
Planteamiento de un método de producción y extracción de polihidroxicanoatos de una mezcla de microalgas.

Rodrigo Alessandro Vásquez López



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Ciencias y Humanidades

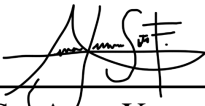


**Planteamiento de un método de producción y
extracción de polihidroxicanoatos de una mezcla de
microalgas.**

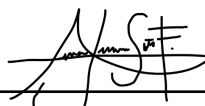
Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Rodrigo Alessandro Vásquez López
para optar al grado académico de Licenciado en Biotecnología Molecular


Guatemala
2023


Vo.Bo.:

(f) 
MSc. Anna Yunnuen Soto

Tribunal Examinador:

(f) 
MSc. Anna Yunnuen Soto

(f) 
Patrizia Lupo, Ph.D.

(f) 
Dalia Lau-Bonilla, Ph.D.

Fecha de aprobación: Guatemala, 4 de diciembre de 2023.

El presente trabajo de investigación fue realizado en conjunto con el Centro de Estudios en Biotecnología de la Universidad del Valle de Guatemala y Cementos Progreso. El proyecto busca aprovechar el uso de microalgas que fueron recolectadas de un humedal artificial de Cementos Progreso ubicado en el Sanarate, El Progreso Guatemala. El objetivo de la presente investigación es plantear un método de producción y extracción de polihidroxialcanoatos (PHA) sometiendo una mezcla de microalgas a condiciones de estrés por déficit de nutrientes. Agradezco primeramente a Dios por haberme permitido llevar a cabo esta investigación y darme la sabiduría para salir adelante en estos años de Universidad. A mis padres Miguel Vásquez y Ruth López por todo su esfuerzo y animo en estos años de carrera. A cada uno de mis familiares: Mildred Vásquez, Rony Hipp, Natalia García, Florisa Ruiz, Daniel Vásquez, Galilea Vásquez, además de mis amigos: Víctor Zelada, José Rodas, Yailin Rivera y Pablo Guzmán que fueron un apoyo emocional o económico durante este trayecto. A mi asesora de tesis Yunuen Soto por su apoyo, dedicación y paciencia durante este proceso. A mis catedráticos por los conocimientos que me proporcionaron. A todos gracias ya que han sido fundamentales para mi desarrollo como persona y profesional.

Prefacio	I
Lista de figuras	IV
Lista de cuadros	V
Resumen	VI
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. Justificación	4
4. Marco teórico	6
4.1. Microalgas	6
4.1.1. Especies de microalgas.....	7
4.1.2. Importancia de microalgas	7
4.1.3. Aplicaciones biotecnológicas	7
4.2. Polímeros y biopolímeros.....	8
4.2.1. Definición de polímeros.....	8
4.2.2. Definición de biopolímeros	8
4.2.3. Contaminación por plástico.....	9
4.2.4. Importancia de biopolímeros	9
4.3. Polihidroxialcanoatos.....	11
4.3.1. Definición.....	11
4.3.2. Estructura química.....	11
4.3.3. Importancia	12
4.4. Polihidroxialcanoatos de microalgas	13
4.4.1. Biosíntesis.....	13
4.4.2. Producción.....	14
4.4.3. Tinte Sudan Negro B.....	14

5. Metodología	16
5.1. Sitio de estudio	16
5.2. Población y muestra	17
5.3. Enfoque, diseño y tipo de investigación.....	17
5.4. Variables	17
5.5. Materiales y métodos.....	17
5.5.1. Cultivo de microalgas	17
5.5.2. Crecimiento de microalgas	18
5.5.3. Crecimiento de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> como control positivo.....	18
5.5.4. Tinción Sudan Negro B para analizar producción de PHA.....	19
5.5.5. Construcción de curva de calibración y análisis espectrofotométrico para evaluación de concentración de PHA.....	19
5.5.6. Escalamiento, extracción y análisis de PHA obtenido	20
6. Resultados y discusión	21
6.1. Resultados	21
6.1.1. concentración de PHA en microalgas	22
6.1.2. Extracción y cuantificación de PHA	24
6.1.3. Caracterización por FTIR de PHA extraído	25
6.2. Discusión	27
7. Conclusiones	33
8. Recomendaciones	34
9. Bibliografía	35
Anexos	39
A. Valores promedio de absorbancia y valores calculados de expresión de SB en la célula	39
B. Supuestos analizados para ANOVA de un factor	40
C. Grupos funcionales analizados para FTIR por condición experimental	41
D. Espectros comerciales de PHA	43
E. Espectros PHA en literatura	45

Lista de figuras

4.1. Estructura de algunos poliésteres alifáticos importantes.	9
4.2. Mapa global con cada país sombreado según la masa estimada de residuos plásticos mal gestionados generados en 2010 por las poblaciones	10
4.3. Estructura química de los diferentes polihidroxicanoatos.	12
4.4. Ruta metabólica de los polihidroxicanoatos en microalgas	13
4.5. Estructura química de tinte Sudan Negro B (SB).	15
5.1. Metodología implementada en el estudio.	16
6.1. Curva de calibración de estándares de Sudan Negro B	22
6.2. Promedio de concentración de Sudan Negro B por condición experimental	22
6.3. Comparación de extracción de biomasa y PHA	24
6.4. Espectro FTIR PHA de Condición experimental 1.	25
6.5. Espectro FTIR PHA de Condición experimental 3.	26
6.6. Espectro FTIR PHA de condición experimental 1 comparación con estándares.	26
6.7. Espectro FTIR PHA de Condición experimental 3 comparación con estándares.	27
D.1. Ficha técnica PHA transparente.	43
D.2. Ficha técnica PHA Milky-White.	44
E.1. Espectros PHA I y PHA II extraída de microalgas.	45
E.2. Espectros PHA II y PHA III extraída de microalgas	46

Lista de cuadros

5.1. Variables del estudio	17
5.2. Condiciones experimentales para el sometimiento a estrés de cultivos de microalgas .	18
6.1. Prueba de Kruskal-Wallis para determinación de mejores condiciones de cultivo.	23
6.2. Valores P analizados en prueba Post-Hoc de Dunn.	23
6.3. Rendimiento de proceso de producción y extracción de PHA por condición experimental.	25
A.1. Valores promedio de absorbancia y calculados de expresión de SB en célula	39
B.1. Valor P obtenidos para analizar supuesto de normalidad para ANOVA de un factor.	40
B.2. Supuestos de Cooks Distance, y Leve Test para análisis de datos atípicos y homocedasticidad.	40
C.1. Grupos funcionales vistos en FTIR para condición experimental 3	41
C.2. Grupos funcionales vistos en FTIR para condición experimental 1	41
C.3. Grupos funcionales vistos en FTIR para condición experimental 1	42
C.4. Grupos funcionales vistos en FTIR para PHA Milky White comercial.	42

Durante los últimos años la contaminación por plástico en cuerpos de agua y tierra ha tenido una creciente preocupación debido a los efectos adversos que ya son visibles alrededor del mundo. Afectando no solo la vida silvestre que vive en los ecosistemas contaminados, si no también, la salud de los seres humanos. Sin embargo, es evidente también que el plástico ha promovido el desarrollo tecnológico de la humanidad, y ha pasado a ser un compuesto necesario en nuestro día a día. Por lo que no es factible eliminar el uso de estos compuestos y sus diversas aplicaciones.

Es necesario buscar alternativas a los polímeros derivados de petróleo que sean igual de efectivos para llevar a cabo las tareas para las que los polímeros actuales son utilizados. Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros que funcionan de manera efectiva para dichas tareas, estas contienen características similares a las de un plástico comercial además de que pueden ser extraídas de manera biológica. Entre sus características se encuentra que son polímeros biodegradables y pueden ser degradados de manera natural, en tiempos cortos, en comparación a los polímeros derivados de petróleo.

Las microalgas como *Chlorella sp.* o *Scenedesmus sp.* Son especies productoras de PHA, generándolo como parte de su metabolismo en la producción de lípidos. Este proceso puede ser aprovechado para la producción del biopolímero. En esta investigación se llevó a cabo el planteamiento de un método de producción y extracción de polihidroxicanoatos sometiendo a las microalgas a diferentes concentraciones de nutrientes en medio BG-11 con el objetivo de someterlas a estrés por falta de nutrientes. Los resultados revelaron que el someter a las microalgas a condiciones de falta de nutrientes, específicamente falta de nitrógeno y hierro, resulta en una producción efectiva de PHA. Además de la validez de un método que permite la generación y extracción de PHA en microalgas confirmando la presencia de grupos funcionales analizados por FTIR que son congruentes con la presencia de PHA. Estos hallazgos demuestran que esta investigación es un planteamiento inicial para la futura investigación y escalamiento de producción de biopolímeros para la sustitución de polímeros a base de petróleo, además, de la importancia de investigaciones futuras en la producción de PHA a partir de microalgas, así como la búsqueda de aplicaciones prácticas para estos biopolímeros en la vida cotidiana.

Las microalgas son organismos foto-sintéticos microscópicos, las cuales pueden crecer en cualquier ambiente que contenga cuerpos de agua. Los tamaños de estos varían en pocos micrómetros y no tienen la capacidad de producir raíces u hojas de ningún tipo (Jhonson & Steuer, 2018). De igual manera, estos son organismos autótrofos que cuentan con la capacidad de fijar CO₂ atmosférico utilizando energía solar, haciendo que estos sean los organismos autótrofos de mayor crecimiento en el mundo gracias a que pueden desarrollarse utilizando la mínima concentración de nutrientes inorgánicos, agua y luz solar. Haciéndolos buenos candidatos para utilizarse como “fabricas microscópicas” para la elaboración de varios productos de naturaleza biológica de interés. (Afreen et al., 2021). Las microalgas pueden crecer en condiciones adversas con facilidad. Estas no requieren de una de fertilizantes, o nutrientes especiales, tampoco requieren o tampoco un suplemento de agua fresca grande, ya que pueden crecer en estanques, lo que genera bajos costos en bioprocesos de producción (Rahman et al., 2014). La estructura de las microalgas carece de lignocelulosa, lo que lo favorece a la disminución de gastos energéticos al consumir energía durante la recuperación de productos bioactivos presentes en las células de las microalgas. Estos compuestos bioactivos son: lípidos, proteínas, carbohidratos, celulosa, ácidos grasos y polihidroxicanoatos que pueden ser utilizados en la tecnología de bioplásticos (Roy Chong et al., 2022).

Estos son organismos muy diversos, entre las cuales la clasificación puede encontrarse entre procariotas y eucariotas (Friedl, 1997). Existen alrededor de 30,000 especies conocidas de microalgas y menos de 100 de ellas han sido estudiadas. Entre estas los ejemplos más claros son *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella* y *Nannochloroopsis*, las cuales son las cepas más comercializadas y utilizadas en la industria (Otálora et al., 2021). Entre los principales filos clasificados de microalgas están: *Clorophyta*, *Rodhophyta*, *Haptophyta*, *Stramenopiles* y *Dinophyta*. Las microalgas tienen un rol muy importante en el proceso de secuestro de carbono del medio ambiente, ya que, la tasa de absorción de carbono está limitada por la actividad metabólica de las microalgas y este proceso está igualmente limitado por la fotosíntesis. Se ha estudiado la fijación de dióxido de carbono de las microalgas y es posible utilizar hasta un 9 % de la energía solar entrante para producir 280 toneladas de biomasa seca mientras consume alrededor de 513 toneladas de CO₂ (Sydney et al., 2010).

Las microalgas pueden fijar el carbono de diferentes fuentes, incluyendo el dióxido de carbono que se hace presente en la atmósfera, desde los gases industriales liberados hasta formas solubles de carbonatos. El uso de gases industriales o residuos líquidos se ha convertido en una opción para promover el cultivo y uso de microalgas en las industrias por lo que el conocimiento de la composición de residuos, rutas metabólicas de microalgas y factores nutricionales para estos es requerido

para dichos procesos en las industrias (Sydney et al., 2010). Las microalgas pueden ser utilizadas también para generación de Polihidroxicanoatos (PHA), estos compuestos han representado una oportunidad para ser utilizados como sustitutos de los polímeros comerciales elaborados químicamente debido a sus propiedades fisicoquímicas similares al de los polímeros utilizados actualmente (Ramaraj et al., 2014). La producción de PHA puede ser aplicada a una escala industrial con el uso de estos microorganismos, sin embargo, es necesario estandarizar y optimizar los procesos para llegar a los niveles de producción deseados y que estos tengan el efecto que se busca, el cual es sustituir los polímeros comerciales con biopolímeros que tienen una capacidad degradativa mucho más alta, y por ende, menos contaminante (Sonia Graciela Ramos, 2021). Por ello el objetivo principal de esta investigación es el plantear un método de producción de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de una mezcla de especies de microalgas, y de esta forma, proveer un planteamiento inicial para la producción de dichos compuestos a gran escala.

2.1. Objetivo general

Plantear un método de producción de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de una mezcla de especies de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*

2.2. Objetivos específicos

- Producir PHA por medio del método de sometimiento a estrés por la falta de nutrientes en *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*
- Extraer y cuantificar la producción de PHA por medio de las condiciones adecuadas de nutrientes en *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*
- Caracterizar y comparar por medio de técnicas de infrarrojos por la transformada de Fourier (FTIR) el PHA producido de manera biológica y PHA comercial.

Justificación

En los últimos años, ha habido un creciente interés en encontrar alternativas sostenibles para remplazar a los plásticos elaborados a base de petróleo. La contaminación por plásticos de plástico ha llegado a un nivel de alto impacto, afectando cuerpos de agua como mares, ríos y lagos. Además, puede afectar suelos debido al alto tiempo de degradación de este. En Guatemala se producen alrededor de 0.41 kilogramos de plástico por persona (Ritchie & Roser, 2018) generando problemas en la calidad del suelo y daños a la fauna silvestre. Un ejemplo claro de esta contaminación es el aumento de plásticos liberados en el río Motagua, alrededor de 8,500 toneladas de plástico se liberan cada año, ocasionando un serio problema de contaminación no solo para Guatemala sino también Honduras donde toneladas de basura son acarreadas cada año (Vigna, 2023). En cuanto la vida marina, esta se ve afectada en procesos naturales que realizan desde la ingesta de los plásticos hasta la limitación de movilidad que ocasiona la muerte en varias especies. En 2019 un estudio determinó que 1,557 especies marinas han consumido plástico incluyendo algunas en peligro de extinción. La ingesta de plásticos puede reducir la capacidad de ingesta e incluso perforar órganos internos en las especies, por ende, es un problema que debe ser abordado (Lai, 2022).

Los biopolímeros, como los polihidroxicanoatos (PHA), son una solución prometedora para abordar esta problemática. El PHA es producido por diferentes microorganismos como bacterias y microalgas. Varios estudios (Shiva Aley Acharjee et al., 2022), (Samrot et al., 2021) han demostrado su similaridad con polipropileno (PP) el cual es uno de los polímeros a base de petróleo más utilizados en la actualidad. El PHA demuestra una ventaja en cuanto a la alteración de su estructura ya que puede realizarse de forma física, química o biológica. Otra ventaja evidente es que puede partir de una diversidad considerable de sustratos como la sacarosa, azúcar de maíz y aceites vegetales; además de que proporciona la oportunidad de generar economía circular (Vicente et al., 2023). La característica más importante es que este compuesto es biodegradable y biocompatible ofreciendo así un sustituto de los plásticos convencionales en diversas aplicaciones industriales.

El objetivo de esta investigación es llevar a cabo el planteamiento un protocolo para la obtención de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de la mezcla de microalgas *Scenedesmus sp.* y *Chlorella sp.* Las cuales fueron obtenidas de un humedal artificial ubicado en Sanarate, El Progreso, Guatemala perteneciente a la empresa de Cementos Progreso. Estas especies de microalgas cuentan con una capacidad metabólica de producción de PHA, sin embargo, la cantidad producida no es tan alta, se reporta que se encuentra en el rango inferior a 3.5 % de producción por litro, sin embargo, las investigaciones indican que es posible incrementar dicha producción cuando estas especies son sometidas a estrés por falta de nutrientes, en condiciones adecuadas puede elevar la producción hasta

un 35 % (García et al., 2020). Por lo que es necesario llevar a cabo estudios para determinar cuáles son las condiciones óptimas para producir el biopolímero en dichas condiciones. Estas microalgas han sido seleccionadas debido a su capacidad de crecimiento y contenido lipídico a nivel celular. El uso de microalgas presenta una ventaja convencional en la producción en comparación con bacterias productoras de PHA. Ya que estas tienen la capacidad de crecer en condiciones adversas y soportar dichas condiciones como por ejemplo altas concentraciones de boro que provienen de procesos industriales. Se ha reportado que son capaces de tolerar concentraciones de 25 mg/L de alto estrés proveniente del boro sin disminución de cultivos y producción de 4.5g/L de biomasa en estas condiciones (Yan et al., 2022).

