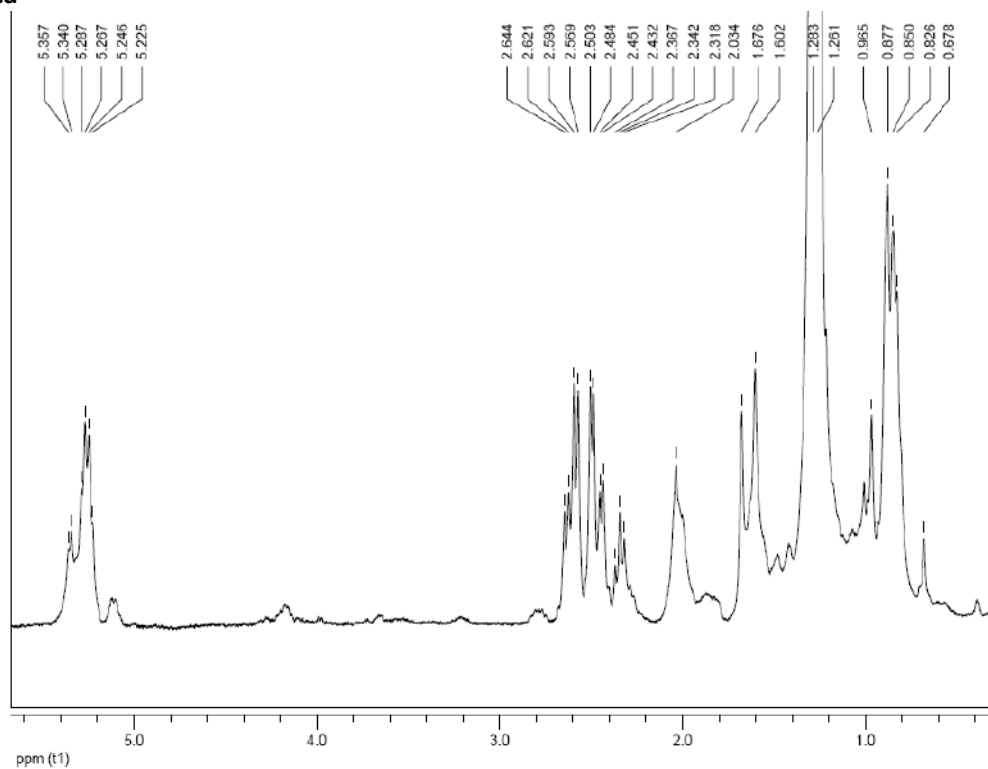
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 1 de los residuos de cascara de Yuca.



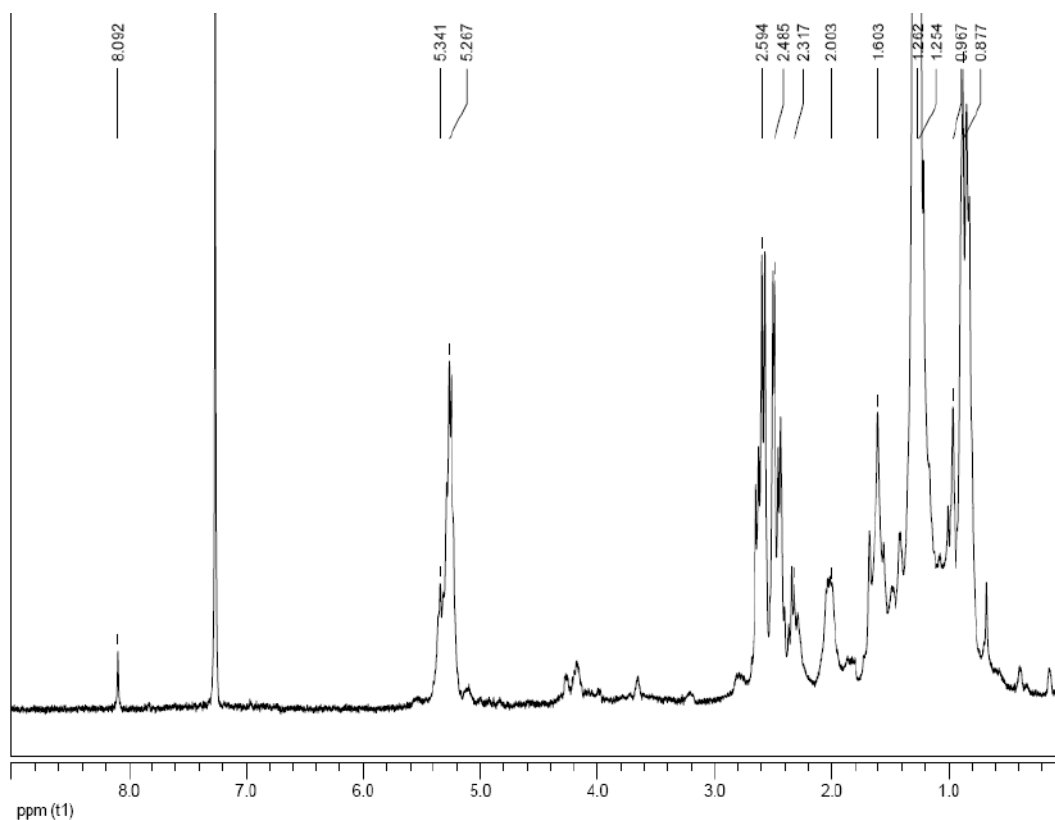
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 3 de los residuos de cascara de Yuca.



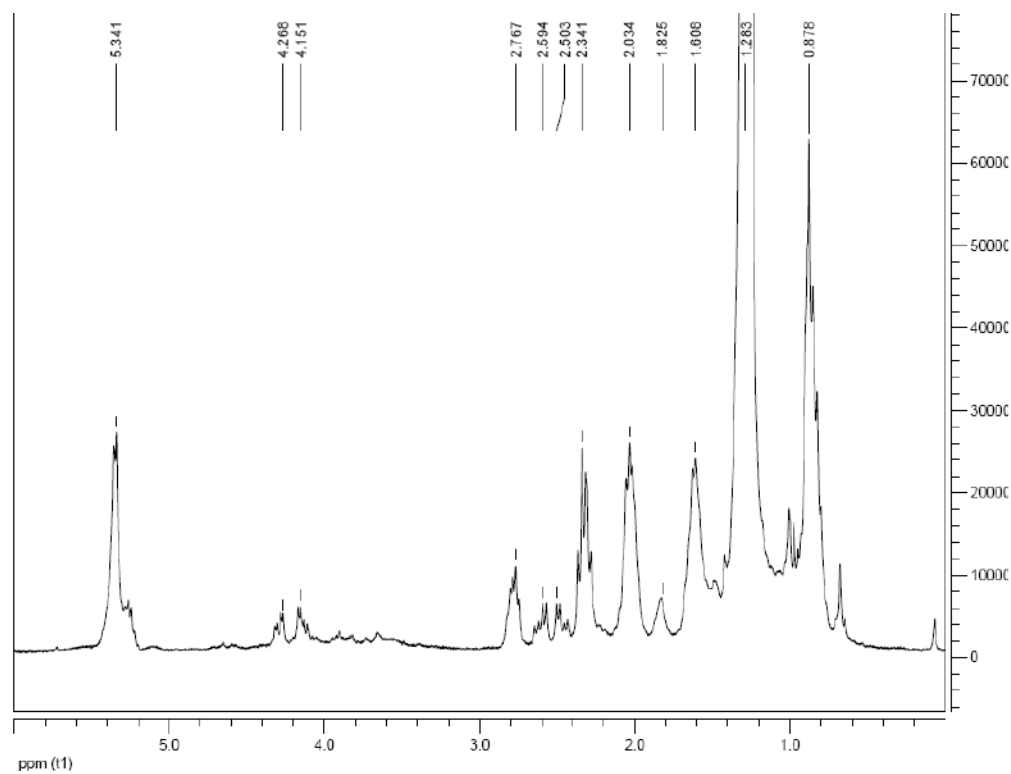
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 4 de los residuos de cascara de Yuca



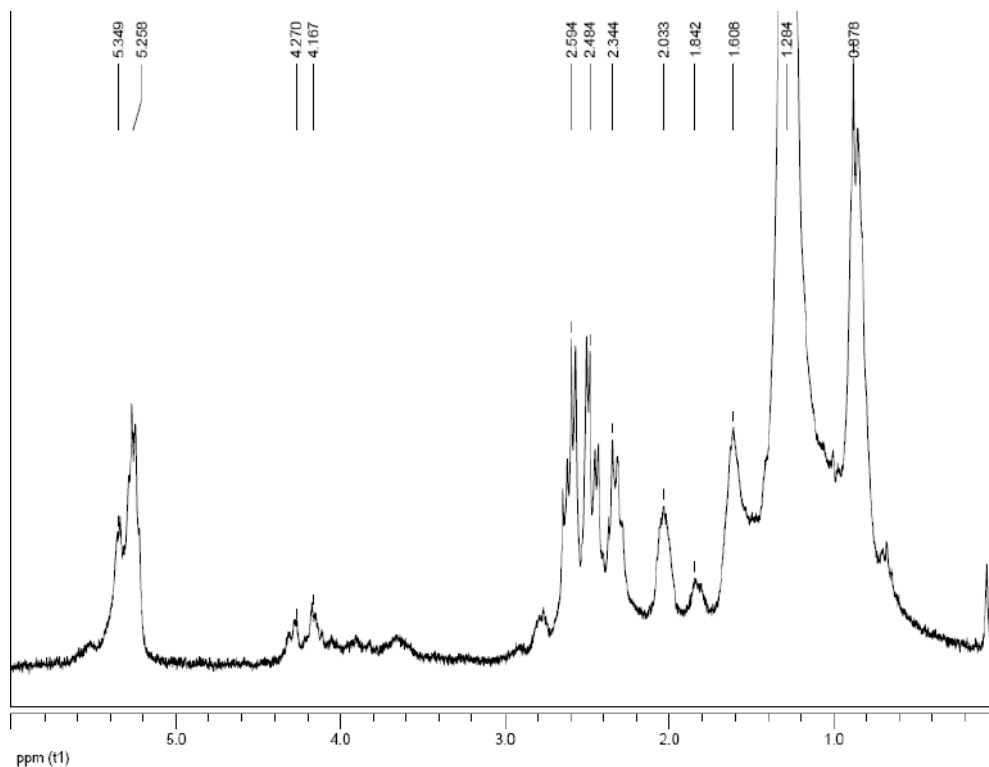
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 5 de los residuos de cascara de Yuca



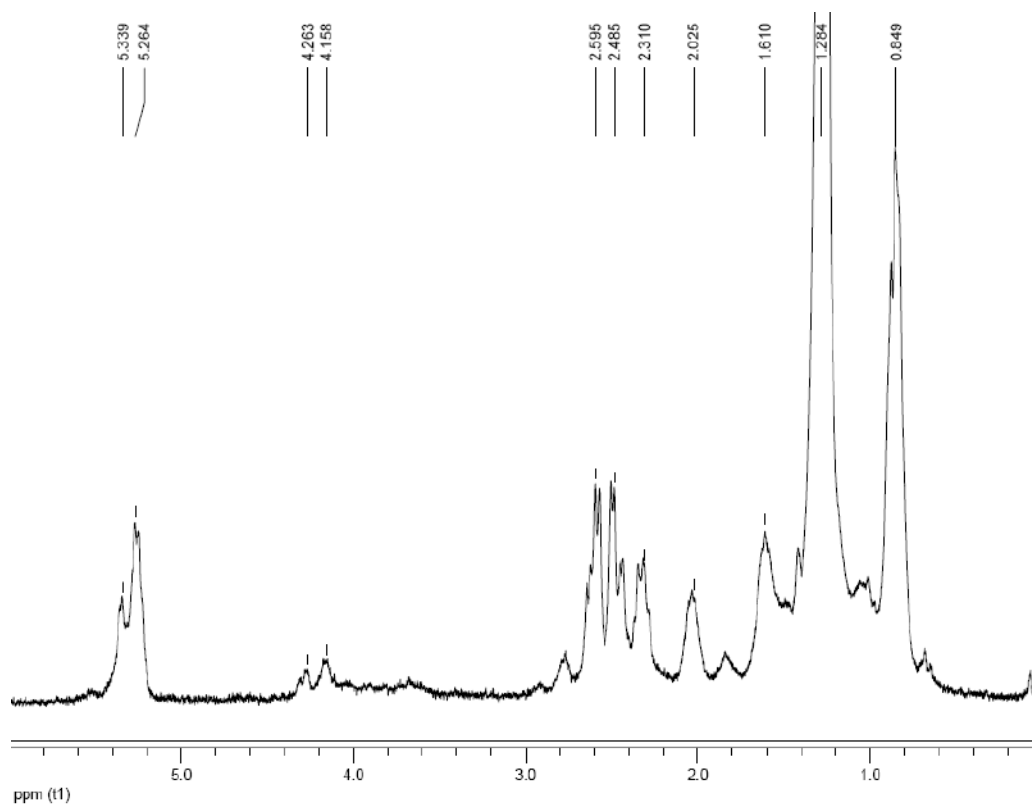
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 7 de los residuos de cascara de Yuca



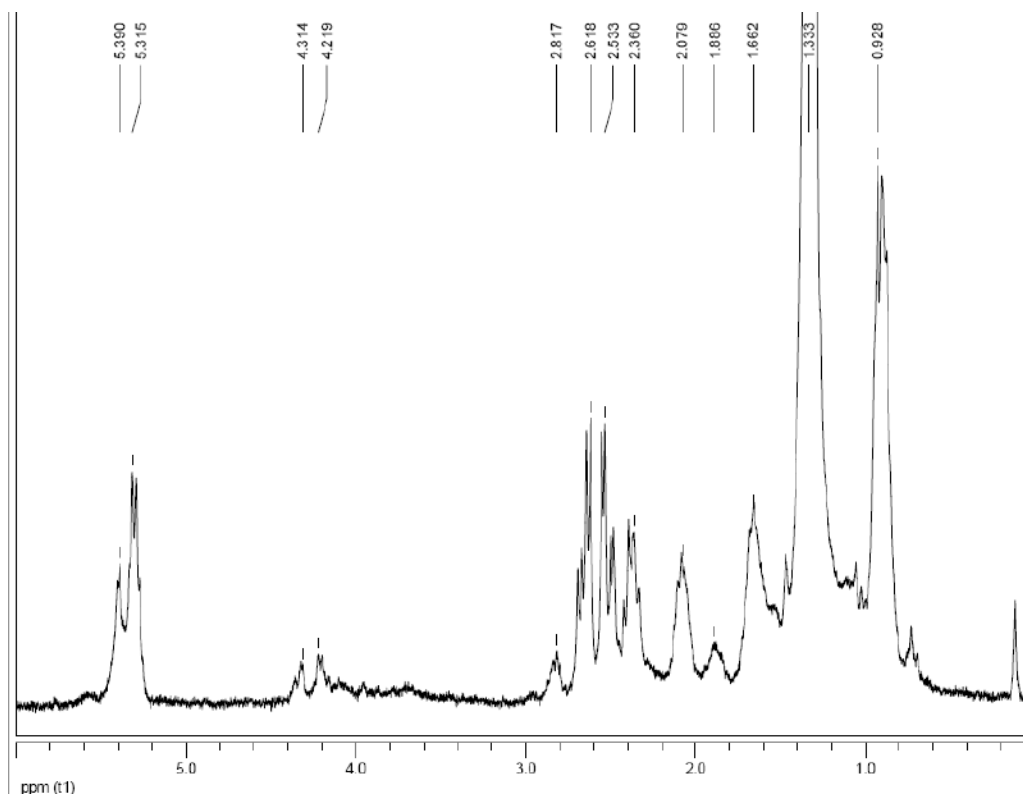
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 8 de los residuos de cascara de Yuca



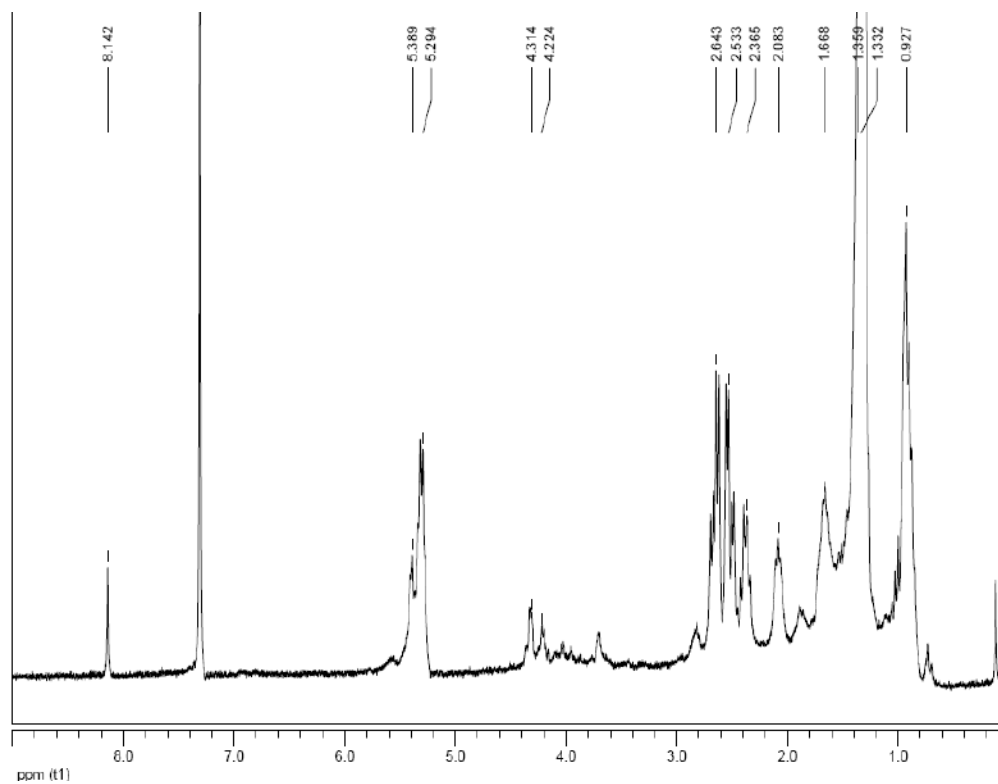
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 1 de los residuos de cascara de Piña.



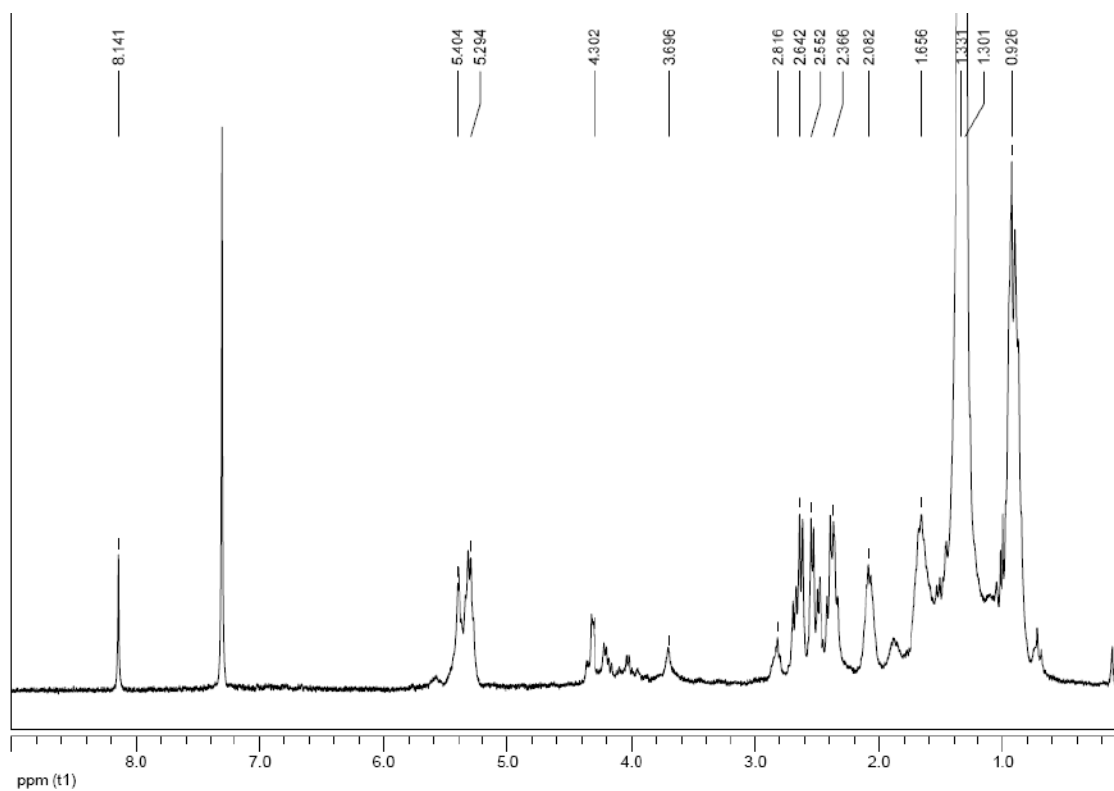
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 2 de los residuos de cascara de Piña.



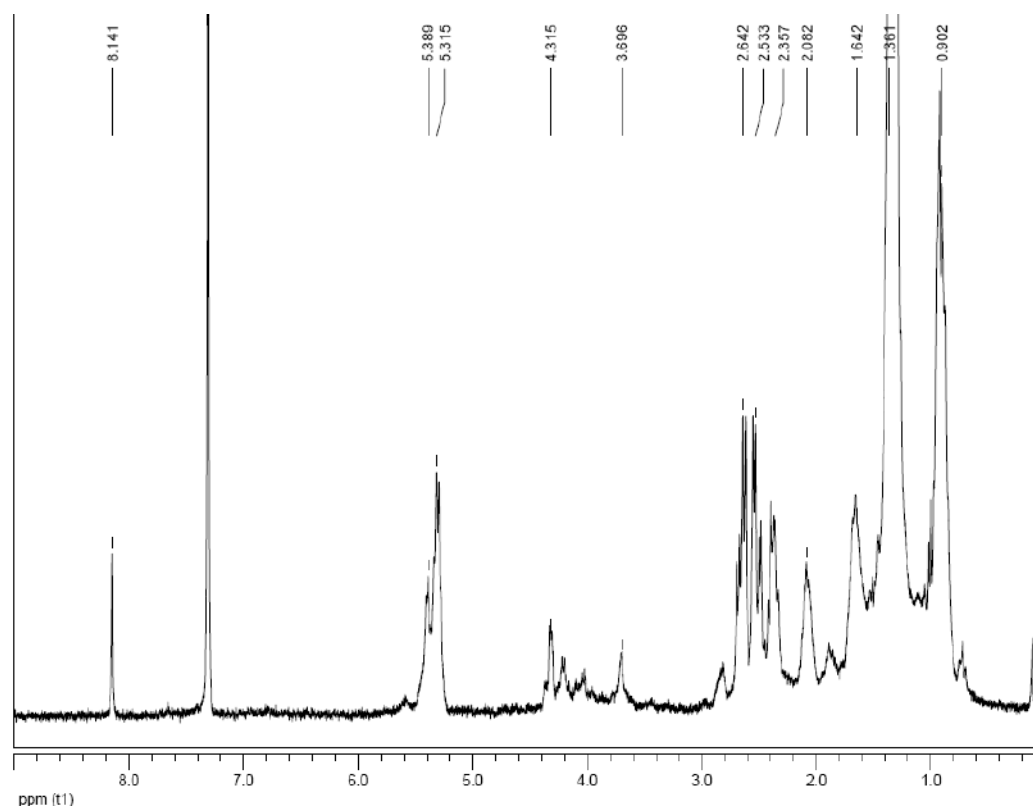
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 3 de los residuos de cascara de Piña.



