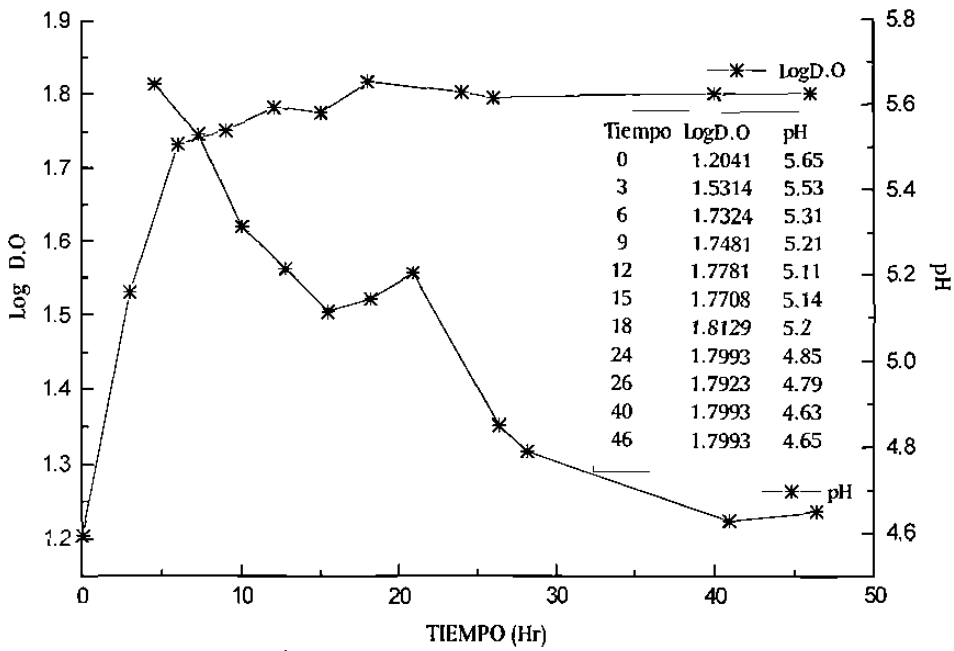

Fig. 3.3 Curva de crecimiento y determinación de su pH durante la fermentación por *Klebsiella pneumoniae.*

Cabe señalar que el comportamiento del medio de fermentación es de un fluido No-newtoniano durante el mezclado y, en donde la agitación solo es eficiente en las fases iniciales de la fermentación, ya que una vez avanzada ésta solo lo es en la vecindad de los impulsores. Esto se puede establecer ya que la fuerza de propulsión de los impulsores bajo de 200 r.p.m. a 160 r.p.m., debido a la solubilización del exopolisacárido en el medio, en la tabla 3.3 se presentan los cambios que sucedieron durante el transcurso de la fermentación.

Tabla 3.3 Cambios físicos que ocurrieron durante la fermentación

	FERMENTACIÓN		
PARÁMETROS	INICIO	INTERMEDIO	FINAL
pH	5.6	5.14	4.65
Agitación (r.p.m.)	200	180	160
Tipo de viscosidad	Newtoniano	Dilatante	Pseudoplastico

3.4 RESULTADOS DE OBTENCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDO.

De las muestras de 100 ml obtenidas a diferentes tiempos se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 3.4)

Tabla 3.4 Resultados de los pesos obtenidos del exopolisacárido a diferentes tiempos de obtención.

TIEMPO (Hrs)	PESO DE EPS(seco)g/100ml
3	0.0595
6	0.0652
12	0.0976
15	0.0987
18	0.0749

Estos resultados se graficaron para poder obtener una mayor apreciación de los cambios ocurridos durante la producción del exopolisacárido (figura 3.4)

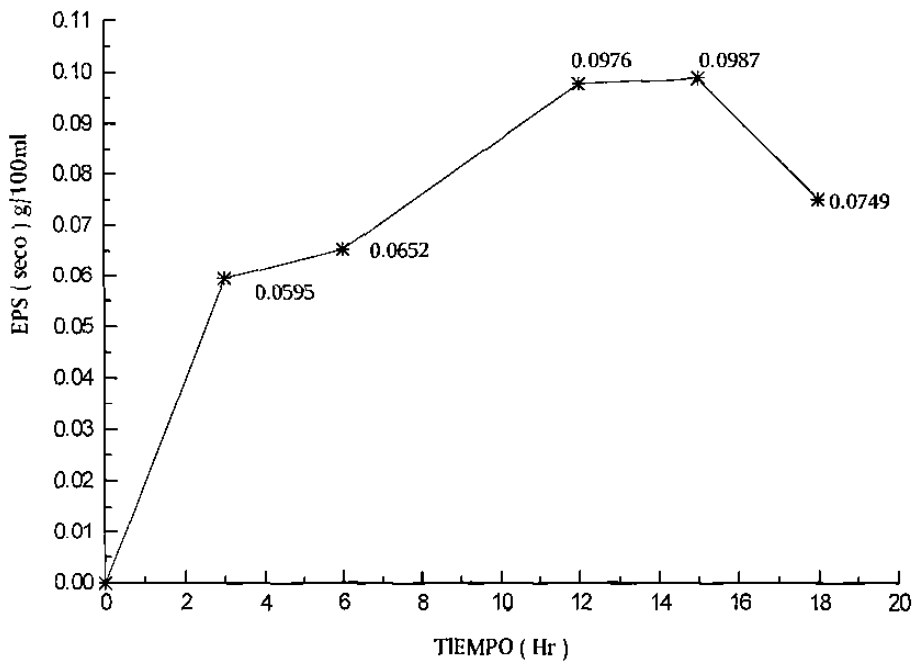

Fig. 3.4 Evolución de la producción del exopolisacárido.

Con estos datos se observa que la formación de EPS va aumentando en forma gradual hasta llegar a una fase constante (12-15 hrs), esta evolución de constante producción o aumento en la formación del biopolímero nos demuestra que el microorganismo es capaz de sostener un ritmo de formación de biopolímero sostenible de acuerdo al flujo de la fuente de carbono y energía disponible; pero posteriormente este ritmo de producción se desacelera y empieza a decrecer, que es algo característico de los polímeros de origen microbiano, ya que se pueden sintetizar y degradar con gran rapidez debido a que se encuentran en un estado dinámico en el cuál actúan simultáneamente, mas la degradación se puede llegar a controlar esto es, regulando las enzimas que realizan esta acción de manera que solo actúen en ciertas condiciones. Además la media del peso promedio de exopolisacárido obtenido por litro de medio de cultivo es de 0.95 g/L comparando este resultado con otros exopolisacáridos obtenidos de otras investigaciones[6,7,9]. Podemos determinar que el rendimiento es bajo, pero cabe aclarar que en este trabajo no se mantuvo un pH adecuado ya que no era el objetivo, y en las referencias de los microorganismos productores (tabla 3.5) si se establecen parámetros de pH adecuados para la producción de exopolisacárido. En general, podemos establecer que para la producción de exopolisacárido se deben establecer más parámetros de control para poder obtener un máximo rendimiento del mismo.

Tabla 3.5 Comparación de resultados de peso seco de exopolisacáridos obtenidos con otros microorganismos y *Klebsiella pneumoniae*.

MICROORGANISMO	PESO SECO g/L	REFERENCIA
Cyanospira capsulata	4	9 y 7
Methylophilus sp.	5.4	6
Agrobacterium radiobacter	9	6
Klebsiella pneumoniae	0.95	

En la figura 3.5 se gráfica el pH y la concentración de exopolisacárido (seco) en función del tiempo de la obtención de muestras durante el transcurso de la fermentación.

Aquí se puede observar más detalladamente la forma en que el exopolisacárido se acumulaba gradualmente así como los cambios de pH que se generaban en el transcurso del tiempo llegando a ser una relación dinámica en la cual el exopolisacárido se sintetiza y se degradada simultáneamente.

