



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**OPCIÓN I.- TESIS**

**TRABAJO PROFESIONAL**

**“Evaluación de la adición de óxido de grafeno reducido  
como mejorador de la digestión anaerobia”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

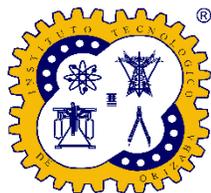
**I.Q. Diana Amador González**

DIRECTOR DE TESIS:

**Dr. Alejandro Alvarado Lassman**

CO-DIRECTOR DE TESIS:

**M.I.Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú**



Instituto Tecnológico de Orizaba  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Ver., 08/octubre/2024  
Dependencia: División de Estudios de  
Posgrado e Investigación.  
Asunto: Autorización de Impresión  
Opción: I

C. Diana Amador González  
Candidata a Grado de Maestra en  
Ciencias en Ingeniería Química  
PRESENTE

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

“Evaluación de la adición de óxido de grafeno reducido como mejorador de la digestión anaerobia”.

Comunico a usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

**ATENTAMENTE**  
Excelencia en Educación Tecnológica-  
CIENCIA – TÉCNICA - CULTURA®



**DRA. OFELIA LANDETA ESCAMILLA**  
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



ccp. Archivo

OLE/NAVC

OC-13-F06





Orizaba, Veracruz, **20/agosto/2024**

Asunto: Revisión de trabajo escrito

C. DRA. OFELIA LANDETA ESCAMILLA  
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
P R E S E N T E.-

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C.

**DIANA AMADOR GONZÁLEZ**

La cual lleva el título de:

**Evaluación de la adición de óxido de grafeno reducido como mejorador  
de la digestión anaerobia**

Y concluyen que se acepta.

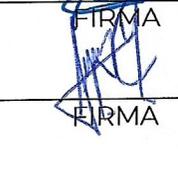
ATENTAMENTE  
Excelencia en Educación Tecnológica®  
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®

PRESIDENTE: DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN

SECRETARIO: MIQ. NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTÚ

VOCAL: DRA. OFELIA LANDETA ESCAMILLA

VOCAL SUP.: DR. JUAN MANUEL MÉNDEZ CONTRERAS

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA  
  
\_\_\_\_\_  
FIRMA  
  
\_\_\_\_\_  
FIRMA  
  
\_\_\_\_\_  
FIRMA

TA-09-18



## Declaración de originalidad y cesión de derechos

Orizaba, Veracruz, el día 17 del mes de Octubre del año 2024.

El(la) que suscribe

C. Diana Amador González

Declaro que esta tesis, que tiene una extensión de 139 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de la tesis titulada

“Evaluación de la adición de óxido de grafeno reducido como mejorador de la digestión anaerobia”

del programa: Maestría en Ciencias en Ingeniería Química, bajo la asesoría y dirección del Dr. Alejandro Alvarado Lassman y M.I.Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú y no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

Todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal y, en los casos que así lo requieran, cuento con las debidas autorizaciones de quienes poseen los derechos patrimoniales. Por lo tanto, me hago responsable de cualquier litigio o reclamación relacionada con derechos de propiedad intelectual, exonerando de toda responsabilidad al Tecnológico Nacional de México/Instituto tecnológico de Orizaba.

También declaro que, al presentar esta tesis, cedo los derechos del trabajo al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Orizaba para su difusión, con fines académicos y de investigación, bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: [depi\\_orizaba@tecnm.mx](mailto:depi_orizaba@tecnm.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.



Diana Amador González

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por todo su amor, por caminar conmigo, cuidándome y guiándome. Por enviarme a las personas indicadas a mi vida porque cada una de ellas es una enseñanza, una lección de la cual aprender. Porque nada en mi vida sería posible sin él.

A mi mamá quien es mi mejor amiga y a mi familia que son los pilares que me sostienen, por apoyarme, respaldarme y alentarme en cada decisión que tomo, por corregirme cuando lo necesito y ser pacientes, ustedes alegran mi vida y yo sé que no me dejarán caer. A mi papá por enseñarme que yo puedo.

Agradezco a mis profesores por su enorme paciencia y el amor que le tienen a su profesión como docentes compartiendo sus conocimientos, a aquellos maestros que no solo se han preocupado por formar a sus estudiantes académicamente sino que también nos han ayudado a crecer como personas y nos escuchan.

Le agradezco a mis compañeros, amigos y primos por confiar en mí y en mi capacidad, por siempre echarme porras y seguirme en mis aventuras, reconociendo en mi cualidades que ni yo misma puedo ver u olvido, han hecho de mi camino, mucho más feliz y mucho menos cansado.

A Yoa por hacerme caso en mis locuras llevándonos a otro país sin saber cruzar la calle y a acompañarme en la maestría, por su amistad y apoyo, a mi amigo y compañero Edilsoniano quién parte fundamental de este trabajo, por compartir esta travesía, por las tardes de pizza y estudio, logrando hacer un gran equipo de trabajo.

Le agradezco a todos los compañeros de laboratorio, maestría y doctorado con los que tuve la fortuna de compartir, por su orientación y asesorías, por las pláticas y hacer amenos los largos días de trabajo pero principalmente por dejarme conocerlos y encontrar a buenos compañeros y amigos, que sigan viviendo las posadas, los cumpleaños, las roscas y salidas.

## RECONOCIMIENTOS

Reconocimiento y admiración a la maestra Norma Vallejo Cantú y al Dr. Alejandro Alvarado Lassman por todo el trabajo que desarrollan y el equipo que conforman, así como por haberme recibido en su grupo de trabajo y creer en mí, les agradezco el tiempo dedicado para el desarrollo del presente trabajo así como su apoyo, orientación, amabilidad y disponibilidad. Muchas gracias.

A la Dra. Ofelia Landeta Escamilla por no sólo ser un excelente docente sino también ser humano, el tiempo que dedica a sus alumnos y la confianza que inspira, por su orientación, guía y su arduo trabajo.

Al Dr. Juan Manuel Méndez Contreras por compartir sus conocimientos, alentándonos a mejorar e integrar aspectos que enriquecen el trabajo, así como por sus palabras de aliento que nos animan a seguir esforzándonos.

Al Dr. Gerardo Águila Rodríguez por su amabilidad, tiempo y colaboración al abrir las puertas de su laboratorio, así como por sus consejos y recomendaciones enriqueciendo el conocimiento. A la Dr. Rosalía Cerecero por su tiempo y recomendaciones como revisora del presente trabajo. Al Dr. Luis Antonio Vazquez Herrera por su colaboración y disposición.

Agradezco a CONACYT por haberme otorgado la beca No. 1237234 en apoyo a la investigación.

## RESUMEN

### **“Evaluación de la adición de óxido de grafeno reducido como mejorador de la digestión anaerobia”**

**Elaborado por:** I.Q. Diana Amador González

**Dirigida por:** Dr. Alejandro Alvarado Lassman

M.I.Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú

El OGr es un nanomaterial base carbón perteneciente a la familia del grafeno, consiste en una red de átomos de carbono decorada con grupos funcionales oxigenados confiriéndole una alta reactividad y excelentes propiedades, entre las que se destaca su excelente movilidad electrónica y conductividad eléctrica permitiéndole desempeñarse como conductor de electrones favoreciendo el mecanismo DIET, el cual acelera la velocidad de reacción mediante la captura de electrones mejorando el rendimiento del proceso de la DA e incrementando las tasas de producción de metano. Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo realizar la evaluación de la adición de Óxido de Grafeno Reducido en la degradación anaerobia y generación de biogás utilizando como sustrato residuos de frutas y verduras.

La síntesis de OGr a tres grados de reducción se realizó mediante el método de Hummers modificado y el empleo de AA como agente reductor verde, dichos materiales fueron caracterizados por medio de las técnicas espectroscópicas y microscópicas FTIR, UV-vis y SEM, posteriormente se realizó la adecuación e impregnación de matrices sintéticas poliméricas empleadas como materiales de soporte con las NPs de OGr en una concentración de 30 mg/mL. La siguiente etapa consistió en la inoculación de los MS impregnados mediante el uso de un reactor anaerobio empleando como sustrato FL de FyV siendo monitoreado por medio de los parámetros de pH, % de remoción de  $DQO_T$  y  $DQO_S$ , ST y STV , así como la

evaluación de la influencia de la biopélicula desarrollada en el MS de dichos parámetros mediante tres fases en las que fue retirada la biomasa inicial de manera gradual hasta que la biopélicula generada en el material de soporte fue la única fuente del consorcio microbiano anaerobio responsable del proceso de la DA; finalmente se realizaron 4 cinéticas de PBM: una para cada uno de los materiales y una prueba blanco.

Como resultado fueron obtenidos nanomateriales a tres grados de reducción con rendimientos superiores al 60 %, determinando por medio de las técnicas de caracterización empleadas que el grupo funcional carboxilo tuvo una mayor presencia en los mismos, a su vez los MS presentaron valores promedio de 1.57, 1.8 y 1.7 mg de OGr 20 min, OGr 1 h y OGr 2 h impregnados respectivamente. Respecto al proceso de inoculación las tres fases presentaron una duración de 54, 9 y 15 días cada una en los que se alcanzaron porcentajes de remociones de DQO del 84.69, 56.19 y 55.9 %, siendo el último valor alcanzado sin otra fuente de m.o. responsables de la DA que los presentes en la biopélicula desarrollada, demostrando bio compatibilidad del material con los m.o. Los resultados experimentales de las pruebas de PBM demostraron el efecto benéfico de la adición del OGr en general con respecto al blanco presentando aumentos en la producción de biogás rico en metano mejorando sus índices de biodegradabilidad, así como el % de CH<sub>4</sub> en la composición del biogás obtenido con respecto al blanco del 65, 68, 66 % para el OGr 20 min, OGr 1 h y OGr 2 h respectivamente comparado al 60.95 % presentado por la prueba blanco, además de presentar % IBD del 96.1, 96.28 y 96 % para OGr 20 min, OGr 1 h y OGr 2 respecto al blanco con un % IBD del 95.79 %.

Concluyendo factible el empleo del OGr en especial el OGr 1 h como mejorador del proceso de DA permitiendo lograr una recuperación eficiente de energía de los residuos de frutas y verduras encaminado hacia un enfoque de economía circular.

## **ABSTRACT**

### **“Evaluation of addition of reduced graphene oxide as an anaerobic digestion enhancer”**

**By:** I.Q. Diana Amador González

**Advisor (s):** Dr. Alejandro Alvarado Lassman

M.I.Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú

rGO is a carbon-based nanomaterial belonging to the graphene family, which consists of a network of carbon atoms decorated with oxygenated functional groups, which confer high reactivity and excellent properties. Among these, its excellent electronic mobility and electrical conductivity stand out, allowing it to perform as an electron conductor, favoring the DIET mechanism, which accelerates the reaction rate by capturing electrons, thereby enhancing the performance of the DA process and increasing methane production rates. The present study aims to evaluate the addition of reduced graphene oxide in anaerobic degradation and biogas generation using fruit and vegetable waste as a substrate.

The three-reduction degree rGO synthesis was conducted via the modified Hummers method, applying AA as a green reductant agent. Characterization of the resulting materials was made through the use of FTIR, UV-vis, and SEM spectroscopy and microscopy techniques. Subsequently, rGO NPs at 30 mg/mL of concentration were adapted and impregnated into synthetic polymeric matrices used as carriers. The next stage consisted of the inoculation of the impregnated MS using an anaerobic reactor with FyV LF as substrate, being monitored employing pH, % COD, % ST, and STV removal parameters, as well as the evaluation of the influence of the biofilm developed in the MS on these parameters through three phases in which the biomass was gradually withdrawn until the biofilm remained as the only source of the anaerobic

microbial consortium; finally, 4 PBM kinetics were performed: one for each of the materials and a blank test.

As a result, rGO nanomaterials achieve three degrees of reduction with yields upper 60 %, determined by employing the characterization techniques used that carboxyl functional group had a high presence of them, in turn, the MS presented average values of impregnated NPS 1.57, 1.8, and 1.7 mg of rGO 20 min, rGO 1 h and rGO 2 h respectively. Regarding the inoculation process, the three phases presented a duration of 54, 9, and 15 days each in which % Total COD removals of 84.69, 56.19, and 55.9 %, the last value was reached without another source of m.o. for the AD than those present in the developed biofilm, demonstrating biocompatibility of the material with the m.o. The experimental results of the PBM tests demonstrated the beneficial effect of the addition of rGO in general concerning the blank, presenting increases in the production of methane-rich biogas, improving its biodegradability indices, as well as a % of CH<sub>4</sub> in the composition of the biogas obtained of 65, 68, 66 % of rGO 20 min, rGO 1 h and rGO 2 h respectively compared to 60.95 % presented by the blank test, in addition to presenting % BDI of 96.1, 96.28 and 96 for rGO 20 min, rGO 1 h and rGO 2 h concerning the blank with an % BDI of 95.79 %.

Concluding that the use of rOG, especially the rOG 1 h, as an improver of the anaerobic digestion is feasible, in which it is possible to archive an efficient recovery of energy from fruit and vegetable waste, aimed at circular economy approach.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	V
LISTA DE TABLAS.....	VII
INTRODUCCIÓN .....	1
JUSTIFICACIÓN .....	3
OBJETIVOS .....	5
OBJETIVO GENERAL .....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....	7
1.1 Generación de residuos.....	7
1.1.1 Residuos Sólidos Urbanos .....	7
1.1.2 Composición de RSU .....	8
1.1.3 Residuos alimenticios: frutas y verduras .....	8
1.2 Impactos ambientales de los residuos de alimentos .....	9
1.3 Digestión anaerobia.....	10
1.3.1 Aspectos importantes en la digestión anaerobia. ....	10
1.3.2 Factores clave en la DA.....	11
1.3.3 Retos de la DA .....	11
1.3.4 Etapas de la digestión anaerobia .....	12
1.4 Transferencia de electrones entre especies en la DA .....	15
1.4.1 MIET (Transferencia Mediada de Electrones Entre Especies) .....	15
1.4.2 DIET (Transferencia Directa de Electrones Entre Especies) .....	16
1.5 Pruebas de potencial bioquímico de metano (PBM).....	19
1.6 Estrategias para mejorar la obtención de biogás en la DA .....	21
1.6.1 Clasificación de aditivos empleados en la DA .....	22
1.6.2 Aditivos orgánicos.....	22

1.6.3	Aditivos inorgánicos.....	22
1.6.4	Materiales aditivos a base de carbón .....	22
1.7	Nanomateriales y su influencia en la digestión anaerobia.....	23
1.7.1	Grafito.....	25
1.7.2	Grafeno.....	26
1.7.3	Óxido de grafeno .....	27
1.7.4	Óxido de grafeno reducido OGr.....	29
1.8	Síntesis de OG .....	30
1.8.1	Exfoliación química- oxidativa .....	30
1.9	Métodos de reducción de óxido de grafeno.....	32
1.9.1	Reducción química .....	33
1.10	Técnicas de caracterización .....	43
1.10.1	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) .....	43
1.10.2	Espectrofotometría UV-Vis (Ultravioleta-Visible) .....	43
1.10.3	Espectroscopia RAMAN .....	44
1.10.4	TEM (Microscopia electrónica de transmisión) .....	44
1.10.5	SEM (Microscopia electrónica de barrido) .....	44
1.11	Toxicidad del OGr y generación de biopelículas microbianas .....	45
1.11.1	Hidrofobicidad.....	45
1.11.2	Área superficial específica y rugosidad .....	46
1.11.3	Dosis.....	47
1.12	Antecedentes.....	48
CAPITULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS .....		50
2.1	Síntesis de OGr empleando el método de Hummers modificado .....	51
2.1.1	Oxidación de grafito.....	51
2.1.2	Exfoliación de grafito .....	52
2.1.3	Reducción de óxido de grafeno .....	52
2.2	Caracterización de OGr .....	53
2.3	Obtención, adecuación y caracterización del sustrato.....	53

2.3.1	Obtención de residuos orgánicos .....	53
2.3.2	Acondicionamiento del sustrato .....	54
2.3.3	Caracterización fisicoquímica del sustrato.....	54
2.4	Acondicionamiento de NPs.....	56
2.4.1	Acondicionamiento e incorporación de nanomateriales (OGr) .....	56
2.5	Desarrollo de biopelícula .....	57
2.5.1	Etapa de acondicionamiento del reactor anaerobio.....	58
2.5.2	Etapa de operación del reactor anaerobio .....	60
2.4.2	Caracterización de biopelículas obtenidas.....	64
2.6	Pruebas de Potencial Bioquímico de Metano (PBM) .....	64
2.7	Monitoreo de la eficiencia de biodegradabilidad anaerobia .....	65
2.8	Evaluación del Potencial de Producción de Biogás experimental .....	66
2.9	Determinación de PBM teórico mediante composición elemental .....	67
2.10	Determinación de PBM teórico mediante análisis de DQO .....	68
CAPITULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		71
3.1	Síntesis de OGr empleando el método de Hummers modificado .....	71
3.1.1	Oxidación.....	71
3.1.2	Exfoliación .....	72
3.1.3	Reducción.....	72
3.1.4	Rendimientos.....	73
3.2	Caracterización de OGr .....	74
3.2.1	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier .....	74
3.2.2	UV- Visible .....	78
3.2.3	SEM.....	79
3.3	Obtención, adecuación y caracterización del sustrato.....	81
3.3.1	Obtención del sustrato.....	81
3.3.2	Acondicionamiento del sustrato .....	82
3.3.3	Caracterización fisicoquímica del sustrato.....	82
3.4	Acondicionamiento de NPs.....	84

3.4.1	Acondicionamiento e incorporación de nanomateriales.....	84
3.5	Desarrollo de biopelícula .....	86
3.6	Pruebas de Potencial Bioquímico de Metano .....	94
	CONCLUSIONES.....	106
	RECOMENDACIONES .....	108
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	109

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Composición de los RSU .....	8
Figura 1.2	Diagrama proceso de digestión anaerobia .....	14
Figura 1.3	DIET a través de proteínas transportadoras de electrones .....	17
Figura 1.4	DIET a través de Pili conductivos .....	18
Figura 1.5	DIET a través de materiales conductivos .....	19
Figura 1.6	Prueba de PBM en frascos de vidrio. ....	21
Figura 1.7	Clasificación de los aditivos utilizados en la DA .....	24
Figura 1.8	Estructura del grafito .....	25
Figura 1.9	Estructura de grafeno. ....	27
Figura 1.10	Estructura de OG .....	28
Figura 1.11	Estructura del OGr .....	30
Figura 1.12	Métodos Top-Down y Bottom-up .....	31
Figura 1.13	Técnicas precursoras empleadas en la síntesis del óxido de grafeno. .	32
Figura 1.14	Métodos de reducción del óxido de grafeno para la síntesis de OGr ....	33
Figura 1.15	Reducción química del OG mediante hidracina como agente reductor.	34
Figura 1.16	Estructura química del AA empleado en la reducción de OG .....	36
Figura 1.17	Reducción del OG empleando AA como agente reductor .....	37
Figura 1.18	Reducción del OG a través del uso de microorganismos.....	40
Figura 2.1	Diagrama de la metodología experimental en la evaluación de la adición de OGr como mejorador de la digestión anaerobia.....	50
Figura 2.2	Síntesis de OGr por el método de Hummers modificado .....	51
Figura 2.3	Ubicación del punto de recolección.....	54
Figura 2.4	Acondicionamiento e incorporación de nanomateriales (OGr) .....	57
Figura 2.5	Acondicionamiento de reactor anaerobio de inoculación. ....	58
Figura 2.6	Montaje de MS impregnados .....	59
Figura 2.7	Obtención de inóculo.....	60
Figura 2.8	Fase I Adaptación, estabilización y crecimiento de microorganismos...	61

Figura 2.9 Pruebas de PBM .....	64
Figura 2.10 Pruebas de PBM de los OGrs .....	65
Figura 3.1 Secado y refinado del og.....	71
Figura 3.2 Exfoliación de og/ obtención de OG .....	72
Figura 3.3 Reacción de reducción de OG .....	72
Figura 3.4 Lavado y filtrado de OGr .....	73
Figura 3.5 Almacenamiento de los diferentes OGr obtenidos .....	73
Figura 3.6 Espectro FTIR de GT, OG y OGr <sub>20 min</sub> .....	75
Figura 3.7 Espectro FTIR de OG, OGrs .....	77
Figura 3.8 Espectro UV-vis.....	78
Figura 3.9 Micrografías SEM.....	80
Figura 3.10 Residuos alimenticios recolectados .....	81
Figura 3.11 Acondicionamiento de residuos para elaboración de sustrato .....	82
Figura 3.12 Sustrato caracterizado .....	83
Figura 3.13 MS.....	84
Figura 3.14 Espectro FTIR de MS impregnado con OGr .....	85
Figura 3.15 Montaje y operación del RAIFI .....	87
Figura 3.16 Monitoreo % Remoción de DQO .....	88
Figura 3.17 Monitoreo % Remoción de ST y STV .....	90
Figura 3.18 Monitoreo pH en las 3 fases inoculación.....	91
Figura 3.19 Micrografías SEM de biopelículas formadas en MS.....	93
Figura 3.20 Producción de biogás.....	94
Figura 3.21 Producción de biogás acumulado .....	95
Figura 3.22 Composición de la producción de biogás.....	96
Figura 3.24 Producción de CH <sub>4</sub> acumulado (mL N CH <sub>4</sub> /g SV) .....	99