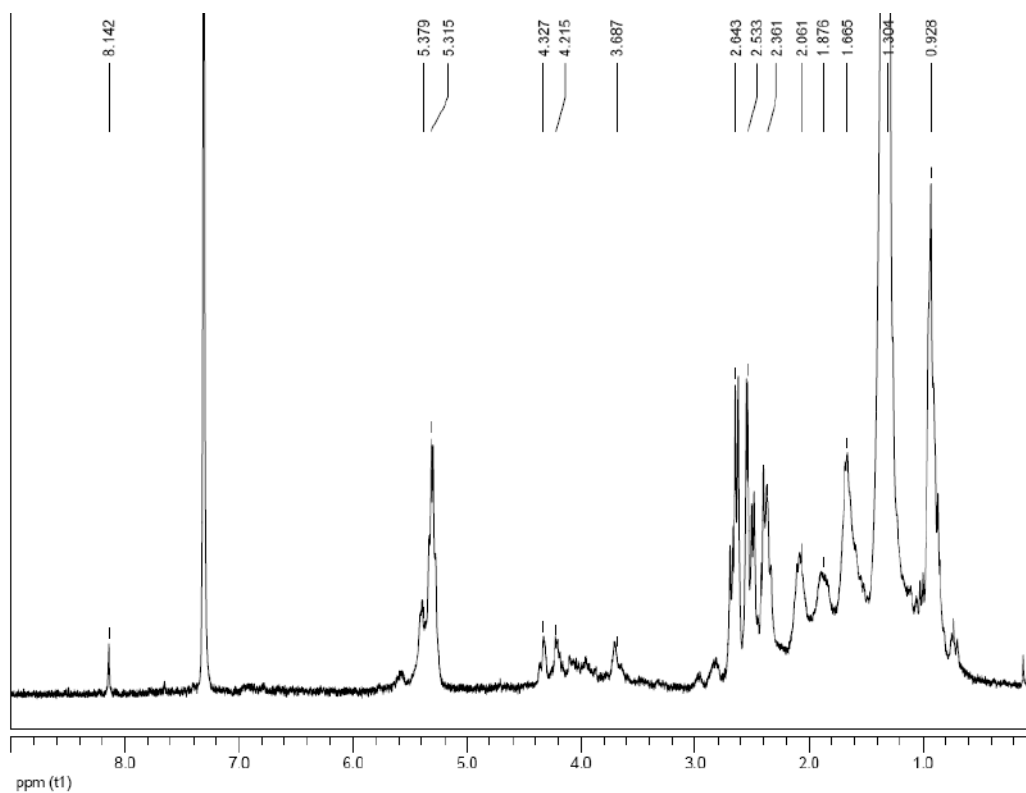
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 4 de los residuos de cascara de Piña.



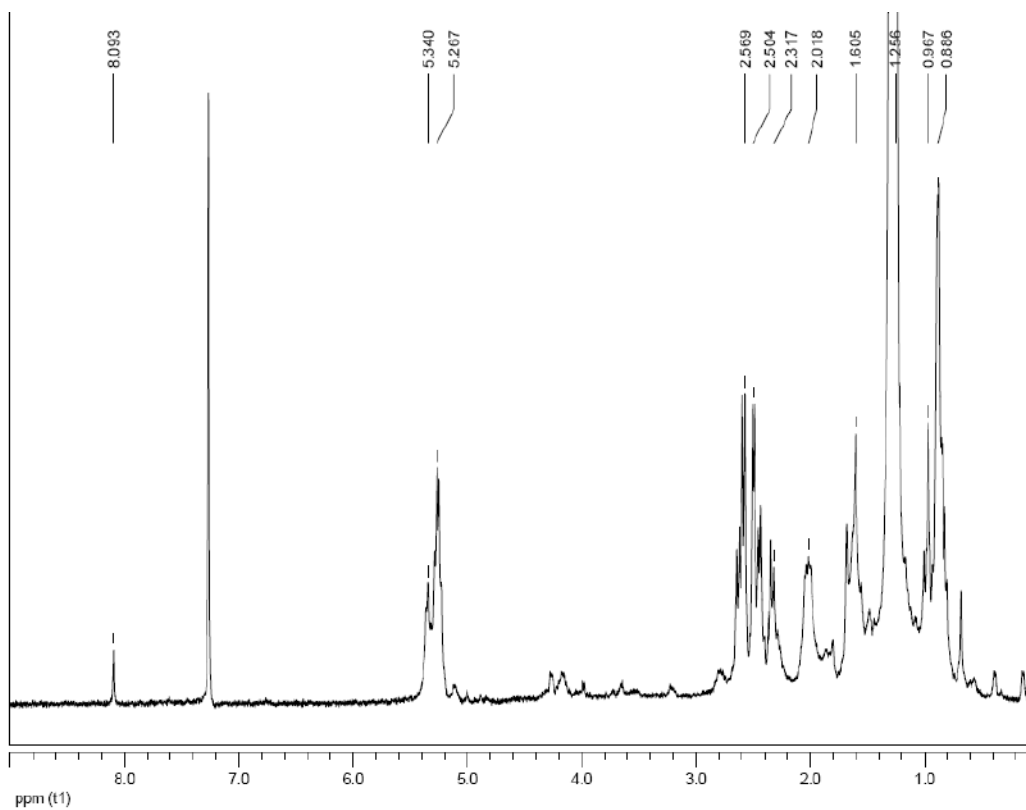
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 5 de los residuos de cascara de Piña.



^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 6 de los residuos de cascara de Piña.



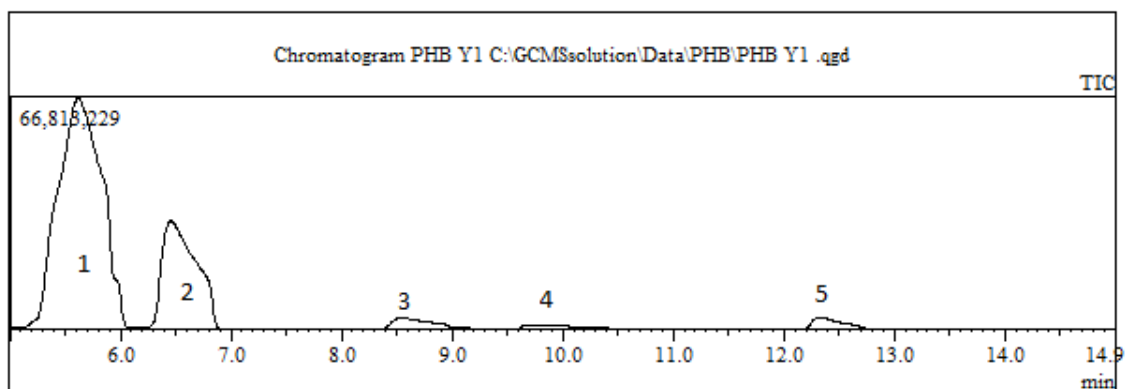
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 8 de los residuos de cascara de Piña.



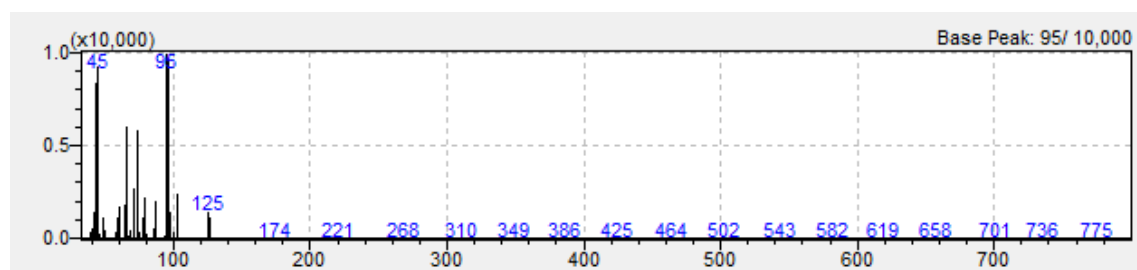
^1H RMN; para PHB Obtenido de la condicion de fermentación 9 de los residuos de cascara de Piña.

**ANEXO 2. ESPECTROS DE CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADO A
MASAS.**

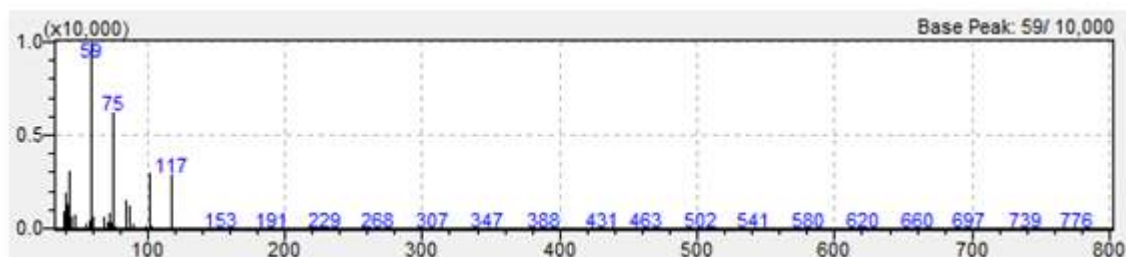
Cromatogramas Para los PHB obtenidos de la condicion de fermentación 1, de los residuos de cascara de yuca



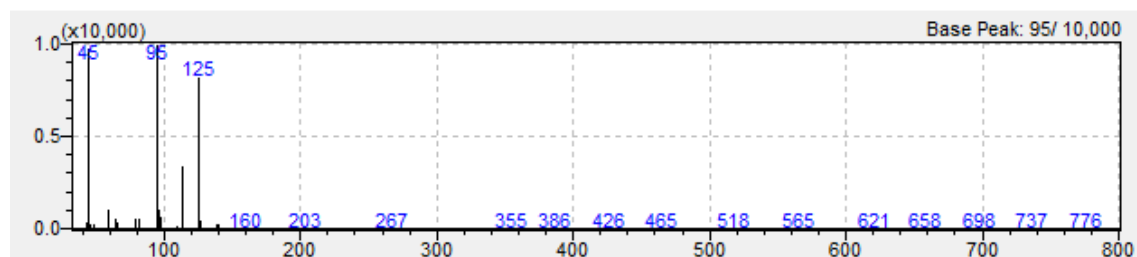
Pico 1:



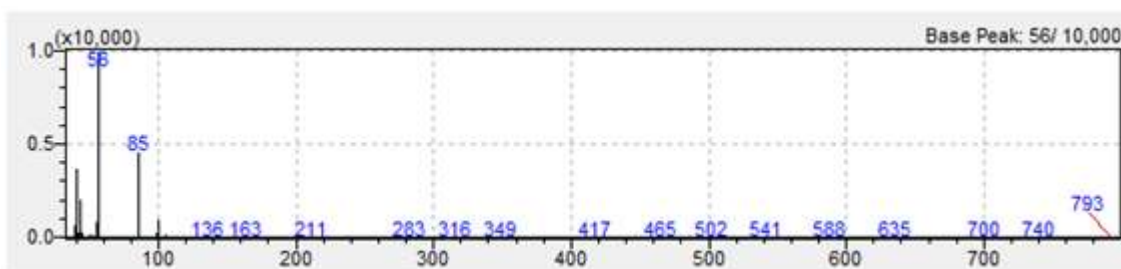
Pico 2:



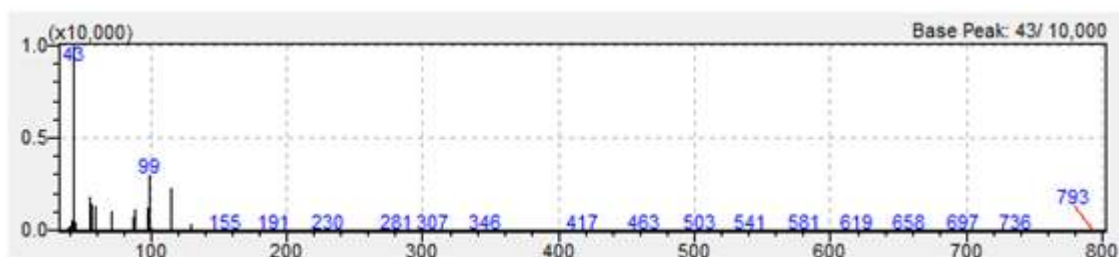
Pico 3:



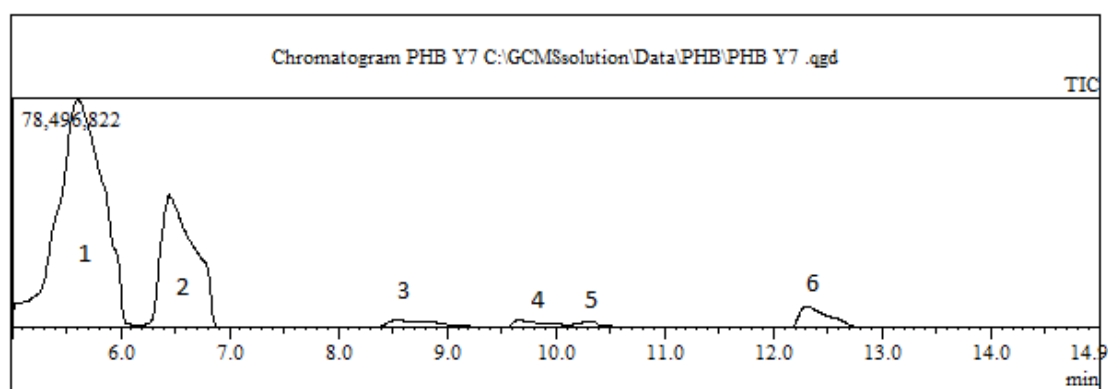
Pico 4:



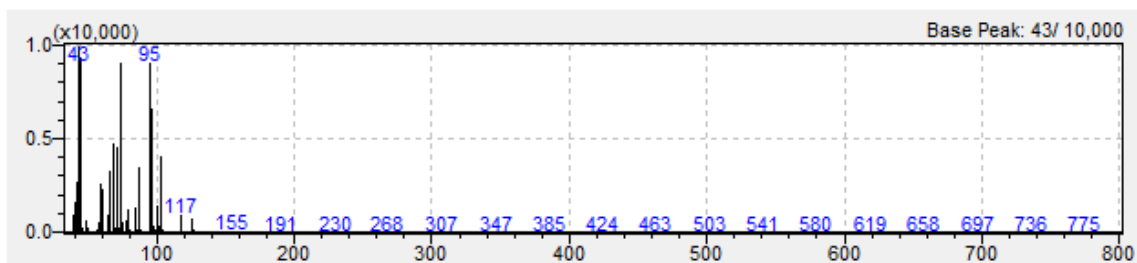
Pico 5:



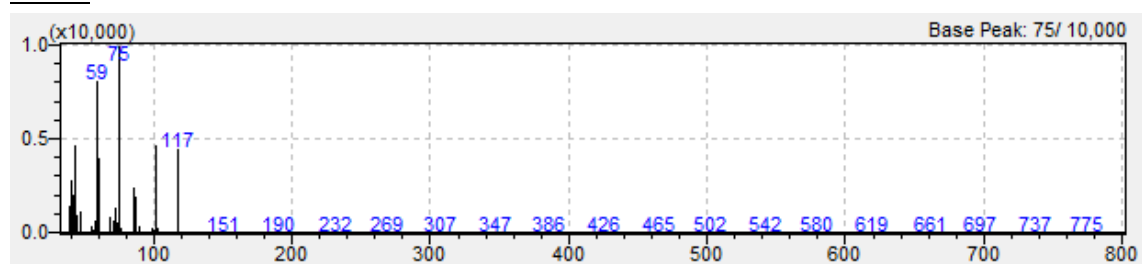
Cromatogramas Para los PHB obtenidos de la condicion de fermentación 7, de los residuos de cascara de yuca



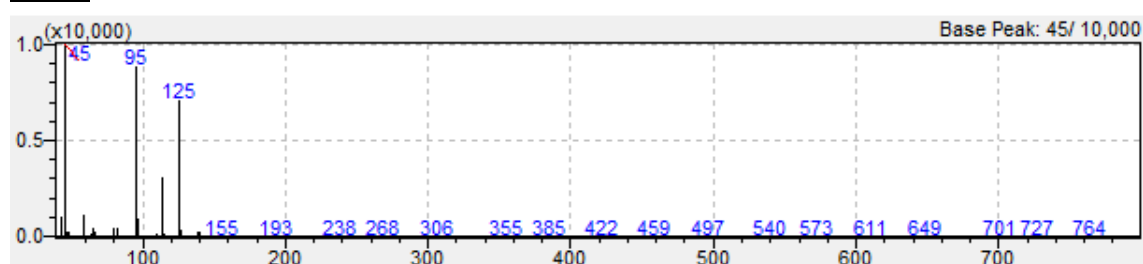
Pico 1:



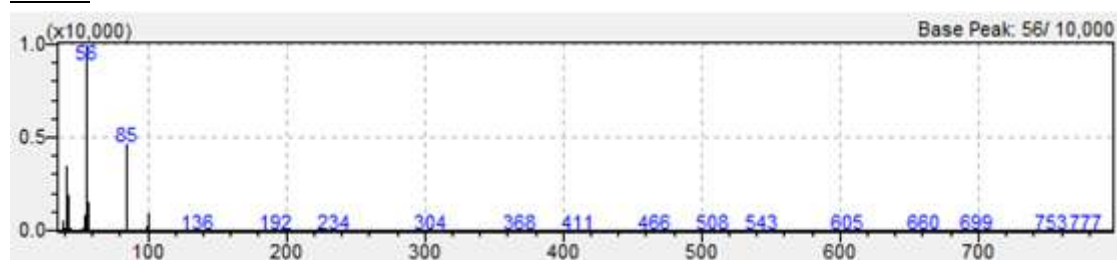
Pico 2:



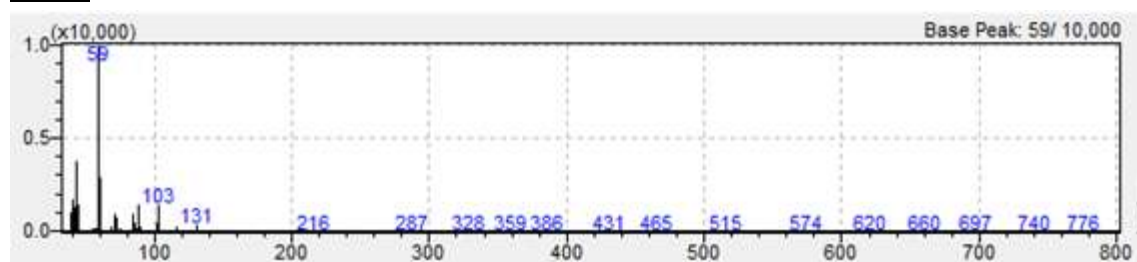
Pico 3:



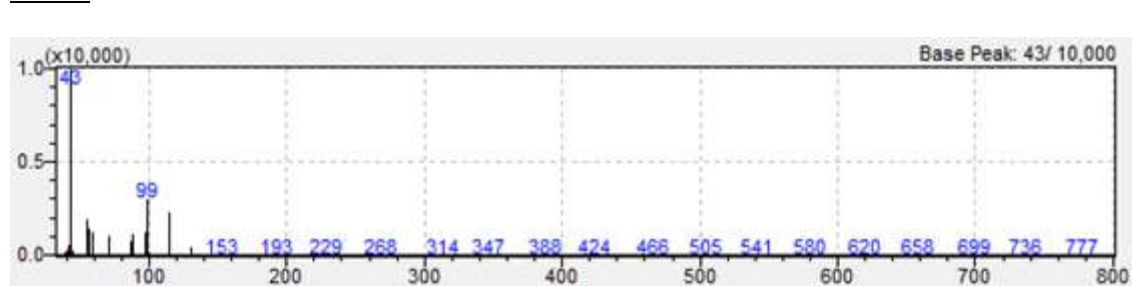
Pico 4:



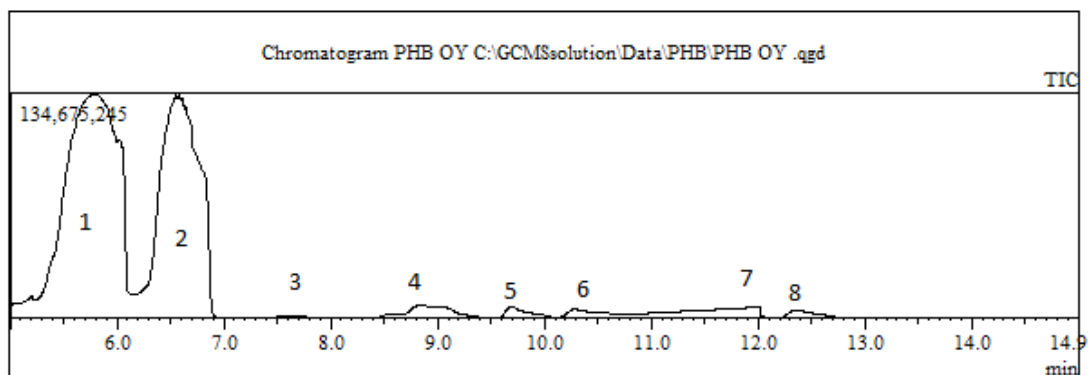
Pico 5:



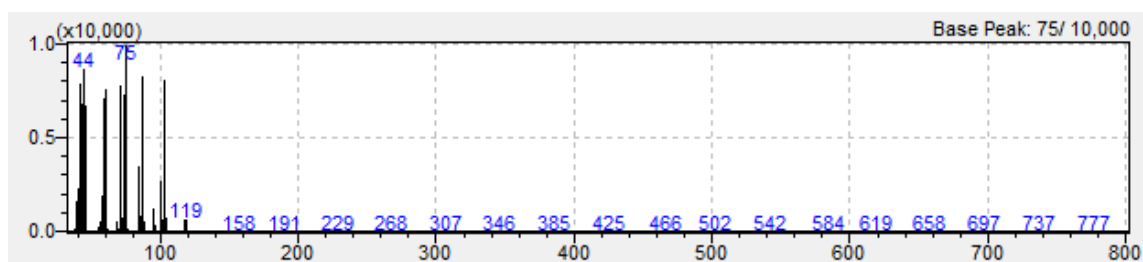
Pico 6:



