

Evaluación de extractos de raíz y fruto de la palma de iraca (*Carludovica palmata*) como fuentes de carbono para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA)

Paula Andrea Rueda Ruiz

Trabajo de Grado para Optar el Título de Química

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Doctor en Química

Codirector

Marlon Yesid Cáceres Ortiz

Doctor en Ciencias biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

A mi mamá y a mi hermana, por su amor, apoyo y compañía en este proceso.

Agradecimientos

A mi director William Hidalgo por confiar en mí, por su paciencia, por el ánimo que nos brindó en cada momento y por su compromiso y dedicación con todo su equipo de estudiantes, por contribuir en mi crecimiento personal y profesional compartiendo su conocimiento e introducirme a la ciencia.

A la escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander, al Grupo de Investigación de Bioquímica y Microbiología y al Grupo de Investigación de Bioquímica en Productos Naturales, por permitirme realizar mi investigación, brindarme su espacio y su colaboración en todo el proceso.

A mi mamá, por ser el motor diario de mi vida, por alentarme en mis momentos difíciles y ser mi principal apoyo y compañía en la realización de mis sueños. Por cada día hacerme ver la vida de una forma diferente y bonita y por siempre confiar en mí.

A mis amigos que durante estos años siempre estuvieron para mí, me llenaron de palabras de motivación y por compartir momentos agradables conmigo con su amistad incondicional.

A mis compañeros de laboratorio, por ser un impulso y compañía en la realización de este trabajo, sin duda cada uno de sus aportes fue indispensable para lograr condensar todo. Por las risas dentro y fuera del laboratorio, por acompañarme en esta formación y por los valiosos consejos y palabras de aliento y de amistad.

Finalmente, a mí por nunca rendirme. A la música, a Taylor Swift, a los libros y al arte por ser mi pasatiempo y ser mi polo a tierra cuando sentía que no podía, darme paz y llenarme de esperanza.

Tabla de contenido

Introducción	13
1. Objetivos	15
1.1 Objetivo general	15
1.2 Objetivos específicos.....	15
2. Marco teórico	16
2.1 Descripción general de los polihidroxicanoatos (PHA)	16
2.2 Propiedades físicas y químicas de los biopolímeros tipo PHA	18
2.3 <i>Carludovica palmata</i> (palma de iraca)	20
2.4 Microorganismos productores de PHA	23
2.5 Selección de fuentes de carbono para la síntesis de PHA	24
2.6 Vías biosintéticas de PHA	26
2.7 Enzimas involucradas en la síntesis de PHA.....	27
2.8 Degradación de PHA.....	29
2.9 Aplicaciones de los PHA.....	31
2.10 Perspectiva del futuro	33
3. Antecedentes	34
4. Metodología	37
Etapa 1: Obtención de los extractos de la raíz, hidrolizado de la raíz y triturado del fruto de la especie vegetal <i>Cardulovica palmata</i>	37
4.1 Materia prima	37
4.2 Preparación de la muestra de la especie vegetal <i>C. palmata</i>	37
4.2.1 Extracción acuosa de los metabolitos de la raíz de la especie vegetal <i>C. palmata</i>	37
4.2.2 Hidrólisis de los residuos de la raíz de la especie vegetal <i>C. palmata</i>	38
4.2.3 Maceración y trituración del fruto de la especie vegetal <i>C. palmata</i>	39

4.3 Determinación del contenido azúcares reductores totales en el extracto e hidrolizado de la raíz y del fruto de la especie vegetal <i>C. palmata</i>	39
4.3.1 Preparación del reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	39
4.3.2 Preparación de la curva patrón de Glucosa.....	39
4.3.3 Cuantificación de azúcares reductores totales	40
4.4.1 Preparación del reactivo de Bradford	40
4.4.2 Preparación de la curva patrón de Albúmina de suero bovino (BSA).....	40
4.4.3 Cuantificación de proteínas.....	40
Etapa 2: Obtención de biomasa microbiana y acumulación de PHA bacteriano	41
4.5 Preparación de medio de cultivo de crecimiento del microorganismo.....	41
4.6 Preparación de medio de cultivo de activación	41
4.7 Fermentación bacteriana.....	42
4.7.1 Preparación de medio de cultivo líquido mínimo en sales (MSM)	42
4.7.2 Curva de crecimiento del microorganismo utilizando glucosa, extracto e hidrolizado de raíz y fruto de la especie vegetal <i>C. palmata</i>	43
4.8 Obtención de la biomasa.....	43
Etapa 3: Identificación y cuantificación el tipo de monómero(s) del PHA producido como producto de la fermentación microbiana	44
4.9 Optimización de la reacción de derivatización en la determinación de monómero(s) de polihidroxialcanoatos (PHA).....	44
4.9.1 Optimización de la concentración del ácido como derivatizante [H ⁺ /MeOH]	44
4.9.2 Optimización del tiempo de la reacción de derivatización	45
4.9.3 Optimización de la temperatura de la reacción de derivatización	45
4.10 Análisis estadístico	45
4.11 Hidrólisis y derivatización del PHA bacteriano obtenido de la fermentación	46
4.12 Caracterización y cuantificación del biopolímero mediante GC/MS	47
4.13 Caracterización del biopolímero por espectroscopía infrarroja con transformada de fourier	47
5. Resultados y discusión	48

5.1 Etapa 1. Obtención de los extractos e hidrolizado de la raíz y fruto de la especie vegetal <i>C. palmata</i>	48
5.2 Etapa 2. Obtención de biomasa bacteriana y acumulación de PHA.....	50
5.3 Etapa 3. Identificación y cuantificación de PHB.....	52
5.3.1 Evaluación de las condiciones establecidas de la reacción de derivatización	52
5.3.2 Cuantificación de PHB producido por la bacteria PHA positiva utilizando la raíz y el fruto como fuente de carbono	55
5.3.3 Caracterización del biopolímero por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	58
6. Conclusiones	60
Referencias bibliográficas	61
Apéndices	79

Lista de Figuras

Figura 1. Formula química general de PHA: Poli(3-hidroxiacanoato).....	16
Figura 2. Esquema general de las vías metabólicas de la síntesis de PHA a partir de diferentes fuentes de carbono dentro de una célula bacteriana, y representación del proceso general de producción y extracción de PHA.	29
Figura 3. Mecanismo de reacción de hidrólisis catalizada/no catalizada de PHB	30
Figura 4. Reacción de la hidrólisis de la sacarosa.....	49
Figura 5. Curvas de crecimiento del aislado bacteriano C01 con extracto e hidrolizado de la raíz y el fruto de la especie vegetal <i>C. palmata</i> durante la fermentación en un medio de cultivo mínimo en sales durante 72 h	51
Figura 6. Perfil cromatográfico obtenido de la reacción de derivatización del patrón ácido 3-hidroxiacético con condiciones de 5% (v/v) H ⁺ /MeOH durante 7 minutos a 160 °C	54
Figura 7. Espectros de masas de los productos de la reacción de derivatización identificados en el perfil cromatográfico.....	54
Figura 8. Espectro de FTIR del biopolímero obtenido utilizando glucosa y el fruto de la especie vegetal <i>C. palmata</i> como fuente de carbono	59

Lista de Tablas

Tabla 1. Microorganismos productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas.....25

Tabla 2. Porcentaje de ácido 3-hidroxibutírico (PHB) presente en los extractos de biopolímero para cada fuente de carbono56

Lista de Apéndices

Apéndice A. Raíces y extracto de la especie <i>Cardulovica palmata</i>	79
Apéndice B. Soluciones patrón para la preparación de la curva de calibración del método DNS para determinar contenido de azúcares reductores.....	79
Apéndice C. Curva de calibración método DNS.....	80
Apéndice D. Absorbancias de las soluciones patrones obtenidas para la curva de calibración del método DNS.....	80
Apéndice E. Soluciones patrón para la preparación de la curva de calibración del método Bradford para determinar contenido de proteínas	80
Apéndice F. Curva de calibración método Bradford.....	81
Apéndice G. Absorbancias de las soluciones patrones obtenidas para la curva de calibración del método Bradford	81
Apéndice H. Escala de soluciones de MacFarland y curva de McFarland	81
Apéndice I. Absorbancias de los ensayos con glucosa, extracto e hidrolizado de la raíz y fruto de la especie vegetal <i>Cardulovica palmata</i> como fuentes de carbono para el crecimiento bacteriano en la fermentación durante 72 h	82
Apéndice J. Áreas y señales correspondientes del perfil cromatográfico de la optimización de las variables para la derivatización en la determinación de monómero(s) de polihidroxicanoatos (PHA)	82
Apéndice K. <i>Análisis estadístico</i>	83

Apéndice L. Áreas totales promedio de los picos generados de la curva de calibración para el ácido 3-hidroxibutírico.....	84
Apéndice M. Curva de calibración para el (S)-metil-3-hidroxibutirato	85
Apéndice N. Perfiles cromatográficos de la cuantificación del extracto de la raíz, hidrolizado de la raíz y fruto de la especie vegetal <i>Cardulovica palmata</i> (a) Extracto de la raíz, (b) Hidrólisis de la raíz y (c) Fruto.....	85
Apéndice O. Análisis estadístico ANOVA para el %PHB en cada fuente de carbono.....	86
Apéndice P. Espectros de masas teóricos de los monómeros identificados (NIST) para la identificación tentativa	86

Resumen

Título: Evaluación de extractos de raíz y fruto de la palma de iraca (*Carludovica palmata*) como fuentes de carbono para la producción de polihidroxicanoatos (PHA)***

Autor: Paula Andrea Rueda Ruiz**

Palabras clave: Biopolímeros, *Cardulovica palmata*, sustratos, microorganismos

Descripción: Los plásticos petroquímicos han sido los materiales más utilizados en las últimas décadas. Sus propiedades no renovables y no biodegradables han afectado el medio ambiente, la salud humana y la vida silvestre. Por años, se ha tratado de mejorar esta situación, sustituyendo los plásticos derivados del petróleo en polihidroxicanoatos (PHA). Estos son polímeros de origen biológico que tienen propiedades similares a los plásticos convencionales y tiene una amplia gama de aplicaciones industriales. La biomasa residual derivada de la agricultura se presenta como valiosa fuente de recursos renovables, fomentando la economía circular y nuevas oportunidades en el campo de los plásticos. Esta investigación, tuvo como objetivo producir PHB a partir de un aislado bacteriano PHA positivo (código C01), utilizando la raíz y el fruto de la especie vegetal *Cardulovica palmata* (palma de iraca) como fuente de carbono. La identificación y cuantificación de PHB, se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), determinando que la bacteria fue capaz de acumular el poli(3-hidroxicaproatato) (PHB) en 1,72, 1,89 y 2,83 (g L⁻¹), a partir del extracto de raíz, su hidrolizado, y del fruto, respectivamente. De lo anterior, es de resaltar la utilidad que puede llegar a tener el fruto de la palma de iraca, actualmente un residuo orgánico derivado del cultivo de palma de iraca, como fuente de carbono potencial para la producción de biopolímeros tipo PHB.

*Trabajo de Grado

**Facultad, de Ciencias. Escuela de Química. Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Título académico completo de mayor rango: Doctor en Química.

Abstract

Title: Assessment of root and fruit extracts of the iraca palm (*Carludovica palmata*) as carbon sources for the production of polyhydroxyalkanoates (PHA). ††*

Author(s): Paula Andrea Rueda Ruiz ††

Key Words: Biopolymers, *Cardulovica palmate*, substrates, microorganisms

Description: Petrochemical plastics have been the most widely used materials in recent decades. Their non-renewable and non-biodegradable properties have affected the environment, human health, and wildlife. For years, efforts have been made to improve this situation by substituting petroleum-derived plastics with polyhydroxyalkanoates (PHA). These are biologically sourced polymers that have properties similar to conventional plastics and have a wide range of industrial applications. Residual biomass derived from agriculture emerges as a valuable source of renewable resources, promoting the circular economy and new opportunities in the field of plastics. This research aimed to produce PHB from a positive PHA bacterial isolate (code C01), using the root and fruit of the *Cardulovica palmata* plant (iraca palm) as a carbon source. The identification and quantification of PHB were carried out using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS), determining that the bacteria were able to accumulate poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) at 1,72, 1,89, and 2,83 (g L⁻¹) from the root extract, its hydrolysate, and the fruit, respectively. It is noteworthy that the fruit of the iraca palm, currently an organic residue derived from iraca palm cultivation, can be potentially useful as a carbon source for the production of PHB-type biopolymers.

*Degree Work

††Faculty of Sciences. School of Chemistry. Chemistry. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Full academic title of highest rank: Doctor in Chemistry.

Introducción

La demanda de plásticos sintéticos derivados del petróleo ha tenido un enorme incremento en los últimos años debido a su estabilidad, practicidad y diversas aplicaciones. En todo el mundo se producen aproximadamente 187 millones de toneladas al año y se observan cantidades notables de estos polímeros, como el polietileno o el polipropileno, que se introducen en los ecosistemas como desechos (Izaguirre, 2020). La baja degradabilidad de estos materiales plásticos genera graves problemas de eliminación de residuos, que contaminan el medio ambiente terrestre y marino, con consecuencias en el calentamiento global, riesgo de salud y en la vida silvestre (MacLeod *et al.*, 2021). Esta contaminación plástica ha generado desafíos ambientales y económicos significativos, por eso, se han gestionado incontables investigaciones y desarrollos en maximizar la utilización de polímeros de origen biológico que generen menos impacto ambiental. Por consiguiente, una alternativa para reducir el impacto ambiental de los plásticos es reemplazar los polímeros convencionales derivados del petróleo por biopolímeros como los polihidroxicanoatos (PHA) (Sukan *et al.*, 2015).

Los polihidroxicanoatos (PHA) son biopolímeros sintetizados intracelularmente por organismos procariotas como fuente de carbono y energía, almacenada en gránulos en respuesta al estrés exógeno o a la limitación de nutrientes (Soares *et al.*, 2021), producidos por *Eubacteria* y *Archaea*, que han ganado interés a lo largo de los años como solución ecológica al problema de la contaminación por plásticos (Raza *et al.*, 2018). Desde 1974, se han llevado a cabo numerosas investigaciones con el objetivo de identificar nuevos monómeros de PHA dentro de la familia de estos poliésteres, incluyendo su caracterización y clonación de los genes asociados con la síntesis de estos biopolímeros (Alcântara *et al.*, 2020). En 1995, se reportaron 91 tipos distintos de monómeros, cifra que incrementó a 150 ácidos (*R*)-hidroxicanoatos registrados para el año 2020

(Choi *et al.*, 2020). Debido a sus grandes descubrimientos y sus propiedades mecánicas y termoplásticas abren las posibilidades de aplicaciones en diversas áreas, incluida la ingeniería, la agricultura, la tecnología de alimentos, la industria farmacéutica, y particularmente, la medicina y la farmacia (Delgado *et al.* 2015). Cabe resaltar su uso en películas agrícolas biodegradables y fertilizantes encapsulados que proporcionan una liberación controlada de nutrientes y se descomponen después de su uso, evitando la contaminación del suelo (Sintim *et al.* 2021). También en aplicaciones médicas debido a su alta biocompatibilidad como suturas, parches, implantes, ingeniería de tejidos y dispositivos de liberación controlada en medicamentos (Pradhan *et al.*, 2020). La versatilidad de estos biopolímeros hace de ellos un gran potencial para contribuir a la sostenibilidad y reducir el impacto ambiental.

Actualmente, las investigaciones de producción de PHA, van inclinadas a la reducción del costo de producción, métodos de menor contaminación para la extracción y modificación genética bacteriana para mejoramiento de producción en los microorganismos productores (Israni *et al.*,2020). El uso de especies vegetales como fuente de carbono puede representar una reserva de biomasa que se permite ver como un recurso y utilizarse para la generación de bioenergía renovable, así como para la síntesis de bioproductos con alto valor en el mercado (Bharathiaraja *et al.*,2017). Su naturaleza y composición como elementos nutritivos, carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, aceites, fibras, lignocelulosa y pigmentos (Panesar *et al.*,2015) hace a especies vegetales, como *Cardulovica palmata* (o comúnmente conocida como palma de iraca), prometedoras para su aprovechamiento de la biosíntesis de polihidroxialcanoatos debido a su alto contenido de carbono y, además contribuye a minimizar costos de la fermentación microbiana y reducir los contaminantes en la producción. Por lo tanto, en este trabajo tuvo como objetivo la evaluación de extractos de raíz y fruto de la palma de iraca como fuentes de carbono utilizable para

la producción de biopolímeros tipo PHA, optimizando su producción por microorganismos PHA positivos.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar los extractos de raíz y fruto de la palma de iraca (*Cardulovica palmata*) como fuentes de carbono potencial para la producción de biopolímeros tipo PHA.

1.2 Objetivos específicos

Obtener extractos acuosos de la raíz, el hidrolizado de la raíz y del fruto de la especie vegetal *Carludovica palmata*.

Evaluar los extractos acuosos obtenidos como fuente de carbono para la producción de PHA por microorganismos PHA positivos.

Identificar y cuantificar los monómeros constituyentes del PHA y tasa de producción experimental del biopolímero.

2. Marco teórico

2.1 Descripción general de los polihidroxicanoatos (PHA)

Los polihidroxicanoatos son biopolímeros tipo poliésteres de ácidos (*R*)-hidroxicanoicos, que son sintetizados por microorganismos como bacterias grampositivas y gramnegativas de al menos 75 géneros diferentes (González *et al.*, 2013). Estos polímeros se encuentran acumulados intracelularmente como inclusiones granulares en el citoplasma celular usados como material de reserva como fuente de carbono y energía, suele tener 0,2 a 0,5 μm de diámetro y su peso molecular varía entre 2×10^5 a 3×10^5 Da dependiendo del tipo de especie microbiana y de las condiciones de crecimiento de pH, las condiciones de fermentación y tipo y concentración de la fuente de carbono (Khanna *et al.*, 2005).

Los PHA's se clasifican por la cantidad de átomos de carbonos presentes en cada monómero, es decir, según la longitud de la cadena lateral: los de cadena corta (scl-PHA; *short chain length*) con 3 a 5 átomos de carbonos, característicos por ser rígidos y frágiles, los de cadena media (mcl-PHA; *médium chain length*) con 6 a 14 átomos de carbonos, característicos por ser elásticos, pero con poca fuerza mecánica, y los de cadena larga (lcl-PHA; *long chain length*) con 15 a más átomos de carbono, característicos por su resistencia mecánica y al calor, y transparencia (Giin-Yu Tan *et al.*, 2014; Anjum A *et al.*, 2016). La composición química de los PHA depende del sustrato utilizado, la enzima PHA-sintasa y de la ruta metabólica involucrada (Lemos *et al.*, 1998).

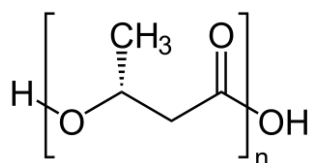


Figura 1. Formula química general de PHA: Poli(3-hidroxicanoato)

(Corrêa. M.S *et al.*, 2004)

Una molécula de PHA generalmente contiene entre 600 a 35000 unidades monoméricas de (*R*)-hidroxi-ácidos grasos. Cada unidad monomérica posee un grupo funcional en una cadena lateral *R*, que generalmente es un grupo alquilo saturado, pero también se pueden encontrar con grupos alquilo insaturados, grupos alquilo ramificados y grupos alquilo sustituidos, pero son más escasos (Jingnan Lu *et al.*, 2009). Dado que las enzimas biosintéticas son estereoespecíficas, todos los monómeros se encuentran en configuración *R*; también se han identificado monómeros *mcl*-PHA que presentan diversos grupos funcionales como grupos halógeno, hidroxilo, epoxi, ciano y carboxilo esterificado en la cadena (Ciesielski *et al.*, 2015).

El biopolímero de PHA más abundante y más estudiado es el polihidroxibutirato (PHB), es un PHA de cadena corta, sintetizado por diferentes bacterias y posee características similares al polipropileno. Debido a que el PHB es el polímero más estudiado, las propiedades de PHA se han desarrollado y explicado a partir de este (Gumel *et al.*, 2013).