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1	Extractos de plantas: clasificación de agentes reductores .....	38
Tabla 1.2	Conductividad eléctrica del OGr de acuerdo a su método de reducción .....	42
Tabla 2.1	Técnicas espectroscópicas y microscópicas de caracterización de OGr .....	53
Tabla 2.2	Método gravimétrico para la determinación de ST y STV .....	55
Tabla 2.3	Condiciones generales de operación del RAIFI .....	61
Tabla 2.4	Condiciones de operación en la Fase I del RAIFI.....	62
Tabla 2.5	Condiciones de operación en la Fase II del RAIFI.....	63
Tabla 2.6	Condiciones de operación de las PBM.....	66
Tabla 3.1	Rendimientos de los diferentes OGr obtenidos .....	74
Tabla 3.2	Comparativa de espectros FTIR de materiales precursores .....	76
Tabla 3.3	Comparativa de espectros FTIR de OG y OGr con bibliografía.....	77
Tabla 3.4	Comparativa de espectros UV-vis de OG y OGr con bibliografía .....	79
Tabla 3.5	Caracterización fisicoquímica del sustrato empleado en el proceso de inoculación. ....	82
Tabla 3.6	Caracterización fisicoquímica del sustrato empleado en pruebas de PBM .....	83
Tabla 3.7	Peso de material impregnado en MS .....	84
Tabla 3.8	Caracterización por FTIR de MS impregnado .....	86
Tabla 3.9	Caracterización inicial del inóculo.....	87
Tabla 3.10	% Remoción presentada por las fases de inoculación de MS. ....	89
Tabla 3.11	Biomasa generada al final de fase I y II.....	89
Tabla 3.12	% Remociones de ST y STV en el proceso de inoculación de MS. ....	90
Tabla 3.13	pH de las etapas de inoculación de MS .....	91
Tabla 3.14	Caracterización de inóculo retirado .....	92
Tabla 3.15	Peso (g) de biopelícula generada.....	94
Tabla 3.16	mL de biogás acumulado (mL N).....	96
Tabla 3.17	% Aumento de concentración de biometano .....	97

Tabla 3.18 Rendimientos de biogás y biometano.....	98
Tabla 3.19 mL N de biometano acumulado / g SV agregados .....	100
Tabla 3.20 % Aumento de producción de metano.....	100
Tabla 3.21 % Biodegradabilidad anaerobia experimental .....	102
Tabla 3.22 Análisis elemental de sustrato de F y V.....	102
Tabla 3.23 Relación elemental de N .....	103
Tabla 3.24 Resultados experimentales y teóricos del PBM .....	105

## NOMENCLATURA

Nomenclatura	Definición
AA	Ácido ascórbico
AGVs	Ácidos grasos volátiles
AT	Alcalinidad total
DA	Digestión Anaerobia
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DE	Desviación estandar
DIET	Transferencia Directa de Electrones Entre Especies
DMF	N,N dimetilformamida
DQO	Demanda química de oxígeno
G	Grafeno
GT	Grafito técnico
IFT	Transferencia de formiatos entre especies
IHT	Transferencia de hidrógeno entre especies
LGPGIR	Ley General para la prevención y Gestión Integral de los Residuos
m.o.	Microorganismos
MG	Materiales grafénicos
MIET	Transferencia mediada de electrones
NMP	N-metil-2-pirrolidona
NPs	Nanopartículas
NTC	Nanotubos de carbono
og	Óxido de grafito
OG	Óxido de Grafeno
OGr	Óxido de grafeno Reducido
TE	Transferencia de electrones
RSU	Residuos Sólidos Urbanos

## INTRODUCCIÓN

Debido al uso inadecuado de la energía y recursos disponibles en las actividades humanas diariamente son generados grandes cantidades de residuos sólidos urbanos (RSU) a nivel mundial, tan solo en el año 2016 la generación mundial de RSU alcanzó 2,01 billones de toneladas, de los cuales el 44 % son residuos orgánicos, estimándose que en el año 2050 se tenga generación de 3,400 millones de toneladas de RSU (Kaza *et al.*, 2018), por lo que, el manejo adecuado de la enorme cantidad de residuos generados es uno de los más grandes retos que enfrentan los países ya que las técnicas más empleadas para el tratamiento de RSU son los rellenos sanitarios y vertederos a cielo abierto, las cuales están relacionadas a problemáticas medioambientales y de salud pública como el ingreso de lixiviados provenientes de vertederos a aguas superficiales y subterráneas así como emisiones de gases como CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> a la atmósfera (Sharma y Jain, 2020).

La gestión sostenible de RSU es imperante para minimizar el riesgo a la salud humana, evitar el agotamiento de recursos naturales, reducir impactos ambientales así como mantener el equilibrio del ecosistema, por lo que diversos métodos han sido empleados para el tratamiento y gestión de residuos como la incineración, compostaje, reciclado, destacándose la digestión anaerobia para el tratamiento de la gran cantidad de residuos orgánicos que presentan los RSU ( Khalid *et al.*, 2011; Nanda y Berruti, 2021)

La digestión anaerobia (DA) se considera una tecnología sostenible para el tratamiento, estabilización y recuperación de energía de diversos desechos orgánicos en ausencia de oxígeno, representando un enfoque de aprovechamiento integral de los recursos (Muratçobanoglu *et al.*, 2021), de acuerdo con la bibliografía reportada, se define como un proceso biológico en el que microorganismos presentes descomponen los materiales orgánicos disponibles por medio de cuatro etapas definidas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Kumar *et al.*, 2021b), la cual tiene como productos, la generación de biogás, presentando una combinación típica de metano, dióxido de carbono y trazas de ácido sulfhídrico;

sin embargo se trata de un proceso susceptible a diversos factores como lo son procesos de pretratamiento, diseño y selección del proceso de digestión, temperatura, tiempo de retención hidráulica, índice de carga orgánica así como de la proporción carbono-nitrógeno, entre otras (Ajay *et al.*, 2020).

El mecanismo principal que determina si la degradación de la materia orgánica y el proceso de metanogénesis se puede llevar a cabo de manera eficiente y ordenada en la DA es la Transferencia Electrónica Entre Especies, siendo preferible la Transferencia Directa de Electrones Entre Especies (DIET). Sin embargo, existen algunos factores que limitan el rendimiento y la eficiencia de DA como la baja tasa de biodegradabilidad de sustratos orgánicos complejos, posibles requerimientos de pretratamientos, etc., (Abdelwahab *et al.*, 2020). Como solución a las problemáticas antes mencionadas, se ha promovido la implementación de nanopartículas conductoras las cuales han demostrado su potencial para el incremento en las tasas de producción de metano en la digestión anaerobia, siendo notables los nanomateriales inorgánicos a base de carbón utilizados como materiales no-biológicos que actúan como conductores de electrones para el mecanismo DIET, uno de ellos es el óxido de grafeno reducido, el cual resulta de la eliminación de la mayoría de los grupos funcionales oxigenados del OG, alcanzando propiedades cercanas y mejoradas a las presentadas por el grafeno (Baniamerian *et al.*, 2019; Muratçobanoglu *et al.*, 2021). Encontrándose diversos proyectos de investigación prominentes desde el año 2016 como el realizado por Tian *et al.*, (2017), los cuales están relacionados con el empleo de nanomateriales en la digestión anaerobia para el mejoramiento de la producción de biogás rico en metano, hasta lo reportado por Bueno-López *et al.*, (2020) quien probó el efecto positivo de la adición del OGr en la DA, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo realizar la evaluación de la adición de OGr en la degradación anaerobia y generación de biogás utilizando como sustrato residuos de frutas y verduras.

## JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales impactos medioambientales de los residuos de alimentos que incluyen los residuos de frutas y verduras está relacionado a su disposición final y a la producción de gases de efecto invernadero como dióxido de carbono y metano, los cuales forman parte del proceso de descomposición natural de la materia orgánica y contribuyen en gran parte al cambio climático, ya que de acuerdo con lo reportado en literatura, se ha comprobado que el metano atrapa veintiún veces más calor que el dióxido de carbono posicionándolo como uno de los gases más dañinos al medio ambiente, es por esto que el manejo y tratamiento adecuado de los residuos alimenticios generados a grandes escalas cada año es imperativo. En la búsqueda de soluciones a esta problemática mundial se encuentra la digestión anaerobia, la cual se considera como una tecnología sostenible para el tratamiento y recuperación de energía de diversos desechos orgánicos, por lo que no solo se estaría ayudando a la reducción de la generación de gases de efecto invernadero, si no que se estaría dando un aprovechamiento integral a los residuos como una fuente energética, que de otro modo se estaría perdiendo.

Los residuos de frutas y verduras son considerados una opción atractiva para la producción de energía pudiendo ser utilizada como sustrato para la alimentación de plantas de biogás basadas en digestión anaerobia. Se ha demostrado por medio de estudios buenos resultados en términos de estabilidad, rendimiento y tasas de generación de biogás en la implementación de la digestión anaerobia para el tratamiento de estos residuos.

Por otro lado para el aseguramiento de la eficiencia de la recuperación de energía de los residuos alimenticios por medio de digestión anaerobia, se contempla el uso de nanopartículas conductoras de óxido de grafeno reducido (OGr) que han demostrado ayudar en el incremento de las tasas de producción de metano en la digestión anaerobia por medio del mecanismo de transferencia directa de electrones entre especies y que facilita la termodinámica y cinética de la digestión anaerobia debido al desencadenamiento de un metabolismo sintrófico más eficiente el cual

aumenta la capacidad de captura de los electrones con la formación de puentes eléctricos entre microorganismos productores, incrementando la producción de biogás y acortando los tiempos de espera, atribuido a sus propiedades cercanas al grafeno con un menor costo.

Debido a las razones antes expuestas, en el presente trabajo se busca realizar la evaluación de la adición de óxido de grafeno reducido en la degradación anaerobia y generación de biogás utilizando como sustrato residuos de frutas y verduras, ya que no se cuenta con trabajos en bibliografía enfocados al aprovechamiento de un recurso constante que no se aprovecha como lo son los residuos de frutas y verduras y las propiedades que el OGr brinda al ser adicionadas a la digestión anaerobia, de tal manera que se asegure el buen funcionamiento, alta producción y menores tiempos de proceso.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Realizar la evaluación de la adición de óxido de grafeno reducido en la degradación anaerobia y generación de biogás utilizando como sustrato residuos de frutas y verduras.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener óxido de grafeno reducido a partir de grafito.
2. Caracterizar los óxidos de grafeno reducido obtenidos.
3. Realizar la caracterización de los residuos de frutas y verduras.
4. Desarrollar cinéticas de biodegradabilidad anaerobia utilizando residuos de frutas y verduras empleando los tres diferentes OGr obtenidos y sin adición.
5. Evaluar la generación de biogás en las 4 cinéticas realizadas.

# **CAPÍTULO 1**

## **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

## CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 1.1 Generación de residuos

La cantidad de residuos generados es un producto inherente de la urbanización, el desarrollo económico de la nación, crecimiento poblacional y la industrialización en el mundo (Sharma *et al.*, 2020), se entiende por residuos a cualquier material o producto que es desechado que puede encontrarse en estado sólido, semisólido, líquido o gaseoso contenido en recipientes o depósitos y que se encuentra sujeto a un tratamiento o disposición final apegado a lo señalado por la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos LGPGIR; DOF, 2003, cuya clasificación toma en cuenta las características y orígenes que poseen los residuos, categorizándolos en tres grupos: Residuos Sólidos Urbanos (RSU), Residuos de Manejo Especial (RME) y Residuos peligrosos (RP) (SEMARNAT, 2017).

#### 1.1.1 Residuos Sólidos Urbanos

Los RSU consisten en una mezcla variada de desechos sólidos que las poblaciones urbanas desechan diariamente como basura o desperdicios, de acuerdo con SEMARNAT, (2017) los residuos sólidos urbanos RSU se definen como aquellos residuos que son producidos en los domicilios que comprenden casas habitación, comercios u oficinas, así como aquellos que son provenientes de cualquier actividad que se realice en establecimientos o vía pública que presenten características domiciliarias además de los que se producen en sitios públicos que no sean considerados como otro tipo de residuos.

Se estima que en el año 2012 fueron producidos 1.3 billones de toneladas de residuos habiendo incrementado dicha cifra en el año 2016, en el cual alcanzó 2.01 billones de toneladas de RSU y se espera que las cantidades producidas continúen incrementando para el año 2050 a 3.4 billones de toneladas de RSU (Kaza *et al.*, 2018).

### 1.1.2 Composición de RSU

La composición y clasificación de los RSU varía sustancialmente entre municipalidades alrededor del mundo según el nivel de ingresos del país, sin embargo, consiste en fracciones biodegradables y no biodegradables de materiales orgánicos e inorgánicos respectivamente, disminuyendo los porcentajes de residuos orgánicos a medida que aumentan los niveles de ingresos. Sin embargo, mundialmente los residuos verdes (orgánicos) y de alimentos constituyen la mayor proporción de los RSU alcanzando hasta un 44 % de los desechos mundiales como se observa en la Figura 1.1, seguido por los residuos de papel y cartón (17 %), plástico (12 %), vidrio (5 %), metal (4 %), otros (14 %), madera (2 %), caucho y cuero (2 %) (Sharma *et al.*, 2020; Kaza *et al.*, 2018).

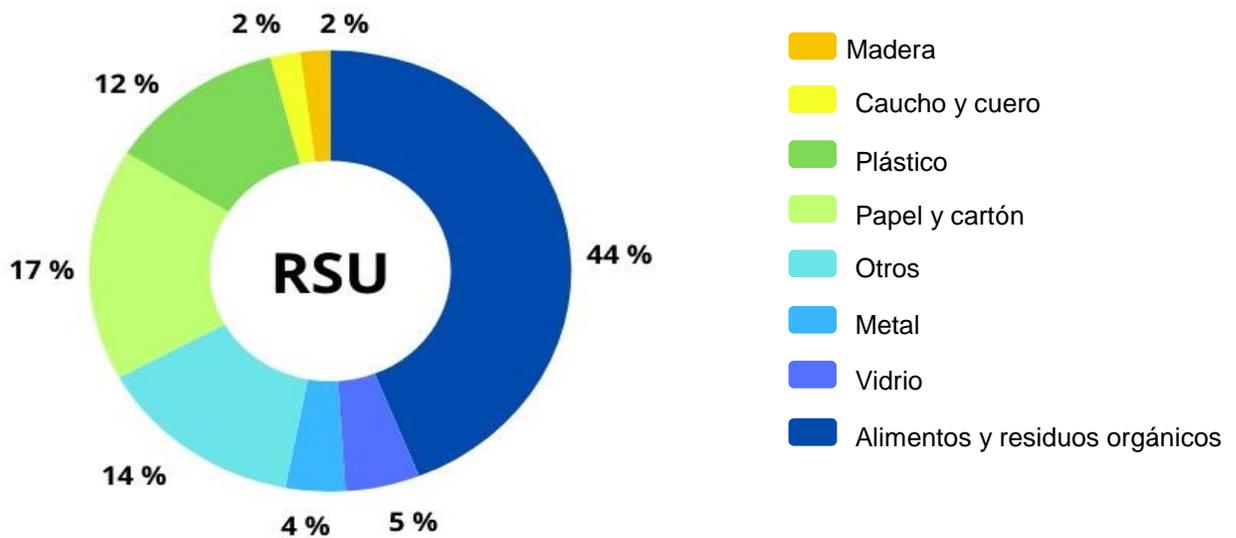


Figura 1.1 Composición de los RSU

### 1.1.3 Residuos alimenticios: frutas y verduras

La fracción biodegradable de los RSU puede ser considerada como un recurso de energía renovable debido a que su generación es constante, los residuos alimenticios son mundialmente considerados como parte importante de residuos orgánicos, ya que

de acuerdo con la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO por sus siglas en Inglés), anualmente estos residuos representan cerca de 1.3 billones o el 30 % del total de alimentos en el mundo (Sharma *et al.*, 2020)

De acuerdo con Edwiges *et al.*, (2018) se considera a los residuos de frutas y verduras una categoría importante de los Residuos Sólidos Urbanos debido a que son producidos en grandes cantidades por mercados y otras actividades alrededor del mundo, donde cerca al 15 % y 25 % de la producción total de frutas y verduras son desperdiciadas a lo largo de la cadena de producción.

Los residuos de frutas y verduras presentan las características de poseer un alto contenido de agua y azúcares velozmente hidrolizables, además de ser ricos en compuestos orgánicos degradables, los cuales presentan valores típicos en el contenido de sólidos de menos del 10 % y cerca del 85 % de materia orgánica, (Edwiges *et al.*, 2020), Estos desechos orgánicos deben gestionarse de manera sostenible para evitar el agotamiento de los recursos naturales, minimizar el riesgo para la salud humana, reducir las cargas ambientales y mantener un equilibrio general en el ecosistema (Khalid *et al.*, 2011).

## **1.2 Impactos ambientales de los residuos de alimentos**

Problemas ambientales, pérdidas económicas y el uso ineficiente de los recursos son algunas de las consecuencias de la pérdida y desperdicio de alimentos, considerando que cerca de la tercera parte de la producción mundial de alimentos se pierde cada año, de los cuales del 16 - 22 % corresponden a residuos de frutas y verduras contribuyendo a cerca del 6 % de las emisiones globales de gases de efecto invernadero (Cassani y Gomez-Zabaglia, 2022).

La disposición de dichos residuos ocurre de diferentes maneras, sin embargo, los métodos de disposición más comunes son el vertido en rellenos sanitarios o lugares cercanos al lugar de producción de los mismos, incineración, su uso como fertilizantes de suelos y alimento para animales debido a su bajo costo (Ueda *et al.*, 2022).

Además de los lixiviados producidos en los rellenos sanitarios, gases como metano ( $CH_4$ ) y dióxido de carbono ( $CO_2$ ) son generados y liberados a la atmósfera formando parte de las emisiones de gases de efecto invernadero que contribuyen en gran medida al cambio climático, dichos gases se originan como consecuencia de la descomposición de materia orgánica que se encuentra disponible realizada por un conjunto de microorganismos, considerándose al  $CH_4$  como un gas altamente perjudicial con el medio ambiente, seguido por el  $CO_2$ , es por esto que tecnologías como la digestión anaerobia son una buena alternativa para mitigar el impacto ambiental y lograr un aprovechamiento de los recursos disponibles (Papargyropoulou *et al.*, 2014).

### **1.3 Digestión anaerobia**

La digestión anaerobia (DA) es un proceso biológico presente en la naturaleza, en el cual los microorganismos presentes descomponen materiales orgánicos, (Richen y Morphy, 2021), siendo considerada como una tecnología sostenible para el tratamiento, estabilización y recuperación de energía de diversos desechos orgánicos en ausencia de oxígeno, teniendo así un enfoque de aprovechamiento integral, (Muratçobanoglu *et al.*, 2021; Zamri *et al.*, 2021). Convirtiendo el contenido orgánico que se encuentra presente en los desechos orgánicos en un biogás rico en energía por medio de la influencia de microorganismos y en ausencia de oxígeno, siendo productos resultantes de este proceso biogás y residuos orgánicos ricos en nitrógeno, (Ajay *et al.*, 2020).

Su implementación ha sido exitosa en el tratamiento de desechos agrícolas, desechos alimenticios y lodos de aguas residuales debido a su habilidad para reducir la demanda química de oxígeno (DQO) y la Demanda Bioquímica de oxígeno (DBO), a partir de flujos de residuos y producir energía renovable (Alimohammadi y Demirer, 2022).

#### **1.3.1 Aspectos importantes en la digestión anaerobia.**

- Composición típica del biogás producido.

La generación de energía en forma de metano ( $CH_4$ ) a partir de la descomposición de los desechos orgánicos es la característica principal de la DA (Gahlot *et al.*, 2020), donde el biogás producido es un gas altamente inflamable, presentando una composición típica conformada por una combinación de metano, dióxido de carbono y trazas de ácido sulfhídrico principalmente (Kaushal y Baitha, 2018), dichos componentes se presentan en las proporciones del 30-40 % de dióxido de carbono ( $CO_2$ ), 60-70 % de metano ( $CH_4$ ), trazas de hidrógeno ( $H_2$ ), oxígeno ( $O_2$ ), ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ), nitrógeno ( $N_2$ ) y agua en forma de vapor ( $H_2O$ ) (Muratçobanoglu *et al.*, 2021).

### **1.3.2 Factores clave en la DA**

Los factores clave que afectan y de los cuales depende principalmente la eficiencia de la digestión anaerobia incluyen la calidad y pH de la materia prima o sustrato, procesos de pretratamiento del sustrato, diseño y selección del proceso de digestión, así como algunas condiciones como la temperatura, tiempo de retención hidráulica, índice de carga orgánica así como de la proporción carbono-nitrógeno (C/N), siendo considerado como un proceso relativamente lento (Zamri *et al.*, 2021).