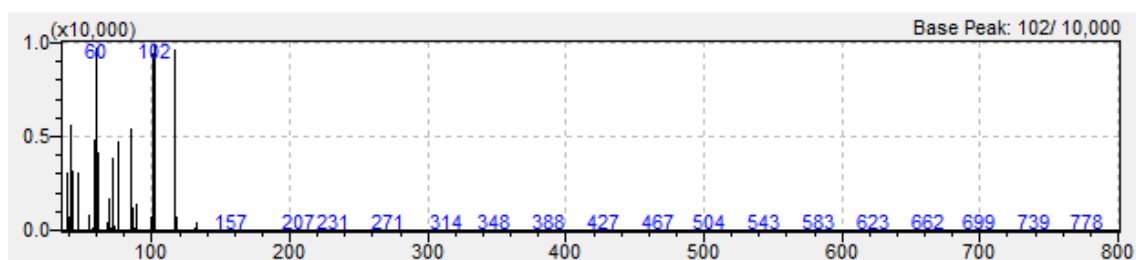
Cromatogramas Para los PHB obtenidos de la condicion de fermentación 8, de los residuos de cascara de yuca



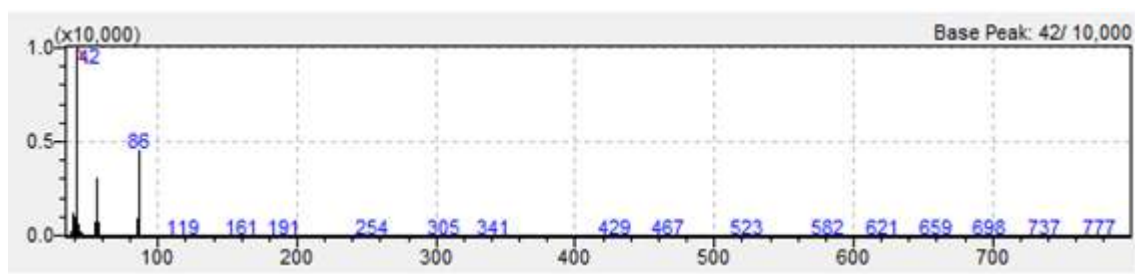
Pico 1:



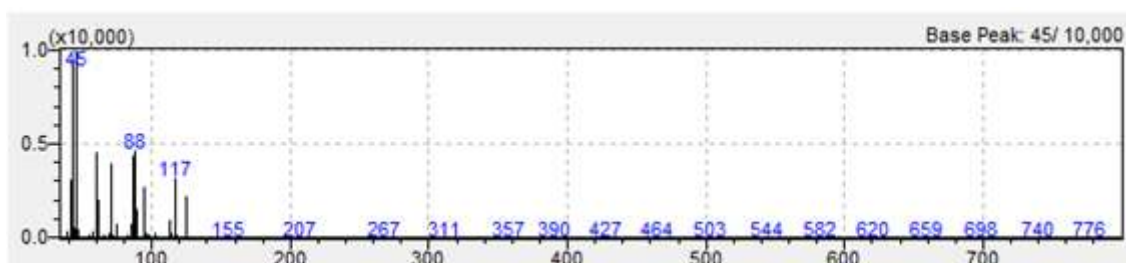
Pico 2:



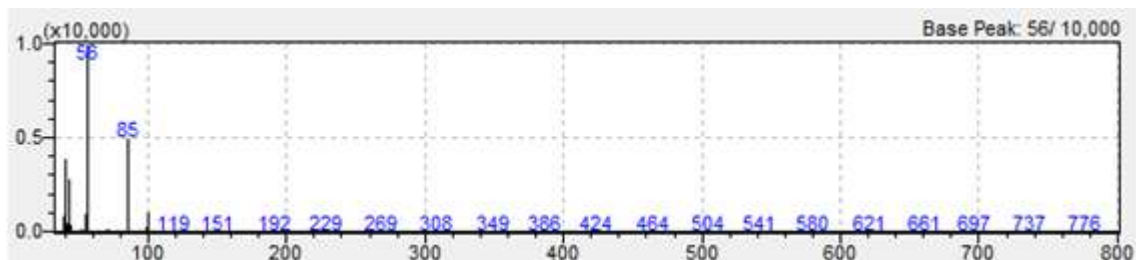
Pico 3:



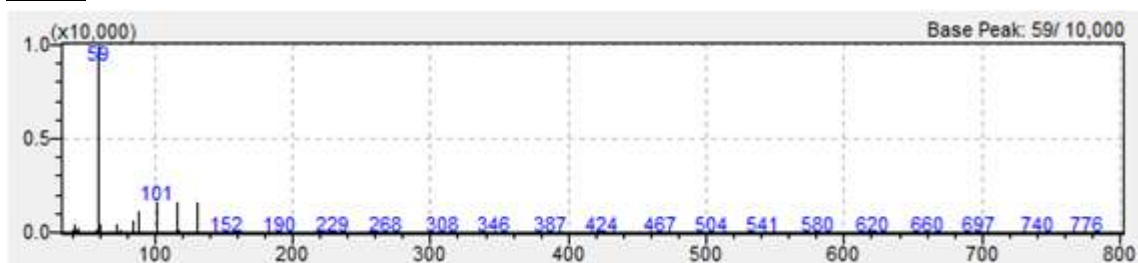
Pico 4:



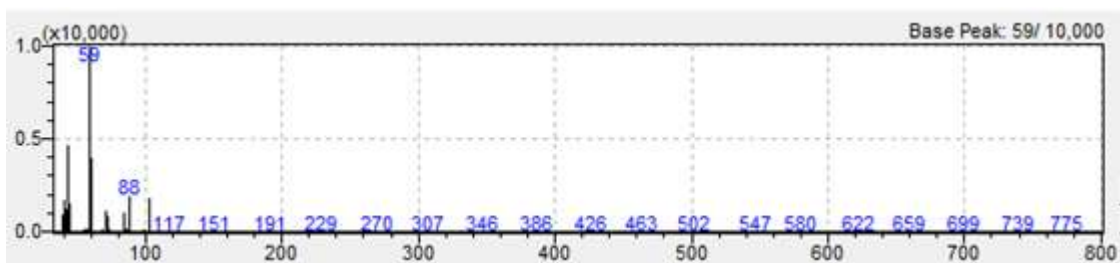
Pico 5:



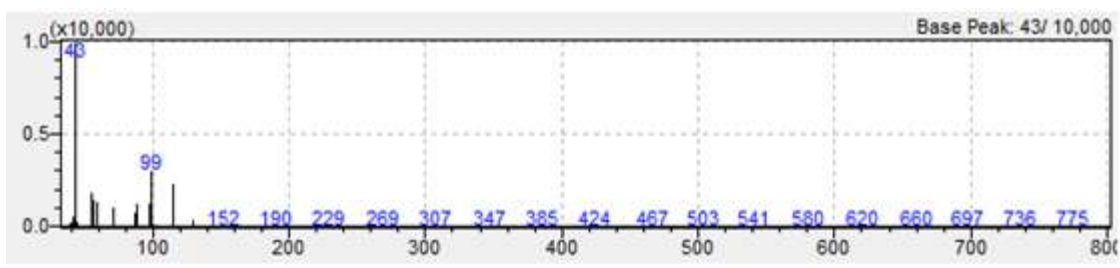
Pico 6:



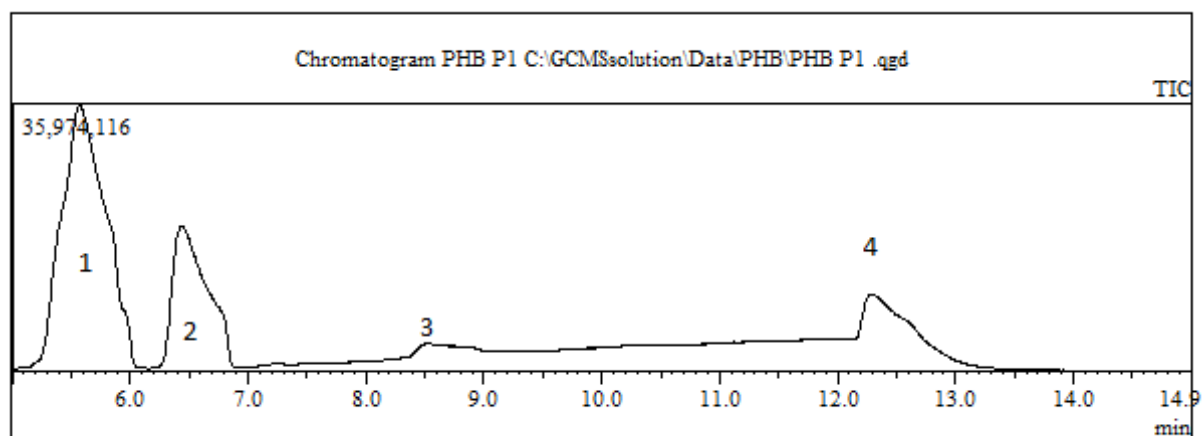
Pico 7:



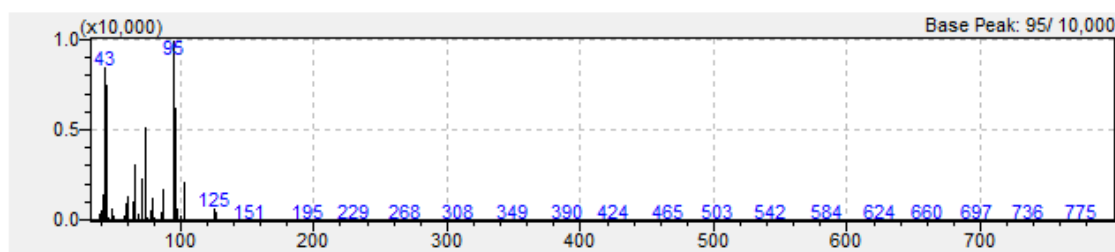
Pico 8:



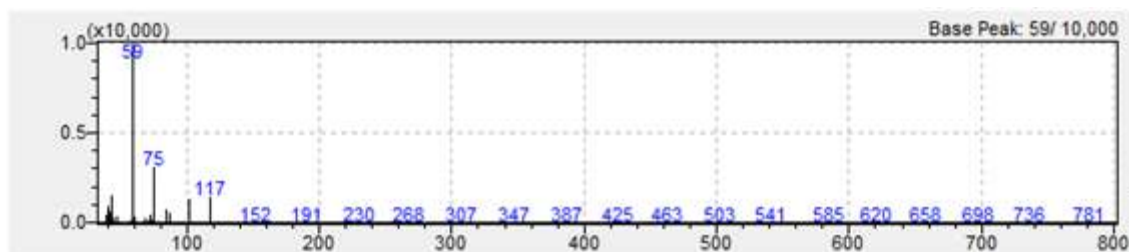
Cromatogramas Para los PHB obtenidos de la condicion de fermentación 1, de los residuos de cascara de piña



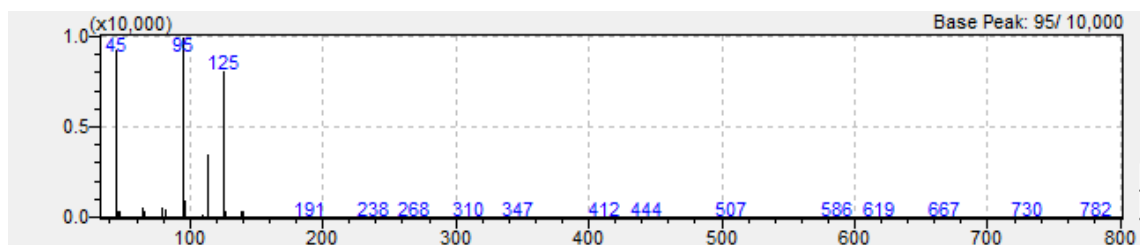
Pico 1:



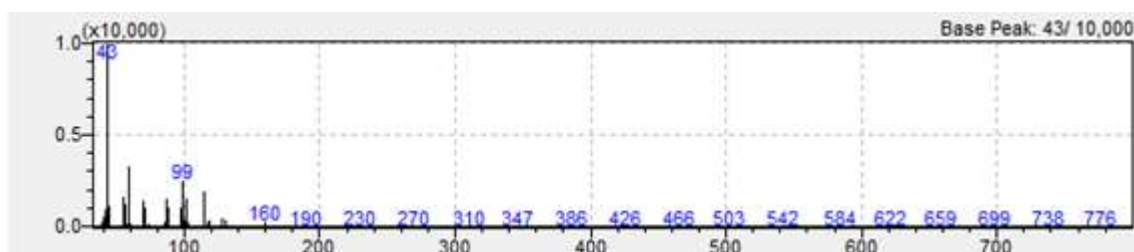
Pico 2:



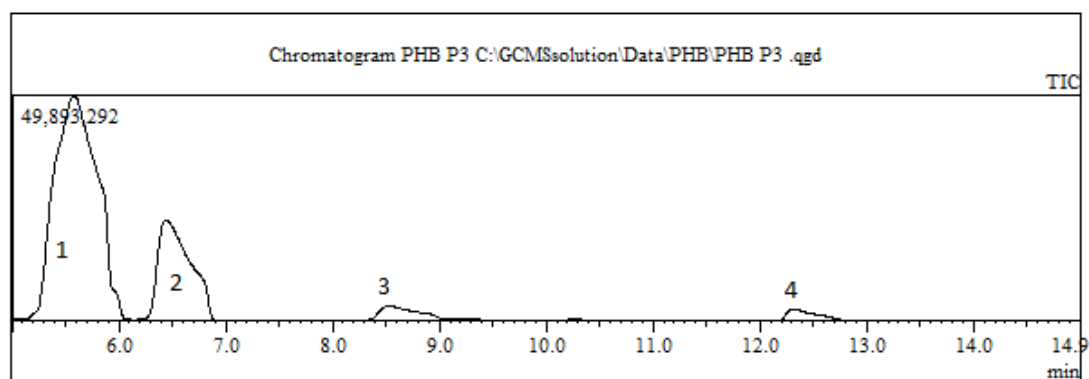
Pico 3:



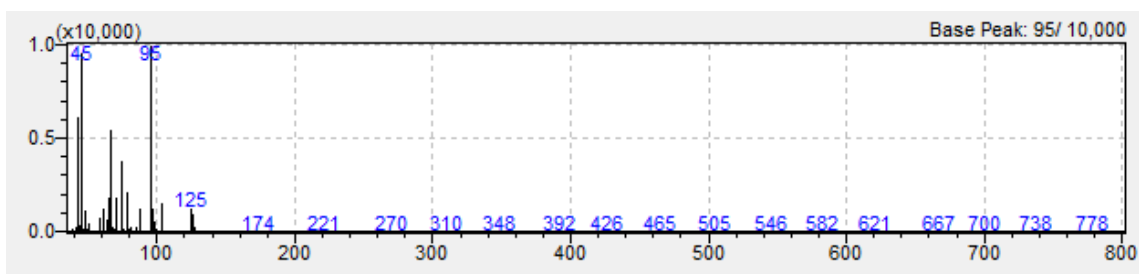
Pico 4:



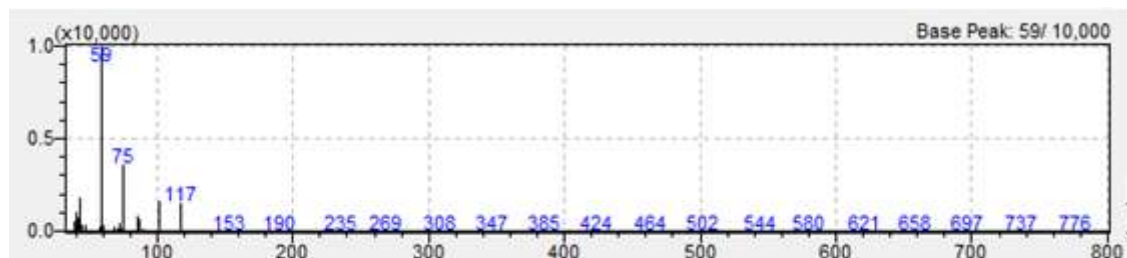
Cromatogramas Para los PHB obtenidos de la condicion de fermentación 3, de los residuos de cascara de piña

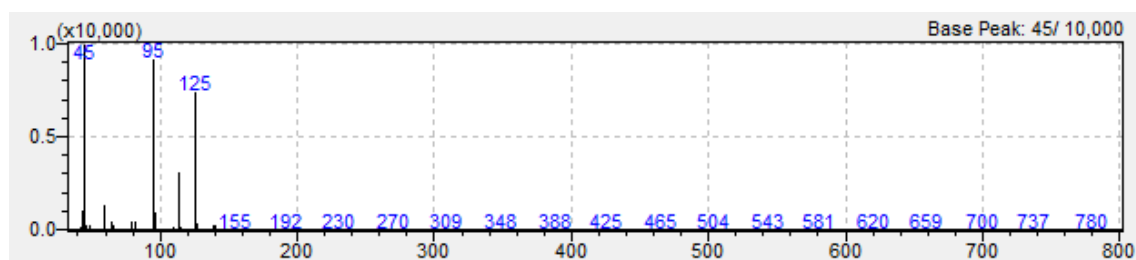
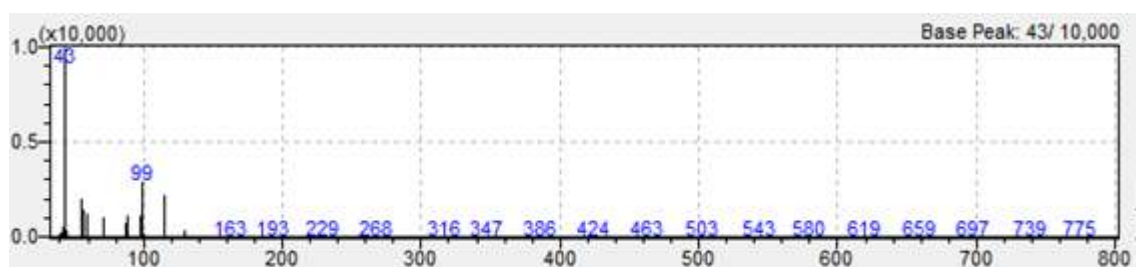


Pico 1:

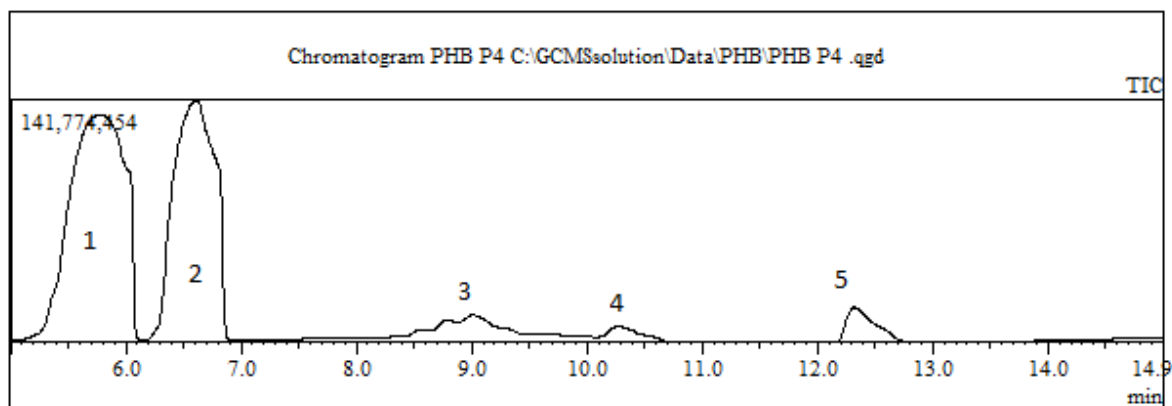
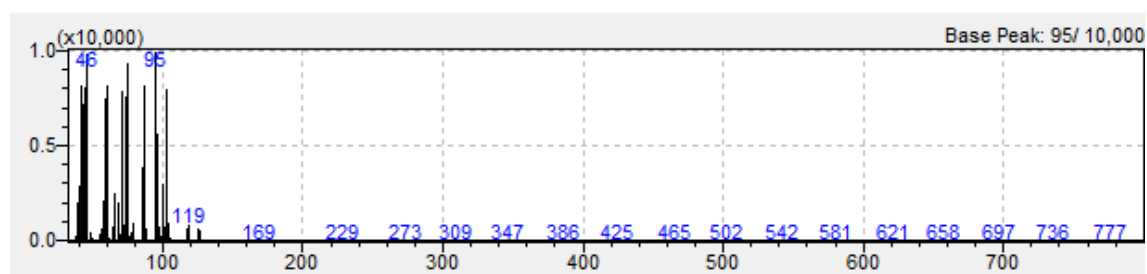


Pico 2:

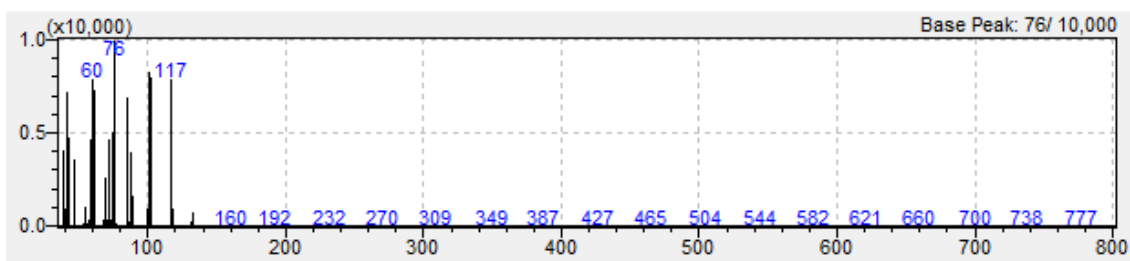


Pico 3:Pico 4:

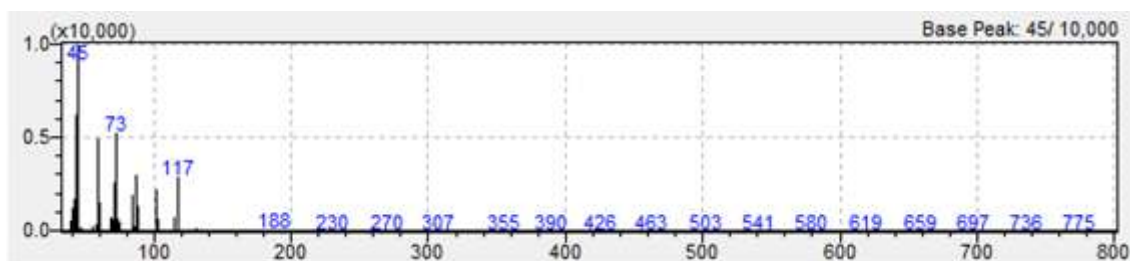
Cromatogramas Para los PHB obtenidos de la condición de fermentación 4, de los residuos de cascara de piña

Pico 1:

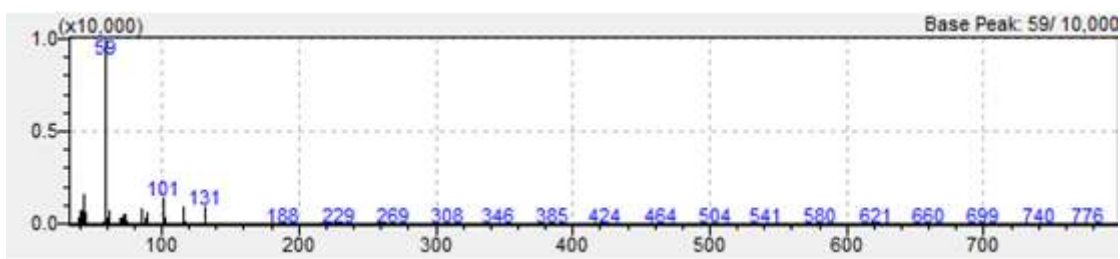
Pico 2:



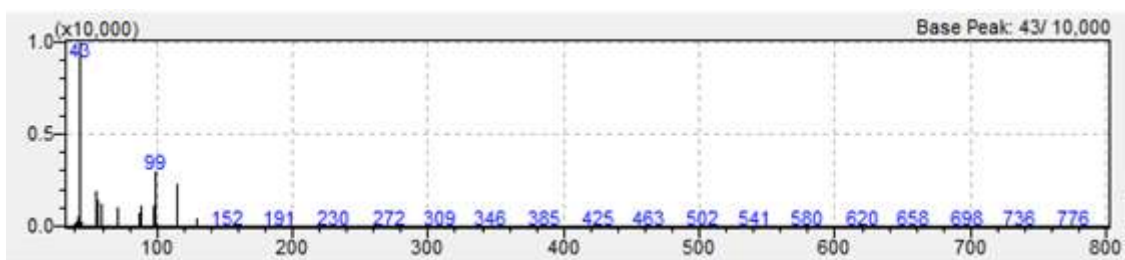
Pico 3:



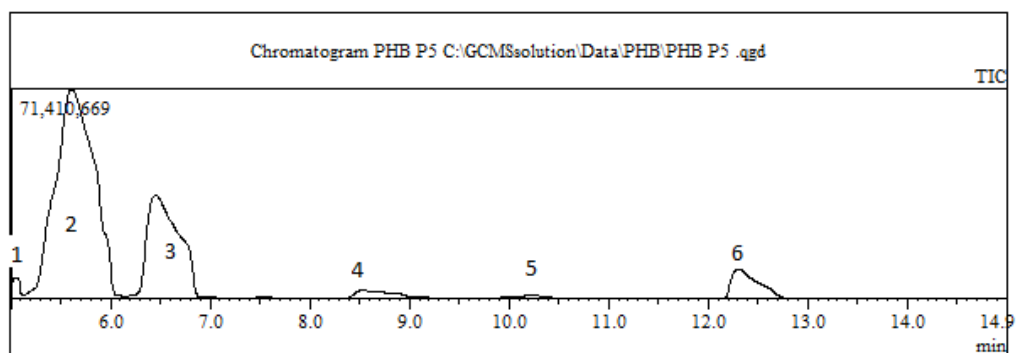
Pico 4:



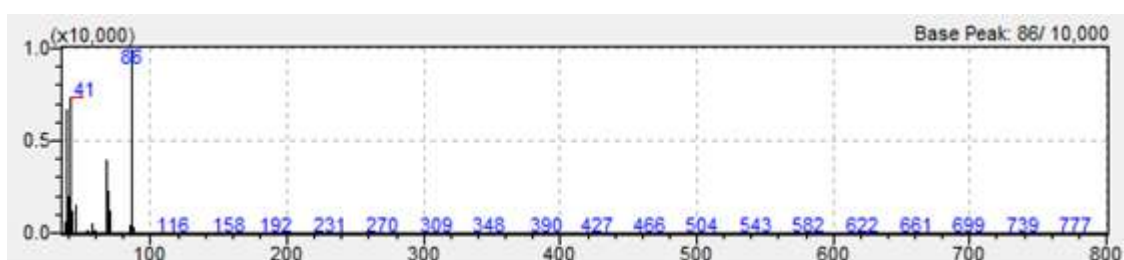
Pico 5:



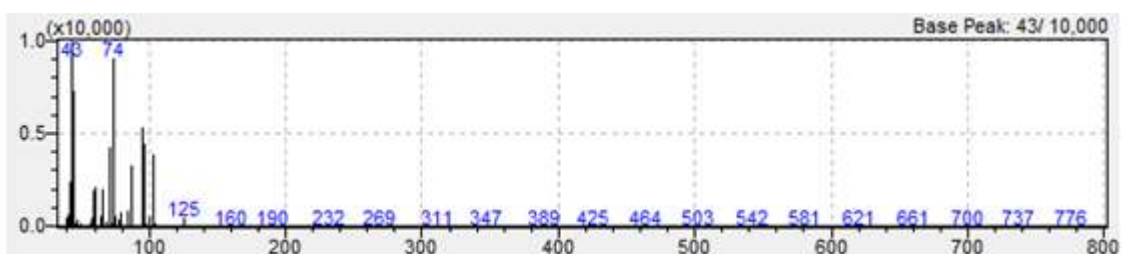
Cromatogramas Para los PHB obtenidos de la condicion de fermentación 5, de los residuos de cascara de piña



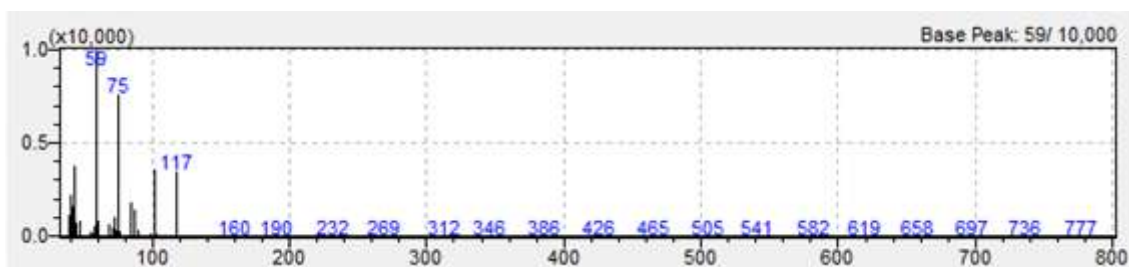
Pico 1:



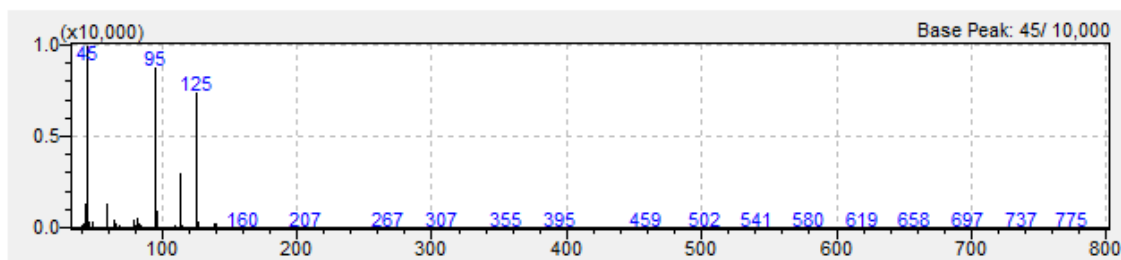
Pico 2:



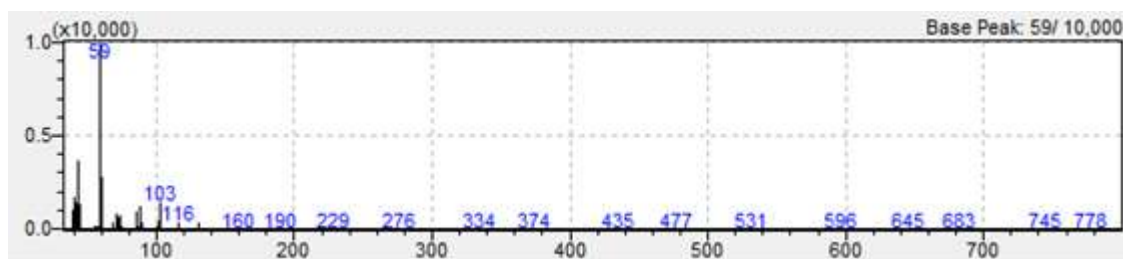
Pico 3:



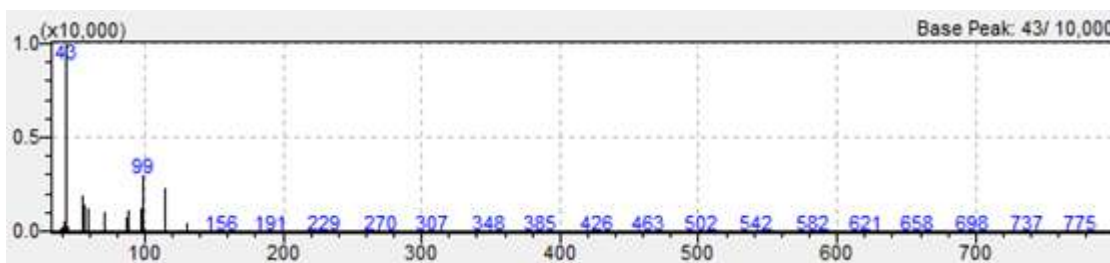
Pico 4:



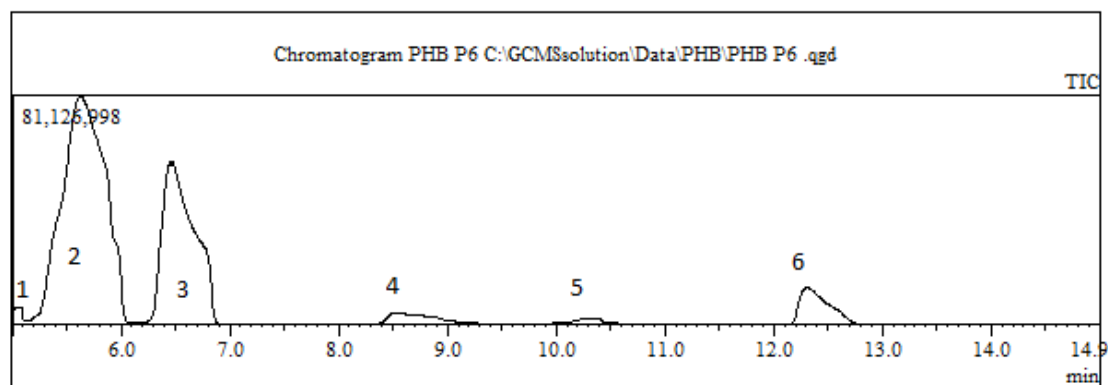
Pico 5:



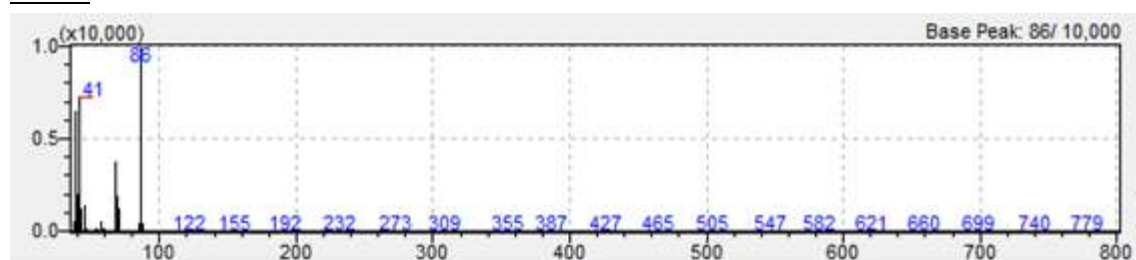
Pico 6:



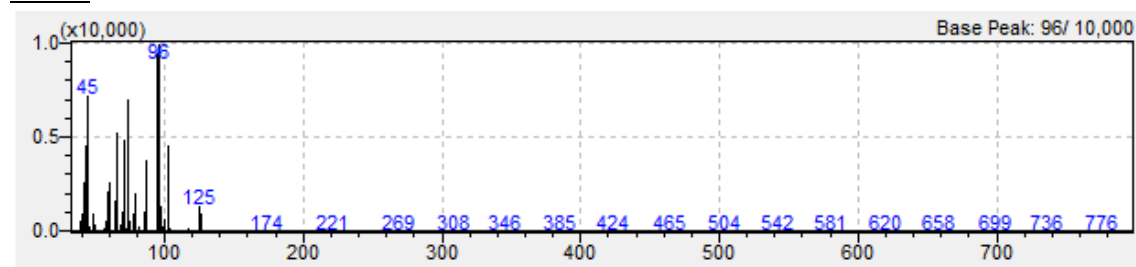
Cromatogramas Para los PHB obtenidos de la condición de fermentación 6, de los residuos de cascara de piña



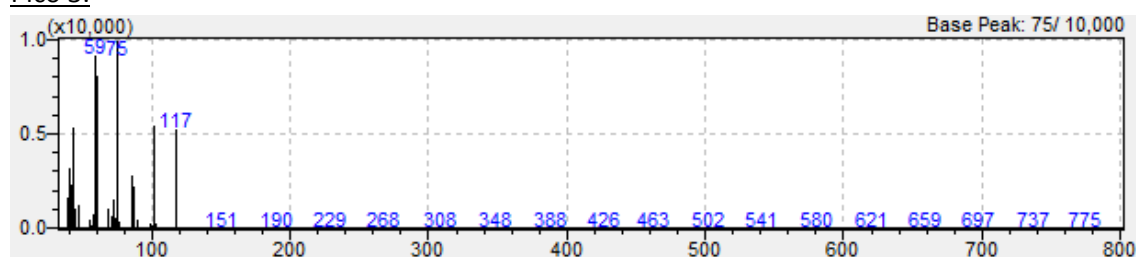
Pico 1:



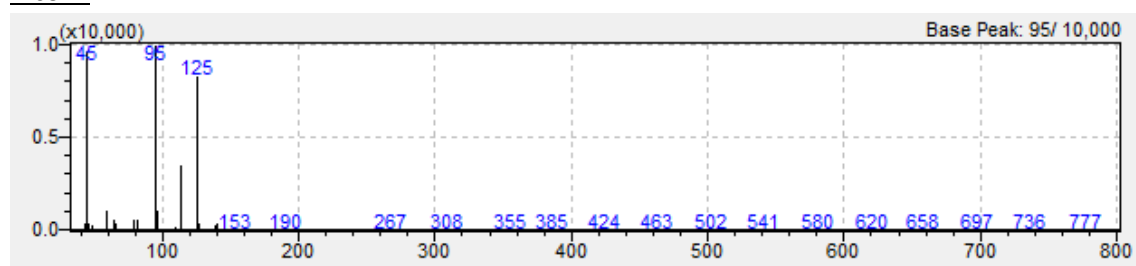
Pico 2:



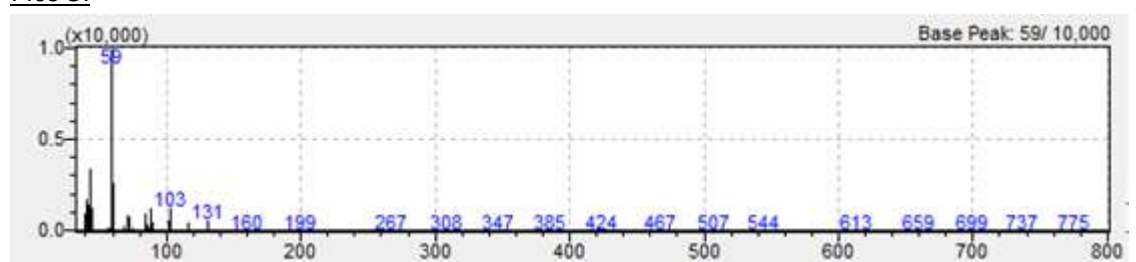
Pico 3:



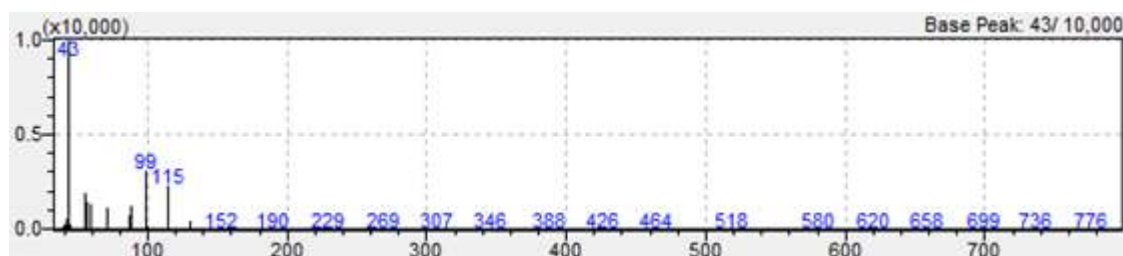
Pico 4:



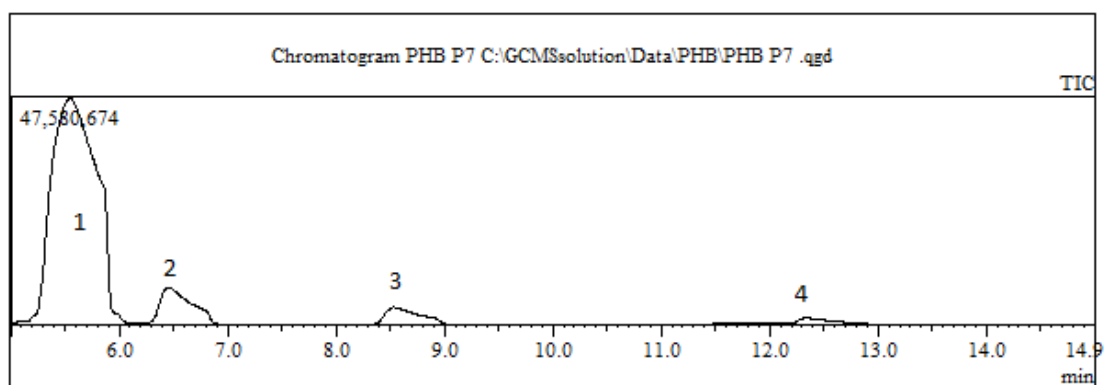
Pico 5:



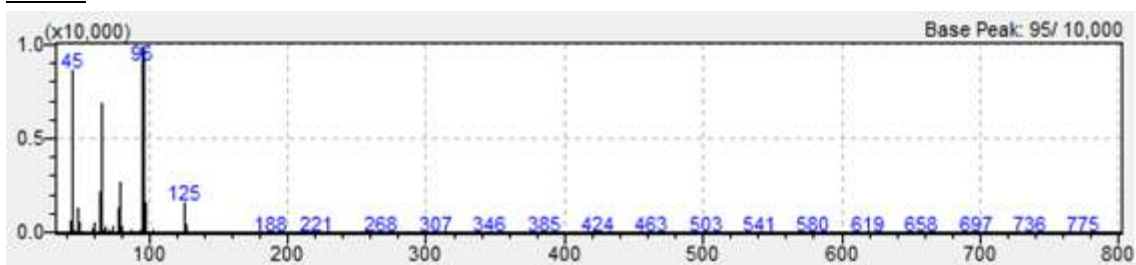
Pico 6:



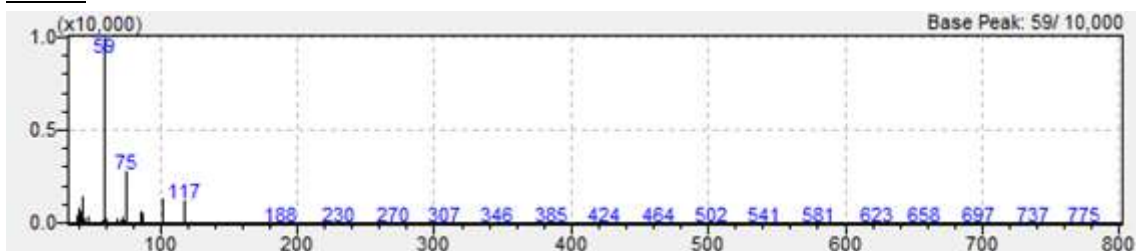
Cromatogramas Para los PHB obtenidos de la condición de fermentación 7, de los residuos de cascara de piña



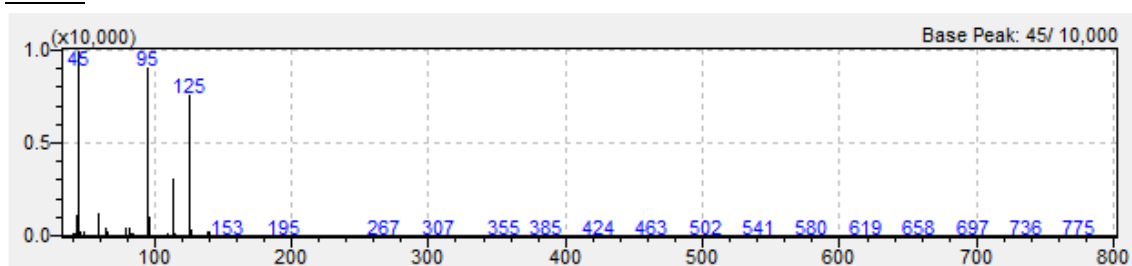
Pico 1:



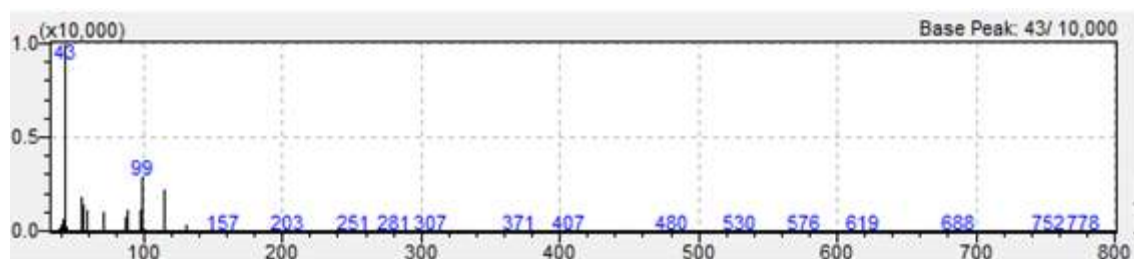
Pico 2:



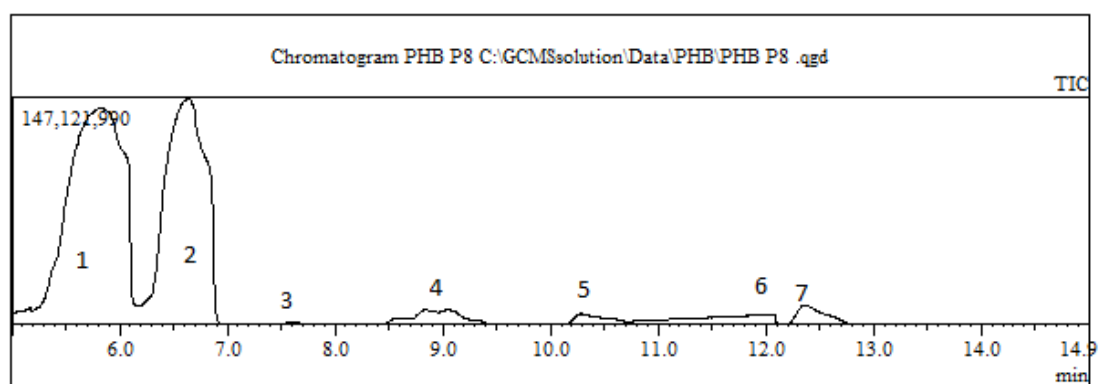
Pico 3:



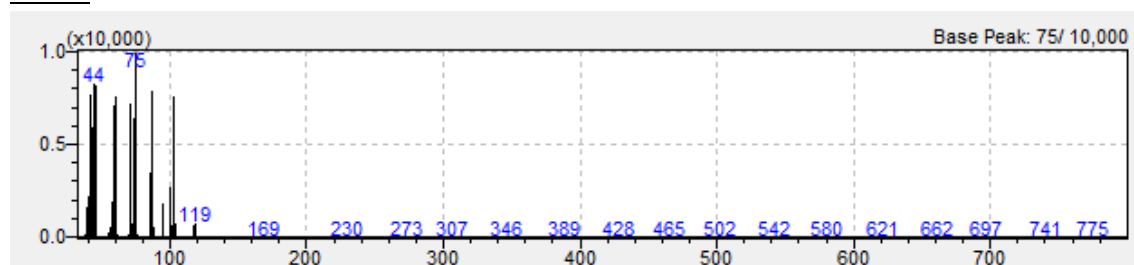
Pico 4:



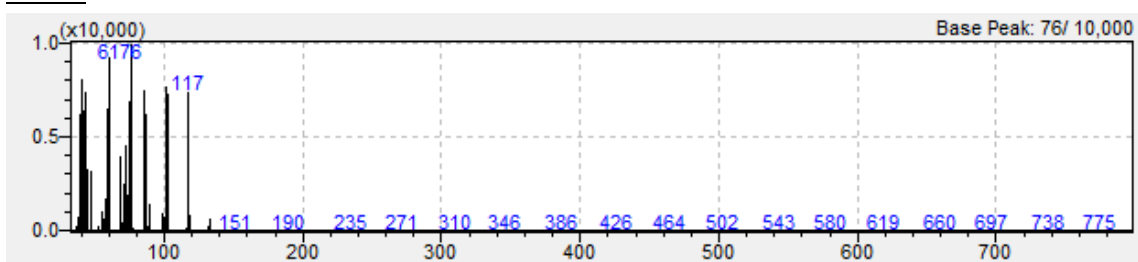
Cromatogramas Para los PHB obtenidos de la condición de fermentación 8, de los residuos de cascara de piña



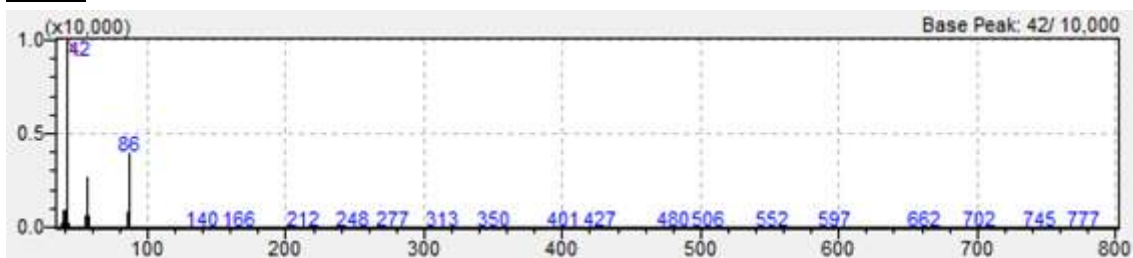
Pico 1:



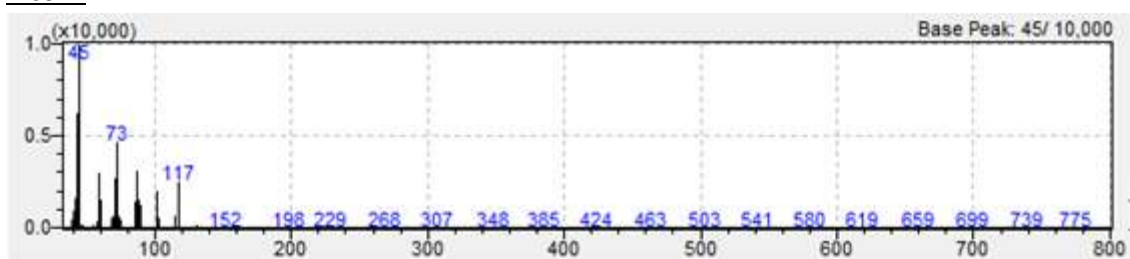
Pico 2:



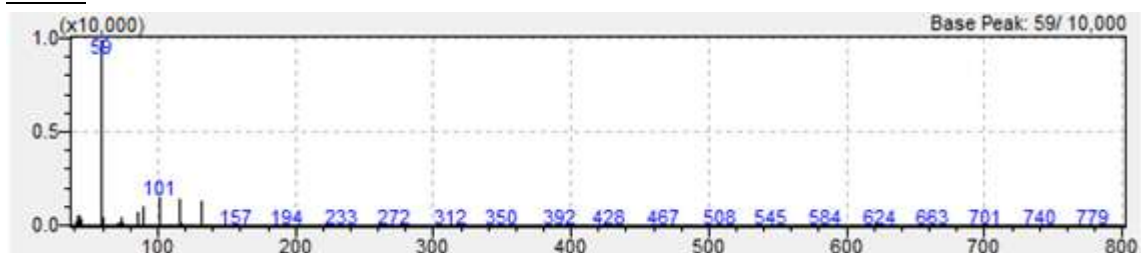
Pico 3:



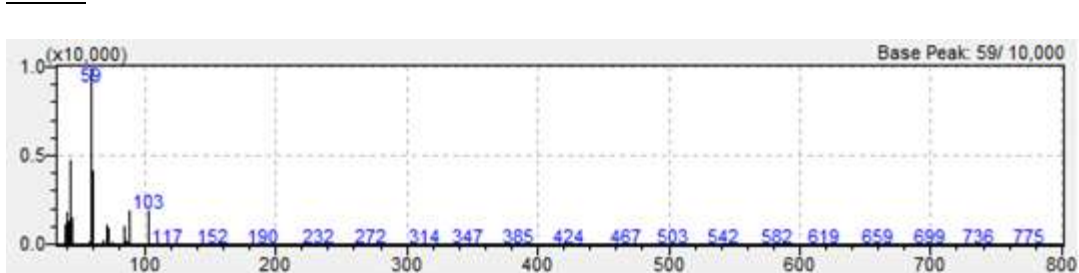
Pico 4:



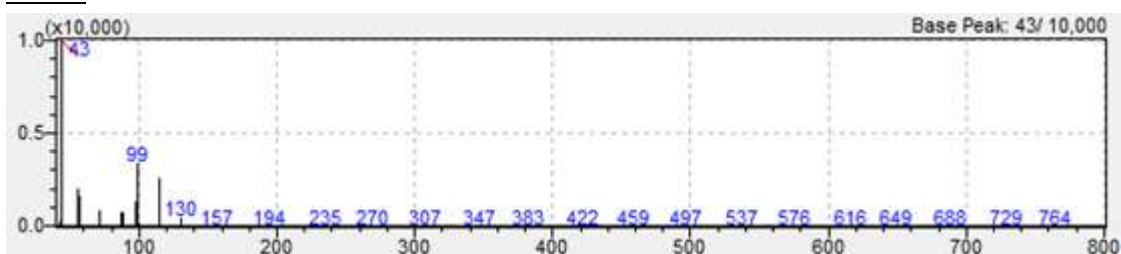
Pico 5:



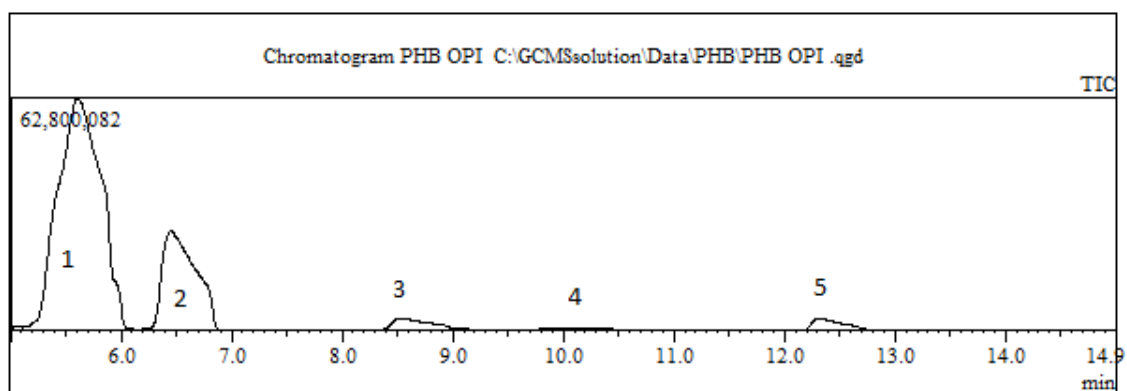
Pico 6:



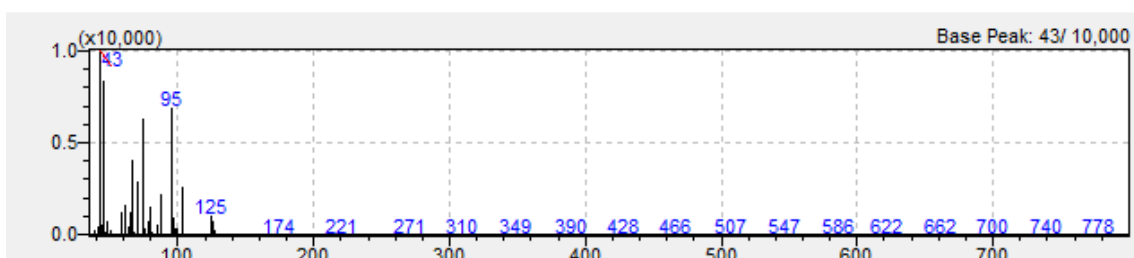
Pico 7:



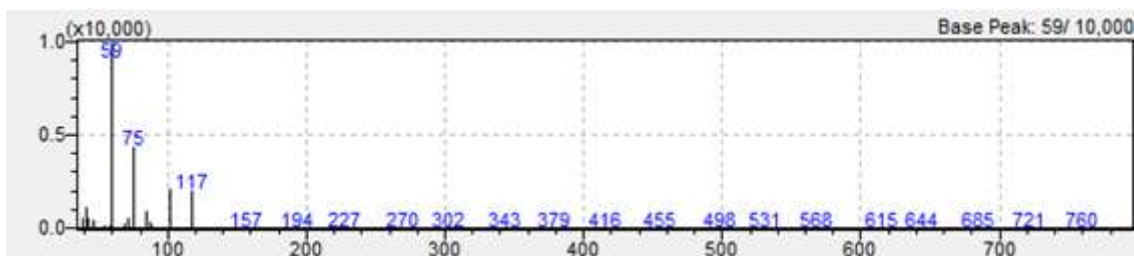
Cromatogramas Para los PHB obtenidos de la condición de fermentación 9, de los residuos de cascara de piña.

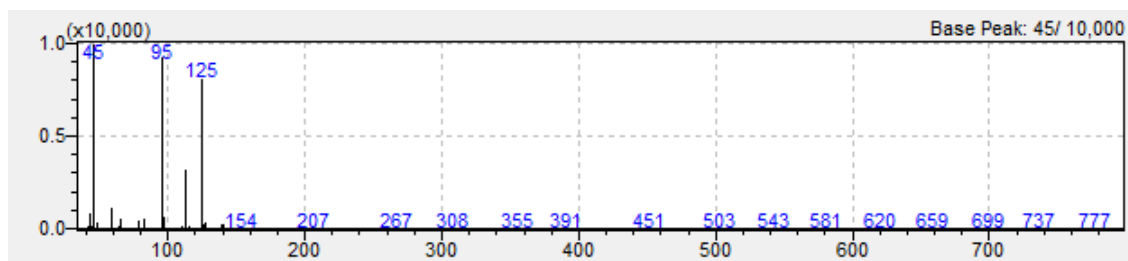
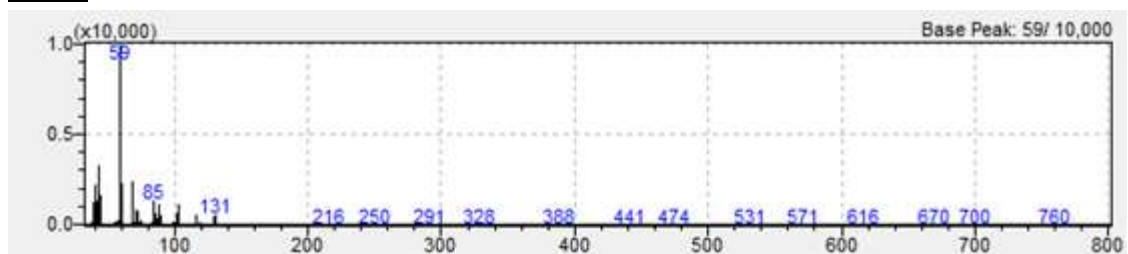
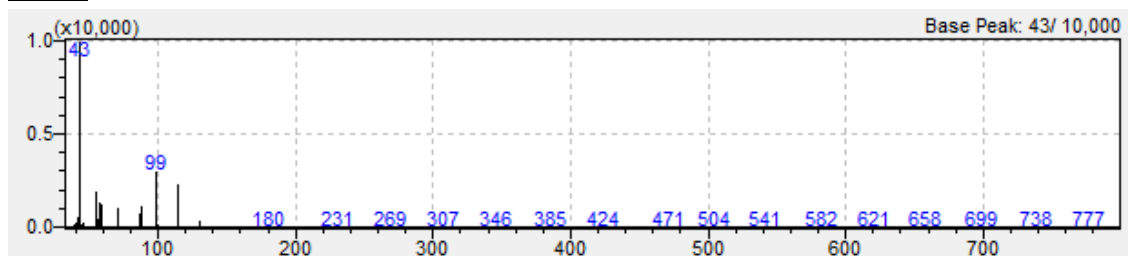


Pico 1:

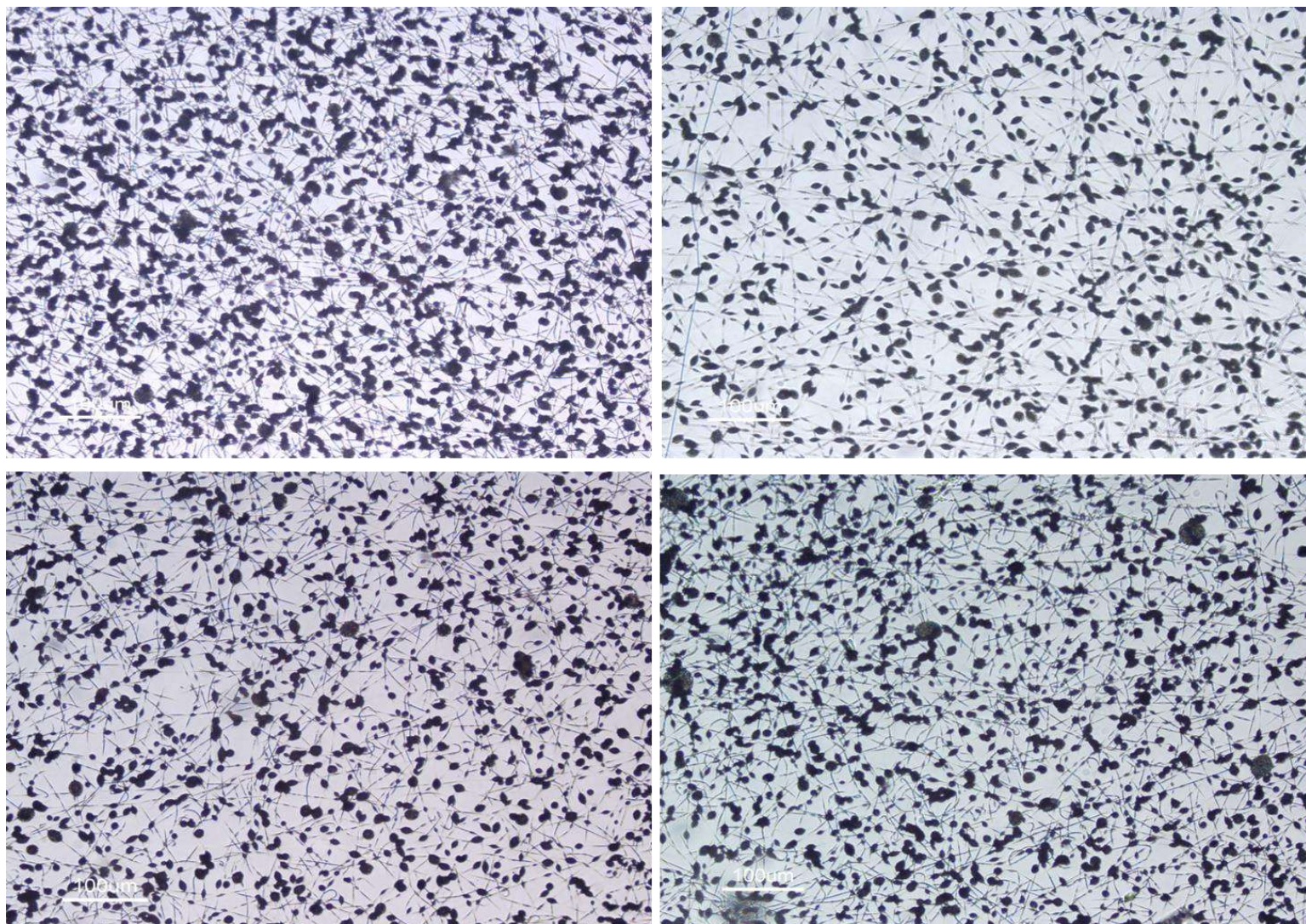


Pico 2:

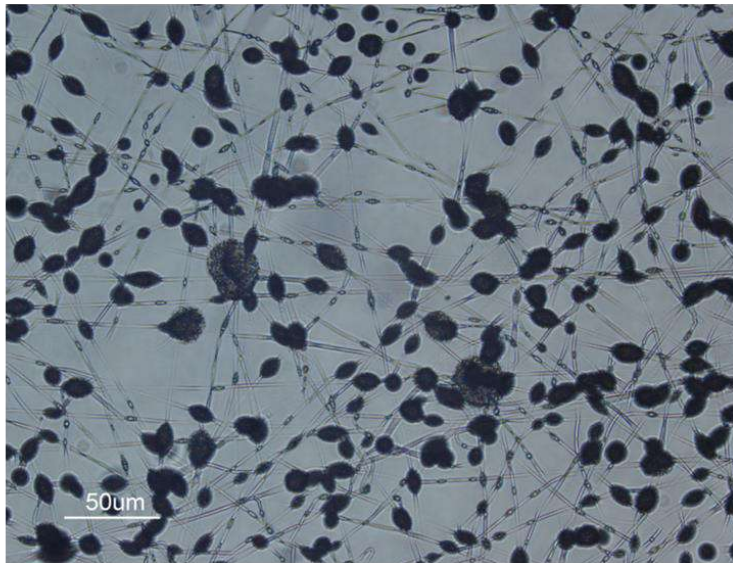
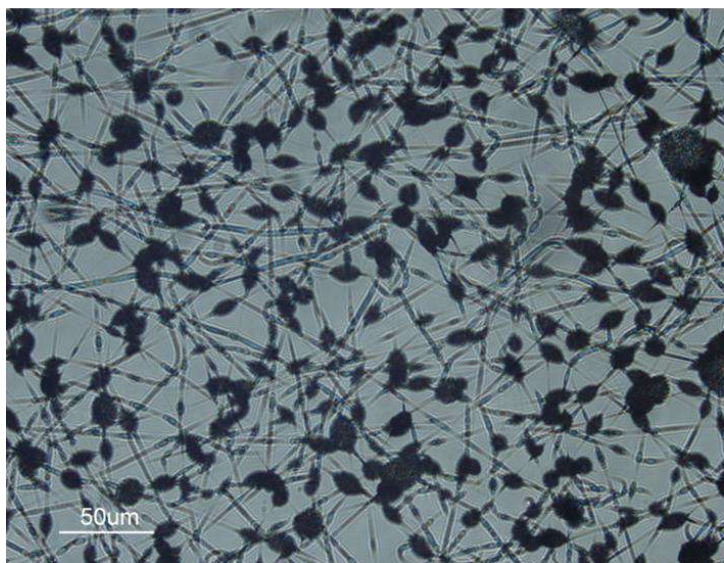
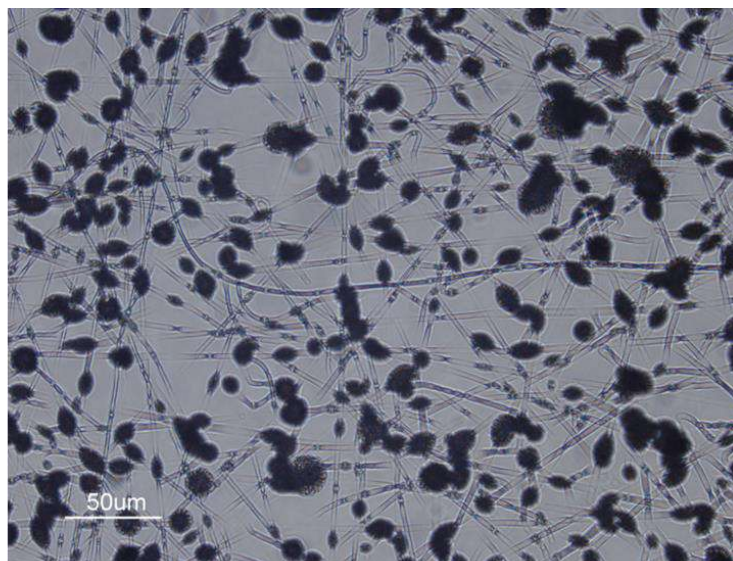
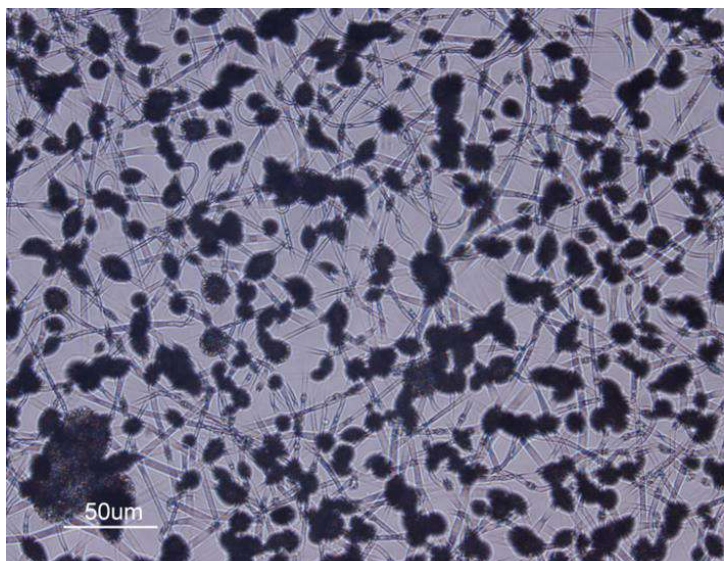


