

RUTA FAVORABLE DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS PROCEDENTES DE LODO DE PTAR SALITRE

Autor: Natalia Cuevas Sua¹ – nacuevass@udistrital.edu.co

Docente asesor: Jeniffer Paola Gracia Rojas

Semillero de investigación: Semillero de Gestión Ambiental ARAZÁ

RESUMEN

El trabajo de investigación se desarrolló en el marco del convenio Minciencias N° 1016-2021, en colaboración con la Universidad Nacional de Colombia, el ICETEX y el Ministerio de Ciencia. Se implementó un diseño experimental, precedido por una revisión bibliográfica para seleccionar los reactivos adecuados en la extracción y purificación de PHA.

El PHA se obtuvo mediante un proceso fermentativo de selección de los microorganismos productores de PHA y acumulación del PHA a nivel intracelular, bajo condiciones previamente establecidas. Se emplearon lodos de la planta de tratamiento de aguas residuales “Salitre” como sustrato y

microorganismos mixtos con el objetivo de reducir los costos de esterilización.

Los resultados indicaron que la mejor ruta para la extracción y purificación del PHA incluyó la lisis celular con SDS en una relación de 10 ml/g, seguida de la extracción con ácido acético en una relación de 15 ml/g de biomasa lisada y, finalmente, la purificación con metanol en una relación de 100 ml/g de PHA. Esta metodología permitió optimizar el rendimiento en la obtención de polihidroxicanoatos.

PALABRAS CLAVES

Polihidroxicanoatos, extracción, purificación, cultivos mixtos.

¹ Administración Ambiental, Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

ABSTRACT

The research was conducted under the Minciencias Agreement No. 1016-2021, in collaboration with the National University of Colombia, ICETEX, and the Ministry of Science. An experimental design was implemented, preceded by a bibliographic review to select the appropriate reagents for the extraction and purification of PHA.

PHA was obtained through a fermentation process involving the selection of PHA-producing microorganisms and the intracellular accumulation of PHA under previously established conditions. Sewage sludge from the "Salitre" wastewater treatment plant was used as a substrate, along with mixed microbial cultures, to reduce sterilization costs.

The results indicated that the best route for PHA extraction and purification included cell lysis with SDS at a ratio of 10 ml/g, followed by extraction with acetic acid at a ratio of 15 ml/g of lysed biomass, and finally, purification with methanol at a ratio of 100 ml/g of PHA.

This methodology optimized the yield in obtaining polyhydroxyalkanoates.

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, extraction, purification, mixed cultures.

INTRODUCCIÓN

Los polihidroxicanoatos (PHA) representan una alternativa sostenible a los plásticos sintéticos, debido a que son biopolímeros biodegradables producidos por microorganismos como reserva de carbono y energía en condiciones de estrés. Estos se clasifican según el número de monómeros que los componen en PHA de cadena corta (3 a 5 átomos de carbono), de cadena media (6 a 14 átomos de carbono) y copolímeros (combinación de monómeros de diferentes longitudes).

La producción industrial de PHA se lleva a cabo, principalmente, con cultivos puros que requieren condiciones estériles. Sin embargo, su alto costo sigue siendo una limitante, dado que el sustrato representa

aproximadamente el 40 % del costo total de producción y los reactivos utilizados en la extracción y purificación pueden ser costosos y contaminantes (Kourmentza et al., 2017; Mannina et al., 2020). Esto evidencia la necesidad de desarrollar mejoras operativas para aumentar la eficiencia del proceso de manera más sostenible.

En este contexto, el presente estudio busca optimizar la producción de PHA mediante el uso de lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales como sustrato y cultivos mixtos previamente seleccionados, reduciendo así los costos de esterilización. Además, la implementación de reactivos sostenibles en la extracción y purificación permitirá mejorar la replicabilidad y escalabilidad del proceso a menor costo. Estos avances contribuirán a la sustitución de plásticos convencionales en el marco de la Ley 2232 de 2022, que regula la reducción de plásticos de un solo uso en Colombia, y alinean la investigación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS); número 6 (Agua limpia y saneamiento),

número 9 (Industria, innovación e infraestructura) y número 12 (Producción y consumo responsables).

