

Síntesis de Poliglicerol Funcionalizado con Glicina para el Desarrollo de un Agente Floculante de la Biomasa de Microalgas *Chlorella vulgaris*

Luis Carlos Fonseca Herreño

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Magister en Ingeniería Química

Director:

Viatcheslav Kafarov,

ScD. En Ciencias Técnicas

Codirectores:

Gustavo Emilio Ramírez Caballero

PhD. En Ingeniería Química

Andrea Juliana Garzón Sanabria

PhD. En Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Maestría en Ingeniería Química

Bucaramanga

2018

*Este trabajo está dedicado a
las estrellas que iluminaron mis noches más oscuras:*

Sonia Susana

Sonia Smith

Diana Milena

Betho, Katty y Toto

Tabla de Contenido

Introducción	13
1. Capítulo I: Síntesis de poliglicerol	19
1.1. Materiales y métodos	20
1.1.1. Reactivos.	20
1.1.2. Metodología experimental.....	20
1.2. Resultados y discusión.....	24
1.3. Conclusiones.....	32
2. Capítulo II: Síntesis de poliglicerol-éster.....	33
2.1. Materiales y Métodos.....	34
2.1.1. Reactivos.	34
2.1.2. Metodología experimental.....	34
2.2. Resultados y discusión.....	37
2.3. Conclusiones.....	56
3. Capítulo III: Poliglicerol funcionalizado como agente floculante de la biomasa de microalgas	57
3.1. Materiales y métodos	58
3.1.1. Equipos.....	58
3.1.2. Microalgas.	59

POLIGLICEROL-GLICINA EN LA FLOCULACIÓN DE MICROALGAS	6
3.1.3. Agente floculante polimérico.	61
3.1.4. Procedimiento experimental.	61
3.2. Resultados y discusión.	63
3.3. Conclusiones.	70
Referencias.	71
Apéndices.	83

Lista de Tablas

Tabla 1. Distribución de experimentos	24
Tabla 2. Conversión molar de grupos hidroxilo lo largo de la reacción.....	28
Tabla 3. Distribución simplificada de pesos moleculares, peso molecular promedio en número (<i>Mn</i>), peso (<i>Mw</i>) e índice de polidispersidad (PDI). comparativa de condiciones.	30
Tabla 4. Distribución de experimentos fase exploratoria I.....	38
Tabla 5. Distribución de experimentos. Síntesis de poliglicerol esterificado con glicina.	47
Tabla 6. Distribución simplificada de pesos moleculares, peso molecular promedio en número (<i>Mn</i>), peso (<i>Mw</i>) e índice de polidispersidad (PDI). Comparativa de condiciones.	51
Tabla 7. Condiciones de reacción, síntesis de poliglicerol. Experimentos adicionales.....	52
Tabla 8. Conversión final de grupos hidroxilo con cada conjunto de condiciones de reacción. ..	53
Tabla 9. Distribución simplificada de pesos moleculares, peso molecular promedio en número (<i>Mn</i>), peso (<i>Mw</i>) e índice de polidispersidad (PDI). comparativa de poliglicerol.....	55
Tabla 10. Composición y preparación de Medio Basal Bold (BBM), adaptado de Algal culturing techniques (2005).....	60
Tabla 11. Condiciones experimentales de floculación	63

Lista de Figuras

Figura 1. Formación de Diglicerol.....	15
Figura 2. Mecanismos de eterificación de glicerol. i) Catálisis Ácida. ii) Catálisis Básica	16
Figura 3. Picos característicos. Espectro infrarrojo de Poliglicerol.....	25
Figura 4. Comparación de la reducción de la banda OH, FTIR-ATR	27
Figura 5. Comparación de cromatogramas HPLC-GPC, pesos moleculares relativos al final de la reacción.....	29
Figura 6. Esterificación de Fischer	33
Figura 7. Espectro infrarrojo, picos característicos	38
Figura 8. Espectro infrarrojo de la fase exploratoria I. Identificación de picos característicos....	39
Figura 9. Espectro infrarrojo, avance de la reacción a diferentes temperaturas y relaciones molares. No se evidencia la presencia de grupos amida.....	40
Figura 10. Espectro infrarrojo, estabilidad del equilibrio alcanzado	41
Figura 11. Espectro infrarrojo, formación de amida y consumo de aminas a 140 °C	42
Figura 12. Espectro infrarrojo, conservación de ésteres y aminas, ausencia de amida y ligera reducción del pico OH	43
Figura 13. Espectro infrarrojo, formación de amida, polimerización y esterificación inhibida. ..	44
Figura 14. Espectro de infrarrojo, avance de las reacciones de polimerización y esterificación. 45	
Figura 15. Espectro infrarrojo, comparación de los métodos de adición.....	46
Figura 16. Comparación del avance de la reacción con diferentes condiciones de síntesis. Reducción de la banda OH y crecimiento del pico éster. Espectro FTIR-ATR	48

Figura 17. Comparación de diferentes condiciones de síntesis luego de ocho horas de reacción. Espectro FTIR-ATR.....	49
Figura 18. Comparación de cromatogramas HPLC-GPC, pesos moleculares relativos al final de la reacción.....	50
Figura 19. Comparación de la banda O-H, Espectro FTIR-ATR.....	53
Figura 20. Comparación de cromatogramas de poliglicerol obtenidos en el capítulo 1 y sintetizados con reposición de catalizador.....	54
Figura 21. Efecto de la concentración de polímero en la recuperación de biomasa a diferentes pH.	64
Figura 22. Eficiencia de floculación a diferentes pH y concentraciones de polímero.....	65
Figura 23. Autofloculación a diferentes pH.....	66
Figura 24. Recuperación de biomasa a pH 3, avance en el tiempo de sedimentación.....	67
Figura 25. Recuperación de biomasa a pH 4, avance en el tiempo de sedimentación.....	68
Figura 26. Registro fotográfico del proceso, a) coagulación - floculación y b) sedimentación. ..	69

Lista de Apéndices

APÉNDICE A. CURVAS DE CALIBRACION: COLUMNAS HPLC-GPC	83
APÉNDICE B. INTEGRACIÓN COMPLETA DE CROMATOGRAMAS HPLC-GPC POLIGLICEROL	85
APÉNDICE C. INTEGRACIÓN COMPLETA DE CROMATOGRAMAS HPLC-GPC POLIGLICEROL-ESTER.....	89

RESUMEN

TÍTULO: SÍNTESIS DE POLIGLICEROL FUNCIONALIZADO CON GLICINA PARA EL DESARROLLO DE UN AGENTE FLOCULANTE DE LA BIOMASA DE MICROALGAS *CHLORELLA VULGARIS* *

AUTOR: LUIS CARLOS FONSECA HERREÑO **

PALABRAS CLAVE: POLIGLICEROL, ETERIFICACIÓN, ESTERIFICACIÓN, FLOCULACIÓN DE BIOMASA.

DESCRIPCIÓN:

La sobreoferta de glicerol, generado en la producción de biodiesel, se ha convertido en un problema para la industria y el ambiente. Una importante alternativa es la valorización del glicerol por medio de su transformación en productos de valor agregado como el poliglicerol hiperramificado modificado. En esta investigación se estudiaron las reacciones de polimerización de glicerol y su funcionalización con el aminoácido glicina como agente iónico, encaminado a la síntesis de un polímero catiónico con base en glicerol que pueda ser empleado como agente floculante de la biomasa de microalgas. El estudio estuvo dividido en tres etapas: la polimerización de glicerol con catálisis ácida, buscando condiciones que favorecieran el aumento del peso molecular; la esterificación de glicerol y poliglicerol con glicina, hacia la síntesis de un polímero poliamina con peso molecular elevado; y la evaluación del desempeño de este polímero como agente floculante de biomasa de microalgas. Los polímeros fueron analizados empleando cromatografía líquida HPLC-GPC y Espectroscopía infrarroja FTIR-ATR y la recuperación de biomasa se determinó por medio de absorbancia UV-Vis. Se encontró una relación entre las condiciones de síntesis y la distribución del peso molecular del poliglicerol, así como las condiciones que favorecen la esterificación de glicerol y poliglicerol con glicina. Se logró un 90% de remoción de biomasa con un pH de 4 empleando un polímero obtenido, lo cual abre las puertas a nuevas aplicaciones para polímeros obtenidos a partir de materia prima barata y renovable.

*Trabajo de investigación para obtener el título de Magister en Ingeniería Química

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química. Director: Viatcheslav Kafarov, PhD. Codirector: Gustavo Ramírez Caballero PhD. Codirectora: Andrea Juliana Garzón Sanabria, PhD.

ABSTRACT

TITLE: SYNTHESIS OF POLYGLYCEROL FUNCTIONALIZED WITH GLYCINE FOR THE DEVELOPMENT OF A FLOCCULANT OF MICROALGAE CHLORELLA VULGARIS BIOMASS*

AUTHOR: LUIS CARLOS FONSECA HERREÑO **

KEYWORDS: POLYGLYCEROL, ETHERIFICATION, ESTERIFICATION, BIOMASS FLOCCULATION.

DESCRIPTION:

Glycerol surplus has become a problem for the industry and the environment, it is obtained as by-product during the biodiesel production. An alternative is to produce a higher value product such as modified hyperbranched polyglycerol. The purpose of this research is to study the polymerization of glycerol and its functionalization using the amino acid glycine as ionic agent towards the synthesis of a cationic polymer based of glycerol for the development of a flocculant of microalgae biomass. This study has three stages: The effect of the synthesis conditions in glycerol polymerization catalyzed by acid, towards higher molecular weight; Functionalization of glycerol and polyglycerol with glycine, for the synthesis of a polyamine polymer with high molecular weight; and the evaluation of the polymer as a flocculant of microalgae biomass. The obtained polymers were analyzed under liquid chromatography HPLC-GPC and infrared spectroscopy FTIR-ATR. Biomass recovery was measured via UV-Vis absorbance. The relationship between the synthesis conditions of polyglycerol and its molecular weight distribution was found, conditions that promote the esterification of glycerol and polyglycerol with glycine were also found. Employing an obtained polymer and a pH of 4, a biomass recovery of 90 % was achieved. These results are appealing for the development of new applications of polymers based of a cheap and renewable resources.

*Thesis to obtain the degree of Magister in Chemical Engineering

** Faculty of Physicochemical Engineering, Chemical Engineering School. Advisor: Viatcheslav Kafarov, PhD. Advisor: Gustavo Ramírez Caballero PhD. Advisor: Andrea Juliana Garzón Sanabria, PhD.

Introducción

La configuración de las moléculas orgánicas es una característica de gran importancia que determina muchas de sus propiedades. Los polímeros lineales han sido ampliamente estudiados y empleados en diversas industrias, pueden alcanzar elevados pesos moleculares con una alta densidad, no obstante, tienen una funcionalidad limitada por su estructura (Reinaldo, Pereira, Silva, Ueki, & Ito, 2018; Schubert et al., 2017; Wei et al., 2017). Con el ánimo de crear macromoléculas que posean múltiples propiedades de interés, los dendrímeros se han popularizado gracias a su estructura precisa, bien definida y alta funcionalidad, dada por los grupos funcionales ubicados en la superficie molecular; la síntesis de estas moléculas se lleva a cabo por medio de reacciones largas con etapas múltiples y procesos complejos de asolación y purificación dando como resultado polímeros monodispersos de bajo peso molecular (Jikei & Kakimoto, 2001).

Los polímeros hiperramificados combinan aspectos de los polímeros lineales y dendríticos, de forma aleatoria, una cadena se puede propagar como una sección lineal o ramificarse como una sección dendrítica (Moore, Thissen, & Voelcker, 2013), la relación entre estas secciones define las propiedades finales del polímero hiperramificado; de esta manera los polímeros hiperramificados pueden presentar altos pesos moleculares como los polímeros lineales, conservando una amplia funcionalidad como los dendrímeros, con la importante diferencia de que pueden ser sintetizados en reacciones de un único paso con altos rendimientos (Moore et al., 2013). Esto ha permitido que los polímeros hiperramificados se posicionen como una alternativa económica y fácil de producir

con utilidad en diferentes áreas (S. Chen, Xu, & Zhang, 2018; Y. Chen et al., 2015; Jikei & Kakimoto, 2001; D. Wang, Jin, Zhu, & Yan, 2017).

Actualmente se busca reemplazar los polímeros obtenidos a partir de combustibles fósiles con polímeros generados a partir de recursos renovables (Parzuchowski, Świdarska, Roguszevska, Frączkowski, & Tryznowski, 2018). El poliglicerol es un polímero que puede ser obtenido a partir de la polimerización por apertura de anillo de glicidol (Ebewele, 2000; Etsuo & Shinzo, 1984; Sunder, Hanselmann, Frey, & Mülhaupt, 1999), polimerización aniónica de carbonato de glicerol (Ebewele, 2000; Rokicki, Rakoczy, Parzuchowski, & Sobiecki, 2005) o polimerización por condensación de glicerol (Ardila-Suárez, Rojas-Avellaneda, & Ramirez-Caballero, 2015; Ebewele, 2000; Salehpour & Dubé, 2011). El glicerol es producido en grandes cantidades durante la producción de biodiesel, cuya sobreoferta ha convertido en un subproducto ambientalmente gravoso (Gholami, Abdullah, & Lee, 2014; Hejna, Kosmela, Formela, Piszczyk, & Haponiuk, 2016), haciendo del poliglicerol un polímero económicamente atractivo.

El poliglicerol hiperramificado es una macromolécula químicamente estable, biocompatible (Ghasemi, Jafari, Saeidi, Mohtashami, & Salehi, 2018), con toxicidad baja o nula (Cef, 2013). Su estructura principal es una cadena poliéter saturada y posee múltiples grupos terminales hidroxilo, haciéndolo un polímero altamente hidrofílico y permitiendo su modificación por medio de reacciones de esterificación y eterificación, gracias a lo cual pueden obtenerse polímeros con diferentes grupos funcionales, *grafting* de cadenas alifáticas con funcionalidad específica y compuestos bioactivos inmovilizados para diferentes aplicaciones (Gosecki, Gadzinowski, Gosecka, Basinska, & Slomkowski, 2016; Shenoi, Lai, Imran ul-haq, Brooks, & Kizhakkedathu, 2013).

El glicerol (propano-1,2,3-triol), es un compuesto incoloro, inodoro, viscoso, higroscópico e hidrófilo, con tres grupos hidroxilo (RH, Perry; DW, 1999; Spencer, Bodner, & Rickard, 2012). El proceso de polimerización de glicerol ocurre mediante una serie de reacciones reversibles de condensación que dan origen a enlaces éter entre moléculas de glicerol, en un proceso llamado polimerización por crecimiento a pasos, en las cuales se libera una molécula de agua por cada enlace éter formado (Ebewele, 2000). En este conjunto de reacciones es necesario mantener una atmosfera inerte, generalmente de nitrógeno, para evitar reacciones no deseadas como la oxidación; y la extracción continua de agua para desplazar el equilibrio hacia los productos (Salehpour & Dubé, 2011).

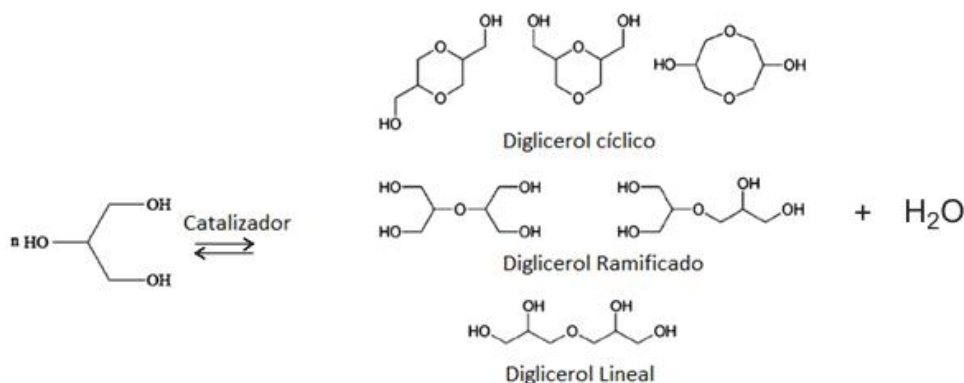


Figura 1. Formación de Diglicerol

Inicialmente, las moléculas de glicerol reaccionan entre sí para dar origen a moléculas de diglicerol, estas a su vez reaccionan con más glicerol para formar triglicerol, paralelamente ocurren reacciones entre las moléculas que se van formando (Ebewele, 2000). Como se puede observar en la Figura 1, existen tres posibles configuraciones, que afectan la morfología del polímero obtenido, al conectar dos moléculas de glicerol. Si la reacción se da entre dos hidroxilos primarios se

obtendrá un diglicerol lineal y si en la reacción se involucra al menos un hidroxilo secundario, el resultado será un diglicerol ramificado. Una vez se ha formado el diglicerol este podría reaccionar con sigio mismo, dando origen a un diglicerol cíclico. Estas configuraciones pueden darse en combinación a medida que crece el polímero.

Lo anterior resulta en la formación de moléculas de poliglicerol con ligeras variaciones en morfología y diferentes pesos moleculares que dependerán de las condiciones de reacción, así como del catalizador utilizado. Se ha encontrado que altas concentración de catalizador ácido (5.2 p/p) y elevadas temperaturas (170°C) se favorece la formación de poliglicerol ramificado mientras que a bajas concentraciones (1.5 p/p) y temperaturas menores (130°C) los poligliceroles obtenidos tienden a ser lineales, aunque no se evidencia influencia en el peso molecular y grado de polimerización (Ardila-Suárez et al., 2015). El grado de polimerización muestra la cantidad de monómeros que se han unido formando determinada molécula de polímero, mientras que la polidispersidad indica la amplitud de la distribución de pesos moleculares en una muestra (Ebewele, 2000).

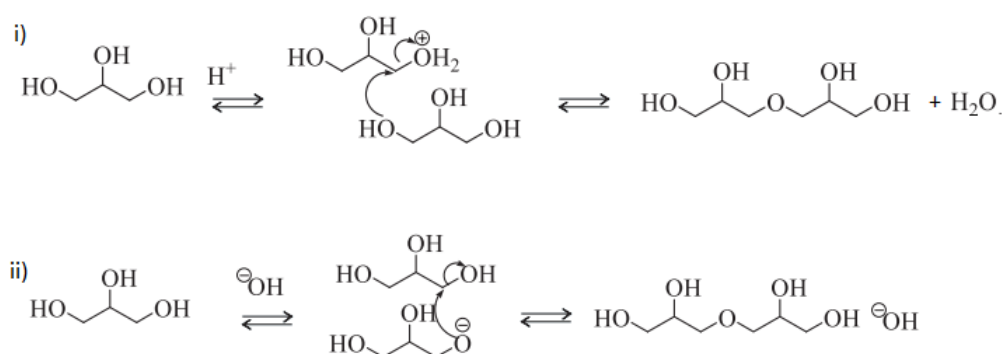


Figura 2. Mecanismos de eterificación de glicerol. i) Catálisis Ácida. ii) Catálisis Básica

El uso de catalizadores ácidos resulta en reacciones más rápidas, polímeros más ramificados y con mayor grado de polimerización que cuando se usan catalizadores básicos (Etsuo & Shinzo, 1984; Salehpour & Dubé, 2011). Como se ilustra en la Figura 2, los catalizadores ácidos actúan protonando un hidroxilo primario, facilitando la salida de este grupo. El enlace carbono-oxígeno se polariza y consecuentemente un hidroxilo de otra molécula ataca el carbocatión para formar el enlace éter (Wade, 2013). Alternativamente, un catalizador básico deprotona el hidroxilo formando un alcóxido (nucleófilo), seguidamente el alcóxido atacara el carbono unido a uno de los hidroxilos primarios estableciendo un enlace éter y liberando el hidróxido (Salehpour & Dubé, 2011).

La funcionalización del poliglicerol puede llevarse a cabo mediante reacciones de eterificación y esterificación que permitan incluir grupos funcionales y fracciones de otras moléculas con propiedades de interés, con lo que se obtienen polímeros adaptados a necesidades específicas (Gholami et al., 2014; Gosecki et al., 2016; Jikei & Kakimoto, 2001). Los polímeros con múltiples sitios aminados, que brindan carácter catiónico, son de gran interés por su aplicación en la industria farmacéutica (Fischer, Calderón, & Haag, 2010), cosmética (Fevola, Sun, & York, 2012), y como agentes emulsificantes, surfactantes y floculantes (Gholami et al., 2014; Postnova et al., 2013; Salehpour, 2012; Vandamme, Foubert, & Muylaert, 2013). La funcionalización de poliglicerol con grupos amina puede obtenerse como producto de reacciones de esterificación entre los múltiples grupos hidroxilo del polímero y moléculas de aminoácidos como la glicina, que al ser el aminoácido más sencillo representa un buen punto de partida para su estudio. Esta reacción se conoce como esterificación de Fischer y ocurre específicamente con alcoholes primarios y secundarios con catalizador ácido (Morrison & Boyd, 1998; Wade, 2013).

La floculación de biomasa de microalgas utilizando polímeros con base biológica ha sido un foco de interés en los últimos años, presentándose como una alternativa a los floculantes convencionales que contienen componentes tóxicos (Bratby, 2006; Okuda, Baes, Nishijima, & Okada, 1999) y otros métodos de separación como la centrifugación o microfiltración resultan costosos para muchas aplicaciones (Brennan & Owende, 2010; Schlesinger et al., 2012; Uduman, Qi, Danquah, Forde, & Hoadley, 2010). El peso molecular y la densidad de carga del polímero son las variables que tienen el mayor impacto en la eficiencia de separación de la biomasa de microalgas del medio acuoso (Garzon-Sanabria, Ramirez-Caballero, Moss, & Nikolov, 2013).

Esta investigación busca estudiar el efecto de las condiciones de síntesis sobre las propiedades finales del poliglicerol y su funcionalización con glicina con miras al desarrollo de un agente floculante de la biomasa de microalgas con base en glicerol, dando valor a una materia prima abundante y económica dentro de un ciclo productivo renovable. Este informe se encuentra dividido en tres capítulos, a lo largo de los cuales se presentan las fases del estudio desde la síntesis de polímeros hasta su aplicación en la floculación de biomasa de microalgas.

1. Capítulo I: Síntesis de poliglicerol

En el marco de la globalización económica, la producción y consumo de combustibles de transporte incrementa continuamente. En 2017 el consumo global de petróleo ascendió a 98.186 millones de barriles al día, y la reserva mundial probada de petróleo fue de 1.697 billones de barriles (BP, 2018). Según las estimaciones del Panel Intergubernamental del Cambio Climático (IPCC), la temperatura se elevará en 1.4-5.8 °C mientras que la Convención Marco de Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, se planteó la meta en 2012 de mantener el aumento por debajo de 2 °C, para lo cual deberían reducirse las emisiones de gases con efecto invernadero (GHG).