Pico 3:Pico 4:Pico 5:

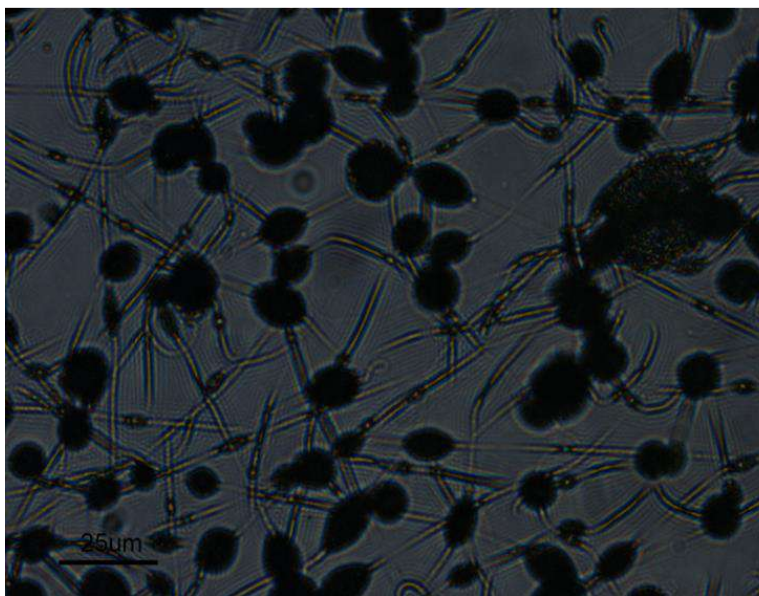
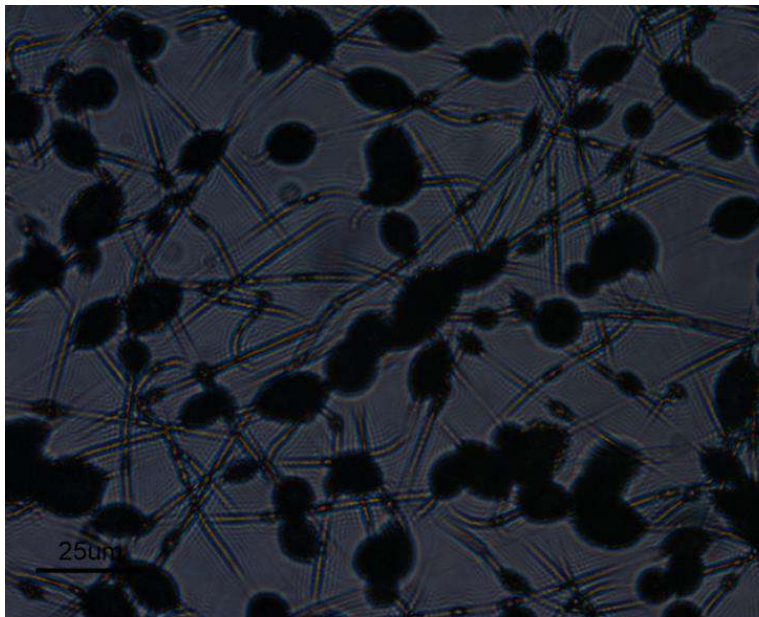
**ANEXO 3. FOTOGRAFIAS DE LAS MICROFIBRAS OBTENIDAS POR
ELECTROSPINNING.**



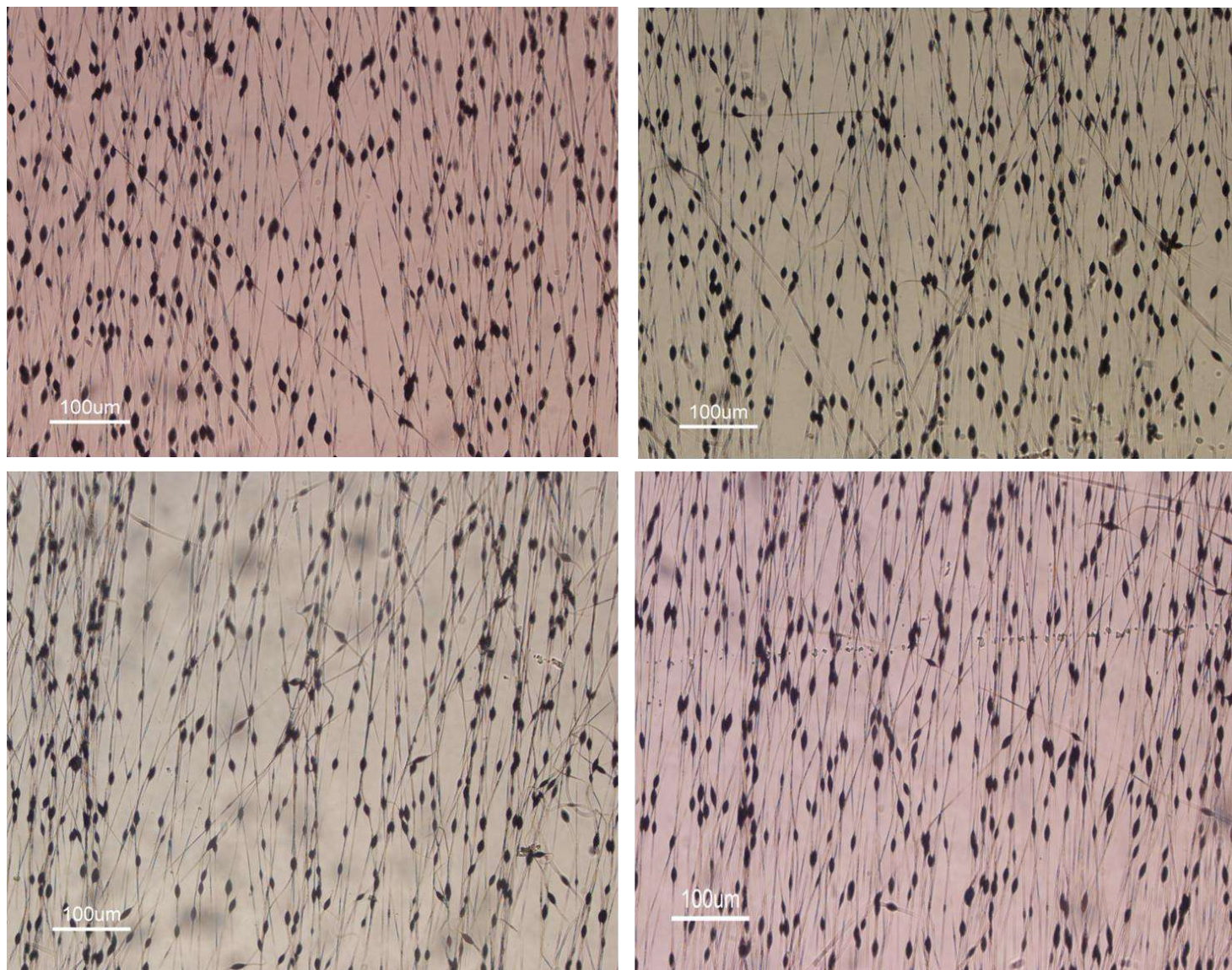
Fotografías con microscopio electrónico a 100μm (100x), de las microfibras aleatorias obtenidas a partir de los polidroxialcanoatos extraídos de las fermentaciones de los residuos de cascara de yuca.



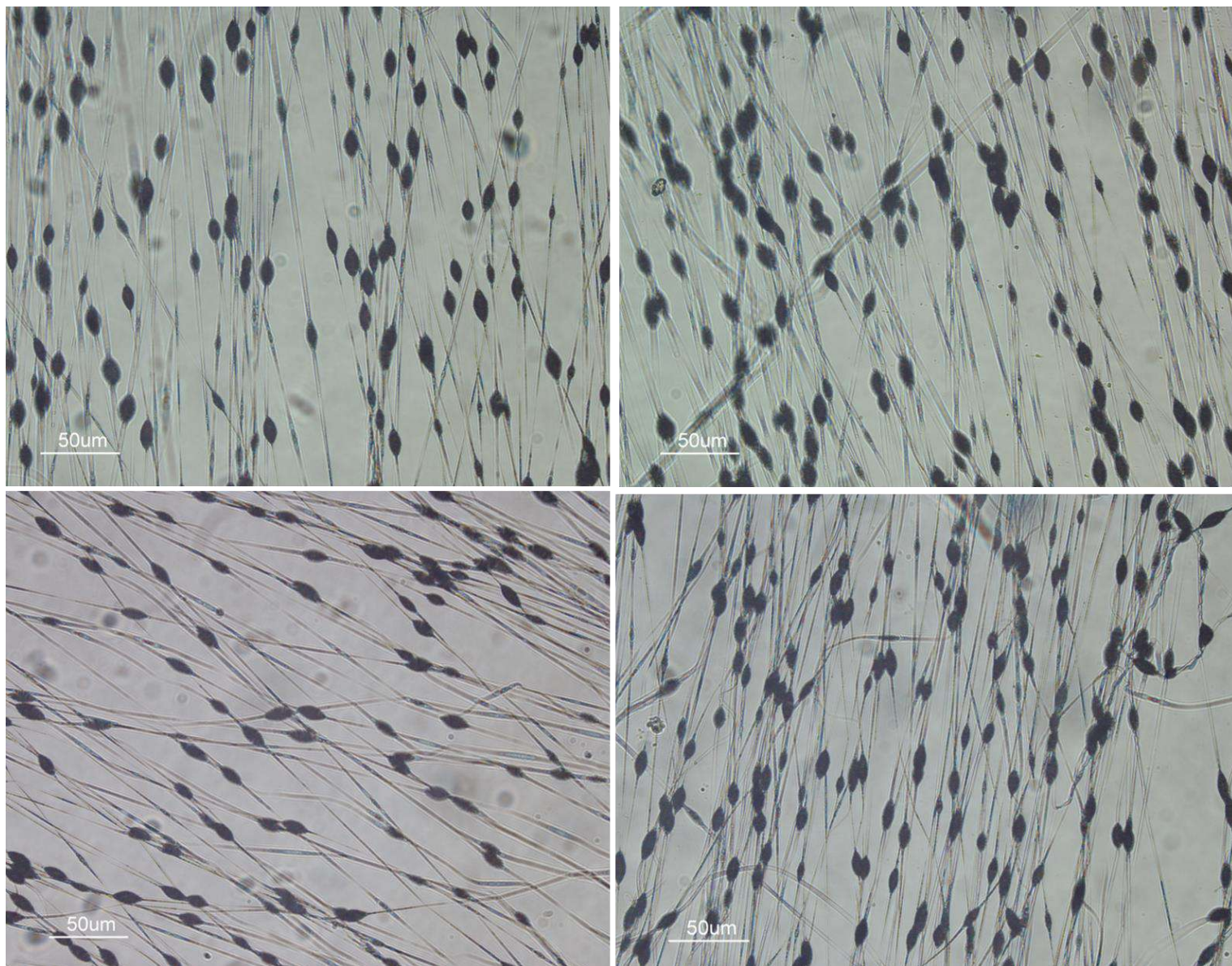
Fotografías con microscopio electrónico a 50um (200x), de las microfibras aleatorias obtenidas a partir de los polidroxialcanoatos extraídos de las fermentaciones de los residuos de cascara de yuca.



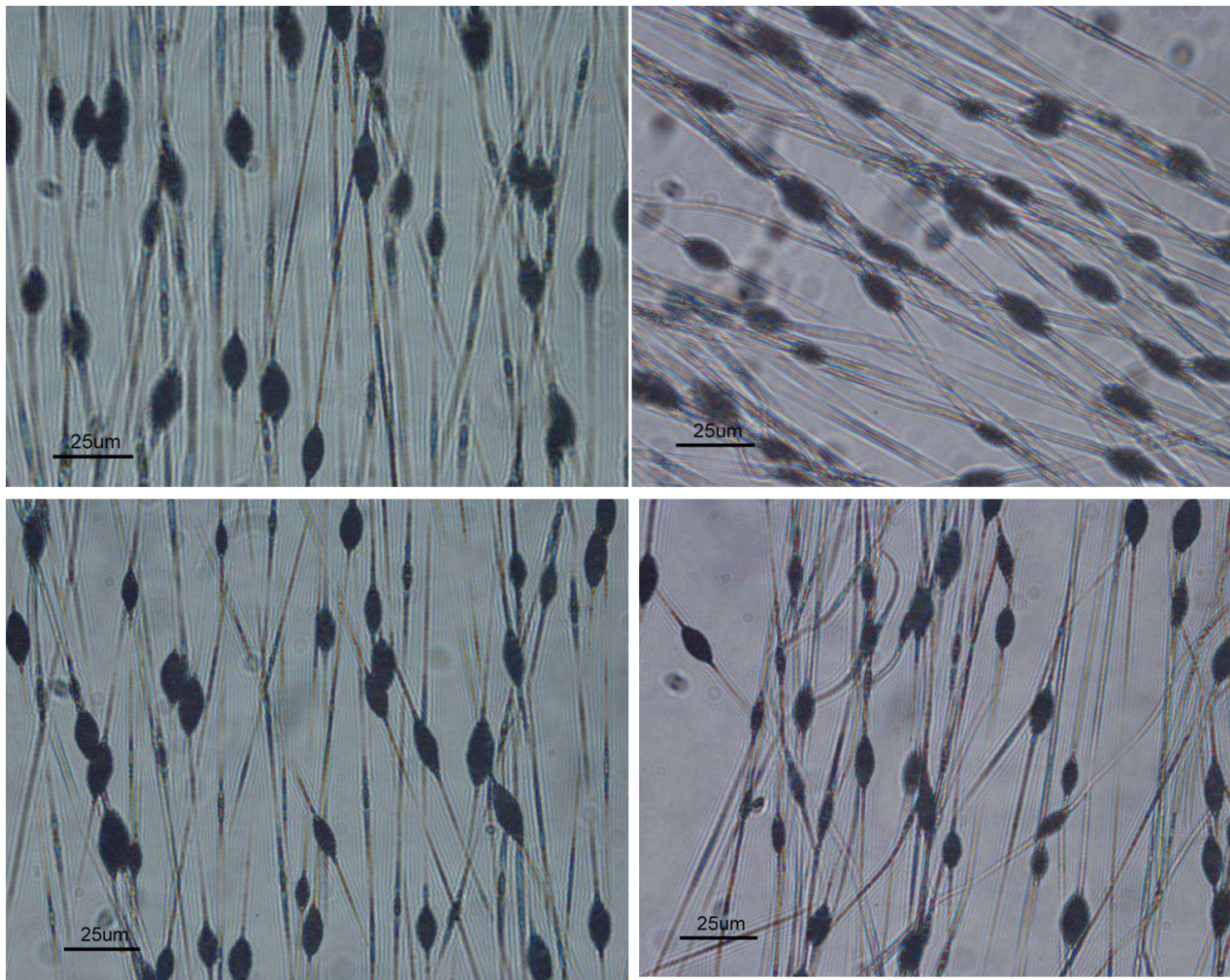
Fotografías con microscopio electrónico a 25μm (400x), de las microfibras aleatorias obtenidas a partir de los polidroxialcanoatos extraídos de las fermentaciones de los residuos de cascara de yuca.



Fotografías con microscopio electrónico a 100um (100x), de las microfibras lineales obtenidas a partir de los polidroxialcanoatos extraídos de las fermentaciones de los residuos de cascara de yuca

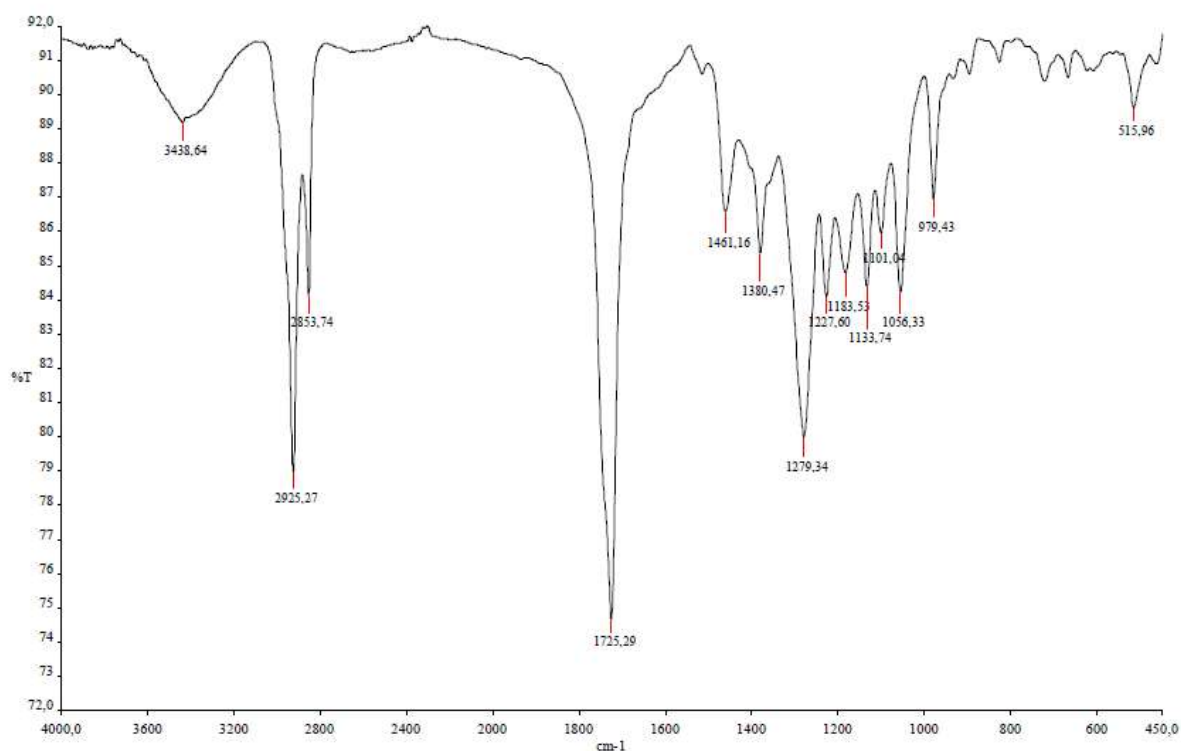


Fotografías con microscopio electrónico a 50um (200x), de las microfibras lineales obtenidas a partir de los polidroxialcanoatos extraídos de las fermentaciones de los residuos de cascara de yuca

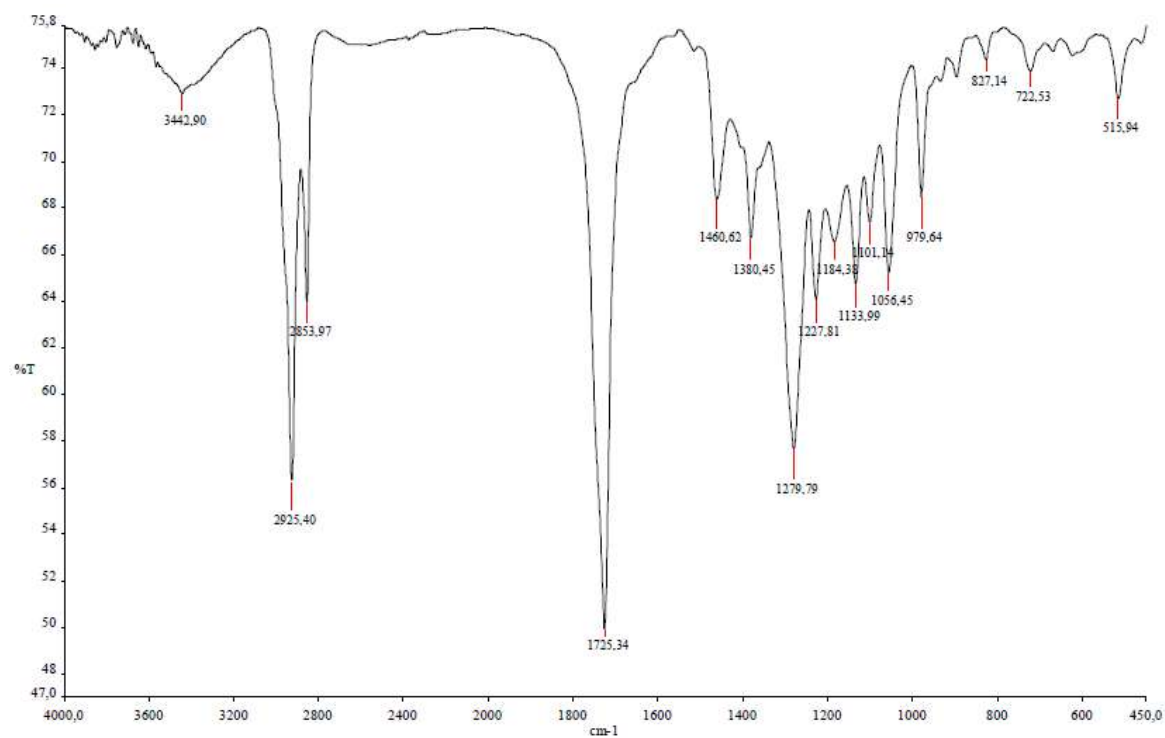


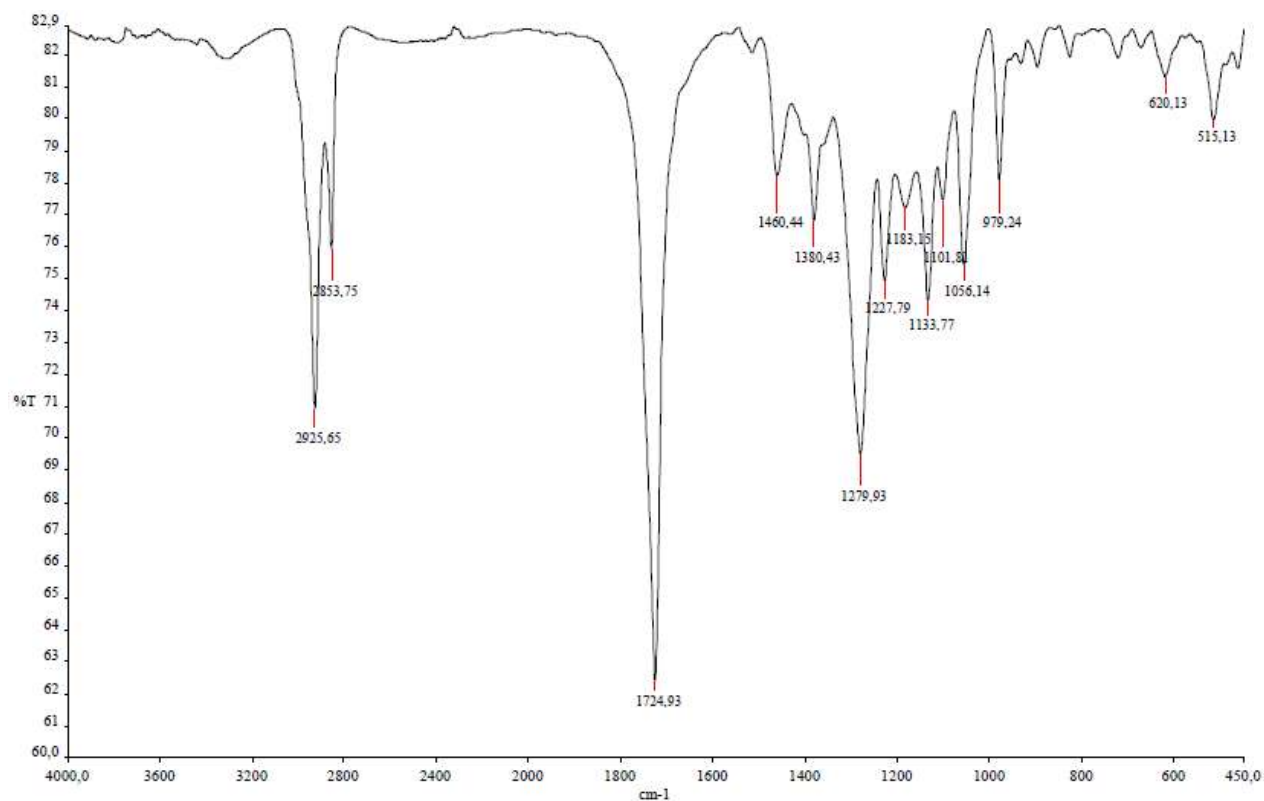
Fotografías con microscopio electrónico a 25um (400x), de las microfibras lineales obtenidas a partir de los polidroxialcanoatos extraídos de las fermentaciones de los residuos de cascara de yuca

ANEXO 4. ESPECTROS FTIR.