Este estudio es de gran importancia ya que aporta un primer paso a la producción de biopolímeros en microalgas con la finalidad de aportar al estudio de producción de bioplásticos en Guatemala y futuro uso como una alternativa ecológicamente amigable. Además, las microalgas presentan una ventaja en varios procesos como en la captación de dióxido de carbono durante su crecimiento, producción de biomasa que puede ser aplicada en varios procesos como la obtención de biodiesel o biomasa purificada de uso alimenticio. Por lo que además de la producción de un biopolímero presenta una alternativa para generar productos basados en economía circular derivado de los subproductos generados relacionados al metabolismo de estas. Por ende, este proyecto de investigación tiene una relevancia desde un punto de vista ambiental como económico. La producción de PHA a partir de microalgas contribuye a la sostenibilidad ambiental al reducir la dependencia de plásticos convencionales y aprovechamiento de recursos locales. Además, promueve la valorización de subproductos industriales dando información relevante para el escalamiento de su producción y al proceso de optimización del mismo.

4.1. Microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos microscópicos, las cuales pueden crecer en cualquier ambiente que se encuentre basado en cuerpos de agua. Los tamaños de estos varían en pocos micrómetros y no tienen la capacidad de producir raíces u hojas de ningún tipo (Jhonson & Steuer, 2018). De igual manera, estos son organismos autotróficos productores de biomasa con la capacidad de fijar CO₂ atmosférico utilizando energía solar, haciendo que estos sean los organismos autotróficos de mayor crecimiento en el mundo gracias a que pueden desarrollarse utilizando la mínima concentración de nutrientes inorgánicos, agua, luz solar y aguas residuales, haciéndolos buenos candidatos para utilizarse como “fabricas microscópicas” para la elaboración de varios productos de naturaleza biológica de interés. (Afreen et al., 2021).

Las microalgas pueden crecer en condiciones adversas con facilidad, estas no requieren de una tierra fertilizada especial o tampoco un suplemento de agua fresca grande, estas pueden crecer en estanques lo que genera bajos costos en bioprocesos de producción (Rahman et al., 2014). La estructura de las microalgas carece de lignocelulosa lo que lo favorece en la disminución de consumir energía durante la recuperación de productos bioactivos. Estos compuestos bioactivos son: lípidos, proteínas, carbohidratos, PHA, ácidos grasos y celulosa que puede ser utilizado en la tecnología de bioplásticos (Roy Chong et al., 2022).

Las microalgas pueden fijar el carbono de diferentes fuentes, incluyendo el dióxido de carbono que se hace presente en la atmósfera, desde los gases industriales liberados hasta formas solubles de carbonatos. El uso de gases industriales o residuos líquidos se ha convertido en una opción para promover el cultivo y uso de microalgas en las industrias por lo que el conocimiento de la composición de residuos, rutas metabólicas de microalgas y factores nutricionales para estos es requerido para dichos procesos en las industrias (Sydney et al., 2010).

Aunque las algas son de carácter foto-sintético y capaces de llevar una vida independiente están relacionadas con procesos simbióticos en la naturaleza. Las microalgas tienen relaciones simbióticas con procariotas y protistas no foto-sintéticos, en este complejo ecológico se promueve el dar sustento a la vida de las microalgas y los procesos metabólicos en donde también se incluye la fijación de carbono (Ramaraj et al., 2014). Estos microorganismos tienen una gran importancia a nivel de ecosistema, teniendo la capacidad de realizar procesos foto-sintéticos y de biorremediación en el ambiente incluso con la interacción de otros microorganismos. Esto de la mano de cada uno de los procesos metabólicos

que generan bioproductos de interés que pueden ser aplicados en la biotecnología.

4.1.1. Especies de microalgas

Las microalgas son organismos muy diversos, existen alrededor de 30,000 especies conocidas de microalgas y menos de 100 de ellas han sido estudiadas. Entre estas los ejemplos más claros son *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella* y *Nanochloopsis* las cuales son las cepas más comercializadas y utilizadas en la industria (Otálora et al., 2021). Entre los principales filos clasificados de microalgas están: *Chlorophyta*, *Rhizophyta*, *Haptophyta*, *Stramenopiles* y *Dinophyta*. Entre las cuales la clasificación puede encontrarse entre procariotas y eucariotas (Friedl, 1997).

4.1.2. Importancia de microalgas

Las microalgas tienen un rol muy importante en el proceso de secuestro de carbono. El proceso biológico en el que las microalgas realizan el secuestro de CO₂ puede ser utilizado como una estrategia alternativa para intereses ecológicos. La tasa de absorción de carbono está limitada por la actividad metabólica de las microalgas y este proceso está igualmente limitado por la fotosíntesis. Se ha estudiado la fijación de dióxido de carbono de las microalgas y es posible utilizar hasta un 9 % de la energía solar entrante para producir 280 toneladas de biomasa seca mientras consume alrededor de 513 toneladas de CO₂ (Sydney et al., 2010).

Las microalgas pueden fijar el carbono de diferentes fuentes, incluyendo el dióxido de carbono que se hace presente en la atmósfera, desde los gases industriales liberados hasta formas solubles de carbonatos. El uso de gases industriales o residuos líquidos se ha convertido en una opción para promover el cultivo y uso de microalgas en las industrias por lo que el conocimiento de la composición de residuos, rutas metabólicas de microalgas y factores nutricionales para estos es requerido para dichos procesos en las industrias (Sydney et al., 2010).

Aunque las algas son de carácter fotosintético y capaces de llevar una vida independiente están relacionadas con procesos simbióticos en la naturaleza. Las microalgas tienen relaciones simbióticas con procariotas y protistas no fotosintéticos, en este complejo ecológico se promueve el dar sustento a la vida de las microalgas y los procesos metabólicos en donde también se incluye la fijación de carbono (Ramaraj et al., 2014). Estos microorganismos tienen una gran importancia a nivel de ecosistema, teniendo la capacidad de realizar procesos de fotosíntesis y de biorremediación en el ambiente incluso teniendo interacción de otros microorganismos. Esto de la mano de cada uno de los procesos metabólicos que generan bioproductos de interés que pueden ser aplicados en la biotecnología.

4.1.3. Aplicaciones biotecnológicas

La diversidad de especies que existen de microalgas y su capacidad de permanecer en ecosistemas adversos, al igual que su capacidad de producción de diversos biomateriales ha captado la atención en los últimos años. Las microalgas pueden ser una rica fuente de fuentes de carbono que pueden ser aplicados en la generación de biocombustibles, suplementos de salud, cosméticos y farmacéuticos (Khan et al., 2018).

La biorremediación de aguas residuales no se basa solamente en el cultivo de una sola especie, ya que el producto final del proceso es limpiar el suministro de agua que se está tratando. En la mayoría de las operaciones a gran escala se busca el crecimiento de flora de algas nativas en las de aguas residuales que pueden remediar el cuerpo de agua, así a través de estos procesos absorber los nutrientes inorgánicos que requiere las microalgas para la biomasa (Heimann & Huerlimann, 2015).

Las microalgas verdes son también ricas en antioxidantes de los cuales el betacaroteno y la antoxantina son de especial interés. Las microalgas halófilas se cultivan comercialmente para producir un betacaroteno mientras que las algas de agua dulce se utilizan para producir antoxantina, las cuales se forman bajo condiciones desfavorables ambientales como la privación de nutrientes, aumento de salinidad, alta irradiancia y temperatura. Esta es utilizada como un fuerte antioxidante que se usa como suplemento nutricional y agente anticancerígeno. Exhibiendo las propiedades preventivas para enfermedades como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos además de estimular la inmunización (Ambati et al., 2014).

4.2. Polímeros y biopolímeros

4.2.1. Definición de polímeros

Los polímeros son materiales que son utilizados en la vida diaria y producidos a grandes escalas en las industrias estas son moléculas de peso molecular muy alto enlazadas por enlaces covalentes, los cuales son obtenidos por una reacción química de los monómeros. Los monómeros tienen la capacidad de reaccionar con otra molécula ya sea del mismo tipo o de otro tipo con las condiciones adecuadas se forman cadenas poliméricas y es un proceso que además existe en la naturaleza obteniendo polímeros naturales (Pillai & Panchagnula, 2001).

Los polímeros también pueden ser sintetizados de manera industrial y son estos los que están involucrados en la vida diaria humana, creados para la comodidad y facilitación de las actividades diarias. Los procesos de nutrición, comunicación, vestimenta, riego entre otros han sido facilitados gracias a la elaboración de estos polímeros sintéticos (Pillai & Panchagnula, 2001). Durante los últimos años se ha buscado tener una mejora en la producción de materiales para ser polímeros es una tendencia que se hace notar entre estudiantes de ingeniería o carreras científicas, con el objetivo de obtener materiales más eficientes tanto a nivel estructural del material como a nivel ecológico, por ende la generación de materiales de naturaleza biológica y capaces de ser biodegradados que permita evitar la acumulación de materiales que ocasionen daños al ambiente es de gran interés en la actualidad (Namazi, 2017).

4.2.2. Definición de biopolímeros

Los biopolímeros son definidos como polímeros que experimentan escisión, la cuál es inducida de manera microbiológica y que, pueden ser conducidos para que la mineralización, fotodegradación, oxidación e hidrólisis pueda ser facilitada para experimentar descomposición. Esta puede ser dada también por medio de acción enzimática de microorganismos en un periodo de tiempo especificado (Drzal, 2002). Los biopolímeros pueden ser obtenidos de materiales renovables, por acción de microorganismos o la mezcla de dos o más biopolímeros de origen de petróleo.

Los polímeros biodegradables requieren de desarrollo para hacer que estos sean adecuados como polímeros en matriz. Los plásticos de uso diario como pueden ser el propileno, polietileno, poliéster o el epoxi son polímeros que experimentan muchos desarrollos para poder obtener aplicaciones compuestas de la misma como en la industria del embalaje, la agricultura entre otras aplicaciones con requisitos de resistencia menores (Drzal, 2002). Los biopolímeros pueden llegar a tener limitaciones en cuanto al rendimiento y alto costo de producción y por ende se relacionan a su aceptación generalizada como sustituto de polímeros no biodegradables tradicionales, la estructura química de algunos biopolíesteres importantes se muestra en la **Figura 4.1**

Los biopolímeros tienen una tendencia actual relacionada a la amenaza ambiental y sus preocupaciones sociales asociadas a la contaminación por plástico. Los bioplásticos producidos a partir de

PHA son generados a partir de recursos renovables como pueden ser los azúcares de fermentación, CO₂ y luz solar. El alto costo de los biopolímeros en comparación con los plásticos tradicionales no se debe al costo de la materia prima para su síntesis si no es debido al bajo nivel de producción. Sin embargo, nuevas y emergentes aplicaciones para los biopolímeros se están dando en la actualidad resultando en un aumento significativo de su producción (Drzal, 2002).

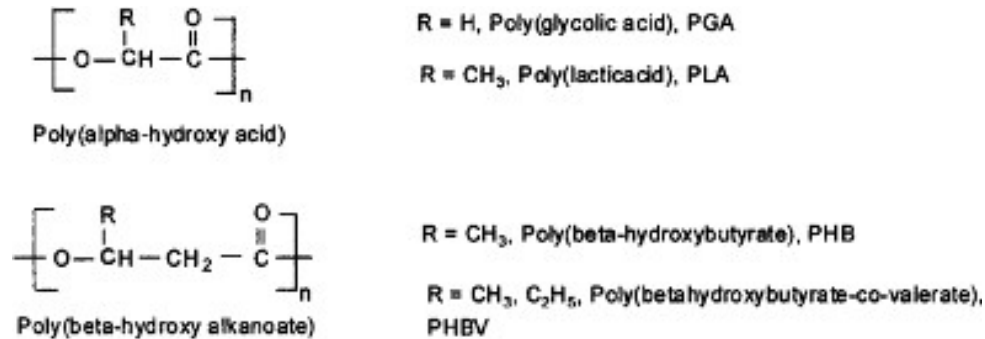


Figura 4.1: Estructura de algunos poliésteres alifáticos importantes.

Fuente: (Drzal, 2002)

4.2.3. Contaminación por plástico

La contaminación por productos plásticos ha sido un tema de suma importancia ecológica hace muchos años. Los primeros reportes de contaminación por plástico en océanos aparecieron alrededor de 1970. Y más de 40 años después no es posible tener estimaciones sobre la cantidad de desechos plásticos en la tierra y principalmente a nivel de los océanos. Alrededor de 1975 se estima que el flujo anual de basura de todos los materiales hacia el océano era de 6.4 millones de toneladas, y en 2012 se alcanzaron alrededor de 288 millones de toneladas métricas lo cual corresponde a un aumento del 620 % desde 1975. La mayor cantidad de producción plástica proviene de la industria de embalaje, materiales que son específicamente diseñados para empaquetar productos y ser desechados inmediatamente. Para el año 2000 la proporción aumento en una magnitud importante siendo que el plástico representaba al menos el 10 % de los residuos sólidos por masa (AOPM, 2013).

Se ha estimado la entrada anual de plásticos al océano a partir de los desechos generados por poblaciones costeras en todo el mundo. Los desechos mal gestionados son aquellos que son arrojados en la calle o en un desecho inapropiado ya que no incluyen una gestión formal de su desecho. Este tipo de desecho suele desembocar en el mar a través de las vías fluviales internas como descargas de aguas, transporte por viento o mareas, se estima que la masa de residuos plásticos transportados por estas vías varía entre 1 kg por días hasta 4,200 kg por día y esto es dependiente de las características de la cuenca local. Se dice que para al menos 192 países costeros con al menos 100 residentes permanentes rodeando los mares principales tienen la posible variación de que las cantidades mencionadas con anterioridad ingresen al océano. En la **Figura 4.2** se muestra la masa estimada de residuos de plásticos mal gestionados con datos del 2010.

4.2.4. Importancia de biopolímeros

El plástico tiene una importancia muy grande en la producción de productos, envasados y elaboración de materiales de uso diario. Sin embargo, son también contaminantes de alto nivel por lo que es importante que en la industria se lleve a cabo el desarrollo de mejores opciones para dicha producción. La producción anual de producción de biopolímeros ha alcanzado 268 millones de toneladas

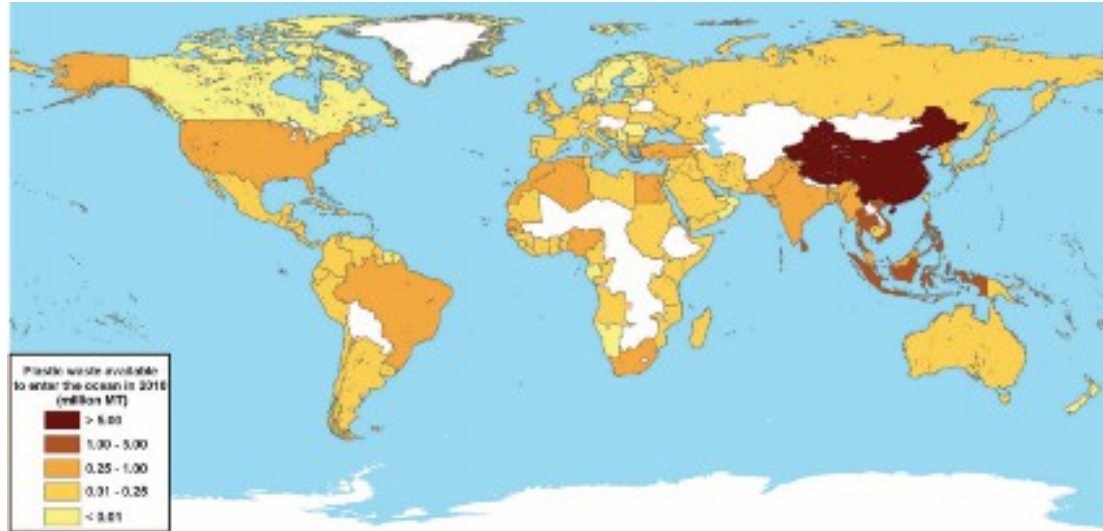


Figura 4.2: Mapa global con cada país sombreado según la masa estimada de residuos plásticos mal gestionados generados en 2010 por las poblaciones.