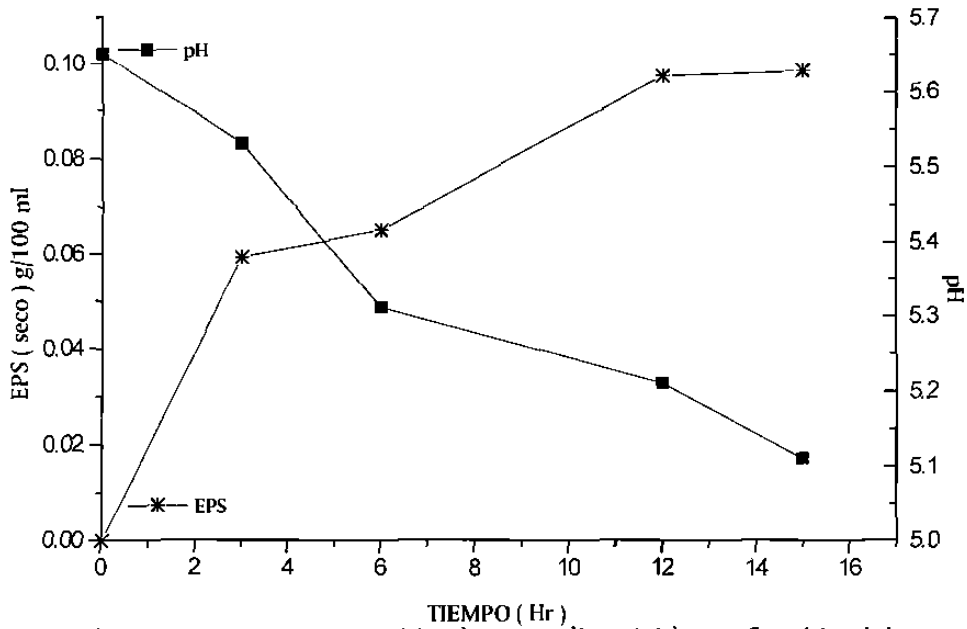

Fig. 3.5 pH y concentración de exopolisacárido en función del tiempo.

3.5 RESULTADOS DE FT-IR

Se caracterizó por IR el exopolisacárido (EPS) obtenido para intentar comprender la naturaleza de los productos a través de los grupos funcionales presentes en su estructura. Los resultados indican los siguientes datos : las bandas de mayor intensidad y anchura se presentan a 3307 cm^{-1}, el cual corresponde a un estiramiento de un grupo O-H antisimétrico característico en la mayor parte de las gomas procedentes de microorganismos ; a 1709 cm^{-1} se presenta una banda de estiramiento C=O de esteres ; a 1648 cm^{-1} se presenta una banda de estiramiento por el enlace C=O de amidas ;

a 1082 cm^{-1} se presenta un estiramiento asimétrico del enlace C-O-C. Bandas adicionales son indicadas en la figura 3.7

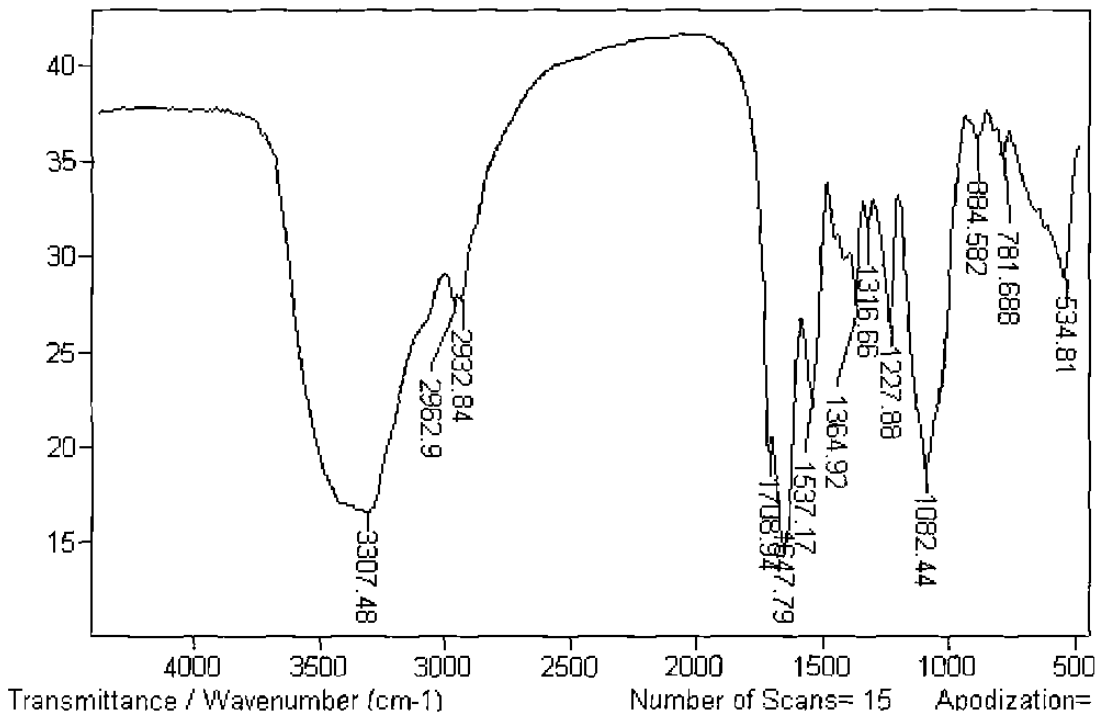

Fig. 3.6 Espectro de infrarrojo del EPS. 3307 cm^{-1} banda de estiramiento antisimétrico del OH ; 2962 cm^{-1} banda de estiramiento antisimétrico del CH_3 ; 2932 cm^{-1} banda de estiramiento antisimétrico del CH_2 ; 1708 cm^{-1} banda de estiramiento C=O de esteres ; 1648cm^{-1} banda de estiramiento de C=O de amidas ; 1365 cm^{-1} banda de grupo CH_3 de acetilos; 1227 cm^{-1} banda de estiramiento O-C-(O)-C ; 1082 cm^{-1} Estiramiento antisimétrico de C-O-C ; 781 cm^{-1} banda de $-(CH_2)_n$ en cadena ; 535 cm^{-1} banda de estiramiento de O-H.

Para determinar si la banda a 1708 y 1648 cm^{-1} corresponden a un grupo ester y amida, el exopolisacárido se trató con NaOH al 3 % y se calentó a baño María por 3h/95 °C y, permitiéndose enfriar a temperatura ambiente por una hora y media para posteriormente introducirlo a la estufa por 24 h/100 °C; al término de este tiempo se realizaron pastillas de KBr y se obtuvo su espectro (figura. 3.7).

En este espectro cual observamos la obtención de señales de bandas anchas a 3420 cm^{-1} debido al grupo COO^{-} Na^{+} y, a 1654 cm^{-1} que corresponde a un estiramiento de carbonilo C-O de amida ; 1438 cm^{-1} que corresponde a un estiramiento simétrico C-H.

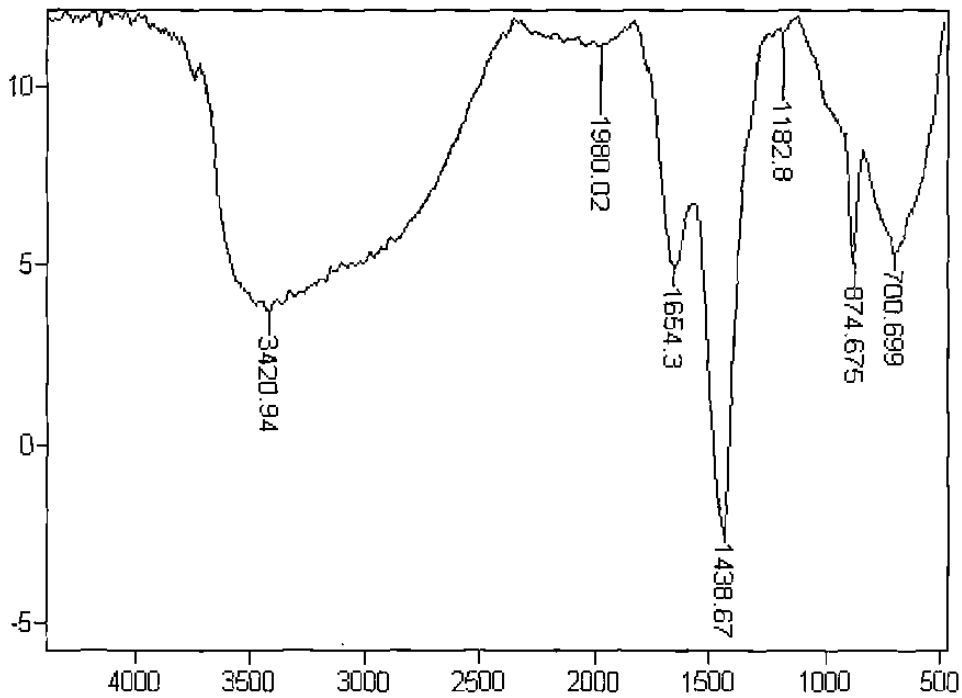

Fig. 3.7 Espectro de infrarrojo del EPS tratado con NaOH al 3%. 3420 cm^{-1} banda de estiramiento de O-H ; 1654 cm^{-1} banda de estiramiento de carbonilo C-O-C, C=O ; 1438 cm^{-1} banda de flexión C-H ; 874 cm^{-1} Substitución de aromáticos C-H.