### **1.3.3 Retos de la DA**

Con el paso del tiempo, han sido identificados algunos inconvenientes particulares que enfrenta el proceso de DA convencional, ejemplo de estos obstáculos son la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGVs), los cuales tienen el potencial de ser tóxicos para los microorganismos metanogénos; también, se hace mención de la acumulación de hidrógeno molecular ( $H_2$ ) el cual tiene el efecto de incrementar la presión parcial de hidrógeno lo que causa inhibición de las coenzimas oxidativas de las bacterias acetogénicas; así mismo se hace referencia al efecto en la velocidad del proceso de DA que tiene el hidrógeno reducido o también conocido como formiato el cual actúa como un transbordador para poder llevar a cabo la transferencia de electrones, por lo que se considera un paso limitante para la velocidad en la que se lleva a cabo la DA convencional. (Gahlot *et al.*, 2020)

Aunado a lo expuesto anteriormente, algunos otros autores referidos en el trabajo realizado por (Abdelwahab *et al.*, 2020), plantean que entre los diversos problemas que limitan el rendimiento y la eficiencia de DA son la baja tasa de biodegradabilidad que presentan los sustratos orgánicos complejos tales como los sustratos lignocelulósicos, así como los posibles requerimientos de pretratamientos térmicos, ácidos o alcalinos que presenten algunos sustratos, debido a la presencia de componentes tóxicos que puedan afectar el desempeño del proceso de DA como lo son la alta cantidad de materia orgánica residual y amoníaco presente en aguas residuales, grandes concentraciones de amoníaco y ácido sulfhídrico encontradas en residuos de aves de corral, la alta demanda química de oxígeno (DQO) y demanda bioquímica de oxígeno (DBO), alcalinidad total (AT) y la salinidad encontrados en algunos sustratos, considerando también la susceptibilidad a la interrupción del sistema por toxinas o sobrecargas que experimente el sistema (Zhao *et al.*, 2020).

De acuerdo a lo descrito por Ajay *et al.*, (2020), sobre los factores que afectan a la DA, Richen y Murphy (2021) plantean dos obstáculos principales a los que la digestión anaerobia se enfrenta y que no se han podido superar por completo: siendo el primer problema la sensibilidad de la AD a diversos factores operacionales, convirtiendo el proceso en inestable e ineficiente si dichos factores no se controlan. El segundo obstáculo se presenta en la parte final de la AD, en donde el digestato producido conserva aún una cantidad significativa de energía y carga de nutrientes requiriendo una amplia superficie de terreno para la absorción de dicha carga de nutrientes y que si no se gestiona de manera adecuada, puede conllevar a una eutrofización de los cuerpos de agua cercanos.

#### **1.3.4 Etapas de la digestión anaerobia**

La DA es un proceso de multietapas, el cual consta de cuatro etapas secuenciales llevadas a cabo por un consorcio microbiano mostradas en la Figura 1.2, (Abdelwahab *et al.*, 2020) y descritas a continuación:

- I) Etapa de hidrólisis.

En esta etapa, los compuestos orgánicos complejos (moléculas grandes) como son los carbohidratos, proteínas, etc., presentes en los desechos ricos en materia orgánica son convertidos en compuestos orgánicos simples (moléculas más pequeñas) como aminoácidos o ácidos grasos por medio de la influencia de enzimas y bacterias anaerobias (Kumar *et al.*, 2021b; Muratçobanoglu *et al.*, 2021).

## II) Etapa de acidogénesis.

También conocida como fermentación primaria donde los productos intermedios, igualmente conocidos como compuestos orgánicos simples son transformados en ácidos grasos volátiles (AGVs) principalmente en ácidos orgánicos y alcoholes, esta etapa se caracteriza por el incremento de la presión parcial del hidrógeno debido a las grandes cantidades de hidrógeno producidas por las bacterias acidogénicas, pudiendo ser remediada esta situación si existe la suficiente presencia de arqueas que utilizan hidrógeno como lo son los metanógenos hidrogenotróficos, siendo denominada esta interacción entre microorganismos como metabolismo sintrófico (Muratçobanoglu *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2020).

## III) Etapa de acetogénesis.

Esta etapa es conocida también como fermentación secundaria y es donde se transforman los ácidos grasos volátiles como butirato y propionato convirtiéndolos en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono, (Baniamerian *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2021b).

## IV) Etapa de metanogénesis.

Donde son formados el metano y el dióxido de carbono por microorganismos productores de metano, los cuales transforman  $CO_2$ ,  $H_2$  y los acetatos producidos en metano. En el ambiente metanogénico, debido a la ausencia de

receptores de electrones inorgánicos como  $O_2$ , la materia orgánica sólo puede ser sometida a un proceso de degradación por fermentación usando protones y  $HCO^{3-}$  como receptores de electrones (Muratçobanoglu *et al.*, 2021; Zhang y Zang, 2019; Corrales *et al.*, 2015).

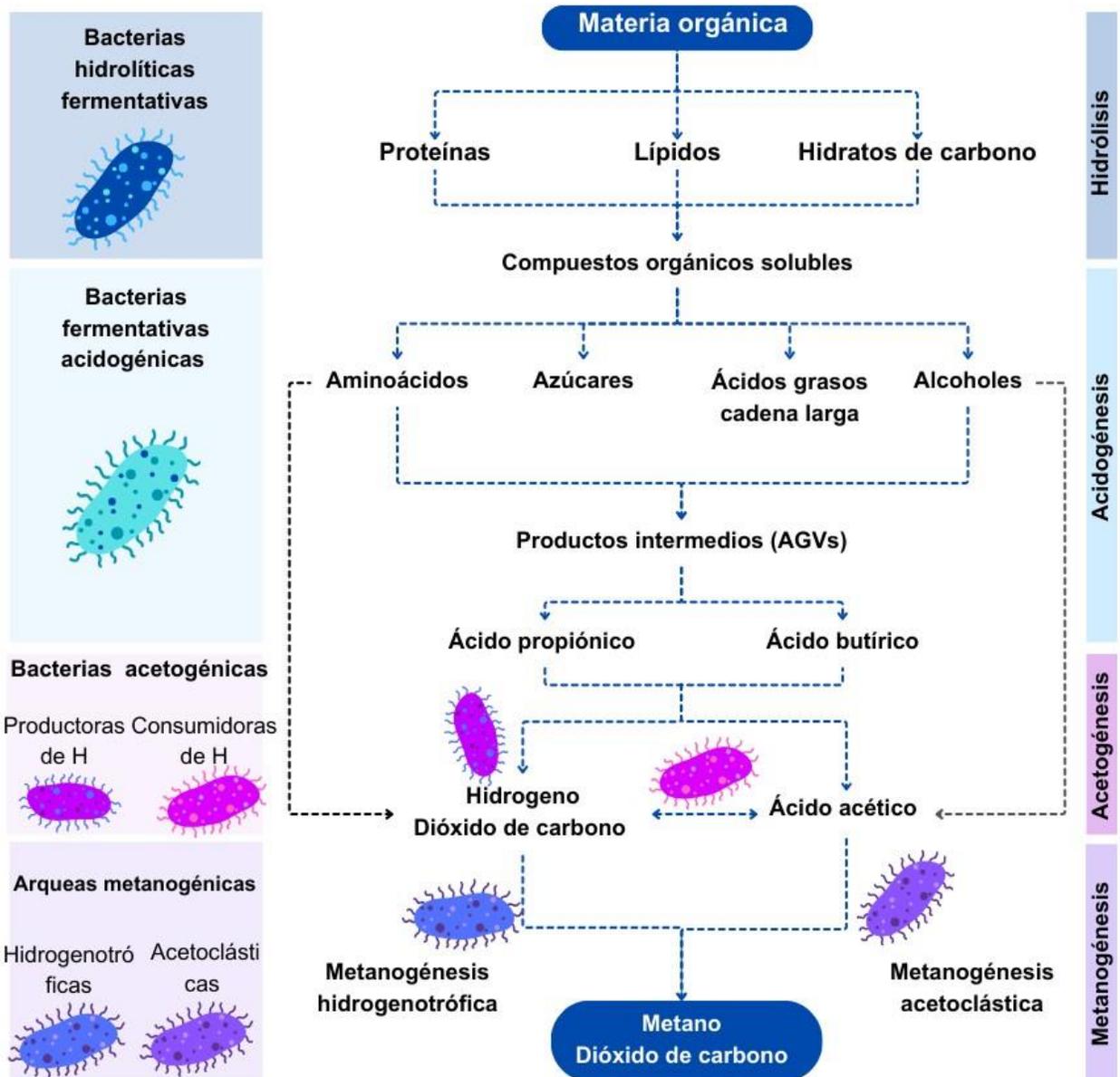


Figura 1.2 Diagrama proceso de digestión anaerobia

Donde de acuerdo con autores como Kumar *et al.*, (2021b), las etapas de hidrólisis y metanogénesis han sido reportadas como etapas limitantes en la DA debido a la acción inhibidora cuando existe una acumulación de amoníaco que, en la primera etapa, reduce la tasa de hidrólisis de la biomasa, mientras que en la última etapa interfiere con la formación de metano.

#### **1.4 Transferencia de electrones entre especies en la DA**

El mecanismo principal detrás de la digestión anaerobia es la Transferencia Electrónica Entre Especies (IET, por sus siglas en inglés) la cual contribuye a la utilización de energía durante la digestión anaerobia, por lo que, para que el proceso de DA pueda llevarse a cabo en sus etapas, debe existir una simbiosis cooperativa entre las bacterias fermentativas y metanogénicas conocida como metanogénesis sintrófica, la cual determinará si la degradación de la materia orgánica y el proceso de metanogénesis se puede llevar a cabo de manera eficiente y ordenada, contribuyendo al uso racional de la energía (Ajay *et al.*, 2020; Zhang y Zang, 2019).

Este, es un proceso en el cual las células microbianas sirven como receptores de electrones para una segunda célula, teniendo una gran importancia en diversos entornos para los ciclos biogeoquímicos y la completa degradación de la materia orgánica en metano (Zhang y Tremblay, 2020). La IET ocurre de dos maneras principales:

##### **1.4.1 MIET (Transferencia Mediada de Electrones Entre Especies)**

MIET se trata de uno de los mecanismos de transferencia de electrones inicialmente descubiertos, en donde son requeridos trasportadores de electrones solubles para la transformación de electrones entre microorganismos donantes y microorganismos receptores de electrones, siendo una de sus condiciones clave que la concentración de metabolitos se mantenga lo suficientemente baja para proveer condiciones termodinámicas favorables para la reacción de envío de electrones (Wu *et al.*, 2020),

En el proceso de DA, es reportado el uso de hidrógeno o formiatos como transportadores de electrones entre los AGVs y el  $CO_2$ , por lo cual se le ha denominado como transferencia mediada de electrones y que, dependiendo del caso puede ser también conocida como Transferencia de hidrógeno entre especies (IHT) o Transferencia de formiatos entre especies (IFT) cabe señalar que dicho mecanismo es el más predominante en cuanto al intercambio de electrones entre las bacterias fermentadoras y metanogénicas se refiere (Ajay *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021b).

Mientras que otros autores como Zhao *et al.*, (2020), explican que para que el mecanismo de IHT sea factible, los metanógenos que se encargan del consumo de hidrógeno ( $H_2$ ) deben de seguir el ritmo de las bacterias que lo producen, manteniendo así los niveles de hidrógeno muy bajos. Además de que una cantidad importante de hidrógeno puede ser producida de la fermentación de azúcares y aminoácidos, los cuales son menos sensibles a altas concentraciones de hidrógeno, donde los sistemas que dependen del mecanismo de transferencia de hidrógeno entre especies, son susceptibles a perturbaciones, considerando a este mecanismo altamente dependiente de la difusión y que presenta un velocidad relativamente lenta.

#### **1.4.2 DIET (Transferencia Directa de Electrones Entre Especies)**

El proceso de la DA, como mencionan Gahlot *et al.*, (2020), puede ser acelerada por la Transferencia Directa de Electrones entre Especies (DIET, por sus siglas en inglés) incrementando la eficiencia de la DA y la producción de biogás. Se sabe que este tipo de transferencias sucede naturalmente en algunos digestores que tratan desechos simples y diluidos. DIET, es una ruta alternativa a la transferencia de hidrógeno/formiato para transferir electrones entre bacterias oxidativas y metanógenas durante el proceso de DA y se considera como el área de investigación de transferencia de electrones más solicitada (Ajay *et al.*, 2020).

En DIET, los pares que son donantes de electrones pasan los electrones a los receptores mediante conexiones eléctricas y siendo los electrones donados directamente aceptados por los microorganismos, a diferencia de producir portadores

de electrones intermediarios solubles como hidrógeno y formiato, los cuales transportan electrones a través del transporte difusivo. Las bacterias que oxidan los residuos orgánicos pueden forjar conexiones con los microbios productores de metano a través de circuitos conductores producidos biológicamente basados en proteínas (Zhao *et al.*, 2020). De acuerdo con autores como Ajay *et al.*, (2020), el mecanismo DIET para la producción de metano es preferida sobre MIET debido a que presenta un consumo bajo de energía, no requiere mediadores reductores para el intercambio de electrones, además de que no presenta una acumulación de ácidos grasos volátiles tóxicos si no se presenta un estancamiento en el proceso aunado a esto, no presenta el requerimiento de pasos enzimáticos complejos para producir, consumir y difundir mediadores redox, brindando ventajas termodinámicas.

Según lo reportado por Zhang y Zang (2019), el mecanismo DIET se puede llevar a cabo mediante tres tipos de mecanismos existentes, entre las que se encuentran:

- DIET mediante proteínas transportadoras de electrones unidas a membrana

Este mecanismo se distingue debido a que la TE es llevada a cabo por el citocromo de las mitocondrias de los microorganismos (Ver Figura 1.3). Este tipo de mecanismo se ha observado en *Prosthecochloris aestaurii*, la cual es capaz de aceptar electrones liberados por *G. sulfurreducens*.

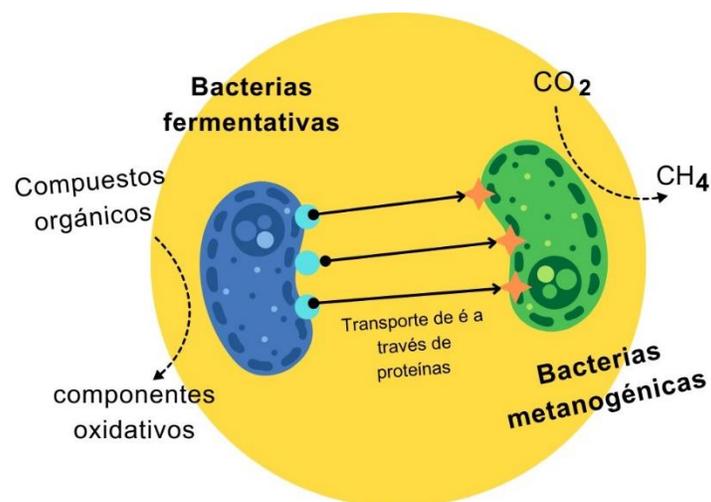


Figura 1.3 DIET a través de proteínas transportadoras de electrones

- DIET a través de Pili conductivos

Donde los electrones liberados durante la oxidación por las bacterias fermentativas son conducidos a los microorganismos metanogénos a través de un pili conductivo (Ver Figura 1.4) el cual funciona como un nano cable conductor para lograr una mayor degradación, (Ajay *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021b). Un ejemplo, es el del Pili de *G. sulfurreducens*, el cual afirma que es altamente conductivo pudiendo actuar como un bio-nanocable para transferir electrones en la superficie de una célula a óxidos de hierro Fe(III) extracelulares, y predecir que esos electrones puedan también ser transferidos entre células vía pili.

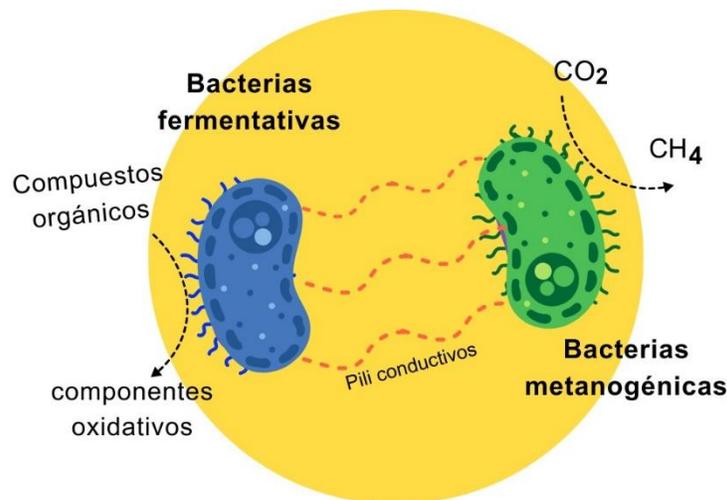


Figura 1.4 DIET a través de Pili conductivos

- DIET a través de materiales conductivos abióticos

Se trata de materiales conductivos que forman puentes entre bacterias y metanogénos, lo cual promueve la actividad metanogénica tal como se muestra en la Figura 1.5 (Ajay *et al.*, 2020). Este mecanismo se caracteriza por la suplementación de la DIET con materiales conductivos o semi conductivos, como alternativas a la transferencia de electrones vía pili, los cuales han demostrado que promueven la transferencia de electrones por medio de la formación de puentes eléctricos entre especies de *Geobacter* y *Methanosaeta*, incrementando la producción de biogás y

acortando los tiempos de espera, haciendo referencia al periodo de tiempo durante el cual, las bacterias se adaptan al nuevo entorno (Zhang y Zang, 2019). Siendo este mecanismo una oportunidad para la solución de algunas limitantes y el mejoramiento de la generación de metano por medio de la implementación de ciertos materiales conductivos como carbón activado granular, grafeno, fibras de carbono, biochar, minerales de hierro, magnetita, etc. (Alimohammadi y Demirer, 2022), además, la adición de materiales conductores a los digestores anaerobios acelera el crecimiento de metanógenos capaces de transferir electrones entre diferentes especies.

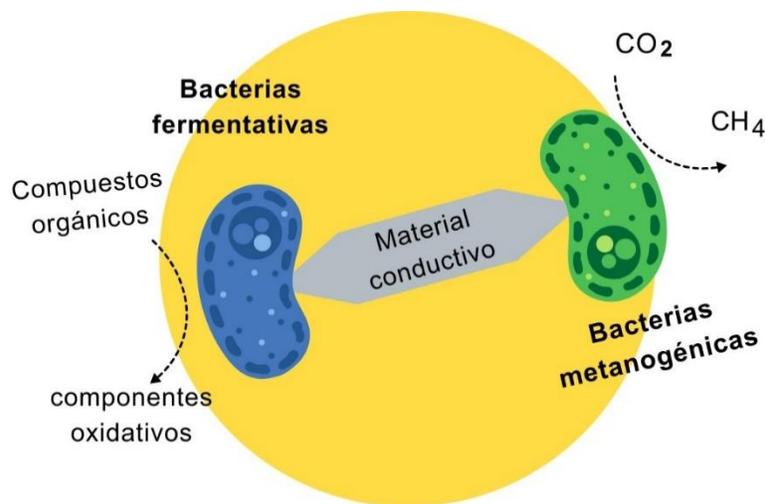


Figura 1.5 DIET a través de materiales conductivos

### 1.5 Pruebas de potencial bioquímico de metano (PBM)

El potencial bioquímico de metano PBM o también conocido como potencial de biometano es una técnica que se centra principalmente en la determinación de la máxima producción de metano dada comúnmente en mL/g SV, así como la biodegradabilidad anaerobia de residuos orgánicos (sustratos) en condiciones anaerobias, incluyendo:

- Identificación del potencial de producción de energía.
- Selección de sustratos (pueden presentarse en forma líquida o sólida).

- Identificación de la actividad microbiana (adaptación o inhibición).
- Determinación de las cinéticas de degradación que son útiles para la calibración de modelos matemáticos y cinéticos que a su vez son empleados en la simulación de diversos procesos de digestión anaerobia y la predicción del funcionamiento de digestores a tamaño real.
- Establecimiento de parámetros de diseño de los digestores anaeróbicos

La técnica de PBM es realizada comúnmente a nivel laboratorio en modo batch, siendo preferida por su practicidad y facilidad en comparación de experimentos continuos, considerándose una prueba de última generación en la determinación del rendimiento de metano de un determinado sustrato, por lo que se considera de gran relevancia para llevar a cabo el diseño y operación de digestores anaerobios (Pererva *et al.*, 2020; Cárdenas-Cleves *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2020; Sánchez-Reyes *et al.*, 2016)

La prueba de PBM, consiste en mezclar un sustrato con un cultivo de microorganismos anaerobios procedentes de un digestor anaerobio activo que recibe el nombre de inóculo e ingresarlo en frascos de vidrio sin ocupar el total del espacio dejando un espacio libre denominado espacio de cabeza, dicho espacio es purgado de oxígeno mediante el uso de nitrógeno gaseoso o una mezcla de nitrógeno-dióxido de carbono en una proporción 80:20 (Ver Figura 1.6). Los frascos, son almacenados a bajo condiciones estables de temperatura entre los 35 °C y 55 °C, mezclado continuo y un periodo de tiempo que ronda entre los 30 y 60 días, durante ese periodo es producido  $CH_4$  y  $CO_2$  como resultado de la degradación anaerobia del contenido orgánico presente en el sustrato, siendo el  $CH_4$  generado a partir del sustrato cuantificado, para poder expresar al PBM como la masa de sólidos volátiles agregados o la demanda química de oxígeno (DQO) agregada, calculándose mediante la resta del volumen de metano de un blanco, además de que existe la posibilidad de expresar el sustrato en términos de biodegradabilidad mediante la división del volumen de  $CH_4$  acumulado por el volumen de metano acumulado teórico, donde se obtiene una relación química de 1 g de DQO = 0.35 L de  $CH_4$  en condiciones de temperatura y presión estándar (Filer *et al.*, 2019; Koch *et al.*, 2015)

Destacando la medición del volumen de biogás producido ya sea por medio de métodos volumétricos o manométricos, continuando la prueba hasta que el material es considerado completamente degradado o se presente una producción de biogás menor al 1 % de la producción acumulada, siendo calculado el PBM y ajustado a condiciones de presión y temperatura estándar (273.15 K y 101.325 kPa) para posteriormente graficarlo en forma de curvas de potencial de metano acumulado (Wang, 2016).