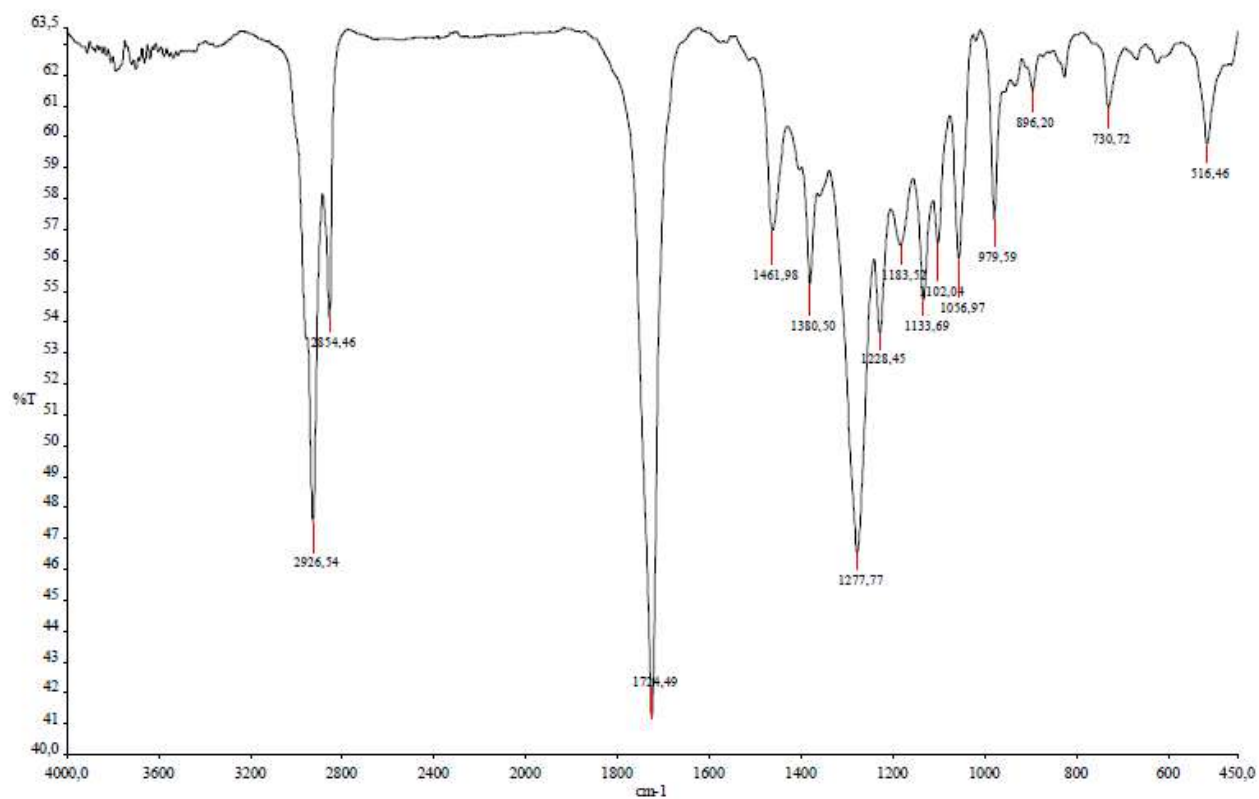


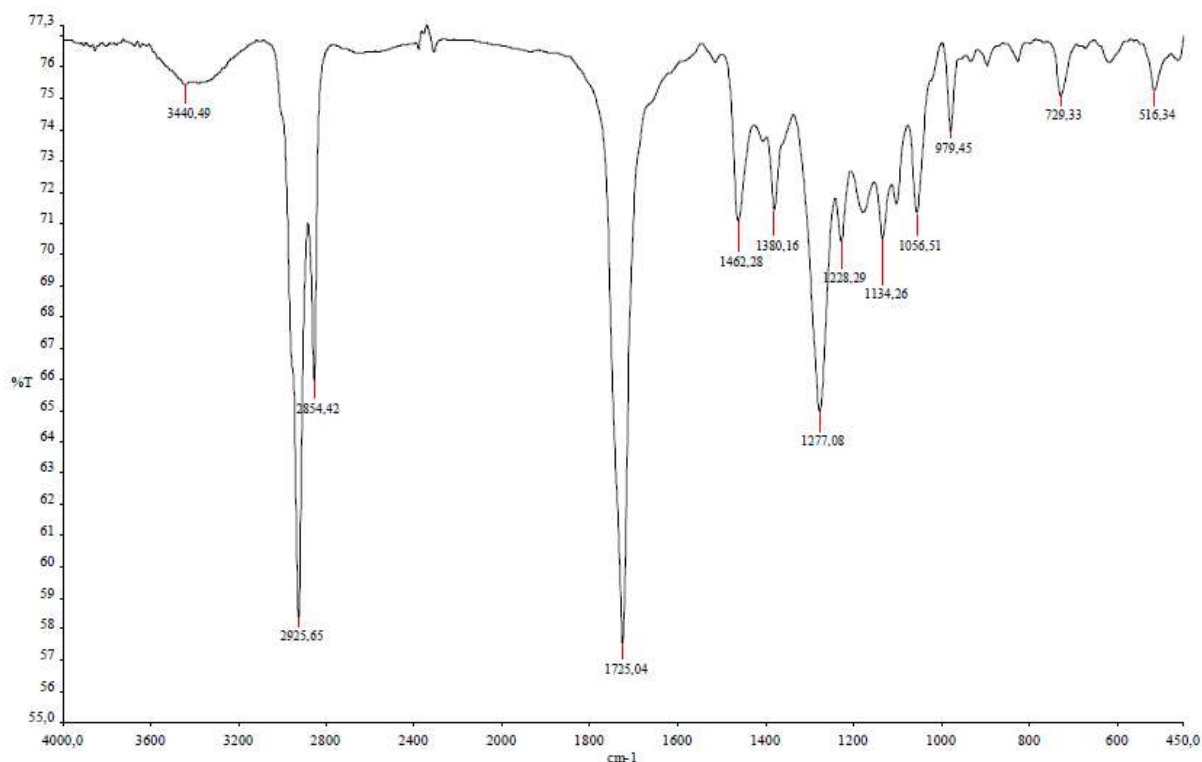
Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 1, residuos de cascara de piña.



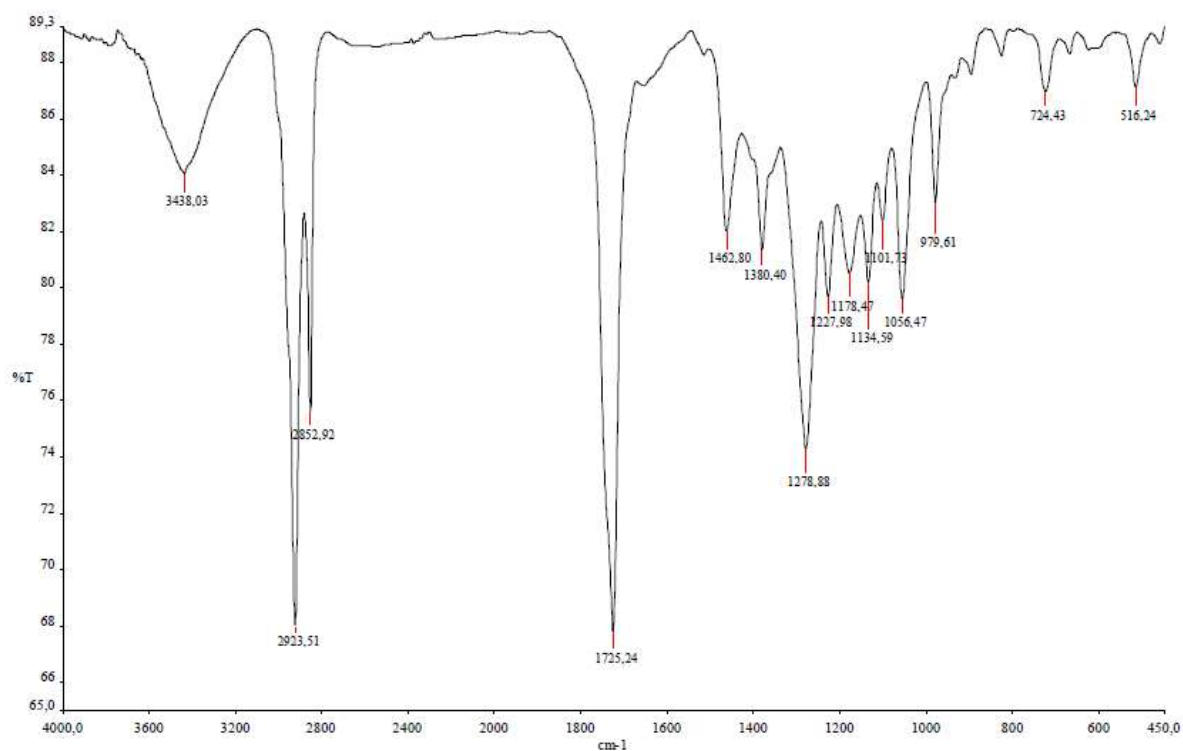


Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 3, residuos de cascara de piña.

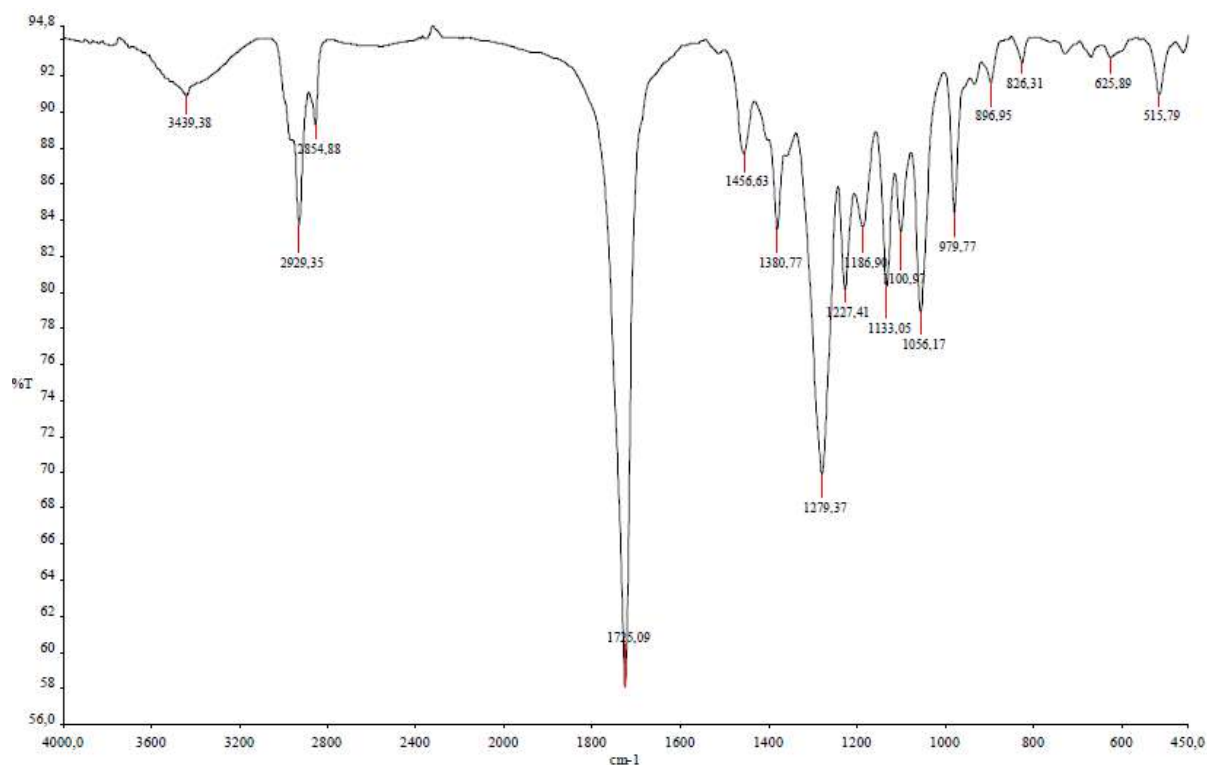




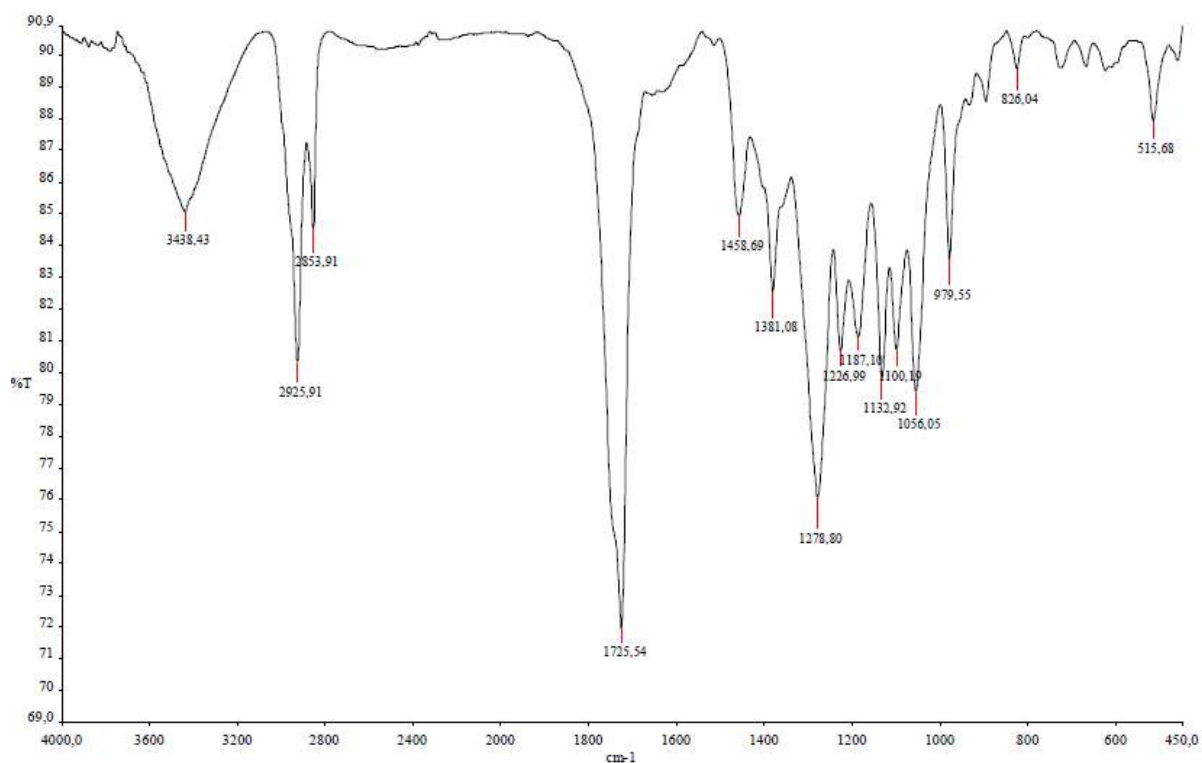
Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 5, residuos de cascara de piña.



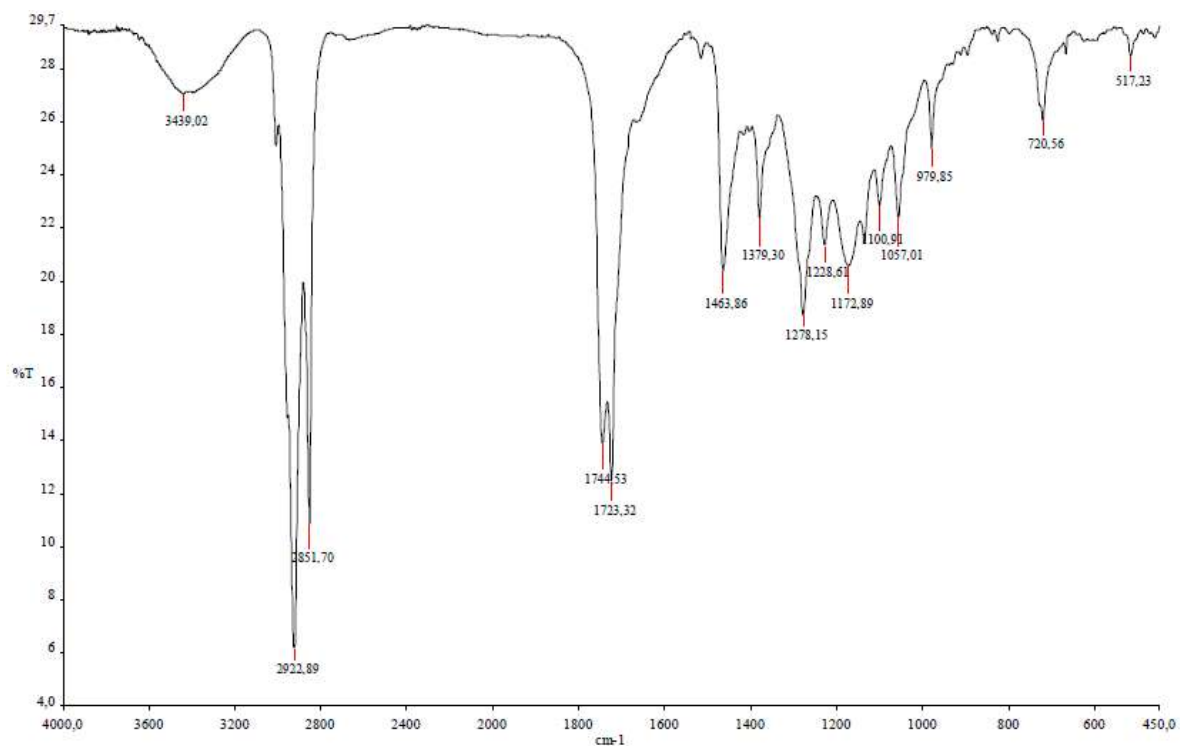
Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 6, residuos de cascara de piña.



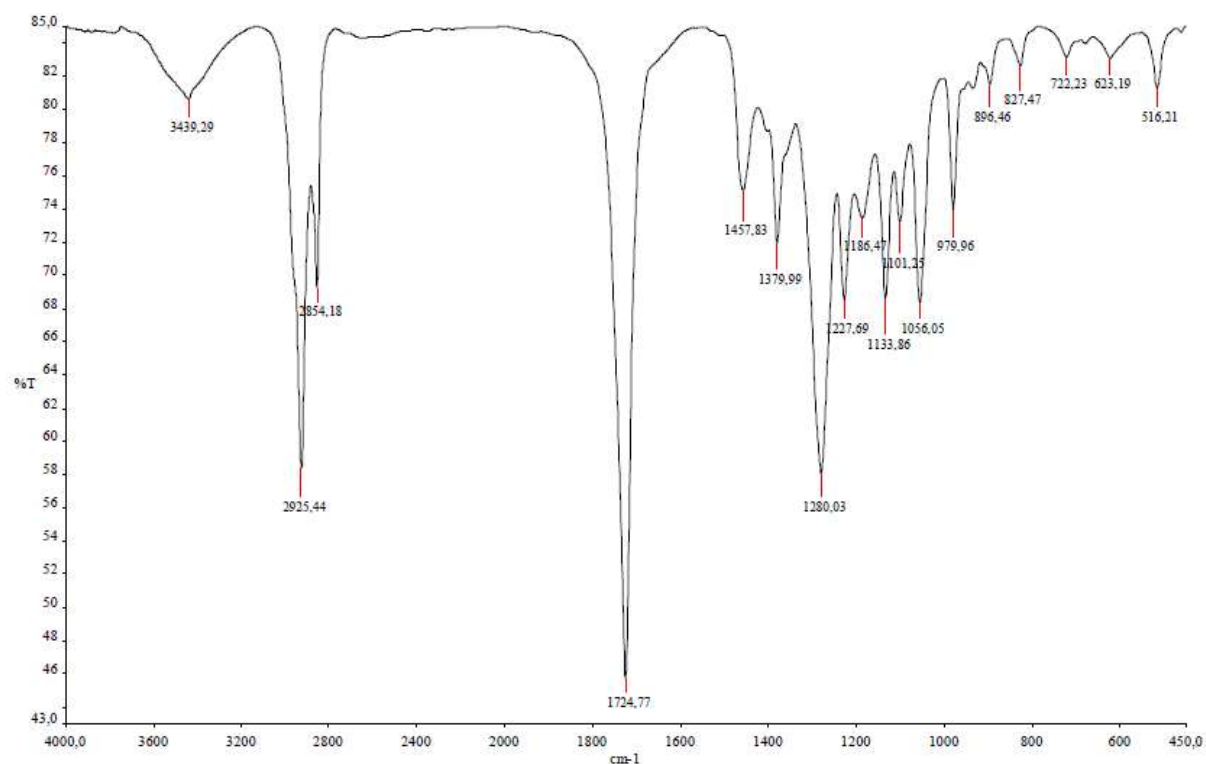
Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 7, residuos de cascara de piña.