El poli(3-hidroxibutirato), P(3HB) o PHB, se caracteriza por tener un grupo funcional metilo (-CH₃) y un grupo de enlace éster (-COOR); son estos grupos los responsables de sus propiedades como material termoplástico, hidrofóbico, de alta cristalinidad debido a su estereoespecificidad y de características frágiles, resistente a la degradación hidrolítica y baja permeabilidad al O₂, y su punto de fusión es 175 °C (Sudesh *et al.*, 2000). El peso molecular del P(3HB) producido por microorganismos como bacterias suele estar en el rango de 1 x 10⁴ a 3 x 10⁵ Da, con una polidispersidad (índice de dispersión) de aproximadamente 2. Es un material muy frágil, rígido, ópticamente puro con centro de simetría (Philip *et al.*, 2007). El PHB fue el primer PHA identificado en 1926 por Maurice Lemoigne en la bacteria *Bacillus megaterium* (Steinbüchel *et al.*, 2003), capaz de acumular hasta el 80% del peso seco celular (Wang *et al.* 2014).

En la actualidad, se ha informado que los PHA's pueden estar compuestos por una amplia variedad de componentes monoméricos, con estructuras rectas, ramificadas, saturadas, insaturadas y aromáticas. Esto sugiere una diversidad significativa en la composición química de los PHA's, producidos por más de 90 géneros de especies microbianas (Zinn *et al.*, 2001). La polimerización de los ácidos hidroxialcanoatos ocurre por la acción de las enzimas intracelulares mediante la condensación del grupo carboxilo del monómero con un grupo hidroxilo de otro, formando un enlace éster; llamándose biopoliésteres (Zhou *et al.*, 2023).

2.2 Propiedades físicas y químicas de los biopolímeros tipo PHA

Las propiedades físicas y químicas de los PHA varían según la composición del monómero, generalmente son insolubles en agua, y se caracterizan utilizando parámetros como hidrofobicidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea y grado de cristalinidad (Jacquel *et al.*, 2007). Estos biopolímeros exhiben una amplia variedad de propiedades mecánicas, desde cristalinas duras hasta elásticas. La biodegradabilidad es una característica notable del PHA, debido a que se obtiene de forma natural a partir de microorganismos, tienen la capacidad de descomponerse en agua y dióxido de carbono en un lapso de siete meses cuando se entierra en el suelo. Una amplia variedad de microorganismos que se encuentran en la naturaleza liberan enzimas que degradan el PHA, facilitando su descomposición en el entorno en componentes solubles en agua. Estos componentes luego pueden ser utilizados por los microorganismos como fuente de nutrición (Paduani *et al.*, 2020). Las propiedades del PHA se pueden describir con las propiedades de PHB, es decir, son insolubles en agua, enantiómeros (*R*), no son tóxicos después de sus tratamientos de extracción biocompatibles y presentan una alta tasa de polimerización con altos pesos moleculares de hasta siete millones de Dalton (Da). Estas propiedades son parámetros que determinan las propiedades mecánicas del polímero (Steinbüchel *et al.*, 2003). La propiedad más importante de estos polímeros

es la capacidad de degradación en diversos entornos, tanto aerobios y anaerobios, como el suelo, el agua de mar, el agua de lagos y lodos de depuradora, digestores y vertederos, esta degradación se debe a la influencia de factores como la población microbiana en un entorno determinado, la temperatura, el nivel de humedad, pH, nutrientes, composición, cristalinidad, aditivos y superficie del propio PHA (Rosa Turco *et al.*, 2021). Como el PHA es un polímero sólido de alto peso molecular, es incapaz de traspasar la pared celular de los microorganismos, varios de estos liberan extracelularmente despolimerasas de PHA que hidrolizan el PHA en oligómeros y monómeros solubles en agua, para ser usados como nutrientes dentro de la célula (Khanna *et al.*, 2005).

La mayoría de polihidroxialcanoatos son polímeros semicristalinos, por lo tanto, sus propiedades mecánicas y térmicas se presentan en términos de la temperatura de transmisión (T_g) o de la temperatura de fusión (T_m) (Julieth Y, 2010). Los scl-PHA en condiciones normales, son polímeros termoplásticos lo que permite ser moldeados con valores superiores de sus puntos de fusión, los mcl-PHA son altamente amorfos con un T_g entre -62 y -26 °C y T_m de 58 °C, por lo cual son elastómeros (Dan Kai and Xian, 2014). El homopolímero PHB desarrolla una alta cristalinidad ($>60\%$), lo que lo hace rígido y quebradizo. Las propiedades térmicas de los PHA dependen de la longitud de cadena del polímero y estos atributos afectan directamente las propiedades mecánicas del polímero. Las estructuras cristalinas de PHB y PHV al pertenecer al sistema cristalino ortogonal, presentan una estructura quiral con un alto grado de rotación óptica. Aunque el PHB muestra propiedades mecánicas similares a las de los plásticos convencionales como el polipropileno (PP), el desafío de su procesamiento por fusión para la fabricación de productos constituye uno de los principales obstáculos que limitan su uso extendido en aplicaciones de consumo general. A pesar de esta limitación del PHB de baja ductilidad, la adicción de

comonómeros, plastificantes, diversos polímeros y rellenos mejora significativamente su alargamiento y resistencia a la tracción al reducir la cristalinidad del polímero.

2.3 *Carludovica palmata* (palma de iraca)

La palma de iraca, también conocida como jipi-japa o toquilla es una especie que pertenece a la familia Cyclanthaceae, orden Pandanales, género *Carludovica*. Es un arbusto de hoja perenne similar a una palmera, crece hasta 3 a 4 metros de altura y se distribuye desde México hasta Bolivia. Se caracteriza por producir una fibra natural suave, flexible y duradera. Se utiliza especialmente en la elaboración de artesanías, siendo éstos los productos más valiosos derivados del cultivo de iraca, también se utiliza en techos como aislante térmico, en los sectores agroindustriales y alimenticios (Galviz *et al.*, 2019). La fibra de la palma de iraca es la más comercial, se fabrica en el norte de Ecuador y en el Sur de Colombia, se distingue el tradicional “sombrero de Panamá” y otros diseños como bolsos, canastos, aretes y collares (Muñoz *et al.*, 1999). Colombia es uno de los principales productores de iraca, y el departamento de Nariño es la principal región donde se encuentra la mayor parte de los cultivos de iraca (Muñoz *et al.*, 1999). En el 2017, Artesanías de Colombia reportó ventas por 24.500 millones de pesos, que en el 2019 ascendieron a 28.831 millones de pesos. Así mismo, Procolombia (agencia gubernamental) reportó en el 2017 que las exportaciones de artesanías fueron 35.9 millones de dólares con Japón, España y Perú como principales compradores. Además, en el sector intensivo en mano de obra, la industria manufacturera vincula en oficios artesanales alrededor de 120.000 personas de manera indirecta y a 350.000 personas que pertenecen a áreas y etnias (López, 2020). Además, del recurso de la fibra, se han utilizado los brotes foliares y las raíces como alimento y los frutos en decocción se usan como hemostático en caso de hemorragias, estas partes no tienen valor comercial y son consideradas un desecho; sin embargo, por el color intenso de los frutos, es una fuente promisoría de compuestos fenólicos,

generando beneficios en la cadena productiva de la planta en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmeceútica (Galviz *et al.*, 2019; Chizmar *et al.*, 2009). Los metabolitos primarios y secundarios representativos de la *C. palmata* están presentes de forma ubicua en la mayoría de los tejidos vegetales y en los procesos metabólicos de la planta que tienen funciones esenciales en su supervivencia (De la Rosa *et al.*, 2019). Sus características biológicas le confieren la capacidad de biodegradarse de manera que contribuye al medio ambiente permitiendo recuperar suelos, siendo un cultivo perenne, se siembra una vez y no requiere la adición de fungicidas, generando una disminución de ataques de plagas y enfermedades en cultivos, y se convierte en una opción para las comunidades campesinas e indígenas que buscan alternativas para la sustitución de cultivos ilícitos (Haas, 2016).

La raíz de la especie vegetal contiene metabolitos que le permite realizar funciones vitales, como la absorción de nutrientes, la defensa contra patógenos y la interacción con el entorno. Los compuestos orgánicos constituyentes de la raíz incluyen metabolitos primarios de bajo peso molecular (especialmente azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos) y metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides y terpenoides) (Liao *et al.*, 2023). Algunos son fitohormonas como las auxinas, citoquininas, giberelinas y ácido abscísico, que son reguladores del crecimiento y desarrollo de las raíces, en respuesta al estrés ambiental. Los compuestos fenólicos, comprenden funciones antioxidantes, antimicrobianas y protectoras. Los ácidos orgánicos como ácido málico, ácido cítrico, y ácido oxálico que están involucrados en el metabolismo energético y la regulación del pH. También, se encuentran compuestos nitrogenados como aminoácidos, péptidos y derivados de aminoácidos, que son esenciales para la síntesis de proteínas y otras biomoléculas, actuando como respuesta del estrés y la señalización. Los carbohidratos como almidón, glucosa, celulosa y fructosa que son importantes como fuente de energía y como precursores para la síntesis de otros

metabolitos. Los polisacáridos como pectinas y hemicelulosas, que representan roles estructurales y almacenamiento. Además, de terpenoides como esteroides y terpenos que regulan el crecimiento, la defensa contra patógenos y la atracción de polinizadores (Yang *et al.*, 2023). Las infrutescencias de iraca se caracterizan por su color intenso en su pulpa, color similar al de frutas de color rojo anaranjado, como naranjas y papayas. Este fruto se caracteriza por sus carotenoides que son pigmentos orgánicos liposolubles del grupo isoprenoides, responsables de sus colores. En este fruto se encuentran compuestos como carotenos que incluyen el β -caroteno, α -caroteno y el licopeno, que poseen propiedades antioxidantes y son precursores de la vitamina A. Las xantofilas incluyen la luteína, la zeaxantina y la criptoxantina (Moo-Huchin *et al.*, 2019). Un principal carotenoide secundario es la capsorrubina, que tiene la capacidad para neutralizar los radicales libres y proteger contra el estrés oxidativo. Además, de carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas con minerales como potasio, magnesio y fósforo y algunos fitonutrientes (Galviz *et al.*, 2019).

Los compuestos químicos mencionados de la raíz y del fruto de la *C. palmata* pueden ser potenciales como fuente de carbono y energía, y en la biosíntesis de moléculas para microorganismos productores de PHA. Entonces, especies vegetales, como *C. palmata* pueden ser factor clave para la producción de PHA debido al costo de la materia prima, lo que permite una reducción de costos y una gestión de residuos más efectiva y económica. Además, con la valorización de los biorecursos excedentes, económicos y renovables, para la biosíntesis de PHA (Obruca *et al.*, 2015). Por lo tanto, la utilización de fuentes de carbono económicas, como desechos orgánicos y subproductos agroindustriales, junto con estrategias de fermentación eficientes, se presenta como un requisito esencial para llevar a cabo investigaciones y producciones a gran escala de PHA.

2.4 Microorganismos productores de PHA

Actualmente, más de 300 microorganismos diferentes se han identificado como PHA positivos, sin embargo, solo un grupo pequeño de bacterias como *Curpriavidus necator* (*Ralstonia eutropha* o *Alcaligenes eutrophus*), *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Paracoccus denitrificans*, *Protomonas extorquens* y *Escherichia coli* son capaces de producir PHA para una producción a gran escala (Lee *et al.*, 1996).

El tipo de microorganismo seleccionado para la producción de PHA se determina por la capacidad de la célula para utilizar una fuente de carbono económica, actualmente se investigan los desechos agrícolas y subproductos industriales, entre otros, como el costo del medio, la tasa de crecimiento, la tasa de síntesis de polímeros, la calidad y cantidad de PHA y el coste de los procesos posteriores (Lee *et al.*, 2001).

Las bacterias productoras de PHA pueden clasificarse en dos grupos, según las condiciones de cultivo necesarias para la síntesis de PHA. El primer grupo de bacterias, requieren de limitaciones nutricionales esenciales como el nitrógeno, fósforo, magnesio o azufre para acumular PHA intracelularmente a partir de una fuente de carbono en exceso, como lo son *A. eutrophus*, *Protomonas extorquens* y *Protomonas oleovorans* (Soares *et al.*, 2021). El segundo grupo de bacterias, no requieren de limitaciones nutricionales para la síntesis de PHA, logrando acumular polímero durante el crecimiento, como *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* y *E. coli* (Pradhan *et al.*, 2020).

El microorganismo más estudiado ha sido la bacteria *R. eutropha* debido a su capacidad de acumular grandes cantidades de PHA, específicamente el P(3HB), representando aproximadamente el 80% del peso seco de la bacteria. Esta producción y acumulación se puede

realizar en un medio simple utilizando fuentes de carbono económicas como la glucosa, fructosa, ácido acético y residuos de industria oleica, agroindustrial, entre otras (Priyadarshi *et al.*, 2014).

2.5 Selección de fuentes de carbono para la síntesis de PHA

Para la optimización de la producción de PHA se puede maximizar mediante el uso de sustratos y desechos de bajo costo como fuentes de carbono, para aumentar la productividad y el rendimiento de PHA y sus copolímeros mediante diversas rutas de fermentación, o simplificando el proceso de producción utilizando microorganismos selectivos con características específicas (Adeleye *et al.*, 2020).

Se han desarrollado diferentes estudios sobre biomásas biodiversas sostenibles adecuadas para la síntesis de PHA. Estos emplean una variedad de materiales como fuentes de carbonos. Algunos materiales son: melaza, remolacha azucarera, azúcar de caña y melaza de soja (Verma *et al.*, 2002). Suero, soja y malta hidrolizados (Koller *et al.*, 2008). Materias primas lignocelulósicas como madera, xilosa, hidrolizados de hemicelulosa, trigo, entre otros (Tamer *et al.*, 1998). También grasas, aceites vegetales, aceites residuales, glicerol y aguas residuales (Shamala *et al.*, 2012).

La biomasa derivada de cultivos, bosques y madera tienen grandes cantidades de materiales lignocelulósicos después de su cosecha, es decir, contienen celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos constan de pentosas, manosas, galactosas, arabinosa y ramnosa, que son precursores para la síntesis de PHA (Naik *et al.*, 2010).

En la literatura, la fuente de carbono más simple y en mayor escala, es la sacarosa, que se ha encontrado con éxito para la producción de PHB (Kim *et al.*, 2004). Los almidones también son una fuente abundante de carbono, se ha demostrado que los residuos de almidón de patata sacarificado con limitación de fosfato producen PHB a gran escala (Haas *et al.*, 2008). Los

alcoholes son sustratos de carbono estéril que podrían reducir la contaminación, a partir de algunas bacterias metalotróficas y metanotróficas para la producción de PHB (Harding *et al.*, 2007).

En general, las fuentes de carbono pueden ser sacáridos (fructosa, maltosa, xilosa, arabinosa, etc), *n*-alcanos (hexano, octano, dodecano, etc), ácidos *n*-alcanoidos (ácido acético, ácido propiónico, ácidos butíricos, ácido valérico, ácido oleico, etc), *n*-alcoholes (metanol, etanol, glicerol, etc) y gases (metano y dióxido de carbono) (Anderson *et al.*, 1990). Estos estudios se complementan, con el análisis de la producción de PHB en diferentes colonias bacterianas con múltiples fuentes de carbono. Por ejemplo, una cepa de *Halomonas boliviensis* a la cual se le suministró hidrolizado de almidón como fuente de carbono, se logró una producción máxima de 56% (*p/p*) en comparación con el peso seco celular (Verlinden *et al.*, 2007). *Pseudomonas aeruginosa* posee la habilidad de hidrolizar ácidos grasos para la síntesis de PHA, al utilizar aceite de cocina usado como fuente de consumo primaria obteniendo una producción máxima de 66% (*p/p*) (Fernández *et al.*, 2005). Como también, el uso de aceite de palma usado y melaza para obtener una producción máxima de 57,4% (*p/p*) y 56,3% (*p/p*), respectivamente (Alias *et al.*, 2005 & Mercan *et al.*, 2005). Otras bacterias interesantes debido a que producen scl-PHA son *Pseudomonas fluorescens* al igual que las especies *Azohydromonas*, *Burkholderia* y *Cupriavidus*. Por ejemplo, *Azohydromonas lata* registró una producción de P3HB en una tasa de 50% a 88%, en comparación de su peso seco celular usando diferentes azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa (Soares *et al.*, 2021).

Tabla 1. Microorganismos productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas

Fuente de carbono	Microorganismo	Modo de fermentación	Contenido de PHA(%)	Referencia
Glucosa	<i>Pseudomonas mendocina</i> NK-01	Matraz de agitación	51,2	Wang <i>et al.</i> , 2016

	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 1317	Lote	52,0	He <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pseudomonas putida</i> Δ gcd (recombinante)	Alimentado por lotes	67,1	Pradhan <i>et al.</i> , 2020
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Lote	10,8	Rojas <i>et al.</i> , 2007
	<i>Escherichia coli</i> (mutante)	Lote	11,9	Wang <i>et al.</i> , 2012
	<i>Escherichia coli</i> K24KP (recombinante)	Lote aerobio	37,2	De Almeida <i>et al.</i> , 2010
	<i>Azohydromonas lata</i> IAM 12665	Lote	76,5-79,4	Gomez <i>et al.</i> , 1996
Bagazo de caña de azúcar	<i>Burkholderia sp</i>	Alimento por lotes	48,0	Lopes <i>et al.</i> , 2014
Vinaza de caña de azúcar	<i>Haloferax mediterranei</i>	Lote	70,0	Bhattacharyya <i>et al.</i> , 2012
Melaza	<i>Escherichia coli</i> (recombinante)	Lote	75,5	Saranya <i>et al.</i> , 2011
	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Lote	31,0-44,0	Beaulieu <i>et al.</i> , 1995
	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Estado sólido	39,0	Oliveira <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIM 2948	Lote	62,0	Tripathi <i>et al.</i> , 2012

2.6 Vías biosintéticas de PHA

Se han identificado diversas rutas metabólicas que aportan los monómeros para la síntesis de PHAs (**Figura 2**). Entre las vías más estudiadas y comúnmente encontradas en diferentes géneros bacterianos se encuentran la ruta de síntesis de poli(3-hidroxi-butirato), la β -oxidación y la síntesis de ácidos grasos (Stubbe y Tian, 2003).

En la ruta de síntesis de PHB (Vía I), los monómeros 3HB se generan mediante la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, para formar acetoacetil-CoA, reacción catalizada por la enzima β -cetotiolasa. Siguiendo, la enzima acetoacetil-CoA reductasa reduce el acetoacetil-CoA para formar 3-hidroxiacetil-CoA. Finalmente, la enzima PHA sintasa cataliza la polimerización a partir de la esterificación del 3-hidroxiacetil-CoA a PHB (Anjum *et al.*, 2016). La vía II es la β -oxidación de ácidos grasos. Esta ruta ha sido descrita en *Pseudomonas*, cuando las bacterias crecen con ácidos grasos como fuente de carbono. El intermedio de β -oxidación, *trans*-2-enoil-CoA, se convierte en (*R*)-hidroxiacil-CoA mediante una enoil-CoA hidratasa específica de (*R*) (Anjum *et al.*, 2016; Le Meur *et al.*, 2012). La vía III es la síntesis de ácidos grasos. La síntesis de PHAs es generada a partir de fuentes de carbono no relacionadas y simples, como la glucosa, sacarosa o fructosa, entre otras. Los intermediarios (*R*)-3-hidroxiacil provenientes de la vía biosintética de ácidos grasos son convertidos desde su forma proteica portado de acilo (ACP) a su forma CoA por acción de la enzima acil-ACP-CoA transacilasa (Anjum *et al.*, 2016; Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

Algunas bacterias del género *Pseudomonas* producen mcl-PHAs. Dependiendo de la naturaleza de la fuente de carbono, estas especies sintetizan mcl-PHAs por dos vías metabólicas centrales: la vía de síntesis de ácidos grasos (vía III), es decir, carbohidratos, y la β -oxidación (vía III) cuando la fuente de carbono es un ácido graso (Fontaine *et al.*, 2017).