Fuente: (Jamberck et al., 2015).

en 2020 debido a la alta demanda en los años recientes, relacionado a que, la producción de plásticos o polímeros no biodegradables ha conducido a la acumulación de estos causando contaminaciones en el ambiente de suma importancia. El desarrollo de nuevos materiales, productos y tecnologías se ha ido facilitando con el crecimiento y concientización de la sostenibilidad ambiental y la química verde. Los biopolímeros son sintetizados por medio de microorganismos, en el caso de los polihidroxialcanoatos son generados de manera espontánea de forma intracelular en formas de reservas de carbón y energía lo que facilita su producción y reduce los costos de elaboración de este (Ranganadha et al., 2019).

Los biopolímeros tienen diversas aplicaciones en las cuales radica su importancia, los bioplásticos generados a partir de PHA son comúnmente utilizados para diversas bolsas, redes, y diversos tipos de filmes en la agricultura. Estos productos son elaborados a partir de poliésteres de alta densidad, son utilizados para proteger a los cultivos de aves que pueden llegar a atacar los cultivos y eliminarlos. Sin embargo, estos son tóxicos para las aves. Los productos elaborados a partir de PHA permiten generar los mismos productos que no son tóxicos, biodegradables y son amigables con el ambiente (Fady Abd El-malek et al., 2021).

En cuanto a la industria de alimentos hoy en día se tiene una problemática relacionada al embalaje de los productos, considerando que las industrias deben cumplir con requisitos y estándares globales, considerando también factores de sostenibilidad y calidad en la industria alimentaria dependen directamente del desarrollo de nuevos envases que sean basados en biopolímeros para generación de bioplásticos. Al utilizar bioplásticos que son compostables o degradables es de vital importancia para satisfacer las demandas de las condiciones de almacenamiento de alta calidad y el deseo de un material que sea económico, no contaminante y de fácil uso. Además de la permeabilidad al oxígeno, el contenido de humedad y la eficiencia mecánica son características que deben ser esenciales para el embalaje de los alimentos. Esto debe incluir la protección contra estas características, siendo los bioplásticos elaborados de PHA o de otros biopolímeros sumamente eficientes y que pueden seguir siendo explorados para mejorar su producción, disminución de costos y mejor o igual calidad a la de un plástico no degradable de uso convencional (Alexandrovich et al., 2018; Mostafavi & Zaeim, 2020).

Se pueden encontrar una amplia gama de usos de los polímeros en los campos médicos y biológicos. La creación de sistemas de entrega de medicamentos y dispositivos de ingeniería de tejidos como aplicaciones biomédicas se logró con éxito con polímeros biodegradables. Debido a su biocompatibili-

lidad, los polihidroxicanoatos también se utilizan para otras aplicaciones médicas, como la terapia de úlceras post-quirúrgicas, apósitos para la curación de heridas, la detección de cáncer, válvulas cardíacas, arterias sanguíneas artificiales, y la ingeniería de tejidos óseos, entre otros (Ranganadharedd et al, 2022)

4.3. Polihidroxicanoatos

4.3.1. Definición

Los polihidroxicanoatos o PHA son poliésteres naturales de varios microorganismos como microalgas o bacterias, han tenido un creciente interés debido a la facilidad de extracción y de calidad de polímeros que pueden ser utilizados en varios procesos industriales. Esto y que son sustitutos atractivos para los plásticos petroquímicos porque tienen propiedades materiales que son similares a diferentes termoplásticos y elastómeros. Los PHA actúan como un compuesto de almacenamiento ideal, esto relacionado a su insolubilidad en el citoplasma bacteriano y en microalgas se encuentra almacenado en forma de gránulos intracelulares que se almacenan dentro del citoplasma de la célula. Este compuesto funciona como almacenamiento de fuentes de carbono y energía, al igual que contiene características de sumidero de equivalentes reductores para algunos microorganismos. En cuanto a bacterias, las especies que contiene PHA pueden sobrevivir durante un periodo de tiempo más largo en comparación a aquellas sin PHA, ya que funciona como reserva de energía que reduce la autólisis celular y la tasa de mortalidad (Ym, 2011).

Las microalgas pueden producir una amplia variedad de PHA con propiedades físicas y químicas únicas, dependiendo de la especie de microalga y las condiciones de cultivo. Los PHA de microalgas tienen propiedades biodegradables y biocompatibles similares a los PHA producidos por bacterias, pero también tienen una mayor flexibilidad y resistencia a la temperatura (Chen y Wu, 2018). Además, la producción de PHA a partir de microalgas tiene una serie de ventajas en comparación con la producción de PHA a partir de bacterias, ya que las microalgas son más resistentes a las condiciones ambientales extremas y pueden crecer en suelos marginales y aguas residuales. También pueden utilizarse como biorreactores para producir otros productos valiosos, como lípidos y proteínas (Koller et al., 2015).

4.3.2. Estructura química

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros naturales producidos por bacterias y otros organismos a través de la síntesis de ácidos hidroxicanoicos (HA) con la participación de una serie de enzimas. Los PHA se sintetizan mediante la condensación de unidades monoméricas de HA, que contienen un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo hidroxilo (-OH) en posiciones alternas en la cadena polimérica (Sudesh y Abe, 2009). Los PHA pueden tener una estructura química muy variada, lo que los convierte en un grupo diverso de polímeros. En general, la estructura química de los PHA depende de la especie de la bacteria productora, la fuente de carbono y las condiciones de cultivo. Sin embargo, en términos generales, los PHA consisten en una cadena principal de unidades repetitivas de ácidos hidroxicanoicos, que pueden contener de 3 a 14 carbonos (Chen y Wu, 2017).

Los ácidos hidroxicanoicos pueden tener grupos funcionales adicionales, como grupos éster, ceto y éter, que afectan las propiedades físicas y químicas del PHA. Por ejemplo, la presencia de grupos éster en la cadena polimérica puede mejorar la solubilidad del PHA en solventes orgánicos (Javadi et al., 2019). Además, la configuración y la simetría de las unidades repetitivas de ácidos hidroxicanoicos también pueden afectar las propiedades del PHA. Por ejemplo, los PHA con unidades repetitivas simétricas y de tamaño uniforme pueden tener una cristalinidad más alta y una mayor resistencia mecánica (González et al., 2009). La estructura química de los PHA es altamente variable

y depende de la especie de la bacteria productora, la fuente de carbono y las condiciones de cultivo. Los ácidos hidroxialcanoicos que componen la cadena polimérica pueden tener grupos funcionales adicionales y diferentes configuraciones que afectan las propiedades físicas y químicas del PHA. La comprensión de la estructura química de los PHA es fundamental para el diseño de nuevos polímeros con propiedades mejoradas para su uso en diversas aplicaciones.

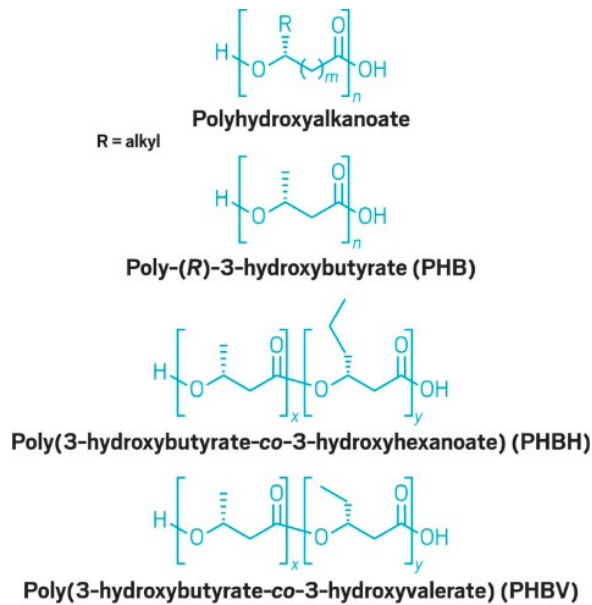


Figura 4.3: Estructura química de los diferentes polihidroxialcanoatos

Fuente: (Tullo, 2019)

4.3.3. Importancia

Los biopolímeros tienen la capacidad de degradarse por sí solos, teniendo un período de vida útil suficiente. La acción microbiana (enzimática) sobre el PHA de alto peso molecular es la única forma de degradar estos bioplásticos de manera ecológica, lo cual se logra mediante la secreción de las de-polimerasas de PHA. Muchas bacterias y hongos tienen la capacidad de producir estas enzimas. Existen dos tipos diferentes de depolimerasas de PHA, extracelulares e intracelulares. Las depolimerasas de PHA intracelulares (depolimerasas i-PHA) se liberan cuando se suministran los nutrientes necesarios al medio y degradan activamente el PHA nativo almacenado endógenamente. Esto generalmente no es útil, ya que este trabajo lo realiza la propia bacteria acumulada y, además de manera interna. Mientras tanto, las de-polimerasas de PHA extracelulares (de-polimerasas e-PHA) son carboxilesterasas que tienen la capacidad de hidrolizar el PHA insoluble en agua a monómeros solubles en agua. Estas depolimerasas e-PHA están compuestas por células acumuladas de microbios después de la muerte y lisis celular, por lo que pueden separarse fácilmente, purificarse y usarse ampliamente para la degradación de PHA (Ym, 2011). Debido a la facilidad de degradación, el PHA es un polímero viable para la generación de bioplásticos que pueden ser utilizadas en la industria de manera efectiva.

4.4. Polihidroxicanoatos de microalgas

4.4.1. Biosíntesis

La síntesis de polihidroxicanoatos (PHA) en microalgas ha sido objeto de una gran cantidad de investigaciones debido a su potencial como fuente renovable de biopolímeros (Al-Abri et al., 2019). La biosíntesis de PHA en microalgas se produce a través de la vía metabólica del ácido graso, que es similar a la ruta de síntesis de PHA en bacterias (Koller et al., 2014). Las microalgas tienen la capacidad de utilizar la luz solar como fuente de energía, lo que reduce la dependencia de recursos no renovables y las hace una alternativa prometedora para la producción sostenible de biopolímeros (Koller et al., 2017).

La selección de cepas de microalgas que tienen una alta capacidad de acumulación de PHA ha sido una de las estrategias más efectivas para mejorar la producción de PHA en microalgas (Al-Abri et al., 2019). Además, la optimización de las condiciones de cultivo, como la fuente de nutrientes, la iluminación y la temperatura, puede mejorar significativamente la producción de PHA en microalgas (Koller et al., 2017). La ingeniería genética también se ha utilizado para aumentar la producción de PHA en microalgas, ya que implica la manipulación de genes específicos involucrados en la síntesis de PHA para mejorar la eficiencia de producción (Koller et al., 2014).

En la síntesis de PHA en microalgas, se ha estudiado ampliamente el uso de diferentes sustratos, como la glucosa, el acetato y el glicerol. La utilización de sustratos de bajo costo, como el glicerol residual de la producción de biodiesel, ha demostrado ser una estrategia prometedora para reducir los costos de producción de PHA (Safni et al., 2020). Además, la utilización de subproductos agrícolas y residuos orgánicos como sustratos para la síntesis de PHA en microalgas puede reducir la dependencia de recursos no renovables y mejorar la sostenibilidad de la producción de biopolímeros (Koller et al., 2017).

En cuanto a la biosíntesis del polímero en organismos fotosintéticos como las microalgas, este inicia con el consumo de acetyl-CoA. Dos moléculas se unen para formar una molécula de acetoacetyl-CoA en una reacción de condensación catalizada por Beta-cetotilasa. Esta molécula luego se reduce a D-3-hidroxibutiril-CoA por la acetoacetyl-CoA reductasa, esta es dependiente de nicotianamina adenina dinucleótido fosfato y finalmente la PHB sintasa cataliza la unión de D-3-hidroxibutirilo a una molécula de polihidroxibutirato (PHB) existente a través de un enlace de éster, liberando CoA como se puede observar en **Figura 4.4**.

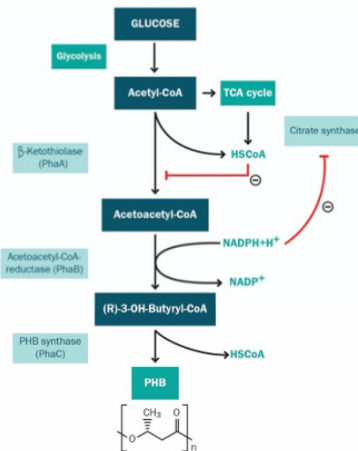


Figura 4.4: Ruta metabólica de los polihidroxicanoatos en microalgas

Fuente: (García et al., 2020)

La composición química y tasa de producción está regulada a nivel enzimático, la concentración intracelular del acetilCoA y CoA libre juega un papel en la síntesis del polímero y la disponibilidad de precursores de PHA. Los estudios demuestran que las microalgas en un agotamiento de nitrógeno derivan la cantidad de carbono en la ruta metabólica de la síntesis de PHA. Principalmente los productos de la degradación del glucógeno podrían ser precursores clave para la producción de PHA (García et al., 2020). Por ende, al manipular las condiciones de cultivo y de crecimiento de las especies de microalgas es posible elevar su producción, la metodología descrita en esta investigación propone la determinaciones de dichas condiciones para un futuro escalamiento.

4.4.2. Producción

La producción de PHA en microalgas ha recibido una atención creciente en los últimos años debido a la capacidad de estas microalgas para acumular grandes cantidades de PHA en condiciones adecuadas de crecimiento. (Chen et al., 2016) La producción de PHA en microalgas se lleva a cabo en dos fases: la fase de crecimiento y la fase de acumulación de PHA. Durante la fase de crecimiento, las microalgas se cultivan en condiciones óptimas para crecer y multiplicarse. (Koller et al., 2017) Durante la fase de acumulación de PHA, las microalgas se someten a condiciones de estrés, como la privación de nutrientes, para inducir la acumulación de PHA en su interior. (Madkour et al., 2013)

La composición y la cantidad de PHA producido en microalgas varían según la especie y las condiciones de crecimiento. Por ejemplo, se ha demostrado que las especies de microalgas *Chlorococcum sp.* y *Scenedesmus obliquus* tienen una mayor capacidad para producir PHA en comparación con otras especies de microalgas. (Liu et al., 2020; Qiao et al., 2021) Además, se ha encontrado que el contenido de PHA en microalgas puede aumentar significativamente en respuesta a factores de estrés como la reducción de la intensidad luminosa y la privación de nitrógeno. (Dai et al., 2018; Pacheco et al., 2021)

Se han utilizado diversos enfoques para mejorar la producción de PHA en microalgas, como la optimización de las condiciones de cultivo y la ingeniería genética. La optimización de las condiciones de cultivo, como la selección de las condiciones adecuadas de pH y temperatura, puede mejorar significativamente la acumulación de PHA en microalgas. (Choi et al., 2017) Además, la ingeniería genética puede utilizarse para mejorar la producción de PHA en microalgas al mejorar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de PHA. (Kong et al., 2019)

En términos de aplicaciones, la producción de PHA a partir de microalgas puede ser una alternativa sostenible y rentable a la producción de plásticos convencionales. Los PHA producidos a partir de microalgas tienen propiedades similares a las de los plásticos convencionales y se pueden utilizar en una amplia gama de aplicaciones, como la fabricación de envases y la industria de la medicina. (Cai et al., 2020; Shen et al., 2021) Además, la producción de PHA a partir de microalgas tiene la ventaja adicional de reducir la emisión de gases de efecto invernadero y contribuir a la mitigación del cambio climático (Zhang et al., 2017).

4.4.3. Tinte Sudan Negro B

El tinte de Sudan Negro B es un tinte utilizado para llevar a cabo procesos de tinción química de lípidos en células, este tinte puede detectar triglicéridos y lipoproteínas intracelulares, que son formados dentro de microorganismos, pero también puede utilizarse para enzimas y otras estructuras intracelulares de interés como el aparato de golgi (Su et al., 2022). El Sudan Negro B tiene dos componentes principales los cuales son SSB-I y SSB-II y es parte de la clase de pirimidinas que tienen un sustituyente 4-(fenildiazenil)naftalen-1-il]diazenilo (PubChem, 2023) la **Figura 4.5** muestra la estructura química del tinte.