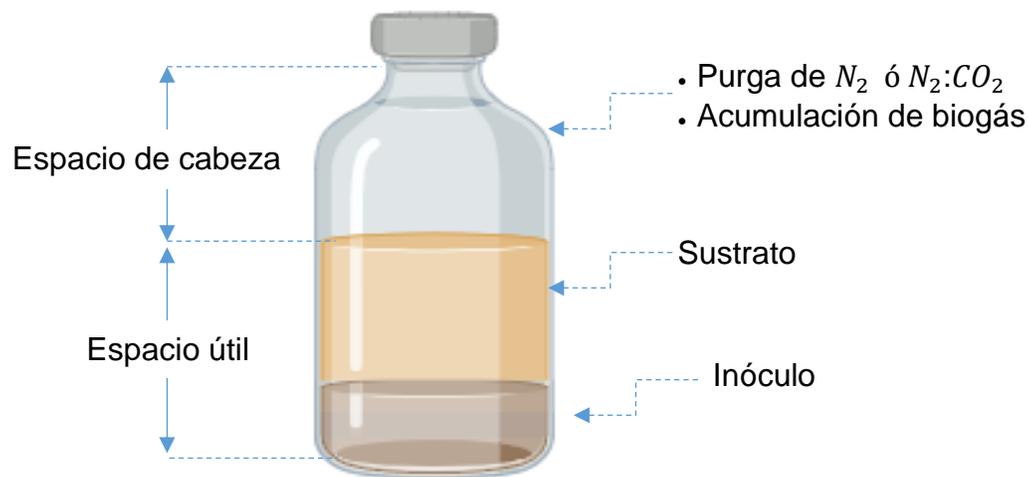


Figura 1.6 Prueba de PBM en frascos de vidrio.

## 1.6 Estrategias para mejorar la obtención de biogás en la DA

De acuerdo con Baniamerian *et al.*, (2019), hacen mención de algunas de las estrategias que se han desarrollado en el transcurso de los últimos años a través del desarrollo de diversas investigaciones cualitativas para la mejora de la generación de biogás así como para el aseguramiento de la estabilidad del proceso de DA, en dichas estrategias se incluye el empleo de procesos de co-digestión utilizando diferentes sustratos esto con el objetivo de vencer el obstáculo que representa la proporción no óptima de C:N o la disponibilidad limitada de los nutrientes; también se sabe del empleo de pretratamientos a sustratos recalcitrantes, esto para poder liberar a la

materia orgánica biodegradable para que sea más susceptible al ataque microbiano que se lleva a cabo en la DA; otra de las técnicas empleadas es la modificación en la configuración de reactores y el ajuste de las condiciones de operación así como la adición de aditivos tanto orgánicos como inorgánicos para estimular la actividad microbiana, dándose una descripción más detallada a continuación.

### **1.6.1 Clasificación de aditivos empleados en la DA**

Los aditivos utilizados para el mejoramiento de la producción de biogás en el proceso de DA, teniendo como base lo realizado por Baniamerian *et al.*, (2019), se pueden clasificar como se puede observar a continuación en la Figura 1.7, comprendiendo:

#### **1.6.2 Aditivos orgánicos**

Estos aditivos se caracterizan de ser de naturaleza orgánica e incluyen cultivos microbianos, enzimas y biomasa verde, esta última, como expresa, puede ser transformada en diferentes formas de energía como biocombustibles, biogás, biodiesel, bioetanol y bioelectricidad.

#### **1.6.3 Aditivos inorgánicos.**

Estos aditivos pueden ser divididos a su vez en macronutrientes como fósforo (P), nitrógeno (N) y azufre (S), los cuales son agregados a la materia prima de la DA en forma de sales, mejorando la capacidad del sistema, mientras que los micronutrientes y materiales como níquel (Ni), cobalto (Co), hierro (Fe), molibdeno (Mo), son constituyentes cruciales de co-factores y enzimas en numerosas reacciones biológicas involucradas en la DA y su adición a los biorreactores anaeróbicos ha demostrado que estimula el rendimiento de los reactores de producción de biogás (Baniamerian *et al.*, 2019).

#### **1.6.4 Materiales aditivos a base de carbón**

Por otro lado, los materiales de carbono, son utilizados como materiales no-biológicos conductivos en digestores anaerobios, estos comprenden materiales como carbón

activado granular, carbón activado en polvo, tela de carbono, nanotubos de carbono de paredes simples y múltiples, grafeno, grafito, etc., (Ajay *et al.*, 2020), los cuales adicionados a una escala nanométrica, actúan como conductores de electrones para el mecanismo DIET entre los microorganismos sintróficos, incrementando la producción de biometano.

Uno de los materiales a base de carbón que han sido ampliamente investigados son los materiales de la familia del grafeno debido a sus propiedades deseables para varias aplicaciones como procesos de separación por membrana, adsorción de metales pesados, adsorción de colorantes, absorción de ondas de microondas, fotocátalisis y como mejoradores en la DIET en la DA (Alkhouzaam *et al.*, 2020).

Dichos materiales a nanoescala se han implementado debido a sus propiedades térmicas, mecánicas y estructurales en diversas aplicaciones como biológicas, físicas, químicas, medicas, etc., motivando a investigadores a estudiar su impacto en la DA para la producción de energía verde.

### **1.7 Nanomateriales y su influencia en la digestión anaerobia.**

La nanotecnología se ha convertido en una tecnología creciente en las industrias ambientales, médicas y químicas, considerándose nanomateriales a aquellos que comprendan de un tamaño de entre 1-100 nm y debido a sus propiedades térmicas, mecánicas estructurales únicas y su gran área específica cuando son empleados como aditivos en la DA, estos pueden tener efectos tanto positivos como negativos (Baniamerian *et al.*, 2019).

Jadhav *et al.*, (2021) Destacan el desempeño que las nanopartículas conductoras han demostrado al ayudar en el incremento de las tasas de producción de metano en la digestión anaerobia y que, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas específicas se determinará la manera en que interactúan con el sustrato y el consorcio de microorganismos presentes, pudiendo tener efectos tanto positivos como el incremento de tasas de producción de metano, así como negativos promoviendo la inhibición de microorganismos, (Dong *et al.*, 2019). Apoyando lo señalado por Jadhav

*et al.*, (2021) y *Wu et al.*, (2020) quienes indican los impactos positivos de la implementación de nanopartículas conductoras en el tratamiento de diferentes biomazas y aguas residuales, facilitando termodinámica y cinéticamente el proceso de la DA debido a un desencadenamiento del metabolismo sintrófico, el cual es más eficiente por lo que aumenta la capacidad de captura de los electrones y acelera la velocidad de reacción, mejorando el rendimiento de las cuatro etapas de la DA.

Los nanomateriales gráfenicos, así como otros materiales que presentan base de carbón, son algunos de los materiales conductores que aumentan la producción de metano cuando se agregan a un digestor anaerobio, estos, permiten la transferencia de electrones entre especies mediada por materiales conductores mejorando la conversión de residuos orgánicos en metano cuando se emplea la digestión anaerobia, siendo su principal precursor el grafito (Zhang y Tremblay, 2020).

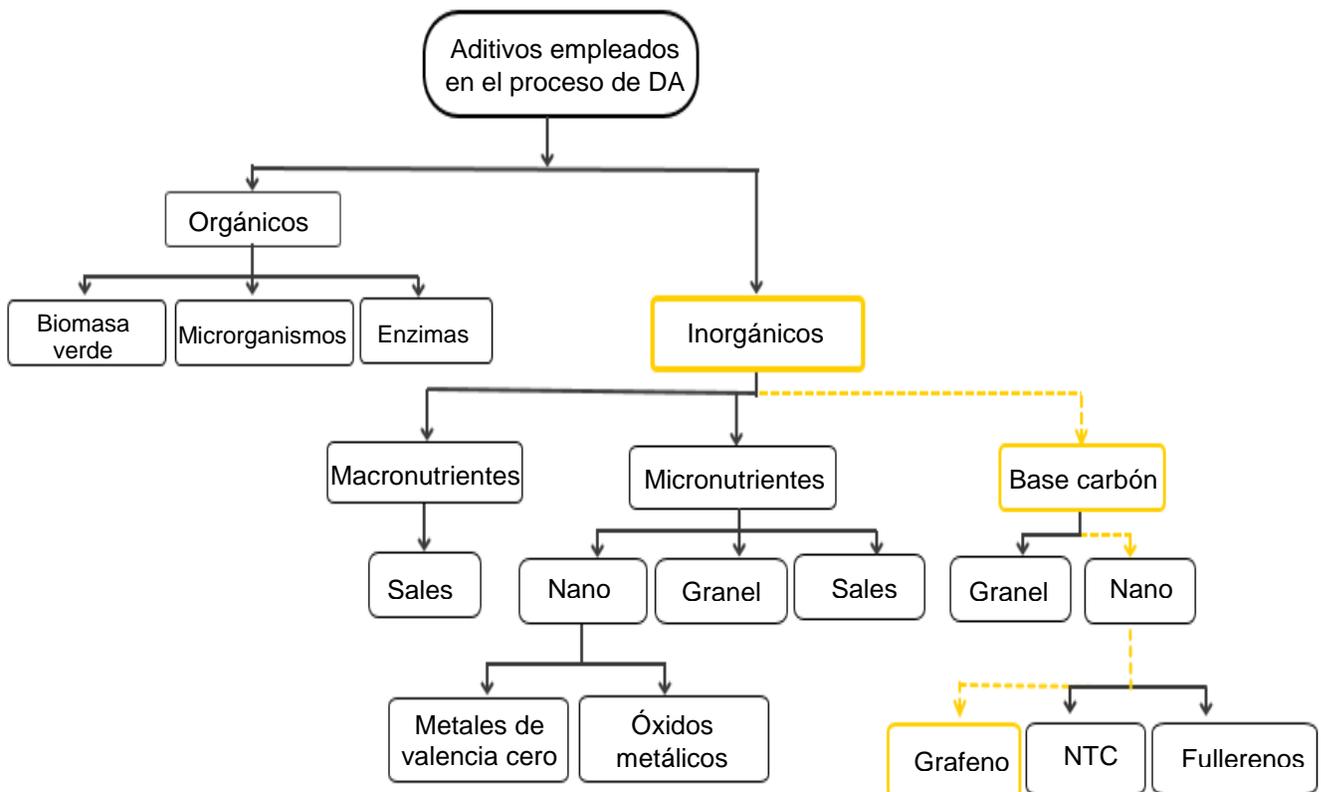


Figura 1.7 Clasificación de los aditivos utilizados en la DA (Baniamerian *et al.*, 2019).

### 1.7.1 Grafito

El grafito natural es descrito por Wang *et al.*, (2021), como un mineral formado a través de la conversión de materia de carbón, que cuenta con una alta capacidad de adsorción y conductividad, la cual la hace una materia prima muy utilizada para producir materiales reductores.

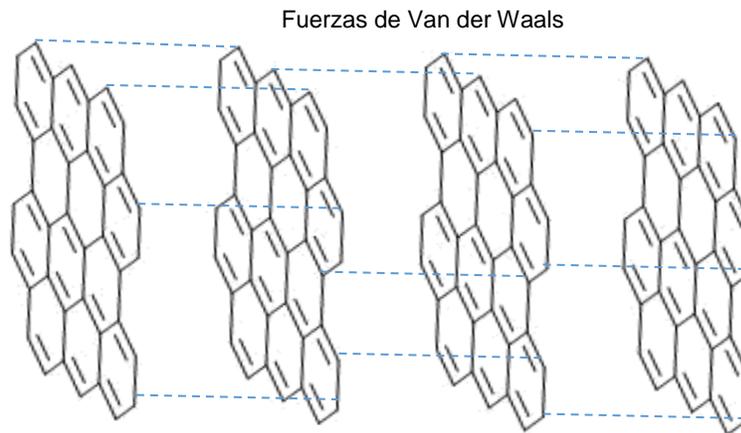


Figura 1.8 Estructura del grafito

De acuerdo con Mata-Marquez, (2020), el grafito es un alótropo cristalino semimetálico del carbono, el cual está formado por la reducción de compuestos de carbono y es componente primario de rocas ígneas, presentando un color característico negro metálico.

Los átomos del grafito cuentan con una disposición de hibridación  $sp^2$  los cuales forman un patrón hexagonal formando láminas que se asemejan a panales de abeja siendo esta la morfología característica de este material, las cuales se encuentran unidas mediante fuerzas de Van der Waals (Ver Figura 1.8), destacando la importancia del grafito como el precursor de diferentes materiales grafénicos, ya que este material presenta la posibilidad de ser oxidado y exfoliado dando lugar a un nuevo material conocido como óxido de grafeno (OG).

### 1.7.2 Grafeno

El grafeno es uno de los alótropos de carbón de una sola hoja, siendo el primer material verdaderamente bidimensional (2D) que es considerado como una piedra angular en la investigación de la ciencia de los materiales, (Agarwal y Zetterlund, 2021) debido a las diversas propiedades únicas que posee para aplicaciones tecnológicas y médicas (Muratçobanoğlu *et al.*, 2021).

Se trata de un material bidimensional que puede ser extraído del grafito, el cual consiste en átomos de carbono enlazados con hibridación  $sp^2$  (ver Figura 1.9) dispuestos en una estructura de panal bidimensional (Alkhouzaam *et al.*, 2020). El grafeno es considerado como el bloque básico para la formación de diferentes alótropos del carbón, por ejemplo, si las láminas de grafeno en forma de panal se apilan forman grafito, si se enrollan forman nanotubos y si se envuelven forman fullerenos (Mata-Marquez, 2020)

Este material de acuerdo con (Shojaeenezhad y Kazeminezhad, 2017), presenta propiedades deseables como súper conductividad eléctrica y térmica ( $5.3 \times 10^3 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$ ), una alta resistencia mecánica, una gran área superficial específica ( $2630 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ ), movilidad electrónica ( $1500 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) así como habilidades de barrera molecular (Smith *et al.*, 2019; Tabandeh-Khorshid *et al.*, 2020), ligereza, flexibilidad, estabilidad química, compatibilidad y propiedades ópticas superiores, que lo han convertido en el material objetivo de diferentes temas de investigación y tanto estudios teóricos y como experimentales han sido llevados a cabo, sin embargo, el grafeno presenta un inconveniente importante ya que es un material muy caro para llevar a aplicaciones industriales a gran escala (Muratçobanoğlu *et al.*, 2021).

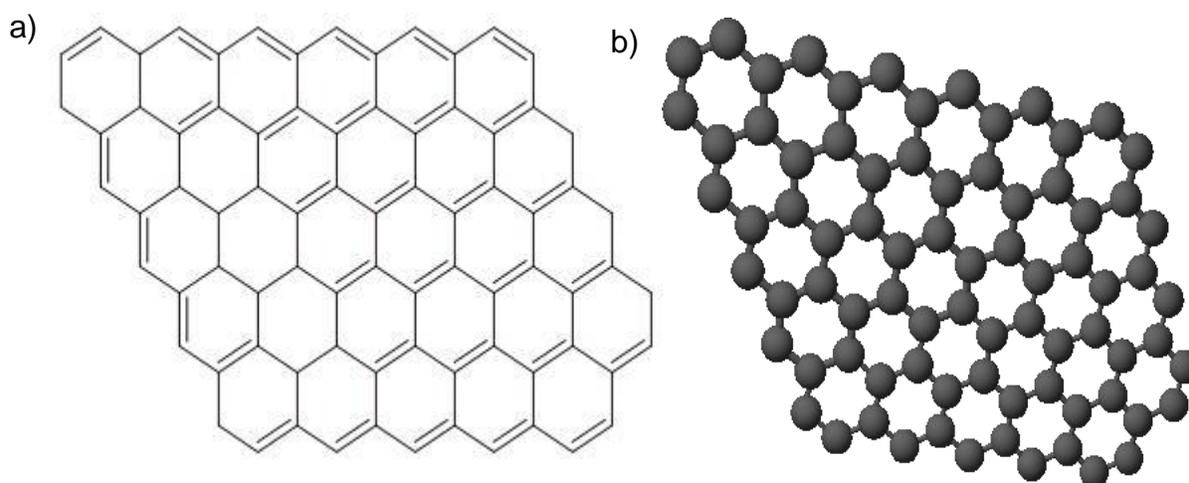


Figura 1.9 Estructura de grafeno en a) 2D y b) 3D.

### 1.7.3 Óxido de grafeno

Se denomina como óxido de grafeno (OG) a la forma oxidada del grafeno, quien presenta en su estructura grupos funcionales hidrofílicos, quienes le proporcionan una mejor adecuación a ser procesado en cuanto a grandes cantidades se refiere presentando bajos costos. Este material es el precursor inmediato del OGr una vez habiéndose sometido a un proceso previo de exfoliación llevado a cabo en medios acuosos (Mata-Marquez, 2020), dicho material presenta una estructura de carbono hexagonal semejante a la del grafeno enlazados con hibridación  $sp^2$  y  $sp^3$  en forma de panal tridimensional (ver Figura 1.10), el cual contiene en su estructura abundantes grupos funcionales con base oxigenada como hidroxilo ( $-OH$ ), alcoxi ( $C-O-C$ ), carbonilo ( $C=O$ ), ácidos carboxílicos ( $-COOH$ ), entre otros, proporcionándole algunas ventajas al OG sobre el grafeno como una mayor solubilidad lo que conlleva a una mejor dispersión en agua, así como una afinidad por los compuestos aromáticos y biomoléculas hidrofobias, entre otras (Smith *et al.*, 2019).

El OG de acuerdo con (Colom *et al.*, 2020), es un compuesto no estequiométrico el cual consiste en una red de átomos de carbono con hibridación  $sp^2$  similar a la del grafeno, con la diferencia que esta incluye grupos funcionales intercalados que

contienen oxígeno. Además, es conocido por poseer un coeficiente bajo de fricción en ambientes húmedos y con presencia de nitrógeno en comparación de los otros materiales grafénicos (Deepa *et al*, 2022). Dentro de sus más importantes ventajas del empleo del OG están su habilidad de ser usado como aditivo durante la fabricación de materiales donde el grafeno prístino no puede ser utilizado, debido a que cuando el grafeno es utilizado directamente, es susceptible a sufrir un re-apilamiento considerable debido a las interacciones en sus enlaces  $\pi - \pi$  y su carácter hidrofóbica-hidrofóbica entre sus laminas, lo que produce una separación de fases del grafeno dentro de los nanocompuestos lo que termina siendo perjudicial; además, otra de las ventajas que posee se debe a los grupos funcionales oxigenados que se encuentran contenidos dentro de la estructura del OG, los cuales proveen a las láminas una amplia estabilidad por consiguiente, esto permite una mejor incorporación y una distribución más uniforme dentro de los nanocompuestos, sin embargo este material no presenta la misma conductividad eléctrica que el grafeno y OGr (Agarwal y Zetterlund, 2021).

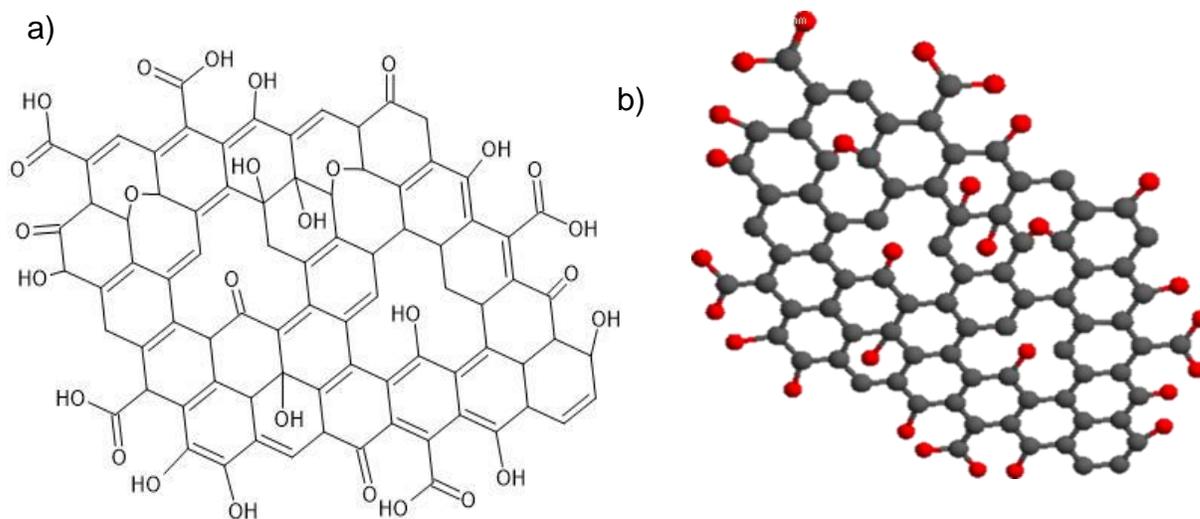


Figura 1.10 Estructura de OG en a) 2D y b) 3D.