2.7 Enzimas involucradas en la síntesis de PHA

Las tres principales enzimas que desempeñan el papel de síntesis, degradación y regulación de PHA son la acetil-CoA-acetiltransferasa (codificada por PhaA), la acetoacetil-CoA reductasa (codificada por PhaB) y la subunidad de PHA sintasa (codificada por PhaC) (Stubbe y Tian, 2003). PhaA traduce la enzima 3-cetotiolasa; aislada y estudiada en bacterias como *Azotobacter beijerinckii*, *Ralstonia eutropha*, *Zooglea ramigera* y *Rhizobium japonicum*. PhaB traduce la (*R*)-

3-ketoacetyl-CoA reductasa; también estudiada en bacterias tipo *Azotobacter beijerinckii*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Rhodomicrobium vannielii* y *Streptomyces coelicolor*. Para la síntesis de PHB, la enzima específica es la acetoacetyl-CoA reductasa; PhaC que es llamada PHA sintasa, PhaG que traduce (*R*)-3-hidroxiacetyl-CoA hidrolasa (Shahid *et al.*, 2021). Todas las enzimas utilizadas son enantioméricamente selectivas, es por esto que una de las características del PHA es su síntesis de solo el enantiómero *R*. La enzima PhaC se divide en cuatro grupos donde se diferencian por su estructura y por su especificidad de sustrato. La PHA sintasas de clase I tiene como microorganismo modelo *Ralstonia eutropha*, compuesto de solo una subunidad (PhaC), actúan sobre tioésteres CoA de varios scl-PHA (Rehm *et al.*, 2003). La clase II también se componen de una sola subunidad (PhaC) actuando sobre tioésteres CoA de varios mcl-PHA (Fukui *et al.*, 1998). La clase III son representadas por *Allochromatium vinosum*, y está conformado por dos subunidades (PhaC y PhaE) sintetizando scl-PHA. Por último, las sintasas de clase IV, se representan por el microorganismo *Bacillus megaterium* poseen dos subunidades (PhaC y PhaR) actuando sobre tioésteres CoA de scl-PHA (Tsuge *et al.*, 2005).

En relación con la elección de la colonia bacteriana, diversos factores pueden influir en las características y producción del PHA. Primero, el nivel de expresión de la enzima activa PHA sintetasa, a mayor concentración de esta enzima, menor será la masa molecular del biopolímero. Segundo, la presencia de enzimas capaces de degradar el PHA durante su síntesis, así como otras esterasas y lipasas. Si estas enzimas están ausentes, se producirán polímeros de mayor peso moléculas. Tercero, la actividad catalítica de la PHA sintetasa activa. Y cuarto, la ocurrencia de reacciones de transferencia de cadena. En general, la composición monomérica de estos poliésteres dependerá de la PHA sintetasa específica para cada especie y de los precursores de tioéster de hidroxiacetyl-CoA suministrados a la enzima, los cuales estarán determinados por la ruta metabólica

que opera en el microorganismo y su fuente de carbono externa (Alcântara *et al.*, 2020; Pradhan *et al.*, 2020).

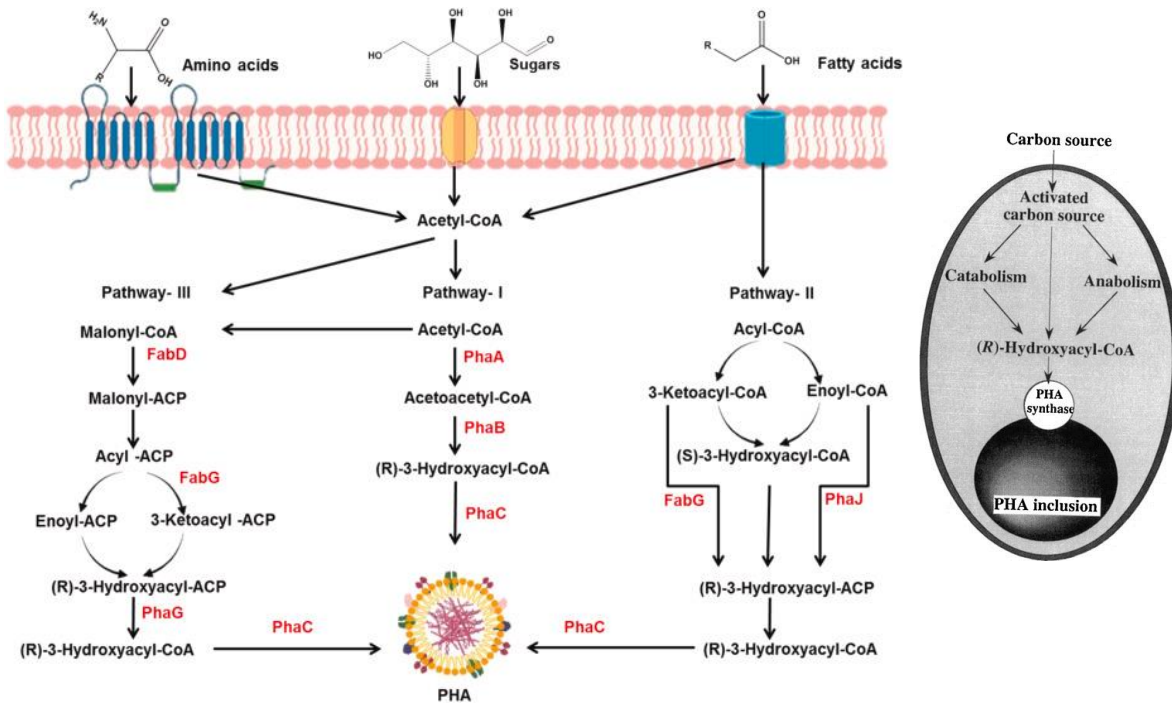


Figura 2. Esquema general de las vías metabólicas de la síntesis de PHA a partir de diferentes fuentes de carbono dentro de una célula bacteriana, y representación del proceso general de producción y extracción de PHA (Sudesh *et al.*, 2000 & Philip *et al.*, 2007).

2.8 Degradación de PHA

La principal ventaja de PHA radica en su capacidad de biodegradación. Esta característica se logra mediante la hidrólisis de los gránulos por microorganismos que utilizan estos polímeros como fuentes de carbono y energía. Este proceso se lleva a cabo a través de depolimerasas, enzimas secretadas por las células que se adhieren a la superficie del polímero y lo descomponen en unidades de monómeros individuales. El tiempo necesario para la degradación dependen de la composición intrínseca del polímero y de las condiciones ambientales a las que este expuesto. Se ha

observado que los PHA se degradan en una variedad de ambientes, incluidos los aerobios, anaerobios, salinos, marinos y otros (Ojumu, Yu & Solomon, 2004).

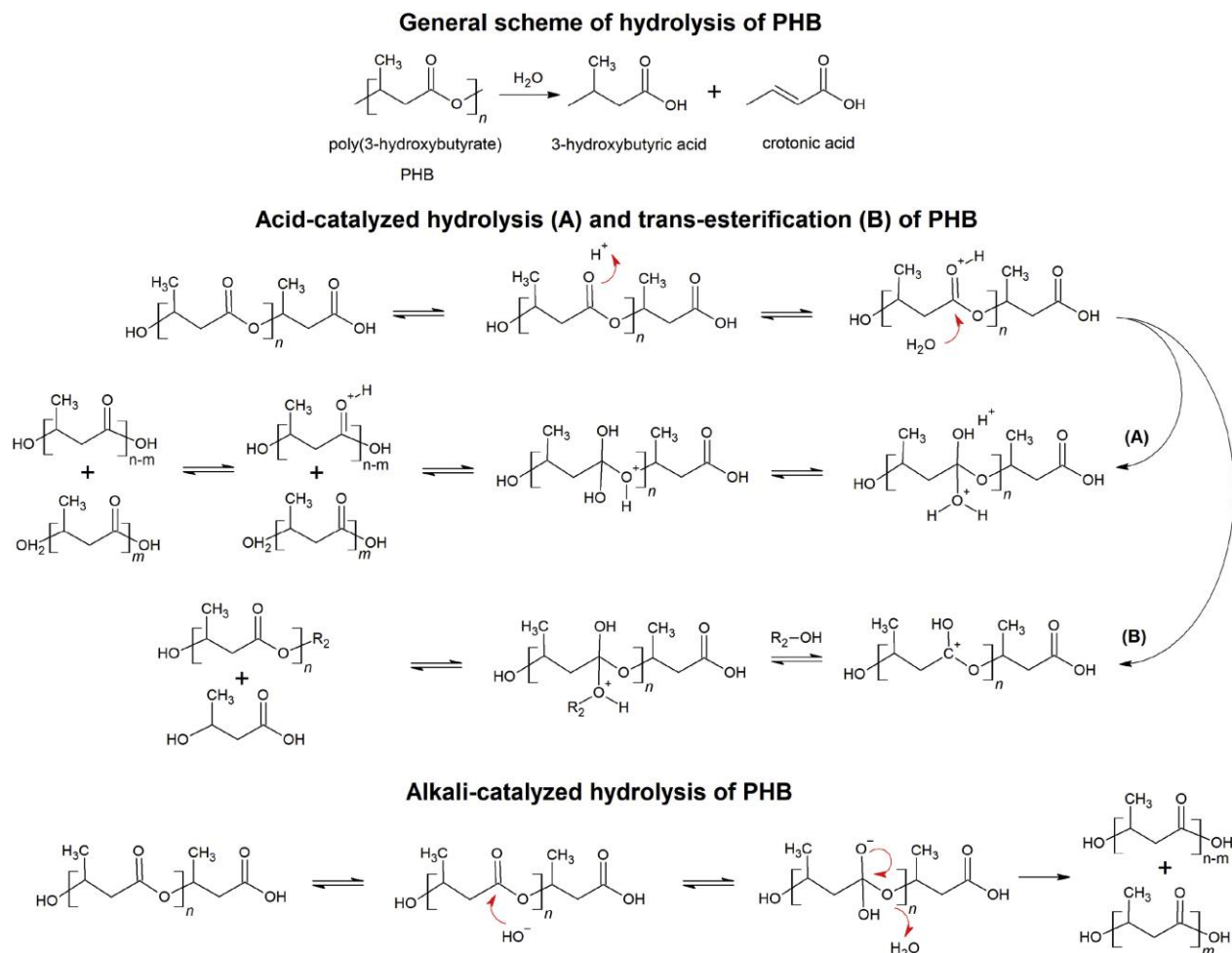


Figura 3. Mecanismo de reacción de hidrólisis catalizada/no catalizada de PHB (Rydz *et al.*, 2014)

Este proceso de degradación bien definido ocurre en presencia de agua, donde las moléculas de agua atacan los enlaces éster más débiles en la estructura del polímero (Renard *et al.*, 2007). Esto conduce a cambios rápidos en las propiedades del PHB, como el peso moléculas y la resistencia a la tracción, dependiendo de factores como la humedad, la temperatura, el pH y la presencia de catalizadores (Ashter *et al.*, 2016). Como se ha observado en investigaciones previas, la hidrólisis tiende a ocurrir preferentemente en los enlaces éster cercanos al extremo de las cadenas principales

del poliéster, dando como resultado la formación de oligómeros parcialmente solubles. Estos oligómeros pueden posteriormente fragmentarse en unidades monoméricas, como el ácido 3-hidroxi-butiranoico y ácido crotonico (Polyák *et al.*, 2017). La hidrólisis catalizada por ácido implica el ataque de protones de hidrógeno (H^+) y puede conducir a la transesterificación colateral mediante un ataque de H^+ a grupos carboxílicos u hidroxilo de los productos de degradación (Yu *et al.*, 2005). Esto resulta en una tasa de hidrólisis más baja en comparación con la hidrólisis catalizada por álcali. Por otro lado, la hidrólisis catalizada por álcali comienza con la extracción de hidrógeno del grupo $-COOH$ mediante un ataque de iones OH^- , lo que hace que la reesterificación sea termodinámicamente desfavorable. Como resultado, la hidrólisis catalizada por álcali muestra una tasa de hidrólisis más alta en comparación con la hidrólisis catalizada por ácido, con una relación directa entre la tasa de hidrólisis y la concentración de iones OH^- (Rydz *et al.*, 2014) (Figura 3).

2.9 Aplicaciones de los PHA

La producción de bioplásticos da una perspectiva a resolver el problema creciente de los residuos plásticos, así permitiendo disminuir el uso de combustibles fósiles y aumentando el uso sostenible de recursos en una economía circular.

Las propiedades del biopolímero permiten el uso en diversas industrias, siendo la más destacada la agricultura y la medicina. Generalmente, los scl-PHA como el PHB tienen poca resistencia a la tracción y propiedades de alta cristalinidad que pueden ser utilizados en utensilios y pajitas desechables (Eesaee *et al.*, 2022). La creciente demanda del plástico biodegradable significa que existe una amplia gama de mercados para el PHA.

En la aplicación médica, se ha reportado que el uso de PHA no tiene influencia tóxica ni provoca inflamaciones en el cuerpo humano, debido a su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad,

también por su alta flexibilidad estructural por la abundancia de monómeros. Principalmente, la aplicación esta inclinada a la administración de fármacos, la ingeniería de tejidos y los dispositivos médicos (Reddy *et al.*, 2022). Los mcl-PHA, como polihidroxitirato-co-valerato (PHBV) y polihidroxitirato-co-hidroxihexanoato (PHBHHX), se han utilizado como andamio para la regeneración de la piel, en ingeniería de tejido óseo y en la ingeniería de tejidos de cartílago, el polihidroxitirato-co-hidroxitirato (P3HB4HB) es un material amorfo y elastomérico, se puede aplicar en válvulas cardíacas y vasos sanguíneos. Se pueden elaborar agujas quirúrgicas, materiales de sutura, entre otros (Guo *et al.*, 2022).

Se ha investigado el potencial de los PHA para aumentar la captación de fármacos, por ejemplo, en la detección de células cancerosas (O'Connor *et al.*, 2013), han dado resultados con las células de cáncer de mama son capaces de adherirse al PHB mediante proteínas diana específicas, mientras que las células normales carecen de esta capacidad, por lo tanto, el PHA se puede emplear como nueva herramienta de detección del cáncer (Sabarinathan *et al.*, 2018).

Los PHA demuestran un rendimiento bueno contra el oxígeno, el agua y una degradabilidad completa (Nanda *et al.*, 2022). Siendo buenos productores de bolsas de plástico, paquete de alimentos, envases de cosméticos, pitillos, vasos, tapas, tenedores, utensilios, entre otros. También, se debe recalcar que es de gran interés debido a la gestión más sencillas del final de su vida útil, conduciendo a una economía circular y sostenible (Gupta *et al.*, 2022).

Por otro lado, el polietileno de alta densidad (HDPE) y el polietileno de baja densidad (LDPE) son los plásticos más convencionales para el acolchado y mantillo en la agricultura, causando contaminación del suelo debido a su terminación en los vertederos. Por esta razón, el PHA es buena alternativa para el acolchado y mantillo, siendo apropiado para la estructura del suelo, reteniendo el agua, previniendo la contaminación y beneficiando los cultivos (Sintim *et al.*, 2021). Su baja

permeabilidad al oxígeno, permite otras aplicaciones como formar películas y recubrimientos. También, las bolsas de crecimiento, beneficiando la baja toxicidad para el medio ambiente, un menos cambio en la deformidad de las raíces, permitiendo que las plantas crezcan más rápido y desarrollen una mejor inmunidad contra los patógenos (El-malek *et al.*, 2020). Siendo así, el PHA es apto para aplicaciones en la agricultura por su respeto al medio ambiente.

2.10 Perspectiva del futuro

Los bioplásticos, como el PHA, están siendo reconocidos como una alternativa para abordar estos problemas. Sin embargo, los altos costos de producción representan un desafío significativo para su adopción a gran escala en el mercado mundial de plástico. Se sugiere que este obstáculo podría superarse utilizando residuos como materia prima y optimizando el proceso de producción para aumentar los rendimientos y reducir los costos. Estas innovaciones son valiosas porque abren la puerta a un proceso de producción económicamente viable. Una comprensión más profunda de los mecanismos de producción y degradación de los PHA permitirá el diseño de plásticos adaptados a diversas necesidades industriales. La amplia variedad de PHA con diferentes propiedades ofrece una flexibilidad única que les permite acceder a varios segmentos de mercado. Se enfatiza la importancia de investigar métodos de extracción a gran escala para aplicaciones industriales. El uso de PHA jugará un papel importante en la reducción de desechos plásticos, la promoción de recursos sostenibles, la versatilidad en aplicaciones y la mitigación del cambio climático, contribuyendo así a la creación de un sistema de circuito cerrado en una economía circular. Abordar las limitaciones de los PHA producidos a partir de residuos requerirá un enfoque multifacético, incluido una mayor investigación sobre métodos de extracción para mejorar la pureza y calidad de los PHA (Zhou *et al.*, 2023).

3. Antecedentes

Ciesielski y colaboradores (Ciesielski *et al.*, 2015), determinaron que los aceites vegetales como sustratos son prometedores para la producción de polihidroxialcanoatos, es decir, crear biopolímeros bacterianos, recuperando y utilizando como materia prima aceites vegetales crudos y de desecho, que son difíciles de eliminar. Algunos de estos aceites, son el aceite de soja, el aceite de palma y el aceite de maíz, dando lugar a un rendimiento teórico en la producción de PHA a partir de ácidos grasos de 0,65 g/g, mientras que el rendimiento teórico en la producción de PHA a partir de glucosa oscila entre 0,30 y 0,40 g/g (Chanprateep, 2010). Su uso como alternativa se debe a que los aceites vegetales incluyen ésteres complejos de glicerina y ácidos monocarboxílicos, por lo que son óptimos sustratos para la producción de bioplásticos mediante fermentación microbiana.

Mozejko y colaboradores (Mozejko *et al.*, 2011), encontraron que la cepa perteneciente a la especie *Pseudomonas*, es capaz de producir el 21% de mcl-PHA con aceite de canola, encontrando que la composición monomérica de los poliésteres era el 3-hidroxi octano (3-HO) y el 3-hidroxi decano (3-HD), también el aceite de palma saponificado ha demostrado que la cepa fue capaz de sintetizar hasta el 48% del mcl-PHA. Además de la especie *Pseudomonas*, se probó *Comamonas testosteroni* para producir mcl-PHA a partir de aceites como el aceite de ricino, aceite de coco, aceite de semilla de algodón, aceite de mostaza, aceite de oliva y aceite de sésamo. Por observación final, el proceso de producción de PHA a partir de aceites vegetales se puede hacer más eficiente utilizando las partes de las plantas, para el desarrollo y optimización de nuevas estrategias de fermentación y nuevos métodos de recuperación de productos.

Wendy y colaboradores (Wendy *et al.*, 2022), exploraron la producción y caracterización de polihidroxibutirado (PHB) utilizando glicerol residual como fuente de carbono por parte de *Burkholderia cepacia* BPT1213. Este proceso implicó el control y la regulación de las condiciones

de cultivo y fermentación, así como el análisis del PHB mediante cromatografía de gases (GC), extracción y purificación del PHB, y su caracterización mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Es crucial controlar la concentración de glicerol suplementado en el sistema, ya que esto afecta las propiedades finales del PHB. Se observó que la cepa *B. cepacia* pudo alcanzar el mayor rendimiento de biomasa con concentración de glicerol del 3% (v/v). Se sugiere considerar la producción de copolímeros por parte de *B. cepacia* para mejorar su potencial como bacteria productora de PHA.

Tyagi y colaboradores (Tyagi *et al.*, 2021), estudiaron la producción de polihidroxibutirato (PHB) por *Parapedobacter* ISTM3 aislado de la cueva de Mawsmi utilizando melaza como fuente de carbono, caracterizando el biopolímero mediante GC-MS, FT-IR, NMR y TEM, y se optimizó el rendimiento de PHA producido. Obteniendo un rendimiento de PHA del 55,62% utilizando un 5% de melaza como fuente de carbono. Según los resultados el uso de sustratos de carbono residual para la producción de PHA es un candidato útil para la producción de PHA a gran escala, siendo un enfoque rentable y sostenible para ser una alternativa a los problemas ambientales debido a la alta acumulación del plástico.