Una importante alternativa energética es la producción de biocombustibles, los cuales representan una fuente de energía sostenible con bajo índice de carbono y fácilmente adaptables a las condiciones de almacenamiento y transporte existentes (Su, Zhang, & Su, 2015). Este es el caso del biodiesel, que utiliza biomasa como materia prima, la cual se ha consolidado como un recurso renovable importante en muchos campos como la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria (Muto et al., 2016; Rawat, Ranjith Kumar, Mutanda, & Bux, 2013; Yusuf, 2007).

En la industria del biodiesel, cerca del 10% de la producción en peso es convertido en glicerol crudo, el cual podría representar un problema ambiental requiriendo inversión adicional para su tratamiento y afectando el potencial económico del proceso. En los últimos años se ha planteado utilizar el glicerol, subproducto de la producción de biodiesel, para sintetizar poliglicerol y otros

productos de valor agregado (Gholami et al., 2014; Guerrero-Urbaneja et al., 2014; Hejna et al., 2016).

El poliglicerol es un polímero con base biológica, viscoso, altamente soluble en agua y no volátil a temperatura ambiente; posee numerosos grupos hidroxilo que le otorgan alta funcionalidad y reactividad (Oudshoorn, Rissmann, Bouwstra, & Hennink, 2006). Los numerosos grupos hidroxilos que componen al poliglicerol lo convierten en un buen candidato para conformar la base de diferentes materiales poliméricos (Barrault, Clacens, & Yannick, 2001; Salehpour & Dubé, 2011) mediante su funcionalización con ácidos orgánicos (esterificación) y alcoholes (eterificación) con propiedades de interés según su aplicación final.

En esta sección se presentará a detalle el estudio realizado para determinar la influencia de la temperatura y presión de vacío en las propiedades el poliglicerol sintetizado a partir de glicerol con catálisis ácida.

1.1. Materiales y métodos

Los materiales, métodos y equipos utilizados para la síntesis y caracterización serán descritos a continuación.

1.1.1. Reactivos. Para el desarrollo experimental se empleó glicerol con 98% de pureza de laboratorios León como único reactivo y ácido sulfúrico con 95-98% de pureza de Merck como catalizador.

1.1.2. Metodología experimental. A continuación, se describirá la metodología, condiciones y equipos utilizados para el desarrollo de los experimentos.

1.1.2.1. Variables de operación. Se fijaron las condiciones cuya variación, según trabajos anteriores y pruebas preliminares (Ardila-Suárez et al., 2015; Guerrero-Urbaneja et al., 2014; Salehpour & Dubé, 2011), no incurre en un efecto importante para el peso molecular.

La agitación se mantuvo en 600 rpm con el fin de homogenizar la mezcla reaccionante; el flujo de nitrógeno se estableció en 200 STD mL/min para renovar la atmosfera inerte y arrastrar el vapor generado en la reacción. La concentración de catalizador se mantuvo fija e igual a la determinada por Salehpour (2012) correspondiente a 4.8% molar con base en el índice de hidroxilo del glicerol. Las variables de estudio fueron temperatura con valores de 120, 140 y 160 °C; y presión de vacío de 15 y 20 inHg.

Pretratamiento estándar. El glicerol fue concentrado utilizando un roto evaporador (Hei-VAP Precision, Heidolph), a temperatura de 80 °C, presión de vacío de 24.5 inHg y velocidad de rotación de 80 rpm durante 2.25 horas por cada 500 mL. Lo anterior con el fin de utilizar el reactivo a las mismas condiciones en cada experimento y reducir errores por humedad. El balón donde se llevó a cabo la reacción se secó en un horno a 80 °C durante 90 minutos antes de cada reacción.

Procedimiento experimental. Para cada reacción se siguieron los siguientes lineamientos y especificaciones:

En un balón de vidrio con fondo plano marca SIMAX de 250 mL, se introdujo 30 mL de glicerol y una barra de agitación magnética de 2.5cm. El balón es acoplado a una plancha con agitación (MR Hei-Tec, Heidolph) por medio de un bloque de calentamiento de fluoro polímero para balones de 250 mL marca Radleys; también se empleó como fluido de intercambio térmico 15 mL de aceite mineral y un termopar externo para cerrar el lazo de control de temperatura.

En la boca del balón se ubica un corcho de goma PET con 4 orificios para las conexiones del montaje: entrada de nitrógeno grado 5.0 (Linde) para generar una atmosfera inerte a razón de 200

STD mL/min, el cual fue medido con un rotámetro Cole-Parmer calibrado para nitrógeno; Succión de vacío por medio de una bomba de vacío Welch 2581, para retirar el agua producida por la reacción, mantener una presión constante y desplazar el equilibrio de la reacción hacia los productos; un termo pozo llenado con aceite mineral y acoplado a un termopar digital Heidolph para censar la temperatura interna del reactor; el cuarto orificio fue utilizado para tomar muestras y adicionar catalizador.

Se llevó a cabo un precalentamiento de 30 minutos con agitación de 600 rpm para estabilizar a la temperatura deseada. Se adicionó 1,1 mL de catalizador, correspondientes a 4.8% y se da inicio a la reacción con una duración correspondiente al 90% del tiempo gel para cada conjunto de condiciones. Se tomó una muestra de 1 mL al comienzo y cada 30% del tiempo gel hasta culminar; cada reacción se realizó por duplicado.

Caracterización. Para las pruebas de caracterización se emplearon técnicas que midieran las propiedades de interés como peso molecular, polidispersidad y grupos funcionales.

Los análisis utilizados fueron: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada para identificar la presencia de grupos funcionales y cromatografía líquida por exclusión de tamaño en permeación de gel, para medir el peso molecular y su distribución

Cromatografía líquida por exclusión de tamaño. Las pruebas se llevaron a cabo en un cromatógrafo de líquidos SHIMADZU Prominence, operado a 30 °C, flujo de 0.5 mL/min y utilizando agua tipo 1 como fase móvil y un detector de índice de refracción.

Se emplearon 2 columnas específicas para polímeros solubles en agua, una TSKgel5000PWXL para pesos en el rango de 4-1000 kDa y una TSKgel3000PWXL para pesos menores a 40kDa. La

curva de calibración se construyó con 20 estándares de polietilenglicol para todo el rango de ambas columnas. La curva de calibración puede apreciarse en el Apéndice A.

La configuración que se empleó para determinar los pesos moleculares fue un arreglo en serie con ambas columnas acoplando ambas columnas por medio de un tubing con calibre de 0.1 mm y 40 cm de longitud, este tipo de arreglos es válido cuando se usan conexiones de bajo calibre y muestran una mejora en la resolución de los cromatogramas (Campbell, Roe, & Way, 2007; Gilbert, 1987) , primero se ubicó la columna TSKgel3000PWXL y en segundo lugar la TSKgel5000PWXL con un tiempo de adquisición de datos de 60 minutos. Se hizo pasar un volumen de columna de fase móvil entre cada muestra para evitar cruce de muestras y contaminación.

Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada.

Para esta técnica se utilizó un espectrómetro Nicolet iS50 FTIR con modulo ATR, las muestras se homogenizaron y se dispusieron sobre el cristal ATR sin ningún tipo de preparación adicional. Con el fin de facilitar la identificación de muestras con alto contenido de sustancias fuertemente absorbentes, como es el agua, se tomaron 32 barridos para el blanco y 32 barridos para cada muestra, en nuestro caso, un blanco de aire fue suficiente para llevar acabo dicho seguimiento. Los datos fueron procesados por el software OMNIC, propio del equipo, y fueron analizados en porcentaje de transmitancia.

1.2. Resultados y discusión

Los resultados comparativos de los experimentos de síntesis, caracterización, su interpretación y análisis serán discutidos en esta sección.

Se realizaron 6 experimentos por duplicado variando la presión de vacío en dos niveles y la temperatura en 3 niveles, tomando muestras cada 30% del tiempo gel, de manera que se pudieran comparar los seis conjuntos de condiciones bajo un mismo parámetro. Los experimentos y la toma de muestra fueron distribuidos como se muestra a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1. Diseño de experimentos

Reacción-Muestra	Temperatura [°C]	Presión [inHg]	Tiempo [min]	% Tiempo gel
1-1			8	30
1-2	160	20	16	60
1-3			24	90
2-1			15	30
2-2	160	15	30	60
2-3			45	90
3-1			40	30
3-2	140	20	80	60
3-3			120	90
4-1			75	30
4-2	140	15	150	60
4-3			225	90
5-1			160	No alcanzó punto de gel
5-2	120	20	320	
5-3			480	
6-1			160	No alcanzó punto de gel
6-2	120	15	320	
6-3			480	

Los experimentos 5 y 6 no alcanzaron el punto de gel dentro de las 8 horas en las que se observó la reacción, es importante mencionar que para estas reacciones la viscosidad aparente no sufrió cambios significativos a lo largo del tiempo de polimerización.

Para realizar un análisis cuantitativo a partir de los espectros de infrarrojo es necesario identificar los picos característicos del poliglicerol y confrontarlos con la literatura disponible, el resultado de esto se puede apreciar en la Figura 3 a continuación:

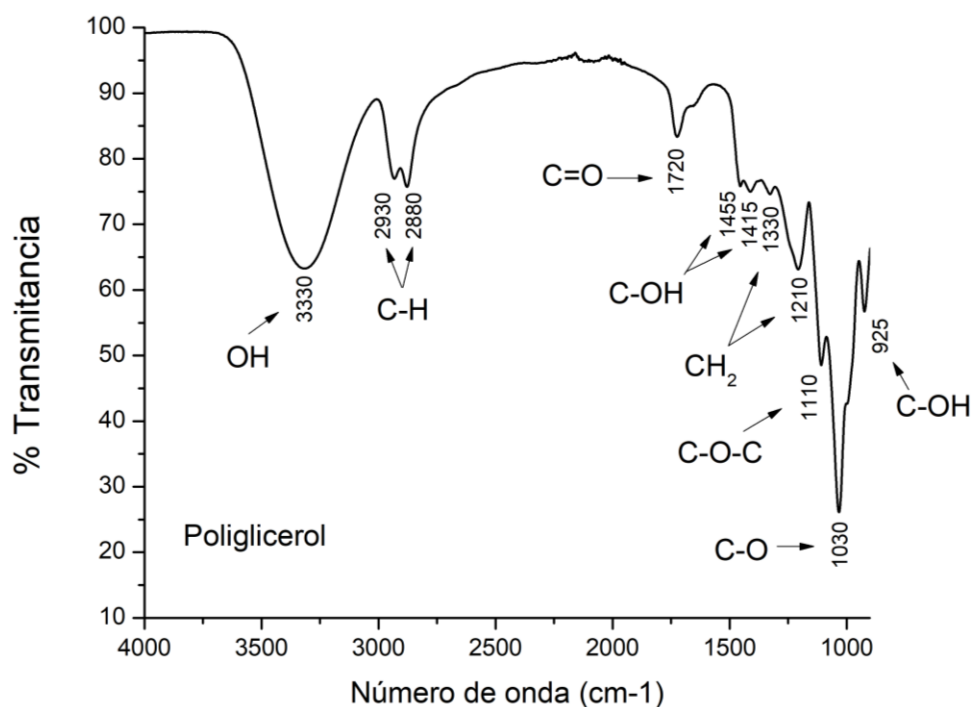


Figura 3. Picos característicos. Espectro infrarrojo de Poliglicerol

En todas las muestras analizadas la razón señal-ruido fue lo suficientemente grande para identificar los picos característicos, según Salehpour y Dubé (2012) una resolución de 4 cm^{-1} es suficiente para picos finos con una alta razón señal-ruido en este tipo de muestras.

En la región de grupos funcionales, entre 4000 y 1500 cm^{-1} , se observan 3 zonas de absorción, la primera, en 3330 cm^{-1} , corresponde al estiramiento de los grupos OH (Socrates, 2007); la segunda, alrededor de 2900 cm^{-1} , es una banda bimodal que se debe al estiramiento de los enlaces

C-H y el pico en 1730 cm^{-1} es atribuido a la oxidación del glicerol en una reacción no deseada que resulta en subproductos como la acroleína (Salehpour & Dubé, 2012). En la región de “huella dactilar”, entre 1500 y 700 cm^{-1} , se encuentran varios picos que se solapan entre sí; la absorción en esta zona puede deberse a deformaciones en las moléculas, en esta zona se presentan picos debidos a la estructura molecular y combinación de bandas que se deforman en números de onda muy cercanos (Socrates, 2007). Entre estos se pueden identificar flexiones del grupo C-H₂ (1500 - 1200 cm^{-1}), estiramientos del enlace C-O (1200 - 900 cm^{-1}), estiramientos de los enlaces C-O-C (1290 - 1100 cm^{-1}) y flexión en el enlace C-OH (950 - 900 cm^{-1}) (Pretsch, Bullmann, & Affolter, 2000; Socrates, 2007).

Aunque la zona de huella dactilar es importante para la confirmación de grupos funcionales y teniendo en cuenta que en esta región los picos se solapan, su uso resulta más útil para descartar grupos por medio de gráficos de correlación negativa como las disponibles en el libro de interpretación de George Socrates (2004), que permiten excluir grupos funcionales cuando no se presentan picos específicos. Por esto se escogió la región de grupos funcionales para calcular la conversión de grupos hidroxilo, tomando como base la banda a 3330 cm^{-1} y comparando el cambio en la absorbancia en esta banda a lo largo de las reacciones de polimerización. El análisis cuantitativo fue posible gracias a que, siguiendo la ley de Beer-Lambert (Smith, 2011), es correcto asumir que la concentración molar es proporcional a la absorbancia, es decir, la altura del pico. En un principio se había pensado en realizar esta relación integrando los picos similar a como se hace en cromatografía, sin embargo, en estudios anteriores se concluyó que esta relación es más consistente con las alturas que con las áreas de los picos (Dubé & Li, 2010; Fonseca, Dubé, & Penlidis, 2009; Patel, Bakeev, Chen, Zhang, & Wan, 2010; Roberge & Dubé, 2007), por tanto, la conversión de grupos hidroxilo se calculó con la siguiente ecuación:

$$x[\%mol] = \left(\frac{\text{Altura de de pico inicial} - \text{Altura de de pico final}}{\text{Altura de de pico inicial}} \right) \times 100 \quad \text{Eq-1}$$

Una representación gráfica en donde se muestra el avance de la reacción como una reducción de picos, puede observarse a continuación en la Figura 4, donde se puede apreciar que el mayor cambio ocurre en las reacciones 3 y 4.:

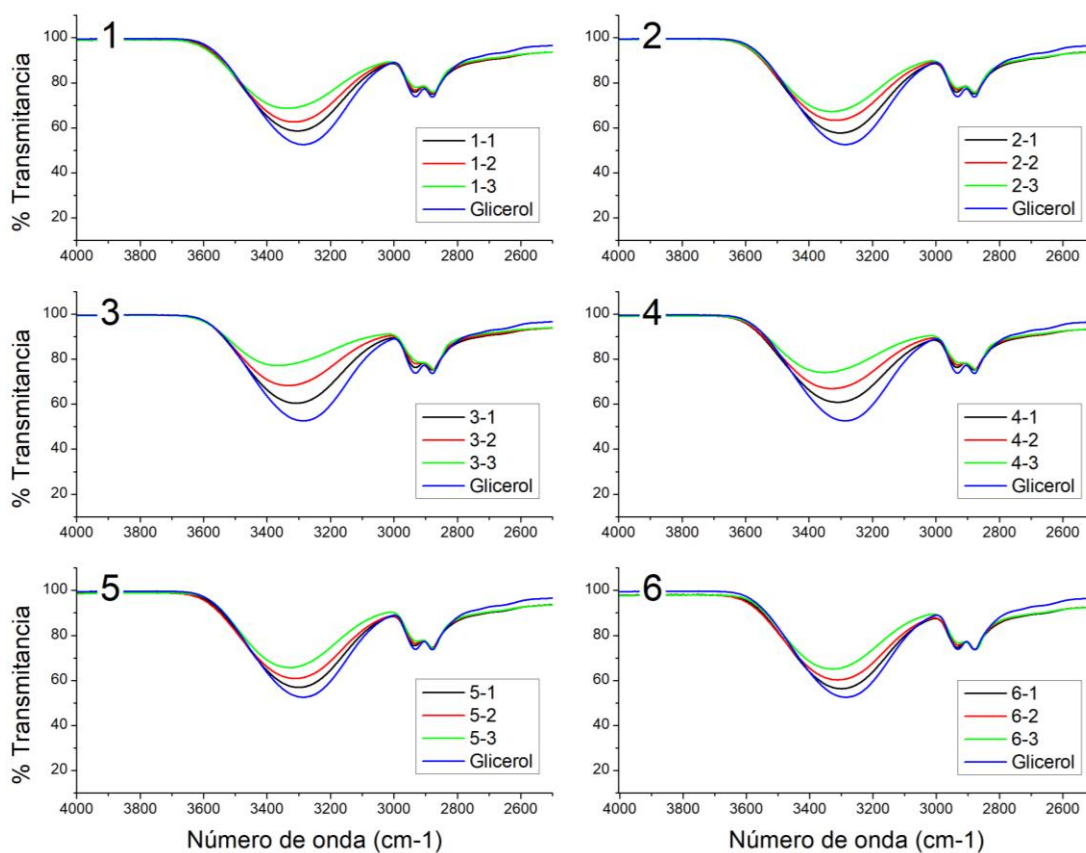


Figura 4. Comparación de la reducción de la banda OH, FTIR-ATR

Aplicado la ecuación 1, se obtiene la conversión para cada reacción, dichas conversiones se encuentran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Conversión molar de grupos hidroxilo lo largo de la reacción

Avance en tiempo de reacción	33.33 %	66.66 %	100 %
Reacción	Conversión		
1	13.22 %	22.27 %	36.28 %
2	11.23 %	23.82 %	32.99 %
3	17.27 %	35.57 %	55.78 %
4	18.16 %	32.04 %	48.59 %
5	9.49 %	18.41 %	30.08 %
6	8.29 %	17.12 %	28.67 %

En la Tabla 2 se evidencia que a 140 °C (reacciones 3 y 4) la conversión de grupos hidroxilo es la más alta, alrededor del 50%; mientras que las reacciones 5 y 6 que no alcanzaron punto de gel muestra una conversión de 30%, la cual es bastante baja si se tiene en cuenta el tiempo de reacción. En cuanto a las reacciones 1 y 2, tienen una conversión alrededor del 35%, sin embargo, son las reacciones que más rápido alcanzan el punto de gel. Lo anterior puede explicarse debido a que en los experimentos 1 y 2 la alta temperatura fomenta un avance de reacción más rápido, pero también menos ordenado, lo cual resulta en un mayor número de ramificaciones y entrecruzamientos que elevan la viscosidad del polímero y lo llevan a punto de gel sin que puedan reaccionar los hidroxilos restantes (Oudshoorn et al., 2006).

La Figura 5 compara cromatogramas de seis diferentes grupos de condiciones de polimerización de glicerol y está dividida en tres zonas: peso molecular alto (PM-Alto), para moléculas mayores a 100kDa; peso molecular moderado (PM-Moderado), entre 10kDa y 100kDa; y peso molecular bajo (PM-Bajo), para moléculas menores a 10kDa. Todas las muestras aquí representadas fueron tomadas al 90% del tiempo gel con excepción de las reacciones 5 y 6 en las cuales no se alcanzó el punto de gel, en su lugar se muestra el producto de 8 h de reacción.

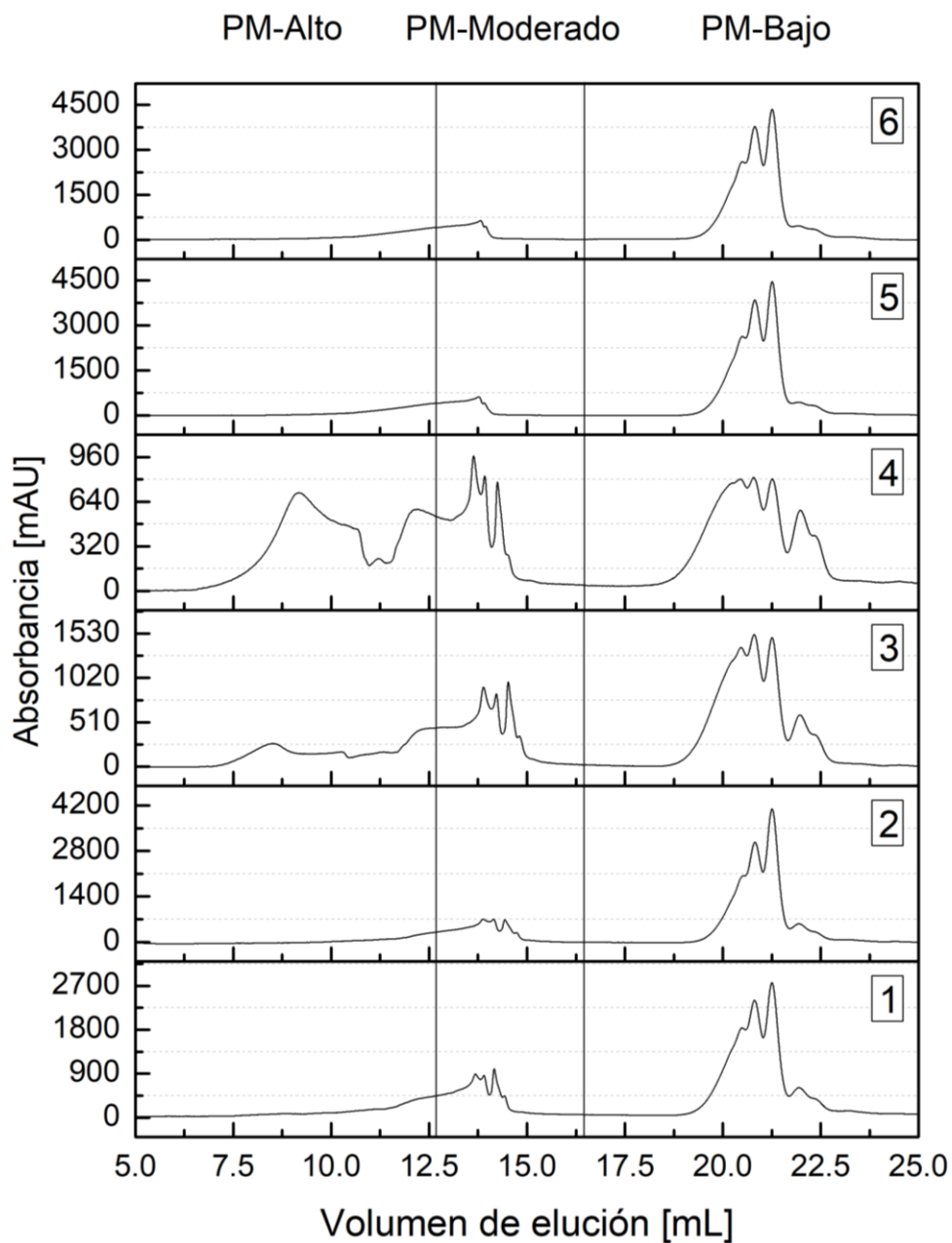


Figura 5. Comparación de cromatogramas HPLC-GPC, pesos moleculares relativos al final de la reacción.