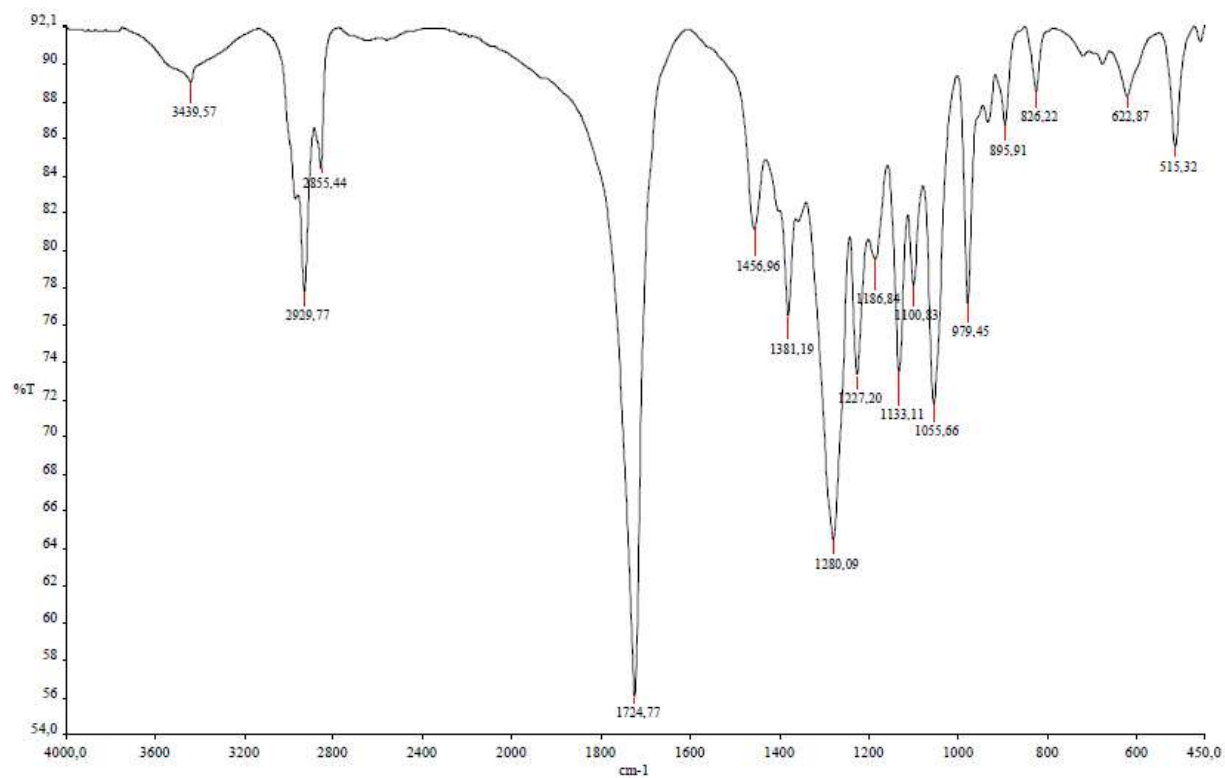
Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 8, residuos de cascara de piña.



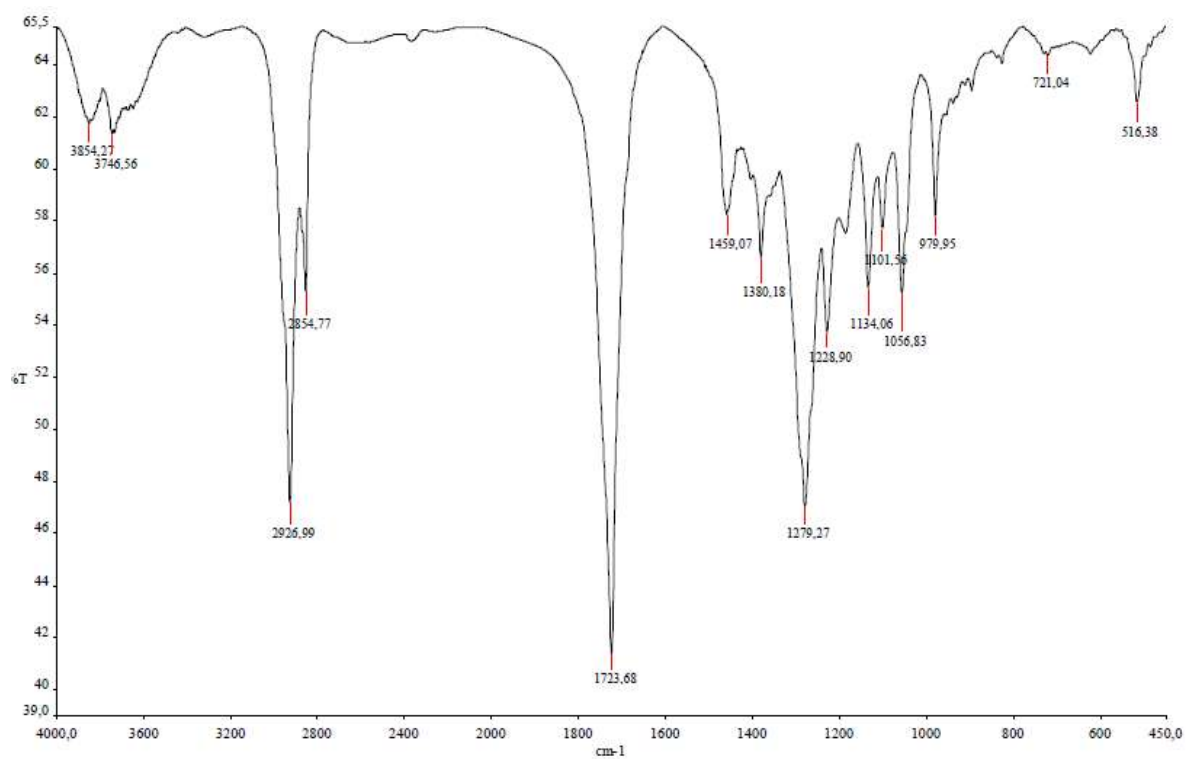
Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 9, residuos de cascara de piña.



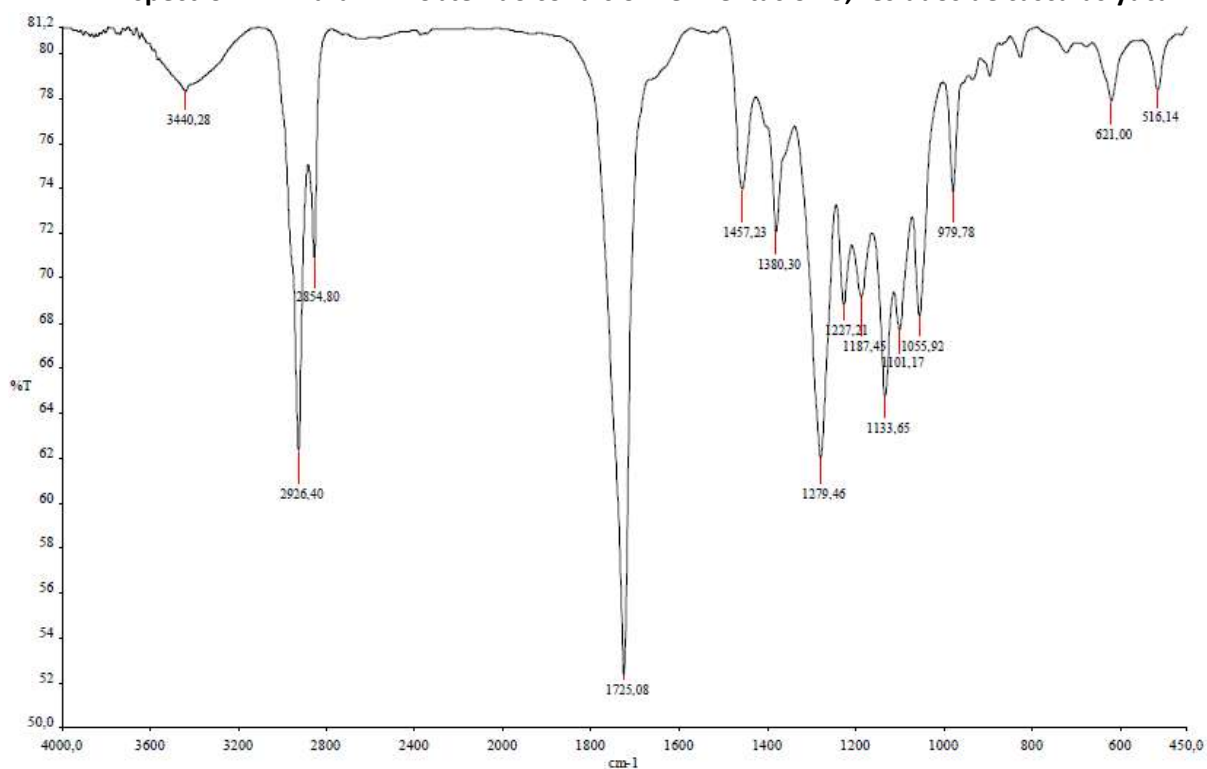
Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 1, residuos de cascara yuca.



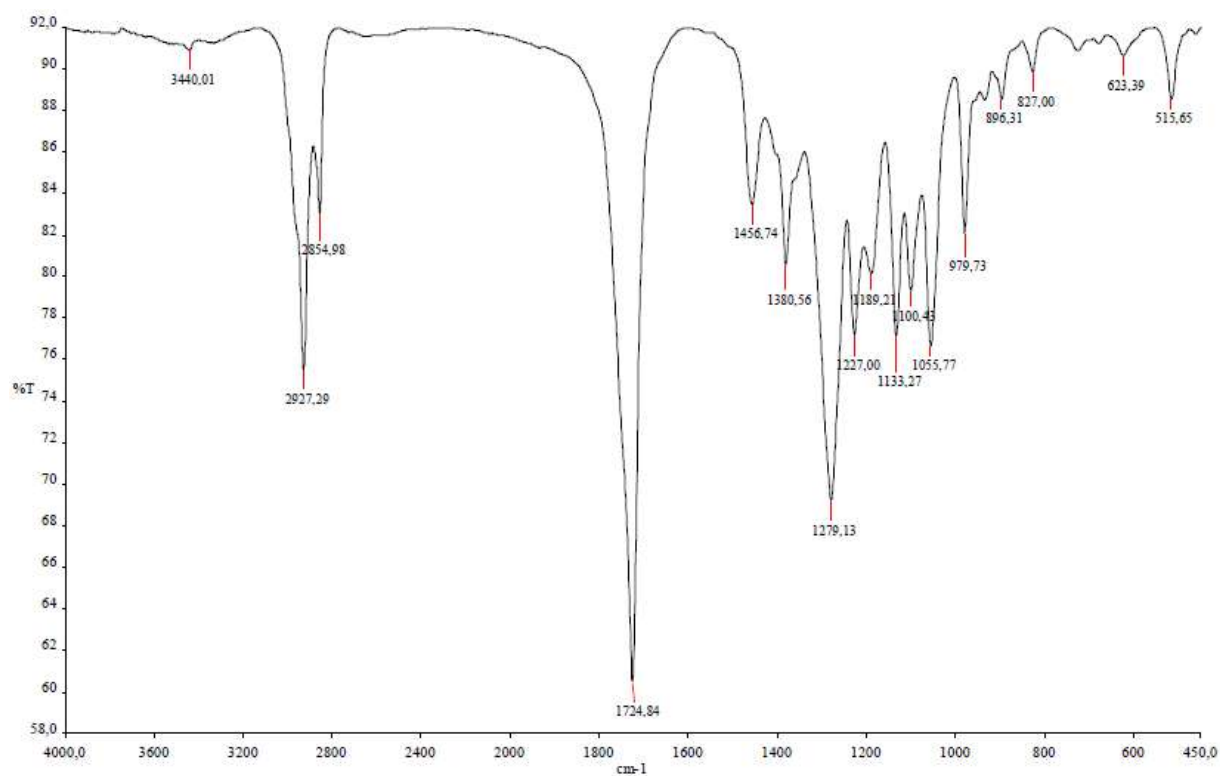
Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 2, residuos de cascaras yuca.

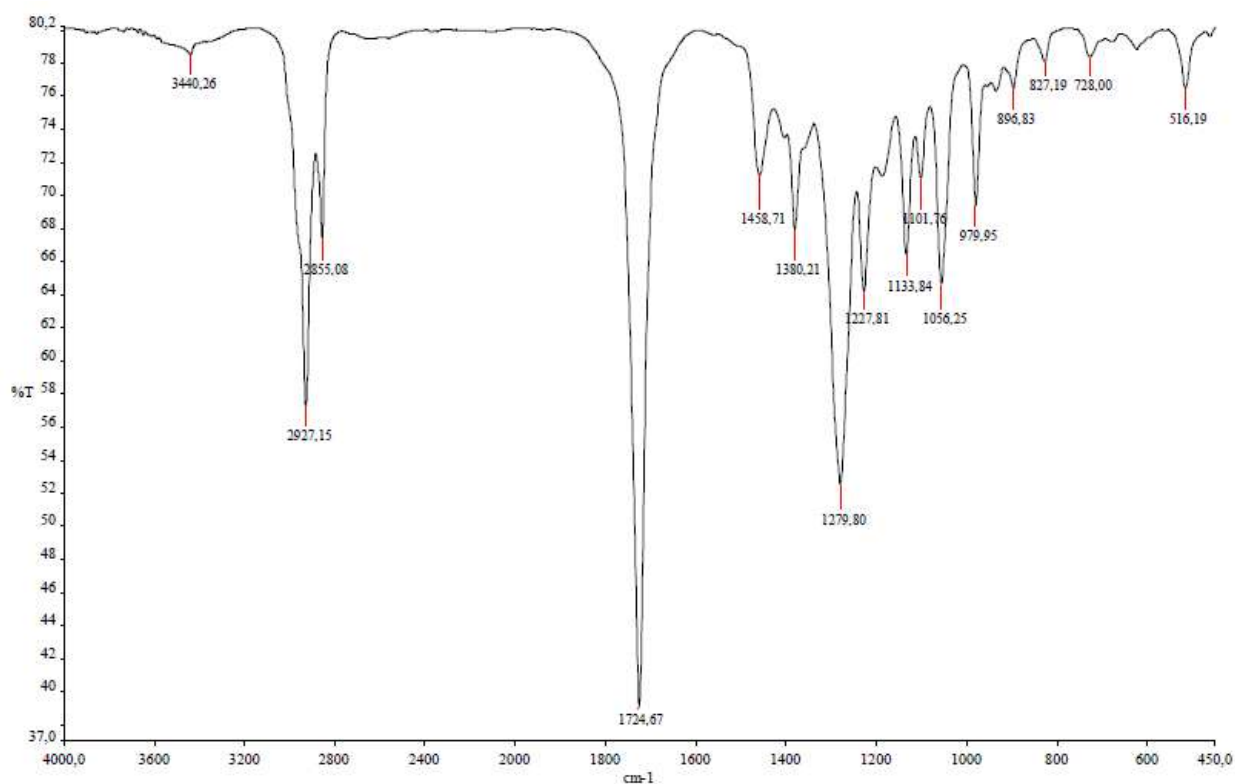


Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 3, residuos de cascaras yuca.

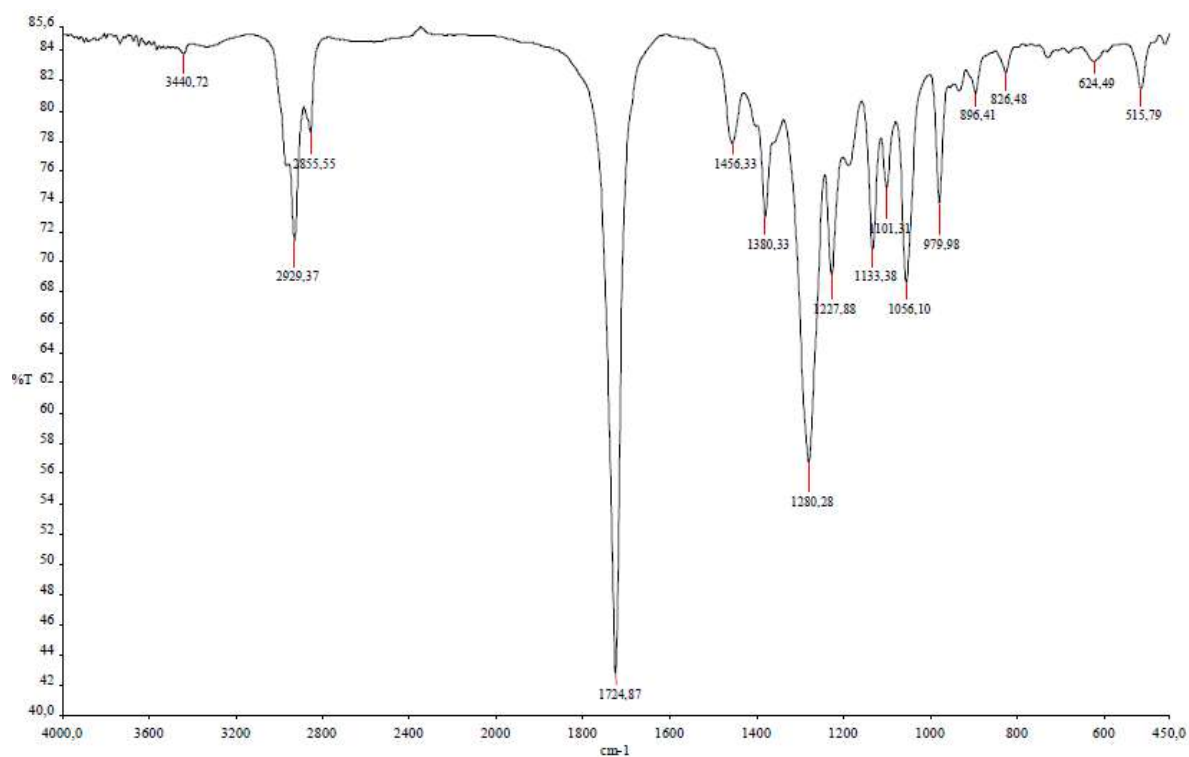


Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 4, residuos de cascaras yuca.

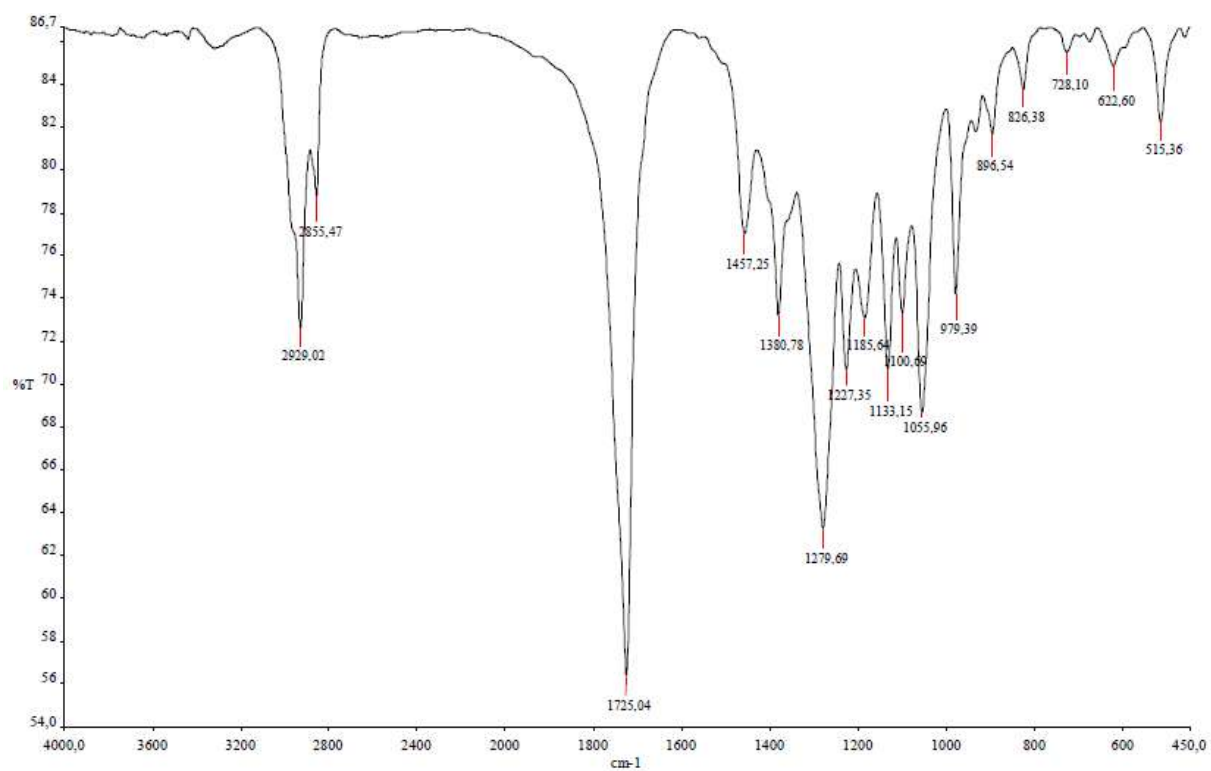




Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 6, residuos de cascaras yuca.



Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 7, residuos de cascaras yuca.



Espectro FTIR. Para PHA obtenido condición fermentación 8, residuos de cascaras yuca.

**ANEXO 5. PRODUCTOS ACADEMICOS DEL TRABAJO DE
INVESTIGACION.**



CERTIFICATE OF PRESENTATION

We hereby confirm that

O.A. Vega

Gave the following oral presentation reference O2.05

Thermal and structural characterization of two polyhydroxyalkanoates, obtained from cassava and pineapple wastes, by *Ralstonia eutropha*

At the

ICEF12

Québec City Canada June 14-18, 2015

For and on behalf of



CERTIFICA QUE:
OSCAR VEGA

CONFERENCISTA

ASISTIÓ AL EVENTO:

**II Congreso Colombiano de Estudiantes de Ingeniería de Alimentos
y AL II Simposio Internacional de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias**

OCTUBRE 26, 27, 28 Y 29 DE 2015

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
MEDELLÍN - COLOMBIA

Juan Carlos Alarcón Pérez
Decano



Daniel Alejandro Bedoya Ramírez
Coordinador CONCEIA-II ACEIAL



Accepted Manuscript

Title: Characterization of a polyhydroxyalkanoate obtained from pineapple peel waste using *Ralstonia eutropha*

Author: Oscar Vega Jose Contreras Emilson León Almir Segura Mario Arias León Pérez Paulo J.A. Sobral



PII: S0168-1656(16)31361-X
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jbiotec.2016.06.018>
Reference: BIOTEC 7596

To appear in: *Journal of Biotechnology*

Received date: 25-4-2016
Revised date: 7-6-2016
Accepted date: 13-6-2016

Please cite this article as: Vega, Oscar, Contreras, Jose, León, Emilson, Segura, Almir, Arias, Mario, Pérez, León, Sobral, Paulo J.A., Characterization of a polyhydroxyalkanoate obtained from pineapple peel waste using *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.018>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.