MÉTODOS

Este estudio se enmarca en un enfoque cuantitativo, experimental y de tipo aplicado, con un diseño completamente al azar multifactorial, orientado a evaluar la influencia de distintos factores sobre la eficiencia del proceso de extracción y purificación de polihidroxicanoatos (PHAs) obtenidos a partir de cultivos mixtos alimentados con ácidos grasos volátiles (AGVs), generados a partir de lodos provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) Salitre.

El trabajo inició con una revisión bibliográfica sistemática, apoyada en el software **Bibliometrix** de RStudio, con el objetivo de identificar las metodologías más efectivas, viables y sostenibles reportadas en la literatura científica para la lisis celular, extracción y purificación de PHAs. Dicha

revisión incluyó criterios de evaluación como eficiencia de recuperación, pureza, impacto ambiental y viabilidad económica, siguiendo directrices como la guía de química verde de **GSK**.

Con base en esta revisión, se diseñaron los procedimientos experimentales, que consistieron en la evaluación de tres etapas: **(i)** lisis celular, en la cual se determinó el uso de SDS al 18% (10 ml/g de biomasa seca), NaOH al 4% (10 ml/g de biomasa seca) y H₂SO₄ al 20% (10 ml/g de biomasa seca); **(ii)** extracción, etapa en la que se empleó ácido acético en tres concentraciones diferentes (10, 15 y 20 ml/g de biomasa lisada); y **(iii)** purificación, donde se evaluaron dos métodos: *solvent casting*, utilizando una proporción de 100 ml/g de PHA, y la precipitación del PHA contenido en la muestra de ácido acético mediante la adición de metanol en una cantidad igual a la del ácido acético empleado.

Las combinaciones de tratamientos dieron lugar a un total de 19 combinaciones,

incluyendo un blanco o control positivo, en el cual se empleó hipoclorito para la etapa de lisis celular y cloroformo para la extracción y purificación del PHA. Cada combinación fue replicada por triplicado, para un total de 57 ensayos experimentales.

El proceso experimental se llevó a cabo utilizando biomasa obtenida de un cultivo mixto previamente enriquecido mediante ciclos de selección y acumulación. Los AGVs empleados como sustrato fueron generados a través de fermentación acidogénica de lodos de PTAR, utilizando un medio mineral pobre en nitrógeno y condiciones de tipo "fiesta-hambruna", implementadas durante 10 ciclos de 3 días.

Una vez ejecutado el diseño, se recopiló la información en función de las variables de respuesta de la siguiente manera:

- **Rendimiento experimental:**
Corresponde a la fracción de PHA con respecto a la biomasa seca inicial del tratamiento medida por gravimetría.

$$Re = \frac{PHA}{Bs} \times 100$$

Donde:

Re: Rendimiento experimental (%).

PHA: PHA medido por gravimetría (g).

Bs: Biomasa seca (g).

- **Pureza de la muestra:** Corresponde a la pureza obtenida de la cromatografía HPLC.

$$Pm = \frac{PHAc * Vm}{PHAm} \times 100$$

Donde:

Pm: Pureza de la muestra (%).

PHAc: PHA obtenido por cromatografía (mg/L).

Vm: Volumen de la muestra en el cromatógrafo (L).

PHAm: PHA de la muestra en el cromatógrafo (g).

- **Rendimiento real:** Corresponde a la fracción de PHA obtenido con respecto a la biomasa seca inicial del tratamiento medida por gravimetría, multiplicado por el porcentaje de pureza de la muestra obtenido en la cromatografía HPLC.

$$Rr = \frac{PHA}{Bs} * Pm$$

Donde:

Rr: Rendimiento real (%).

PHA: PHA medida por gravimetría (g).

Bs: Biomasa seca (gr).

Pm: Pureza de la muestra (%).

- **Recuperación experimental:** Corresponde a la fracción del rendimiento experimental obtenido con respecto al rendimiento experimental del tratamiento control o blanco, es decir el máximo rendimiento experimental posible.

$$RCe = \frac{Re}{Reb} * 100$$

Donde:

RCe: Recuperación experimental (%).