#### 1.7.4 Óxido de grafeno reducido OGr

Una vez se han eliminado la mayoría de los grupos funcionales oxigenados presentes en la estructura del OG y por consiguiente los enlaces de hibridación  $sp^3$  (ver Figura 1.11) es posible alcanzar propiedades cercanas e incluso mejoradas a las que presenta el grafeno (Smith *et al.*, 2019). El OGr, es un nanomaterial que aún contiene grupos funcionales oxigenados de los que se ha reportado, aumentan la producción de metano en DA, cuya producción es más barata en comparación al grafeno cuando se encuentra en su forma de una película delgada, haciendo posible su introducción en la DA con la intención de mejorar la producción de metano y/o la estabilización del proceso (Muratçobanoglu *et al.*, 2021).

El precursor inmediato del OGr es el OG, el cual puede ser reducido por medio de diferentes técnicas como son: reducción química, método solvotérmico, exfoliación electroquímica asistida por líquido iónico, reducción asistida por energía solar, calentamiento asistido por microondas y tratamiento térmico (Coros *et al.*, 2020).

La ruta para la preparación de OGr de acuerdo con (Emiru y Ayele, 2017), involucra tres pasos principales:

1. Oxidación: el polvo de grafito es oxidado, dando como resultado óxido de grafito, el cual puede ser dispersado en agua o en otro solvente polar, siendo atribuida esta característica a la existencia de grupos funcionales oxigenados que se encuentran presentes en su estructura.
2. Exfoliación: el og resultante de la oxidación tiene la posibilidad de ser exfoliado mediante un baño de ultrasonido (sonicación) o por medio de agitado mecánico, esto con la finalidad de formar hojas compuestas de una sola capa de OG.
3. Reducción: el OG es reducido por la remoción de los grupos funcionales oxigenados contaminantes.

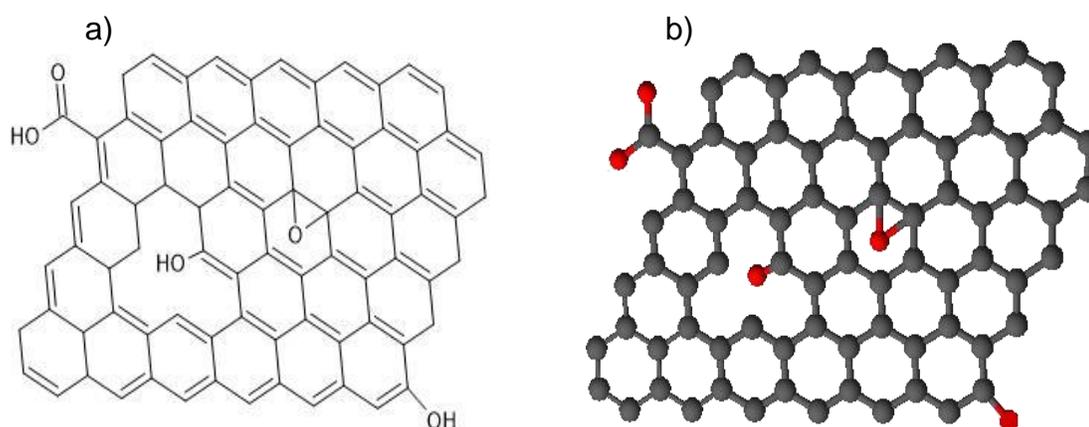


Figura 1.11 Estructura del OGr vista en a) 2D y b) 3D

## 1.8 Síntesis de OG

Existen diferentes métodos para lograr la síntesis de los materiales grafénicos, estos métodos pueden ser clasificados en dos grupos principales de acuerdo con su enfoque: los métodos “Bottom-Up” son métodos que presentan una naturaleza química, los cuales también son conocidos como métodos de autoensamble molecular y atómico, teniendo como predecesores átomos o moléculas menos complicadas con las cuales se construye el material de interés, mientras que los métodos Top-Down son principalmente procesos físicos donde se transforma un material de partida en los materiales deseados (ver Figura 1.12) Siendo en la producción de grafeno la técnica más frecuentemente empleada la reducción o exfoliación de grafito en polvo (Kumar, *et al.*, 2021a; Singh *et al.*, 2023).

### 1.8.1 Exfoliación química- oxidativa

El proceso de síntesis de OG es llevado a cabo mediante la oxidación del grafito siguiendo uno de los principales métodos desarrollados por Brodie, Staudenmaier, o Hummers y su modificación. Siendo reportada la primera oxidación del grafito por Brodie en el año de 1855, sin embargo, fue Schafhäeütl quien realizó por primera vez la intercalación de grafito en el año de 1840, más tarde en 1898, Staudenmaier presentaría una metodología para la obtención de OG, la cual presentaría una menor

complejidad y peligrosidad, pero no fue hasta 1958 que Hummers y Offeman sintetizaron OG de tal manera que esta técnica fue adoptada por la comunidad científica y se usa ampliamente hoy en día, a continuación en la Figura 1.13 se muestra la metodología de cada una de las técnicas (Trikkaliotis *et al.*, 2021).

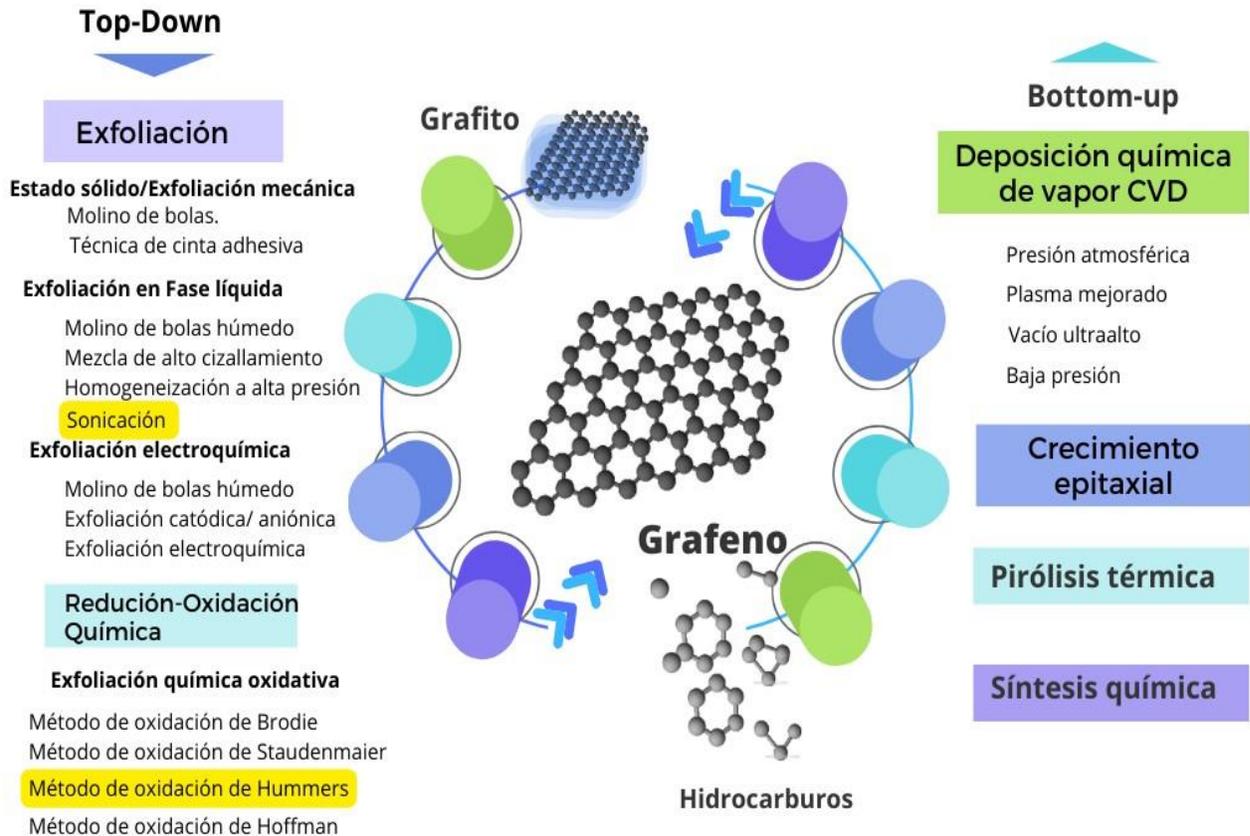


Figura 1.12 Métodos Top-Down y Bottom-up

Dentro de las principales ventajas del método de Hummers se encuentra un control eficiente de temperatura, la ausencia de producción de gases tóxicos como lo son  $NO_2$ ,  $N_2O_4$  o  $ClO_2$  durante la reacción, además de un gran grado de oxidación de las partículas de grafeno (Singh *et al.*, 2023).

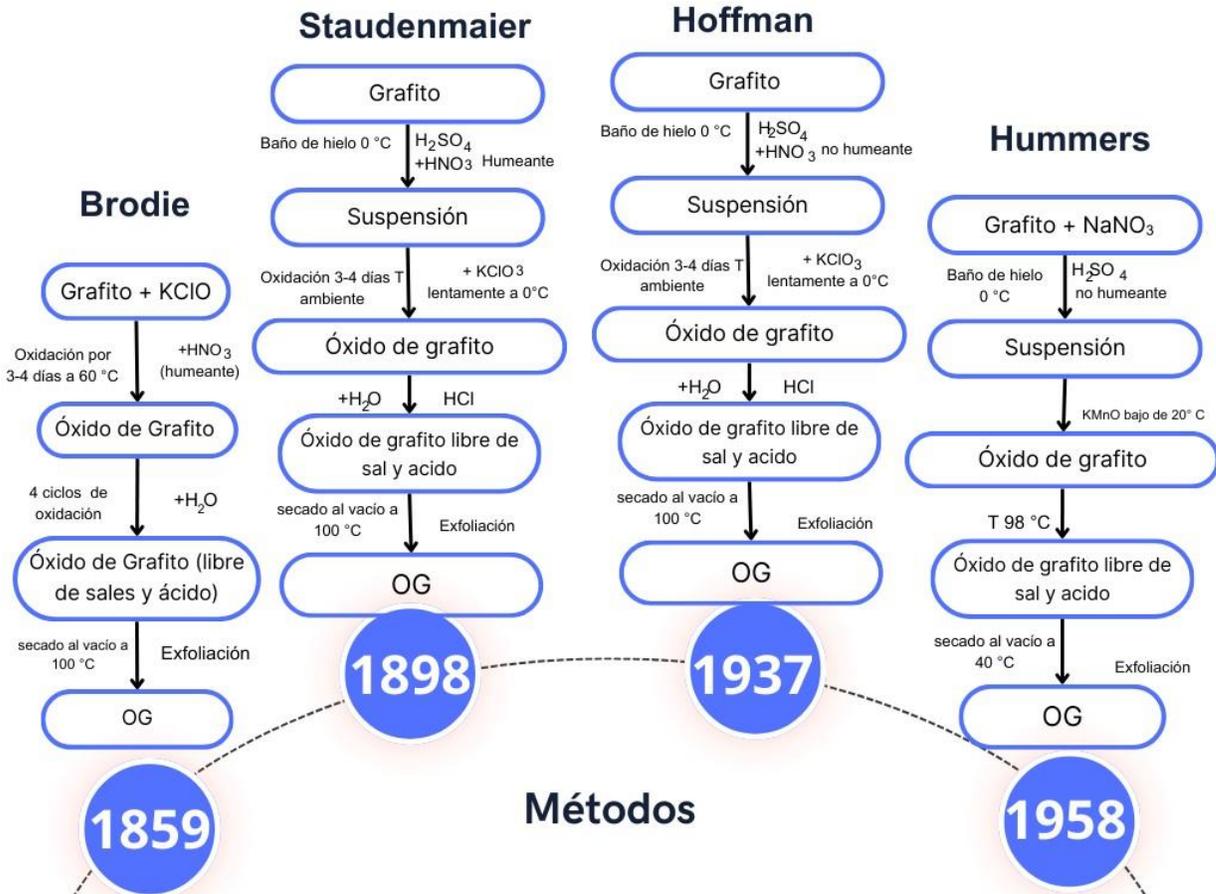


Figura 1.13 Técnicas precursoras empleadas en la síntesis del óxido de grafeno.

### 1.9 Métodos de reducción de óxido de grafeno.

Diversos métodos de reducción han sido desarrollados para la obtención de OGr a partir de OG, con la finalidad de minimizar el número de grupos oxigenados y alcanzar propiedades cercanas al grafeno prístino, dichos métodos son clasificados en cuatro categorías principales: reducciones químicas, biológicas, fotomediadas y térmicas (Figura 1.14), destacando a la conductividad eléctrica que presente el material obtenido al final como el mejor indicador de la efectividad del método de reducción empleado (Agarwal y Zetterlund, 2021 ; Smith *et al.*, 2019)

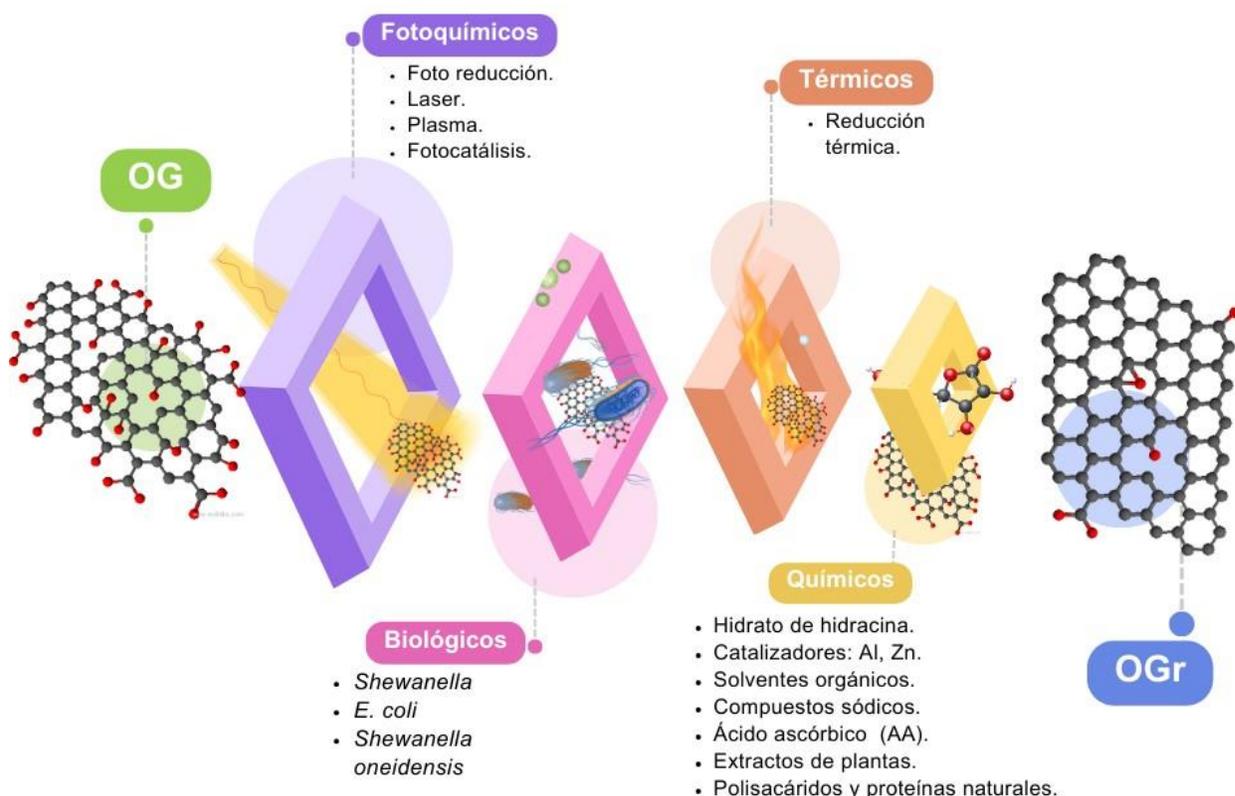


Figura 1.14 Métodos de reducción del óxido de grafeno para la síntesis de OGr

### 1.9.1 Reducción química

- Hidrato de hidracina

El monohidrato de hidracina ( $N_2H_4 \cdot H_2O$ ) es el reductor químico más extensamente empleado en la obtención de OGr, donde el material obtenido se considera como el más parecido al grafeno prístino en términos de propiedades electrónicas y estructurales, realizándose la primera reducción de OG mediada por hidracina en 2007. Se explica la reducción de OG que se observa con un aumento de la conductividad eléctrica, mediante la formación de anillos de pirazol, donde el par solitario de electrones en el nitrógeno se deslocaliza en la estructura de anillo aromático hibridado  $sp^2$  de OGr, mejorando así su conducción electrónica, siendo considerado dicho tratamiento como una reacción de sustitución en lugar de reducción debido a que esta última está asociada principalmente con la formación de dobles

enlaces carbono-carbono tras la pérdida de grupos funcionales que contienen oxígeno. En este método de reducción no obtiene como resultado una estructura prístina de grafeno y no se puede evitar el dopaje concomitante con nitrógeno de OGr como se muestra en la Figura 1.15 a continuación (Agarwal y Zetterlund, 2021):

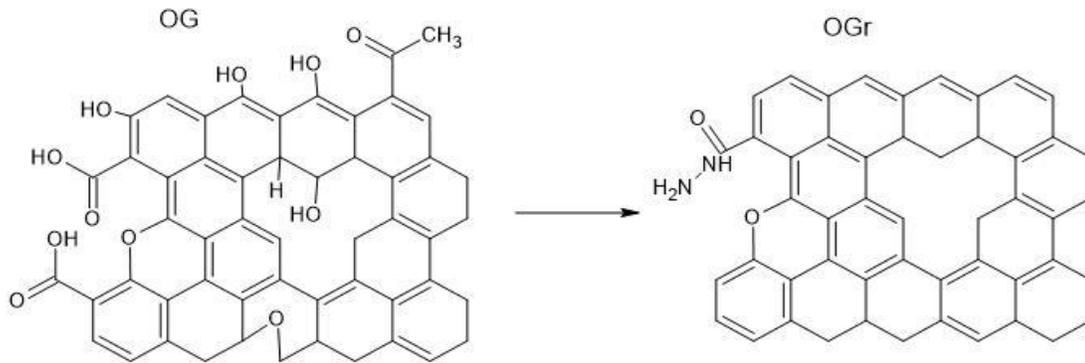


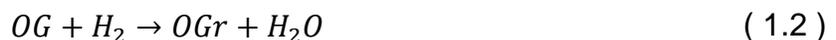
Figura 1.15 Reducción química del OG mediante hidracina como agente reductor

- Catalizadores

Algunos catalizadores como aluminio (Al) y zinc (Zn) han sido ampliamente usados bajo condiciones acidas para lograr una alta reducción del OG en menos de una hora, donde el aluminio en un medio ácido dado por el ácido clorhídrico (HCl) reacciona produciendo cloruro de aluminio e hidrogeno gaseoso como se muestra a continuación:



Posteriormente, el hidrogeno producido interactúa con los oxígenos presentes en los grupos funcionales de la estructura del OG para formar láminas de OGr y agua como producto secundario en un proceso isotérmico que sigue el siguiente camino:



Habiendo evidencia de que el Al funciona sólo como catalizador siendo necesario en la generación de hidrogeno, dando paso a la reducción del OG y por ende, que la producción de OGr se lleven a cabo. De manera similar al mecanismo de reducción

del Al, el Zn reacciona con el ácido formando hidrogeno gaseoso y cloruro de zinc, donde el hidrogeno reacciona con el OG formando OGr y agua (Agarwal y Zetterlund, 2021).

- Solventes orgánicos

Algunos solventes como la dimetilformamida (DMF), alcoholes como metanol (MeOH), etanol (EtOH), isopropanol (iPrOH), alcohol bencílico (BnOH) y agua han sido utilizados en la síntesis del OGr. La reducción empleando DMF inicia con la dispersión del OG en el solvente mediante ultrasonido a 153 °C durante 1 h, donde el DMF se descompone formando dimetilamina y CO, siendo este último un agente reductor fuerte, elimina el oxígeno presente en la superficie del OG, dando como resultado la formación de una dispersión coloidal estable de OGr (Agarwal y Zetterlund, 2021).