La Figura 5 indica que para obtener un alto grado de polimerización y por consiguiente mayor peso molecular, las condiciones más apropiadas son 140 °C y 15 inHg, sin embargo, la distribución de pesos es considerablemente amplia.

Tabla 3. Distribución simplificada de pesos moleculares, peso molecular promedio en número (\overline{M}_n), peso (\overline{M}_w) e índice de polidispersidad (*PDI*). comparativa de condiciones.

Reacción	1	2	3	4	5	6
PM-Alto	0.00%	0.00%	9.96%	44.33%	0.00%	0.00%
PM-Moderado	29.78%	30.19%	35.09%	17.28%	17.04%	17.62%
PM-Bajo	70.22%	69.81%	54.95%	38.39%	82.96%	82.38%
\overline{M}_n [kDa]	16.244	15.457	116.946	325.641	9.256	9.563
\overline{M}_w [kDa]	53.729	50.611	859.158	888.937	52.261	52.304
PDI	3.31	3.27	7.35	2.73	5.65	5.47

En la Tabla 3 se presenta la distribución simplificada de los pesos moleculares para cada producto de reacción, La integración completa puede ser encontrada en el Apéndice B. En esta tabla se reitera que las reacciones 3 y 4 son las que alcanzan un mayor grado de polimerización, especialmente la reacción 4, en la cual se logra un incremento notable del peso molecular con un 44.33% en la zona de alto peso molecular. Esta distribución y demás parámetros fueron calculados teniendo en cuenta los lineamientos y definiciones de trabajos previos (Mohd Noor et al., 2016; Rogošić, Mencer, & Gomzi, 1996) con las ecuaciones que se muestran a continuación.

$$\overline{M}_n = \frac{\sum M_i N_i}{\sum N_i} \quad \text{Eq-2}$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum M_i^2 N_i}{\sum M_i N_i} \quad \text{Eq-3}$$

$$PDI = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} \quad \text{Eq-4}$$

Donde \overline{M}_n es peso molecular promediado en número, \overline{M}_w es peso molecular promediado en peso, *PDI* es índice de polidispersidad, N_i es el número de moles del polímero *i* y M_i es la masa del polímero *i*.

Las reacciones que se llevaron a cabo a 160 y 120 °C mostraron resultados similares tanto en la conversión (FTIR-ATR) como en la distribución y pesos moleculares (HPLC-GPC), no obstante, las reacciones a 160 °C siempre tuvieron mayor conversión de grupos hidroxilo y mayor peso molecular promedio en comparación. Esto no necesariamente indica que la condición de temperatura de 120 °C deba ser descartada, ya que es probable que, al ser una temperatura baja, la reacción lenta favorezca la linealidad y a largo plazo se obtenga un peso molecular considerablemente alto, una distribución más uniforme y mayor conversión de grupos hidroxilo, sin embargo, resulta poco práctico realizar reacciones mucho más largas con el montaje que se ha definido para este estudio y se saldría del alcance de este.

La polidispersidad es alta en los polímeros que presentan picos de baja intensidad muy alejados de los picos principales, mientras que en polímeros como el 4, al tener todos sus picos de tamaño similar, enmascara la amplia distribución que presenta y tanto el peso molecular promediado en peso como el peso molecular promediado en número se ven equilibrados permaneciendo relativamente cercanos y resultando en un índice de polidispersidad más bajo.

Por otra parte, la presión de vacío no parece tener un efecto importante en la conversión, distribución de peso molecular y grado de polimerización, no obstante, se evidencia su efecto en los tiempos de reacción, ya que en todos los casos el tiempo en alcanzar el punto de gel se redujo aproximadamente en un 50% con una presión de vacío de 20 inHg con respecto a una presión de vacío de 15inHg.

1.3. Conclusiones

Fue posible, mediante las condiciones de 140 °C y 15 inHg, la síntesis de poliglicerol con peso molecular promedio de 325.641 kDa y una distribución con un 44% de las moléculas con pesos superiores a 100 kDa, utilizando glicerol como materia prima. Estas condiciones son selectivas para un peso molecular alto.

Se obtuvo poliglicerol en punto de gel con peso molecular promedio de 16.244 kDa y una distribución con 70% de las moléculas con pesos inferiores a 10 kDa, mediante las condiciones de 160 °C y 20 inHg de presión de vacío.

La temperatura tiene un fuerte efecto en las propiedades finales del polímero. La conversión, el grado de polimerización y el peso molecular se beneficiaron bajo condiciones de temperatura moderadas (140°C) ya que a temperaturas bajas la reacción avanza más lentamente y fomenta los enlaces de hidroxilo primarios, permitiendo que el polímero crezca más antes de alcanzar el punto de gel.

La presión de vacío es una variable importante que afecta fuertemente el tiempo de reacción, debido a que al retirar continuamente el vapor de agua generado se desplaza el equilibrio hacia los productos aumentando la velocidad de reacción. No se evidenció un efecto significativo en las propiedades finales del polímero, Aunque de manera general, 15 inHg de succión de vacío permitió un mayor grado de polimerización, la conversión de grupos hidroxilo fue más alta con una succión de 20 inHg.

2. Capítulo II: Síntesis de poliglicerol-éster

Para la funcionalización del poliglicerol es de particular interés la esterificación con ácidos orgánicos, esterificación de Fischer, que consiste en una reacción reversible catalizada por ácido y cuyos productos son el éster y agua, como se ilustra en la Figura 6. La funcionalidad la aportaran los grupos adicionales del ácido orgánico, este deberá ser escogido según las características de interés. Para este estudio es importante dar un carácter catiónico al polímero, lo cual puede lograrse mediante la esterificación con aminoácidos.

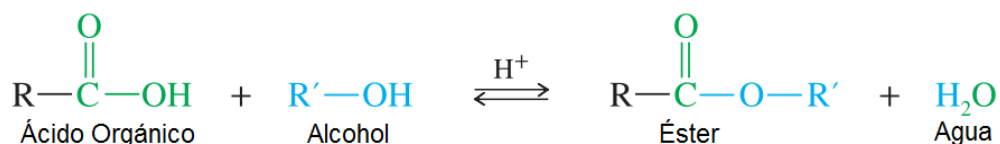


Figura 6. Esterificación de Fischer

Los aminoácidos son moléculas orgánicas que poseen simultáneamente grupos amina y ácido, esta particularidad les permite tener carácter catiónico, aniónico o neutro, dependiendo del pH (Wade, 2013). El valor de pH en el cual las cargas positivas de los grupos amina y las cargas negativas de los grupos ácidos se encuentra en equilibrio, dando como resultado una carga neta igual a cero, se denomina punto isoeléctrico, y depende de los pKa de cada grupo presente.

Los aminoácidos se esterifican con exceso de alcohol y en presencia de un catalizador ácido (Li & Sha, 2008), de esta manera el grupo amina se protona sin interferir en la esterificación (Morryson & Boyd, 1998). Teniendo en cuenta que la esterificación al igual que la esterificación

se beneficia de la continua extracción de agua, y ocurre con catálisis ácida, es probable efectuar la polimerización y funcionalización en un solo paso.

En esta sección se presentará el estudio realizado para la determinación de la influencia de la temperatura, presión de vacío, concentración de catalizador y concentración de glicina en la obtención de poliglicerol funcionalizado; las reacciones secundarias que tienen lugar y alternativas de síntesis. Se encontrarán conjuntos de condiciones que favorece la formación del producto de interés y se realizará una comparación entre estos.

2.1. Materiales y Métodos

Los materiales, métodos y equipos utilizados para la síntesis y caracterización se describen a continuación:

2.1.1. Reactivos. Para el desarrollo experimental se empleó glicerol con 98% de pureza de laboratorios León, glicina *ReagentPlus* de SIGMA con 99% de pureza y ácido sulfúrico con 95% de pureza de Merck.

2.1.2. Metodología experimental. Se describirá la metodología, condiciones y equipos utilizados durante el desarrollo de este estudio.

2.1.2.1. Variables de operación. Se fijaron las condiciones cuya variación en pruebas preliminares y trabajos anteriores (Urban, 2016), no incurre en un efecto importante para este tipo de reacciones. La agitación se mantuvo en 600 rpm con el fin de homogenizar la mezcla reaccionante; el flujo de nitrógeno se estableció en 200 STD mL/min para renovar la atmosfera inerte y arrastrar el vapor generado por la reacción. Las variables de estudio fueron: la temperatura en un intervalo de 100-160 °C; la presión de vacío de 15 y 20 inHg; la concentración de catalizador en tres niveles 2.2, 3.5 y 4.8 % molar, bajo, medio y alto respectivamente; y la relación molar de

glicina, con respecto a la concentración molar de grupos hidroxilo, desde 12.5×10^{-3} hasta 0.2; dichas relaciones molares se definieron con base en el número de moles de grupos hidroxilo aportados por el glicerol. Es preciso señalar que algunas de las variables anteriormente mencionadas se fijaron como resultado de los experimentos exploratorios.

Pretratamiento estándar. El glicerol fue concentrado utilizando un roto evaporador Hei-VAP Precision marca Heidolph, a temperatura de 80 °C, presión de vacío de 24.5 inHg y velocidad de rotación de 80 rpm durante 2.25 horas por cada 500 mL. Esto se realizó con el fin de utilizar el reactivo a las mismas condiciones en cada experimento y reducir errores en por humedad, ya que se trata de una sustancia altamente higroscópica. El balón donde se llevó a cabo la reacción se secó en un horno a 80 °C durante 90 minutos antes de cada reacción. La masa de glicina a utilizar fue pesada en una balanza digital Precisa 321 LS con protector contra corrientes de aire.

Procedimiento experimental. Para cada reacción se siguieron los siguientes lineamientos y especificaciones:

En un balón de vidrio de 250 mL con fondo plano marca SIMAX, se introdujo 30 mL de glicerol, la masa de glicina correspondiente al experimento y una barra de agitación magnética de 2.5 cm. El balón es acoplado a una plancha con agitación MR Hei-Tec marca Heidolph por medio de un bloque de calentamiento de fluoro polímero para balones de 250 mL marca Radleys; se empleó como fluido de intercambio térmico 15 mL de aceite mineral y un termopar externo para cerrar el lazo de control de temperatura.

En la boca del balón se ubica un corcho de goma PET con 4 orificios para las conexiones del montaje: entrada de nitrógeno grado 5.0 (Linde) para generar una atmosfera inerte a razón de 200 STD mL/min, el cual fue medido con un rotámetro, marca Cole-Parmer calibrado para nitrógeno; succión de vacío por medio de una bomba de vacío, marca Welch 2581, para retirar el agua

producida por la reacción, mantener una presión constante y desplazar el equilibrio de la reacción hacia los productos; un termo pozo llenado con aceite mineral y acoplado a un termopar digital, marca Heidolph, para censar la temperatura interna del reactor; el cuarto orificio fue utilizado para tomar muestras y adicionar catalizador.

Se llevó a cabo un precalentamiento de 30 minutos con agitación de 600 rpm para estabilizar a la temperatura deseada. Se adicionó la cantidad de catalizador correspondiente al experimento y se da inicio a la reacción con una duración variable para cada conjunto de condiciones. Se tomó una muestra de 1 mL al comienzo, cada hora y al culminar. Cada reacción se realizó por duplicado.

Caracterización. Para las pruebas de caracterización se emplearon técnicas que midieran las propiedades de interés, específicamente peso molecular y grupos funcionales. Las pruebas escogidas fueron: cromatografía líquida por exclusión de tamaño en permeación de gel, para medir el peso molecular y su distribución; y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada para identificar grupos funcionales.

Cromatografía líquida por exclusión de tamaño. Las pruebas se llevaron a cabo en un cromatógrafo de líquidos SHIMADZU Prominence, operado a 30 °C, flujo de 0.5 mL/min y utilizando agua tipo 1 como fase móvil. Se emplearon 2 columnas específicas para polímeros solubles en agua, una TSKgel5000PW_{XL} para pesos en el rango de 4-1000 kDa y una TSKgel3000PW_{XL} para pesos de 0.1-40kDa. La curva de calibración se construyó con 20 estándares de polietilenglicol para todo el rango de ambas columnas, esta puede ser encontrada en el Apéndice A.

Al igual que en el capítulo anterior, para el análisis de los polímeros se empleó un arreglo en serie con ambas columnas de manera que las muestras pasaran primero por la TSKgel3000PW_{XL}, después por la TSKgel5000PW_{XL} y finalmente por un detector de índice de refracción. El tiempo

de adquisición de datos fue de 60 minutos y se limpió el arreglo con un volumen de columna entre cada muestra para evitar el cruce de muestras y contaminación.

Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada.

Para esta técnica se utilizó un espectrómetro Nicolet iS50 FTIR con modulo ATR, las muestras se homogenizaron previamente y se dispusieron sobre el cristal ATR sin ningún tipo de preparación adicional. Se tomaron 32 barridos para el blanco y 32 barridos para cada muestra, estos datos fueron procesados por el software OMNIC, propio del equipo, y fueron analizados en porcentaje de transmitancia.

2.2. Resultados y discusión

Los resultados comparativos de los experimentos de síntesis, caracterización, su interpretación y análisis se discutirán en esta sección.

Teniendo en cuenta los grupos funcionales presentes, hidroxilo, carboxilo y amino, las reacciones principales que pueden tener lugar son reacciones de oxidación, cuya consecuencia es la pérdida de hidroxilos lo cual la hace una reacción indeseada; eterificación, que corresponde principalmente a la polimerización; esterificación cuya ocurrencia implica la funcionalización; y amidación, siendo una reacción indeseada ya que tiene lugar cuando dos moléculas de glicina reaccionan entre sí.

Se realizaron 22 experimentos exploratorios con el fin de encontrar condiciones a las cuales se redujeran las reacciones no deseadas y se favoreciera la esterificación. Se utilizó espectroscopia FTIR-ATR para determinar la presencia o ausencia de los grupos amida, éster y la reducción molar de hidroxilos. Las bandas de absorción de dichos grupos fueron tomados de libros de

espectroscopia infrarroja (Derrick, Landry, & Stulik, 1999; Smith, 2011; Socrates, 2007) y se ven representadas en la figura a continuación:

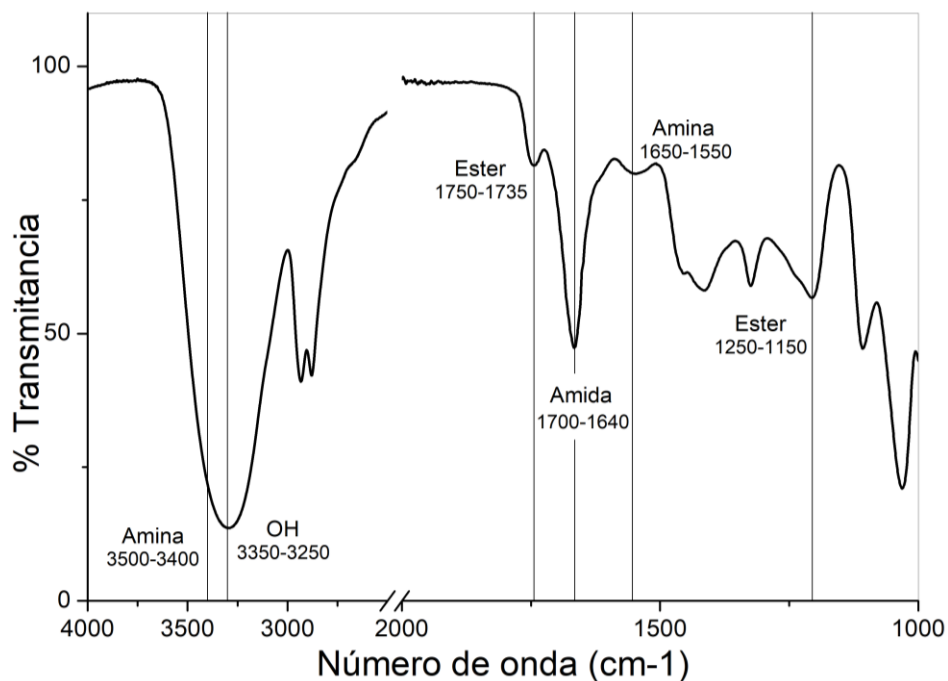


Figura 7. Espectro infrarrojo, picos característicos

La primera parte de la fase exploratoria se realizó con seis experimentos haciendo variaciones en la temperatura, desde 120 hasta 160 °C. también se fijó la presión de vacío en 15 inHg y la concentración de catalizador en 4.8%. Se alternó la relación molar de glicina/ grupos OH del glicerol como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4. Distribución de experimentos fase exploratoria I

Experimento	Temperatura [°C]	Relación molar
E-GGC-1	120	0.1
E-GGC-2		0.2
E-GGC-3	140	0.1
E-GGC-4		0.2
E-GGC-5	160	0.1
E-GGC-6		0.2

Los experimentos se nombraron “E” para indicar que hace parte de la fase exploratoria y “GGC” para indicar que la mezcla reaccionante es glicerol-glicina. Se tomaron muestras cada hora hasta completar 8 horas de reacción y en todos los casos se presentó el pico amida desde la primera muestra. A continuación, se puede apreciar la identificación de picos característicos de alcoholes, aminas, amidas y ésteres, para todas las reacciones:

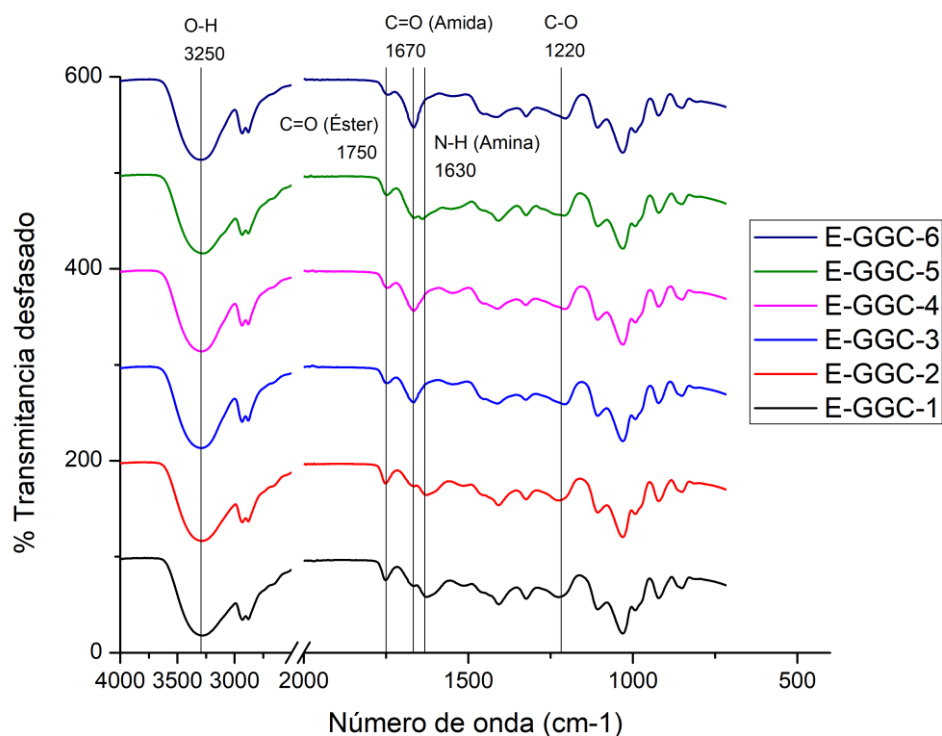


Figura 8. Espectro infrarrojo de la fase exploratoria I. Identificación de picos característicos.

Se observó que medida que disminuye la temperatura, disminuye el tamaño del pico amida y se hace más notoria la presencia del pico éster. Por lo tanto, se disminuyó la temperatura de reacción a 100 °C, y se aumentó progresivamente hasta encontrar, la condición de temperatura en la cual no se evidenciará la presencia de grupos amida.

En el rango de 100 – 115 °C no se observó la formación de grupos amida. Se observó que con una relación molar de 0.1, tanto a 100 (Figura 9a) como a 110 °C (Figura 9b) la reacción continuó

avanzando lentamente a durante de las 8 horas de reacción. Al disminuir la relación molar a 0.05 y se observó que a 110 °C (Figura 9c) la reacción se detuvo al pasar 4 horas ya que luego de este tiempo no hubo cambios en el infrarrojo hasta completas 8 horas. Con una temperatura de 115 °C (Figura 9d) se observa que la reacción ocurre mucho más rápido ya que no se observaron cambios después de la primera hora, y el espectro infrarrojo se mantuvo esencialmente igual hasta completar las 8 horas de reacción.