Re: Rendimiento experimental (%).

Reb: Rendimiento experimental del blanco (%).

- **Recuperación real:** Corresponde a la fracción del rendimiento real obtenido con respecto al rendimiento real del tratamiento control o blanco, es decir máximo rendimiento real posible.

$$RCr = \frac{Rr}{Rrb} * 100$$

Donde:

RCr: Recuperación real (%).

Rr: Rendimiento real (%).

Rrb: Rendimiento real del blanco (%).

- **Pureza del tratamiento:** Corresponde a la fracción de PHA puro obtenido con respecto al PHA obtenido del tratamiento

control, es decir, la máxima pureza posible.

$$Pt = \frac{PHAr}{PHArb} * Pmb$$

Donde:

Pt: Pureza del tratamiento (%).

PHAr: PHA real (g).

PHArb: PHA real del blanco (g)

Pmb: Pureza de la muestra del blanco (%).

Finalmente, los resultados se analizaron mediante gráficos y tablas de Excel, y se aplicó un análisis ANOVA para identificar el efecto individual y combinado de los factores F1, F2 y F3 sobre el rendimiento real (variable dependiente principal). Este enfoque permitió establecer la combinación de condiciones más favorables para maximizar el rendimiento y la pureza del biopolímero, minimizando los impactos operativos y ambientales.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos que fueron tabulados y calculados en las variables de respuesta se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Resultados de implementación del diseño.

	Re (%)	Pm (%)	Bc (%)	BCe (%)	BCr (%)	Pt (%)
SIAM	2,42	24,53	0,58	80,39	26,06	10,52
SIM	5,86	15,64	0,78	194,62	34,83	15,67
SZAM	1,82	30,37	0,55	60,46	24,47	9,92
S2M	6,97	15,62	1,22	231,66	54,61	19,62
S3AM	1,54	15,06	0,23	51,11	10,36	4,15
S3M	7,40	19,24	1,05	246,04	47,13	26,15
NIAM	1,18	6,02	0,07	39,28	3,19	2,17
N1M	3,24	0,00	0,00	107,72	0,00	0,00
N2AM	1,43	4,56	0,07	47,40	2,92	1,98
N2M	2,32	0,00	0,00	77,04	0,00	0,00
N3AM	0,96	5,65	0,05	31,91	2,40	1,61
N3M	3,51	0,00	0,00	116,49	0,00	0,00
H1AM	1,62	0,00	0,00	53,80	0,00	0,00
H1M	2,50	4,61	0,10	83,20	4,65	3,15
H2AM	1,66	0,00	0,00	55,25	0,00	0,00
H2M	4,30	3,91	0,17	142,74	7,46	5,08
H3AM	1,62	0,00	0,00	53,75	0,00	0,00
H3M	2,95	6,47	0,14	97,94	6,11	4,17
B	3,01	74,31	2,24			

Fuente: Autora, 2025

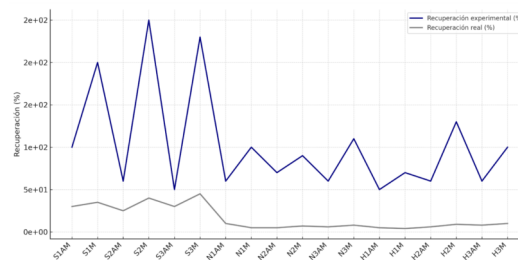
DISCUSIÓN

A partir de la Tabla 1, se pueden analizar diversos aspectos. En primer lugar, se observa que el rendimiento experimental es significativamente mayor que el rendimiento real, alcanzando valores porcentuales superiores a los del tratamiento control o

blanco. Esto se refleja en los datos de recuperación experimental (Ver figura 1).

Esta diferencia se debe a que el ruido (material no PHA) presente en el origen de la muestra es demasiado alto, y el tratamiento de purificación no logra eliminar completamente los componentes provenientes de la fermentación de selección y acumulación. Estos componentes corresponden principalmente a materia orgánica y restos celulares generados por el proceso de lisis.