- Compuestos sódicos

Según Agarwal y Zetterlund (2021) diferentes agentes reductores con base sódica como el borohidruro de sodio, hipofosfito de sodio monohidratado, colato de Sodio, citrato de sodio, sodio tetraborato decahidrato, bisulfito de sodio y sulfuro de sodio se han utilizado para la síntesis de OGr a partir de OG. El mecanismo de reducción propuesto mediante el cual se utiliza borohidruro de sodio junto con partículas de plata (AgNP) el cual actúa como catalizador para la reducción de OG, a temperatura ambiente sufre una hidrólisis espontánea para formar  $BH_3OH$ , que se oxida fácilmente en la superficie de las AgNP y conduce a la transferencia del exceso de electrones de las AgNP al OG iniciando su reducción para la obtener OGr, el cual exhibirá una conductividad eléctrica entre un rango de  $10 - 1500 S m^{-1}$  dependiendo del tiempo de reducción.

- Ácido ascórbico (AA)

El AA es uno de los agentes reductores “verdes” más estudiados empleados en la síntesis de OGr a partir de OG (ver Figura 16), el cual exhibe diversas ventajas asociadas con su empleo como bajos costos, alta eficiencia, que es un compuesto

medioambientalmente amigable, presenta una dispersión estable de AA-OGr en presencia de diversos solventes (agua, DMF, NMP), presenta una biocompatibilidad establecida además de que es fácilmente escalable. Así mismo, cabe señalar que la eficiencia de reducción del AA es dependiente de la dosis administrada para realizar la síntesis del OGr a partir del OG.

El mecanismo de reacción de la reducción del OG mediante el uso de AA se observa en la Figura 17, donde se ha propuesto que el AA se oxida para formar un intermedio oxidativo de ácido deshidroascórbico (DHA) junto con dos protones, dichos protones liberados, exhiben una fuerte afinidad hacia los grupos funcionales oxigenados que se encuentran contenidos en OG, liberando agua como producto secundario y formando un intermedio que posteriormente se somete a eliminación térmica que conduce a la restauración de los enlaces  $C = C$  con hibridación  $sp^2$ , además de que el DHA se oxida irreversiblemente para formar ácido L-gulurónico y ácido oxálico, los cuales forman enlaces de hidrógeno con grupos de ácido carboxílico periféricos en el OG (Agarwal y Zetterlund, 2021).

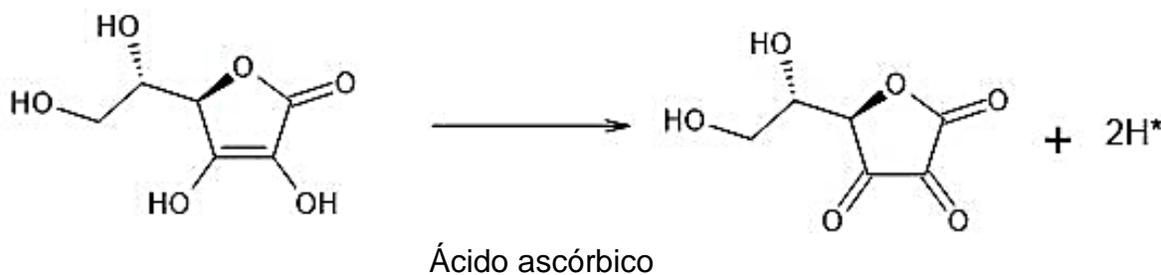


Figura 1.16 Estructura química del AA empleado en la reducción de OG (Agarwal y Zetterlund, 2021).

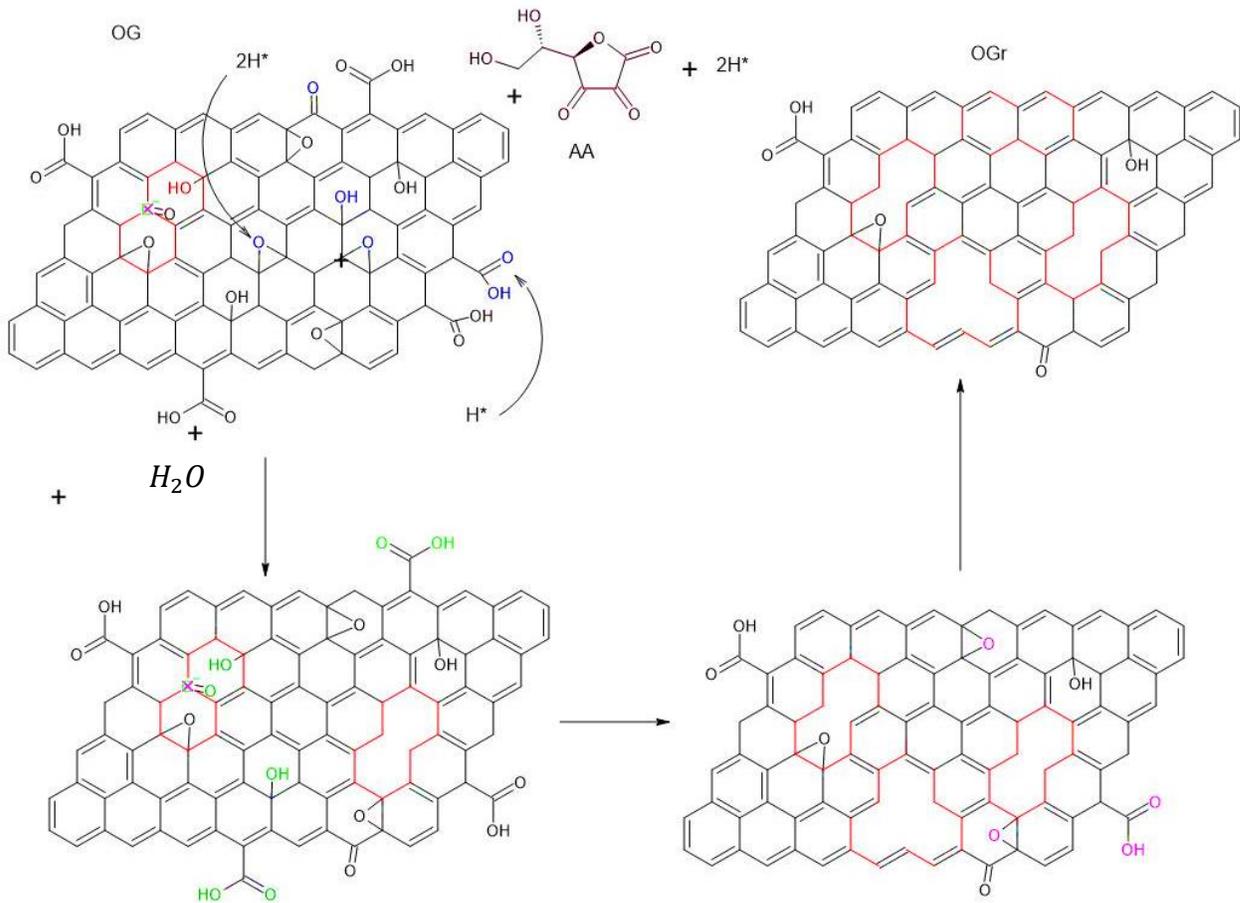


Figura 1.17 Reducción del OG empleando AA como agente reductor (Agarwal y Zetterlund, 2021)

- Extractos de plantas

Los agentes reductores verdes, de acuerdo con Agarwal y Zetterlund (2021) surgen de una búsqueda de agentes ecológicos y sin citotoxicidad alternativos a los agentes reductores tóxicos que son perjudiciales para el medio ambiente y la salud de las personas, dentro de estos agentes surgen los extractos de plantas obtenidos de sus diferentes partes como hojas, frutos, flores y raíces, algunos de estos agentes son los extractos de hojas de eucalipto, té verde, almidón, agua de rosas, jugo de granada, extracto de bagazo de caña, espinacas (*Spinacia oleracea*), ginseng rojo asiático, etc., donde los componentes principales de la mayoría de los extractos se pueden clasificar

en dos grupo principales teniendo en cuenta el tipo de compuestos que son clave para ser empleados como agentes reductores, los cuales son los polifenoles y los flavonoides, siendo un tercer grupo los polisacáridos quienes se encuentran en una proporción menor, dicha clasificación se observa en la siguiente Tabla:

Tabla 1.1 Extractos de plantas: clasificación de agentes reductores

Polifenoles	Flavonoides
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extracto de té verde</li> <li>• Extracto de manzana de roble (ácido tánico)</li> <li>• Extractos de semillas de <i>terminalia chebula</i></li> <li>• Extractos de hojas de <i>mesua ferrea Linn</i></li> <li>• Extractos de hojas de ortiga.</li> <li>• Extractos de cáscara de naranja (<i>Citrus sinensis</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jugo de granada</li> <li>• Extracto de <i>lycium barbarum</i>.</li> <li>• Extracto de crisantemo</li> </ul>

A pesar de la clasificación de acuerdo al compuesto clave que le da su carácter reductor, se tiene evidencia que el mecanismo reductos tanto de los polifenoles como de los flavonoides son muy similares, donde los grupos hidroxilo fenólicos presentes en los polifenoles, reaccionan con los grupos epoxi presentes en la estructura del OG mediante reacciones de apertura de anillo nucleófilo formando grupos hidroxil. El carbono del grupo hidroxilo recién formado en el plano basal del OG actúa reaccionando con otro hidroxilo, dando como resultado la formación moléculas intermedias y agua como subproducto, posteriormente el producto intermedio sufre una reacción de eliminación para formar una estructura  $sp^2$ . Mientras que para el caso de los flavonoides presentes en el extracto de crisantemo, como lo don la diosmetina, luteolina, apigenina y glucósido, cuando se tratan con OG a 95 °C, se oxidan mediante grupos funcionales en los que se encuentra presente oxígeno dando como resultado

productos como la benzoquinona, con iones de hidrógeno liberados como subproducto, que a su vez actúan como catalizadores para promover la deshidratación de OG, resultando en la formación de agua como subproducto y una estructura de carbono con hibridación  $sp^2$  de OGr.

Las principales ventajas de utilizar extractos de plantas como agentes reductores incluyen la estabilidad coloidal prolongada del OGr sintetizado en varios disolventes, incluidos disolventes polares y orgánicos y la biocompatibilidad de OGr. (Agarwal y Zetterlund, 2021)

- Polisacáridos y proteínas naturales

Dentro de los polisacáridos y proteínas naturales que funcionan como agentes reductores se encuentran la L-cisteína, glicina, glucosa, D-fructosa, sacarosa, dextrana, L-glutatió (GSH), albúmina sérica bovina (BSA), dopamina, melatonina (MLT), entre otras, donde a diferencia de otros agentes reductores químicos, estos compuestos naturales como la glucosa presentan una baja eficiencia de reducción de OG, lo que puede mejorarse por medio de la incorporación de aditivos como el amoníaco para aumentar el pH de la reacción o la incorporación de catalizadores como las láminas de hierro (Fe) en la mezcla de reacción dando como resultado la síntesis del OGr y un subproducto que es agua (Agarwal y Zetterlund, 2021).

- Microorganismos

Debido a la buena interacción que existe entre microorganismos y los materiales grafénicos, es posible el empleo de microorganismos capaces de realizar la transferencia de electrones extracelular a receptores de electrones sólidos en la reducción biológica del OG en OGr (Ver Figura 1.18). Dentro de las especies de microorganismos se encuentran las especies de *Shewanella*, *Desulfuromonas*, y *Geobacter*, además los microorganismos de *E. coli* y *P. aeruginosa* las cuales catalizan la síntesis de reducción (Agarwal y Zetterlund, 2021). Destacando la participación de la especie *Shewanella*, esto debido a que ha demostrado una habilidad reductora de

metales, lo cual se ha atribuido a su capacidad para proporcionar mecanismos duales de contacto directo y transferencia de electrones, por lo que es posible la reducción eficaz del OG a OGr tanto en condiciones aerobias como anaerobias, reduciendo principalmente a los grupos de hidroxilo, atribuyendo esto a la mayor energía que presentan los enlaces  $C=O$  en comparación de los enlaces  $C-OH$  (Zhang *et al*, 2019).

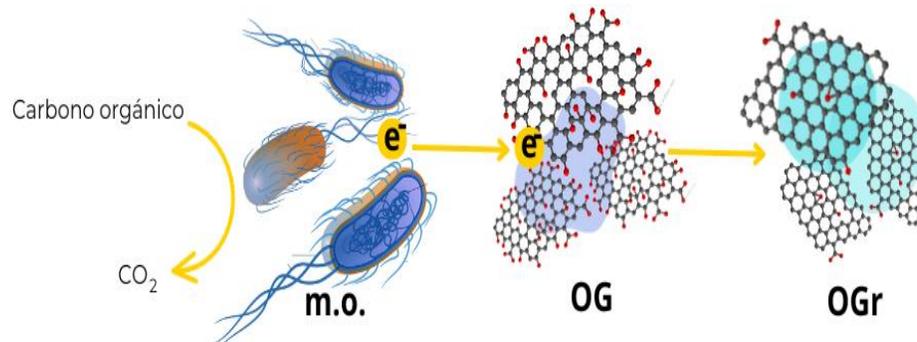


Figura 1.18 Reducción del OG a través del uso de microorganismos

- Fotoreducción

Según lo reportado por Agarwal y Zetterlund, (2021) , la foto reducción del OG es aplicada directamente a través de láseres, plasma o reducción foto térmica, incluso se ha realizado mediante la combinación con un catalizador inorgánico para generar una reducción foto catalítica, o en presencia de moléculas orgánicas como método de reducción fotoquímica, esta técnica requiere de pulsos cortos de foto estímulo de alta energía con la finalidad de inducir un calentamiento localizado en el OG que impulsa la descomposición del grupo funcional que contiene oxígeno, lo que provoca la reducción de OG.

- Laser

El funcionamiento de esta técnica consiste en la inducción de un recocido localizado por efectos de la irradiación láser, con temperaturas que alcanzan los  $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante unos cuantos nanosegundos, y es debido a la alta temperatura la que induce que ocurre la descomposición de los grupos funcionales que contienen oxígeno en la

estructura del OG, lo que da como resultado la formación de OGr. Pudiendo ser utilizado el láser UV e IR que trabajan en las longitudes de onda de 266 nm y 1064 nm respectivamente, habiendo evidencia de que cuando son combinadas, hay una mejor reducción que cuando son utilizadas separadas, siendo esto atribuido a que la reducción fotoquímica bajo irradiación UV mediada por la disminución en el contenido de oxígeno de OG, mientras que la irradiación IR provoca la conversión de carbonos con hibridación  $sp^3$  en carbonos hibridados  $sp^2$  como resultado de la reducción foto térmica (Agarwal y Zetterlund, 2021).

- Plasma

Se ha obtenido evidencia del uso de plasma atmosférico de barrido a 300 W en un tiempo de exposición de 90 segundos para la reducción del OG, presentando nulos efectos foto térmicos a pesar del significativo grado de reducción que alcanzado (Agarwal y Zetterlund, 2021).

- Fotocatálisis

Cuando se habla de la reducción de OG para la obtención de OGr por medio de fotocatálisis se distinguen dos enfoques principales, los cuales han sido explorados en la categoría más amplia de reducción foto catalítica del OG y son el uso de un foto iniciador activado por UV y el uso de nanopartículas inorgánicas foto activables, donde la base de ambos enfoques es la generación de radicales, electrones o pares electrón-vacíos para inducir la reducción de OG (Agarwal y Zetterlund, 2021).

- Reducción térmica

Este método es considerado un método directo de reducción del OG mediante un recocimiento térmico del que se obtiene láminas de Gr que presentan propiedades estructurales y eléctricas muy parecidas a las láminas de grafeno prístino, siendo mayormente empleada cuando para aplicaciones nano eléctricas, prestando principal atención a la temperatura dado que la selección de la temperatura de reducción depende principalmente de la aplicación de uso final de OGr porque se debe mantener

un delicado equilibrio entre el grado de reducción y la descomposición estructural del plano basal de OG al considerar la temperatura de recocido (Agarwal y Zetterlund, 2021). Como se mencionó anteriormente, un indicador de la efectividad del proceso de reducción se ve reflejada en la conductividad térmica, por lo que a continuación en la Tabla 1.2 se presentan las conductividades del OGr sintetizado por las diferentes técnicas.

Tabla 1.2 Conductividad eléctrica del OGr de acuerdo a su método de reducción

Método de reducción	Conductividad eléctrica
Métodos químicos	
Hidrato de hidracina	$2 \times 10^2 \text{ S m}^{-1}$
Catalizadores	$2.1 \times 10^3 \text{ S m}^{-1}$
Solventes orgánicos	~1000 veces más que OG
<i>DMF</i>	$6380 \text{ S m}^{-1}$
<i>BnOH – OGr</i>	$4600 \text{ S m}^{-1}$
<i>iPrOH – OGr</i>	$1019 \text{ S m}^{-1}$
<i>EtOH – OGr</i>	$1.8 \times 10^{-4} \text{ S m}^{-1}$
<i>MeOH – OGr</i>	$3.2 \times 10^{-5} \text{ S m}^{-1}$
Compuestos sódicos	$10 – 1500 \text{ S m}^{-1}$
Ácido ascórbico	$4.13 \times 10^{-7} – 0.28 \text{ S m}^{-1}$
Métodos biológicos	
Rm-OG <i>Shewanella oneidensis</i>	$55.32 \text{ S m}^{-1} – 0.11 \text{ S m}^{-1}$
Foto reducción	
Plasma	
Foto reducción	$3.7 \times 10^3 \text{ S m}^{-1}$
Termo reducción	
Microondas	$1.08 \times 10^{-4} \text{ S m}^{-1}$

## 1.10 Técnicas de caracterización

Los materiales grafénicos pueden ser caracterizados cuantitativamente y cualitativamente por medio de técnicas espectroscópicas y microscópicas como:

### 1.10.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja es una técnica ampliamente utilizada para la caracterización cualitativa en la identificación de grupos funcionales presentes en una muestra, aunque en casos excepcionales cuando otros métodos especializados no son aplicables, puede ser utilizada de forma cuantitativa. Esta técnica se basa en la radiación infrarroja la cual se extiende a la derecha de la región visible en el espectro electromagnético hasta las microondas, es decir, abarca una región desde los 0.75 a 1000  $\mu\text{m}$ , y esta a su vez se divide en tres subregiones: infrarrojo cercano que van desde los 0.75 a 2.5  $\mu\text{m}$ , infrarrojo medio que se extiende desde 2.5 a 25  $\mu\text{m}$  y por último el infrarrojo lejano que comprende de los 25 a los 1000  $\mu\text{m}$ . Siendo el principio de esta técnica espectroscópica la absorción de la radiación infrarroja de una molécula, cambiando el dipolo inverso, donde a su vez la intensidad de los picos en el espectro depende de estos cambios. No obstante, se debe tomar en cuenta que una frecuencia de vibración podría corresponder a más de una molécula. Cabe señalar que se realiza una conversión de la longitud de onda ( $\mu\text{m}$ ) en frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ ), ubicando a los espectros del OG y OGt entre los 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ , comúnmente empleando gránulos de KBr (Kusrini *et al.*, 2019; Trikkalotis *et al.*, 2021)

### 1.10.2 Espectrofotometría UV-Vis (Ultravioleta-Visible)

Conforme a lo documentado por Trikkalotis *et al.*, (2021), la técnica de UV-Vis tiene como base la absorción de radiación electromagnética de los grupos funcionales que se encuentran presentes en el material a analizar o también llamado analito, el cual es registrado entre el rango de 190 y 780 nm, siendo cuantificada por medio de la ley de Beer-Lambert, que a continuación se presenta:

$$A = -\log T = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon * b * c \quad (1.3)$$

Donde:

A= absorción

T= Transmitancia

$I_0$  e  $I$ = intensidad de radiación incidente y existente

$\varepsilon = \text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$ = coeficiente de absorción molar comprendido entre  $1-5 \times 10^5$

b= cm = es la longitud de camino

c= concentración de las especies absorbentes

### 1.10.3 Espectroscopia RAMAN

La espectroscopia RAMAN es una técnica no destructiva, ampliamente utilizada para investigar la estructural y perfección de materiales en base de carbono (Zhang *et al.*, 2019), Sus principales parámetros a evaluar son la posición de pico, ancho total a la mitad del máximo o (FWHM por sus siglas en inglés), relación de intensidad de los picos de las bandas y el total de áreas bajo las curvas RAMAN, cuyo espectro está dividido en dos regiones, la región de efectos de primer orden que comprende de los  $750-2500 \text{ cm}^{-1}$  y la región de efectos de segundo orden comprendida entre  $2500-3100 \text{ cm}^{-1}$  (Santamaría-Juárez *et al.*, 2020)

### 1.10.4 TEM (Microscopia electrónica de transmisión)

La técnica de microscopia electrónica de transmisión es ampliamente utilizada en la obtención de imágenes de alta resolución y la difracción de los materiales analizados, es empleada principalmente en el análisis de la conformación de las estructuras (Zhang *et al.*, 2019).

### 1.10.5 SEM (Microscopia electrónica de barrido)

La microscopia electrónica de barrido es considerada como un método cuantitativo en el análisis morfológico de estructuras y tamaños de nanopartículas por medio de imágenes de las superficies de los analitos (Zhang *et al.*, 2019).