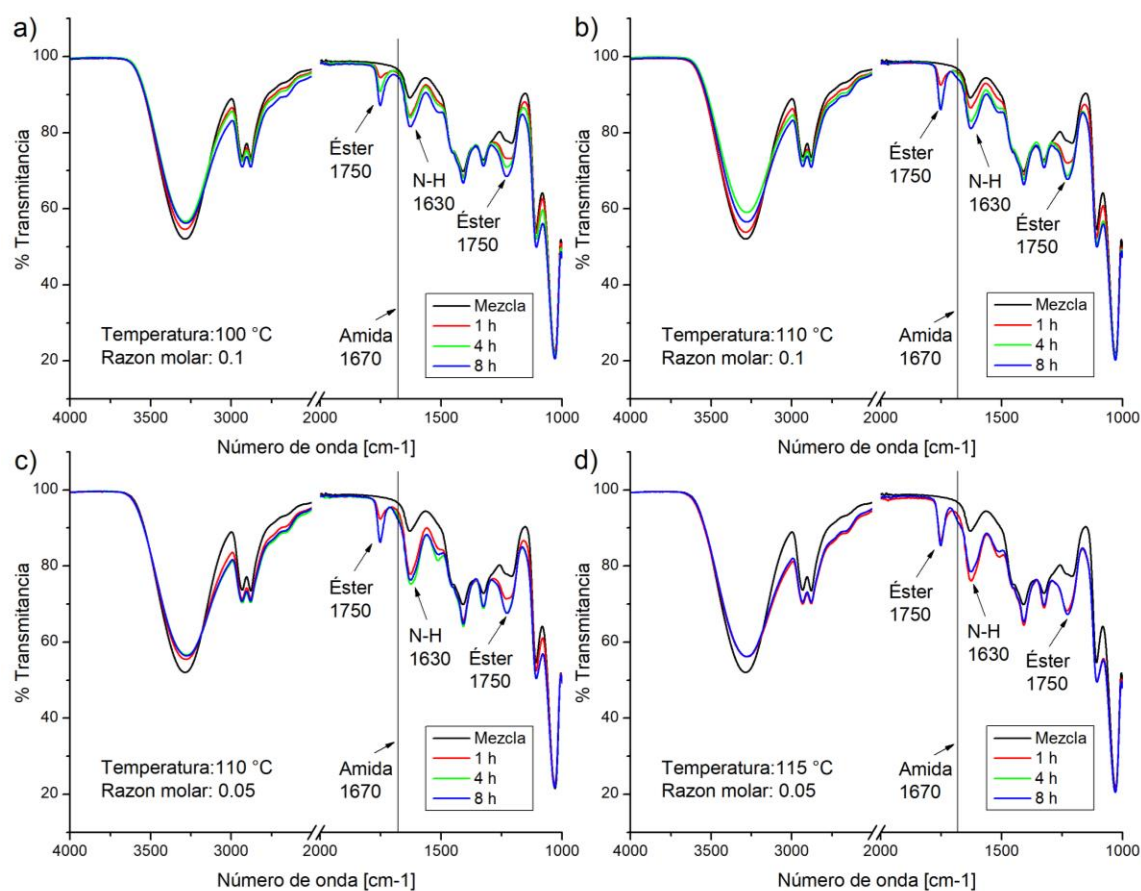


Figura 9. Espectro infrarrojo, avance de la reacción a diferentes temperaturas y relaciones molares. No se evidencia la presencia de grupos amida

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se fijó la temperatura en 115 °C para la síntesis de ésteres de glicerol con glicina, ya que a esta condición de temperatura la reacción se da en el menor tiempo sin evidenciar la formación de amidas.

Se verificó la estabilidad de los productos obtenidos durante 10 horas continuas bajo las condiciones de síntesis y se observó que efectivamente se alcanza un equilibrio después de la primera hora y se mantiene a lo largo del tiempo. Esto se evidencia en la Figura 10:

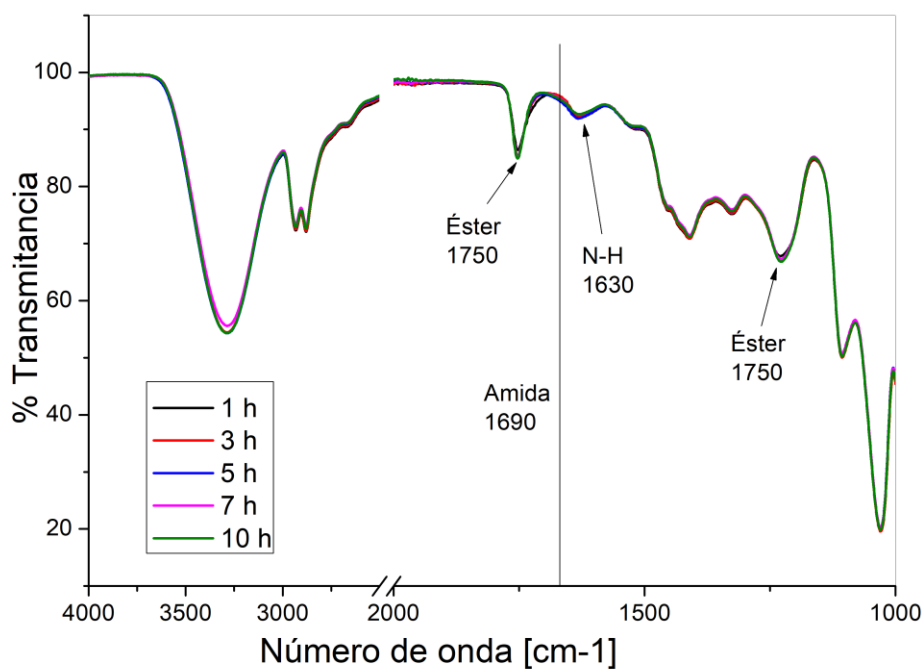


Figura 10. Espectro infrarrojo, estabilidad del equilibrio alcanzado

Con este resultado como base, se prosiguió a buscar la polimerización de los ésteres obtenidos con 2 métodos diferentes. El primero consiste en realizar la síntesis de glicerol-glicina durante 2 horas a 115 °C para después agregar poliglicerol previamente sintetizado, mezclar y aumentar la temperatura a 140 °C para promover la eterificación de los ésteres y el poliglicerol. El segundo método consiste en sintetizar glicerol-glicina a 115 °C y mezclar con glicerol puro, aumentando la temperatura a 140 °C promoviendo la polimerización entre los ésteres y el glicerol libre.

Ambos métodos fueron poco efectivos ya que, sin importar la forma de adición, al aumentar la temperatura se promovió la formación de amidas a partir del aminoácido que no había reaccionado e incluso las aminas ya esterificadas. Las bandas de éster e hidroxilo se conservan, lo que indicaría que los ésteres formados permanecen y que no se está llevando a cabo la polimerización. Esto se puede ver en la Figura 11:

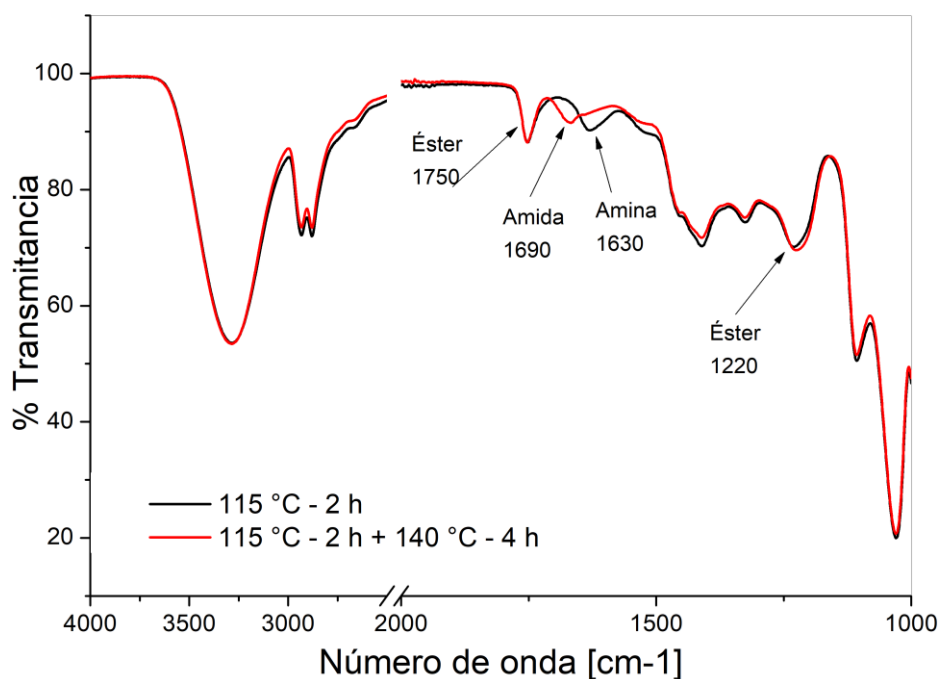


Figura 11. Espectro infrarrojo, formación de amida y consumo de aminas a 140 °C

Este comportamiento indica que una cantidad importante de glicina queda sin reaccionar, lo que podría estar impidiendo la polimerización. Se hipotetiza que la concentración de glicina es muy alta y se plantea una segunda parte para la fase exploratoria, variando la concentración de glicina y dejando fijas las condiciones de temperatura, presión de vacío y concentración de catalizador.

Se disminuyó la relación molar en cada experimento subsecuente dejando la mezcla reaccionar por 2 horas a 115 °C y posteriormente aumentando la temperatura a 140 °C, con el fin de encontrar una concentración molar de glicina que se consumiera casi por completo evitando así la formación de amidas al aumentar la temperatura.

Finalmente se llegó a una relación molar de 12.5×10^{-3} , a la cual se evidenció la formación de ésteres y al aumentar la temperatura a 140 °C no hubo presencia del pico amida en el espectro de infrarrojo como se muestra a continuación:

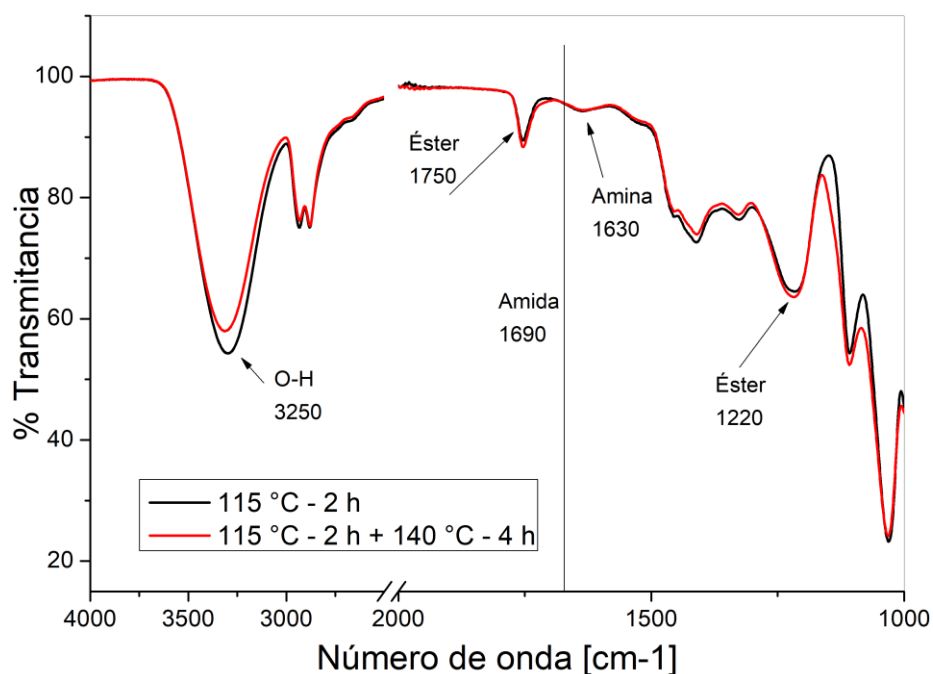


Figura 12. Espectro infrarrojo, conservación de ésteres y aminas, ausencia de amida y ligera reducción del pico OH

Se fijó la relación molar de 12.5×10^{-3} , al tratarse de una concentración tan baja y teniendo en cuenta se alcanza un equilibrio en el cual no se forman más ésteres, se adicionó la misma cantidad de glicina luego de dos horas y se dejó reaccionar por dos horas más, buscando desplazar el equilibrio y aumentar la formación de ésteres. Después de esto con el fin de promover la

esterificación de los grupos OH libres, se aumentó la temperatura a 140 °C y se dejó reaccionar durante 12 horas. El resultado se puede apreciar en la siguiente figura:

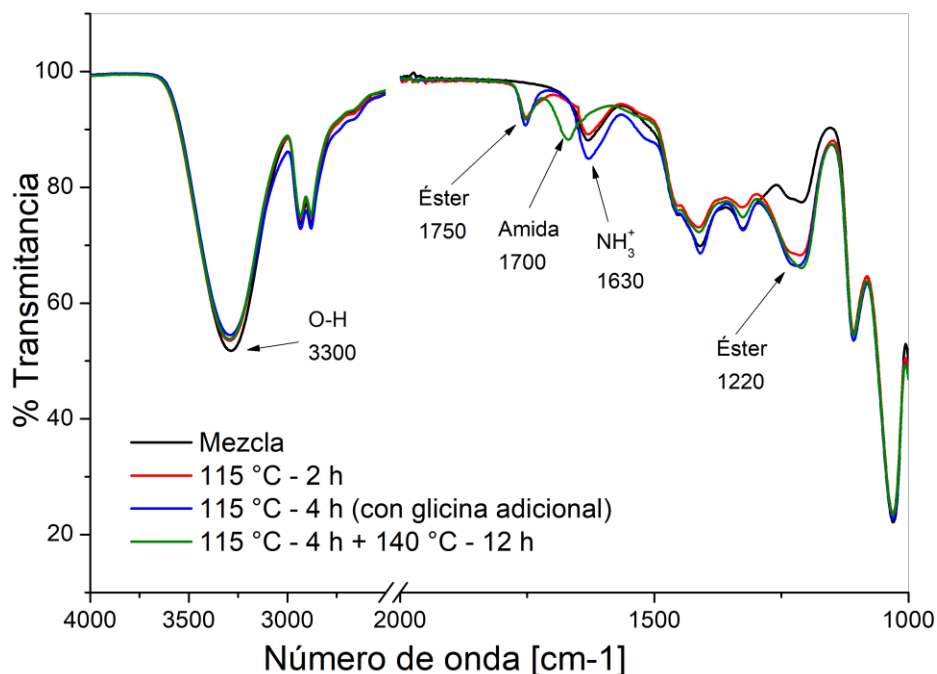


Figura 13. Espectro infrarrojo, formación de amida, polimerización y esterificación inhibida.

En la Figura 13 se puede observar que tanto la polimerización (banda de grupos OH) como la esterificación avanzan más lento luego de las primeras dos horas de reacción y el único efecto de la dosis adicional de glicina, fue promover la formación de amidas cuando se elevó la temperatura a 140 °C. Es importante resaltar que después de 12 horas bajo las condiciones de polimerización determinadas en el capítulo anterior no se logró una reducción apreciable en la banda de grupos hidroxilo.

El experimento anterior se repitió aumentando la presión de vacío a 20 inHg buscando acelerar el proceso de polimerización; sin embargo, se obtuvieron resultados similares y ningún avance apreciable en la reducción de la banda OH. Debido a este comportamiento, se hipotetiza que el

catalizador está siendo arrastrado con el vapor de agua generado en la reacción y retirado en la succión de vacío. Pruebas adicionales revelaron que el agua condensada en la trampa de la bomba de vacío tenía un pH ácido (alrededor de 1). Para comprobar dicha hipótesis se realizaron experimentos con temperatura de 115 °C y presión de vacío de 15 inHg. Se agregó una dosis equivalente a una relación molar de 12.5×10^{-3} cada hora de reacción y se adicionó una cantidad de catalizador igual a la inicial con cada dosis. Mediante este procedimiento fue posible superar significativamente el pico de esterificación que se había alcanzado anteriormente evitando además la formación de amidas.

Se observó aumento en la viscosidad con cada dosis de glicina y catalizador agregada hasta completar 9 horas de reacción, tiempo en el cual se alcanzó el punto de gel. Estos experimentos revelaron información importante respecto a estas reacciones y mostraron que era posible llevar a cabo las reacciones de eterificación y esterificación simultáneamente, obteniendo poliglicerol esterificado con glicina y evitando la formación de amidas como se ilustra en la Figura 14.

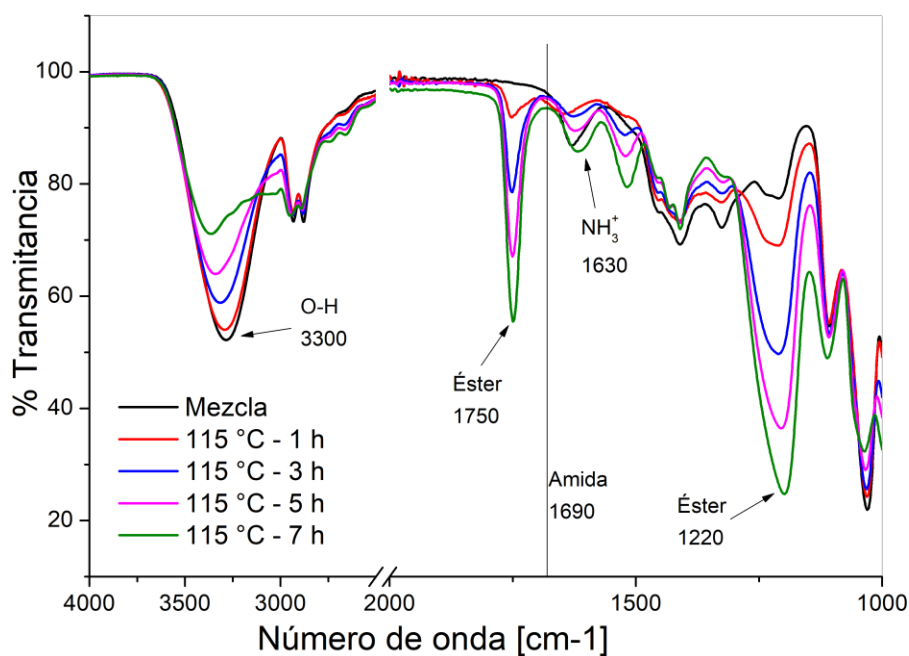


Figura 14. Espectro de infrarrojo, avance de las reacciones de polimerización y esterificación.

Para finalizar la fase exploratoria, se determinó la importancia de la forma de adición de glicina, comparando dos métodos de adición de reactivos: El primero (i): a lo largo de ocho horas de reacción se agregaron ocho dosis (con catalizador) de 12.5×10^{-3} completando una relación molar glicina/OH equivalente a 0.1. En el segundo (ii): se cargó el reactor con una relación molar de 0.1 y se repuso la cantidad inicial de catalizador cada hora durante ocho horas.

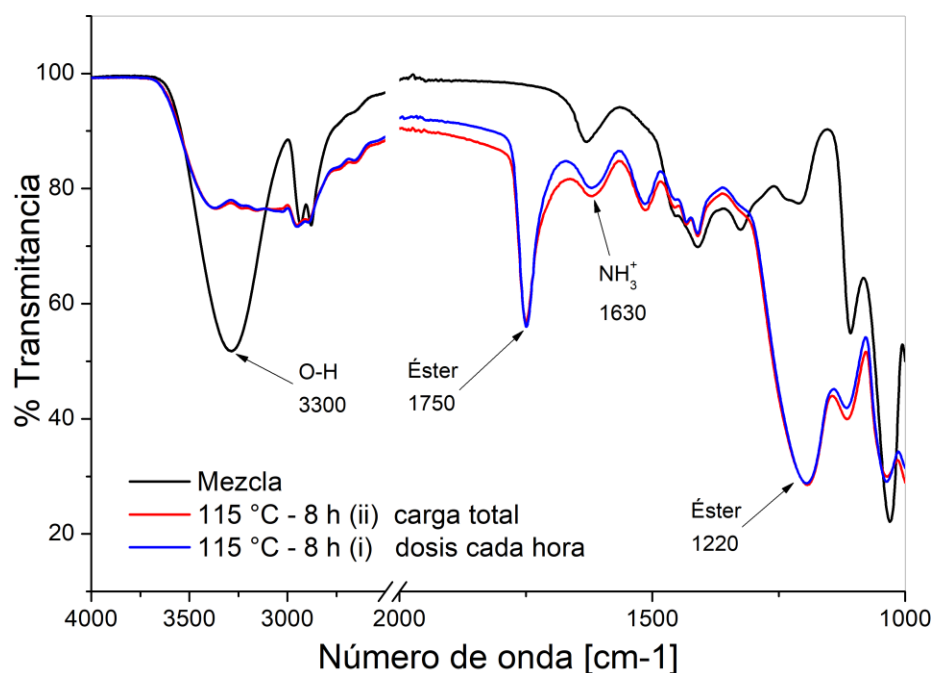


Figura 15. Espectro infrarrojo, comparación de los métodos de adición.

Como se puede apreciar en la Figura 15, el método de adición no afecta la formación de ésteres ni la polimerización (banda OH). Teniendo en cuenta que hacer una carga total inicial minimiza los errores sistemáticos en la medición y la heterogeneidad de la mezcla que están presentes al agregar reactivo en dosis.

De la fase exploratoria se obtuvo una gran cantidad de información que permitió fijar algunas de las variables, establecer las variaciones que se estudiaron y entender en mayor medida el comportamiento del sistema. Se definen como fijas las siguientes condiciones: la temperatura en 115 °C, debido al que por encima de 120 °C se forman enlaces amida, la que mostró la mejor formación de esteres fue 115 °C. El tiempo de reacción en ocho horas y la relación molar en 0.1, ya que se ha encontrado que a las condiciones estudiadas el glicerol es capaz de aceptar una relación molar de 12.5×10^{-3} cada hora y como el tiempo de reacción de fijo en 8 horas, se obtiene una relación molar total de 0.1. El diseño experimental final puede apreciarse en la siguiente tabla:

Tabla 5. Distribución de experimentos. Síntesis de poliglicerol esterificado con glicina.

Experimento	Presión de vacío [inHg]	Concentración de catalizador
A	15	4.8 %
B	20	
C	15	3.5 %
D	20	
E	15	2.2 %
F	20	

En cada experimento se realizó la carga inicial del glicerol, glicina y catalizador. Luego de cada hora se tomó una muestra y se adicionó una cantidad igual a la inicial de catalizador hasta completar 8 horas de reacción.

Las características de interés son los grupos funcionales presentes en el polímero obtenido, determinadas por medio de espectroscopia FTIR-ATR; y el peso molecular, medido por medio de cromatografía HPLC-GPC. En la Figura 16 se encontrará la comparación de los espectros infrarrojo de los seis experimentos.