Este tinte puede ser combinado con técnicas de espectrometría y fluorimetría para estudiar la

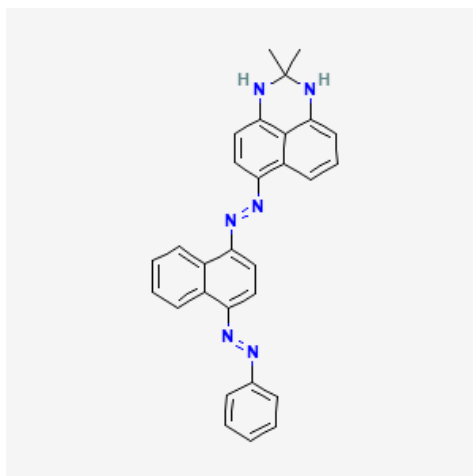


Figura 4.5: Estructura química de tinte Sudan Negro B (SB)

Fuente: (PubChem, 2023)

producción de bioproductos intercelulares de interés como lo es el PHA (Mauricio Ariel Porras et al., 2017). Con respecto a este, debido a que el PHA producido (ya sea por bacterias o microalgas) es de tipo intracelular, se acumula dentro de la célula en consorcios de lípidos que contienen al PHA producido (Grage et al., 2009), es posible utilizar este tinte para detectar los conglomerados de PHA producidos, la concentración medida es relativa y no directa ya que puede tomar en cuenta otros compuestos lipídicos presentes en la célula, sin embargo, el tinte puede ser aplicado ya sea por medio de microscopía o por medio de espectroscopia para la detección de estos conglomerados que son válidos para el análisis de concentración mostrada. Lo que permite visualizar u obtener datos cuantificables de la producción, dicho proceso puede ser aplicado para estudiar condiciones de producción en los microorganismos y tener un primer paso para una producción industrial a gran escala.

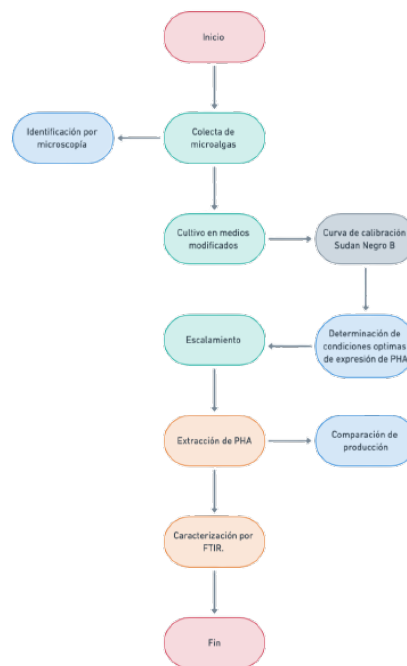


Figura 5.1: Metodología implementada en el estudio.

Fuente: Autoría propia

5.1. Sitio de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de bioquímica y microbiología y el centro de estudios dentro del campus de la Universidad del Valle de Guatemala ubicada en Ciudad de Guatemala, Guatemala.

5.2. Población y muestra

La población de estudio fueron los cultivos de microalgas aisladas del humedal artificial de Cementos Progreso ubicada en el Sanarate, El Progreso, Guatemala. Las especies utilizadas fueron *Scenedemus sp.* y *Chlorella sp.* Las muestras fueron seleccionadas de los medios de cultivo sometidos a estrés por déficit de nutrientes.

5.3. Enfoque, diseño y tipo de investigación

Esta investigación tuvo un enfoque combinado dominante, siendo el enfoque cuantitativo el dominante y un diseño experimental verdadero.

5.4. Variables

Tabla 5.1: Variables del estudio

Procedimiento	Variable	Definición	Tipo
Cultivo y crecimiento de microalgas	Crecimiento de microalgas.	Aumento de la biomasa de microorganismos en el medio de cultivo.	Dependiente cualitativa
	Condiciones de Luz	Intensidad, duración y calidad de radiación luminosa proporcionada a las microalgas.	Independiente cualitativa
	Temperatura	El nivel de calor en el ambiente de cultivo de microalgas que pueda influir en su crecimiento.	Dependiente cuantitativa
	Cambio de concentraciones de medio de cultivo	Modificaciones intencionales en la composición química del entorno del cultivo de microalgas como nutrientes y sales para el crecimiento.	Dependiente cualitativa
Tinción de Sudan Negro B para verificar producción de PHA.	Tinción de PHA	Aplicación de colorantes para la detección de ausencia o presencia de PHA.	Independiente cualitativa
	Presencia de PHA	Medida de la cantidad de PHA en las microalgas.	Dependiente cuantitativa
Construcción de curva de calibración y análisis espectrofotométrico para evaluación de concentración de PHA.	Producción de PHA	Síntesis de PHA intracelular por microalgas en condiciones de déficit de nutrientes	Independiente cuantitativa
	Concentración de nutrientes de medio de cultivo	Modificaciones intencionales en la composición química del entorno de cultivo de microalgas como nutrientes y sales para el crecimiento.	Dependiente cuantitativa
Escalaamiento, extracción y análisis de PHA obtenido	Espectro FTIR	Lectura de grupos funcionales de PHA presentes en el espectro de FTIR	Independiente cualitativa
	Tiempo de secado	Periodo de tiempo para eliminar el exceso de humedad de la biomasa de microalgas	Dependiente cuantitativa
	Concentración de reactivos de extracción	Concentración de los químicos utilizados para la extracción de PHA	Dependiente cuantitativa
	Tiempos de evaporación	Duración necesaria para eliminación de solventes químicos usados en el proceso de extracción.	Dependiente cuantitativa

5.5. Materiales y métodos

5.5.1. Cultivo de microalgas

Los cultivos fueron producidos a partir de cultivos previamente aislados del humedal artificial de Cementos Progreso ubicado en Sanarate, El Progreso, Guatemala. El aislamiento fue realizado

colectando 2 L de muestras de las cuales existe presencia de *Chlorella sp.* y *Scenedemus sp.* Los cultivos fueron colectados y re sembrados en cajas petri con medio BBM sólido para la obtención de colonias puras, luego se llevó a cabo el escalamiento de los cultivos desde 250, 850 y 1000 mL de cultivos puros en medio BG-11 pH 8.2 específico para microalgas.

Las colonias fueron caracterizadas microscópicamente con enfoques 400X, y cultivadas en una incubadora estéril a 26°C con luz LED roja 25 W, 120 V a un fotoperiodo de 16h:8h de iluminación oscuridad vigilando semanalmente las condiciones de temperatura, pH y posibles contaminaciones en los medios de mezcla de microalgas.

Las colonias fueron caracterizadas microscópicamente con enfoques 400X, y cultivadas en una incubadora estéril a 26°C con luz LED roja 25 W, 120 V a un fotoperiodo de 16h:8h de iluminación oscuridad vigilando semanalmente las condiciones de temperatura, pH y posibles contaminaciones en los medios de mezcla de microalgas.

5.5.2. Crecimiento de microalgas

Todos los experimentos se realizaron utilizando el cultivo de microalgas previamente purificado y medio BG-11. Estas fueron cultivadas en cámaras de luz roja fluorescente a una temperatura de 20°C a un fotoperiodo de 16h:8h de iluminación-oscuridad en condiciones estériles. Se cultivaron las mezclas de microalgas en medio BG-11 en condiciones deficientes de nutrientes como se indican en la **Tabla 5.2**. Se agregaron 25 mL de cultivo madre de microalgas en 20 mL de medio en condiciones experimentales. Los nutrientes de cada medio son componentes principales del medio BG-11, ya que las microalgas utilizan fuentes de nitrógeno, fósforo y hierro para su crecimiento, estos nutrientes fueron seleccionados para modificarse en el medio y de esta manera estudiar el comportamiento de las microalgas en déficit de dichas condiciones.

Tabla 5.2: Condiciones experimentales para el sometimiento a estrés de cultivos de microalgas

Condición experimental	Condición de medio
1	Medio BG-11 sin NaNO ₃
2	Medio BG-11 sin K ₂ HPO ₄
3	Medio BG-11 sin Citrato amonio Férrico
Negativo	Medio BG-11 normal sin alteraciones

Los cultivos fueron realizados en duplicado en tubos falcon de 50 mL para cada condición experimental en específico, con 4 réplicas. Todos los cultivos fueron llevados a un pH de 8.2 y se llevó a cabo el crecimiento por 14 días en fotoperiodos de 16h:8h de iluminación-oscuridad.

5.5.3. Crecimiento de *Lysinibacillus sphaericus* como control positivo

Debido a que que *Lysinibacillus sphaericus* es una productora reportada de PHA bacteriano (Biradar et al., 2017), fue utilizada como un control positivo en el desarrollo de este estudio. Para dicho proceso se tomó un cultivo solido congelado del cepario de la UVG. Se descongeló la caja a temperatura ambiente y se tomó una asada para colocarla en agar nutritivo sólido, estas se incubaron durante 48 horas a 30°C. Posterior a esto, se tomó una asada de la nueva cepa crecida y este se colocó en 250 mL de caldo nutritivo, este será colocado overnight en un agitador a 30°C y 150 rpm.

5.5.4. Tinción Sudan Negro B para analizar producción de PHA

El análisis fue realizado utilizando la técnica de ensayos de Sudan Negro B y lisis celular adaptado de Porras et al., 2018 y Viener et al., 2018. La solución Sudan Negro B (SB) marca Sigma-Aldrich se elaboró agregando 500 mg de SB sólido a 50mL de etanol puro, se mezcló durante 30 minutos, se centrifugó para eliminar el precipitado y evitar trazas sólidas en el tinte. Se tomaron los cultivos de 50mL de microalgas y se centrifugaron a 7,500 g por 5 minutos, eliminando las trazas del medio de cultivo con 2 lavados de agua destilada, centrifugando entre cada lavado. Luego se resuspendió el pellet en 1 mL de agua destilada para la lisis de la pared celular de las microalgas. Para esto se sometió el cultivo a 300W por 15 segundos seguido de 15 minutos de enfriamiento a temperatura ambiente, el procedimiento se repitió 3 veces para cada muestra. Luego se tomó 1 mL de muestra en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores (7,500 g por 5 minutos) y se procedió a realizar la tinción del pellet con Sudan Negro B (SB).

Se agregaron 400 uL de la solución a cada muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y posteriormente se colocó en un agitador a 34°C durante 16 minutos de agitación. Al finalizar se centrifugó la muestra para eliminar residuos no teñidos de la pared celular y se agregó 1 mL de agua destilada para luego mezclar el tubo. Se tomaron 300 uL de cada muestra y se procedió a las lecturas a una longitud de onda de 680 nm. El mismo procedimiento fue realizado para *Lysinibacillus sphaericus* omitiendo los pasos de lisis celular, debido a que la técnica de tinción funciona directamente en la bacteria.

5.5.5. Construcción de curva de calibración y análisis espectrofotométrico para evaluación de concentración de PHA.

Para la construcción de la curva de calibración de compuestos lipídicos (como conglomerados de PHA) teñido con Sudan Negro B, se realizaron estándares considerando la solución concentrada como una solución al 100 % p/v, y se realizaron soluciones al 20, 40, 60 y 80 % p/v. Se llevó a cabo la lectura con la técnica de UV/VIS utilizando un espectrofotómetro marca Perkin-Elmer a 680 nm. La absorbancia máxima que puede ser leída es de 0.9 de lo contrario la concentración de PHA se verá sobrepresada, por ello los valores que excedieron esta medida fueron diluidos con una dilución 1:10 y multiplicados por el factor de dilución para ajustar los valores a la curva de calibración. Se construyó una curva de calibración con la cuál se obtuvo la ecuación de la recta para el cálculo de concentraciones para cada replica en cada condición experimental, 8 lecturas para cada valor en 5 condiciones experimentales dando un total de 40 lecturas.

Se realizaron las determinaciones de la concentración de Sudan Negro B expresada para cada condición experimental. Al obtener los datos se llevó a cabo un análisis estadístico con la ayuda de R versión 4.3.1 y R studio. Se realizó un análisis de una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba post Hoc de Dunn, la prueba Kruskal-Wallis fue utilizada debido a que plantea una hipótesis nula que las medianas de cada grupo son las mismas y la alternativa es que al menos uno de los grupos tiene una diferente mediana, es decir, que al menos una de las muestras proviene de una distribución diferente a las otras. La prueba Post Hoc de Dunn nos permite obtener comparaciones entre los grupos analizados, y analizar las diferencias entre los grupos. El ANOVA de un factor no fue posible de ser llevado a cabo debido a que los datos no cumplen con los supuestos de normalidad requeridos. Con estos valores se determinaron las mejores condiciones experimentales para llevar a cabo el escalamiento de los cultivos. Se obtuvo obtuvieron los promedios de expresión para cada condición y se representaron gráficamente.

5.5.6. Escalamiento, extracción y análisis de PHA obtenido

Posterior a la determinación de las mejores condiciones se llevó a cabo el escalamiento de dos cultivos 2 L de la mezcla de microalgas con las condiciones más óptimas determinadas. La extracción de PHA se realizó mediante una extracción química por medio del método de extracción de cloroformo. Para la extracción de PHA de las microalgas se tomaron los 2 L del cultivo de microalgas y se centrifugaron a 4700 rpm durante 7 minutos, se recolectó el pellet y fue secado durante la noche en un horno a 45°C en tubos cónicos llevados a peso constante. Al secar se obtuvieron los valores de biomasa obtenidos para cada condición. Las células de algas fueron posteriormente lavadas con 5 mL de etanol, y centrifugadas (3000 g, 30 min, 10 °C) descartando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 10 mL de solución comercial de hipoclorito de sodio al 4 % y se incubaron durante una hora a 37 °C.

Se centrifugó la solución (3000 g, 30 min, 10 °C), descartando el sobrenadante para después realizar dos lavados más, con 5 mL de agua destilada y 5 mL de etanol, centrifugando y descartando el sobrenadante para obtener el precipitado. Luego se transfirió el precipitado a tubos de vidrio previamente llevados a un peso constante en donde se agregaron 10 mL de cloroformo para posteriormente calentarlo sin llevarlo al punto de ebullición. Esta solución de cloroformo fue decantada con la ayuda de una varilla de vidrio recuperando el cloroformo. Para posteriormente colocarla en una estufa a 45°C para llevar a ebullición hasta obtener el producto deseado. Finalmente, se tomó el peso seco de los polímeros y se utilizaron para determinar la producción total de PHA. Con estos valores se determinó el porcentaje de rendimiento de obtención de PHA con la siguiente ecuación:

$$(X_{mgPHA}/X_{gbiomasa}) * 100 \% \quad (5.1)$$

para determinar la cantidad de PHA producido por cada gramo de biomasa obtenido.

Posterior a la extracción se llevó a cabo un análisis comparativo por medio de la técnica de espectroscopia FTIR, tomando el polímero en seco midiendo las bandas entre 400-4000 cm⁻¹. Este fue comparado con dos muestras comerciales presentes en la base de datos del laboratorio de análisis avanzado en la Universidad del Valle de Guatemala denominados como PHA milky-white y PHA transparente.

6.1. Resultados

Posterior a la medición de los datos, se lleva a cabo el análisis de resultados. En esta sección se presentan los datos, gráficos y espectros obtenidos de cada paso planteado en la sección de metodología anterior. Se presenta la curva de calibración elaborada para la detección de los conglomerados de PHA en las microalgas, utilizada para detectar la producción por el sometimiento a estrés en las cepas de *Chlorella sp.* y *Scenedemus sp.* También se presenta la gráfica de concentración de SB para cada condición experimental y el análisis estadístico realizado para la determinación de las mejores condiciones de producción de PHA dependientes de los nutrientes presentes en el medio vistos en **Tabla 5.2**, condiciones que fueron utilizadas para la producción del PHA en microalgas.

Por último se presentan los análisis de rendimiento de la extracción de PHA para las condiciones CE1 y CE3, que fueron determinadas como las mejores para la producción del PHA. De igual manera, se presentan los espectros FTIR realizados para cada muestra y su comparación con una muestra comercial de PHA para caracterizar las muestras obtenidas de microalgas y ser comparadas contra una de producción comercial.