Los cambios ocurridos en las señales del espectro después de hidrolizar la muestra nos confirman la presencia de los enlaces esteres presentes en la estructura del EPS ya que desapareció la señal a 1708 cm^{-1} que corresponde a este grupo, y además la señal de amida que esta a 1654 cm^{-1} disminuyo la cual se presentaba como un pico de mayor intensidad debido a que la hidrólisis provocó la ruptura del enlace amida obteniendo un enlace de baja energía. Aun con la ayuda de los espectros de infrarrojos no podemos precisar la posición que ocupan los grupos funcionales en la estructura.

Lo que si podemos confirmar es que la señales del espectro de FT-IR del exopolisacárido fueron siempre repetitivas, lo que nos confirma que el proceso de producción es confiable y que el microorganismo se mantuvo puro durante todos las fermentaciones realizadas. La figura 3.8 representa la comparación de ambos espectros en donde se puede observar más detalladamente los cambios ocurridos.

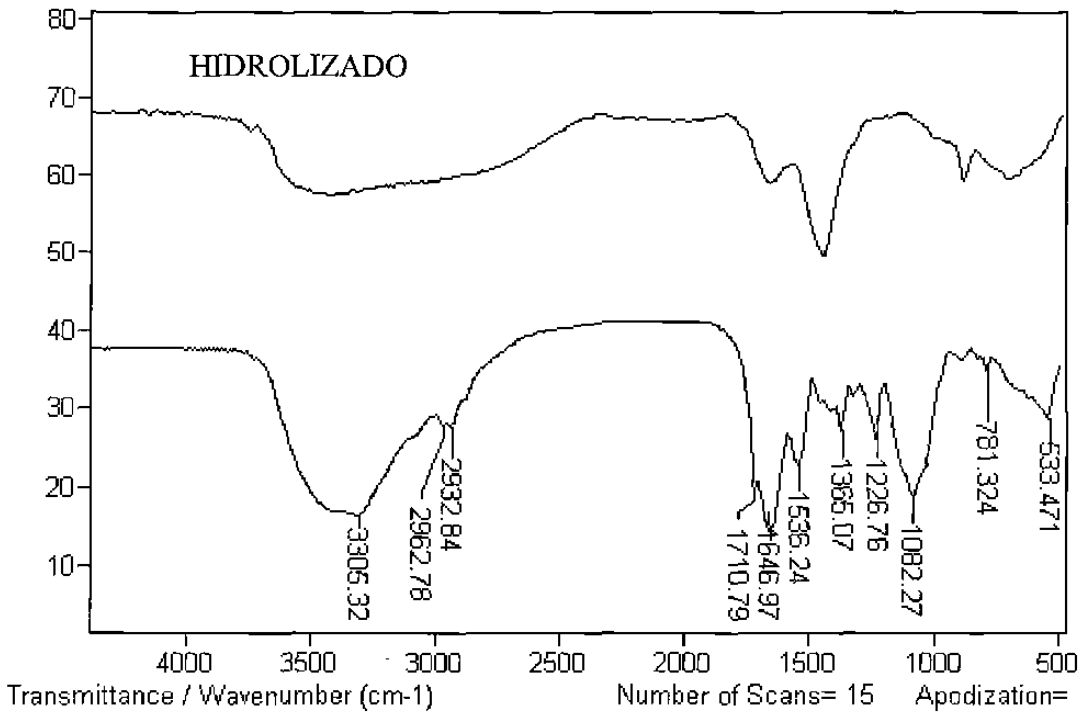

Fig. 3.8 Espectros del exopolisacárido hidrolizado y sin hidrolizar.

3.6 ANÁLISIS TÉRMICO DEL EXOPOLISACÁRIDO

Los resultados de los análisis térmicos realizados a las muestras de biopolímero obtenidas por precipitación con etanol al 99.5 % a los tiempos de 3, 15 y 24 horas se presentan en las figuras 3.9, 3.10 y 3.11 La figura 3.9 que representa la muestra de exopolisacárido obtenida a las 3 hrs de la fermentación presenta 4 pérdidas de peso; la primera se presenta a 50.96°C (A) con una pérdida de peso del 3.1%, la cual se le atribuye a restos de sustancias volátiles o agua adsorbida (humedad) ;

la segunda se presenta a 158.65°C (B) con una pérdida de peso del 11.7%, la cual se le atribuye a agua de hidratación ; la tercera se presenta a 223.80°C (C) con una pérdida de peso del 22.38%, la cual se debe a la descarbonización del material ; la cuarta se presenta a 306.7°C (D) con una pérdida de peso del 36.7%, la cual se debe a descomposición del material. Los primeros dos eventos son picos endotérmicos debido a la perdida de agua; esto se concluyo con la ayuda de la primera derivada que se realizó al análisis térmico diferencial, mientras que los últimos dos eventos son exotérmicos esto también ayudado por la primera derivada la cual nos permite resaltar o afinar un evento químico o físico que esta pasando(ver apéndice XX). La figura 3.10 representa la muestra de exopolisacárido obtenida a las 15 hrs, en donde se observan cinco pérdidas de peso ,el primero se presenta a los 51°C (A) la cual se debe a restos de sustancias volátiles o agua adsorbida con una perdida del 4.95%, la segunda se presenta a 137.5°C (B) debido a la desincorporación de agua de hidratación y con una perdida de peso del 10.3% ; la tercera y la cuarta se presentan a 236.5 °C (C) y 258.65°C (D) con una perdida de peso del 23.62 y 28.57% debido a carbonización del material ; la quinta se presenta a 300.96°C (E) debido a descomposición del material con una perdida de peso del 43.8%, los primeros dos eventos son endotérmicos debido a la liberación del agua y los últimos tres son exotérmicos, esto se visualizo ayudado con la primera derivada realizada al análisis térmico diferencial. La figura 3.11 representa la muestra de exopolisacárido obtenida a las 24 hrs, esta presenta 4 pérdidas de peso; la primera se presenta a 51°C (A) con una pérdida de peso del 4.65% la cual se le atribuye a restos de sustancias volátiles o pérdida de agua adsorbida ; la segunda se presenta a 210.58°C (B) con una perdida de peso del 13.41% la cual se le atribuye a la perdida de agua de hidratación; la tercera se presenta a 267.3°C (C) con una perdida de peso del 27.51% la cual se debe a carbonización del material ; la cuarta se presenta a 306.73°C (D) con una pérdida de peso del 44.12% la cual se debe a la descomposición del material residual o degradación de la columna principal del exopolisacárido (EPS), los primeros dos eventos son endotérmicos y los últimos dos son exotérmicos, en donde se concluye que todos los cambios son debidos a descomposiciones o volatilizaciones debido a que los cambios de peso que se generan van acompañados de picos exotérmicos y endotérmicos lo cual nos indica que no se presenta fusión alguna del material.