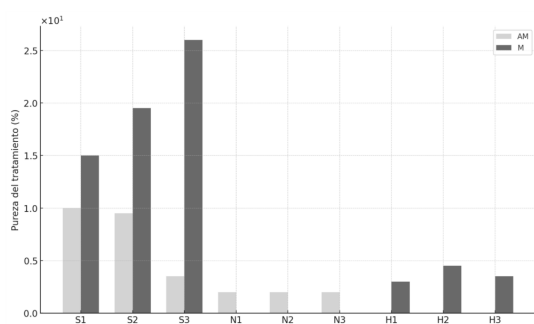
Figura 1. Recuperación real vs Recuperación experimental



Fuente: Autora, 2025

Por otro lado, la figura 2 muestra el rendimiento real de cada tratamiento, destacando que el de mayor rendimiento fue aquel en el que se utilizó SDS con ácido acético a 15 ml/g y purificación mediante Solvent Casting (S2.M).

Figura 2. Pureza del tratamiento



Fuente: Autora, 2025

Adicionalmente, en la figura 3, se muestra el porcentaje de pureza del tratamiento lo cual permite evaluar el proceso de purificación de manera independiente a el proceso de lisis y extracción. Se observa que, en general, los tratamientos de purificación mediante el método de Solvent Casting fueron más efectivos que los tratamientos de precipitación con metanol. Esto podría explicarse por la mayor proporción de metanol utilizada en el

Solvent Casting en comparación con la empleada en el tratamiento de precipitación con metanol.

En el análisis estadístico ANOVA, se evaluaron los efectos principales de los tres factores considerados en el modelo, encontrándose que todos tuvieron un impacto significativo en la variable de respuesta. En particular, los factores F1 ($F = 6481.714$, $p < 2.2e-16$) y F3 ($F = 1264.706$, $p < 2.2e-16$) presentaron los efectos más destacados, superando incluso el efecto de las interacciones entre ellos. Este resultado es consistente con el análisis descriptivo, donde se observó que algunos tratamientos, diferenciados por el tipo de lisis, no lograron recuperar PHA. Además, se evidenció que la cantidad de PHA recuperada fue considerablemente mayor después de la etapa de purificación en comparación con la extracción, lo que sugiere que esta fase juega un papel determinante en la eficiencia del proceso.

CONCLUSIONES

Se compararon distintos métodos de extracción y purificación de polihidroxicanoatos obtenidos a partir de cultivos mixtos y lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales. Según la literatura consultada, los reactivos que ofrecieron mayor rendimiento, pureza y viabilidad ambiental fueron SDS al 18 % en una relación de 10 ml/g, NaOH al 0,8 % en una relación de 50 ml/g y H₂SO₄ al 10 % en una relación de 20 ml/g, combinado con ácido acético glacial en una relación de 10 a 20 ml/g para la etapa de extracción. Para la purificación, se empleó metanol industrial en una relación de 11 ml/g.

Se evaluaron las condiciones operativas de las metodologías seleccionadas para la extracción y purificación de polihidroxicanoatos obtenidos a partir de cultivos mixtos y lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales, mediante la implementación de un diseño experimental. La eficiencia de los tratamientos se determinó con base en las variables de

respuesta: rendimiento, recuperación y pureza. Los resultados mostraron que el tratamiento con SDS y la metodología de *Solvent Casting* fue la opción más efectiva, mientras que los tratamientos con NaOH y H₂SO₄ no lograron recuperar cantidades significativas de PHA. La ruta más favorable correspondió al uso de SDS al 10 % en una relación de 10 ml/g, combinado con ácido acético glacial en una relación de 20 ml/g y metanol industrial aplicado mediante *Solvent Casting* en una relación de 100 ml/g.