Jung y colaboradores (Jung *et al.*, 2023), analizaron la producción de polihidroxibutirato (PHB) a partir de melaza de caña de azúcar como fuente de carbono, que es un sustrato económico y no contaminante para el medio ambiente, rico en contenido de carbono en forma de azúcares, utilizando la cepa *Priestia sp*, YH4. Primeramente, se determinaron las condiciones óptimas de cultivo para la producción de PHB a 30°C, pH 7,5, en presencia de 4% (p/v) de melaza, 6% (v/v) de inóculo y 7% (p/v) de NaCl. Además, los experimentos se realizaron sin y con proceso de esterilización en el medio de caldo marino (MB), dando como resultado que la ausencia de este proceso no tuvo impacto en la producción de PHB usando YH4 debido a la alta salinidad, concluyendo que evitar la esterilización, disminuye el costo de producción. Así que, la melaza de

caña de azúcar sirvió como sustituto tanto de los medios, como de la fuente de carbono que contiene macronutrientes, oligoelementos y fuentes de nitrógeno (Kiselev *et al.*, 2022).

Ribero y colaboradores (Ribero *et al.*, 2022), evaluaron el proceso de extracción del PHB a partir del microorganismo *Bacillus megaterium* B2 utilizando como fuente de carbono residuos provenientes de la agroindustria de cacao. Evidenciando que el ultrasonido fue el método de extracción más amigable con el medio ambiente y rentable, presentando la menor pérdida de biomasa. Se utilizaron solventes como hipoclorito de sodio, dodecilsulfato sódico y etanol, los cuales demostraron una eliminación eficaz de los restos celulares, con un porcentaje de recuperación del polímero del 34,59% cercano al 41,37% obtenido en la extracción utilizando solventes clorados. La optimización de la extracción reveló un porcentaje de pureza del PHB un 99,58%. Finalmente, el biopolímero se caracterizó por FTIR, DSC, TGA y por MALDI-TOF confirmando la identidad como polihidroxibutirato.

Moreno y colaboradores (Moreno *et al.*, 2015), se estudiaron las cepas de *Bacillus megaterium* de tipo salvaje con la capacidad de acumular PHB utilizando glicerol crudo procedente de la producción de biodiesel como única fuente de carbono. Se utilizaron diseños compuestos centrales y de Plackett-Burman para optimizar las condiciones de cultivo, y se determinó que la temperatura (34 °C) y las concentraciones de glicerol (7,6 g L⁻¹) y Na₂HPO₄ (3 g L⁻¹) son variables clave. Se logró aumentar significativamente la producción de PHB, con un aumento del 48% en matraces agitados y del 314% en biorreactores, en comparación con las condiciones iniciales. Esto sugiere el potencial de *B. megaterium* para la producción económica de PHB utilizando glicerol crudo como fuente de carbono.

Ospina y colaboradores (Ospina *et al.*, 2022), investigaron el uso de aguas residuales de la industria de producción de levadura (WWY) para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA), empleando cultivos microbianos mixtos, que incluía un reactor anaeróbico y dos aeróbicos. Se

produjeron ácidos grasos volátiles (AGV) en un reactor anaeróbico, mientras que bacterias productoras de PHA se enriquecieron en un reactor de secuenciación. Luego, se utilizó un reactor para producir PHB a partir de inóculo enriquecido y el efluente del reactor anaeróbico. Se logró una acumulación máxima de PHB del 17% con un rendimiento de 1,2 g de PHB/L utilizando el efluente destilado. El análisis de la comunidad microbiana reveló la presencia dominante de especies bacterianas productoras de PHA. Estos resultados muestran un enfoque sostenible para la producción de PHA con tasas de acumulación prometedoras y menos susceptibles a la contaminación que los métodos tradicionales.

4. Metodología

Etapa 1: Obtención de los extractos de la raíz, hidrolizado de la raíz y triturado del fruto de la especie vegetal *Cardulovica palmata*

4.1 Materia prima

Las plántulas y los frutos de *C. palmata* fueron enviados por el grupo de investigación en Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (**Apéndice A**)

4.2 Preparación de la muestra de la especie vegetal *C. palmata*

4.2.1 Extracción acuosa de los metabolitos de la raíz de la especie vegetal *C. palmata*

La metodología fue basada por la propuesta de Salem et al., (2017) para ser adaptada para el estudio realizado con algunas modificaciones. Primeramente, se cortaron las raíces en trozos pequeños y se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido (para la conservación de los componentes de la especie vegetal) hasta obtener un triturado fino y sin pedazos de raíz muy grandes. Esto se realizó en un periodo corto y con poca luz preferiblemente, para evitar la degradación de los metabolitos extraídos de la raíz. Se pesó 150 gramos de la muestra de raíz en tubos Falcon y se agregó 300 mL de agua tipo I. Seguidamente, se agitaron los tubos Falcon que

contenían la muestra vegetal y el agua tipo I, en el vórtex para que el tejido vegetal se homogenizara; después se trasladaron los tubos Falcon a un baño ultrasónico por 20 minutos a 25°C (manteniendo la temperatura constante utilizando hielo en el baño de agua), para la aceleración de la disolución y dispersión de sólidos y emulsificación. Luego, se centrifugó durante 10 minutos a 6000 rpm. Finalmente, se recolectaron los sobrenadantes y se evaporó el solvente recolectado mediante un roto-evaporador (Marca HEIDOLPH HEI-VAP, Blamis, Colombia) configurado a 35 °C y 20 mbar. Finalmente, obtenido el extracto hidrosoluble de la raíz, se almacenaron las muestras en el congelador a una temperatura de -30 °C hasta su posterior análisis (AU – Salem *et al.*, 2017).

4.2.2 Hidrólisis de los residuos de la raíz de la especie vegetal *C. palmata*

Adicionalmente, con los residuos triturados de la raíz de la especie vegetal *C. palmata*, se realizó una hidrólisis de este material vegetal para el rompimiento y liberación de polímeros vegetales para obtener monómeros que fueran aprovechados por el microorganismo. Esto se realizó agregando 300 mL de solución de ácido clorhídrico HCl al 1% (v/v) a 150 gramos de raíz recolectado anteriormente, en un vaso precipitado de 500 mL. Luego, se llevó a calentamiento a 80°C y en agitación por 1 hora. Finalizada la hora de calentamiento, se dejó enfriar y se filtró con papel filtro cualitativo, el solvente se recolectó, se centrifugó durante 10 minutos a 6000 rpm y finalmente, se evaporó el solvente recolectado mediante un roto-evaporador (HEIDOLPH HEI-VAP, Blamis, Colombia) configurado a 35 °C y 50 mbar para permitir la evaporación del mismo y reunir todo el extracto sólido y seco de la raíz de la especie vegetal, y pesarlo. Una vez pesado el extracto de la hidrólisis sólido y seco de la raíz, se almacenaron en el congelador a una temperatura de -30 °C hasta su posterior análisis.

4.2.3 Maceración y trituración del fruto de la especie vegetal *C. palmata*

Las muestras de fruto fueron trituradas y maceradas en un mortero con nitrógeno líquido (para la conservación de los componentes de la especie vegetal) hasta obtener un triturado fino y sin pedazos de fruto muy grandes. Esto se realizó en un periodo corto y con poca luz preferiblemente, para evitar la degradación de los compuestos del fruto, y se almacenaron en el congelador a una temperatura de -30 °C hasta su posterior análisis.

4.3 Determinación del contenido azúcares reductores totales en el extracto e hidrolizado de la raíz y del fruto de la especie vegetal *C. palmata*

4.3.1 Preparación del reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Se preparó el reactivo DNS con 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 150 g de tartrato de Na-K y 8 g de hidróxido de sodio (NaOH). Primero, se disolvió el NaOH en 200 mL de agua destilada y se agregó el tartrato de Na-K lentamente y en agitación. Se completó con agua destilada hasta 400 mL y se agregó el ácido 3,5-dinitrosalicílico. Se dejó en agitación por 12 horas y se completó a un volumen final de 500 mL con agua destilada, y se filtró posteriormente (Gil *et al.*, 2006).

4.3.2 Preparación de la curva patrón de Glucosa

Se preparó una solución estándar de glucosa (1 g/500 mL) para la preparación de los patrones posteriormente (**Apéndice B**). A cada solución patrón se le agregó 250 µL de reactivo DNS, incluido al blanco, y se llevaron a calentamiento en baño maría a 100°C por 5 minutos, luego se dejaron enfriar las soluciones en un baño maría con hielo por 5 minutos. Se agregó 2,5 mL de agua destilada a cada solución patrón y se sometieron a proceso de agitación. Finalmente, se registró las medidas de absorbancias para cada muestra de solución patrón en un espectrofotómetro a una longitud de onda 540 nm y se construyó la curva de calibración (**Apéndice C**). Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado técnico (Nuñez *et al.*, 2012).

4.3.3 Cuantificación de azúcares reductores totales

Se pesó 1 mg de muestra y se disolvió en 250 μ L de agua tipo I. Se trabajó con los mismos parámetros anteriores: 250 μ L de muestra, 250 μ L de reactivo DNS y 2,5 mL de agua tipo I en un tubo de ensayo. Se determinó la concentración de los azúcares reductores presentes en el extracto de la raíz con la curva de calibración expresada en microgramos por miligramos de muestra (Nuñez *et al.*, 2012). Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra.

4.4 Determinación del contenido de proteínas en el extracto e hidrolizado de la raíz y del fruto de la especie vegetal *C. palmata*

4.4.1 Preparación del reactivo de Bradford

Se preparó el reactivo de Bradford con 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 y se disolvieron en 50 mL de Etanol al 95% (v/v). Se agregaron 100 mL del ácido fosfórico al 85% (v/v), y se llevó a un volumen final de 1 L con agua destilada.

4.4.2 Preparación de la curva patrón de Albúmina de suero bovino (BSA)

Se prepararon las soluciones de los patrones de una solución de trabajo de BSA (0,1 mg/mL), y se completaron los volúmenes con una solución Buffer fosfato (0,1 M, pH 7) (**Apéndice E**) y se agregó 2500 μ L de reactivo de Bradford. El blanco consistió en 250 μ L de Buffer fosfato (0,1, pH 7) y 2500 μ L de reactivo de Bradford. Finalmente, se registró la absorbancia para cada muestra de solución patrón en un espectrofotómetro a una longitud de onda 595 nm y se construyó la curva de calibración (**Apéndice F**) (Kruger, 2009).

4.4.3 Cuantificación de proteínas

Se pesó 1 mg de muestra y se disolvió en 250 μ L de Buffer fosfato, y se trabajó con los mismos parámetros anteriores: 250 μ L de muestra y 2500 μ L de reactivo de Bradford en un tubo de ensayo. Se determinó la concentración de proteínas presentes en el extracto de la raíz con la curva de

calibración expresado en microgramos por miligramos de muestra fresca (Kruger, 2009). Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra.

Etapa 2: Obtención de biomasa microbiana y acumulación de PHA bacteriano

4.5 Preparación de medio de cultivo de crecimiento del microorganismo

La colonia de bacterias PHA positiva a trabajar fueron aisladas de muestras de suelo húmedo, cerca de árboles de gran tamaño y de característica no arcillosa en el departamento de Santander (actualmente en proceso de identificación por secuenciación del gen 16S ribosomal). Este aislado bacteriano se repicó en un medio de cultivo sólido Luria Bertani (LB), el cual fue preparado utilizando agua tipo I, a un pH de 7 a 7,2, calentando hasta ebullición para completar la homogenización y se esterilizaron en autoclave. Posteriormente, se agregaron a cajas Petri, dejándolas enfriar y solidificar. Finalmente, se sembraron por agotamiento de estría con un asa bacteriológica y se incubaron a 29,5 °C por 72 h. Después, se verificó que no hubiera ningún tipo de contaminación. Los experimentos con microorganismos se llevaron a cabo en una cabina de flujo laminar con esterilización UV para tener un ambiente libre de contaminación con extra de filtración absoluta.

4.6 Preparación de medio de cultivo de activación

Teniendo en cuenta las instrucciones que plantea Arcos et al., (2004), se preparó un medio de activación para el aislado bacteriano PHA positivo a trabajar, en nuestro estudio, asignado con código C01. El medio de cultivo de activación contenía peptona 17 g/L, glucosa 2g/L, NaCl 5 g/L y K₂HPO₄ 2,5 g/L. Estos compuestos se pesaron en un vial de vidrio con tapa, seguida de su esterilización en una autoclave (JP Inglobal, JPA40LH/DE/220V 60Hz/40L, Colombia). Al finalizar la esterilización, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó una colonia de bacteria C01 con un asa bacteriológica desde el medio solido LB al medio liquido de activación. Este vial

se dejó incubar por 24 h a 29,5 °C y 150 rpm (Arroyave *et al.*, 2013). Posterior a este tiempo, se cuantificó la concentración del inóculo a agregar al medio de fermentación mediante la escala de McFarland (McFarland, 1907), la cual fue basada comparando la turbidez de las diferentes disoluciones de BaCl₂ y H₂SO₄ midiendo su absorbancia a 595 nm (**Apéndice H**). Pasadas las 24 horas, se agregó 200 µL del medio de cultivo de activación (blanco) y 200 µL de inóculo que contenía los microorganismos de estudio, en una placa de 96 pozos de fondo plano midiendo en un espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm, donde la absorbancia obtenida por las colonias bacterianas activas se les restó el valor dado por el medio de cultivo de activación sin colonias bacterianas (blanco) para así obtener densidad óptica absoluta. Posteriormente, se prepararon las disoluciones respectivas con agua tipo I y estéril hasta obtener una concentración cercana a la escala de 2 McFarland, el cual es equivalente a una concentración celular de 6×10^8 unidades formadoras de colonias por unidad de volumen en mL (*UFC/mL*) (Arcos *et al.*, 2004).

4.7 Fermentación bacteriana

4.7.1 Preparación de medio de cultivo líquido mínimo en sales (MSM)

Se pesaron en un Erlenmeyer de 250 mL las respectivas sales y reactivos que contiene el medio de cultivo mínimo de sales (1,0 g/L (NH₄)SO₄, 1,5 g/L KH₂PO₄, 9 g/L Na₂HPO₄, 0,2 g/L MgSO₄·7H₂O, 1 mL/L de solución de metales(FeSO₄·7H₂O, ZnSO₄·7H₂O, MnSO₄·5H₂O, CaCl₂·2H₂O, CuSO₄·5H₂O), y 10 g/L de la fuente de carbono (extracto e hidrolizado de la raíz y fruto de la especie vegetal *C. palmata*). Se agregó 100 mL de agua tipo I se calentó en una plancha de calentamiento para homogenizar y en agitación, y finalmente se esterilizó en una autoclave (JP Inglobal, JPA40LH/DE/220V 60Hz/40L, Colombia).

Después de enfriar los medios de cultivo MSM, se les agregó 1 mL del medio activador preparado y ajustado a 2 McFarland anteriormente, a cada 100 mL de medio de cultivo líquido

contenido en un Erlenmeyer de 250 mL, este se dejó incubar durante 72 horas a 29,5 °C y 150 rpm en una Shaker incubadora (JP inglobal, Orbital Digital JPSHID40, Colombia) (Riedel *et al.*, 2015).

4.7.2 Curva de crecimiento del microorganismo utilizando glucosa, extracto e hidrolizado de raíz y fruto de la especie vegetal *C. palmata*

Se determinó el crecimiento del aislado bacteriano PHA positivo (código C01) con las diferentes fuentes de carbono a trabajar, cada 4, 8, 24, 48, 56 y 72 horas de fermentación bacteriana, tomando alícuotas de 200 µL en una microplaca de 96 pozos (fondo plano), en cada punto de tiempo y midiendo la densidad óptica (a 595 nm) en un lector de microplacas Multiskan go (Thermo Fischer Scientific, Vantaa-Helsinki, Finlandia) (Riedel *et al.*, 2015).

4.8 Obtención de la biomasa

Terminadas las 72 horas de fermentación, se procedió a separar la biomasa del medio de cultivo. Para ello, se traspasó cada muestra a tubos Falcon de 50 mL y se procedió a centrifugar durante 10 minutos a 6000 rpm. Después, se retiró el sobrenadante y la biomasa obtenida fue separada y resuspendida con agua tipo I, para luego, centrifugar nuevamente. Este procedimiento se repitió tres veces. El pellet bacteriano obtenido fue transferido a un tubo Falcón de 15 mL, previamente pesado para tener el total de la biomasa obtenida por cada 100 mL de medio de cultivo de mínimo de sales en fermentación. Se almacenó la biomasa en el congelador a una temperatura de -20°C hasta su posterior análisis (Riedel *et al.*, 2015).

Adicional, se tomó 100 mg de biomasa que se agregó a una caja Petri de 30 mm previamente pesada, donde se dejó secar la biomasa por 24 horas en un horno a 60 °C. Pasado este tiempo, la muestra se retiró del horno y se colocó en un desecador hasta temperatura ambiente. El procedimiento anterior se realizó por triplicado.

Etapas 3: Identificación y cuantificación del tipo de monómero (s) del PHA producido como producto de la fermentación microbiana

Para la cuantificación del PHB se realizó mediante una curva de calibración utilizando un patrón de ácido 3-hidroxi-butírico (Merck) empleando cloroformo como disolvente. Para el análisis, fue necesario derivatizar el patrón, ajustando la metodología reportada por Guillermo et al. (2020) y Pravesh et al. (2019). Las variables de estudio para determinar las condiciones apropiadas de reacción fueron tiempo, temperatura y concentración del ácido en solución de metanol, para determinar los productos con mejoramiento de la eficiencia del análisis, aumentando la detectabilidad de los analitos.

4.9 Optimización de la reacción de derivatización en la determinación de monómero(s) de polihidroxicanoatos (PHA)

4.9.1 Optimización de la concentración del ácido como derivatizante [H⁺/MeOH]

Se inició la optimización variando la concentración del derivatizante que contenía ácido sulfúrico y metanol, con concentraciones del 1, 3 y 5 % (v/v) de H⁺/MeOH. Brevemente, a 3 mg de compuesto ácido 3-hidroxi-butírico (Merck) se disolvió en 1 mL de cloroformo (99%) (Merck) y 1 mL del agente derivatizante. La reacción se llevó a cabo en un vial estándar de vidrio de reacción G10, el cual se introdujo en el reactor de microondas (Monowave 200, Anton Para, Austria) por 5 minutos a 160 °C. Posteriormente, se adicionó 1 mL carbonato de sodio 6% (p/v), se retiró la solución y se agregó 1 mL de carbonato de sodio 3% (p/v) para neutralizar el exceso de ácido sulfúrico. El tubo fue sometido a agitación durante 10 minutos utilizando un agitador Vortex entre cada ciclo de lavado, este procedimiento fue repetido 10 veces más. Luego, se descartó la fase acuosa, y de la fase orgánica donde contiene el extracto de los productos generados de la reacción, se tomaron 50 µL y se adicionaron a 950 µL de cloroformo (grado analítico), se filtró la solución

resultante en un filtro PTFE (0,22 μm) y se transfirió a un vial ámbar (1,5 mL) para su posterior análisis por GC/MS (Guilherme *et al.*, 2020). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4.9.2 Optimización del tiempo de la reacción de derivatización

Una vez determinada la concentración más apropiada del derivatizante a utilizar, se procedió a evaluar el tiempo de reacción siguiendo la metodología descrita en la sección anterior (Sección 4.9.1), evaluando la reacción a 3,5 y 7 minutos (con base en las recomendaciones del manual de instrucciones del fabricante del equipo). Los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 160 °C y utilizando el agente derivatizante a la concentración determinada previamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4.9.3 Optimización de la temperatura de la reacción de derivatización

Finalmente, determinada la concentración del derivatizante y el tiempo más apropiados, se procedió a evaluar la temperatura de reacción siguiendo la metodología descrita en la Sección 4.9.1, evaluando la reacción a 120, 140 y 160 °C (con base en las recomendaciones del manual de instrucciones del fabricante del equipo) y utilizando las variables óptimas determinadas previamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4.10 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para el análisis estadístico de datos con el fin de determinar diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos realizados, con un nivel de confianza del 95%. Previo al análisis de varianza, se verificó que los datos cumplieran con los supuestos estadísticos (homocedasticidad y normalidad), por lo tanto, la prueba de homogeneidad de varianzas (Levene's test, $p > 0,05$) y prueba de distribución normal de los datos (Shapiro-Wilk) fueron aplicados. Aquellos casos que no cumplieron los supuestos estadísticos, se aplicó transformación logarítmica (\log_{10}) al conjunto de datos y se evaluaron los

criterios nuevamente. Un análisis de Kruskal-wallis fue aplicado para aquellos análisis que no cumplieron las condiciones del método paramétrico. Los datos fueron analizados utilizando el software Statgraphics Centurion18 (2010 StatPoint Technologies, Inc, Estados Unidos de América) (**Apéndice J**).