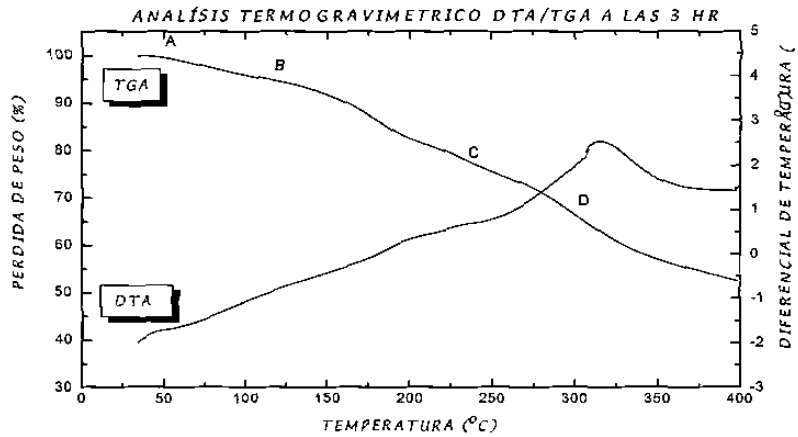

Fig. 3.9 Análisis térmico del EPS a las 3 Hrs

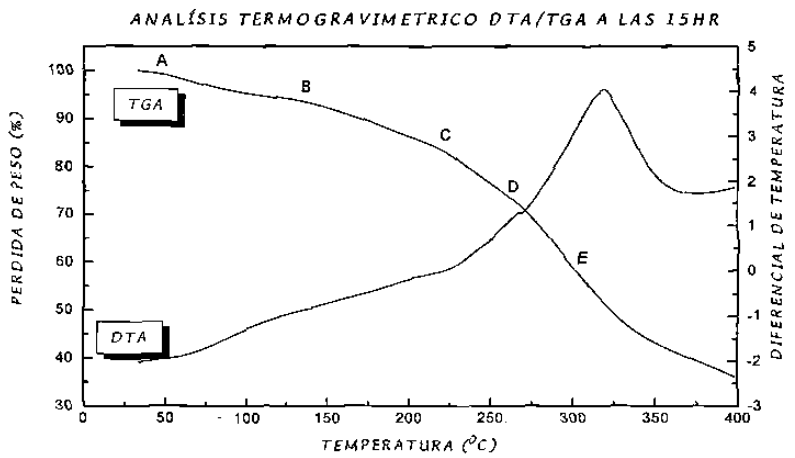

Fig. 3.10 Análisis térmico del EPS a las 15 Hrs

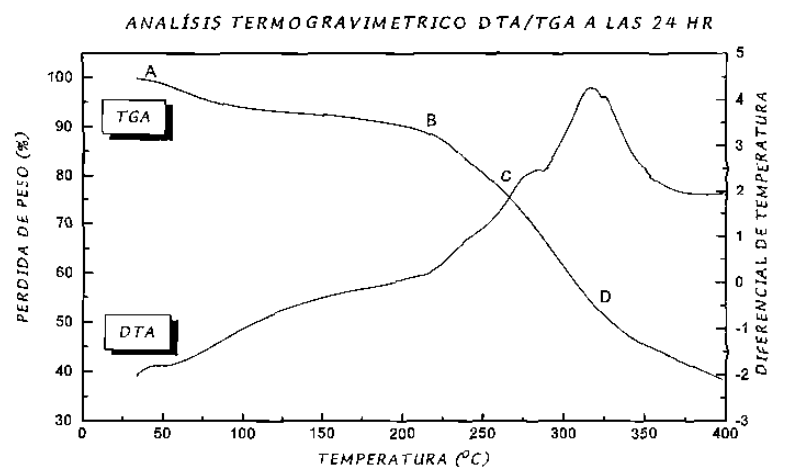

Fig. 3.11 Análisis térmico del EPS a las 24 Hrs

Estos cambios graduales de temperaturas de descomposición nos da información acerca de la relación que existe entre la estructura y sus propiedades físicas estableciéndose que a medida que transcurre el tiempo de fermentación hay una formación de exopolisacárido. Esta formación, da como consecuencia que la red polimérica se haga más estable. El ultimo resultado de temperatura de descomposición (24 hrs) se comparo con los resultados de biopolímeros de otros investigadores (tabla 3.6).[30] En donde podemos establecer que el biopolímero de nuestra muestra tiene cualidades de alta resistencia a temperaturas de descomposición

Tabla 3.6 Comparación de temperaturas de descomposición de diferentes biopolímeros.

COMPUESTO	TEMPERATURA FINAL (°C)	PERDIDA DE PESO (%)
Quitosan[30]	332.3	47.7
Hidroxibutil quitosan[30]	340.1	71.3
celulosa[36]	260	
EPS	306.73	43.1

3.7 ANÁLISIS DEL AGENTE POLIMERIZANTE POR ABSORCIÓN ATOMICA

De las muestras de exopolisacárido obtenidas y analizadas por absorción atómica se obtuvieron los siguientes resultados :

Tabla 3.7 Concentración de iones metálicos divalentes en el EPS.

ELEMENTO	% EN PESO
Calcio	2.52
Magnesio	0.83

Estos resultados nos confirman la presencia de que ambos elementos están unidos al polímero ya que después de obtener el exopolisacárido por precipitación este se seco y se limpio con etanol mediante reflujo para eliminar proteínas y constituyentes inorgánicos no unidos a la red, lo cual sugiere que estos elementos inorgánicos forman parte integral de la red en mayor cantidad y, puede ayudar a que el exopolisacárido sea

más estable térmicamente y presente propiedades físicas de mayor interés como agente polimerizante. Este breve estudio se comparó con otro biopolímero reportado en literatura[2]

Tabla 3.8 Comparación de los elementos encontrados en % en peso con la goma de xantano.

EXOPOLISACÁRIDO	Ca^{+2} (% peso seco)	Mg^{+2} (% peso seco)
Xantana[2]	0.1-0.15	-
EPS Kp	2.52	0.83

3.8 ANÁLISIS DEL EXOPOLISACÁRIDO POR RMN.

De las muestras enviadas (blanco y muestra), para resonancia magnética nuclear solo se pudo obtener resultados de ^1H RMN. El resultado (figura 3.13) nos muestra 2 regiones principalmente de carbohidratos, la primera esta entre 0 a 3 ppm y la segunda se encuentra de 3 a 4.5 ppm esto se establece por la conjunción o agrupación de las señales de los protones pero, no se puede establecer a que estructura y a que monosacáridos se deba o se encuentren presentes., más si podemos decir que los espectros mantuvieron siempre una concordancia en sus señales de ^1H RMN .

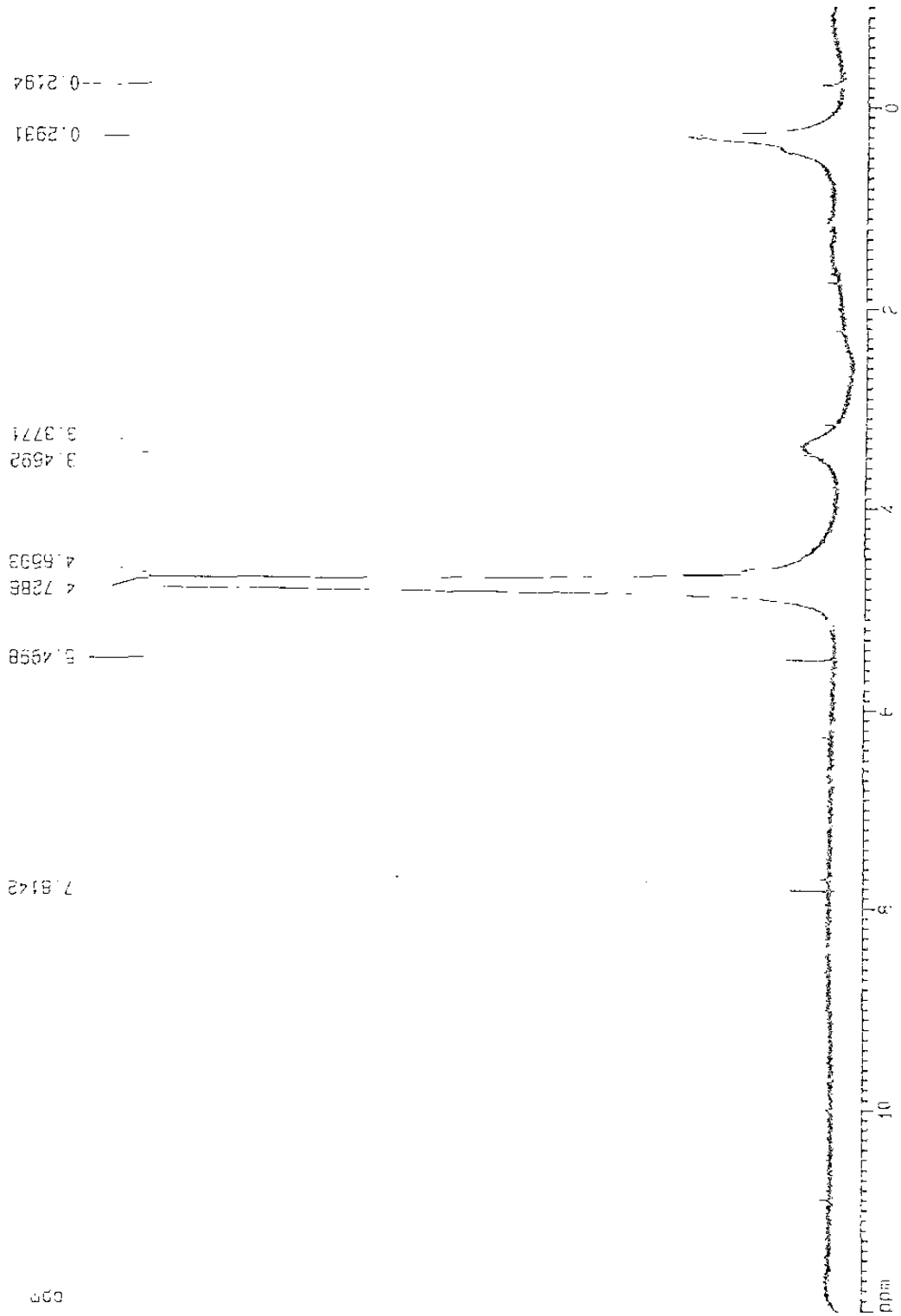

Fig. 3.12 Espectro de ^{1}H RMN del blanco (agua deuterada/NaOH)