6.1.1. Concentración de PHA en microalgas

Figura 6.1: Curva de calibración de estándares de Sudan Negro B



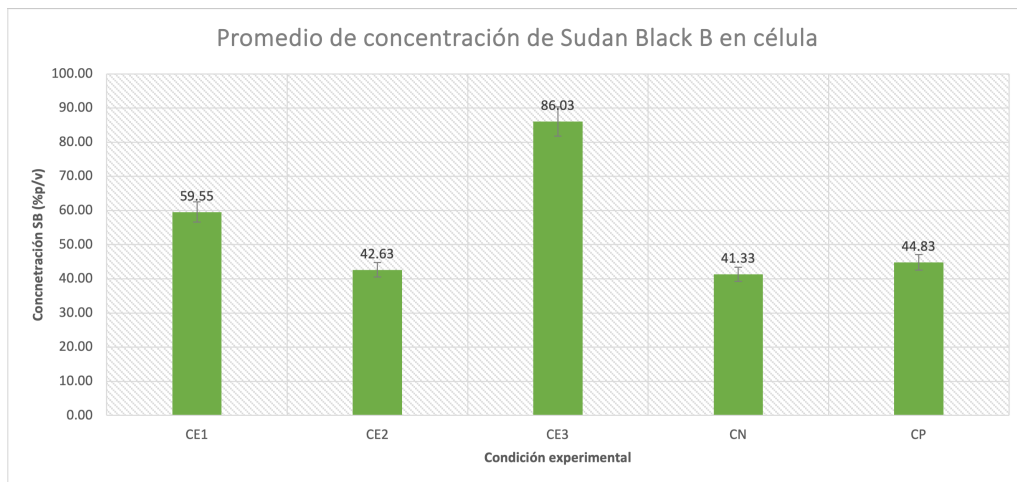
La **Figura 6.1** nos muestra la curva de calibración construida a partir de estándares de Sudan Negro B, para esta curva se consideró la concentración pura del tinte como el 100 % p/v de concentración, los estándares fueron realizados con diluciones 1:10 con agua destilada para la construcción de la curva y el ajuste de los valores a la concentración necesaria medida para detectar esta misma concentración dentro de la célula. Se obtuvo un valor de R^2 de 0.9551 y la ecuación:

$$Y = 0.00088x + 0.0006 \quad (6.1)$$

utilizada para realizar el cálculo de concentración en cada condición.

Al obtener la curva de calibración, se llevó a cabo la medición de las absorbancias a 680 nm de los cultivos de microalgas teñidos con SB los cuales son representados en la siguiente Figura:

Figura 6.2: Promedio de concentración de Sudan Negro B por condición experimental



Representación gráfica de los promedios de concentración visto en la **Tabla 6.1** con base a la **Tabla**

1 de sección de anexos. Se busca mostrar de una manera más sencilla y detallada lo observado en la sección anterior, siendo CE1 (condición experimental 1 sin nitrato), CE2 (condición experimental 2 sin fosfatos), CE3 (condición experimental 3 sin hierro), CN (control negativo medio BG-11 sin alterar) y CP (control positivo *Lysinibacillus sphaericus*). La condición experimental 3 (CE3) es la que muestra una mayor cantidad expresado de SB dentro de la célula. El menor valor observado es el control negativo, seguido de CE2, control positivo y Condición experimental 1.

Dado que se obtuvo una determinación de las mejores condiciones con respecto al promedio de la concentración es necesario analizar las réplicas para obtener datos estadísticos significativamente para verificar la hipótesis. Por ende se realiza un prueba no paramétrica, originalmente se plantea un ANOVA de un factor, sin embargo dicha prueba no puede ser llevada a cabo ya que los datos del control negativo no cumplen con los supuestos de normalidad de los datos. Los valores pueden ser observados en **Figura B.1** y **Figura B.2** en la sección de anexos, debido a esto se procede a realizar una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba post Hoc de Dunn.

Tabla 6.1: Prueba de Kruskal-Wallis para determinación de mejores condiciones de cultivo.

Prueba no paramétrica	Valor P
Kruskal-Wallis	6.78E-05

La **Tabla 6.1** nos muestra el valor P de la prueba de Kruskal-Wallis considerando un alfa de 0.05. El valor p obtenido es de 6.78E-05, ya que $p < 0.05$ se rechaza la hipótesis nula, por ende significa que alguno de los grupos analizados es significativamente distinto al otro.

Debido a que se obtuvo un valor P significativo para rechazar la hipótesis nula siendo esta que las medianas de cada grupo son iguales. Se acepta la hipótesis alternativa que establece que al menos uno de los grupos tiene una diferente mediana, es necesario realizar una prueba Post-Hoc para determinar cuál de los grupos analizados son significativamente diferentes al resto. Para esto se llevo a cabo una prueba Post-Hoc de Dunn.

Tabla 6.2: Valores P analizados en prueba Post-Hoc de Dunn.

Comparación	Valor Z	Valor P ajustado
CE1 - CE2	2.031	0.25
CE1 - CE3	-1.99	0.23
CE1 - CN	1.37	0.67
CE1 - CP	2.17	0.21
CE2 - CE3	-4.03	4.99E-04
CE2 - CN	-0.65	1.00
CE2 - CP	0.14	0.89
CE3 - CN	3.38	5.81E-03
CE3 - CP	4.17	3.04E-04
CN - CP	0.79	1.00

La **Tabla 6.2** nos muestra los valores P obtenidos para la prueba de Dunn, esta prueba nos muestra en que grupos existe una diferencia significativa dado el valor que fue visto en la prueba no paramétrica. Cada combinación obtiene un valor P significativo que nos explica si existe o no diferencia entre esta interacción.

El análisis nos muestra un valor P para las interacciones de condición experimental 1 (CE1). No muestra diferencias significativas con la condición experimental 2 (CE2) dado el valor $P=0.25$, de igual manera no muestra una diferencia significativa con la condición experimental 3 (CE3). De igual manera no muestra diferencia significativa con el control positivo ($P=0.21$) y control negativo

($P=0.21$). Con respecto a las interacciones de CE2, se muestran diferencias significativas entre CE3 (CE3) ($P=4.99E-04$). No demuestra diferencias significativas entre el control positivo ($P=0.89$) y con el control negativo ($P=1.00$).

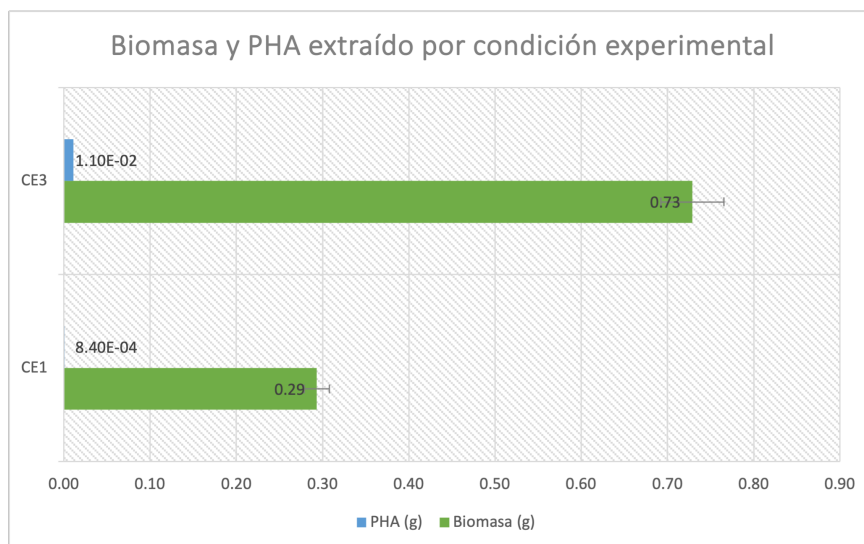
Las interacciones de CE3 son las que muestran mayor diferencia significativa entre las condiciones, se muestra una diferencia significativa entre CE2 ($P=4.99E-04$). Además de una diferencia significativa con ambos controles, control positivo ($P=3.04E-04$) y negativo ($P=5.81E-03$) lo que valida la diferencia de la condición con los controles. Pero no demuestra diferencia significativa con CE1 ($P=0.23$).

Debido a que CE3 fue la que presentó diferencias significativas con respecto a los controles y CE2 fue seleccionada como la condición para un escalamiento de los cultivos. Considerando CE1, no presenta diferencias significativas con la condición 2, tampoco presenta diferencia significativa con los controles. Sin embargo, se selecciona para verificar su producción como una posible condición óptima para el escalamiento ya que si de manera cualitativa se muestra una leve diferencia contra CE1 vista en la **Figura 6.2**. También se presenta como un control para la comparación de la producción para CE3. Es importante destacar que dicho análisis fue realizado con cada réplica, no tomando en cuenta el promedio de los datos, esto para determinar que existen diferencias significativas en las concentraciones de cada condición.

6.1.2. Extracción y cuantificación de PHA

Al obtener las mejores condiciones de crecimiento de los cultivos se tomó un periodo de crecimiento de 3 semanas para 2 cultivos de 2 litros en cada condición respectiva, esto para obtener la mayor cantidad de biomasa posible y obtener una extracción alta de PHA. El proceso de extracción requirió del uso de Hipoclorito de sodio y etanol para la lisis celular, además, del uso de cloroformo para la obtención del PHA. La **Figura 6.3** muestra la cantidad de biomasa obtenida y PHA para cada condición experimental.

Figura 6.3: Comparación de extracción de biomasa y PHA



Se presentan los resultados de la extracción de biomasa y PHA obtenidos. Para la CE1 se obtuvieron 0.29 g y para la CE3 0.73 g de biomasa. Además de 8.40E-04 g y 1.10E-02 g de PHA respectivamente para cada condición experimental. Para la condición CE1 se obtuvo un rendimiento

del 0.29 %, para la CE3 se obtuvieron valores de 1.5 % siendo este el valor de rendimiento más alto. El rendimiento esta expresado como los mg de PHA producido para cada gramo de biomasa obtenido.

Tabla 6.3: **Rendimiento de proceso de producción y extracción de PHA por condición experimental.**

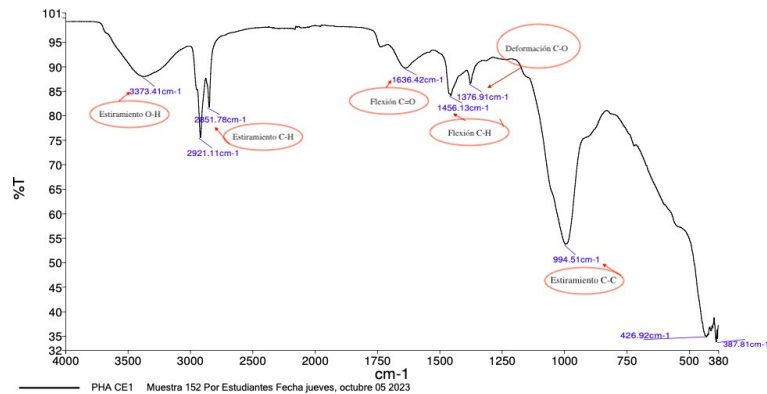
Condición experimental	Rendimiento (%)
CE1	0.29
CE3	1.5

La **Tabla 6.3** se presentan los resultados del rendimiento del proceso de extracción y producción de PHA para cada condición experimental. Siendo condición experimental 1 (CE1) y condición experimental 3 (CE3). El rendimiento fue calculado utilizando la **ecuación 5.1**.

6.1.3. Caracterización por FTIR de PHA extraído

Ya que fue posible llevar a cabo la extracción de PHA de los cultivos de microalgas, se llevo a cabo una caracterización por medio de la Espectroscopia de la transformada de Fourier (FTIR). Las muestras obtenidas fueron analizadas para después ser comparadas con muestras comerciales de dos tipos de PHA, observando los grupos funcionales presentes en los espectros para identificar la pureza del PHA extraído.

Figura 6.4: **Espectro FTIR PHA de Condición experimental 1.**

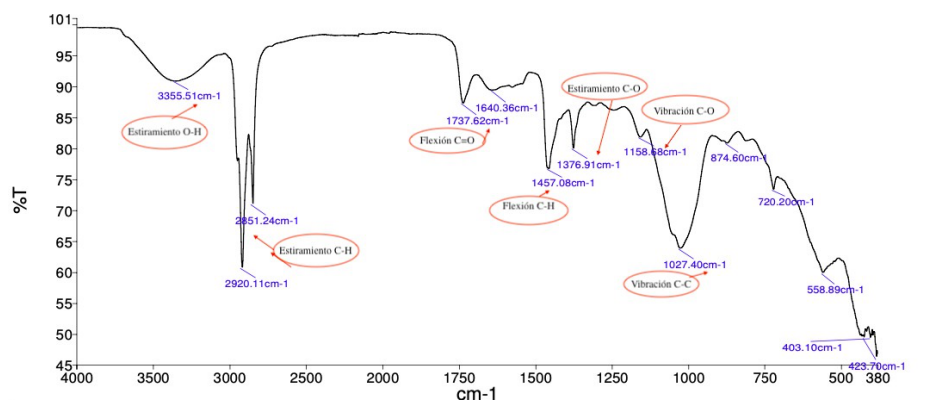


En la **Figura 6.4** se puede observar el espectro generado a partir de la condición experimental 1 (CE1) del medio de mezcla de microalgas extraído de *Chlorella sp* y *Scenedemus sp*. Se pueden observar grupos funcionales evidentes a lo largo del espectro.

En $3,373.41\text{cm}^{-1}$ observamos un pico pequeño que corresponder al estiramiento del grupo funcional -OH. Entre $2,800$ y $3,000\text{cm}^{-1}$ se observan dos picos de intensidad media que pueden indicar el estiramiento de C-H. En 1636cm^{-1} se observa un pico pequeño que puede corresponder a la flexión C=O de una cetona conjugada. Entre $1,376\text{cm}^{-1}$ y $1,456\text{cm}^{-1}$ se observan dos picos de intensidad baja que corresponden a una flexión C-H y una deformación del grupo C-O respectivamente. Por último se observa un pico de intensidad alta entre 900 y $1,000\text{cm}^{-1}$ correspondiente a un estiramiento de enlace C-C.

De igual manera el espectro obtenido para CE3 de la mezcla de microalgas de *Chlorella sp* y *Scenedemus sp*. fue analizada identificando los grupos funcionales presentes en el mismo, identificando los picos característicos y al posible grupo funcional que pertenecen.

Figura 6.5: Espectro FTIR PHA de Condición experimental 3.

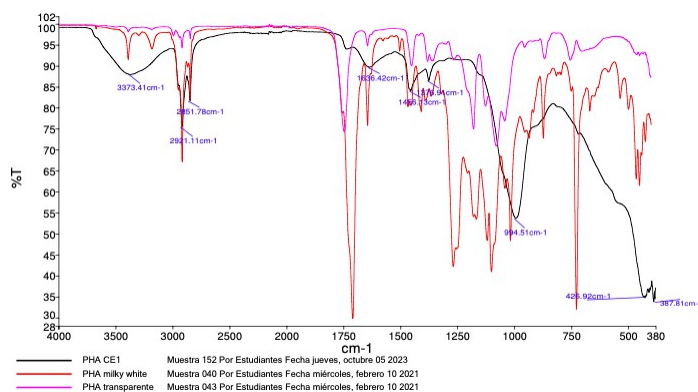


La **Figura 6.5** muestra el análisis de los grupos funcionales identificados en el espectro, para esta condición experimental se tuvo una resolución menor en comparación con el espectro presente en la **Figura 6.4** sin embargo los picos característicos pudieron ser identificados.

En la región de $3,555\text{ cm}^{-1}$ se observa un estiramiento O-H. Posteriormente se observa un pico de alta intensidad en $2,920\text{ cm}^{-1}$ y otro un poco menor alrededor de $2,851\text{ cm}^{-1}$ que indica un estiramiento de C-H. Se observa un pico de intensidad baja en $1,737\text{ cm}^{-1}$ que indica una flexión de C=O seguido de un pico de intensidad media en $1,457\text{ cm}^{-1}$ de flexión de C-H. Un pico en $1,376\text{ cm}^{-1}$ de intensidad baja que muestra estiramiento de C-O. Por ultimo un pico de intensidad baja que posiblemente indica una vibración de C-O en $1,158\text{ cm}^{-1}$ y un pico de intensidad media-alta en $1,027\text{ cm}^{-1}$ que muestra una vibración de C-C. Los demás picos no pueden ser identificados ya que forman parte de la huella dactilar de la muestra.