4.11 Hidrólisis y derivatización del PHA bacteriano obtenido de la fermentación

La metodología reportada por Guillermo et al. (2020) y Pravesh et al. (2019) fue acondicionada y utilizada para el análisis del PHB obtenido. Brevemente, se pesó 100 mg de muestra de pellet bacteriano en un tubo Falcón de 15 mL, se agregó 1 mL de agua tipo I, se agitó en el Vortex, luego se colocó en baño ultrasónico por 10 minutos a 25 °C. Posteriormente, se agregó 1 mL de cloroformo (99%), se agitó en el Vortex, luego se colocó en baño ultrasónico por 10 minutos a 25 °C. Posteriormente, se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 6000 rpm; lo que resultó en la separación de dos fases: la fase acuosa y la fase orgánica, y residuos celulares. Se eliminó la fase acuosa y la biomasa, y se recolectaron 600 µL de la fase orgánica (que contenía el PHB extraído), se transfirió a un vial estándar de vidrio de reacción G10, y se completó con 400 µL de cloroformo (grado analítico). Luego, se añadió 1 mL de derivatizante compuesto de ácido sulfúrico al 5% (v/v) en metanol. La reacción se llevó a cabo en un reactor de microondas (Monowave 200, Anton Para, Austria) durante 7 minutos a 160 °C (según las condiciones de reacción determinadas en la **Sección 4.9**). Pasada la reacción, se agregó 1 mL carbonato de sodio 6% (p/v), se retiró la solución y se agregó 1 mL de carbonato de sodio 3% (p/v) para neutralizar el exceso de ácido sulfúrico. El tubo fue sometido a agitación durante 10 minutos utilizando un agitador Vortex entre cada ciclo de lavado, repitiéndolo 10 veces. Finalmente, se agregó 100 µL de la muestra derivatizada en un vial de vidrio y 100 µL de cloroformo (99%), luego se tomó 50 µL de la muestra diluida y se agregó a

un vial ámbar (1,5 mL) que previamente contenía 950 μL de cloroformo (grado analítico), para su posterior análisis por GC/MS (Guilherme *et al.*, 2020 & Pravesh *et al.*, 2019).

4.12 Caracterización y cuantificación del biopolímero mediante GC/MS

Se realizó una curva de calibración usando como patrón el ácido 3-hidroxibutírico (99%, Merck) empleando cloroformo (grado analítico) como disolvente. Se realizaron seis puntos con concentraciones en el rango de 10 a 60 $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

El cromatógrafo de gases usado fue 7890B de la marca *Agilent Technologies* con una columna capilar apolar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) acoplado a un espectrofotómetro de masas 5977B de la misma marca; flujo de 1 mL min^{-1} de helio (99% pureza), inyección de muestra 1 μL , en modo splitless con una temperatura inicial de 35 $^{\circ}\text{C}$ y con una rampa de temperatura de 10 $^{\circ}\text{C/min}$ hasta llegar a 250 $^{\circ}\text{C}$. Se utilizó el software *Masshunter Qualitative Analysis* (Versión B,07,00)x para el análisis químico y los espectros de masas fueron comparados con los reportados por la base de datos NIST MS Search para la identificación química de PHB producido por el asilado bacteriano C01 (Guilherme *et al.*,2020).

4.13 Caracterización del biopolímero por espectroscopía infrarroja con transformada de fourier

Una pequeña cantidad de la muestra (≈ 1 mg) fue ubicada en el módulo ATR (reflexión total atenuada), en un espectrómetro infrarrojo (JASCO FT/IR-4X, Japón) con un rango espectral de 4000-400 cm^{-1} para el registro de los espectros IR e identificar las frecuencias que representan los grupos funcionales característicos del biopolímero.

5. Resultados y discusión

5.1 Etapa 1. Obtención de los extractos e hidrolizado de la raíz y fruto de la especie vegetal

C. palmata

La extracción de la raíz produjo un extracto hidrosoluble seco de 3,054 g con rendimiento de extracción del 2,0%. Estos resultados están influenciados por diversos factores, como la relación muestra vegetal/solvente, el método de preparación, el tiempo y la temperatura de extracción, así como las condiciones específicas de la muestra vegetal (Panca *et al.*, 2019). En el proceso de la hidrólisis de la raíz, cuyo propósito es romper enlaces químicos específicos en el material vegetal y liberar componentes de interés (Shirato *et al.*, 2006), se obtuvo 3,688 g de extracto seco (hidrolizado) a partir de la misma cantidad de muestra de raíz, con un rendimiento de extracción de 2,5%. Para el fruto, no se llevó a cabo ningún procedimiento adicional a la trituración y maceración.

La hidrólisis de los metabolitos de la raíz, como carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos orgánicos, fitohormonas y compuestos fenólicos, entre otros. Cuando estas moléculas se sometieron a hidrólisis se descomponen en sus componentes más simples. Por ejemplo, los carbohidratos, se pudieron hidrolizar en azúcares más simples como glucosa y fructosa; las proteínas en aminoácidos; los lípidos en glicerol y ácidos grasos, y los ácidos orgánicos pudieron liberar protones y iones asociados. Este proceso puede ser catalizado por enzimas específicas, que aceleraron la reacción de hidrólisis. La reacción de hidrolisis es un proceso químico en el que la molécula se divide en dos o más fragmentos mediante la adición de una molécula de agua. Este proceso implica la ruptura de un enlace químico mediante la adición de un ion hidroxilo (-OH) a uno de los átomos de la molécula y un ion hidrógeno (H^+) al otro átomo. Por ejemplo, la hidrólisis de una molécula de sacarosa (disacárido) en agua produce glucosa y fructosa como productos, esta

reacción es catalizado por la enzima sacarasa, que rompe el enlace glucosídico entre la glucosa y la fructosa en la sacarosa (Sun *et al.*, 2021 & Liu *et al.*, 2022).

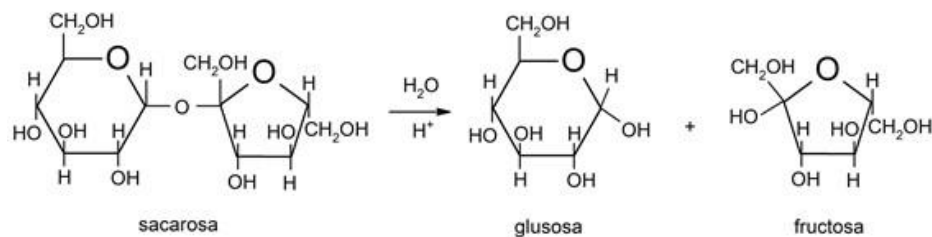


Figura 4. Reacción de la hidrólisis de la sacarosa

El método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) se utilizó para medir azúcares con propiedades reductoras generadas por la presencia de grupos carbónicos (C=O) (Gusakov *et al.*, 2011). La determinación de azúcares reductores presentes en el extracto e hidrolizado de la raíz y el fruto de la *C. palmata* se realizó mediante una curva de calibración con estándar de glucosa, la cual nos arrojó una ecuación de la recta para la regresión $y = 0,0039x + 0,0629$ y un coeficiente de determinación $R^2 = 0,999$ (**Apéndice C**), donde y es la absorbancia de la muestra y x es la concentración, y se determina despejando la variable de concentración en función de la absorbancia. Este valor cercano a 1 sugiere una relación lineal entre la absorbancia y la concentración (variables), confirmando el grado de relación entre las variables es alto (Skoog *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos revelaron concentraciones de $339,6 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de azúcares reductores por muestra seca del extracto de la raíz, $158,7 \pm 0,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de azúcares reductores por muestra seca en la hidrólisis de la raíz y $27,44 \pm 0,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de azúcares reductores por muestra seca en el fruto. Lo anterior muestra que los sustratos que se usaron como fuentes de carbono contienen una cantidad de azúcares reductores adecuados y aprovechables para la biosíntesis de PHA por el microorganismo (Martínez, 2018).

El método Bradford se utilizó para medir proteínas presentes en el extracto e hidrolizado de la raíz y fruto de la *C. palmata*, mediante la curva de calibración con estándar de BSA con una ecuación de la recta para la regresión $y = 0,0254 x + 0,6948$ y el coeficiente de determinación $R^2 = 0,9956$ (**Apéndice F**). Los resultados obtenidos revelaron concentraciones de $1,22 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas por muestra seca del extracto de la raíz, $1,04 \pm 0,9 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas por muestra seca en la hidrólisis de la raíz y $2,03 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas por muestra seca del fruto. Lo anterior muestra que los sustratos contienen proteínas que pueden servir como fuente de nitrógeno y otros nutrientes esenciales para el microorganismo durante la fermentación (Wang *et al.*, 2023). Por lo tanto, conocer la composición de azúcares y proteínas en las muestras proporcionó información crucial sobre la disponibilidad de nutrientes en el medio de fermentación, lo que permite optimizar las condiciones para una producción eficiente de PHB.

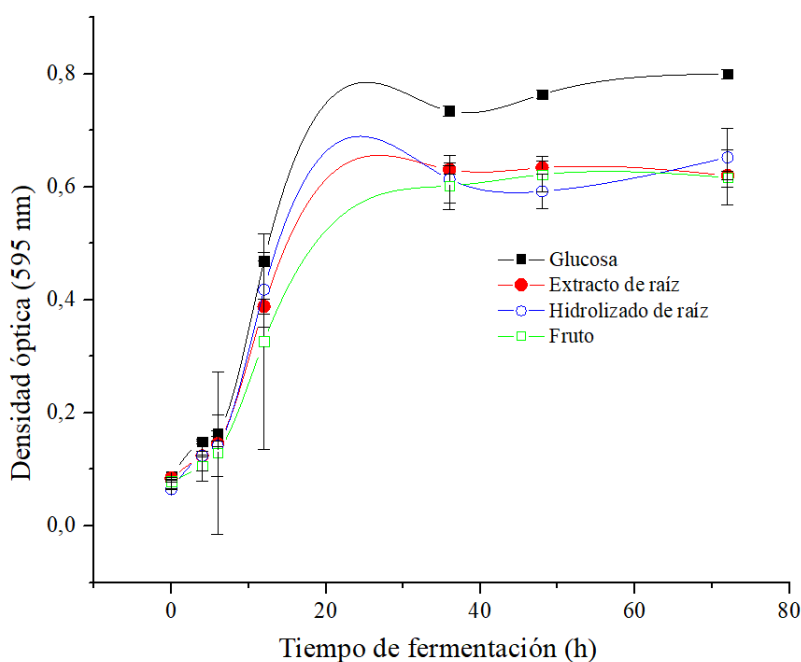
5.2 Etapa 2. Obtención de biomasa bacteriana y acumulación de PHA

Como la fuente de carbono comparte la mayor parte del presupuesto de la fermentación microbiana, es inevitable identificar la mejor fuente de carbono para mejorar la eficiencia del proceso de fermentación. En este estudio, se examinaron varias fuentes de carbono (extracto e hidrolizado de la raíz y fruto de la especie vegetal *C. palmata*) para mejorar la producción de PHB. Estos fueron comparados con la curva de crecimiento del microorganismo utilizando glucosa como fuente de carbono (control de crecimiento). La glucosa potencia el crecimiento de los microorganismos y su actividad metabólica durante los procesos de fermentación, debido a su eficiencia y disponibilidad como sustrato natural (Sanchez *et al.*, 2002). Se observó que todas las fuentes de carbono utilizadas generaron crecimiento por el aislado bacteriano PHA positivo (código C01), con la glucosa como control de crecimiento representando un porcentaje de crecimiento del 100%, se obtuvo que el fruto proporcionó el mejor crecimiento, alcanzando un 95%, seguido por

el hidrolizado con un 93% y en último lugar, el extracto, con un porcentaje de crecimiento del 86%. Estos porcentajes de crecimiento fueron presuntivos con las absorbancias medidas (**Apéndice I**).

Estos resultados evidencian la capacidad del asilado bacteriano (código C01) para metabolizar los compuestos hidrocarbonados presentes en los sustratos evaluados en el proceso de la fermentación, proporcionando suficiente carbono y energía para la síntesis de PHB. Además, el equilibrio adecuado entre azúcares y proteínas en el medio de fermentación es esencial para maximizar la producción de PHB. Idealmente, estas fuentes de carbono son económicamente viables y fácilmente disponibles en grandes cantidades. Esto ayuda a reducir los costos de producción y hace que el proceso sea más rentable a escala industrial, conduciendo a una alta producción de PHB por sustrato consumido (Andler *et al.*, 2024).

Figura 5. Curvas de crecimiento del aislado bacteriano C01 con extracto e hidrolizado de la raíz y el fruto de la especie vegetal *C. palmata* durante la fermentación en un medio de cultivo mínimo en sales durante 72 h



5.3 Etapa 3. Identificación y cuantificación de PHB

5.3.1 Evaluación de las condiciones establecidas de la reacción de derivatización

Los resultados de los perfiles cromatográficos indicaron que la reacción de derivatización con las condiciones apropiadas fueron con una concentración del 5% (v/v) de ácido sulfúrico en metanol, con un tiempo y temperatura de reacción de 7 minutos a 160 °C (**Figura 6**). Para esta determinación, se analizaron las intensidades y las áreas de las tres señales de los productos relevantes de la reacción en el perfil cromatográfico (**Apéndice J**). Además, se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) al conjunto de datos y este análisis arrojó un valor-P menor que 0,05, lo que indica una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza (**Apéndice K**).

En la **Figura 7** se muestran los compuestos identificados como productos de la reacción de derivatización del ácido 3-hidroxibutírico. El primer compuesto (1) identificado con una similitud (score) según la base de datos (NIST MS Program) de 61,1%, es el (*E*)-2-butenato de metilo ($t_R = 1,928$ min), también llamado metil crotonato es un compuesto orgánico sintético, monómero en la síntesis de biopolímeros y copolímeros para la fabricación de materiales plásticos, adhesivos y recubrimientos (Lucrezi *et al.*, 2014). Se forma típicamente a través de una deshidratación intramolecular del ácido β -hidroxibutírico. Esta deshidratación es una reacción química en la que se elimina una molécula de agua de una molécula de ácido β -hidroxibutírico, produciendo el ácido crotonico. La reacción suele llevarse a cabo en presencia de un agente deshidratante, como el ácido sulfúrico y se puede catalizar mediante calor (Carey *et al.*, 2013). En su espectro de masas se identifica su masa del ion molecular m/z 100, esta masa concuerda bien con la formula molecular del compuesto identificado, y el fragmento m/z 69 ion pico base ($-C_4H_5O^+$), que pudo ser formado a partir del ion molecular, debido a la pérdida de un fragmento ($-CH_3O^+$).

El segundo compuesto (2) identificado con una similitud (score) según la base de datos (NIST MS Program) de 91,1%, es el (*R/S*)-metil-3-hidroxitirato ($t_R = 2,997$ min), también llamado 3-hidroxitirato de metilo, pertenece a la familia de ésteres de hidroxialcanoatos, capaz de ser polimerizado mediante procesos biotecnológicos para formar polihidroxialcanoatos (PHA). Es utilizado como componente reactivo en la formación de enlaces químicos en polímeros, también es un metabolito importante en el metabolismo de los lípidos y carbohidratos, componente clave de la cetosis, donde el cuerpo utiliza cetonas como el β -hidroxitirato como fuente de energía alternativa de la glucosa (Otero *et al.*, 2013). En su espectro de masas se identifica su masa del ion molecular m/z 118, esta masa concuerda bien con la fórmula molecular del compuesto identificado, y el fragmento m/z 43 ion pico base ($-C_2H_3O^+$) que pudo ser formado a partir del ion molecular, debido a la pérdida de un fragmento ($-C_3H_5O_2^+$).

El tercer compuesto (3) identificado con una similitud (score) según la base de datos (NIST MS Program) de 96,9%, es el ácido (*R*)-3-hidroxitirico, éter metílico, éster metílico ($t_R = 3,461$ min) o también llamado, 3-metoxitiranoato de metilo, es un monómero en la síntesis de polímeros, su grupo éster ($-COOCH_3$) y su grupo metoxi ($-OCH_3$) en su estructura lo hacen útil para la polimerización y formación de polímeros con propiedades específicas para la industria de materiales, recubrimientos, adhesivos, dispositivos biomédicos, entre otros (Füchtenbusch *et al.*, 1996). En su espectro de masas se identifica su masa del ion molecular m/z 132, esta masa concuerda bien con la fórmula molecular del compuesto identificado, y el fragmento m/z 59 ion pico base ($-C_2H_3O^+$) que pudo ser formado a partir del ion molecular, debido a la pérdida de un fragmento ($-C_4H_9O_3^+$).

Se determinaron que las señales correspondientes al (*R/S*)-metil-3-hidroxitirato y al 3-metoxitiranoato de metilo presentan la mayor intensidad, planteando como una posible hipótesis

la presencia mayoritaria en los biopolímeros extraídos con las fuentes de carbono de trabajo. Los compuestos presentes se identificaron presuntivamente con la información complementaria obtenida de los espectros de masas reportados en la literatura, usando las bases de datos espectrales (NIST) (**Apéndice L**). Dando en grado de similitud (coincidencia >80%) con el ion molecular y el pico base.