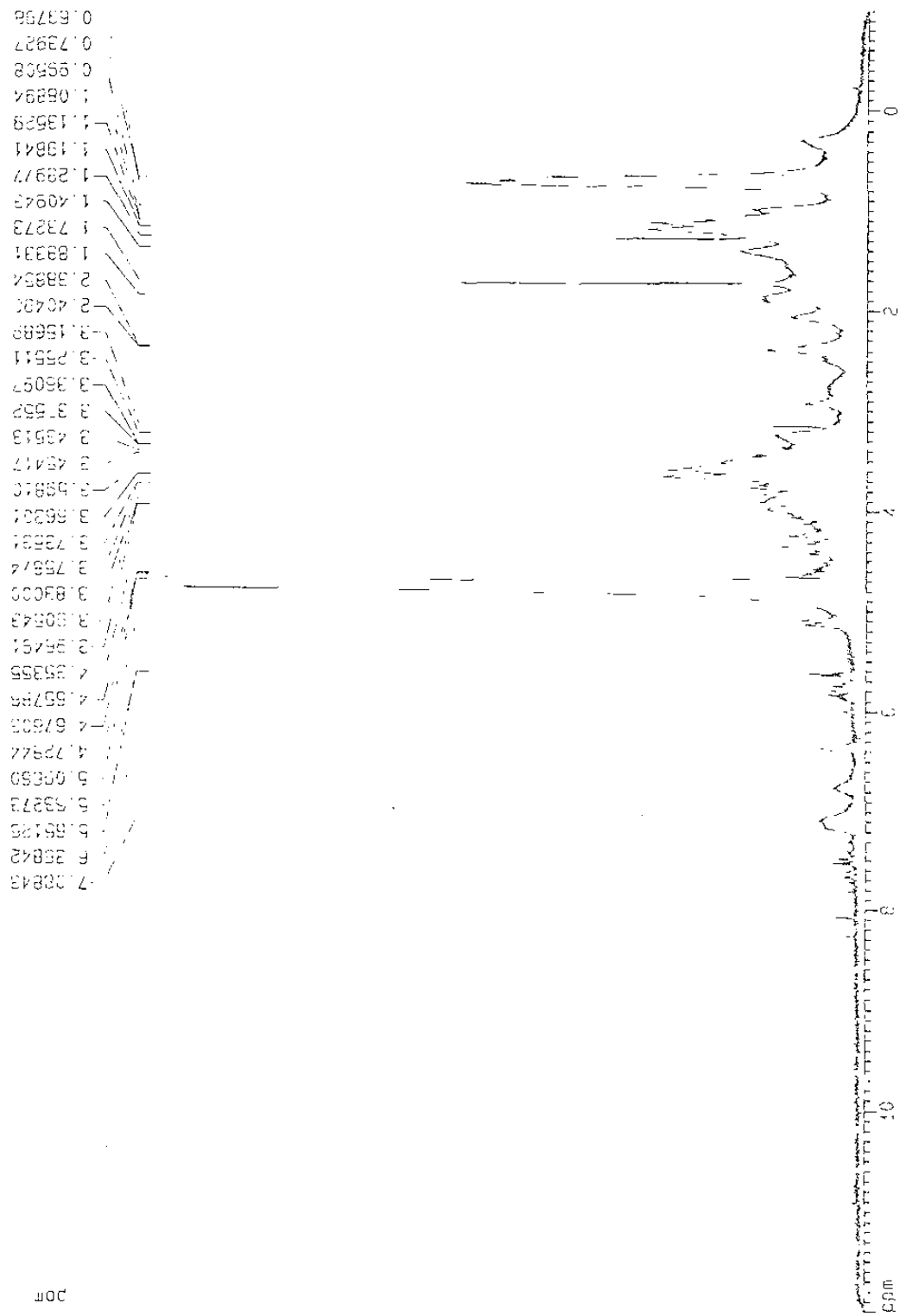

Fig. 3.13 Espectro de ^{1}H RMN de la muestra.

3.9 ANÁLISIS DE LA VISCOSIDAD DEL EXOPOLISACÁRIDO.

Los resultados obtenidos de las viscosidades del exopolisacárido con diferentes rotores y, velocidades de rotación se presentan en la tabla 3.1.3 y, en la figura XX. La curva resultante nos indica la conducta y el tipo de flujo que exhibe el exopolisacárido, en la cual se aprecia que la viscosidad se incrementa conforme aumenta la velocidad de rotación de los 3 diferentes rotores empleados. Este tipo de conducta se conoce como dilatante o "shear-thickening" siendo frecuentemente observado en fluidos que contienen altos niveles de sólidos defloculados tales como pastas cerámicas, gomas en agua etc.[31]

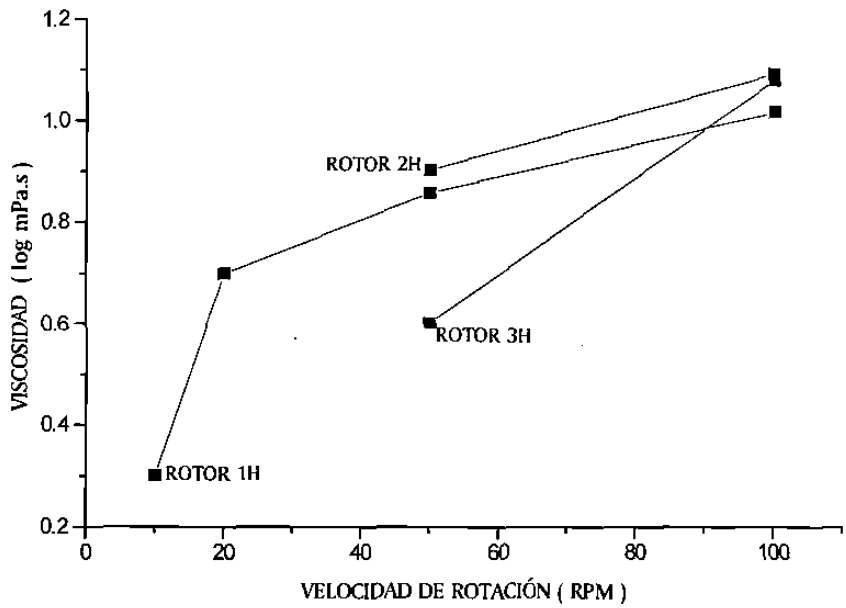

Fig. 3.14 Viscosidad del exopolisacárido en función de la velocidad de rotación del viscosimetro.

TABLA 3.9 Resultados de las viscosidades obtenidas con diferentes velocidades de rotación con 3 diferentes rotores.

ROTOR	VELOCIDAD (RPM)	VISCOSIDAD (log mPa.s)
1H	10	0.3010
	20	0.6989
	50	0.8573
	100	1.0170
2H	50	0.9031
	100	1.0791
3H	50	0.6020
	100	1.0791

3.10 CROMATOGRAFÍA

los resultados de la cromatografía de papel realizado en silica gel son los siguientes:

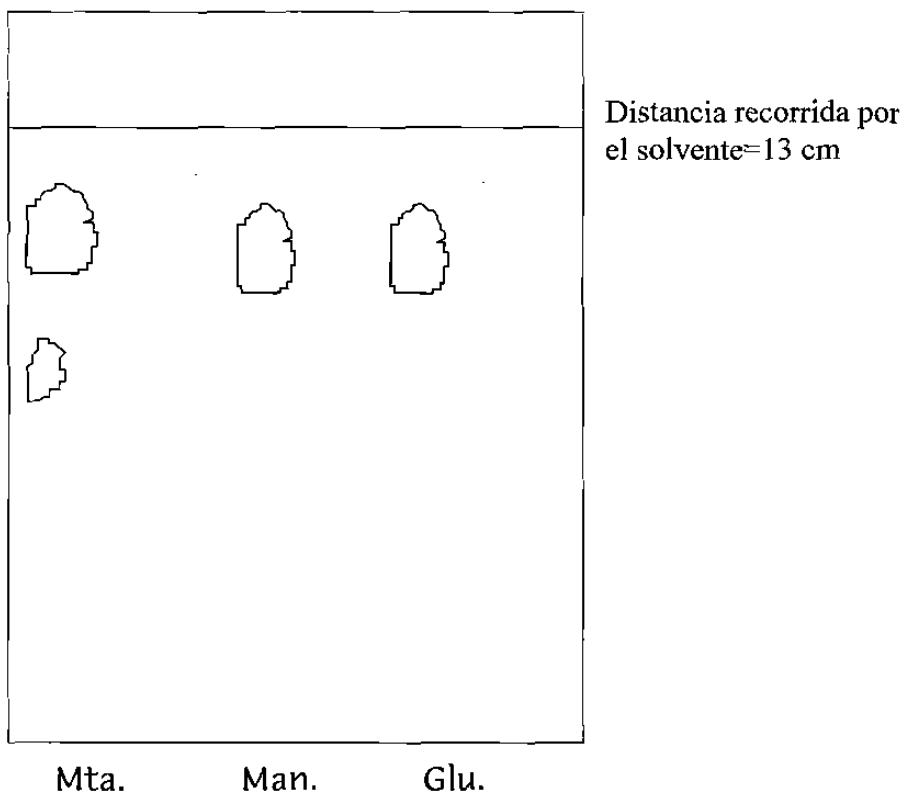

fig. 3.15 Resultados de la cromatografía en papel.