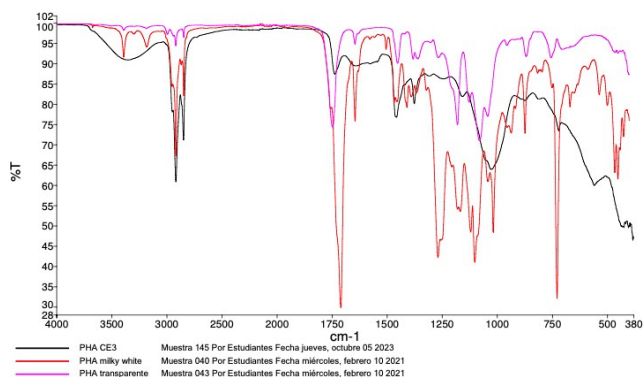
Al obtener esta primera caracterización, se realizó una comparación con dos tipos de PHA comerciales que estaban registrados en la base de datos de el laboratorio de análisis instrumental de la Universidad del Valle de Guatemala, estos están denominados como PHA milky white y PHA transparente debido a las características físicas de los compuestos.

Figura 6.6: Espectro FTIR PHA de condición experimental 1 comparación con estándares.



La **Figura 6.6** presenta la comparación de la extracción de PHA de la condición experimental 1 (CE1) de la mezcla de microalgas y las muestras comerciales. El espectro de PHA milky white tiene coloración roja, el espectro de PHA transparente coloración rosada y, por último, el PHA CE1 coloración negra.

Figura 6.7: Espectro FTIR PHA de Condición experimental 3 comparación con estándares.



La **Figura 6.7** presenta la comparación de la extracción de PHA en condición experimental 3 de la mezcla de microalgas y las muestras comerciales. El espectro de PHA milky white tiene coloración roja, el espectro de PHA transparente coloración rosada y por último el PHA CE3 coloración negra.

Como se puede observar, el espectro de color rosado (PHA transparente) tiene presencia de grupos funcionales -OH alrededor de $3,000$ y $3,500\text{cm}^{-1}$ sin embargo estos tienen una intensidad baja. También se observa un pico de intensidad media alrededor de $1,750\text{cm}^{-1}$ que puede deberse a una tensión C=O. Se observan dos picos pequeños entre $1,250$ y $1,500\text{cm}^{-1}$ que pueden ser indicadores de una flexión O-H. El resto de grupos funcionales no pueden ser identificados ya que corresponden a la huella dactilar del espectro.

El espectro de color rojo (PHA milky white) tiene picos característicos de intensidad baja entre $3,200$ y $3,500\text{cm}^{-1}$ que indica una tensión -OH, también se observa un pico de intensidad media entre $2,300$ y $2,900\text{cm}^{-1}$ que son un posible estiramiento de C-H. Aproximadamente entre $1,750\text{cm}^{-1}$ se observa un pico de alta intensidad correspondiente a una tensión C=O y un pico de intensidad pequeña entre $1,600$ y $1,650\text{cm}^{-1}$ de correspondiente a una posible flexión de C-H. Se observan picos de intensidad alta entre $1,200$ y $1,250\text{cm}^{-1}$ que pueden indicar una tensión C-O, por último el pico más claro es al rededor de 750cm^{-1} que está presente en una flexión C-H monosustituida.

Para ambas condiciones experimentales se puede observar que solamente uno de los picos tiene una misma intensidad y posición en el espectro, el pico en $3,300\text{cm}^{-1}$ que es correspondiente a un estiramiento de C-H. Después la mayoría de picos no coinciden en intensidad con respecto a las muestras comerciales, sin embargo, si en posición por lo que los grupos funcionales identificados son los mismos. La resolución puede estar influida por factores contaminantes, por otro lado, no son significativos para no identificar los grupos funcionales presentes en cada uno de los espectros.

6.2. Discusión

Los polihidroxicanoatos son poliésteres que pueden producirse de manera natural en el metabolismo de muchos microorganismos incluyendo las microalgas. Estos son prometedores para sustituir el uso de plásticos a base de petróleo debido a las características biodegradables, hidrofobicidad y biocompatibilidad (Zambrano & Riera, 2021). Las microalgas son productoras de polihidroxicanoatos (PHA) sin embargo en comparación con una cepa bacteriana de alta producción como *Alcaligenes lactus* o *Azotobacter vinelandii* que pueden llegar a producir PHA en la fase de crecimiento produciendo al rededor de 58.5 % porcentaje peso por cada gramo de biomasa extraído utilizando CO_2

como fuente de carbono (Kumar et al., 2020), mientras que las microalgas en condiciones normales pueden producir un 40 % porcentaje peso por cada gramo de biomasa extraído (Samantha Serra Costa et al., 2018). Aun con esta limitante la producción de PHA bacteriano es cara lo que genera limitantes en la producción y en el uso de PHA a nivel industrial, en contraste la producción por microalgas que puede solo utilizar CO₂ ambiental y luz y dicha producción puede ser elevada al someter a las microalgas en condiciones específicas que eleven la tasa de producción con un menor costo de energía generando beneficios para la industria (Samantha Serra Costa et al., 2019).

Por otro lado, para que dicho proceso pueda ser llevado a cabo de manera efectiva es necesario estudiar las mejores condiciones de crecimiento y los nutrientes que requieren las microalgas para elevar dicha producción, para poder obtener un futuro escalamiento a nivel industrial es necesario también optimizar protocolos de extracción y determinación de condiciones para posteriormente concentrarse en los modelos de escalamiento industrial. El objetivo de esta investigación radicó en plantear un método de producción de PHA en una mezcla de microalgas. La mezcla de microalgas fue elaborada a base de *Scenedemus sp.* y *Chlorella sp.* y medio BG-11 el cuál es conocido como una fuente propicia de carbono para el crecimiento de especies de microalgas de agua dulce (Pandey et al., 2023). Para iniciar con el proceso de producción fue necesario someter a las algas a condiciones de déficit de nutrientes, lo cual genera la elevación de tasa de producción de PHA intracelular, este proceso ocurre de manera natural en microorganismos fotosintéticos la **Figura 4.4** muestra la biosíntesis de PHA en microalgas. Al someter a los microorganismos en dichas condiciones la actividad enzimática y la disponibilidad de precursores de PHA se ve alterada ya que este es dependiente directamente de los recursos que toman las células para la producción (García et al., 2020).

Las mezcla de microalgas fue llevada a cabo con las condiciones observadas en la **Tabla 5.2**, CE1, CE2 y CE3 tienen presencia de medio BG-11 modificado, donde se alteró la composición de sales en cada una, para el control negativo se utilizó medio BG-11 normal ya que era necesario comparar si existían diferencias entre dichas condiciones y las condiciones de cultivo donde se sometió a las algas a estrés y como estas tienen un efecto en la producción de PHA. Cabe recalcar que las condiciones experimentales fueron realizadas en 8 réplicas individuales. En cada condición se mantuvieron las mismas condiciones de pH y concentraciones según la condición experimental. Esto se hizo para evitar la redundancia de datos, y demostrar la reproducibilidad del método ya que cada crecimiento y comportamiento celular se registró de forma independiente.

Para la determinación de la concentración de PHA intracelular se llevo a cabo la tinción utilizando Sudan Negro B (SB), este tinte ha sido utilizado para la determinación de PHA intracelular bacteriano ya que tiene la capacidad de teñir inclusiones de PHA formadas en la célula. Esta inclusión esta rodeada de una pared de fosfolípidos que el tinte tiene la capacidad de teñir y por ende permitirá ver una concentración relativa de PHA intracelular (Grage et al., 2009), esta técnica ha sido utilizada para microscopia pero también en técnicas de espectrofotometría a longitudes de onda de 680 nm que son los puntos de detección del tinte (Mauricio Ariel Porrás et al., 2017). No obstante, es importante mencionar que este método es realizado para bacterias gram negativo. Por ello para esta metodología fue necesario considerar un paso de lisis celular de la pared de microalgas. Esto debido a que las microalgas tiene una pared celular gruesa compuesta de carbohidratos como la celulosa y glicoproteínas que pueden sugerir un problema al considerar las extracciones de biocomponentes de interés en las mismas (Spain & Funk, 2022).

Aunque existen varios métodos de lisis celular como métodos de lisis enzimática o fisicoquímicos, estos métodos requieren de inversiones altas de tiempo y además pueden generar cambios químicos en la composición de los bioproductos de interés. El método de extracción por microondas ha sido estudiado en varias aplicaciones industriales considerando un bajo aporte de energía, un tratamiento rápido y el evitar utilizar sustancias dañinas como una opción viable (Rahul Vijay Kapoore et al., 2018) por ello este método fue seleccionado para el proceso de lisis de las microalgas. Considerando dicho paso, la **Figura 6.1** muestra la curva de calibración realizada para la determinación de la concentración de SB, esta curva fue elaborada con estándares a diferentes concentraciones. El coeficiente de R^2 muestra un valor de 0.9551 que nos indica que los valores experimentales son ajustables al

modelo lineal y por ende se considera confiable para comparar la concentración de SB en cada condición experimental, además, que es válido utilizar la **ecuación 6.1** para obtener la concentración relativa de PHA para cada condición.

Como se puede observar en la **Figura 6.2** fue posible determinar las concentraciones de SB para cada condición experimental. La condición que mostró una menor concentración de SB fue CE2 con 42.3 % de SB expresado que se encontraba sometida a concentraciones nulas de fosfatos. La segunda condición que menos presento concentración fue CE1 sometida a falta de Nitratos expresando un 59.55 % de SB dentro de la célula y por último la condición que más concentración mostró fue CE3 sometida a falta de concentraciones de Hierro y citratos con una concentración de 86.03 % de SB dentro de la célula.

Al comparar estas condiciones con el control negativo que mostró una concentración de 41.33 % y el control positivo de 44.83 % se puede observar que la concentración de cada una coincide con la literatura planteada, ya se establece una concentración de alrededor del 40 % de PHA en microalgas (Samantha Serra Costa et al., 2018) mientras que la bacteria *Lysinibacillus sphaericus* expresa un valor similar ya que no corresponde a una cepa de alta producción bacteriana (Edilane Martins Ferreira et al., 2016). Sin embargo, el control positivo fue utilizado para demostrar la efectividad del método, ya que este fue planteado inicialmente para bacterias y no para microalgas, demostrando que es posible determinar la concentración de PHA en microorganismos. El control negativo fue utilizado para determinar si la concentración en una condición de crecimiento normal con el medio BG-11 podría expresar una cantidad similar a las demás condiciones, en donde se podría determinar la validez del método. Las concentraciones de las condiciones experimentales se muestran altas, mientras que los controles muestran concentraciones más bajas, por ende, se obtuvo un método válido para determinar la concentración relativa de PHA intracelular para microalgas.

Para que estas condiciones puedan tener una validez mucho mayor fue necesario la realización de estadística no paramétrica, determinando si existían diferencias significativas entre cada uno de los grupos analizados. La **Tabla 6.1** muestra los valores de la prueba Kruskal-Wallis. Considerando un valor alfa de 0.05 se obtiene el valor P de 6.75E-05, que es mucho menor que 0.05. Por ende se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa. Por ende se concluye que existe diferencia significativa entre al menos uno de los grupos analizados.

Ya que la prueba muestra diferencias entre al menos uno de los grupos fue necesario analizar las condiciones e interacciones individuales. La **Tabla 6.3** muestra la prueba Post-Hoc de Dunn que evalúa las interacciones entre cada grupo analizado. Se observa, que no existe diferencia significativa entre CE1 y CE2. Esto debido a que se obtuvieron concentraciones relativamente cercanas por ende tienen una concentración de PHA producida similar. Al igual que la condición CE1 y CE3, que a pesar de que tiene una concentración mucho más alta la prueba muestra que no hay diferencia significativa. La condición CE1, el control negativo y positivo no muestran diferencias significativas, esto ya que los valores se encuentran cercanos pero es evidente una diferencia de al menos 10 %. Es importante recalcar que dichos datos fueron analizados para cada réplica y no el promedio de datos. Por lo que entre cada réplica sí existen diferencias de concentración importantes. Es por ello que esta condición al no mostrar diferencia con los grupos importantes y tener la incertidumbre de su comportamiento en cada réplica fue seleccionada para llevar a cabo un escalamiento del cultivo y verificar la producción de PHA.

La condición CE2 y CE3 si muestran una diferencia en la concentración relativa de PHA valor que confirma lo observado en la **Figura 6.2**. La condición CE2 no muestra diferencias con el control negativo ni el control positivo, esto ya que los valores indican una concentración muy baja de PHA producido que se asimila a los controles. Esto nos indica que dicha condición no es efectiva para un escalamiento ya que la producción entre una condición de medio normal y una producción de cepa bacteriana es igual y por ende es descartada para un escalamiento.

La condición experimental 3 es la que muestra diferencia significativa con casi todos los grupos. Se observan diferencias significativas con la condición experimental 2 (CE2) que coincide con lo

esperado ya que hay una concentración mucho más alta en comparación a dicha condición. Muestra una diferencia significativa con el control positivo mostrando que la tasa de concentración de PHA puede llegar a ser mayor en microalgas que en cepas bacterianas y también diferencias significativas con el control negativo que demuestra que el sometimiento a una falta de nutrientes puede elevar la tasa de producción de PHA. Sin embargo, no demuestra diferencias significativas con la CE1. Por ende, esta condición fue también seleccionada para un escalamiento, llevando a cabo el escalamiento en 2 litros considerando una falta de nutrientes de hierro, citrato y nitratos.

Es importante destacar que las concentraciones mostradas no son necesariamente exclusivas a la concentración de PHA. Esto ya que como se menciona anteriormente el SB tiene la capacidad de teñir lípidos y otros productos que se pueden encontrar en el medio (Grage et al., 2009), por ello durante esta investigación se refiere a una concentración relativa de PHA medido. Sin embargo, el método si muestra una validez significativa ya que el control negativo muestra una menor concentración promedio en comparación a los demás grupos experimentales mostrando que el sometimiento a estrés tiene una diferencia significativa en la concentración de PHA producida en la célula. Es posible que esta variabilidad en las lecturas pueda deberse a la tinción de otros componentes en el medio, esto porque el método de microondas aunque si puede realizar una lisis celular alta no se asegura que pueda eliminar completamente la pared celular de las microalgas, además, de que es necesario realizar centrifugaciones y lavados para retirar cualquier traza de pared celular que pueda estar presente en el medio y afectar las lecturas.

A pesar de esto, el objetivo de determinar la concentración de PHA en condiciones de estrés de microalgas fue alcanzado. La razón por la que CE1 y CE3 fueron las que alcanzaron una mayor concentración relativa de PHA fue por la falta de hierro y nitrógeno en los medios. El nitrógeno es el elemento que se hace más presente en la biomasa de microalgas que se considera como la base para todas las funciones proteicas y estructurales de la célula, mientras que la falta de hierro incrementa la producción de carbohidratos dentro de la célula. Al limitar estos nutrientes se encuentra que se eleva la tasa de producción de otros productos como minerales, vitaminas, carbohidratos y lípidos a nivel celular (Hui et al., 2022), lo que sugiere que la falta de estos nutrientes puede elevar la producción de PHA, al obtener estas condiciones se puede evaluar el proceso de producción a escala industrial y tener un paso más para la obtención de un biopolímero producido en masa.

Ya que fue posible la determinación de las mejores condiciones de crecimiento (CE1 y CE3) se procedió al proceso de escalamiento a cultivos de 2 L y la extracción de biomasa y PHA producida para dichos cultivos. La **Figura 6.3** muestra una comparación gráfica para ambas condiciones experimentales y la obtención de biomasa contra la obtención de PHA intracelular extraído. La biomasa extraída fue de 0.29 g y 0.79 g para la CE1 y 3 respectivamente. Considerando que CE3 es la que mostró una cantidad más alta de biomasa producida y extraída. De igual forma la extracción de PHA fue más alta para esta en comparación con CE1. Esto también confirma lo observado en las secciones anteriores (**Figura 6.2** y **Tabla 6.2** y **6.3** ya que se esperaba una producción de PHA más alta para CE3. Sin embargo, para ambas condiciones la extracción de PHA fue bastante baja obteniendo valores de $8.40E-04$ g y $1.10E-02$ g de PHA para la condición 1 y 3 respectivamente. Este valor es también mostrado para el rendimiento de extracción en donde se obtuvo un 0.29 % para CE1 mientras que para CE3 se obtuvo un valor más alto de 1.5 %, el rendimiento es bajo considerando que otros métodos como el utilizar agitación continua en un bioreactor obtienen rendimientos de extracción del 96 % (Chanakarn Wongmoon & Suchada Chanprateep Napathorn, 2022), el rendimiento muestra la cantidad de PHA producido por cada gramo de biomasa generado. Ambos rendimientos son bajos, esto es directamente relacionado al proceso de extracción en cuestión tanto de la biomasa como del PHA. De igual manera se compara la tasa de producción de cada condición experimental, ya que a pesar de que en análisis pasados la CE1 no mostraba una diferencia significativa con la CE3 es evidente que aunque la condición si es favorable, la CE3 logra un aprovechamiento más alto de PHA producido por cada gramo de biomasa obtenido.