Figura 6. Perfil cromatográfico obtenido de la reacción de derivatización del patrón ácido 3-hidroxi-butírico con condiciones de 5% (v/v) H⁺/MeOH durante 7 minutos a 160 °C

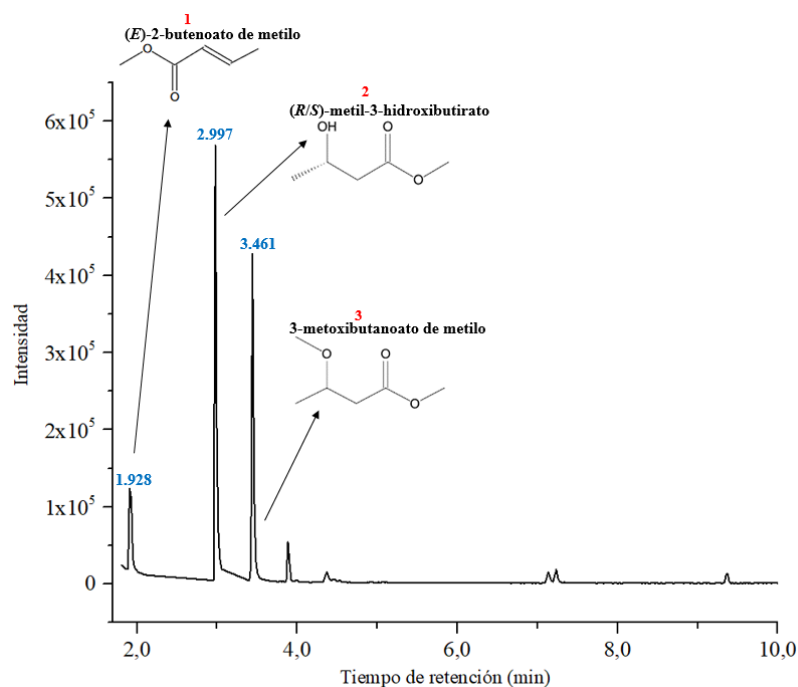
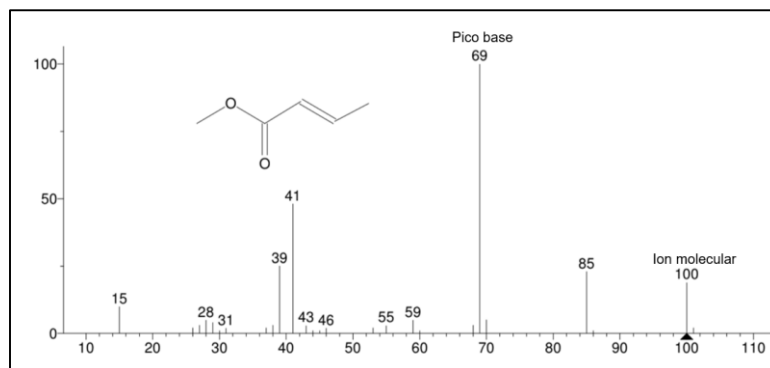
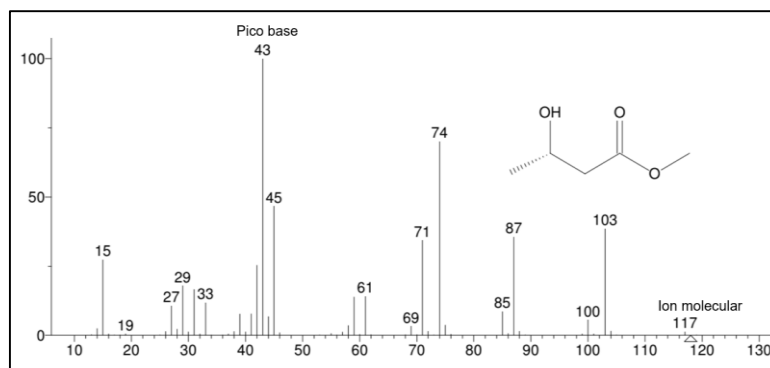


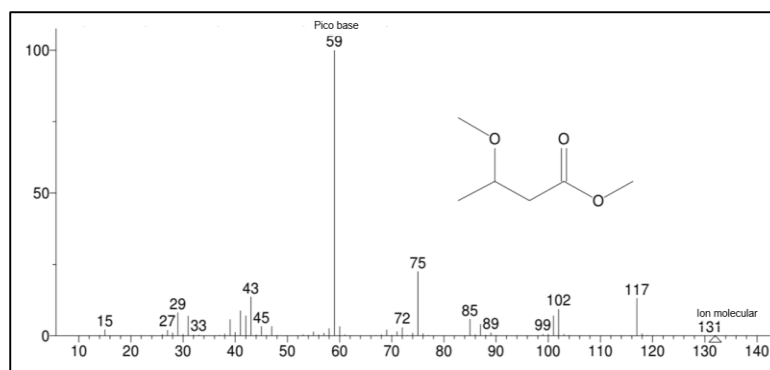
Figura 7. Espectros de masas de los productos de la reacción de derivatización identificados en el perfil cromatográfico



Espectro de masas del (*E*)-2-butenato de metilo



Espectro de masas del metil-3-hidroxitbutirato



Espectro de masas del 3-metoxibutanoato de metil

5.3.2 Cuantificación de PHB producido por la bacteria PHA positiva utilizando la raíz y el fruto como fuente de carbono

Una vez determinadas las condiciones favorables para la derivatización del ácido 3-hidroxitbutírico e identificación de los productos generados, se procedió a cuantificar el PHB presente en cada muestra de extracto e hidrolizado de la raíz y fruto de la especie vegetal *C. palmata* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) empleando una curva de calibración ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) del ácido 3-hidroxitbutírico, con un $R^2 = 0,9903$ y una ecuación de la recta $y = 15872 x + 27755$ (**Apéndice M**). Es importante destacar que la técnica de GC/MS no es una técnica para una cuantificación precisa de compuestos en una muestra. Sin embargo, al combinarla

con técnicas de preparación de muestras adecuadas y calibración cuidadosa, la técnica es válida para mejorar la precisión y exactitud de mediciones cuantitativas. Algunos estudios, dan validación de la posibilidad de resultados cuantitativos precisos y confiables mediante el uso de estrategias adecuadas, junto con la optimización de las condiciones de cromatografía, para lograr mediciones cuantitativas precisas. Aun así, con sus limitaciones, se logró obtener una curva de calibración precisa y con ello su cuantificación del PHB (Smith *et al.*, 2018 & Zhang *et al.*, 2019). Los resultados para las concentraciones utilizadas en micromoles por mililitros ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) para la curva de calibración para el ácido 3-hidroxibutírico se muestran en el **Apéndice K**.

Tabla 2. Porcentaje de ácido 3-hidroxibutírico (PHB) presente en los extractos de biopolímero para cada fuente de carbono

Muestra	<i>Concentración de 3PHB</i>			Resultado [$\mu\text{mol mL}^{-1}$] ($\langle x \rangle \pm \Delta x$)	$\mu\text{mol 3HB /mg}$ muestra seca ($\langle x \rangle \pm \Delta x$)	%Acumulación de PHB	[g L^{-1}]
	Replica 1	Replica 2	Replica 3				
Glucosa	13,88	13,71	13,60	13,73 \pm 0,14	5,56 \pm 0,11	57,8	4,35 ^(a)
Extracto de raíz	7,71	7,99	8,14	7,95 \pm 0,22	2,62 \pm 0,12	27,3	1,72 ^(c)
Hidrólisis de raíz	5,41	5,84	5,47	5,57 \pm 0,23	2,54 \pm 0,22	26,4	1,89 ^(c)
Fruto	6,08	9,49	8,00	7,86 \pm 1,70	3,30 \pm 0,69	34,4	2,83 ^(b)

Los valores (a) y (b) representan diferencias estadísticamente significativas con los demás datos, mientras los valores (c) no existen diferencias estadísticamente significativas

Al analizar la **Tabla 2**, se observó que la glucosa es una fuente de carbono altamente eficaz en comparación con las otras fuentes de carbono menos simples, provenientes de manera natural y renovable, como lo es la especie vegetal *C. palmata*. La glucosa ha demostrado ser una fuente de carbono con alto índice de producción de PHB con diversos microorganismos (Sección 2.5, **Tabla 1**). Se logró una acumulación de PHB del 57,8% utilizando glucosa bajo las condiciones establecidas en la fermentación, derivatización y cuantificación. De lo anterior, se determinó que el asilado bacteriano C01 acumuló PHB en presencia del extracto e hidrolizado de la raíz y el fruto

de la *C. palmata*, obteniendo concentraciones de 1,72 g L⁻¹ con la raíz, 1,89 g L⁻¹ con el hidrolizado y 2,83 g L⁻¹ con el fruto. Por lo tanto, las fuentes de carbono de la raíz y el fruto fueron capaces de servir como fuente de carbono para la producción de PHB por el microorganismo. El contenido de PHB con respecto al peso seco celular (la diferencia de peso corresponde a 30% humedad y 70% seco) fue de 27,3% con el extracto de raíz, 26,4% con el hidrolizado de raíz y 34,4% con el fruto. Según el efecto de las diferentes fuentes de carbono, el fruto acumuló el mayor PHB en un rango comparativo con la glucosa. Este resultado se ve relacionado con el crecimiento en la fermentación, ya que el fruto también es el de mayor porcentaje de crecimiento.

También, se confirma que las condiciones seleccionadas en la derivatización sirvieron para cuantificar y obtener la acumulación de PHB usando GC/MS mostraron las señales relevantes identificadas. Un porcentaje alto indica una mayor eficiencia en la conversión de la materia prima en el biopolímero deseado. Esto evidencia que en los extractos de biopolímero para cada fuente de carbono es una materia prima ideal para producción de biopolímeros a partir de fuentes naturales, que evita impactos negativos sobre el medio ambiente, minimiza el costo total de fabricación y es bioquímicamente rico en carbono. Es decir, que estos sustratos son sostenibles y pueden convertirse en fuentes de carbono apropiadas. Sin embargo, se debe mejorar su eficiencia de producción, recuperación y purificación para aumentar la concentración obtenida. Para determinar si existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, un análisis de varianza de una vía (ANOVA) fue aplicado al conjunto de datos, determinando que la producción de PHB fue mayor (y estadísticamente significativo) al utilizar glucosa como fuente de carbono, seguido por el fruto y finalmente, los extractos de raíz ($p < 0,05$), como se indica en la **Tabla 3 (Apéndice O)**.

Estudios anteriores (Tabla 1, Sección 2.5) de Otero-Ramírez et al., 2013 obtuvo un biopolímero recuperado entre 0,01 g L⁻¹ a 0,88 g L⁻¹ desde bacterias provenientes de muestras de suelo del

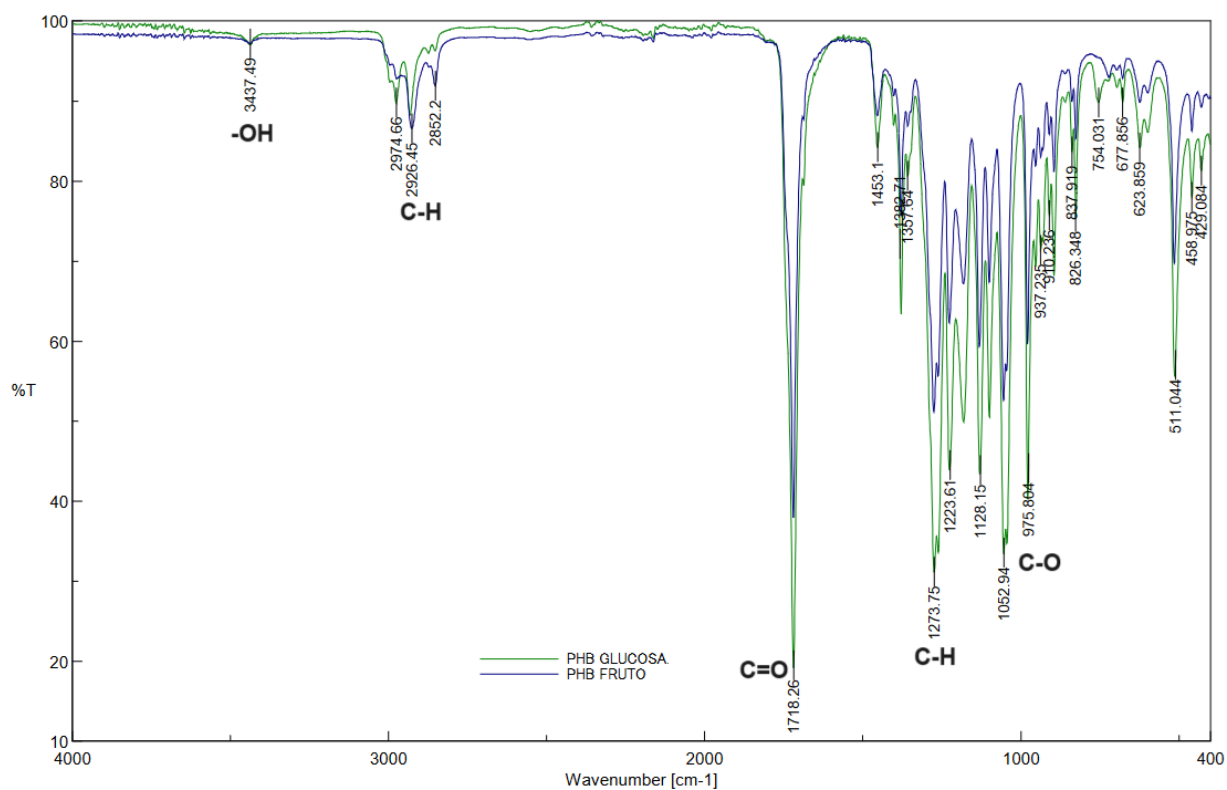
departamento de Nariño. Orita et al.,2022 trabajaron con varias cepas bacterianas determinando que con glucosa como fuente de carbono oscila entre 60,8% a 67,2% de contenido de PHB en porcentaje de acumulación en peso. Pereira et al.,2021 obtuvieron PHA mediante *P. chlororaphis* con residuos de pulpa de fruta con un contenido de 49,25% de acumulación en peso. Con respecto a nuestro aislado bacteriano C01, se logró obtener una mejor producción con las fuentes de carbono de estudio (**Tabla 2**), relacionando con los valores de raíz y fruto, tienen una capacidad significativa para la producción de PHB en la bacteria, sin embargo, la eficiencia y la cantidad de PHB producido pueden varias dependiendo del microorganismo, las condiciones de cultivo, entre otros. Teniendo en cuenta que el método de fermentación implementado (lote), condiciones de extracción y cuantificación del PHB fueron óptimos, es posible conjeturar posteriores estudios a una escala mayor e identificar que compuestos contienen las fuentes de carbono que generan buenos rendimientos en la biosíntesis del biopolímero. Además, la demanda de materiales sostenibles motiva el desarrollo de microorganismos capaces de sintetizar biopolímeros a partir de sustratos renovables.

5.3.3 Caracterización del biopolímero por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El polímero PHB extraído del aislado bacteriano (código C01) usando glucosa y el fruto de la palma de iraca como fuente de carbono, se caracterizó utilizando espectros IR (**Figura 8**). Los espectros IR del PHB producido mostraron bandas características en 1273 y 1718 cm^{-1} , correspondientes a rotaciones específicas alrededor de los átomos de carbono para el estiramiento -CH y C=O del grupo éster presente en la cadena molecular. Las bandas en 975 y 1052 cm^{-1} indican la presencia de estiramiento de CO . Además, las bandas de absorción en 2974 y 2926 cm^{-1} se deben a las vibraciones de estiramiento de C-H de los grupos metilo(-CH_3) y metileno (-CH_2), también la

banda 3437 cm^{-1} es característico de las vibraciones de estiramiento y deformación de los grupos -OH terminales, lo que confirma la formación de PHB (Gahlawat & Soni, 2019; Kansiz *et al.*, 2000). Estas señales observadas se alinean con las reportadas previamente por Andler *et al.*, 2023. Estos resultados se confirmaron con una comparación de un espectro de IR de la base de datos Wiley Online Library con una similitud de 75%. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estas frecuencias pueden variar ligeramente dependiendo de factores como la morfología del material, su grado de cristalinidad y las condiciones de medición.

Figura 8. Espectro de FTIR del biopolímero obtenido utilizando glucosa y el fruto de la especie vegetal *C. palmata* como fuente de carbono



6. Conclusiones

El extracto e hidrolizado de la raíz y el fruto de la especie vegetal *Cardulovica palmata* (palma de iraca) fueron fuentes de carbono aprovechables por el microorganismo de estudio (código C01) para la producción de PHB, siendo un sustrato económico y respetuoso con el medio ambiente con un rico contenido de carbono en forma de azúcares y otros componentes nutricionales como proteínas, con concentraciones de azúcares para el extracto de $339,6 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$, para el hidrolizado de $158,7 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{mg}$ y para el fruto de $27,44 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{mg}$ de azúcares reductores por muestra seca; y concentraciones de proteínas para el extracto de $1,22 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$, para el hidrolizado de $1,04 \pm 0,9 \mu\text{g}/\text{mg}$ y para el fruto de $2,03 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas por muestra seca.

Se establecieron variables para la derivatización de la reacción del ácido 3-hidroxi-butírico mediante GC/MS, y se determinó que las mejores condiciones fueron una concentración de H^+/MeOH del 5% (v/v) durante 7 minutos a 160°C en un reactor de microondas. La raíz y el fruto de la palma de iraca fueron fuentes de carbono aprovechables por el microorganismo para el cual, se obtuvo una concentración de PHB del 4,35 g/L con glucosa, 1,72 g/L con el extracto de raíz, 1,89 g/L con el hidrolizado y 2,83 g/L con el fruto. Si bien con el fruto se logró obtener una producción ligeramente mayor de PHB, todos los sustratos representan una alternativa rentable que puede ayudar en la transición hacia los plásticos biodegradables.

Referencias bibliográficas

Abd El-malek, F., Khairy, H., Farag, A., & Omar, S, (2020). The sustainability of microbial bioplastics, production and applications, *International journal of biological macromolecules*, 157, 319-328.

Acquavia, M, A., Pascale, R., Martelli, G., Bondoni, M., & Bianco, G, (2021). Natural polymeric materials: A solution to plastic pollution from the agro-food sector, *Polymers*, 13(1), 158.

Adeleye, A, T., Odoh, C, K., Enudi, O, C., Banjoko, O, O., Osiboye, O, O., Odediran, E, T., & Louis, H, (2020). Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass, *Process biochemistry*, 96, 174-193.

Alcântara, J, M, G., Distante, F., Storti, G., Moscatelli, D., Morbidelli, M., & Sponchioni, M, (2020). Current trends in the production of biodegradable bioplastics: The case of polyhydroxyalkanoates, *Biotechnology Advances*, 42, 107582.

Alias, Z., & Tan, I. K. (2005). Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. *Bioresource technology*, 96(11), 1229-1234.

Anderson, A, J., & Dawes, E, (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiological reviews*, 54(4), 450-472.

Andler, R., González-Arancibia, F., Vilos, C., Sepulveda-Verdugo, R., Castro, R., Mamani, M., ... & Martínez, I. (2024). Production of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) nanoparticles using grape residues as the sole carbon source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 261, 129649.

Andler, R., Rojas, V., Pino, V., Castro, R. I., Valdés, C., Kumar, V., ... & Díaz-Barrera, A. (2023). Efficient production of a polyhydroxyalkanoate by *Azotobacter vinelandii* OP using apple residues as promising feedstock. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124626.

Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements, *International journal of biological macromolecules*, 89, 161-174.

Arcos, M. L., Ossa, F., & Díaz, T. E. (2004). Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*, *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 5(1), 60-63.

Ashter, S. A. (2016). *Introduction to bioplastics engineering*. William Andrew.

AU - Salem, M., AU - Bernach, M., AU - Bajdzienko, K., & AU - Giavalisco, P. (2017). A Simple Fractionated Extraction Method for the *Comprehensive Analysis of Metabolites, Lipids, and Proteins from a Single Sample*. *JoVE*, 124, e55802. <https://doi.org/10.3791/55802>

Barham, P. J., Keller, A., Otun, E. L., & Holmes, P. A. (1984). Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Materials Science*, 19, 2781-2794.

Bharathiraja, S., Suriya, J., Krishnan, M., Manivasagan, P., & Kim, S. K. (2017). Production of enzymes from agricultural wastes and their potential industrial applications, *In Advances in food and nutrition research* (Vol, 80, pp, 125-148), Academic Press.

Carey, F. A., & Giuliano, R. M. (2013). Alcohols, Ethers, and Epoxides: Introduction and Nomenclature. En F. A. Carey & R. M. Giuliano (Eds.), *Organic Chemistry* (9th ed.). McGraw-Hill Education.

Chanprateep, S, (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates, *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(6), 621-632.

Chen, G, Q., & Patel, M, K, (2012). Plastics derived from biological sources: present and future: a technical and environmental review, *Chemical reviews*, 112(4), 2082-2099.

Choi, S, Y., Rhie, M, N., Kim, H, T., Joo, J, C., Cho, I, J., Son, J., & Park, S, J, (2020). Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters, *Metabolic engineering*, 58, 47-81.

Ciesielski, S., Możejko, J., & Pisutpaisal, N, (2015). Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production, *Journal of Cleaner Production*, 106, 408-421.

Ciesielski, S., Możejko, J., & Przybyłek, G, (2010). The influence of nitrogen limitation on mcl-PHA synthesis by two newly isolated strains of *Pseudomonas* sp, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 511-520.

Corrêa, M, S., Siqueira-Batista, R., Gomes, A, P., Franco-Barbosa, A., Verzola, A, C, A., de Oliveira, F, R, Q., ,,, & Santos, S, S, (2004). Lononia erucism in Teresópolis, Rio de Janeiro State, Brazil: report of a probable case and review, *Revista da Sociedade de Brasileira de Medicina Tropical*, 37(5).

De Almeida, A., Giordano, A. M., Nickel, P. I., & Pettinari, M. J. (2010). Effects of aeration on the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) from glycerol and glucose in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 76(6), 2036-2040.

Delgado, A, C, L., & Cordoba, A, M, (2015). Polihidroxialcanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial, *Informador técnico*, 79(1), 83-101.

Doi, Y, (1990). Microbial polyesters, Vch.

Eesaee, M., Ghassemi, P., Nguyen, D, D., Thomas, S., Elkoun, S., & Nguyen-Tri, P, (2022). Morphology and crystallization behaviour of polyhydroxyalkanoates-based blends and composites: a review, *Biochemical Engineering Journal*, 187, 108588.