## 1.11 Toxicidad del OGr y generación de biopelículas microbianas

Algunos de los materiales grafénicos incrementan el crecimiento microbiano, actuando como sustrato para la unión y la proliferación celular teniendo funciones específicas en el metabolismo celular. En los digestores anaerobios, los materiales grafénicos pueden ser empleados por distintas especies de microorganismos simultáneamente como donadores y receptores de electrones y por lo tanto funcionando como puentes de electrones para la transferencia de electrones entre especies (Zhang y Tremblay, 2020). Sin embargo, estos materiales presentan diversas propiedades fisicoquímicas, las cuales tienen un impacto en su interacción con los microorganismos y su nivel de toxicidad, siendo descritos a continuación:

### 1.11.1 Hidrofobicidad

De acuerdo con Zhang y Tremblay, (2020) una de las características más importantes que presentan los MG como lo son: G, OG y OGr, están relacionadas a la afinidad a la hidrofobicidad o hidrofiliidad característicos de cada uno de los materiales, la cual, establecerá la interacción que presenten las NP's con la población bacteriana, tal es el caso del G, el cual posee de una superficie hidrofóbica, por otra parte, se considera al óxido de grafeno anfifílico el cual presenta en su superficie una doble afinidad: polar y no polar, siendo la parte polar la que contiene el heteroátomo de oxígeno presente en los grupos funcionales oxigenados dándole el carácter afín al agua o hidrofílica y la parte apolar que es el resultado de una cadena hidrocarbonada, característica del grafeno que le da el carácter hidrofóbico (Sanz Tejedor, s.f.), en cuanto al óxido de grafeno reducido presenta un comportamiento más hidrofóbico que el OG aunque conserva algunas regiones hidrofílicas en su superficie.

Del mismo modo, la hidrofobicidad de las superficies microbianas varía de una especie a otra y son influenciadas por las condiciones medioambientales, sugiriendo que algunas bacterias podrán presentar más afinidad hacia uno de los nanomateriales grafénicos como el OGr, mientras que otras serán más afines con el OG. En el caso de los sistemas bioelectroquímicos, donde se involucran reacciones electroquímicas

que son catalizadas por microorganismos, lo cual permite la extracción de energía de la respiración anaeróbica microbiana, basándose en la capacidad de los microorganismos electrogénicos, de transferir electrones extracelularmente durante la respiración celular, en los que una afinidad bacteriana fuerte por los nanomateriales grafénicos dando como resultado una mejor adhesión a estos, facilitando la transferencia de electrones por lo que se tiene un aumento en el rendimiento general del sistema. Mientras que, por el contrario, para recubrimientos antibacterianos, los nanomateriales grafénicos con una adecuada hidrofobicidad y una baja energía libre de superficie puede impedir la adhesión de células con baja afinidad y prevenir la formación de biopelículas (Zhang y Tremblay, 2020; Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable)

De acuerdo con Zhang y Tremblay, (2020), se ha obtenido evidencia del papel promotor de la transferencia de electrones del OGr entre la bacteria electro activa *Geobacter metallireducens* y el metanógeno *Methanosarcina barkerii* para la producción de metano a partir de  $CO_2$ , a su vez, se demostró que el ajuste del nivel de hidrofiliidad del OGr tiene un impacto importante en las interacciones bacterianas, dando como resultado una adhesión más rápida de *Geobacter metallireducens* al OGr muestra una mayor hidrofiliidad, conduciendo a una transferencia de electrones entre especies mediada por un material conductor más eficiente.

### **1.11.2 Área superficial específica y rugosidad**

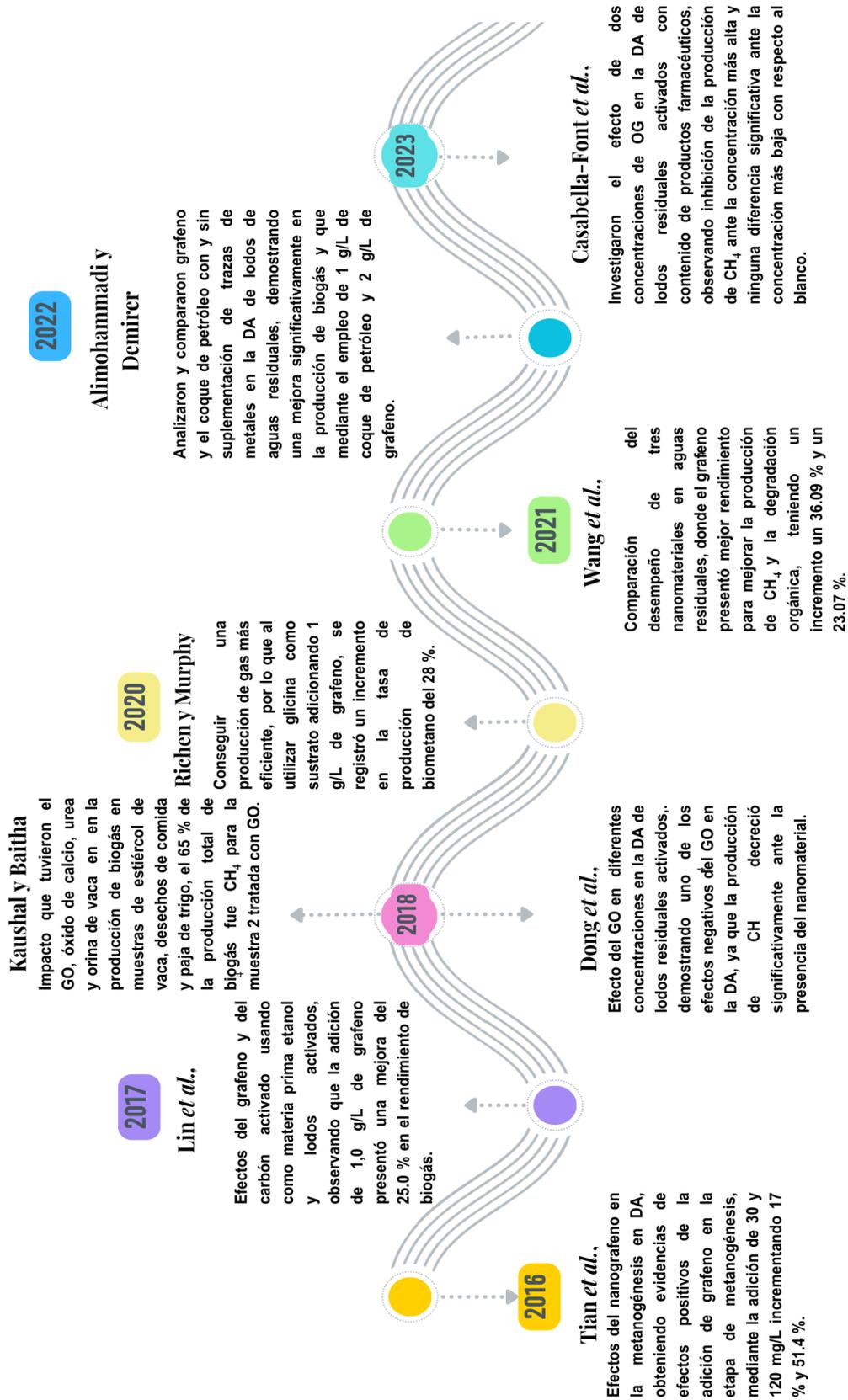
Para los recubrimientos de superficies, los MG que presentan un tamaño de hoja pequeño son asociados a una mayor toxicidad para los microorganismos debido a que presentan una mayor capacidad de alterar la membrana celular de los m.o. y de generar especies de oxígeno reactivas lo que conduce al estrés oxidativo de los microorganismos, la actividad antimicrobiana de las nano láminas de OG de  $0.1 \mu m^2$  recubiertas sobre un filtro, presentó una toxicidad 4 veces mayor en contraste con la presentada por nanoláminas conformadas por el mismo material pero que presentan una mayor área superficial específica, mientras que, dichas hojas en suspensión, OG

con mayor tamaño lateral pueden inhibir el crecimiento bacteriano de manera más eficiente mediante la envoltura celular, de manera temporal y reversible; además, el área superficial específica y rugosidad son otras de las características que presentan cada uno de los materiales grafénicos, los cuales pueden afectar la interacción microbiana y la formación de biopelículas, por lo tanto, a mayor área superficial específica de los MG, comparados con otros materiales, significará más sitios disponibles para la interacción y adhesión microbiana, siendo más adecuadas para la colonización de microorganismos las superficies rugosas que presentan irregularidades en comparación con las superficies lisas, por lo que se puede decir que una mayor área superficial específica y una mayor rugosidad aumentan el número de contacto bacteriano, lo cual puede conducir o al aumento de los efectos antibacteriales o a la formación de biopelículas microbianas dependiendo del contexto. (Zhang y Tremblay, 2020),

### **1.11.3 Dosis**

Según lo reportado por Zhang y Tremblay, (2020), la actividad antimicrobiana o toxicidad de las NP's de los MG es dependiente de la dosis administrada de los mismos, demostrándose mediante el empleo de OG y OGr a concentraciones por debajo de los 25 mg/L donde no se tuvo evidencias de impactos negativos en la viabilidad de los microorganismos patógenos oportunistas como la *Pseudomona aeruginosa*, sin embargo, una reducción en la viabilidad de los microorganismos mayor al 50 % se observó al aumentar la concentración a 100 mg/L de OG y OGr. Mientras tanto, en cuanto a la formación de biopelículas se realizó una medición de su desarrollo conformadas por los microorganismos *E. coli* y *Bacillus subtilis* observando un incremento significativo al suministrar 10 mg  $L^{-1}$  de OG, no obstante, una reducción significativa en su formación fue observada cuando se suministró una concentración de OG superior a los 80 mg  $L^{-1}$  y 160 mg  $L^{-1}$  para *E. coli* y *Bacillus subtilis* respectivamente. Estos resultados sugieren que el efecto de los NMG se puede alternar entre promover o inhibir el crecimiento bacteriano mediante la regulación de la dosis a la que están expuestas las células.

1.12 Antecedentes



## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPITULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 2.1 se muestra el diagrama de la metodología empleada.

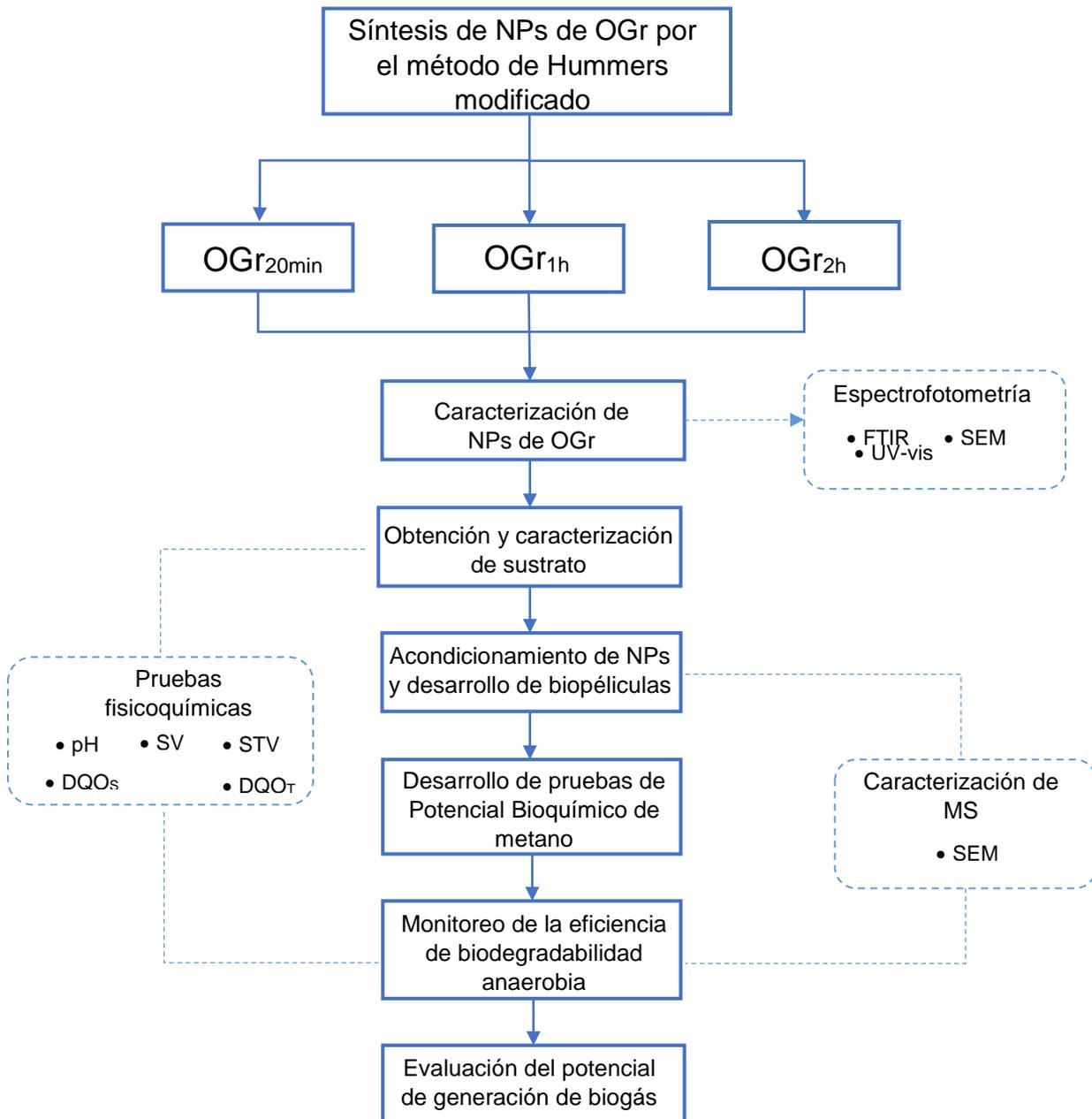


Figura 2.1 Diagrama de la metodología experimental en la evaluación de la adición de OGr como mejorador de la digestión anaerobia.

## 2.1 Síntesis de OGr empleando el método de Hummers modificado

Las nanopartículas de OG se sintetizaron empleando el método de Hummers modificado, el cual se encuentra dentro de la clasificación métodos de reducción-oxidación química perteneciente con el enfoque Top-Down, de acuerdo a lo reportado por De la Luz-Asunción *et al.*, (2015) y que se muestra en la Figura 2.2:

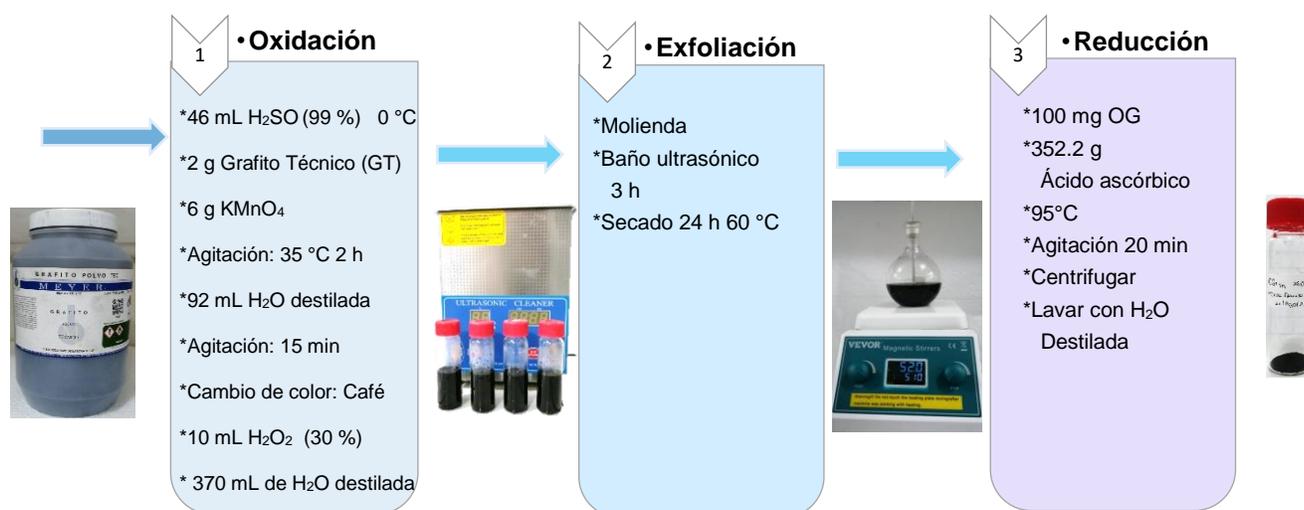


Figura 2.2 Síntesis de OGr por el método de Hummers modificado

### 2.1.1 Oxidación de grafito

Acorde a la metodología prevista, se utilizó grafito de grado técnico (GT) en presentación en polvo (Química Meyer) como materia prima. Se utilizó un matraz de 2000 mL en el cual se agregaron 46 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 99 % Química Meyer), el cual se procedió a enfriar mediante el empleo de un baño de hielo hasta alcanzar una temperatura de 0 °C, posteriormente fueron agregados 2 g de GT y se sometió la mezcla a agitación constante agregando de manera progresiva 6 g de permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>, 99 % Química Meyer), consecutivamente, mediante un baño de agua se calentó la mezcla a 35 °C durante un periodo de tiempo de 2 h con agitación magnética. Una vez alcanzado el tiempo se agregó cuidadosamente 92 mL de agua destilada al matraz que contiene la mezcla

reaccionante y se prosiguió con la agitación por 15 min más hasta que la mezcla presentó una coloración marrón intenso, aumentando la temperatura de manera rápida a 95 °C, consecutivamente se agregó 10 mL de una solución de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ , 30 %) y 270 mL de agua destilada, agitando la solución por un tiempo de 10 min adicional, a continuación fue agregada una solución de ácido clorhídrico ( $HCl$ , 37 %) en un volumen de 270 mL de agua destilada. Mientras que para eliminar las sales residuales de manganeso formadas durante la síntesis y el ácido, la solución se sometió a centrifugación para separar el material del agua ácida y se lavó el precipitado (óxido de grafito) con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro, se vertió en un recipiente plano de cristal y se secó a 60 °C en estufa durante 24 h, una vez que el material estuvo seco se procedió a pulverizarlo, para finalmente pesarlo y almacenarlo en un vial de cristal etiquetado.

### **2.1.2 Exfoliación de grafito**

Para la obtención de OG a partir del og, el cual es el precursor del OGr, fue agregado og en un vial siguiendo una relación de (100 mg/ 10mL) y se exfolió mediante baño de ultrasonido modelo VEVOR JPS-A a una frecuencia de 40 kHz durante 3 h y se secó en estufa durante 24 h a 60 °C.

### **2.1.3 Reducción de óxido de grafeno**

La reducción del OG se realizó acorde a la metodología presentada por De la Luz *et al.*, (2015), agregando 100 mg de OG y 90 mL de agua destilada en un matraz, llevando la mezcla a 95 °C y agregando 352.2 mg de AA permaneciendo en agitación constante para lograr la eliminación de la oxigenación del OG. Para obtener los tres grados de reducción, uno de los matraces de mantuvo a 95 °C después de agregado el AA durante 20 min dando como resultado la primera reducción denominada OGr<sub>20min</sub>, para la obtención del segundo y tercer grado de reducción se siguió el mismo procedimiento con la excepción del tiempo de reducción manteniendo la reacción a 95 °C durante 1 h y 2 h para obtener el OGr<sub>1h</sub> y OGr<sub>2h</sub>, el resultante de cada reducción se lavó con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro y se agregó el contenido de cada vial a

un vaso de precipitado diferente, se secaron a 65 °C en estufa durante 24 h y se pulverizaron en mortero para después agregarlos en viales etiquetados separados.

## 2.2 Caracterización de OGr

Los tres materiales de OGr que se obtuvieron fueron caracterizados mediante las técnicas enlistadas en la Tabla 2.1 de las cuales, la técnica de FTIR utilizada para el análisis de la presencia/ausencia de grupos funcionales oxigenados en las láminas de OGr obtenidas, donde el escaneo fue realizado en la longitud de onda entre 400  $\text{cm}^{-1}$  - 4000  $\text{cm}^{-1}$ , fue llevada a cabo en colaboración del TecNM/ Instituto Tecnológico de Querétaro.

Tabla 2.1 Técnicas espectroscópicas y microscópicas de caracterización de OGr

Técnica de caracterización	Equipo
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier Espectrómetro FT-IR Bruker Vector 33 (1 $\text{cm}^{-1}$ ) modo de reflexión total atenuada
SEM	Microscopia electrónica de barrido Nova Nano SEM 200 FEI, operado a 8 KV y a una distancia de trabajo de 5 mm
Uv-vis	Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS) UV-Vis spectro-photometer Hach/ longitud de onda: 538 nm

## 2.3 Obtención, adecuación y caracterización del sustrato

### 2.3.1 Obtención de residuos orgánicos

El sustrato empleado en el presente proyecto se obtuvo mediante la recolección de residuos de alimentos provenientes del mercado Zapata, el cual se encuentra ubicado en la colonia zapata (Figura 2.3) a un costado del Instituto Tecnológico de Orizaba, dichos residuos consistieron en los residuos de frutas y de verduras, principalmente residuos de jitomate, lechuga y naranja.