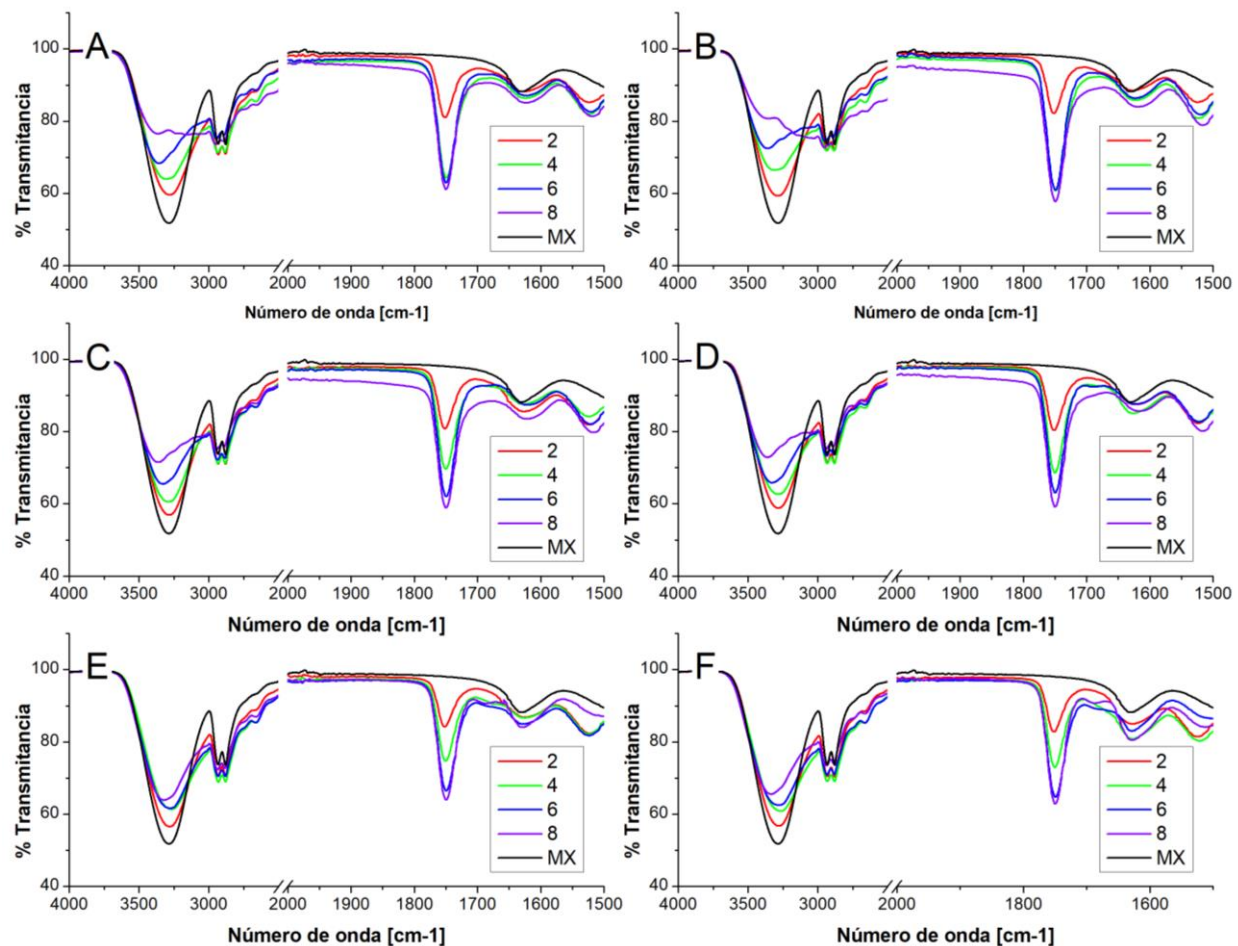


Figura 16. Comparación del avance de la reacción con diferentes condiciones de síntesis. Reducción de la banda OH y crecimiento del pico éster. Espectro FTIR-ATR

Los experimentos A y B, mostraron que, con el nivel alto de concentración de catalizador la mayor parte de la esterificación ocurre en las primeras cuatro horas junto con la polimerización, durante las cuatro horas siguientes solo ocurre polimerización. Tanto en el nivel medio como bajo de catalizador, la esterificación se completa alrededor de la séptima hora, mientras que la polimerización fue continua durante las ocho horas de reacción.

A continuación, en la Figura 17, se presenta una comparación de los productos finales de los 6 experimentos:

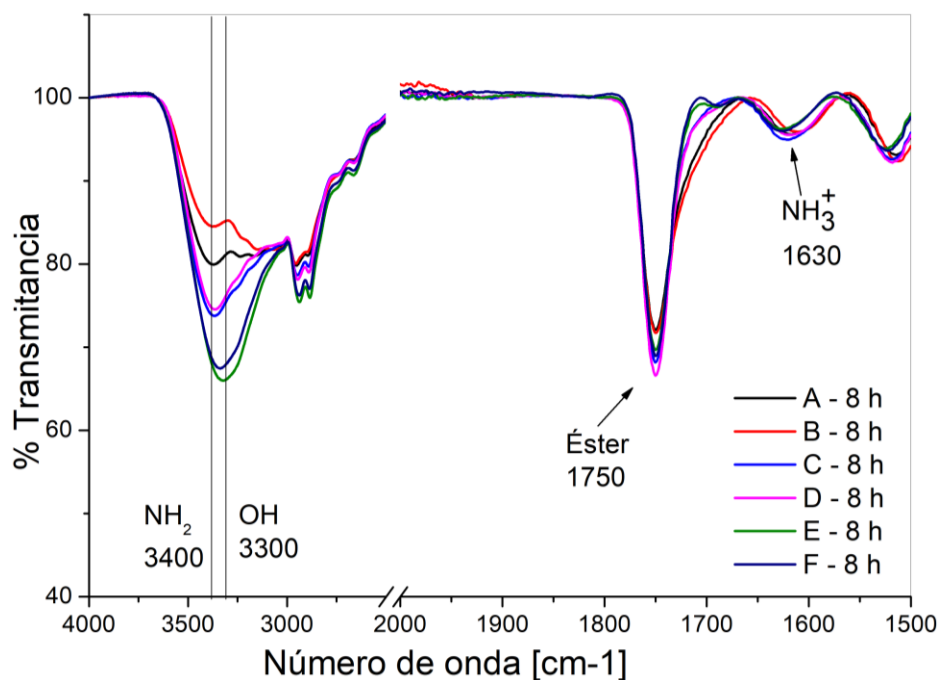


Figura 17. Comparación de diferentes condiciones de síntesis luego de ocho horas de reacción. Espectro FTIR-ATR

Puede observarse que, aunque todos los experimentos presentan una esterificación fuerte (1750), C y D presentan los mayores picos éster, implicando que el nivel de concentración de catalizador medio es el que más favorece esta reacción. También es importante resaltar que la esterificación (reducción en 3300) fue más pronunciada en los niveles altos de concentración de catalizador y menos pronunciada en los niveles bajos. Teniendo en cuenta que, en todos los niveles de concentración de catalizador, la mayor reducción de la banda O-H se dio en el nivel alto de presión se vacío, mientras que en el pico éster la diferencia no es apreciable, por tanto, se puede afirmar que el efecto de la presión de vacío es más fuerte en la polimerización que en la esterificación. Es importante resaltar que existe una superposición de la banda amina e hidroxilo en la región de $3400 - 3300 \text{ cm}^{-1}$, resultando en una convolución de picos que es notoria a medida

que disminuye la banda O-H y no aparece en las reacciones de exclusiva polimerización mostradas en la Figura 4 del Capítulo 1.

A continuación, se comparan los cromatogramas de los seis conjuntos de condiciones de reacción mostrados en la Tabla 5. Estos se encuentran divididos en tres zonas: peso molecular alto (PM-Alto), para moléculas mayores a 100kDa; peso molecular moderado (PM-Moderado), entre 10kDa y 100kDa; y peso molecular bajo (PM-Bajo), para moléculas menores a 10kDa. Todas las muestras aquí representadas fueron tomadas al finalizar la reacción (8 horas).

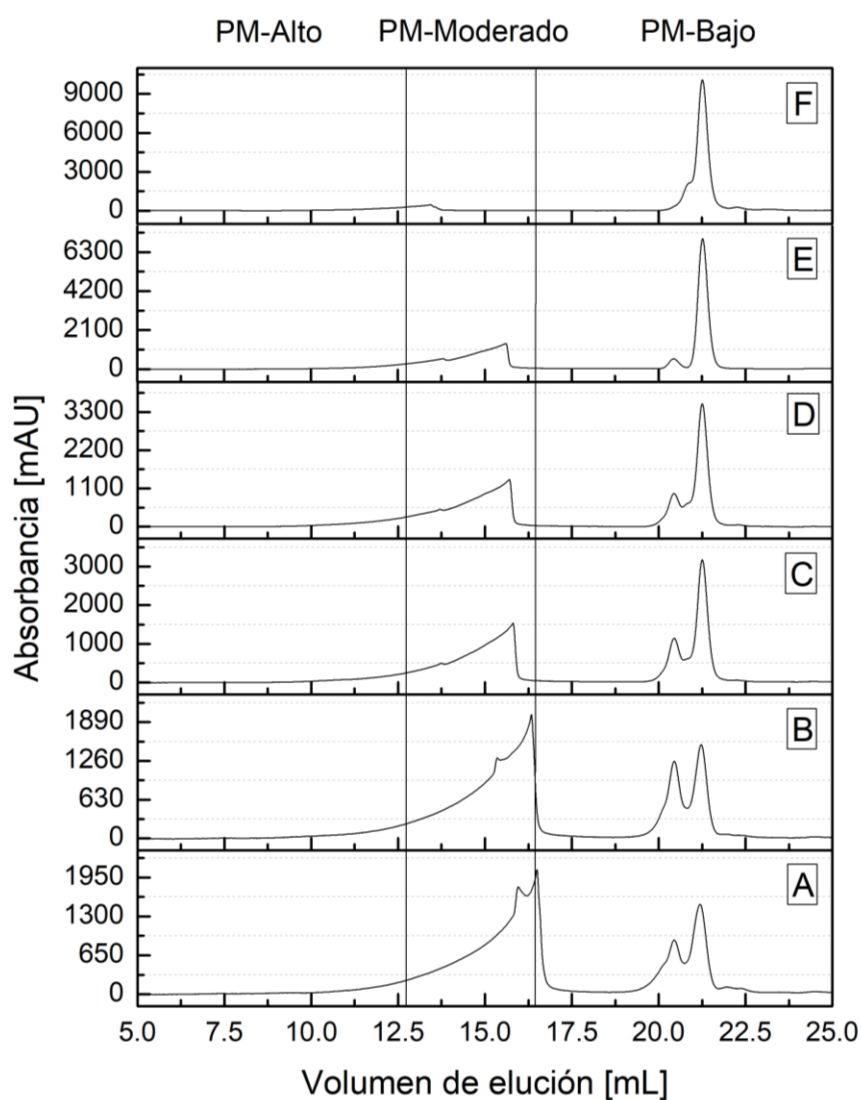


Figura 18. Comparación de cromatogramas HPLC-GPC, pesos moleculares relativos al final de la reacción.

De la Figura 18, se puede destacar que los niveles altos de concentración de catalizador favorecen la polimerización y el aumento del peso molecular dentro del tiempo observado, es posible que esto se deba a que las reacciones con nivel alto de concentración de catalizador fueron las más cercanas en alcanzar el punto de gelación.

Tabla 6. Distribución simplificada de pesos moleculares, peso molecular promedio en número (\overline{M}_n), peso (\overline{M}_w) e índice de polidispersidad (PDI). Comparativa de condiciones.

Reacción	A	B	C	D	E	F
PM-Alto	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
PM-Moderado	74.31%	76.23%	57.87%	55.86%	41.93%	10.70%
PM-Bajo	25.69%	23.77%	42.13%	44.14%	58.07%	89.30%
\overline{M}_n [kDa]	16.766	17.852	15.868	16.147	10.524	7.175
\overline{M}_w [kDa]	32.884	33.627	35.818	37.631	31.175	64.366
PDI	1.96	1.88	2.26	2.33	2.96	8.97

En la Tabla 6 se presenta la distribución simplificada de los pesos moleculares para cada producto de reacción, la integración completa se encuentra en el Apéndice C. En esta tabla se puede ver que el nivel alto de concentración de catalizador se obtuvo la mayor conversión, el mayor peso molecular promedio y la polidispersidad más baja. Todas estas propiedades son de interés para la aplicación final como agente floculante

Con el nivel bajo de catalizador se obtiene el menor aumento en peso molecular en las ocho horas de reacción, sin embargo, a esta concentración de catalizador el producto final muestra una baja viscosidad con respecto a los otros niveles de reacción, sugiriendo que con más tiempo de reacción es posible alcanzar mayores pesos moleculares y una mayor aceptación de enlaces éster. La polidispersidad de la reacción *F* fue particularmente alta y es debida a que el pico de mayor peso se encontró en muy baja proporción, ocasionando un fuerte desplazamiento en el \overline{M}_w mientras

que el \overline{M}_n se mantuvo en la zona de peso molecular bajo; este comportamiento puede darse debido que el tiempo de reacción no fue suficiente para el completo desarrollo de la polimerización. La distribución y demás parámetros fueron calculados teniendo en cuenta los lineamientos y definiciones de trabajos previos (Mohd Noor et al., 2016; Rogošić et al., 1996), al igual que en capítulo anterior, por medio de las ecuaciones Eq-2, Eq-3 y Eq-4.

Con una temperatura de 115 °C, una alta presión de vacío favorece el aumento del peso molecular promedio, lo cual indica que el nivel alto de presión de vacío favorece la formación de moléculas más grandes debido a que, como se concluyó en el capítulo anterior, la presión de vacío tiende a acelerar la reacción.

Adicionalmente, en el capítulo anterior se habló de la posibilidad de obtener mayores pesos moleculares estudiando tiempos de reacción mayores para la polimerización a 120 °C, considerando que en el estudio de este capítulo se pudo llegar a punto de gel a dicha temperatura mediante la reposición de catalizador, se llevó a cabo un conjunto adicional de condiciones de polimerización utilizando esta metodología comparando los resultados con los del capítulo anterior. Estos experimentos han sido nombrados como se indica en la tabla a continuación:

Tabla 7. Condiciones de reacción, síntesis de poliglicerol. Experimentos adicionales

Experimento	Temperatura [°C]	Presión de vacío [inHg]	% Catalizador
5-R	120	20	4.8 cada hora
6-R	120	15	4.8 cada hora

Ambos experimentos llegaron a punto de gel en 340 minutos, por lo tanto, se utilizó una muestra de 90% del tiempo gel (306 minutos) para hacer la comparación con los productos obtenidos en el capítulo anterior.

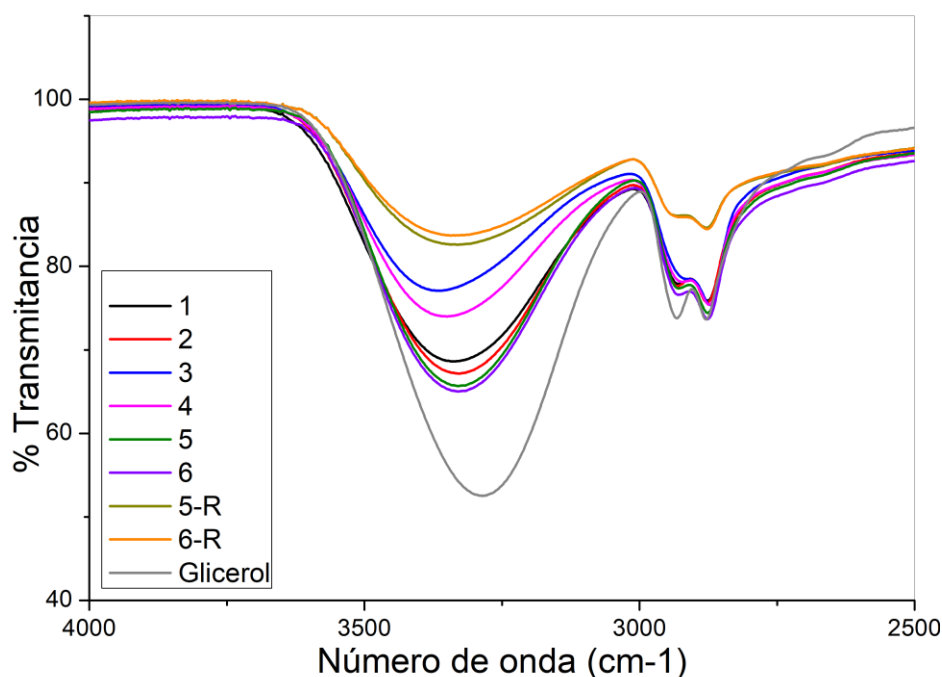


Figura 19. Comparación de la banda O-H, Espectro FTIR-ATR.

En la Figura 19 se puede observar una mayor conversión de grupos hidroxilo utilizando el método de reposición de catalizador. En la siguiente tabla se compara la conversión de todos los métodos, calculada con la reducción de la banda O-H como se señaló en el capítulo anterior.

Tabla 8. Conversión final de grupos hidroxilo con cada conjunto de condiciones de reacción.

Experimento	1	2	3	4	5	6	5-R	6-R
% Conversión de O-H	36.28	32.99	55.78	48.59	30.08	28.67	64.32	66.63

Las reacciones 5-R y 6-R muestran mayor conversión de grupos hidroxilo en un tiempo de 5 horas, mientras que las reacciones 3 y 4 que habían presentado las mayores conversiones en el capítulo 1 tienen una duración de 4 horas. Téngase en cuenta que estos tiempos están limitados por el cambio de estado físico del polímero (tiempo de gelación).

El análisis de pesos moleculares por cromatografía HPLC-ATR y la comparación de los cromatogramas se puede observar a continuación en la Figura 20 y Tabla 9:

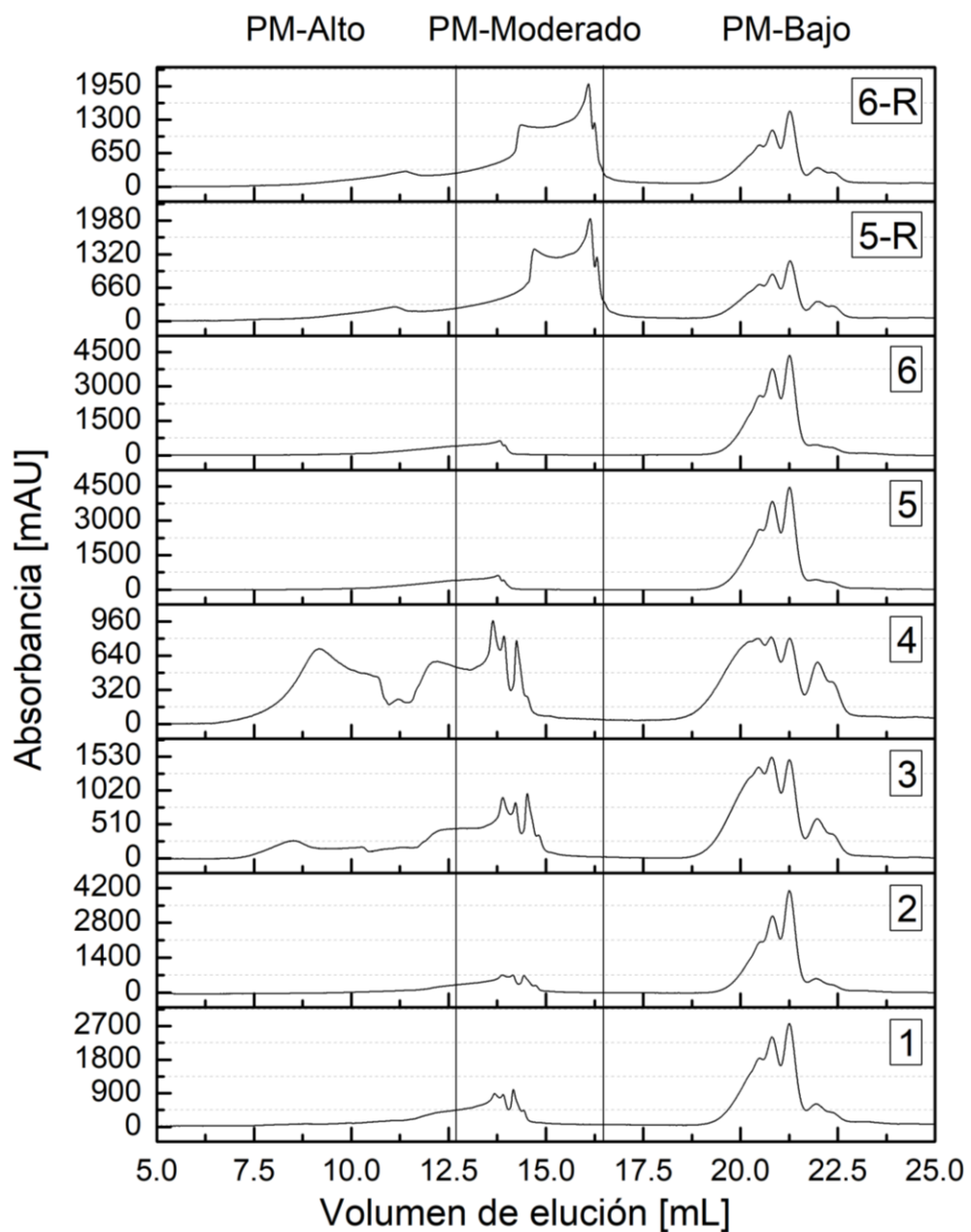


Figura 20. Comparación de cromatogramas de poliglicerol obtenidos en el capítulo 1 y sintetizados con reposición de catalizador.

Comparando los cromatogramas de los ocho polímeros de glicerol obtenidos se puede ver que el método de reposición de catalizador presenta una mejora en pesos moleculares y tiempo de reacción con respecto a las reacciones originales 5 y 6.

Tabla 9. Distribución simplificada de pesos moleculares, peso molecular promedio en número (\overline{M}_n), peso (\overline{M}_w) e índice de polidispersidad (PDI). comparativa de poliglicerol.

Reacción	1	2	3	4	5	6	5-R	6-R
PM-Alto	0.00%	0.00%	9.96%	44.33%	0.00%	0.00%	8.42%	8.56%
PM-Moderado	29.78%	30.19%	35.09%	17.28%	17.04%	17.62%	62.83%	60.95%
PM-Bajo	70.22%	69.81%	54.95%	38.39%	82.96%	82.38%	28.75%	30.49%
\overline{M}_n [kDa]	16.244	15.457	116.945	325.641	9.256	9.563	83.222	56.001
\overline{M}_w [kDa]	53.729	50.611	859.158	888.937	52.261	52.304	688.840	493.694
PDI	3.31	3.27	7.35	2.73	5.65	5.47	8.28	8.82

Se observa en la Tabla 9, que el método de reposición con una temperatura de 120 °C favorece la conversión de monómero y oligómeros en polímeros de peso molecular moderado (entre 10 kDa y 100 kDa), ya que estas reacciones presentaron el menor porcentaje de peso molecular bajo. La proporción de peso molecular medio es considerablemente alta y muy superior a las demás, indicando que este método presenta una ventaja en selectividad a pesos moleculares en dicho intervalo.

La polidispersidad de 5-R y 6-R son altas debido a la baja proporción que presenta en la zona de peso molecular alto, ya que esta cantidad es suficiente para desplazar el \overline{M}_w pero no afecta lo suficiente a el \overline{M}_n , resultando en una considerable diferencia entre ambas cantidades. Los pesos moleculares promedio de estas reacciones solo fueron superados por las reacciones 3 y 4.