Tabla 3.10 Comparación de los R_f de la muestra y estándares de azúcares.

COMPONENTE	Rf EXPERIMENTAL	Rf REPORTADO
Muestra	0.58 y 0.36	
manosa	0.61	0.76[29]
Glucosa	0.59	0.70[29]
Galactosa	-	0.60[29]
Ac. glucuronico		0.32[29]

Con los datos experimentales de R_f de la muestra y de los standares podemos predecir que en nuestro biopolímero se encuentran grupos de glucosa y manosa principalmente, la mancha inferior que nuestra muestra arrastró se comparo con bibliografía y se encontró cierta concordancia con el R_f experimental de ácido glucuronico por lo que cabría la posibilidad de que estuviese presente

CONCLUSIONES

Los resultados reportados del exopolisacárido a partir de microorganismo *Klebsiella pneumoniae* pueden ser considerados como un significativo avance en sus estudios físicos y químicos. Esta afirmación se basa en las siguientes observaciones:

1-. El exopolisacárido es producido con una cinética constante y aunque la producción de EPS no llego a ser la óptima esto da paso a estudios posteriores para que se incremente la producción.

11-. El polisacárido posee características químicas estables, una gran ventaja si este se llega a producir en masa para aplicación industrial.

111-. El polisacárido presenta una viscosidad de fluido dilatante similar al comportamiento de la goma de xantano[2]

1V-. El polisacárido posee una temperatura de descomposición alta, la cual es comparable con otros para biopolímeros a partir de microorganismos.

V-. Se obtuvieron espectros de FT-IR que ayudaran a la elucidación de su estructura ya que se pueden tomar como huellas dactilares.

V1-. Estas observaciones no toman en cuenta el hecho de que para el crecimiento de los microorganismos y producción de exopolisacárido requiere fuentes de carbón y energía que son fuentes renovables y la factibilidad de utilizar materias primas diferentes para su producción .

V11-. Estos datos experimentales dan la pauta para proseguir y conocer más sobre el comportamiento y la formación del exopolisacárido ya que es indiscutible que el desarrollo tecnológico de vanguardia lo exige.

APENDICE

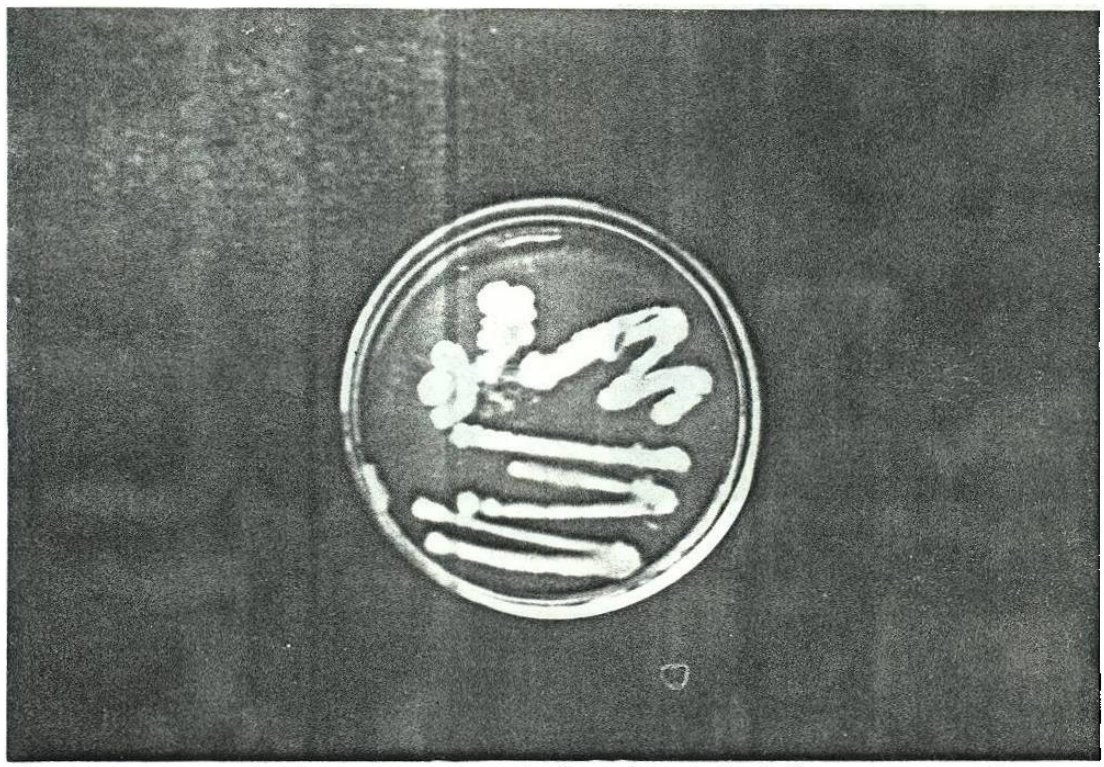

Figura 1a-.Crecimiento característico de *Klebsiella pneumoniae* en agar nutritivo.

Figura 2a-.Medio de cultivo estéril.

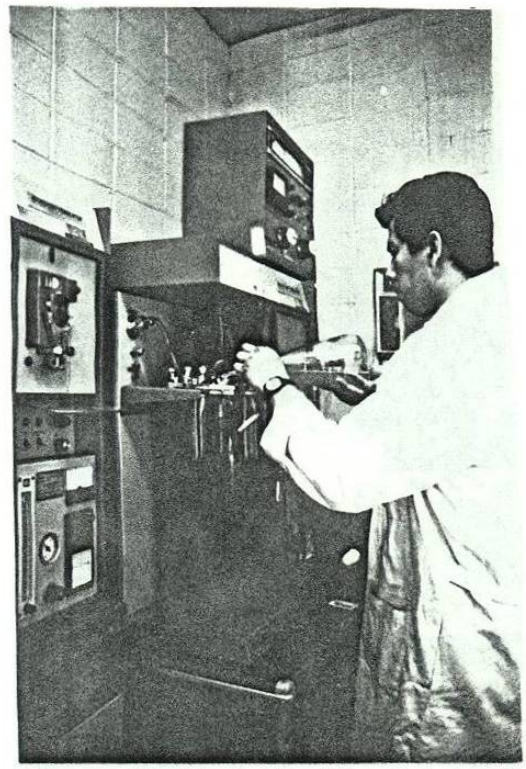

Figura 3a-.Inoculación del medio de cultivo.

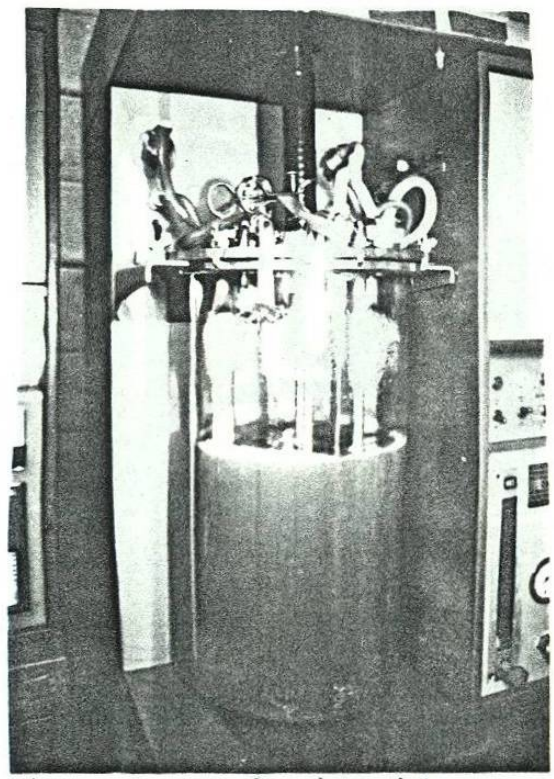

Figura 4a-.Medio de cultivo con alta viscosidad.