Füchtenbusch, B., Fabritius, D., & Steinbüchel, A, (1996). Incorporation of 2-methyl-3-hydroxybutyric acid into polyhydroxyalkanoic acids by axenic cultures in defined media, *FEMS microbiology letters*, 138(2-3), 153-160.

Fukui, T., Shiomi, N., & Doi, Y. (1998). Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. *Journal of Bacteriology*, 180(3), 667-673.

Galviz-Quezada, A., Ochoa-Aristizábal, A, M., Arias Zabala, M, E., Ochoa, S., & Osorio-Tobón, J, F, (2019). Valorization of iraca (*Carludovica palmata*, Ruiz & Pav,) infructescence by ultrasound-assisted extraction: An economic evaluation, *Food and Bioproducts Processing*, doi:10.1016/j.fbp,2019,08,016

Galviz-Quezada, A., Ochoa-Aristizábal, A, M., Arias Zabala, M, E., Ochoa, S., & Osorio-Tobón, J, F, (2021). Obtaining phenolic compounds from iraca waste (*Carludovica palmata* Ruiz & Pav) through ultrasound-assisted extraction, *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1–12, <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01490-1>

García, G., Sosa-Hernández, J, E., Rodas-Zuluaga, L, I., Castillo-Zacarías, C., Iqbal, H., & Parra-Saldívar, R, (2020). Accumulation of PHA in the microalgae *Scenedesmus* sp, under nutrient-deficient conditions, *Polymers*, 13(1), 131.

Gil, D. B., Bocourt, E. C., & Maqueira, Y. D. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico, *ICIDCA, Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 40(2), 45-50.

Gomez, J. G. C., Rodrigues, M. F. A., Alli, R. C. P., Torres, B. B., Netto, C. B., Oliveira, M. S., & Da Silva, L. F. (1996). Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 785-791.

González, Y., Meza, J.C., González, O, y Córdova, J,A, (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29 (1), 77-115.

Gumel, A. M., Annuar M, S, M, y Chisti Y, (2013). Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates, *Journal of Polymers and the Environment* 21,580–605 DOI 10,1007/s10924-012-0527-1.

Guo, W., Yang, K., Qin, X., Luo, R., Wang, H., & Huang, R, (2022). Polyhydroxyalkanoates in tissue repair and regeneration, *Engineered Regeneration*, 3(1), 24-40.

Gupta, S., Sharma, S., Nadda, A, K., Husain, M, S, B., & Gupta, A, (2022). Biopolymers from waste biomass and its applications in the cosmetic industry: A review, *Materials Today: Proceedings*, 68, 873-879.

Gusakov, A. V., Kondratyeva, E. G., & Sinitsyn, A. P. (2011). Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *International journal of analytical chemistry*, 2011.

Haas, R., Jin, B., & Zepf, F, T, (2008). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from waste potato starch, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(1), 253-256.

Harding, K, G., Dennis, J, S., Von Blottnitz, H., & Harrison, S, T, L, (2007). Environmental analysis of plastic production processes: Comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly- β -hydroxybutyric acid using life cycle analysis, *Journal of biotechnology*, 130(1), 57-66.

He, W., Tian, W., Zhang, G., Chen, G. Q., & Zhang, Z. (1998). Production of novel polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil. *FEMS microbiology letters*, 169(1), 45-49.

Israni, N., & Shivakumar, S, (2020). Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from directly valorized ragi husk and sesame oil cake by *Bacillus megaterium* strain Ti3: Statistical optimization and characterization, *International journal of biological macromolecules*, 148, 20-30.

Izaguirre Campoverde, J. K. (2020). Turning waste into value: Production of the high-value compounds poly (3-hydroxybutyrate) and lactic acid from renewable feedstocks based on municipal solid waste.

Jacquel, N., Lo, C. W., Wu, H. S., Wei, Y. H., & Wang, S. S. (2007). Solubility of polyhydroxyalkanoates by experiment and thermodynamic correlations. *AIChE journal*, 53(10), 2704-2714.

Jung, H, J., Kim, S, H., Shin, N., Oh, S, J., Hwang, J, H., Kim, H, J., & Yang, Y, H, (2023). Polyhydroxybutyrate (PHB) production from sugar cane molasses and tap water without sterilization using novel strain, *Priestia* sp, YH4, *International Journal of Biological Macromolecules*, 250, 126152.

Kai, D., & Loh, X, J, (2014). Polyhydroxyalkanoates: Chemical modifications toward biomedical applications, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(2), 106-119.

Kansiz, M., Billman-Jacobe, H., & McNaughton, D. (2000). Quantitative determination of the biodegradable polymer poly (β -hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3415-3420.

Khanna, S., & Srivastava, A, K, (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates, *Process biochemistry*, 40(2), 607-619.

Khanna, S., & Srivastava, A, K, (2009). On-line characterization of physiological state in poly (β -hydroxybutyrate) production by *Wautersia eutropha*, *Applied biochemistry and biotechnology*, 157, 237-243.

Kim, B, S., Lee, S, C., Lee, S, Y., Chang, Y, K., & Chang, H, N, (2004). High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26, 147-150.

Kimura, Y, (2009). Molecular, structural, and material design of bio-based polymers, *Polymer journal*, 41(10), 797-807.

Kiselev, E, G., Demidenko, A, V., Zhila, N, O., Shishatskaya, E, I., & Volova, T, G, (2022). Sugar beet molasses as a potential C-substrate for PHA production by *Cupriavidus necator*, *Bioengineering*, 9(4), 154.

Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fernandes, E, G., Horvat, P., Kutschera, C., & Braunegg, G, (2008). Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*, *Bioresource technology*, 99(11), 4854-4863.

Kruger, N, J, (2009). The Bradford method for protein quantitation, *The protein protocols handbook*, 17-24.

Lee, S, Y, (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in biotechnology*, 14(11), 431-438.

Lee, S, Y., & Choi, J, I, (2001). Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms, *Biopolyesters*, 183-207.

Lemos, P, C., Viana, C., Salgueiro, E, N., Ramos, A, M., Crespo, J, P, S, G., & Reiszcorr, M, A, M, (1998), Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture, *Enzyme and Microbial Technology*, 22(8), 662-671.

Liao, Z., Fan, J., Lai, Z., Bai, Z., Wang, H., Cheng, M., ... & Li, Z. (2023). Response network and regulatory measures of plant-soil-rhizosphere environment to drought stress. *Advances in agronomy*, 180, 93-196.

Liu, Q., Liu, H., & Gao, D. M. (2022). Establishing a kinetic model of biomass-derived disaccharide hydrolysis over solid acid: A case study on hierarchically porous niobium phosphate. *Chemical Engineering Journal*, 430, 132756.

Liu, Q., Luo, G., Zhou, X, R., & Chen, G, Q, (2011), Biosynthesis of poly (3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*, *Metabolic engineering*, 13(1), 11-17.

Liu, X., Cooper, D, E., Cluntun, A, A., Warmoes, M, O., Zhao, S., Reid, M, A., & Locasale, J, W, (2018), Acetate production from glucose and coupling to mitochondrial metabolism in mammals, *Cell*, 175(2), 502-513.

Lu, J., Tappel, R. C., & Nomura, C. T. (2009). Mini-review: biosynthesis of poly (hydroxyalkanoates), *Journal of Macromolecular Science®*, Part C: Polymer Reviews, 49(3), 226-248.

Lucrezi, J. D., Burns, T. J., Matesic, D. F., Oldham, C. D., & May, S. W. (2014). Inhibition of JNK and p38 MAPK phosphorylation by 5-(acetylamino)-4-oxo-6-phenyl-2-hexenoic acid methyl ester and 4-phenyl-butenoic acid decreases substance P-induced TNF- α upregulation in macrophages, *International immunopharmacology*, 21(1), 44-50.

MacLeod, M., Arp, H. P. H., Tekman, M. B., & Jahnke, A. (2021). The global threat from plastic pollution. *Science*, 373(6550), 61-65.

Martínez, E. (2018). Identificación molecular y bioquímica de una cepa productora de Polihidroxicanoatos (PHAs) y evaluación de su producción bajo distintas fuentes de carbono. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina*, 24-24.

Mercan, N., & Beyatli, Y. (2005). Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Rhizobium meliloti*, *R. viciae* and *Bradyrhizobium japonicum* with different carbon and nitrogen sources, and inexpensive substrates.

Moo-Huchin, V. M., Pérez-Pacheco, E., Ríos-Soberanis, C. R., Bello-Pérez, L. A., Cervantes-Uc, J. M., Dzul-Cervantes, M. A., & Estrada-León, R. J. (2019). Extraction and characterization of natural cellulosic fiber from jipijapa (*Carludovica palmata*). *Chiang Mai J Sci*, 46, 579-591.

Moreno, P., Yañez, C., Cardozo, N. S. M., Escalante, H., Combariza, M. Y., & Guzman, C. (2015). Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. *New biotechnology*, 32(6), 682-689.

Mozejko, J., Wilke, A., Przybyłek, G., & Ciesielski, S, (2012), Mcl-PHAs produced by *Pseudomonas* sp, G101 using fed-batch cultivation with waste rapeseed oil as carbon source, *Journal of microbiology and biotechnology*, 22(3), 371-377.

Muñoz, M, A., & Tuberquia, D, (1999), Estudio preliminar para el manejo sostenible de *Carludovica palmata* R, y P, como materia prima en la producción de papel artesanal en Cabo Corrientes, Chocó, Colombia, *Actualidades Biológicas*, 21(71), 87-96.

Murillo, E., Deli, J., Nagy, V., Molinar-Toribio, E., Sándor, V., Marton, K., & Agócs, A, (2021), Carotenoid profile of two capsorubin-rich tropical plants, *Journal of Food Composition and Analysis: An Official Publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 97(103798), 103798, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103798>

Nakajima, H., & Kimura, Y, (2013), Chapter 1, General introduction: Overview of the current development of biobased polymers, *Bio-Based Polymers*, 1st ed.,; Kimura, Y., Ed, 1-23

Nanda, S., Patra, B, R., Patel, R., Bakos, J., & Dalai, A, K, (2022), Innovations in applications and prospects of bioplastics and biopolymers: A review, *Environmental Chemistry Letters*, 20(1), 379-395, Naik, S, N., Goud, V, V., Rout, P, K., & Dalai, A, K, (2010), Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review, *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 578-597.

Núñez, R. Á., Pérez, B. R., Motzezak, R. H., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares

Obruca, S., Benesova, P., Marsalek, L., & Marova, I, (2015), Use of lignocellulosic materials for PHA production, *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 29(2), 135-144.

OCDE (2022), Perspectivas mundiales de los plásticos: impulsores económicos, impactos ambientales y opciones de políticas, *Publicaciones de la OCDE*, París, <https://doi.org/10.1787/de747aef-en>.

O'Connor, S., Szwej, E., Nikodinovic-Runic, J., O'Connor, A., Byrne, A, T., Devocelle, M., & O'Connor, K, E, (2013), The anti-cancer activity of a cationic anti-microbial peptide derived from monomers of polyhydroxyalkanoate, *Biomaterials*, *34(11)*, 2710-2718.

Ojumu, T. V., Yu, J., & Solomon, A. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. *African journal of Biotechnology*, *3(1)*, 18-24.

Orita, I., Iwazawa, R., Nakamura, S., & Fukui, T. (2012). Identification of mutation points in *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 and genetic reconstitution of glucose-utilization ability in wild strain H16 for polyhydroxyalkanoate production. *Journal of bioscience and bioengineering*, *113(1)*, 63-69.

Ospina-Betancourth, C., Echeverri, S., Rodriguez-Gonzalez, C., Wist, J., Combariza, M. Y., & Sanabria, J. (2022). Enhancement of PHA production by a mixed microbial culture using VFA obtained from the fermentation of wastewater from yeast industry. *Fermentation*, *8(4)*, 180.

OTERO-RAMÍREZ, ID (2013). Bioprospection of bacteria producing polyhydroxyalkanoates (PHA'S) in the *Department of Nariño, Biotechnology in the agricultural and agroindustrial sector* , *11 (SPE)*, 12-20.

Paduani, M. (2020). Microplastics as novel sedimentary particles in coastal wetlands: A review. *Marine Pollution Bulletin*, *161*, 111739.

Panca Quico, P. L., & Mendoza Soto, M. A. (2019). Determinación de los factores de extracción del aceite esencial de albahaca (*Ocimum Basilicum L.*) por el método de arrastre de vapor.

Panesar, R., Kaur, S., & Panesar, P, S, (2015), Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review, *Current Opinion in Food Science*, 1, 70-76.

Pereira, J. R., Araújo, D., Freitas, P., Marques, A. C., Alves, V. D., Sevrin, C., ... & Freitas, F. (2021). Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: Cultivation on fruit pulp waste and polymer characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 85-92.

Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I, (2007), Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications, *Journal of chemical technology & biotechnology: International research in process*, *Environmental & clean technology*, 82(3), 233-247.

Polyák, P., Szemerszki, D., Vörös, G., & Pukánszky, B. (2017). Mechanism and kinetics of the hydrolytic degradation of amorphous poly (3-hydroxybutyrate). *Polymer Degradation and Stability*, 140, 1-8.

Pradhan, S., Dikshit, P, K., & Moholkar, V, S, (2020), Production, characterization, and applications of biodegradable polymer: Polyhydroxyalkanoates, *In Advances in Sustainable Polymers: Synthesis, Fabrication and Characterization* (pp, 51-94), Singapore: Springer Singapore.

Priyadarshi, S., Shukla, A., & Borse, B, B, (2014), Polyhydroxyalkanoates: role of *Ralstonia eutropha*, *International Journal of Biomedical And Advance Research*, 5(2), 68-76.

Raza, Z, A., Abid, S., & Banat, I, M, (2018), Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 45-56.

Reddy, V, U, N., Ramanaiah, S, V., Reddy, M, V., & Chang, Y, C, (2022), Review of the developments of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs), *Bioengineering*, 9(5), 225.

Rehm, B. H. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 376(1), 15-33.

Renard, E., Langlois, V., & Guérin, P. (2007). Chemical modifications of bacterial polyesters: from stability to controlled degradation of resulting polymers. *Corrosion engineering, science and technology*, 42(4), 300-311.

Riaño, J, Y, S, (2010), Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos: Una solución frente a la contaminación del medio ambiente, *Teoría y praxis investigativa*, 5(2), 79-84.

Ribero, D. C. U. (2022). Extracción y caracterización de polihidroxibutirato (PHB) producido por *Bacillus megaterium* B2 usando como fuente de carbono residuos provenientes de la agroindustria de cacao. Universidad Industrial de Santander.

Riedel, S, L., Jahns, S., Koenig, S., Bock, M, C., Brigham, C, J., Bader, J., & Stahl, U, (2015), Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats, *Journal of biotechnology*, 214, 119-127.

Ritchie, H., & Roser, M, (2018), Plastic pollution, Published online at OurWorldInData, org,

Rodriguez Meza, L, R, (2023), Políticas gubernamentales en América Latina para la gestión del plástico en la economía circular (Master's thesis, Maestría en Proyectos de Desarrollo Sostenible-Virtual).

Rojas-Rosas, O., Villafana-Rojas, J., Lopez-Dellamary, F. A., Nungaray-Arellano, J., & Gonzalez-Reynoso, O. (2007). Production and characterization of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 from glucose, an unrelated carbon source. *Canadian journal of microbiology*, 53(7), 840-851.

Rydz, J., Sikorska, W., Kyulavska, M., & Christova, D. (2014). Polyester-based (bio) degradable polymers as environmentally friendly materials for sustainable development. *International journal of molecular sciences*, 16(1), 564-596.

Sabarinathan, D., Chandrika, S, P., Venkatraman, P., Easwaran, M., Sureka, C, S., & Preethi, K, (2018), Production of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Pseudomonas plecoglossicida* and its application towards cancer detection, *Informatics in Medicine Unlocked*, 11, 61-67.

Sanchez, S., & Demain, A. L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 895-906.

Shahid, S., Razzaq, S., & Farooq, R. (2021). Polyhydroxyalkanoates: Next generation natural biomolecules and a solution for the world's future economy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 297-321.

Shamala, T, R., Vijayendra, S, V, N., & Joshi, G, J, (2012). Agro-industrial residues and starch for growth and co-production of polyhydroxyalkanoate copolymer and α -amylase by *Bacillus* sp, CFR-67, *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1094-1102.

Shirato, Y., & Yokozawa, M. (2006). Acid hydrolysis to partition plant material into decomposable and resistant fractions for use in the Rothamsted carbon model. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(4), 812-816.

Sintim, H. Y., Bandopadhyay, S., English, M. E., Bary, A., y González, J. E. L., DeBruyn, J. M., & Flury, M. (2021), Four years of continuous use of soil-biodegradable plastic mulch: impact on soil and groundwater quality, *Geoderma*, 381, 114665.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (1996). Fundamentals of analytical chemistry (Vol. 33, pp. 53-55). Fort Worth: Saunders College Pub.

Smith, J. K., Johnson, L. M., & Brown, A. B. (2018). Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for pesticide residue analysis in food samples. *Food Chemistry*, 256, 123-130.

Soares, J., Miguel, I., Venâncio, C., Lopes, I., & Oliveira, M. (2021). Public views on plastic pollution: Knowledge, perceived impacts, and pro-environmental behaviours, *Journal of hazardous materials*, 412, 125227.

Soares, J., Miguel, I., Venâncio, C., Lopes, I., & Oliveira, M. (2021). Public views on plastic pollution: Knowledge, perceived impacts, and pro-environmental behaviours. *Journal of hazardous materials*, 412, 125227.

Steinbüchel, A., & Lütke-Eversloh, T. (2003). Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms, *Biochemical engineering journal*, 16(2), 81-96.

Stubbe, J., & Tian, J. (2003). Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase, *Natural product reports*, 20(5), 445-457.

Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters, *Progress in polymer science*, 25(10), 1503-1555

Sukan, A., Roy, I., & Keshavarz, T, (2015). Dual production of biopolymers from bacteria, *Carbohydrate polymers*, 126, 47-51.

Sun, C., Liao, Q., Xia, A., Chen, C., Fu, Q., Huang, Y., ... & Sun, F. (2021). Hydrolysis of disaccharides via carbon-based solid acids with binding and catalytic domains: glycosidic bond fracture properties and reaction kinetics. *Fuel*, 300, 120978.

Tamer, I, M., Moo-Young, M., & Chisti, Y, (1998). Disruption of *Alcaligenes latus* for recovery of poly (β -hydroxybutyric acid): comparison of high-pressure homogenization, bead milling, and chemically induced lysis, *Industrial & engineering chemistry research*, 37(5), 1807-1814

Tan, G, Y, A., Chen, C, L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I, M, N., ,, & Wang, J, Y, (2014), Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review, *Polymers*, 6(3), 706-754, totales, reductores y no reductores en *Agave cocui Trelease*. *Multiciencias*, 12(2), 129-135.

Tsuge, T., Yano, K., Imazu, S. I., Numata, K., Kikkawa, Y., Abe, H., ... & Doi, Y. (2005). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer from fructose using wild-type and laboratory-evolved PHA synthases. *Macromolecular bioscience*, 5(2), 112-117.

Turco, R., Santagata, G., Corrado, I., Pezzella, C., & Di Serio, M, (2021). In vivo and post-synthesis strategies to enhance the properties of PHB-based materials: A review, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 619266.

Tyagi, B., Takkar, S., Meena, R., & Thakur, I, S, (2021). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Parapedobacter* sp, ISTM3 isolated from Mawsmi cave utilizing molasses as carbon source, *Environmental Technology & Innovation*, 24, 101854.

Varsha, Y, M., & Savitha, R, (2011) Overview on polyhydroxyalkanoates: a promising biopol, *J, Microb, Biochem, Technol*, 3(05), 99-105.

Verlinden, R. A., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of applied microbiology*, 102(6), 1437-1449.

Verma, S., Bhatia, Y., Valappil, S, P., & Roy, I, (2002). A possible role of poly-3-hydroxybutyric acid in antibiotic production in *Streptomyces*, *Archives of microbiology*, 179, 66-69.