2.3. Conclusiones

Fue posible sintetizar, a partir de glicerol y glicina, un polímero funcionalizado con aminas y con peso molecular de 17.852 kDa utilizando una temperatura de 115 °C, 20 inHg de presión de vacío y 4.8% de catalizador; las reacciones de esterificación y eterificación se llevaron a cabo de manera simultánea.

La temperatura afecta significativamente la velocidad de reacción, guardando una proporcionalidad directa. La reacción de amidación se puede controlar regulando la temperatura, debido a que la formación de amidas ocurre a temperaturas mayores a 120 °C.

La variación en la presión de vacío entre 15 y 20 inHg no tuvo un efecto significativo en la reacción de esterificación, sin embargo, la velocidad de las reacciones de polimerización si fue afectada de forma importante, generando un aumento en la conversión de grupos hidroxilo y el peso molecular promedio cuando se emplean 20 inHg con respecto a 15 inHg en un mismo tiempo de reacción.

A temperaturas mayores a 100 °C existe un efecto de arrastre del catalizador con el vapor de agua generado en las reacciones de eterificación y esterificación, el cual se contrarrestó adicionando catalizador periódicamente. Este efecto se acentúa con el aumento de la temperatura y se nota especialmente por debajo de 120 °C donde los tiempos de reacción son largos.

La mayor intensidad del pico éster se logró con una concentración de 3.5% de catalizador y el mayor peso molecular promedio se alcanzó con una concentración de 4.8% de catalizador.

3. Capítulo III: Poliglicerol funcionalizado como agente floculante de la biomasa de microalgas

El hombre ha utilizado biomasa de microalga para su alimentación desde hace miles de años (Gitte S. Jensen, Donald I. Ginsberg, & Christian Drapeau, 2001). Sin embargo, el estudio formal de este recurso comenzó en la década de 1950, con el fin de identificar componentes activos para producir antibióticos (Borowitzka, 1995) y extraer proteínas (Becker, 2004; Spolaore, Joannis-Cassan, Duran, & Isambert, 2006). En los años siguientes creció la atención hacia este recurso, de tal forma que se comenzó a estudiar su aplicación en otras áreas como tratamiento de aguas residuales (Pulz & Scheibenbogen, 1998) y generación de fuentes de energía renovable (Chaumont, 1993). La aplicación de la biomasa de microalgas a gran escala se centra actualmente en nutrición humana y animal (Barrow & Shahidi, 2007; Becker, 2004), productos cosméticos (Stolz & Obermayer, 2003); y en la obtención de moléculas de alto valor como ácidos grasos polinsaturados (Borowitzka, 1995; Cohen & Cohen, 1991), pigmentos (Grossman, Bhaya, Apt, & Kehoe, 1995) e isótopos estables (C^{14} , N^{15} , H^2) con aplicaciones bioquímicas (Apt & Behrens, 1999; Suganya, Varman, Masjuki, & Renganathan, 2016).

La biomasa de microalgas se ha considerado una materia prima importante, se han intensificado los esfuerzos por integrar el desarrollo de nuevas cepas de algas, su cultivo, cosecha, extracción y producción de biocombustibles y bioproductos de alto valor (NAABB, 2014). El cultivo de microalgas puede ser integrado con el tratamiento de aguas residuales, permitiendo se alcance un mejor desempeño económico y un aumento en la sostenibilidad de ambos procesos (Laurens, Chen-Glasser, & McMillan, 2017). Las microalgas tienen una composición rica en lípidos (40%-80% en peso seco) (Yusuf, 2007), puede ser cosechado varias veces al año (Schenk et al., 2008) y

puede crecer en agua salada e incluso metabolizar contaminantes como NH_4^+ , NO_3^- y PO_4^{3-} (Mata, Martins, & Caetano, 2010; Um & Kim, 2009; B. Wang, Li, Wu, & Lan, 2008). La concentración de biomasa en un cultivo puede variar desde 0.5 g/L cuando se trata de un cultivo en estanque, hasta 5 g/l en fotobiorreactores (Raesossadati, Ahmadzadeh, McHenry, & Moheimani, 2014). Aun con estas estrategias, la concentración de biomasa sigue siendo baja, lo cual implica que para su cosecha se deben retirar grandes cantidades de agua. Cuando la finalidad de la biomasa son productos de alto valor, como los discutidos anteriormente, es económicamente viable realizar una separación por centrifugación (Vandamme et al., 2013), pero si la finalidad es la producción de biocombustibles, en donde los volúmenes requeridos son mucho mayores, la cosecha de la biomasa puede llegar a contribuir con más del 30% del costo total de la producción del biocombustible (Cheruvu et al., 2016). Por esto es importante desarrollar alternativas de concentración de biomasa como la coagulación-floculación que permitan reducir los costes de separación.

En esta sección se presenta el estudio realizado para determinar el desempeño del poliglicerol funcionalizado con glicina en la concentración de biomasa de microalgas *Chlorella vulgaris*.

3.1. Materiales y métodos

Los equipos, métodos y materiales utilizados para la evaluación de los polímeros como agentes floculantes serán descritos a continuación.

3.1.1. Equipos. Para el monitoreo del crecimiento de los cultivos y la determinación de la remoción de biomasa se empleó un espectrofotómetro UV-Vis Spectroquant® Pharo 300 de marca Merck. En algunas regiones del espectro UV-Vis la señal de absorbancia es más alta debido a que los pigmentos principales: clorofila α , clorofila β y carotenoides absorben más fuertemente, sin embargo, estas regiones también presentan un mayor error con respecto a la densidad celular a

causa de variaciones en el contenido de pigmentos en las células (Griffiths, Garcin, van Hille, & Harrison, 2011). Por este motivo se ha escogido la absorbancia a longitud de onda de 750 nm como una medida indirecta de la densidad celular del cultivo.

Con el fin de evitar contaminación de los cultivos, todos los materiales que entraron en contacto con el cultivo y el medio de cultivo en sí fueron previamente esterilizados utilizando un equipo de autoclave eléctrico *All American 75X* de 39 L de capacidad, siguiendo los protocolos de uso y seguridad especificados en el manual de uso provisto por el fabricante.

Las pruebas de floculación fueron efectuadas por medio de un floculador de mesa LOVIBOND ET 750 de seis puestos con control de velocidad de agitación de $10-300 \pm 1$ rpm, con diseño para vasos de 500 mL factor alto.

El pH de las soluciones y experimentos fue medido mediante un pH-metro de sobremesa OHAUS starter 2100 series.

3.1.2. Microalgas. Se emplearon microalgas *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, facilitadas por el laboratorio de biomasa del centro de investigación para el desarrollo sostenible en industria y energía (CIDES).

3.1.2.1. Cultivo. Las microalgas fueron cultivadas en medio basal Bold (BBM) siguiendo principalmente los lineamientos y recomendaciones de los libros Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology (Richmond, 2003) y Algal culturing techniques (Andersen, 2005). La composición del medio de cultivo se especifica en la siguiente tabla:

Tabla 10. Composición y preparación de Medio Basal Bold (BBM), adaptado de *Algal culturing techniques* (2005).

Componente	Solución stock [g]*	Cantidad usada [mL]*	Concentración final*
Macronutrientes			
NaNO ₃	25.00	10	2.94×10^{-3}
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.50	10	1.70×10^{-4}
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.50	10	3.04×10^{-4}
K ₂ HPO ₄	7.50	10	4.31×10^{-4}
KH ₂ PO ₄	17.50	10	1.29×10^{-3}
NaCl	2.50	10	4.28×10^{-4}
Solución EDTA alcalina		1	
EDTA	50.00		1.71×10^{-4}
KOH	31.00		5.53×10^{-4}
Solución de hierro acidificada		1	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.98		1.79×10^{-5}
H ₂ SO ₄		1	
Solución de boro		1	
H ₃ BO ₃	11.42		1.85×10^{-4}
Solución de metales traza		1	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.82		3.07×10^{-5}
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.44		7.28×10^{-6}
MoO ₃	0.71		4.93×10^{-6}
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57		6.29×10^{-6}
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.49		1.68×10^{-6}

*Cantidades con base en un litro de Agua desionizada.

Consideraciones generales. El cultivo se llevó a cabo en botellas cilíndricas transparentes de borosilicato con capacidad de dos litros, acoplada a un burbujeador de vidrio por medio del cual se suministra continuamente un flujo de aire a presión constante que contribuye con la agitación. Las botellas se ubican entre cuatro tubos equidistantes de luz fría blanca fluorescente que brinda a los cultivos una intensidad lumínica de $37.5 \frac{\mu E}{m^2 S}$ durante ciclos de encendido y apagado de 12 horas.

Las botellas, burbujeadores, puntas de pipeta y demás materiales que entraron en contacto con el cultivo fueron esterilizados a 121 °C y almacenados en papel aluminio siguiendo las recomendaciones la literatura (Andersen, 2005).

Inoculación y monitoreo del cultivo. Los cultivos fueron monitoreados por medio de espectrofotometría UV-Vis. Se tomaron muestras de 0.5 mL cada día entre las 11:00 a.m. las 12:00 p.m., se prepararon utilizando un factor de dilución de 2 y se analizaron por absorbancia en un espectrofotómetro a longitud de onda de 750 nm.

Se realizó la inoculación del cultivo en medio fresco siguiendo una relación de 10 %, es decir, 200 mL en 1800 mL de medio de cultivo BBM cada vez que se alcanzó una absorbancia de entre 0.5 - 0.7 AU. Los datos obtenidos en cada medición fueron tabulados y graficados para obtener una curva de crecimiento estándar.

3.1.3. Agente floculante polimérico. Se compararon las características de los seis polímeros funcionalizados que fueron sintetizados en el capítulo anterior. El polímero B fue seleccionado para ser evaluado como agente floculante debido a que presentaba el mayor peso molecular promedio y la distribución de pesos moleculares mejor definida con un 76% de las moléculas con pesos moleculares superiores a 10 kDa.

3.1.4. Procedimiento experimental. Las variables de estudio fueron el pH y la concentración del polímero en el cultivo. Se realizó un barrido de concentraciones, desde 10 mg/L hasta 10 g/L, con el propósito de fijar un rango de trabajo para las pruebas de floculación. El pH fue de especial interés ya que la naturaleza catiónica del polímero se debe a la presencia de aminas primarias cuya actividad catiónica es dependiente del pH. Para evaluar este efecto se utilizaron los valores 3, 4 y 5 en la escala de pH.

Las pruebas de floculación se realizaron por lotes utilizando seis vasos de 500 mL factor alto con 400 mL de cultivo de microalgas de los cuales cinco corresponden a experimentos y uno a cultivo de control. Se empleó cultivo con una densidad óptica a 750 nm de 1.5 ± 1 ya que constituye una suspensión relativamente estable con una sedimentación inferior al 10% de biomasa en dos

horas a las condiciones de cultivo. Se preparó una solución de polímero en agua desionizada y se ajustó el pH a 7 con una solución 0.5 molar de NaOH. Se agregó la cantidad correspondiente de polímero a cada vaso con microalgas y se realizó el ajuste al pH correspondiente a cada prueba con una solución 0.5 molar de HCL. Una vez ajustado el pH se realiza una fase de agitación a 100 rpm durante dos minutos, seguido de agitación a 30 rpm durante 60 minutos. Finalmente se dejaron reposar los vasos durante 60 minutos para permitir la sedimentación de la biomasa. Se tomaron muestras antes de agregar el polímero, al ajustar el pH, al finalizar la agitación y cada 15 minutos de sedimentación completando 7 muestras. Cada experimento se realizó por triplicado.

La absorbancia a longitud de onda 750 nm de cada muestra fue relacionada con la absorbancia inicial siguiendo la ecuación Eq-5 (Papazi, Makridis, & Divanach, 2010; Salim, Bosma, Vermuë, & Wijffels, 2011) para obtener el porcentaje de recuperación de biomasa.

$$\text{Recuperacion de Biomasa \%} = \left(1 - \frac{OD_{750t}}{OD_{750t_0}}\right) \times 100 \quad \text{Eq-5}$$

Donde OD_{750t} es la absorbancia de la muestra al tiempo t y OD_{750t_0} es la absorbancia de la muestra inicial, es decir antes de iniciar el proceso experimental.

Adicionalmente, la eficiencia de floculación porcentual se calculó mediante la ecuación Eq-6 (Papazi et al., 2010; Salim et al., 2011). Aquí $OD_{a750}(t)$ y $OD_{p750}(t_0)$ son las absorbancias de las muestras con polímero tomadas en el tiempo t y antes de la adición de polímero (t_0) respectivamente. $OD_{c750}(t)$ y $OD_{c750}(t_0)$ son las absorbancias de las muestras de control con pH ajustado en el tiempo t e inicial (t_0).

$$\text{Eficiencia de floculación \%} = \left(1 - \frac{\frac{OD_{p750}(t)}{OD_{p750}(t_0)}}{\frac{OD_{c750}(t)}{OD_{c750}(t_0)}}\right) \times 100 \quad \text{Eq-6}$$

3.2. Resultados y discusión.

Para determinar el intervalo experimental de concentraciones, se realizó un barrido de 15 concentraciones entre 10 mg/L y 10 g/L. Se observó que a concentraciones inferiores a 1 g/L la contribución del polímero en la recuperación de biomasa fue poco significativa, por tanto, se realizaron las pruebas con concentraciones de 1,3,5,7 y 10 g/L. Las condiciones evaluadas durante las pruebas de floculación se encuentran especificadas en la siguiente tabla.

Tabla 11. Condiciones experimentales de floculación

Variable	Niveles				
pH	3		4	5	
Concentración [g/L]	1	3	5	7	10

En la Figura 21 se puede observar la comparación de la recuperación de biomasa a diferentes pH y concentraciones de polímero, esta fue calculada mediante la ecuación Eq-5. Puede observarse que a pH 5, aun luego de agregar 10 g/L de polímero, la mayor recuperación de biomasa alcanzada fue de 30 %. A pH 3 con una concentración de 1 g/L se alcanza una recuperación de 85% la cual aumenta con la concentración hasta un 90% con 10 g/L; sin embargo, la muestra de control a este mismo pH tiene una sedimentación de un 75%. Con pH 4 y 1 g/L de polímero se obtuvo una remoción de 55 % aumentando con la concentración hasta 90% con 7g/L al igual que con 10 g/L, este pH la remoción en la muestra de control alcanzó un 20%. Todas las muestras aquí representadas corresponden a el tiempo final de las pruebas, es decir, 60 minutos de sedimentación.

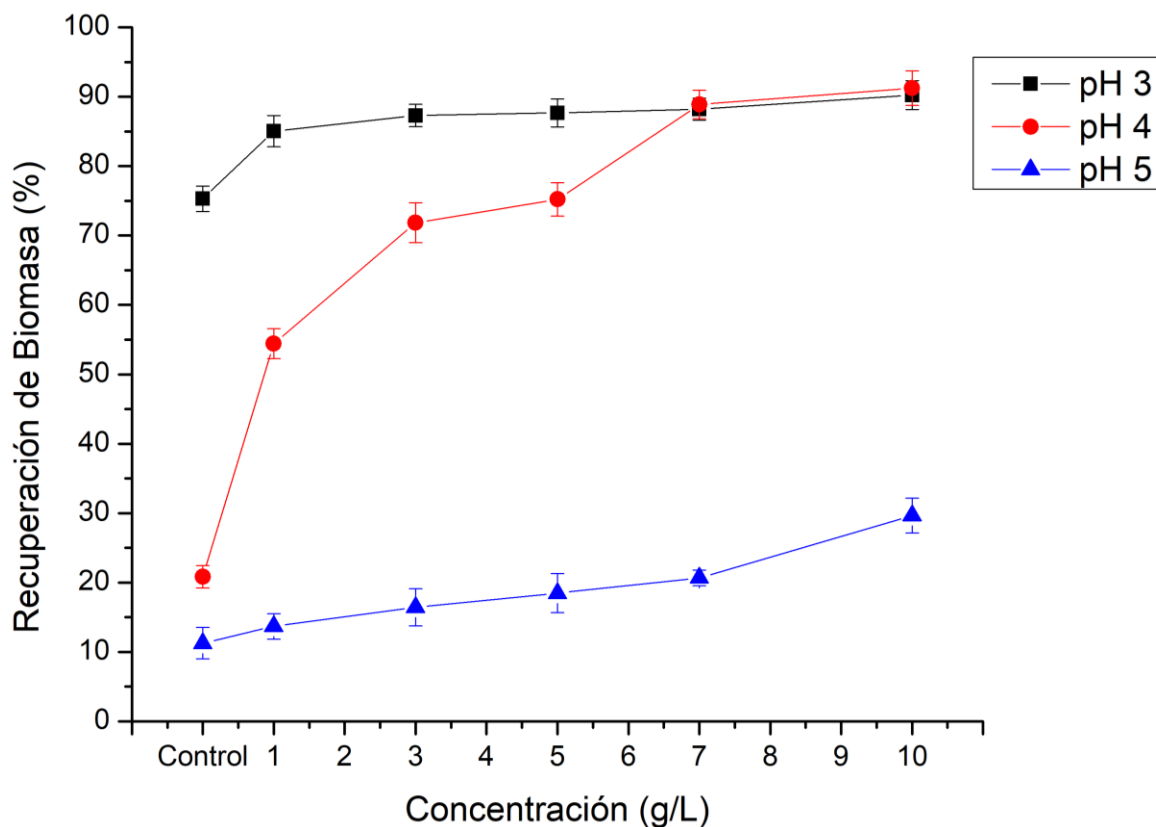


Figura 21. Efecto de la concentración de polímero en la recuperación de biomasa a diferentes pH.

La eficiencia de floculación mostrada en la Figura 22 fue calculada mediante la ecuación Eq-6 y representa el efecto del polímero teniendo en cuenta la sedimentación del control al mismo pH, es decir la remoción con polímero con base en la remoción sin polímero lo que permite ver la significancia del efecto del polímero en la sedimentación de biomasa.

Se observa que a pH 4 se alcanza una eficiencia de 86 % con 7 g/L y 89 % con 10 g/L, mientras que a pH 3 la mayor eficiencia es de 60 % con 10 g/L; por otra parte, a pH 5 se alcanza tan solo un 20% con 10 g/L. La diferencia entre las pruebas a pH 3 y 4 está marcada por la sedimentación en el control provocada por un fenómeno de autofloculación inducido por pH como se puede observar en el primer punto (control) de la Figura 18.

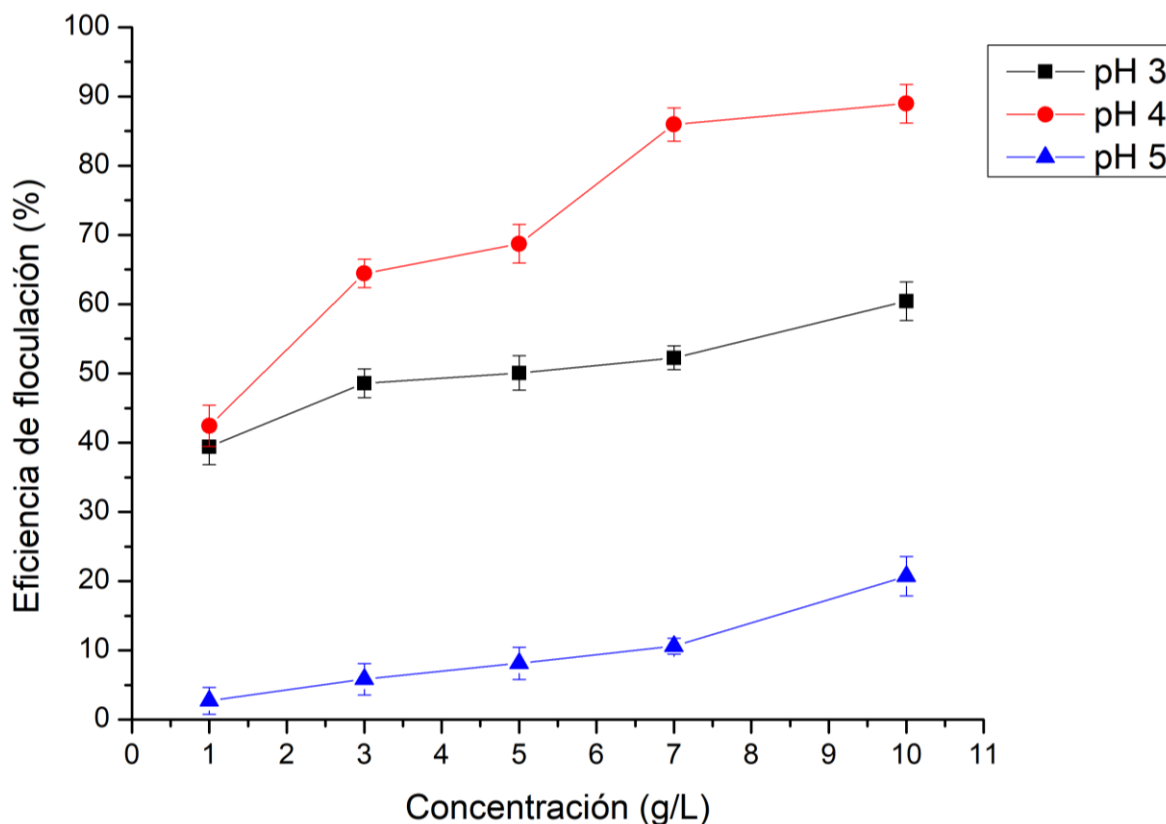


Figura 22. Eficiencia de floculación a diferentes pH y concentraciones de polímero.

La autofloculación inducida por pH normalmente se relaciona con la precipitación de iones y otros compuestos presentes en el medio, desestabilizando la suspensión y promoviendo la agregación celular, lo que ocurre a valores de pH altos (Ndikubwimana et al., 2015; Pérez, Salgueiro, Maceiras, Cancela, & Sánchez, 2017; Yang et al., 2016). A pH menores a 3 se dice que las microalgas presentan una carga superficial neta igual a cero lo que facilita su interacción y agregación (Stumm & Morgan, 1996; Sukenik & Shelef, 1984); sin embargo, se ha encontrado que en *Chlorella vulgaris* a estos pH se puede presentar desnaturalización y rompimiento de las células (Palomino, 2013). En la Figura 23, donde se muestra la remoción de biomasa a diferentes pH entre sin adición de polímero, se evidencia un drástico cambio en los valores de pH 2 y 3 con respecto a los demás puntos.