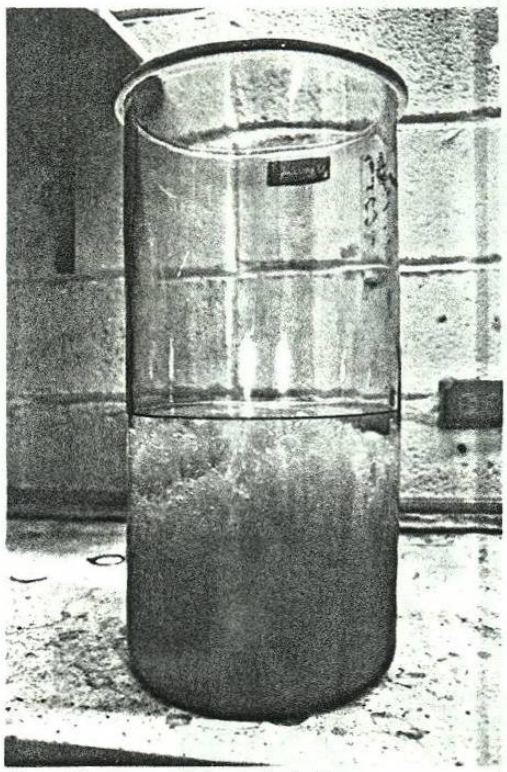

Figura 5a-.Proceso inicial de separación del exopolisacárido.

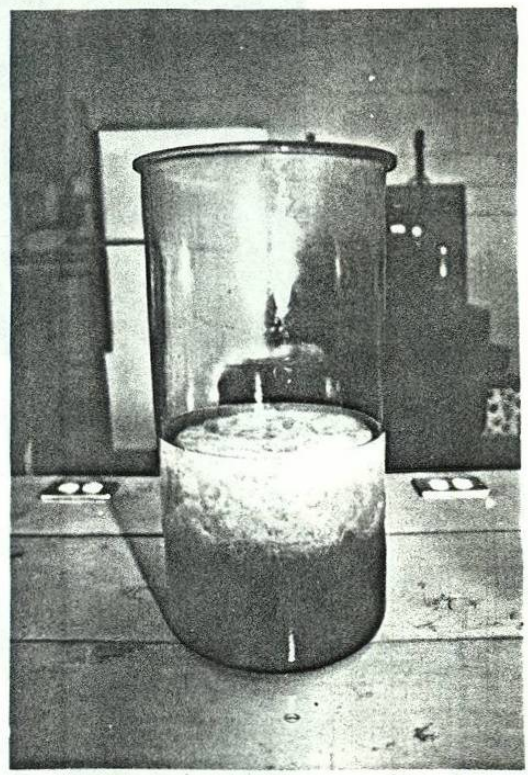

Figura 6a-.Proceso intermedio de separació del exopolisacárido.

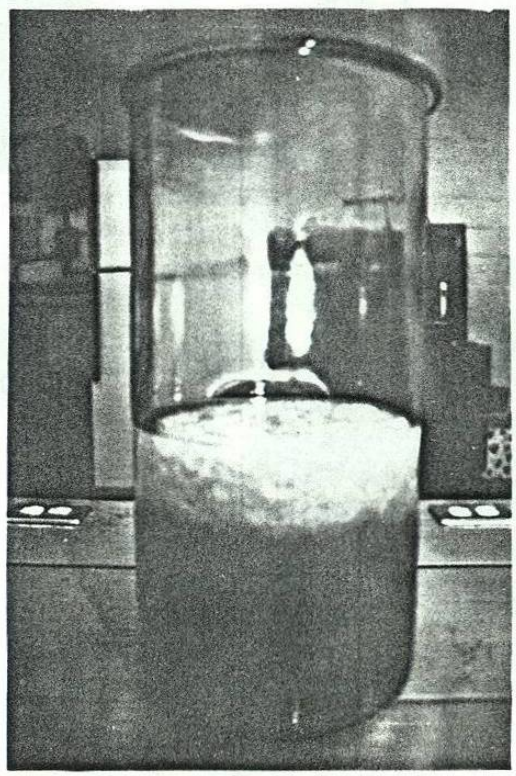

Figura 7a-.Proceso final de separación del exopolisacárido.

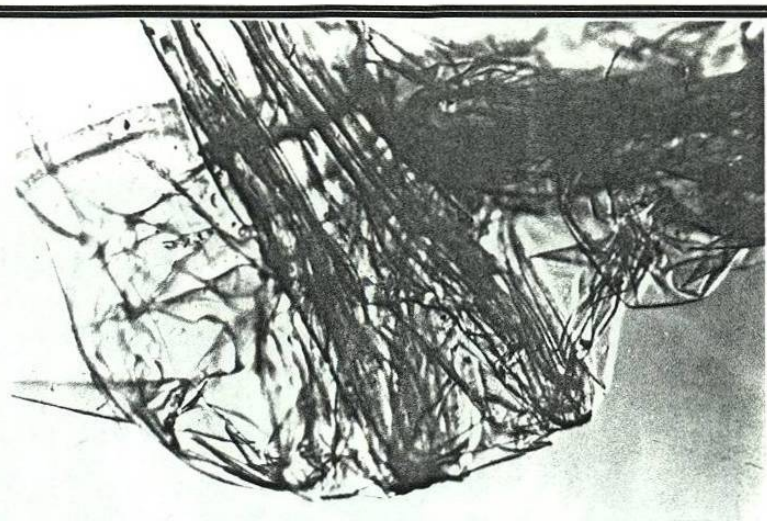

Figura 8a-.Observación microscópica de la película (objetivo 100X).

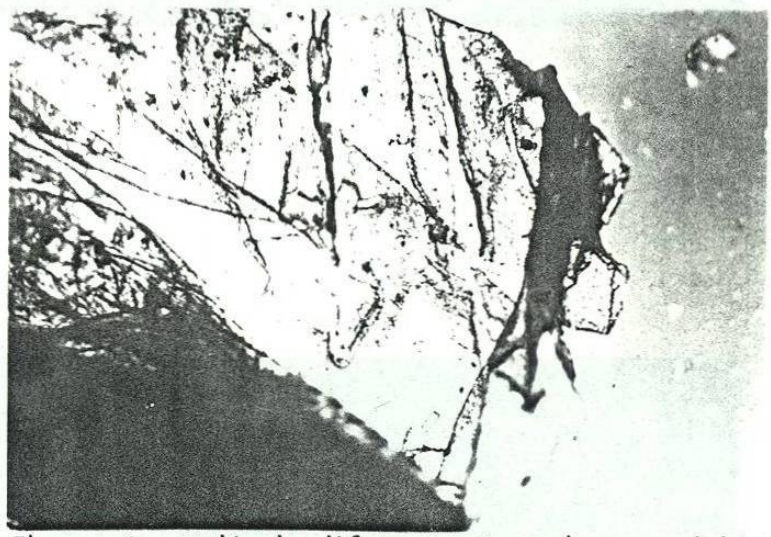

Figura 9a-.Película diferente área de exposición (objetivo100X).

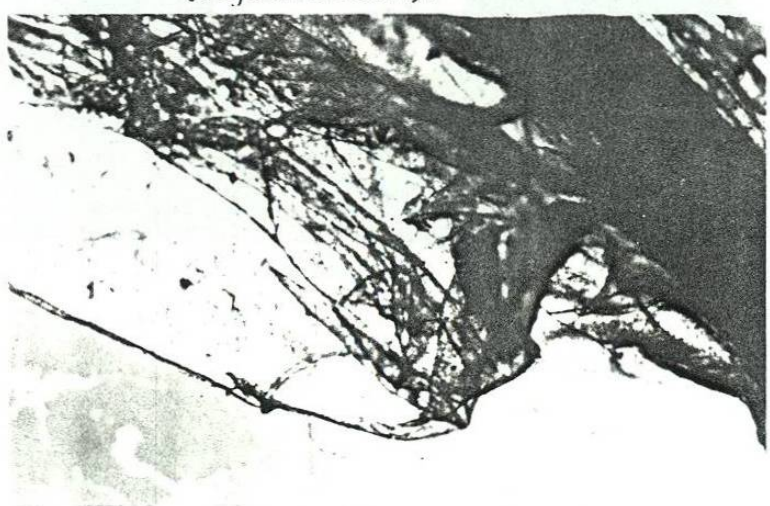

Figura 10a-.Película diferente ángulo (objetivo 100X).