Wang, J., Liu, S., Huang, J., Cui, R., Xu, Y., & Song, Z. (2023). Genetic engineering strategies for sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production from carbon-rich wastes. *Environmental technology & innovation*, 30, 103069.

Wang, Y., Yin, J., & Chen, G, Q, (2014). Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities, *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 59-65.

Wang, Y., Zhao, F., Fan, X., Wang, S., & Song, C. (2016). Enhancement of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates biosynthesis from glucose by metabolic engineering in *Pseudomonas mendocina*. *Biotechnology letters*, 38, 313-320.

Wendy, Y, D., Fauziah, M, N., Baidurah, Y, S., Tong, W, Y., & Lee, C, K, (2022). Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) BY *Burkholderia cepacia* BPT1213 using waste glycerol as carbon source, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 41, 102310.

Yang, T., Song, L., Lin, H. Y., Dong, K., Fu, X., Gao, G. F., ... & Chu, H. (2023). Within-species plant phylogeny drives ectomycorrhizal fungal community composition in tree roots along a timberline. *Soil Biology and Biochemistry*, 176, 108880.

Yu, J., Plackett, D., & Chen, L. X. (2005). Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly [(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions. *Polymer degradation and stability*, 89(2), 289-299.

Zhang, Y., Wang, L., Deng, J., Chen, M., Xu, C., & Li, H. (2019). Quantitative analysis of metabolites in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1104, 230-239

Zhou, W., Bergsma, S., Colpa, D. I., Euverink, G.-J. W., & Krooneman, J. (2023). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy, *Journal of Environmental Management*, 341(118033), 118033, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118033>

Zinn, M., Witholt, B., & Egli, T. (2001), Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, *Advanced drug delivery reviews*, 53(1), 5-21.

Apéndices

Apéndice A Raíces y extracto de la especie *Cardulovica palmata*



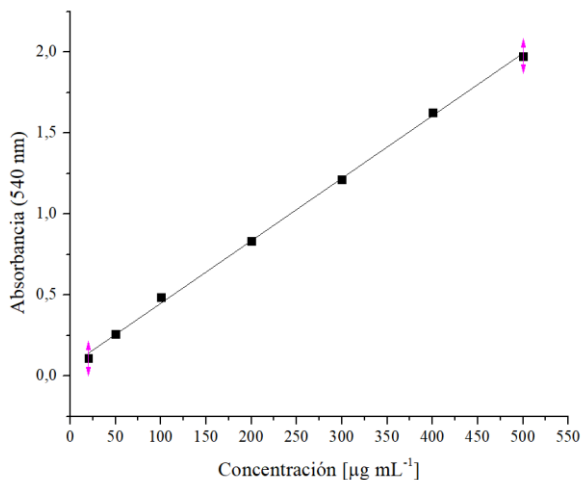
Fruto y triturado de la especie *Cardulovica palmata*



Apéndice B. Soluciones patrón para la preparación de la curva de calibración del método DNS para determinar contenido de azúcares reductores

Solución patrón	Glucosa (µL)	Agua destilada (µL)	Reactivo DNS (µL)
Blanco	-	250	250
1	10	240	250
2	25	225	250
3	50	200	250
4	100	150	250
5	150	100	250
6	200	50	250

Apéndice C. Curva de calibración método DNS



Apéndice D. Absorbancias de las soluciones patrones obtenidas para la curva de calibración del método DNS

Concentración (µg/mL)	Absorbancia (540 nm)
20	0,109
50	0,258
100	0,484
200	0,832
300	1,214
400	1,628
500	1,975

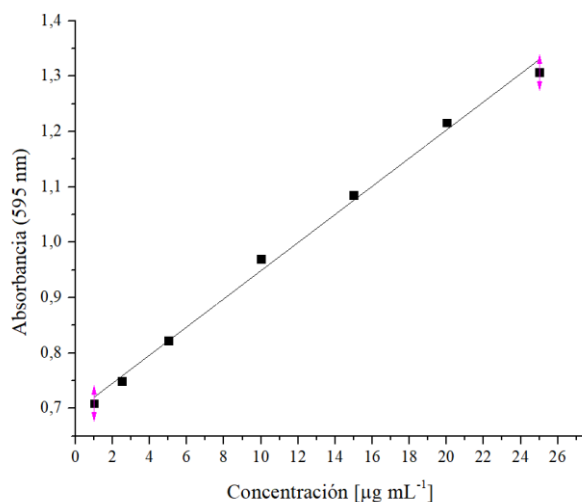
y=0,0039x + 0,0629
R²=0,999

Apéndice E. Soluciones patrón para la preparación de la curva de calibración del método Bradford para determinar contenido de proteínas

Solución patrón	Solución BSA [0,1 mg/mL] (µL)	Solución Buffer fosfato (0,1 M, pH 7) (µL)	Reactivo Bradford (µL)
Blanco	-	250	2500
1	10	240	2500
2	25	225	2500
3	50	200	2500
4	100	150	2500

5	150	100	2500
6	200	50	2500

Apéndice F. Curva de calibración método Bradford

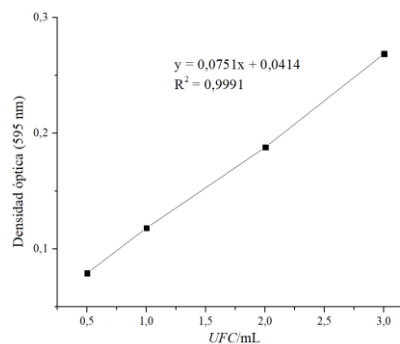


Apéndice G. Absorbancias de las soluciones patrones obtenidas para la curva de calibración del método Bradford

Concentración (µg/mL)	Absorbancia (595 nm)
1	0,709
2,5	0,749
5	0,822
10	0,97
15	1,085
20	1,216
25	1,307
y=0,0254x + 0,6948	
R²=0,9956	

Apéndice H. Escala de soluciones de MacFarland y curva de McFarland

Patrón	BaCl ₂ 1% (mL)	H ₂ SO ₄ 1% (mL)	UFC (x10 ⁸ mL ⁻¹) ¹
1	0,1	9,9	3,0
2	0,2	9,8	6,0
3	0,3	9,7	9,0
4	0,4	9,6	12,0
5	0,5	9,5	15,0
6	0,6	9,4	18,0
7	0,7	9,3	21,0
8	0,8	9,2	24,0



Apéndice I. Absorbancias de los ensayos con glucosa, extracto e hidrolizado de la raíz y fruto de la especie vegetal *Cardulovica palmata* como fuentes de carbono para el crecimiento bacteriano en la fermentación durante 72 h

Tiempo de fermentación (h)	Absorbancias (595 nm)			
	Glucosa ($\langle x \rangle \pm \Delta x$)	Extracto de la raíz ($\langle x \rangle \pm \Delta x$)	Hidrólisis de la raíz ($\langle x \rangle \pm \Delta x$)	Fruto ($\langle x \rangle \pm \Delta x$)
0	0,0428 ± 0,0012	0,0418 ± 0,0019	0,065 ± 0,0013	0,0789 ± 0,0013
4	0,1291 ± 0,0037	0,1141 ± 0,0015	0,124 ± 0,0262	0,1058 ± 0,0262
6	0,1318 ± 0,0047	0,1210 ± 0,0045	0,1415 ± 0,0542	0,1293 ± 0,1438
12	0,3925 ± 0,0002	0,3797 ± 0,0129	0,4178 ± 0,0654	0,3267 ± 0,1907
24	0,4513 ± 0,0041	0,3947 ± 0,0073	0,4257 ± 0,0245	0,4154 ± 0,0415
36	0,5794 ± 0,0092	0,5400 ± 0,0113	0,5436 ± 0,0415	0,6015 ± 0,0312
48	0,5769 ± 0,0072	0,5342 ± 0,0074	0,5921 ± 0,0312	0,6219 ± 0,0486
72	0,6470 ± 0,0078	0,5571 ± 0,0069	0,6047 ± 0,0521	0,6164 ± 0,0512

Apéndice J. Áreas y señales correspondientes del perfil cromatográfico de la optimización de las variables para la derivatización en la determinación de monómero(s) de polihidroxicanoatos (PHA)

Tiempo de retención (tR)	Área/nmol ($\langle x \rangle \pm \Delta x$)		
[H ⁺ /MeOH]	1%	3%	5%
1,928	47,871 ± 1,5056	25,102 ± 11,304	4805,68 ± 6,4217
2,997	117,45 ± 0,5839	21,543 ± 6,3165	3348,91 ± 13,6806
3,461	193,72 ± 2,2756	24,100 ± 6,3737	4102,45 ± 10,0152
Tiempo (min)	3	5	7
1,928	18,688 ± 2,375	59,991 ± 5,703	205,99 ± 3,073
2,997	52,269 ± 10,008	82,861 ± 13,950	164,60 ± 16,037
3,461	49,247 ± 12,369	60,718 ± 8,260	217,51 ± 15,312
Temperatura (°C)	120	140	160
1,928	112,06 ± 1,350	14,555 ± 1,542	29,972 ± 3,073
2,997	75,514 ± 2,955	8,387 ± 1,968	19,018 ± 16,037

3,461	101,81 ± 0,083	9,874 ± 0,823	30,835 ± 15,312
-------	----------------	---------------	-----------------

Apéndice K. Análisis estadístico

Análisis estadístico Variación de concentración del derivatizante [H⁺/MeOH]

Análisis de varianza de un factor: ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3,2239 x10 ⁷	2	1,61195 x10 ⁷	9	0,000
Intra grupos	1,07215 x10 ⁶	6	178692		
Total (Corr.)	3,33112 x10 ⁶	8			

Verificación de varianza y de homogeneidad datos

	Prueba	Valor-P	Prueba	Comparación	
Levene's	3,84754	0,0841	Homogeneidad de datos	1%	X
				3%	X
				5%	X

Verificación de prueba de normalidad

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,8230	0,0372

Análisis estadístico Variación de tiempo (min)

Análisis estadístico de los datos analizados para el tiempo: ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	41527,0	2	20763,5	48,35	0,0002
Intra grupos	2576,49	6	429,416		
Total (Corr.)	44103,5	8			

Verificación de varianza y de homogeneidad datos

	Prueba	Valor-P	Prueba	Comparación	
Levene's	1,56985	0,2829	Homogeneidad de datos	3	X
				5	X
				7	X

Verificación de prueba de normalidad

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,8384	0,0555

Análisis estadístico Variación de temperatura (°C)

Análisis estadístico de los datos analizados para el tiempo: ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12439,6	2	20763,5	45,60	0,0002
Intra grupos	818,367	6	429,416		
Total (Corr.)	13258,0	8			

Verificación de varianza y de homogeneidad datos

	Prueba	Valor-P	Prueba	Comparación	
Levene's	4,7462	0,0581	Homogeneidad de datos	140	X
				160	X
				120	X

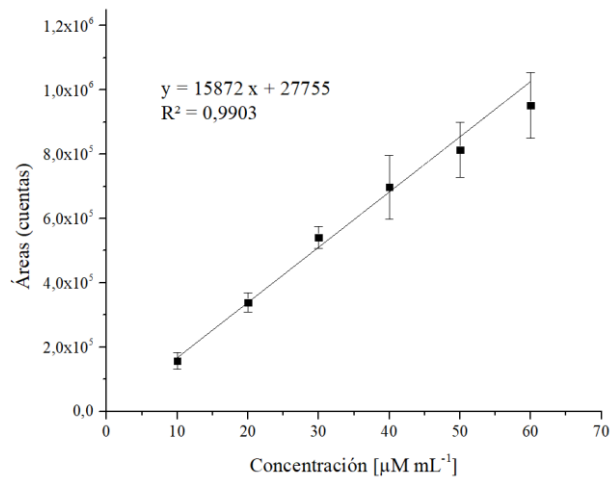
Verificación de prueba de normalidad

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,9186	0,3813

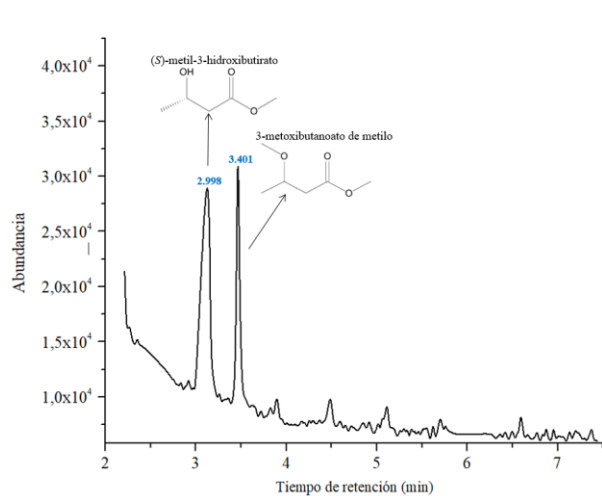
Apéndice L. Áreas totales promedio de los picos generados de la curva de calibración para el ácido 3-hidroxibutírico

Concentración [μmol mL ⁻¹]	Áreas (cuentas)			Resultados (< x > ± Δx)
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
10	1,63 x 10 ⁵	1,79 x 10 ⁵	1,30 x 10 ⁵	1,57 x 10 ⁵ ± 2,52 x 10 ⁴
20	3,08 x 10 ⁵	3,69 x 10 ⁵	3,39 x 10 ⁵	3,39 x 10 ⁵ ± 3,06 x 10 ⁴
30	5,08 x 10 ⁵	5,76 x 10 ⁵	5,40 x 10 ⁵	5,41 x 10 ⁵ ± 3,39 x 10 ⁴
40	8,80 x 10 ⁵	7,26 x 10 ⁵	6,96 x 10 ⁵	7,57 x 10 ⁵ ± 9,98 x 10 ⁴
50	7,89 x 10 ⁵	7,43 x 10 ⁵	9,08 x 10 ⁵	8,54 x 10 ⁴ ± 8,54 x 10 ⁴
60	1,00 x 10 ⁶	1,02 x 10 ⁶	8,35 x 10 ⁵	9,52 x 10 ⁵ ± 1,02 x 10 ⁵

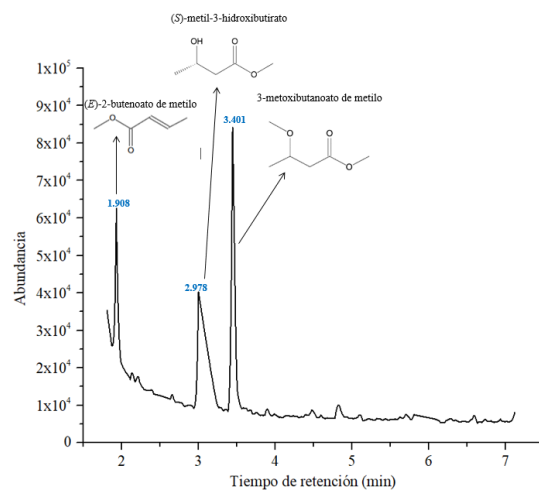
Apéndice M. Curva de calibración para el (S)-metil-3-hidroxi-butirato



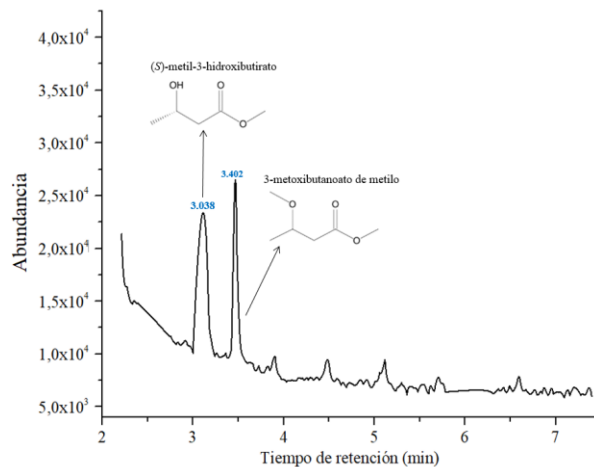
Apéndice N. Perfiles cromatográficos de la cuantificación del extracto de la raíz, hidrolizado de la raíz y fruto de la especie vegetal *Cardulovica palmata* (a) Extracto de la raíz, (b) Hidrólisis de la raíz y (c) Fruto



(a)



(b)



(c)

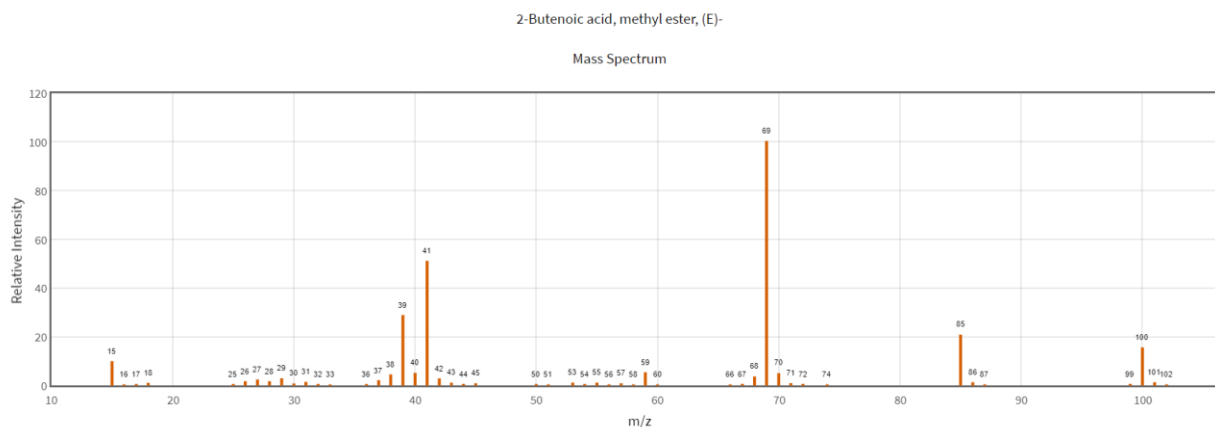
Apéndice O. Análisis estadístico ANOVA para el %PHB en cada fuente de carbono

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	87,2817	3	29,0939	14,52	0,0013
Intra grupos	16,0312	8	2,0039		
Total (Corr.)	103,3129	11			

Prueba	Valor-P	Prueba	Comparación
Levene's	5,2826	0,02664	Homogeneidad de datos
			G X
			E X
			H X
			F X

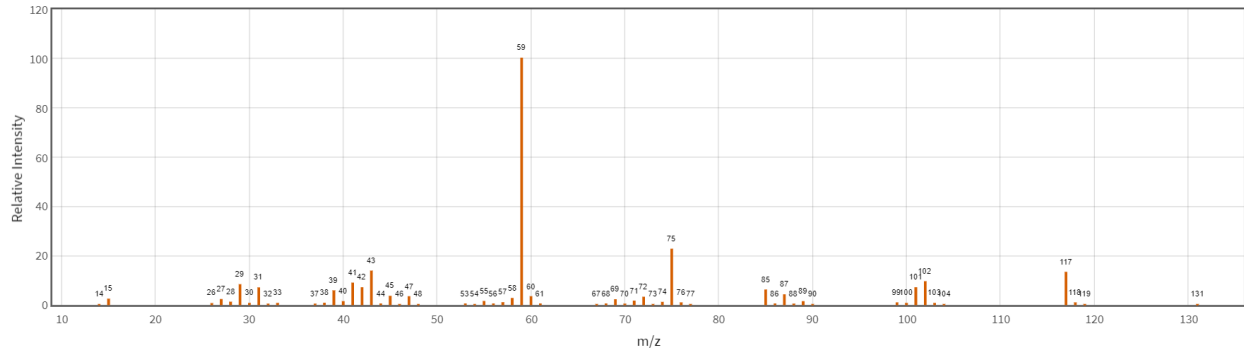
En la prueba de homogeneidad representan que aquellos que tienen X alineada no existen diferencias estadísticamente significativas pero la X que no es alineada representa que tiene diferencias estadísticamente significativas con los demás datos.

Apéndice P. Espectros de masas teóricos de los monómeros identificados (NIST) para la identificación tentativa



(R)-3-hydroxybutyric acid, methyl ether, methyl ester

Mass Spectrum



Butanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester

Mass Spectrum