A pesar de que se obtuvo cierta cantidad de biomasa, no fue posible obtener una cantidad significativa considerando un cultivo de 2 L. Los procesos de extracción de biomasa para microalgas

son conocidos como complejos, ya que la concentración de células puede ser bastante baja entre 0.1 y 3.0 g/L y de un tamaño microscópico entre 3 y 30 μm , además de una densidad similar al agua. Estos factores generan dificultades en la recuperación de la biomasa de los cultivos (Mariana Lara Menegazzo & Gustavo Graciano Fonseca, 2019). Es posible utilizar métodos de floculación que permita espesar la biomasa y de esta manera facilitar su recuperación, además de procesos de sedimentación y deshidratación dentro del recipiente para obtener la mayor cantidad de biomasa posible (Barros et al., 2015). En este estudio solamente se utilizó un proceso de centrifugación y secado para recuperar a la biomasa, el cual no es óptimo para una obtención alta de biomasa y por ende una reducción en la obtención de el bioproducto de interés, por lo que se recomienda otras alternativas.

Aunque el proceso de extracción de biomasa no fue el más óptimo, también se consideran fallas en el proceso de extracción de PHA. El uso de hipoclorito de sodio funciona como un segundo agente de lisis celular aplicado en la biomasa, sin embargo, es posible que esta lisis no sea completa, ocasionando pérdida de PHA dentro de la biomasa. Este proceso se relaciona también con el punto de decantación del cloroformo, ya que, el PHA debe estar incorporado en este compuesto, si la decantación no es efectiva es posible tener pérdidas de PHA dentro del material decantado. De igual manera el proceso de evaporación de cloroformo no fue el más óptimo, ya que este fue realizado en un beaker ya que es posible utilizarlo como recipiente para la evaporación, sin embargo, no era posible controlar la distribución de calor y por ende la temperatura de ebullición pudo elevarse y evaporar algunos PHA. Esto ya que los PHA dependiendo de su naturaleza pueden tener un punto de ebullición entre 40-180°C (Medeiros & Mattia Sponchioni, 2022) al no controlarse la temperatura es posible que se diera la pérdida de una gran parte de los mismos. Por esto, se recomienda el uso de equipo adecuado como un rota evaporador donde la temperatura puede ser mejor controlada y asegurar la obtención de los compuestos.

El rendimiento de estos procesos fue bastante bajo, por otro lado, fue posible obtener una pequeña cantidad que es suficiente para realizar el análisis de caracterización por FTIR. Se obtuvo un sólido blanco con algunas presencias de sólidos cafés que fueron obtenidos después de la evaporación de cloroformo en el beaker, ambos sólidos fueron utilizados para el análisis. En primer instancia, la **Figura 6.4** muestra el espectro de CE1, se observan picos correspondientes a un grupo -OH, estiramiento de C-H, una flexión del grupo C=O, una flexión C-H, una deformación del grupo C-O y por último un estiramiento de enlace C-C. La **Figura 6.4** muestra el espectro obtenido para la condición experimental 3 (CE3). Se muestra un estiramiento del grupo O-H, un estiramiento de C-H, una flexión de C=O, una flexión C-H, vibraciones de C-O y C-C. Además de regiones que no pueden ser identificadas ya que forman parte de la huella dactilar de la muestra. Además en las **Figuras 6.5 y 6.6** se muestran las comparaciones de los espectros contra las muestras comerciales denominadas como PHA transparente y PHA milky-white.

Al analizar la presencia de los grupos funcionales en cada uno de los espectros se puede observar grupos funcionales que son correspondientes a PHA, esto puede observarse en la molécula orgánica del PHA vista en la **Figura 4.3** en donde hay para ambas muestras, la existencia de los grupos funcionales que conforman a la molécula como O-H, C-H, flexión C=O, C-H, C-O y enlaces C-C, los grupos funcionales pueden ser observados en resumen en la **Tabla C.1 a la C.2** para cada condición experimental. Es importante agregar que la resolución para ambos espectros no es la más óptima. Ya que a pesar de que hay picos claros para ambas situaciones algunos muestran intensidades variables, no obstante, se muestran en las regiones que corresponden a los grupos funcionales analizados. Es CE3 la condición que tiene una resolución más baja en comparación a la 1, esto también está relacionado al proceso de extracción del PHA ya que es muy probable que exista presencia de contaminantes como alcoholes o compuestos que se hacen presentes en las células de las microalgas. Como la celulosa, según la literatura la celulosa puede tener picos al rededor de 1,672 cm^{-1} también alrededor de 1,032 cm^{-1} (Nouha Sebeia et al., 2019). Estos se hacen presentes en el espectro de la condición 3, sin embargo no son señales tan fuertes y claras que aunque es un indicador de una contaminación y disminuye la resolución del espectro no es significativa para descartar la presencia de PHA. Además el pico alrededor de 2,920 cm^{-1} y 2,851 cm^{-1} tiene una mayor intensidad que CE1,

sin embargo, esto no es una señal significativa que muestra evidencia de algún otro contaminante. Por lo que la resolución de ambos espectros aunque no es óptima es válida para el análisis en donde se concluye que se obtuvo PHA de origen de microalgas.

Esta caracterización es confirmada al analizar la extracción de PHA de microalgas contra otros análisis realizados en la literatura, la **Figura D.1 y D.2** muestran espectros FTIR de PHA extraídos de *Chlorella sp.* Se observa presencia de grupos funcionales similares a los realizados en esta experimentación. Se observan grupos funcionales para PHA I, II, III y IV en $3,339\text{ cm}^{-1}$ y $3,348\text{ cm}^{-1}$ que representa un estiramiento -OH. La presencia de un grupo entre $2,900\text{ cm}^{-1}$ para PHA I y PHA II, y uno en $2,923\text{ cm}^{-1}$ para PHA III y IV que representa una vibración C-H. Un estiramiento de C=O en $1,625\text{ cm}^{-1}$ para PHA I, $1,644$ para PHA II, $1,639$ para PHA III y IV (Roja et al., 2019). Estos picos y grupos funcionales son los mismos grupos observados para los realizados en esta investigación por lo que se concluye que fue posible obtener PHA de origen de microalgas y se cumplió con el objetivo de ser caracterizado y comparado.

Al obtener estos espectros estos fueron comparados con muestras comerciales que están presentes en el laboratorio de Análisis avanzado de la Universidad del Valle de Guatemala, denominados como PHA transparente y PHA milky-white. Las figuras **6.6 y 6.7** muestran una comparación de los espectros analizados en la investigación contra los comerciales. Como se puede observar no existe la presencia de grupos funcionales iguales en las comerciales y las extraídas. En esta condición tenemos que considerar dos factores, el primero es que la resolución de las muestras comerciales no es óptima, no tiene señales claras de PHA a lo largo del espectro, además, las regiones entre 750 cm^{-1} y $1,500\text{ cm}^{-1}$ no son claras y no es posible identificar los picos esto muestra que la resolución del espectro no fue realizado de la mejor manera, esto puede estar relacionado a la naturaleza de la muestra ya que la composición física de este PHA era de pellets y no un sólido lo que podría no ayudar a la resolución final.

El otro punto a considerar es que los polihidroxicanoatos son un grupo extenso de moléculas y ésteres que pueden llegar a tener varias composiciones y estructuras químicas. Ya que existe presencia de grupos funcionales -OH, C=O y de C-H puede deberse a una presencia de PHA de cadena corta (Shahid et al., 2021). De igual manera las fichas técnicas de estas muestran que las características fisicoquímicas son de otro tipo a las extraídas en este estudio por ende no es razonable comparar estas muestras comerciales con las extraídas ya que son de un origen diferente. Sin embargo, la comparación fue posible de ser llevada a cabo determinando que hay presencia de PHA y que este tiene características diferentes a un PHA comercial. No obstante, se recomienda realizar análisis fisicoquímicos con una mayor cantidad de muestra para obtener una caracterización más completa y determinar si este es posible de ser utilizado como un biopolímero en condiciones escalables a la industria. Fue posible cumplir con los objetivos planteados ya que fue posible encontrar condiciones de nutrientes que permiten la producción de PHA en microalgas, además de extracción y caracterización de PHA de origen de microalgas que puede llegar a tener aplicaciones para la producción a gran escala de polímeros a base de petróleo, sin embargo se recomienda tomar en cuenta que es necesario evaluar mayores características como pH, temperatura, oxigenación en cultivos para optimizar los parámetros a utilizar.

- La metodología planteada en esta investigación demuestra el potencial de producción de poli-hidroxicanoatos (PHA) a partir de una mezcla de microalgas, en particular las cepas *Chlorella sp* y *Scenedesmus sp*. confirmando que el someter a las microalgas a condiciones específicas de estrés por falta de nutrientes puede elevar significativamente la tasa de producción de PHA intracelular, esto sugiere un hallazgo prometedor para la producción sostenible de biopolímeros.
- Fue posible identificar las condiciones óptimas de crecimiento para la producción de PHA en microalgas. Las condiciones experimentales 1 y 3 que involucran la falta de hierro y nitratos en el medio de cultivo demuestran ser efectivas para elevar la producción de PHA. Lo que sugiere la importancia de limitar ciertos nutrientes en el medio para optimizar la producción de PHA en microalgas.
- El método de tinción de Sudan Negro B sugiere que es posible ser utilizado para la tinción de PHA intracelular y que es válido para evaluar su producción en microalgas, a pesar de los desafíos que presenta la pared celular de estas. La eficacia de este método se demuestra al mostrar diferencias significativas en la expresión relativa de PHA entre las diferentes condiciones experimentales y los controles por medio de un análisis estadístico válido que sugiere un enfoque confiable para la determinación de producción de PHA en microalgas.
- Los hallazgos de la caracterización de PHA por medio de la técnica de espectroscopia de la transformada de Fourier (FTIR) sugieren la presencia de PHA en la extracción realizada y que el método es válido para la extracción de dicho compuesto.
- Los resultados de esta investigación tienen implicaciones significativas para la industria de bioplásticos y la producción sostenible de PHA. Establece bases para futuras investigaciones que podrían abordar los desafíos identificados como la mejora de procesos de producción, extracción y escalabilidad de la producción.

Recomendaciones

- Se recomienda buscar métodos de optimización de las condiciones de extracción de biomasa como floculantes, des-hidratantes y extracciones enzimáticas que permitan un mayor aprovechamiento de la obtención de biomasa. Además de condiciones de crecimiento de las microalgas como la intensidad de luz, temperatura, oxigenación y factores que puedan influir en la producción de PHA.
- Se recomienda investigaciones adicionales como la construcción de una curva de crecimiento mientras se realiza mediciones de tinción de SB para determinar el punto exacto de producción de PHA en microalgas para la construcción de modelos de cinética por medio del programa Berkley Madonna que permitan la comprensión de comportamiento de las microalgas para su escalamiento industrial.
- Se sugiere una mejora en los procesos de extracción de PHA utilizando equipos adecuados como rota-evaporadores para evitar la pérdida de PHA además de procesos de purificación orgánica y de lisis celular óptimos para la elevación del rendimiento de extracción del PHA intracelular de las microalgas.
- Se sugiere la realización de análisis más detallados y avanzados para determinar las características fisicoquímicas del PHA producido como puntos de fusión, ebullición, caracterizaciones por HPLC y resistencia térmica para confirmar su posible uso como un biopolímero al compartir características similares a los polímeros a base de petróleo.

Alexandrovich, S. O., Yurievna, V. S., Olegovich, P. I., Yurievna, K. N., Ilyinichna, V. L., & Pavlovna, Y. T. (2018). Provision of Microbiological Safety in the Food Industry based on Special Technological Supporting Solutions. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 7(1), 103-113.

Ambati, R., Phang, S.-M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs*, 12(1), 128–152.

Biradar, G. G., Shivasharana, C. T., & B.B. Kaliwal. (2017). Characterization of Polyhydroxybutyrate (PHB) Produced by Novel *Bacterium Lysinibacillus sphaericus* BBKGBS6 Isolated From Soil. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(4), 1685–1701.

Barros, A., Gonçalves, A. L., Simões, M., & José C.M. Pires. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 41, 1489–1500.

Chanakarn Wongmoon, & Suchada Chanprateep Napathorn. (2022). Optimization for the efficient recovery of poly(3-hydroxybutyrate) using the green solvent 1,3-dioxolane. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1086636>

Chen, G.-Q. y Wu, Q. (2017). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials Science*, 5(12), 2360-2373.

Chen, G.-Q. y Wu, Q. (2018). The biosynthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHA). In G.-Q. Chen, Q. Wu y T. W. Lee (Eds.), *Polyhydroxyalkanoate (PHA) based blends, composites and nanocomposites* (pp. 1-26). Singapore: Springer.

Cho, H. J., Choi, J. Y., Lee, S. H., & Kim, T. W. (2019). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from waste and surplus materials as carbon substrates. *Bioresource Technology*, 294, 122166.

De Sousa, P. F., Pacheco, G. J., de Oliveira, C. A., Martins-Franchetti, S. M., de Carvalho, J. C. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) from microalgae: a review of recent advances in the production and extraction of PHA and the synthesis of nanoparticle-based composites. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 171.

Desafío de los polihidroxicanoatos como solución al problema de los plásticos de un solo uso.

(2021). ResearchGate.

Drzal, L. (2002). Sustainable bio-composites from renewable resources: opportunities and challenges in the green materials world. *Journal of Polymers*.

Fady Abd El-malek, Rofeal, M., Farag, A. M., Omar, S. H., & Heba Khairy. (2021). Polyhydroxyalkanoate nanoparticles produced by marine bacteria cultivated on cost effective Mediterranean algal hydrolysate media. *Journal of Biotechnology*, 328, 95–105.

Gabriela Pino García, Juan Eduardo Sosa-Hernández, Laura Isabel Rodas-Zuluaga, Castillo-Zacarías, C., Hafiz M.N. Iqbal, & Parra-Saldívar, R. (2020). Accumulation of PHA in the Microalgae *Scenedesmus sp.* under Nutrient-Deficient Conditions. *Polymers*, 13(1), 131–131.

González, I., García, P., López, M. J., López, G., Villar, M. A. y García, A. (2009). Effect of the size and symmetry of the monomeric units on the morphology, crystallinity, and thermal properties of polyhydroxyalkanoates. *Biomacromolecules*, 10(10), 2714-2722.

Grage, K., Jahns, A. C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A., & Rehm, B. H. A. (2009). Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, 10(4), 660–669.

Heimann, K., & Huerlimann, R. (2015). Microalgal Classification. *Handbook of Marine Microalgae*, 25–41.

Hui, F., Nadir, N., & Kumar Sudesh. (2022). Microalgal Biomass as Feedstock for Bacterial Production of PHA: Advances and Future Prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10.

Javadi, A., Salehi, R., Amiri, H. y Azimi, S. (2019). A review on chemical structure of biodegradable polyhydroxyalkanoates toward mechanistic understanding of bacterial biosynthesis. *Macromolecular Research*, 27(11), 1039-1058.

Kalia, V. C., & Kaur, C. (2020). Microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) and its copolymers: A review of recent advancements. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1-18.

Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1).

Koller, M., Salerno, A., Muhr, A., Reiterer, A., Schober, S. y Berg, G. (2015). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 12, 76-88.

Koller, M., Salerno, A., Muhr, A., Reiterer, A., Schober, S., Mittelbach, M., & Braunegg, G. (2017). Characteristics and potential applications of polyhydroxyalkanoates from *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, and *Bacillus cereus*. *Advances in Polymer Science*, 271, 1-23.