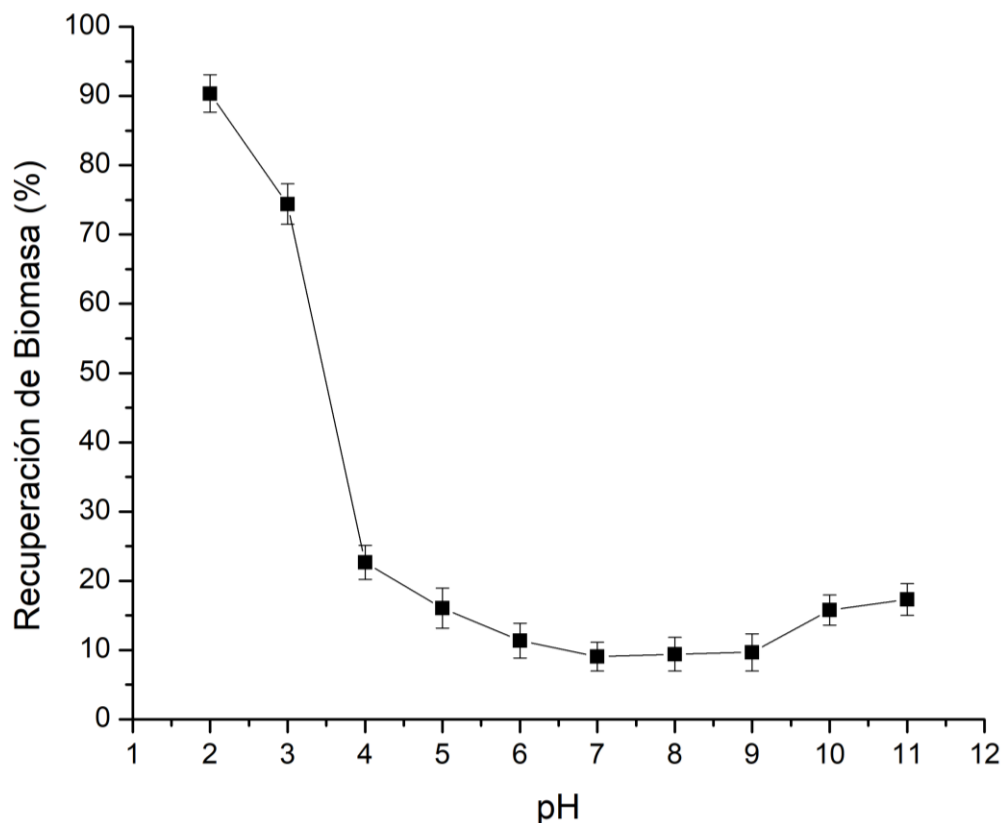


Figura 23. Autofloculación a diferentes pH.

En la figura 24 se puede apreciar la evolución de la recuperación de biomasa en el tiempo de sedimentación con pH 3 a diferentes concentraciones de polímero. Se observa que la mayor parte de la sedimentación ocurre en el tiempo cero, es decir, durante la agitación, con una remoción de entre 80 y 85 % en todas las concentraciones hasta alcanzar 90 % con la mayor concentración, la magnitud de la desviación estándar indica que durante el tiempo de sedimentación el cambio es poco significativo al igual que la concentración en los tres valores intermedios, dándose la mayor diferencia (5 %) entre los valores de concentración más bajo y más alto. Por otra parte, las muestras de control mostraron un avance progresivo en el tiempo desde 57 % hasta 75 % luego de 60 minutos de sedimentación.

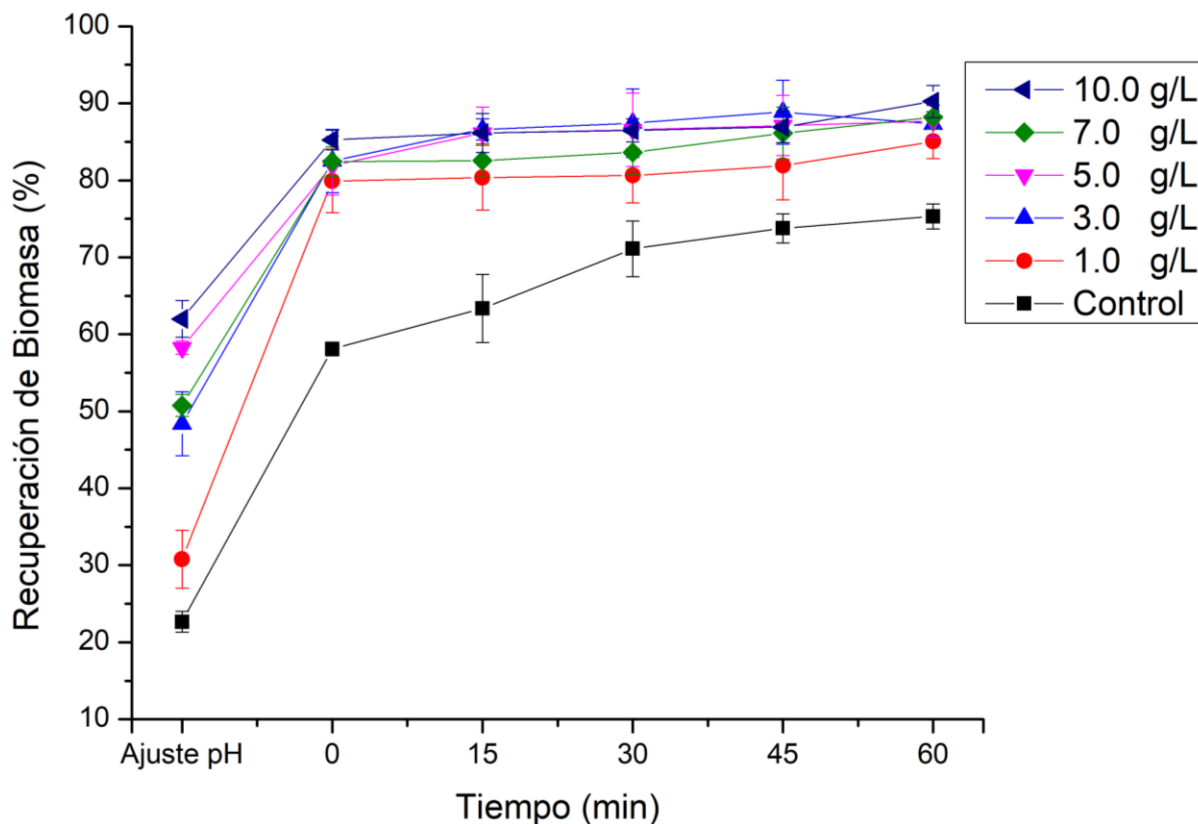


Figura 24. Recuperación de biomasa a pH 3, avance en el tiempo de sedimentación.

La figura 25 presenta el avance de la recuperación de biomasa a pH 4 y diferentes concentraciones de agente floculante a través del tiempo de sedimentación. Se evidencia que en concentraciones de 1 y 3 g/L la sedimentación aumenta desde alrededor de 7 % hasta 53 y 71 % respectivamente durante 45 minutos, sin un aumento significativo en el tiempo restante. Las concentraciones de 5, 7 y 10 g/L señalan un aumento importante en el tiempo de ajuste de pH, es decir antes de las etapas de agitación, lo cual indica que la agitación empleada para homogenizar y ajustar el pH fue suficiente para ocasionar un efecto instantáneo en la precipitación de biomasa. Las concentraciones de 7 y 10 g/L no presentaron diferencias significativas entre si luego de 30 minutos de sedimentación, tiempo luego del cual la recuperación de biomasa permaneció estable hasta el final de los experimentos.

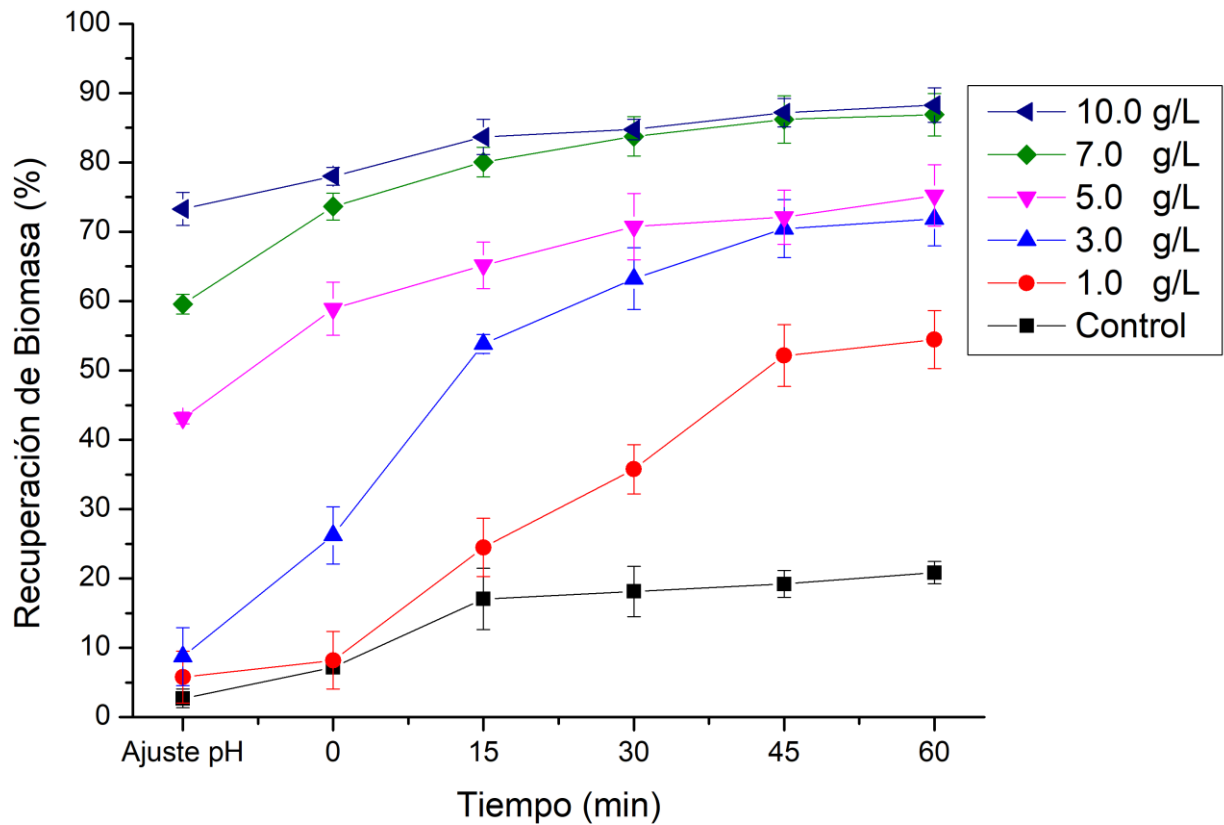


Figura 25. Recuperación de biomasa a pH 4, avance en el tiempo de sedimentación.

Este comportamiento sugiere que los tiempos de agitación y sedimentación pueden ser reducidos sin afectar el desempeño del polímero como agente floculante. A continuación, en la figura 26, se puede observar el registro fotográfico de los procesos de coagulación-floculación (a) y sedimentación (b).

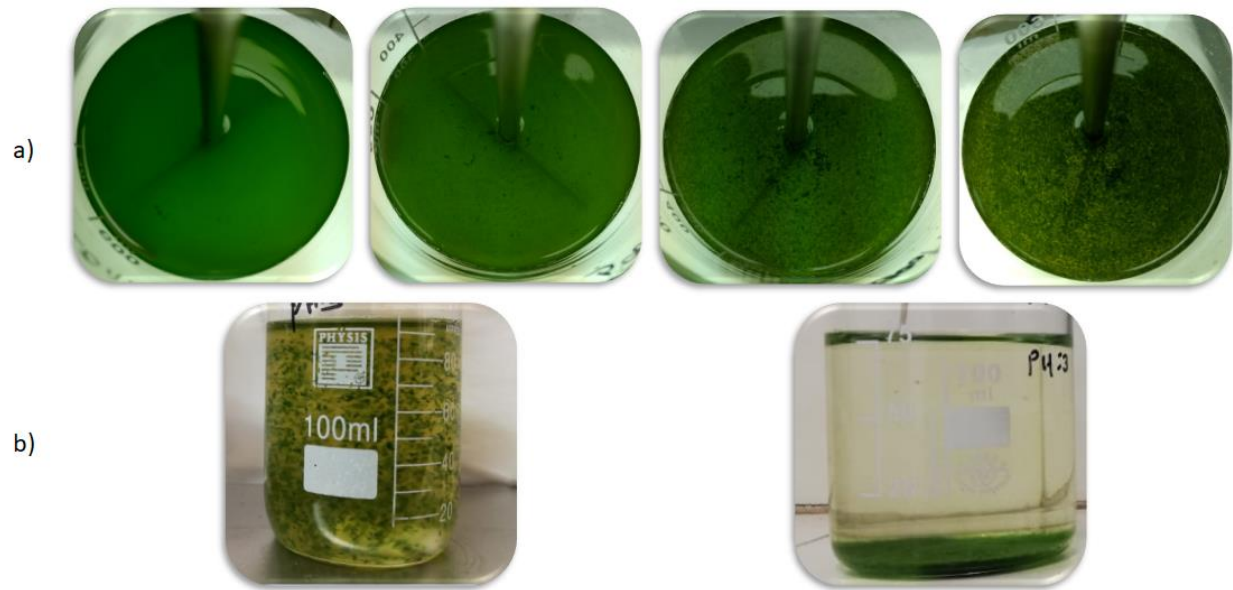


Figura 26. Registro fotográfico del proceso, a) coagulación - floculación y b) sedimentación.

3.3. Conclusiones

El polímero evaluado como agente floculante mostró un buen desempeño en la recuperación de biomasa, alcanzando un 90 % en menos de una hora de sedimentación. La actividad catiónica y el peso molecular fueron suficientes para causar un efecto instantáneo en la estabilidad de la suspensión y la velocidad sedimentación, alcanzando la mayor parte de la remoción antes de terminar la fase de agitación.

La actividad del polímero fue fuertemente afectada por el pH de la solución, alcanzando una remoción de biomasa de 90% con pH 4 y 30 % con pH 5. En pH inferiores a pH 3 el fenómeno de auto floculación es bastante fuerte, alcanzando una reducción en la absorbancia del cultivo de 90 % en pH 2; sin embargo, se debe tener en cuenta que un pH inferior a 3 puede causar rompimiento celular.

Es recomendable continuar con el estudio de este tipo de polímeros que pueden representar una alternativa importante en este tipo de aplicación.

Referencias

- Andersen, R. (2005). *Algal culturing techniques*. (R. Andersen, Ed.). Elsevier Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2005.06.003>
- Apt, K. E., & Behrens, P. W. (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520215.x>
- Ardila-Suárez, C., Rojas-Avellaneda, D., & Ramirez-Caballero, G. E. (2015). Effect of Temperature and Catalyst Concentration on Polyglycerol during Synthesis. *International Journal of Polymer Science*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/910249>
- Barrault, J., Clacens, J.-M., & Yannick, P. (2001). Methods for etherifying glycerol, and catalysts for implementing said methods.
- Barrow, C., & Shahidi, F. (2007). Marine Nutraceuticals and Functional Foods. *Lipids*. CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9781420015812>
- Becker, W. (2004). Microalgae in Human and Animal Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 312–351). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch18>
- Borowitzka, M. A. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 7(1), 3–15. <https://doi.org/10.1007/BF00003544>
- BP. (2018). *BP Statistical Review of World Energy*. Retrieved from <https://www.bp.com/content/dam/bp/en/corporate/pdf/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2018-full-report.pdf>
- Bratby, J. (2006). *Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment*. London: IWA

Publishing.

- Brennan, L., & Owende, P. (2010, February 1). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Campbell, W., Roe, W., & Way, W. K. (2007). *High Resolution Liquid Chromatography with Commercial HPLC Systems and Ascentis® Express HPLC Columns: Increasing Resolution by Column Coupling* (Vol. 25). Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Bulletin/t207004-ascentis-express.pdf>
- Cef, P. A. (2013). Scientific Opinion on the safety assessment of the substance, polyglycerol, CAS No 25618-55-7, for use in food contact materials. *EFSA Journal*, *11*(25618), 1–8. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3389>
- Chaumont, D. (1993). Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology*, *5*(6), 593–604. <https://doi.org/10.1007/BF02184638>
- Chen, S., Xu, Z., & Zhang, D. (2018, July 1). Synthesis and application of epoxy-ended hyperbranched polymers. *Chemical Engineering Journal*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.014>
- Chen, Y., Wang, L., Yu, H., Zhao, Y., Sun, R., Jing, G., ... Akram, M. (2015, June 1). Synthesis and application of polyethylene-based functionalized hyperbranched polymers. *Progress in Polymer Science*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.01.004>
- Cheruvu, S., Van Ginkel, S., Wei, X., Zhang, X., Steiner, D., Rego De Oliveira, S. H., ... Chen,

- Y. (2016). 13 – Algae harvesting. In *Membrane Technologies for Biorefining* (pp. 309–328).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100451-7.00013-X>
- Cohen, Z., & Cohen, S. (1991). Preparation of eicosapentaenoic acid (EPA) concentrate from *Porphyridium cruentum*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(1), 16–19.
<https://doi.org/10.1007/BF02660301>
- Derrick, M. R., Landry, J. M., & Stulik, D. (1999). *Infrared spectroscopy in conservation science*. Retrieved from <http://www.getty.edu/publications/virtuallibrary/0892364696.html>
- Dubé, M. A., & Li, L. (2010). In-Line Monitoring of SBR Emulsion Polymerization Using ATR-FTIR Spectroscopy. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 49(7), 648–656.
<https://doi.org/10.1080/03602551003664909>
- Ebewele, R. O. (2000). Condensation (Step-Reaction) Polymerization. In *Polymer Science and Technology* (pp. 161–180). CRC Press. [https://doi.org/10.1016/0025-5416\(85\)90434-3](https://doi.org/10.1016/0025-5416(85)90434-3)
- Etsuo, T., & Shinzo, U. (1984). Production of polyglycerol.
- Fevola, M. J., Sun, F. C., & York, S. E. (2012). Cationic polyglyceryl compositions and compounds. *Patent Application Publication*. Retrieved from <https://www.google.com/patents/US20120093753>
- Fischer, W., Calderón, M., & Haag, R. (2010). Hyperbranched polyamines for transfection. *Topics in Current Chemistry*, 296, 95–129. https://doi.org/10.1007/128_2010_64
- Fonseca, G. E., Dubé, M. A., & Penlidis, A. (2009, September 14). A critical overview of sensors for monitoring polymerizations. *Macromolecular Reaction Engineering*. Wiley-Blackwell.
<https://doi.org/10.1002/mren.200900024>
- Garzon-Sanabria, A. J., Ramirez-Caballero, S. S., Moss, F. E. P., & Nikolov, Z. L. (2013). Effect of algogenic organic matter (AOM) and sodium chloride on *Nannochloropsis salina*

- flocculation efficiency. *Bioresource Technology*, 143, 231–237.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.125>
- Ghasemi, A., Jafari, S., Saeidi, J., Mohtashami, M., & Salehi, I. (2018). Synthesis and characterization of polyglycerol coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and cytotoxicity evaluation on normal human cell lines. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 551, 128–136.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.05.003>
- Gholami, Z., Abdullah, A. Z., & Lee, K.-T. (2014). Dealing with the surplus of glycerol production from biodiesel industry through catalytic upgrading to polyglycerols and other value-added products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 327–341.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.092>
- Gilbert, M. T. (1987). The Column. In *High Performance Liquid Chromatography* (pp. 53–103). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7236-0897-4.50010-0>
- Gitte S. Jensen, P., Donald I. Ginsberg, M., & Christian Drapeau, M. (2001). Blue-Green Algae as an Immuno-Enhancer and Biomodulator. *Journal of American Nutraceutical Association*, 3(4), 24–30.
- Gosecki, M., Gadzinowski, M., Gosecka, M., Basinska, T., & Slomkowski, S. (2016, June 9). Polyglycidol, its derivatives, and polyglycidol-containing copolymers-synthesis and medical applications. *Polymers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
<https://doi.org/10.3390/polym8060227>
- Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. L. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85(2), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.005>

- Grossman, A. R., Bhaya, D., Apt, K. E., & Kehoe, D. M. (1995). Light-Harvesting Complexes in Oxygenic Photosynthesis: Diversity, Control, and Evolution. *Annual Review of Genetics*, 29(1), 231–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.001311>
- Guerrero-Urbaneja, P., García-Sancho, C., Moreno-Tost, R., Mérida-Robles, J., Santamaría-González, J., Jiménez-López, A., & Maireles-Torres, P. (2014). Glycerol valorization by etherification to polyglycerols by using metal oxides derived from MgFe hydrotalcites. *Applied Catalysis A: General*, 470, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2013.10.051>
- Hejna, A., Kosmela, P., Formela, K., Piszczyk, Ł., & Haponiuk, J. T. (2016). Potential applications of crude glycerol in polymer technology—Current state and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 449–475. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.020>
- Jikei, M., & Kakimoto, M. A. (2001, October 1). Hyperbranched polymers: A promising new class of materials. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. Pergamon. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00018-1)
- Laurens, L. M. L., Chen-Glasser, M., & McMillan, J. D. (2017, June 1). A perspective on renewable bioenergy from photosynthetic algae as feedstock for biofuels and bioproducts. *Algal Research*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.002>
- Li, J., & Sha, Y. (2008). A Convenient Synthesis of Amino Acid Methyl Esters. *Molecules*, 13(5), 1111–1119. <https://doi.org/10.3390/molecules13051111>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Mohd Noor, M. A., Sendjarevic, V., Hoong, S. S., Sendjarevic, I., Tuan Ismail, T. N. M., Hanzah, N., ‘Ain, ... Abu Hassan, H. (2016). Molecular Weight Determination of Palm Olein Polyols

- by Gel Permeation Chromatography Using Polyether Polyols Calibration. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(5), 721–730. <https://doi.org/10.1007/s11746-016-2812-y>
- Moore, E., Thissen, H., & Voelcker, N. H. (2013, August 1). Hyperbranched polyglycerols at the biointerface. *Progress in Surface Science*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.progsurf.2013.03.003>
- Morryson, & Boyd. (1998). Química Orgánica. *Department of Chemistry of Columbia University*, 1101–1120.
- Muto, M., Nojima, D., Yue, L., Kanehara, H., Naruse, H., Ujiro, A., ... Tanaka, T. (2016). Potential of water surface-floating microalgae for biodiesel production: Floating-biomass and lipid productivities. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.015>
- NAABB. (2014). National Alliance for Advanced Biofuels and Bio-products (NAABB) Full Final Report. *United States Department of Energy; Office of Energy Efficiency and Renewable Energy; National Alliance for Advanced Biofuels and Bio-Products*, 150. <https://doi.org/http://energy.gov/eere/bioenergy/downloads/national-alliance-advanced-biofuels-and-bioproducs-synopsis-naabb-final>
- Ndikubwimana, T., Zeng, X., He, N., Xiao, Z., Xie, Y., Chang, J.-S., ... Lu, Y. (2015). Microalgae biomass harvesting by bioflocculation-interpretation by classical DLVO theory. *Biochemical Engineering Journal*, 101, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.010>
- Okuda, T., Baes, A. U., Nishijima, W., & Okada, M. (1999). Improvement of extraction method of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed. *Water Research*, 33(15), 3373–3378. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00046-9)