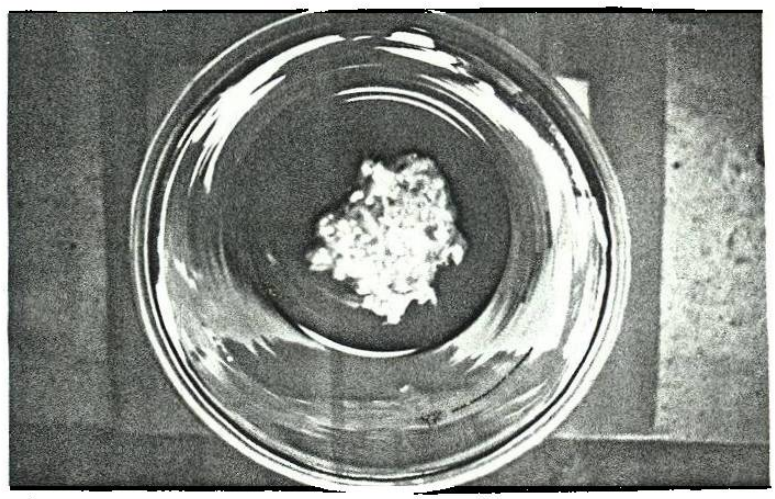

Figura 11a-.Separación del exopolisacárido en fase alcohólica.

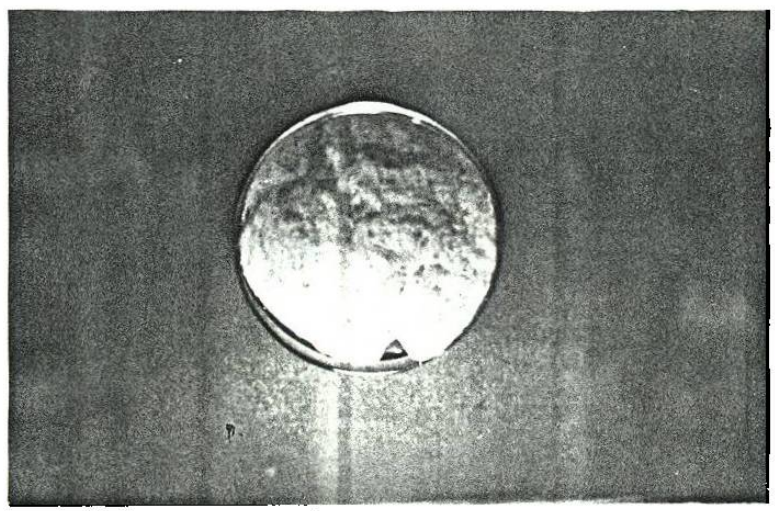

Figura 12a-.Exopolisacárido seco

REFERENCIAS

1. Petersen, G.R.; Nelson, G :A.; Cathey, C.A.; Fuller, G.G. "Rheologicall Interesting Polysaccharides From Yeast." Applied Biochem. And biotechnol., (1989) Vol.20/21 pp.845-867.

2. Sutherland,I.W.; "Structure-Function Relationships In Microbial Exopolysaccharides" Biotech.Adv. (1994) Vol.12, pp. 393-448.

3. Hocking, P.J. ; Marchessault,R.H. "Biopolyesters"1 Chemical And Technolpgy of Biodegradable Polymers. (1994) Blackie academic and profesional an imprint chaphall pp.48-91.

4. Chum,H.L. ; "Polymer From Biobased Materials" Noyes Data Corporation. (1991) pp. 81- 127.

5. Reuber,T.L. ; Urzainqui, J.A. ; Glazebrook, W.J. ; Reed, J.W and Walker, G.C. "Genetic Analyses and Manipulatons of Rhizobium meliloti Exopolisaccharides. Novel Biodegradable Microbial Polymers. (1990) pp. 285-294.

6. Linton, J.D. ; "Physiology of Exopolysaccharides Production" Novel Biodegrable Microbial Polymers. (1990) pp. 311-330.

7. Zevenhuizen, L.P.T.M. ; "Recent Developments in Rhizobium Polysaccharides" Novel Biodegradable Microbial Polymers. (1990) pp. 387-402.

8. Dawes, E.A. ; "Novel Microbial Polymers : Introduction Overview ". Novel Biodegradable Microbial Polymers. (1990) pp. 3-16.

9. Ian W.Sutherland ;"Commercialised Microbial Exopolysaccharides-current polymers and future products". Institute of cell molecular biology, Edimburg university.

10. Soraya A.Sabry, Khaled M.ghanem, Wael A.Sabra. "Effect of nutrients on alginate synthesis in Azobacter vinelandii and characterization of the produced alginate". Microbiogía SEM (1996) pp.1-6.

11.Rajendra Kumar Rath, S.Subramanian, and J .S.Laskowski "Adsortion of dextrin and guar gum onto talc. A comparative study Langmuir" (1997) ,13, 6260-6266.

12.Fernando Martínez-Checa, Concepción Calvo, M.Angeles Caba, M.Rita Ferrer, Victoria Bejár, Emilia Quesada. "Efecto de las condiciones nutricionales sobre la viscocidad y capacidad emulgente del biopolímero V2-7 de Volcaniella eurihalina. Microbiología SEM 12(1996) pp.55-60.

13. Magali C.Cammarota and Geraldo L. Sant´anna Jr. " Metabolic blocking of Exopolysaccharides synthesis : efeccts on microbial adhesion and biofilm accumulation". Biotechnology Letters.Vo 20, No 1, 1998 pp.1-4.

14. Jacqueline I : Kroschwitz " Encyclopedia of polymer science and engineering" A.Wiley-Interscience Publication 1990 pp.1299-1306

15. West, Anthony R. "solid state chemistry and its aplications" Ed. john wiley and sons (1984) pp.102-115

16. V.Crescenci, M.Rentini, T.Coviello "solution and gelling properties of microbial polysaccharides of industrial interest: The case of gellan." novel Biodegradable microbial polymers(1990) pp.277-284.

17. M.Vincenzini, R.de philipps, C. Sili snd R. Materassi "A novel EPS from a filamentous *cyanobacterium* : Production, chemical characterization and rheological properties" Novel biodegradable microbial polymers(1990) pp.295-310

18.Veneta I.Groudeva, Stoyan N.Groundev "Microorganisms improve kaolin properties" American Ceramic Society (1995) vol.74 N.6 pp.85-89,

19. Gilles Lefebvre,Magali Rocher and Gerhart Braunegg. "Effects of low dissolved-oxigen concentrations on poly-(3-hidroxibutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *alcaligenes eutrophus.*

20. D.Lohman "Structural diversity and funcional versatility of polisaccharides" Novel Biodegradable Microbial Polymers (1990) pp.333-348

21. Frobisher ; Hinsdill, Crabtree ; Goodheart. "Fundamentals of Microbilogy" 9th edition (1974)W .B Saunders company pp.770-772

22. Arnold L. Demain and Nadine A. Solomon (Editors) " Manual of Industrial Microbiology and biotechnology". American society for microbiology (1986)

23. Pelczar M.J ; Reid R.G ; Chan E.C.S "Microbiología " 4ta edición (1982) Editorial McGraw-Hill pp. 102-117

24. R.M Silverstein ; G.clayton Bassler ;Terence V. Morril "Spectrometric Identification of Organic Compounds" fifth edition John Wiley and Sons Inc. 1991

25. P.J.Haines "Thermal Methods of Analysis" principles, aplications and problems Chapman Hall 1995.

26. Quintero R. Rodolfo "Prospectiva de la biotecnología en méxico" fundación javier barros sierra, conacyt 1985 pag. 61-95

27. James S. Swnehart "Organic chemistry an experimental approach Meredith corporation 1969 USA pag.484-487

28. Bohinski Robert C. "Bioquimica" fondo educativo interamericano 1986 pag. 12-32,

29. Gunter Zweig, Joseph Sherma Vol II "paper chromatography" Academic press 1971 pag.6-27, 30-84, 152-169.

30. Macossay T. Javier " synthesis and characterization of water soluble chitosan derivates Louisiana state university and agricultural and mechanical college (1995)

31. Brookfield Engineering laboratories " More solution to sticky problems"

32. Robert R. Murray, R .A.Mayes ;D.K. Granner ;V.W.Rodwell Bioquimica de Harper" 13ava edt. Editorial manual moderno 1994 pag. 162-168.

33. R.C.Fuller "Bacterial polyester :past, present and future" Novel Biodegradable Microbial Polymers ; .K.Academic Press. 1990 ;pag 19-21

34. D.Byron " Industrial Production Of Copolymer From Alcaligenes Eutrophus" Novel Biodegradable Microbial Polymer Kluber Academic Publisher 1990, pag. 137-190.

35. B.Witholt ; G.W.Huisman "Bacterial Poly(3-hidroxialkanoates)" Novel BiodegradableMicrobialPolymer ; kluber Acad. Publisher 1990. Pag 161-170.

36. David R. Lide "Hanbook Of Chemystri and Physics " 71 edition 1990-1991 pag 3-170