Se analizaron los resultados de los experimentos de extracción y purificación de polihidroxicanoatos mediante un ANOVA multifactorial. Los resultados indicaron que los tres factores evaluados tienen un impacto significativo en el rendimiento real de PHA, tanto de manera individual como en sus interacciones. Asimismo, se identificó una tendencia en la cual los factores 1 y 3 presentan valores de F y P más elevados. Este análisis permitió identificar tendencias, evaluar la significancia de los datos y

respaldar la toma de decisiones en la selección de los métodos más eficientes.

Por otro lado, el análisis estadístico descriptivo reveló que la baja diferencia porcentual entre los tratamientos con SDS y ácido acético glacial en relaciones de 15 y 20 ml/g sugiere que la combinación de SDS con al menos 15 ml/g de ácido acético glacial es suficiente para favorecer la recuperación del polímero. Además, al considerar los factores ambientales y operativos, esta ruta se perfila como la más favorable, debido a que permite reducir el uso de ácido sin afectar significativamente el rendimiento. Esto representa una ventaja tanto económica como ambiental, al disminuir los costos y la generación de vapores residuales contaminantes durante el proceso de extracción.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo brindado en el desarrollo de esta

investigación y a los docentes vinculados al proyecto por su orientación y tutorías. Un agradecimiento especial a las profesoras Jeniffer Paola Gracia Rojas y Nubia Carmenza Moreno Sarmiento, por su guía y acompañamiento. También se reconoce el apoyo y las valiosas ideas aportadas por los demás tesistas del proyecto. Finalmente, se expresa gratitud a la familia por su respaldo incondicional, y de manera especial, a Germán Cuevas y Pinky por su compañía desde el cielo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aramvash, A., Moazzeni Zavareh, F., & Gholami Banadkuki, N. (2018a). Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. *Engineering in Life Sciences*, 18(1), 20–28. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700102>
- Felipe, A., & Farfán, R. (2019). *Extracción, purificación y modificación de un biopolímero del tipo poli(3-hidroxibutirato) obtenido*

- de la fermentación de ácidos grasos con Burkholderia cepacia* [Tesis de licenciatura]. Institución, Ciudad, País.
- Gracia, J., Espinosa, A., Moreno, N., & Cabeza, I. (2024). Evaluation of the production and extraction of polyhydroxybutyrate from volatile fatty acids by means of mixed cultures and *Burkholderia cepacia*. *Environmental Research*, 250, 118448. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118448>
 - Jiang, Y., Mikova, G., Kleerebezem, R., van der Wielen, L. A. M., & Cuellar, M. C. (2015). Feasibility study of an alkaline-based chemical treatment for the purification of polyhydroxybutyrate produced by a mixed enriched culture. *AMB Express*, 5(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0096-5>
 - López-Abelairas, M., García-Torreiro, M., Lú-Chau, T., Lema, J. M., & Steinbüchel, A. (2015). Comparison of several methods for the separation of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator H16* cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 93, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.018>
 - Mannina, G., Presti, D., Montiel-Jarillo, G., & Suárez-Ojeda, M. E. (2019). Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures. *Bioresource Technology*, 282, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.037>
 - Méndez Reyes, D. A., & Macías Camacho, J. G. (2017). *Evaluación del escalamiento de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por fermentación a partir de la bacteria mutante Burkholderia cepacia B27 a nivel semi-industrial* [Tesis de maestría]. Institución, Ciudad, País.
 - Muñoz Ariza, O. M. (2019). *Evaluación del proceso de extracción y purificación del polímero poli(3-hidroxi-butirato) P3HB obtenido de la cepa Burkholderia cepacia B27*

con un solvente orgánico no halogenado

[Tesis de maestría]. Institución, Ciudad, País. .

- Pagliano, G., Galletti, P., Samorì, C., Zaghini, A., & Torri, C. (2021). Recovery of polyhydroxyalkanoates from single and mixed microbial cultures: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 624021. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.624021>
- Rojas Ahumada, E. C. (2022). 20211_P_Rojas_DocumentoFinalTrabajoGrado_2022-2 [Tesis de grado]. Institución, Ciudad, País.
- Yu, J., & Chen, L. X. L. (2006). Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass. *Biotechnology Progress*, 22(2), 547–553. <https://doi.org/10.1021/bp050362g>