- Oudshoorn, M. H. M., Rissmann, R., Bouwstra, J. A., & Hennink, W. E. (2006). Synthesis and characterization of hyperbranched polyglycerol hydrogels. *Biomaterials*, 27(32), 5471–5479. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.030>
- Palomino, A. (2013). *Extracción de aceite de microalgas*. Universidad del Valle. Retrieved from <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/9135/1/CB-0486620.pdf>
- Papazi, A., Makridis, P., & Divanach, P. (2010). Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. *Journal of Applied Phycology*, 22(3), 349–355. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9465-2>
- Parzuchowski, P. G., Świdarska, A., Roguszevska, M., Frączkowski, T., & Tryznowski, M. (2018). Amine functionalized polyglycerols obtained by copolymerization of cyclic carbonate monomers. *Polymer*, 151, 250–260. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2018.07.055>
- Patel, S. H., Bakeev, K. A., Chen, G., Zhang, Q., & Wan, C. (2010). Determination of %polyvinyl alcohol in vinyl acetate-alcohol resins by quantitative near infrared spectroscopic analysis. *Advances in Polymer Technology*, 29(1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/adv.20166>
- Pérez, L., Salgueiro, J. L., Maceiras, R., Cancela, Á., & Sánchez, Á. (2017). An effective method for harvesting of marine microalgae: pH induced flocculation. *Biomass and Bioenergy*, 97, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.12.010>
- Postnova, I., Silant'ev, V., Kim, M. H., Song, G. Y., Kim, I., Ha, C.-S., & Shchipunov, Y. (2013). Hyperbranched polyglycerol hydrogels prepared through biomimetic mineralization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.026>
- Pretsch, E., Bullmann, P., & Affolter, C. (2000). *Structure Determination of Organic Compounds:*

- Tables of Spectral.* Springer. Retrieved from <https://books.google.com.pk/books?id=9DiWLAwNyaUC>
- Pulz, O., & Scheibenbogen, K. (1998). Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. In *Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis* (pp. 123–152). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/BFb0102298>
- Raesossadati, M. J., Ahmadzadeh, H., McHenry, M. P., & Moheimani, N. R. (2014). CO₂ bioremediation by microalgae in photobioreactors: Impacts of biomass and CO₂ concentrations, light, and temperature. *Algal Research*, 6, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.007>
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.004>
- Reinaldo, J. S., Pereira, L. M., Silva, E. dos S., Ueki, M. M., & Ito, E. N. (2018). Effect of the chemical structure on the linear viscoelastic behavior of acrylic and styrenic polymer blends. *Polymer Testing*, 67, 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.03.013>
- RH, Perry; DW, G. (1999). *Perry's Chemical Engineers' Handbook, Eighth Edition. Journal of Chemical Education*. McGraw-Hill. <https://doi.org/10.1036/0071422943>
- Richmond, A. (2003). *Handbook of Microalgal Culture*. (A. Richmond, Ed.). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995280>
- Roberge, S., & Dubé, M. A. (2007). Inline monitoring of styrene/butyl acrylate miniemulsion polymerization with attenuated total reflectance/Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, 103(1), 46–52. <https://doi.org/10.1002/app.23962>
- Rogošić, M., Mencer, H. J., & Gomzi, Z. (1996). Polydispersity index and molecular weight

- distributions of polymers. *European Polymer Journal*, 32(11), 1337–1344.
[https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(96\)00091-2](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(96)00091-2)
- Rokicki, G., Rakoczy, P., Parzuchowski, P., & Sobiecki, M. (2005). Hyperbranched aliphatic polyethers obtained from environmentally benign monomer: Glycerol carbonate. *Green Chemistry*, 7(7), 529–539. <https://doi.org/10.1039/b501597a>
- Salehpour, S. (2012). *Synthesis of stimuli-responsive hydrogels from glycerol*. University of Ottawa.
- Salehpour, S., & Dubé, M. A. (2011). Towards the sustainable production of higher-molecular-weight polyglycerol. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 212(12), 1284–1293.
<https://doi.org/10.1002/macp.201100064>
- Salehpour, S., & Dubé, M. A. (2012). Reaction Monitoring of Glycerol Step-Growth Polymerization Using ATR-FTIR Spectroscopy. *Macromolecular Reaction Engineering*, 6(2–3), 85–92. <https://doi.org/10.1002/mren.201100071>
- Salim, S., Bosma, R., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2011). Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of Applied Phycology*, 23(5), 849–855. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9591-x>
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., ... Hankamer, B. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, 1(1), 20–43. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>
- Schlesinger, A., Eisenstadt, D., Bar-Gil, A., Carmely, H., Einbinder, S., & Gressel, J. (2012). Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1023–1030.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.011>

- Schubert, C., Dreier, P., Nguyen, T., Maciol, K., Blankenburg, J., Friedrich, C., & Frey, H. (2017). Synthesis of linear polyglycerols with tailored degree of methylation by copolymerization and the effect on thermorheological behavior. *Polymer (United Kingdom)*, *121*, 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.05.030>
- Shenoi, R. A., Lai, B. F. L., Imran ul-haq, M., Brooks, D. E., & Kizhakkedathu, J. N. (2013). Biodegradable polyglycerols with randomly distributed ketal groups as multi-functional drug delivery systems. *Biomaterials*, *34*(25), 6068–6081. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.043>
- Smith, B. (2011). *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC Press.
- Socrates, G. (2007). *Infrared and raman characteristic group frequencies : tables and charts*. (Vol. 35). John Wiley & Sons. Retrieved from <https://www.wiley.com/en-us/Infrared+and+Raman+Characteristic+Group+Frequencies%3A+Tables+and+Charts%2C+3rd+Edition-p-9780470093078>
- Spencer, J. N. (James N., Bodner, G. M., & Rickard, L. H. (2012). *Chemistry : structure and dynamics*. Wiley.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stolz, P., & Obermayer, B. (2003). Manufacturing microalgae for skin care, *120*(3), 99–106.
- Stumm, W., & Morgan, J. (1996). *Aquatic chemistry : chemical equilibria and rates in natural waters* (3rd ed.). Wiley.
- Su, Y., Zhang, P., & Su, Y. (2015). An overview of biofuels policies and industrialization in the major biofuel producing countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *50*, 991–

1003. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.032>

Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H. H., & Renganathan, S. (2016). Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 909–941. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.026>

Sukenik, A., & Shelef, G. (1984). Algal autoflocculation—verification and proposed mechanism. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(2), 142–147. <https://doi.org/10.1002/bit.260260206>

Sunder, A., Hanselmann, R., Frey, H., & Mülhaupt, R. (1999). Controlled Synthesis of Hyperbranched Polyglycerols by Ring-Opening Multibranching Polymerization. *Macromolecules*, 32(13), 4240–4246. <https://doi.org/10.1021/ma990090w>

Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M., & Hoadley, A. (2010, January 12). Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*. American Institute of Physics. <https://doi.org/10.1063/1.3294480>

Um, B. H., & Kim, Y. S. (2009). Review: A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2008.08.002>

Urban, C. (2016). *Development of a glycerol-based polymer functionalized with glutamic acid to be used as a flocculant agent for the recovery of chlorella vulgaris biomass from aqueous media*. Univerisdad Industrial de Santander.

Vandamme, D., Foubert, I., & Muylaert, K. (2013). Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*, 31(4), 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.005>

Wade, L. G. (2013). *Organic Chemistry Eight Edition*.

<https://doi.org/10.1002/0471743984.vse5459.pub2>

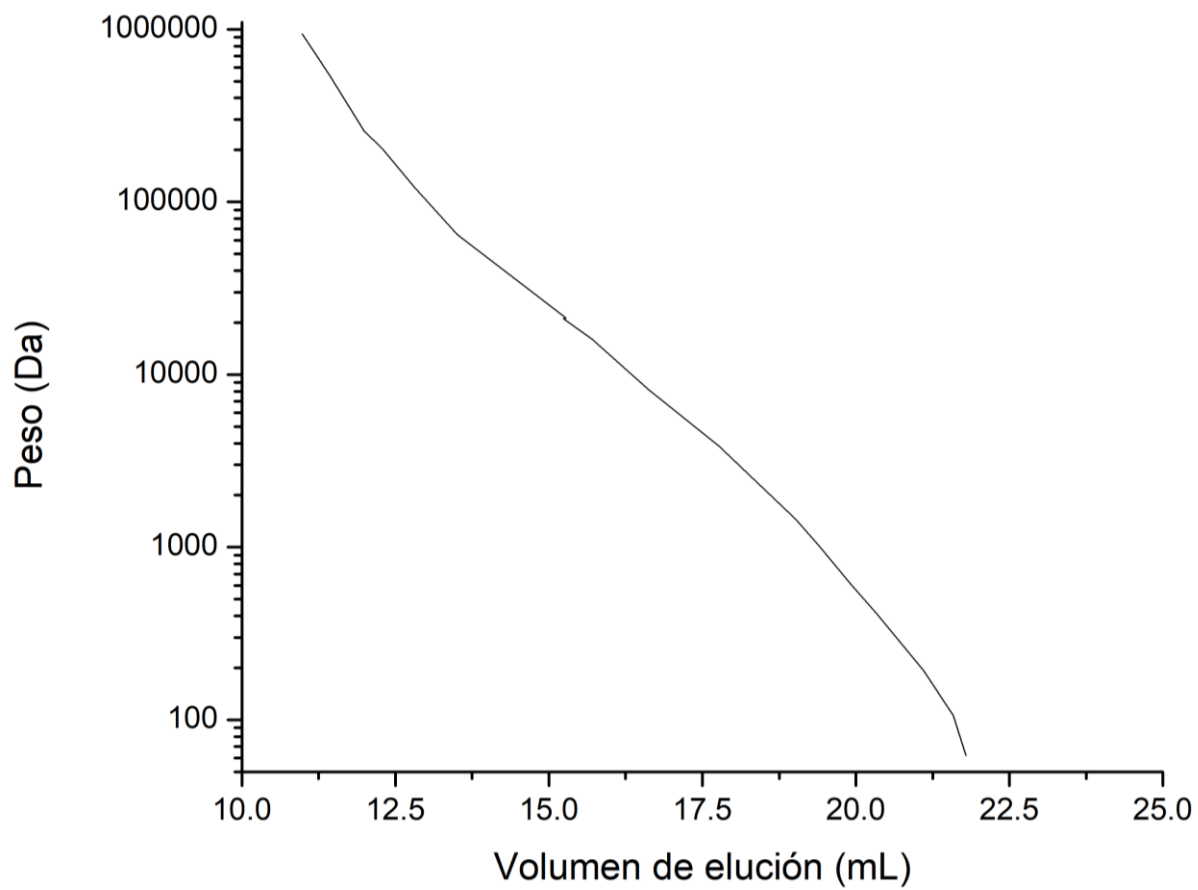
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 707–718. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>
- Wang, D., Jin, Y., Zhu, X., & Yan, D. (2017, January 1). Synthesis and applications of stimuli-responsive hyperbranched polymers. *Progress in Polymer Science*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.09.005>
- Wei, T., Zhou, Y., Zhan, W., Zhang, Z., Zhu, X., Yu, Q., & Chen, H. (2017). Effects of polymer topology on biointeractions of polymer brushes: Comparison of cyclic and linear polymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 527–532. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.021>
- Yang, F., Xiang, W., Fan, J., Wu, H., Li, T., & Long, L. (2016). High pH-induced flocculation of marine *Chlorella* sp. for biofuel production. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 747–756. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0576-7>
- Yusuf, C. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>

Apéndices

Apéndice A. Curva de calibración: Columnas HPLC-GPC

Tabla de datos, Curva de calibración: Arreglo de dos columnas

Peso molecular [Da]	Volumen de elución 1 [mL]	Volumen de elución 2 [mL]	Volumen de elución 3 [mL]	Volumen de elución promedio [mL]
62.07	21.7925	21.7925	21.7925	21.7925
106	21.581	21.5995	21.581	21.58717
194	21.096	21.109	21.086	21.097
410	20.3435	20.3565	20.33	20.34333
610	19.9235	19.9345	19.903	19.92033
1020	19.4095	19.4055	19.3925	19.4025
1450	19.0265	19.028	19.0115	19.022
3860	17.7775	17.774	17.758	17.76983
8160	16.634	16.629	16.6265	16.62983
16100	15.7025	15.6995	15.6915	15.69783
21160	15.2335	15.2345	15.2285	15.23217
21230	15.28	15.281	15.2825	15.28117
29420	14.767	14.762	14.7615	14.7635
49390	13.9395	13.931	13.9345	13.935
64850	13.5105	13.5135	13.498	13.50733
122200	12.8205	12.817	12.7905	12.80933
205500	12.303	12.2705	12.2415	12.27167
256100	12.0235	11.962	11.993	11.99283
542500	11.513	11.4	11.3645	11.42583
724500	11.2715	11.1875	11.129	11.196
942000	11.0475	10.978	10.922	10.9825



Curva de calibración, Arreglo de 2 columnas

Apéndice B.
Integración completa de cromatogramas HPLC-GPC poliglicerol

Integración completa de cromatogramas de poliglicerol

"1-1"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	26.89167	1215.00125	13.30572561	66201.98145
	2	30.90833	3214.41543	35.20171662	18843.06024
	3	40.875	520.58305	5.701010775	371.87669
	4	42.525	4181.41697	45.791547	163.54792
	total	-	9131.4167	100	-
"1-2"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.175	1506.40317	14.42616665	58922.98047
	2	27.56667	260.77183	2.497298169	52919.63086
	3	41.69167	2941.70429	28.17141996	250.26617
	4	42.51667	5733.27909	54.90511522	164.30408
	total	-	10442.15838	100	-
"1-3"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.36667	2864.84433	24.35435295	55452.65039
	2	27.79167	318.83855	2.71048116	51080.08789
	3	28.325	436.85293	3.713734228	48169.70117
	4	28.84167	424.71807	3.610574464	42506.4375
	5	40.96667	2488.53319	21.15529106	355.7641
	6	41.61667	1865.53203	15.8590905	259.60994
	7	42.50833	3363.8525	28.59647563	165.06
	total	-	11763.1716	100	-
"2-1"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.025	1183.575	10.94284147	62446.55371
	2	42.55833	9632.40002	89.05715853	160.54166
	total	-	10815.97502	100	-
"2-2"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.325	1468.36249	13.70864236	56113.96094
	2	27.64167	230.81437	2.154884555	52207.68555
	3	28.10833	324.74486	3.031820259	49396.13086
	4	41.68333	3297.24997	30.78314852	251.28873
	5	42.525	5390.04574	50.3215043	163.54792
	total	-	10711.21743	100	-

"2-3"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.75833	1821.97083	16.60221033	51301.87109
	2	28.3	292.97196	2.66962677	48332.63086
	3	28.86667	493.7822	4.4994551	42103.1582
	4	41.05833	1946.42238	17.73624101	340.34917
	5	41.64167	2449.59426	22.32125699	256.45953
	6	42.50833	3969.52501	36.1712098	165.06
total	-		10974.26664	100	-
"3-1"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.60833	1031.34096	10.85005305	52510.05273
	2	27.925	132.74243	1.396494916	50310.32813
	3	41.69167	2400.83751	25.2576164	250.26617
	4	42.50833	5940.47926	62.49583563	165.06
total	-		9505.40016	100	-
"3-2"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.05	1304.93187	16.0815978	61807.84961
	2	27.50833	170.60639	2.102503134	53556.74414
	3	27.98333	275.95341	3.400768924	50012.42578
	4	41.64167	3422.51528	42.17807494	256.45953
	5	42.51667	2940.4347	36.2370552	164.30408
total	-		8114.44165	100	-
"3-3"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	17.01667	741.94584	7.125735586	>1MDa
	2	20.5	275.08715	2.641969519	>1MDa
	3	25.5	1126.11279	10.8153204	132439.1152
	4	27.775	1470.63336	14.1241367	51189.09375
	5	28.43333	355.92083	3.418305741	47369.86523
	6	29.04167	744.07082	7.146144145	38973.58398
	7	40.93333	2473.46668	23.75546649	361.54211
	8	41.6	1131.03423	10.8625865	261.73037
	9	42.50833	2093.92829	20.11033491	165.06
total	-		10412.19999	100	-
"4-1"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.48333	1351.93335	11.80891111	53853.99609
	2	41.725	2354.44449	20.5656778	246.2127
	3	42.525	7742.03885	67.62541109	163.54792
total	-		11448.41669	100	-

"4-2"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.55	2331.99786	19.39155451	53094.02344
	2	27.85	203.03226	1.688299636	50723.31055
	3	28.325	445.43319	3.703966514	48169.70117
	4	41	2755.76264	22.91533898	350.08052
	5	41.64167	2343.38917	19.4862781	256.45953
	6	42.51667	3946.22767	32.81456226	164.30408
total	-		12025.84279	100	-
"4-3"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	18.35	3022.13397	26.90353868	>1MDa
	2	22.40833	173.36123	1.543290471	719273.3572
	3	24.38333	1560.0065	13.88743703	213775.9775
	4	27.26667	1019.40434	9.074906792	57124.66113
	5	27.84167	338.35752	3.012114856	50772.2168
	6	28.48333	658.26968	5.860026052	46941.05859
	7	40.85	1959.86926	17.44708175	376.39692
	8	41.56667	603.64531	5.373750835	266.0174
9	42.525	1898.17324	16.89785353	163.54792	
total	-		11233.22105	100	-
"5-1"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.53333	949.22113	10.03906795	53274.22266
	2	42.54167	8506.05036	89.96093205	162.04274
total	-		9455.27149	100	-
"5-2"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.53333	1157.95865	10.06207763	53274.22266
	2	42.55	10350.188	89.93792237	161.29166
total	-		11508.14665	100	
"5-3"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.53333	2272.88331	18.73583671	53274.22266
	2	40.99167	2859.80416	23.57394395	351.49199
	3	41.63333	2905.03742	23.94681086	257.50677
	4	42.51667	4093.48305	33.74340849	164.30408
total	-		12131.20794	100	
"6-1"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.63333	856.04112	9.319420052	52281.25
	2	42.54167	8329.52102	90.68057995	162.04274
total	-		9185.56214	100	-
"6-2"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.63333	982.31709	8.925806784	52281.25
	2	42.54167	10023.04202	91.07419322	162.04274
total	-		11005.35911	100	

"6-3"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.63333	2556.89192	20.47026343	53274.22266
	2	40.99167	2898.12071	23.20211265	351.49199
	3	41.63333	2869.31657	22.97150911	257.50677
	4	42.51667	4166.43297	33.35611481	164.30408
	total	-	12490.76217	100	
"5-R"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	22.19167	956.57532	8.420078139	822460.3027
	2	29.4	3743.19646	32.94879768	31595.5625
	3	32.26667	3394.9338	29.88327973	11725.5117
	4	41.63333	1736.20591	15.28263287	257.50677
	5	42.54167	947.72289	8.342156254	164.30408
	6	43.94167	582.01221	5.123055324	62.07
	total	-	11360.64659	100	
"6-R"	Pico #	tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	22.775	1014.50095	8.559954434	567401.3545
	2	32.18333	7223.31288	60.94743343	12095.55473
	3	41.63333	1899.05202	16.0234436	257.50677
	4	42.53333	1146.165	9.670883181	162.79571
	5	43.95833	568.67885	4.798285348	62.07
	total	-	11851.7097	100	

Apéndice C.
Integración completa de cromatogramas HPLC-GPC poliglicerol-ester

Integración completa de cromatogramas de poliglicerol

A	Pico #	Tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.525	1399.894	14.15944	53366.77344
	2	30.75833	2113.251	21.37479	19667.42623
	3	31.20833	469.2621	4.74642	17150.60109
	4	31.425	249.9329	2.527983	15937.50847
	5	31.65	279.2417	2.824431	14718.51893
	6	31.91667	1258.867	12.73299	13354.17809
	7	32.675	1575.886	15.93953	10075.88644
	8	40.88333	1089.465	11.01956	370.38287
	9	42.36667	1450.852	14.67486	178.15343
	total		9886.652	100	
B	Pico #	Tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.525	1435.247	15.40596	53366.77344
	2	30.70833	2544.371	27.31131	19935.12951
	3	31.2	380.1666	4.080713	17197.67814
	4	31.425	282.0168	3.027172	15937.50847
	5	31.65	306.5833	3.290869	14718.51893
	6	32.425	1188.125	12.75335	11053.74297
	7	32.675	965.3986	10.3626	10075.88644
	8	40.88333	1056.429	11.33972	370.38287
	9	42.44167	1157.843	12.4283	171.16206
	total		9316.18	100	
C	Pico #	Tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.49167	1257.415	14.58602	53753.39453
	2	30.75833	2353.607	27.30187	19667.42623
	3	31.20833	551.337	6.395515	17150.60109
	4	31.425	293.5627	3.40533	15937.50847
	5	31.60833	533.2955	6.186233	14940.1416
	6	40.88333	1014.492	11.76812	370.38287
	7	42.50833	2616.973	30.35691	165.06
	total		8620.682	100	

D	Pico #	Tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.41667	1333.415	15.54	54723.32813
	2	30.75833	2394.206	27.90277	19667.42623
	3	31.20833	531.437	6.19352	17150.60109
	4	31.4	534.2581	6.226398	16075.94374
	5	40.875	801.0895	9.336128	371.87669
	6	42.50833	2986.127	34.80119	165.06
	total		8580.533	100	
E	Pico #	Tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	27.58333	658.543	7.286166	52751.5
	2	30.75833	2299.059	25.43695	19667.42623
	3	31.21667	831.8336	9.203465	17103.48664
	4	40.85833	386.9335	4.281059	374.88512
	5	42.53333	4861.896	53.79236	162.79571
	total		9038.265	100	
F	Pico #	Tiempo de retención	Área	% Área	Peso estimado
	1	26.90833	1059.388	10.69858	65700.44629
	2	42.525	8842.749	89.30142	163.54792
	total		9902.137	100	