Kumar, M., Rashmi Rathour, Singh, R., Sun, Y., Pandey, A., Edgard Gnansounou, Kun-Yi Andrew Lin, Daniel C.W. Tsang, & Indu Shekhar Thakur. (2020). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. *Journal of Cleaner Production*, 263, 121500–121500.

Mauricio Ariel Porras, Villar, M. A., & María Amelia Cubitto. (2017). Novel spectrophotometric technique for rapid determination of extractable PHA using Sudan black dye. *Journal of Biotechnology*, 255, 28–32.

Mariana Lara Menegazzo, & Gustavo Graciano Fonseca. (2019). Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review. *Renewable & Sustainable Energy*

Reviews, 107, 87–107.

Medeiros, J., & Mattia Sponchioni. (2022). Evolution and design of continuous bioreactors for the production of biological products. *Advances in Chemical Engineering*, 1–26.

Namazi, H. (2017). Polymers in our daily life. *BioImpacts*, 7(2), 73–74.

Pillai, O., & Panchagnula, R. (2001). Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(4), 447–451.

PubChem. (2023). Sudan black B. @Pubchem; PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sudan-black-B>.

Plastics -the Facts 2013 An analysis of European latest plastics production, demand and waste data. (n.d.).

Ramaraj, R., Tsai, D. D.-W., & Chen, P. H. (2014). Freshwater microalgae niche of air carbon dioxide mitigation. *Ecological Engineering*, 68, 47–52.

Rahul Vijay Kapoore, Jagroop Pandhal, & Vaidyanathan, S. (2018). Microwave-Assisted Extraction for Microalgae: From Biofuels to Biorefinery. *Biology*, 7(1), 18–18.

Ranganadhareddy, A., Vijetha, P., & Chandrsekhar, C. (2022). Bioplastic Production from Microalgae and their Applications- A Critical Review. *Journal of Biochemical Technology*, 13(2), 13–18.

Ranganadha, R. A., Krupanidhi, S., Venkateswarulu, T. C., Bharath, K. R., Sudhakar, P., & Vidyaprabhakar, K. (2019). Molecular characterization of a biopolymer producing bacterium isolated from sewage sample. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 13(3), 325-335.

Rahman, A., Anthony, R. J., Sathish, A., Sims, R. C., & Miller, C. D. (2014). Effects of wastewater microalgae harvesting methods on polyhydroxybutyrate production. *Bioresource Technology*, 156, 364–367.

Rahman, P. K. S. M., Gakpe, E., & Ashokkumar, M. (2020). Microbial polyhydroxyalkanoates: Opportunities and challenges. *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors*, 9, 73-108.

Roy Chong, J. W., Tan, X., Khoo, K. S., Ng, H. S., Jonglertjunya, W., Yew, G. Y., & Show, P. L. (2022). Microalgae-based bioplastics: Future solution towards mitigation of plastic wastes. *Environmental Research*, 206, 112620.

Samantha Serra Costa, Andréa Lobo Miranda, Greque, M., Alberto, J., & Janice Izabel Druzian. (2019). Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 536–547.

Samantha Serra Costa, Andréa Lobo Miranda, Assis, J., Oliveira, C., Greque, M., & Janice Izabel Druzian. (2018). Efficacy of *Spirulina sp.* polyhydroxyalkanoates extraction methods and influence on polymer properties and composition. *Algal Research*, 33, 231–238.

Samrot, A. V., Samanvitha, S. K., Nagarajan Shobana, Renitta, E. R., P. Senthilkumar, Kumar, S., S. Abirami, S. Dhiva, Bavaniatha Muthiah, Prakash, P., S. Saigeetha, Shree, K. S., & Thirumurugan Rathinasabapathy. (2021). The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA-Based Nanoparticles. *Polymers*, 13(19), 3302–3302. <https://doi.org/10.3390/polym13193302>

Sonia Graciela Ramos. (2021). Tecnologías para el desarrollo de biopolímeros, como una alternativa en la sustitución del plástico (PET). *Alimentos Ciencia E Ingeniería*, 28(1), 95–100. <https://doi.org/10.31243/aci.v28i1.1034>

Shahid, S., Corroler, D., Ridha Mosrati, Amiel, C., & Gaillard, J. (2021). New model development for qualitative and quantitative analysis of microbial polyhydroxyalkanoates: A comparison of Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Gas Chromatography.

Shiva Aley Acharjee, Pranjal Bharali, Bhagyudoy Gogoi, Viphezolie Sorhie, Walling, B., & Alemtoshi. (2022). PHA-Based Bioplastic: a Potential Alternative to Address Microplastic Pollution. *Water, Air, & Soil Pollution*, 234(1). <https://doi.org/10.1007/s11270-022-06029-2>

Singh, D., Khare, S.K., & Fraceto, L.F. (2019). Recent advances in polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, 6(4), 1-23.

Singh, G. P., & Singh, M. (2021). Challenges and Perspectives of Polyhydroxyalkanoate Production From Microalgae/Cyanobacteria and Bacteria as Microbial Factories: An Assessment of Hybrid Biological System. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.

Sudesh, K. y Abe, H. (2009). Biodegradable polymers from bacteria and microorganisms. In A. S. Singha y S. Thakur (Eds.), *Biodegradable and biocompatible polymer composites: Processing, properties and applications* (pp. 35-69). Oxford: Woodhead Publishing Limited.

Sydney, E. B., Sturm, W., de Carvalho, J. C., Thomaz-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2010). Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*, 101(15), 5892–5896.

Su, S., Ning, Y., Zhang, H., Wu, D., & Cui, H. (2022). Sudan Black B treatment uncovers the distribution of angiotensin-converting enzyme2 in nociceptors. *Molecular Pain*, 18, 174480692210803-174480692210803. <https://doi.org/10.1177/17448069221080305>

Tullo, A. H. (2019). A biopolymer whose time has come. *Chemical & Engineering News*; American Chemical Society.

Vigna, A. (2023, August 15). From Guatemala to Honduras, the Motagua River carries thousands of tonnes of plastic. *Le Monde.fr*; *Le Monde*. https://www.lemonde.fr/en/environment/article/2023/08/15/floating-from-guatemala-to-honduras-the-motagua-river-carries-thousands-of-tonnes-of-plastic_6093834_114.html

Ym, V. (2011). JMBT, an open access journal Open Access Varsha and Savitha. Polyhydroxyalkanoates: A Promising Biopol. *J Microbial Biochem Technol*, 3(5), 99–105.

Valores promedio de absorbancia y valores calculados de expresión de SB en la célula

Tabla A.1: Valores promedio de absorbancia y calculados de expresión de SB en célula

Condición experimental	CE1	CE2	CE3	CN	CP
Promedio abs	0.0482	0.0347	0.0694	0.0337	0.0365
Concentración promedio (%)	59.55	42.63	86.03	41.33	44.83

La **Tabla 1** muestra los valores de absorbancia medida para cada condición experimental, además de el cálculo de porcentaje promedio expresado en cada condición. Condición experimental 1 (CE1), condición experimental 2 (CE2), control negativo 3 (CN) y control positivo (CP) según las condiciones vistas en **Tabla 5.2**. Utilizados para la realización de **Figura 6.2** vista en la sección de resultados.

Supuestos analizados para ANOVA de un factor

Tabla B.1: Valor P obtenidos para analizar supuesto de normalidad para ANOVA de un factor.

Condición experimental	Valor P
CE1	0.4601
CE2	0.9912
CE3	0.7482
CN	8.32E-04
CP	0.2974

Se presentan los valores P para análisis de normalidad en cada condición experimental, siendo condición experimental 1 (CE1), condición experimental 2 (CE2), condición experimental 3 (CE3), control positivo (CP) y control negativo (CN). Se observa que todos menos CN cumple el supuesto de normalidad, por ende no es posible realizar ANOVA de una factor y se realiza prueba no paramétrica.

Tabla B.2: Supuestos de Cooks Distance, y Leve Test para análisis de datos atípicos y homocedasticidad.

Supuesto	Valor en R
Distancia de Cook	FALSE=40
Leven Test	P=0.05717

Se presentan los valores de la distancia de Cook y Leven Test para análisis de datos atípicos y homocedasticidad. El valor FALSE=40 indica que no hay datos atípicos y el dato de homocedasticidad P=0.05717 indica que los datos son homocedásticos.

 Grupos funcionales analizados para FTIR por condición experimental

Tabla C.1: Grupos funcionales vistos en FTIR para condición experimental 3

Grupo funcional	Estiramiento cm^{-1}
Estiramiento O-H	3,373.4
Estiramiento C-H	2,800
Flexión C=O	1,636
Flexión C-H	1,376
Deformación C-O	1,456
Enlace C-C	954

Se muestran los grupos funcionales identificados para la condición experimental 3 vista en **Figura 6.4**.

Tabla C.2: Grupos funcionales vistos en FTIR para condición experimental 1

Grupo funcional	Estiramiento cm^{-1}
Estiramiento O-H	3,555
Estiramiento C-H	2,920- 2,851
Flexión C=O	1,737
Flexión C-H	1,457
Vibración C-O	1,158
Vibración C-C	1,027

Se muestran los grupos funcionales identificados para la condición experimental 2 vista en **Figura 6.5**.

Tabla C.3: Grupos funcionales vistos en FTIR para condición experimental 1

Grupo funcional	Estiramiento cm^{-1}
Estiramiento O-H	3,555
Estiramiento C-H	2,920- 2,851
Flexión C=O	1,737
Flexión C-H	1,457
Vibración C-O	1,158
Vibración C-C	1,027

Se muestran los grupos funcionales identificados para la muestra comercial PHA transparente vista en **Figura 6.6**.

Tabla C.4: Grupos funcionales vistos en FTIR para PHA Milky White comercial.

Grupo funcional	Estiramiento cm^{-1}
Tensión O-H	3,200-3,500
Estiramiento C-H	2,300-2,900
Tensión C=O	1,600-1,650
Flexión C-H	1,200-1,250
Flexión C-H mono sustituida	750

Se muestran los grupos funcionales identificados para la muestra comercial PHA Milky white vista en **Figura 6.7**.

Espectros comerciales de PHA



		www.sigmaaldrich.com
SAFETY DATA SHEET		Version 6.3
according to Regulation (EC) No. 1907/2006		Revision Date 27.04.2023 Print Date 17.11.2023
GENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO OEL DATA		
SECTION 1: Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking		
1.1 Product identifiers		
Product name	:	PHA 767491 hydrochloride
Product Number	:	PZ0178
Brand	:	Sigma
REACH No.	:	A registration number is not available for this substance as the substance or its uses are exempted from registration, the annual tonnage does not require a registration or the registration is envisaged for a later registration deadline.
CAS-No.	:	845538-12-7
1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against		
Identified uses	:	Laboratory chemicals, Manufacture of substances
1.3 Details of the supplier of the safety data sheet		
Company	:	Sigma-Aldrich Inc. 3050 SPRUCE ST ST. LOUIS MO 63103 UNITED STATES
Telephone	:	+1 314 771-5765
Fax	:	+1 800 325-5052
1.4 Emergency telephone		
Emergency Phone #	:	800-424-9300 CHEMTREC (USA) +1-703-527-3887 CHEMTREC (International) 24 Hours/day; 7 Days/week
SECTION 2: Hazards identification		
2.1 Classification of the substance or mixture		
Not a hazardous substance or mixture according to Regulation (EC) No 1272/2008.		
2.2 Label elements		
No hazard pictogram, no signal word, no hazard statement(s), no precautionary statement(s) required		
Sigma- PZ0178		Page 1 of 10
The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the US and Canada		

Figura D.1: Ficha técnica PHA transparente.
Fuente: (Merck,2023)

SAFETY DATA SHEET

according to Regulation (EC) No. 1907/2006

Version 7.3
Revision Date 27.04.2023
Print Date 17.11.2023

GENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO OEL DATA

SECTION 1: Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking**1.1 Product identifiers**

Product name : PHA-543613
Product Number : PZ0135
Brand : Sigma
REACH No. : A registration number is not available for this substance as the substance or its uses are exempted from registration, the annual tonnage does not require a registration or the registration is envisaged for a later registration deadline.
CAS-No. : 478149-53-0

1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Identified uses : Laboratory chemicals, Manufacture of substances

1.3 Details of the supplier of the safety data sheet

Company : Sigma-Aldrich Inc.
3050 SPRUCE ST
ST. LOUIS MO 63103
UNITED STATES

Telephone : +1 314 771-5765
Fax : +1 800 325-5052

1.4 Emergency telephone

Emergency Phone # : 800-424-9300 CHEMTREC (USA) +1-703-527-3887 CHEMTREC (International) 24 Hours/day; 7 Days/week

SECTION 2: Hazards identification**2.1 Classification of the substance or mixture**

Not a hazardous substance or mixture according to Regulation (EC) No 1272/2008.

2.2 Label elements

No hazard pictogram, no signal word, no hazard statement(s), no precautionary statement(s) required

Sigma- PZ0135

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the US and Canada

Page 1 of 10



Figura D.2: Ficha técnica PHA Milky-White obtenida de (Merck,2023)

Espectros PHA en literatura

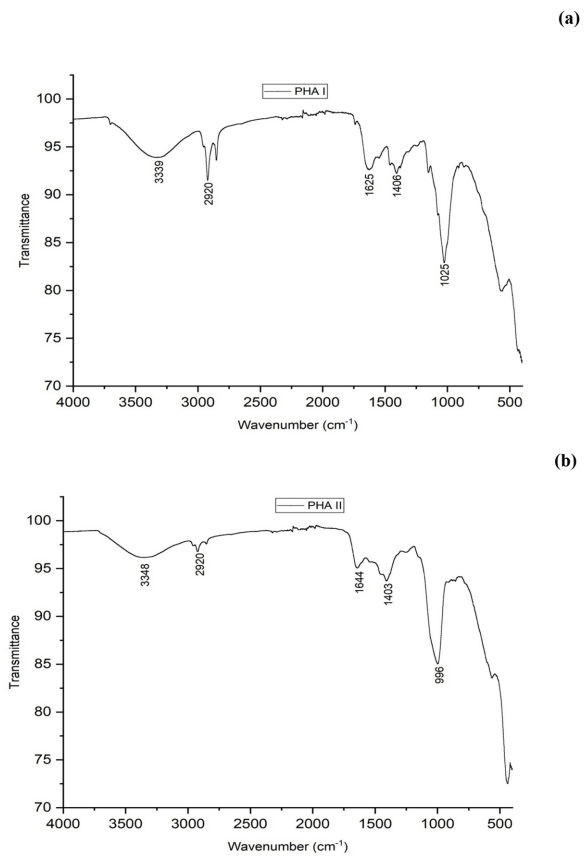
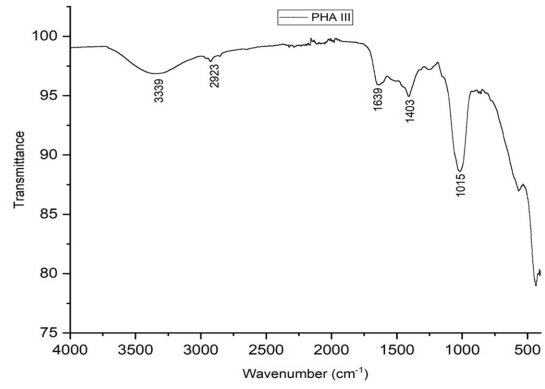


Figura E.1: Espectros PHA I y PHA II extraída de microalgas.
Fuente: (Roja et al., 2019)

(a)



(b)

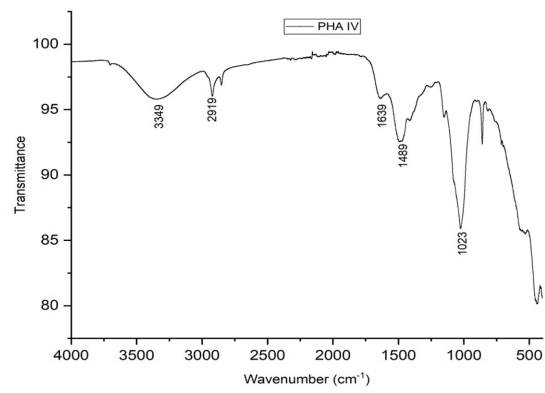


Figura E.2: Espectros PHA III y PHA IV extraída de microalgas.

Fuente: (Roja et al., 2019)