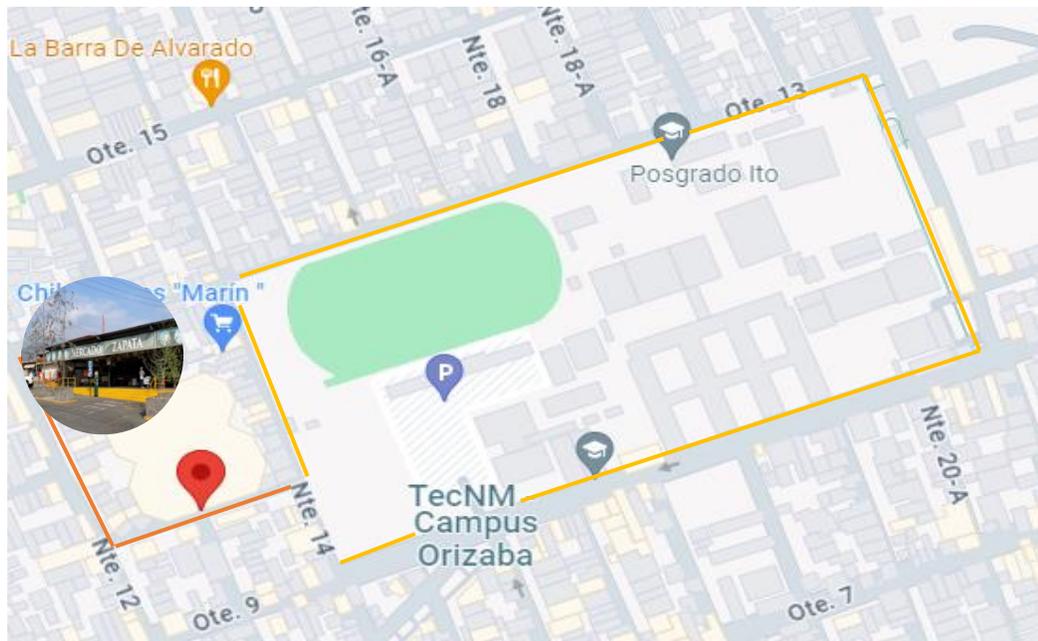


Figura 2.3 Ubicación del punto de recolección.

### 2.3.2 Acondicionamiento del sustrato

Se realizó el acondicionamiento del sustrato consistente en frutas y verduras por medio de reducción de tamaño manual, seguido de una etapa de molienda, para ser posteriormente sometido a la centrifugación de los residuos colectados y posteriormente se procedió a su filtración.

### 2.3.3 Caracterización fisicoquímica del sustrato

Una vez realizada la adecuación del sustrato, se realizó su caracterización mediante técnicas analíticas que se llevaron a cabo en el laboratorio de Ambiental I, con el fin de obtener información de los parámetros fisicoquímicos que presenta la muestra.

- Determinación de pH

Se determinó el pH del sustrato de acuerdo a lo establecido en el método potenciométrico 4500-H+ B de Standard Methods cuyo nombre oficial es "Valor de pH en aguas por potenciometría utilizando un electrodo de hidrogeno estándar", mediante

el uso del potenciómetro marca OAKTON modelo pH 700, con fundamento de la determinación de la actividad del ion hidrógeno por medio de la medición potenciométrica utilizando un electrodo de hidrogeno estándar y un electrodo de referencia.

- Determinación de Sólidos Totales Volátiles (STV) y Sólidos Totales (ST)

Se realizó la determinación de SVT y ST a una muestra de sustrato de frutas y verduras para su caracterización de acuerdo a lo descrito en el método gravimétrico 2540 G de Standar Methods para determinar sólidos totales, fijos y volátiles en muestras sólidas y semisólidas. La determinación de porcentajes de remoción de STV y ST en la etapa de monitoreo de eficiencias de degradabilidad anaerobia se realizó mediante lo puntualizado en la norma NMX-AA-034-SCFI-2001, como se observa en la Tabla 2.2

Tabla 2.2 Método gravimétrico para la determinación de ST y STV

Método gravimétrico 2540 G SM		
Sólidos Totales	$\%ST = \frac{A - B}{C - B} * 100$	( 2.1 )
Sólidos Totales Volátiles	$\%STV = \frac{A - D}{C - B} * 100$	( 2.2 )

A = Peso muestra seca + peso de crisol peso constante (g)  
 B = Peso de crisol a peso constante (g)  
 C = Peso muestra húmeda + peso de crisol (g)  
 D = Peso muestra calcinada + peso de crisol (g)

- Determinación de DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub>

Para determinar la Demanda Química de Oxígeno (DQO), en el cual se mide la cantidad de materia orgánica que se encuentra presente en muestras líquidas, se empleó del método estándar 5220 D de Standar Methods, cuyo nombre oficial se presenta como “Reflujo cerrado, método colorimétrico”, en donde se utilizó una placa digestora y el fotómetro COD A-7325 marca CHEMetrics (high range) que se

encuentran disponibles en el laboratorio de ambiental I, para esto, se hizo empleo de la siguiente formula:

$$DQO = \frac{\text{Lectura de fotometro} * FD}{1000} = DQO \text{ g/L} \quad ( 2.3 )$$

Donde:

FD = factor de dilución (mL)

## **2.4 Acondicionamiento de NPs**

### **2.4.1 Acondicionamiento e incorporación de nanomateriales (OGr)**

Para el acondicionamiento e incorporación del OGr<sub>20min</sub>, OGr<sub>1h</sub> y OGr<sub>2h</sub> obtenidos, se realizó el depósito de los nanomateriales según su grado de reducción en matrices sintéticas poliméricas comerciales (3M) utilizadas como material de soporte para el OGr y la biopelícula anaerobia; las cuales fueron recortarlas cuidadosamente estandarizando sus medidas a 1 cm de ancho por 5 cm de longitud, posteriormente fueron pesadas, identificadas cada una y llevadas a peso constante a una temperatura de 60 °C durante 24 h en estufa, para finalmente ser pesadas y guardadas en bolsas herméticas antes de utilizarlas.

Por otra parte, se estableció una concentración de 30 mg de OGr / 30 mL de agua destilada para la impregnación del material de soporte, por lo que se tomó 30 mg de OGr y se depositaron en un vial de vidrio identificado para cada material agregando 30 mL de agua destilada y se sónico durante 15 min por medio del baño ultrasónico modelo VEVOR JPS-A permitiendo la dispersión e impregnación de las nanopartículas, transcurrido el tiempo cada uno fue retirado, pesado e ingresado a la estufa para eliminar la humedad a una temperatura de 60 °C durante 24 horas, finalmente, cada ms impregnado fue pesado y almacenado individualmente en bolsas herméticas. Para comprobar la dispersión y adherencia de los nanomateriales de OGr,

se realizó una caracterización por medio de la técnica espectroscópica FTIR (Ver el proceso descrito en la Figura 2.4).

## 2.5 Desarrollo de biopelícula

El desarrollo de biopelícula se llevó a cabo en las matrices sintéticas previamente impregnadas con los nanomateriales de OGr como una adaptación a lo realizado por Solano De La Cruz, (2020), las cuales se utilizaron como material de soporte, siendo necesario denotar dos etapas en el desarrollo de la biopelícula bacteriana denominando a la primera como: “Etapa de acondicionamiento del reactor anaerobio” en el cual su objetivo principal fue reunir todos los elementos necesarios para iniciar las operaciones en el reactor de inoculación del material de soporte impregnado y que comprendió: del acondicionamiento del reactor anaerobio de inoculación del material de soporte impregnado (RAI), el montaje de los materiales de soporte impregnados para poder inocularse y desarrollar una biopelícula en cada MS y la obtención del inóculo.

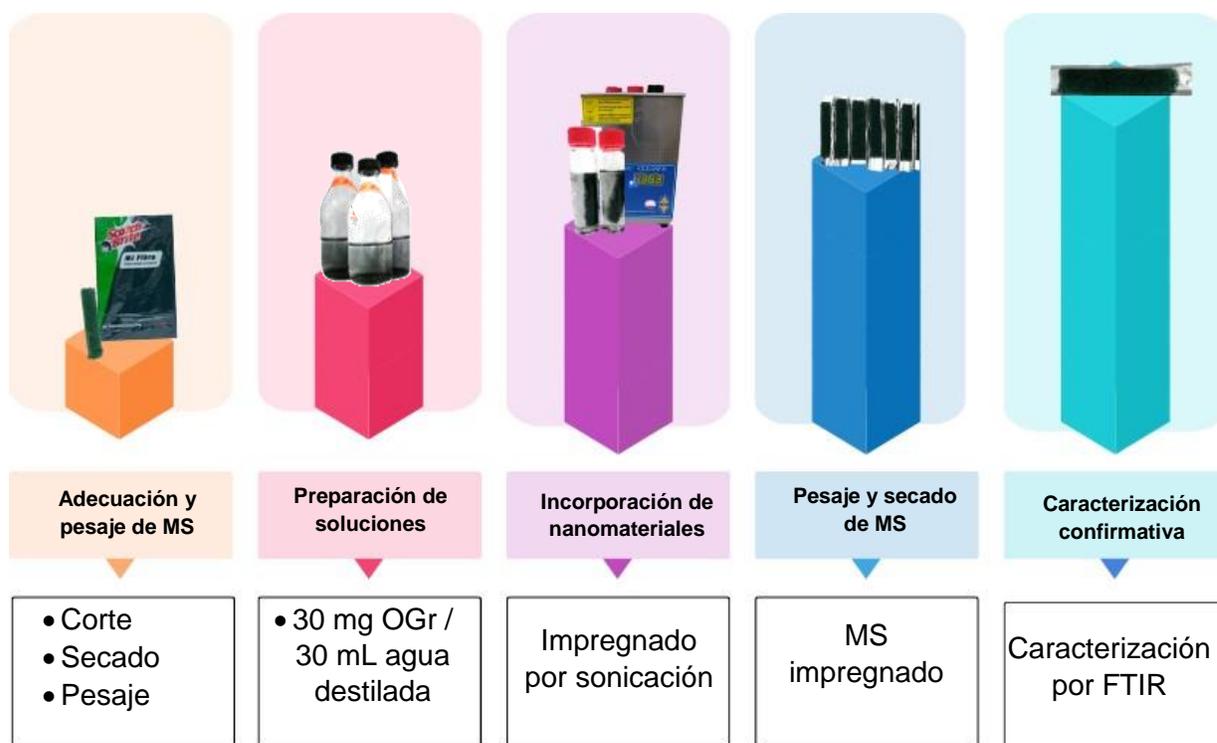
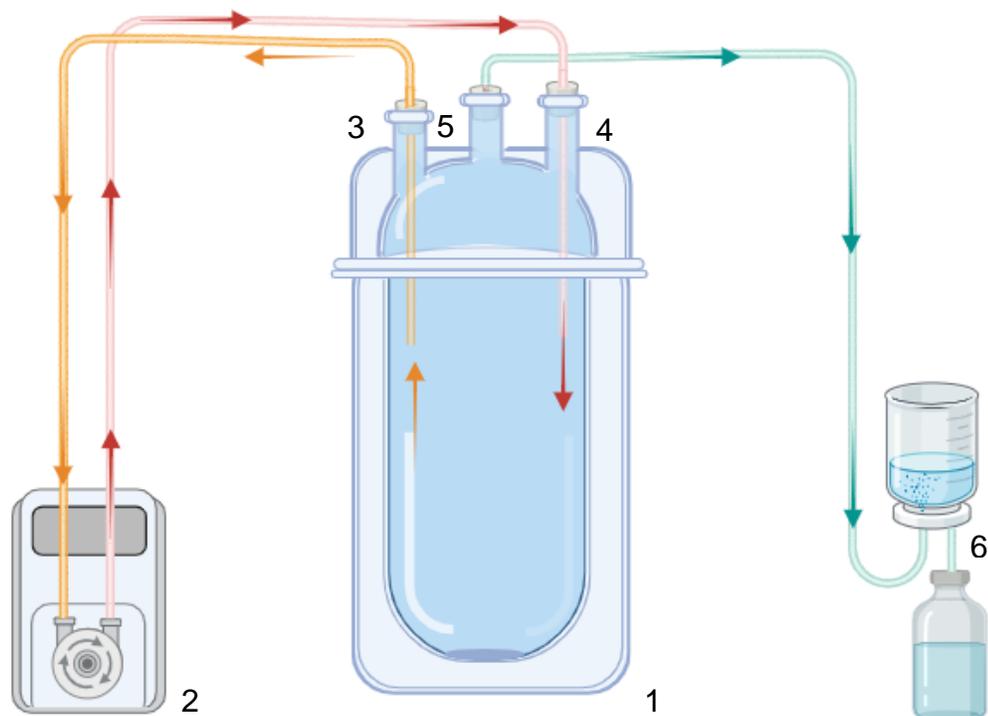


Figura 2.4 Acondicionamiento e incorporación de nanomateriales (OGr)

### 2.5.1 Etapa de acondicionamiento del reactor anaerobio

- Acondicionamiento del Reactor Anaerobio para inoculación del material de soporte

Se empleó un reactor de vidrio el cual tiene una tapa de tres bocas, dos de ellas fueron adaptadas para la entrada de alimentación y salida de efluente conectadas por medio de mangueras a una bomba peristáltica con una potencia de 12 W y un motor de 12 V marca KAMOER, mientras que la tercera boca se adaptó para la salida y recolección de biogás (Figura 2.5).



- 1 Reactor anaerobio de inoculación
- 2 Bomba peristáltica de Alimentación/recirculación
- 3 Línea de salida de efluente
- 4 Línea de entrada de alimentación
- 5 Línea de salida de biogás
- 6 Sistema de captación de metano

Figura 2.5 Acondicionamiento de reactor anaerobio de inoculación.

- Montaje de material de soporte impregnado

Por medio de una estructura de soporte de acero inoxidable fueron colgados e identificados ganchos por un sistema de cintas de colores, donde se colocaron los MS identificados como FI<sub>20</sub>, FI<sub>1</sub> y FI<sub>2</sub>, para los MS Impregnadas con OGr 20 min, OGr 1h y OGr 2 h respectivamente, así como una MS blanco que consistió en una matriz polimérica sintética sin material grafénico, posteriormente la estructura con los MS fue introducida al reactor (Figura 2.6) para el desarrollo de una biopelícula en cada una de ellas.

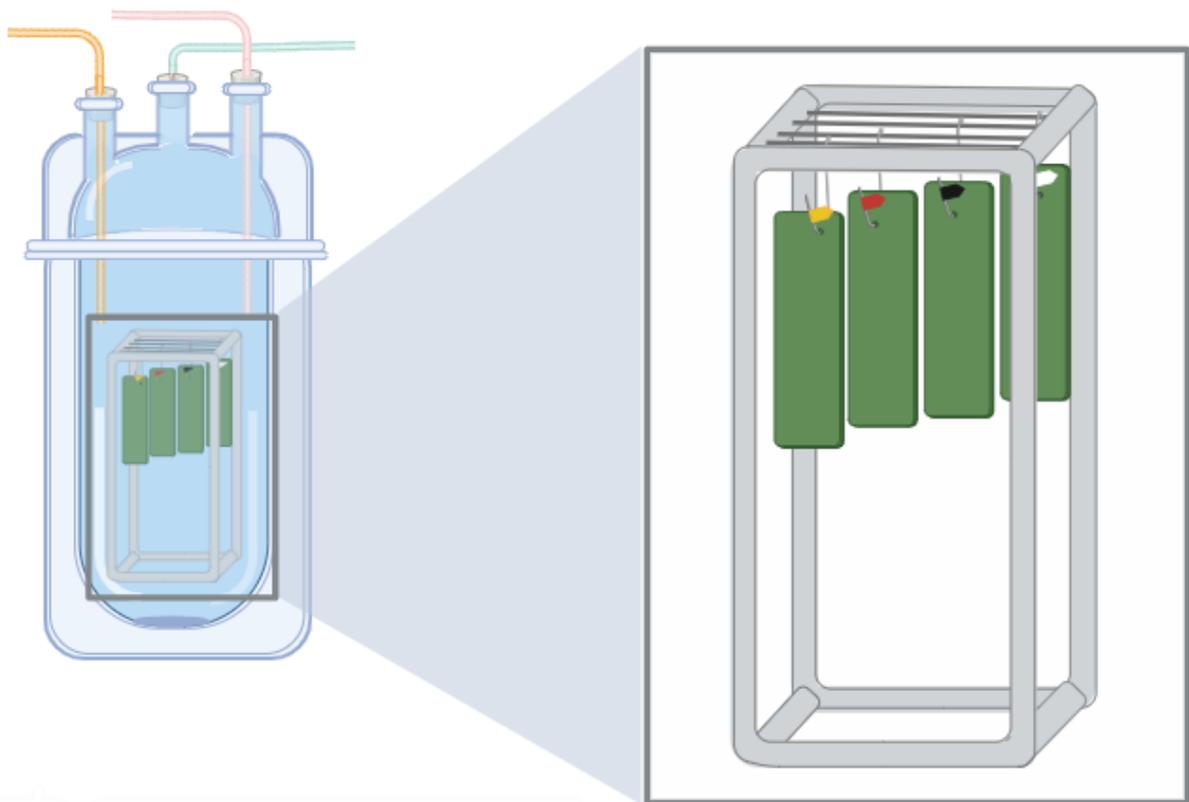


Figura 2.6 Montaje de MS impregnados

- Obtención y adecuación de inóculo

El inóculo se obtuvo del efluente de un reactor a escala piloto de lecho fijo que cuenta con un volumen de 1000 L (Figura 2.7), mantenido a temperatura ambiente y que es

alimentado con un sustrato de frutas y verduras provenientes del mercado Emiliano Zapata, estando ubicado en el laboratorio ambiental de plantas piloto dentro de las instalaciones del Instituto Tecnológico de Orizaba en la ciudad de Orizaba, Veracruz cuya temperatura ambiente media anual es de 23°C. Posteriormente el inóculo fue conducido al laboratorio de ambiental para su incubación en condiciones mesofílicas y monitoreado su producción de biogás, además de haber sido caracterizado mediante pH, DQO<sub>T</sub> DQO<sub>S</sub>, ST y STV antes de emplearse.

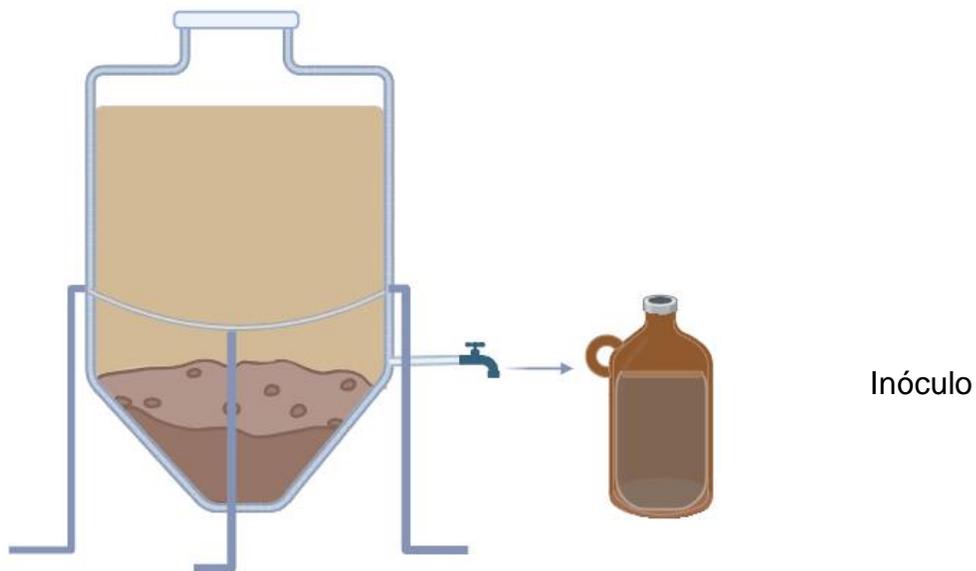


Figura 2.7 Obtención de inóculo

### 2.5.2 Etapa de operación del reactor anaerobio

- Operación de reactor anaerobio de inoculación (RAIFI)

Posterior al montaje del material de soporte dentro del reactor, fueron agregados 100 mL de inóculo, así como 1400 mL de sustrato de frutas y verduras a pH neutro previamente caracterizado por medio de pH, DQO<sub>T</sub> DQO<sub>S</sub>, ST y STV, determinando una alimentación con una concentración de carga orgánica de 5 g/L DQO<sub>T</sub>, siendo operado al 75 % de su volumen dejando un espacio de cabeza del 25 %. El reactor fue operado en modo batch bajo las condiciones de operación mostradas en la Tabla 2.3

Tabla 2.3 Condiciones generales de operación del RAIFI

Alimentación		TRH	Recirculación		Descarga de efluente	
DQO <sub>T</sub>	pH		Frecuencia	Tiempo	Frecuencia	Cantidad [mL]
5 g	7	24 h	Diaria	30 min	Diaria	700-750

En el proceso de desarrollo de biopelícula se identificaron tres fases:

- Fase I Arranque y Estabilización

La primera fase en el desarrollo de la biopelícula se denominó fase de adaptación en donde fueron agregados al RIFI 100 mL de inóculo y sustrato caracterizado hasta completar el volumen total útil de 1500 mL del reactor en el que previamente se había colocado en su interior el soporte con el MS como se muestra en la Figura 2.8.

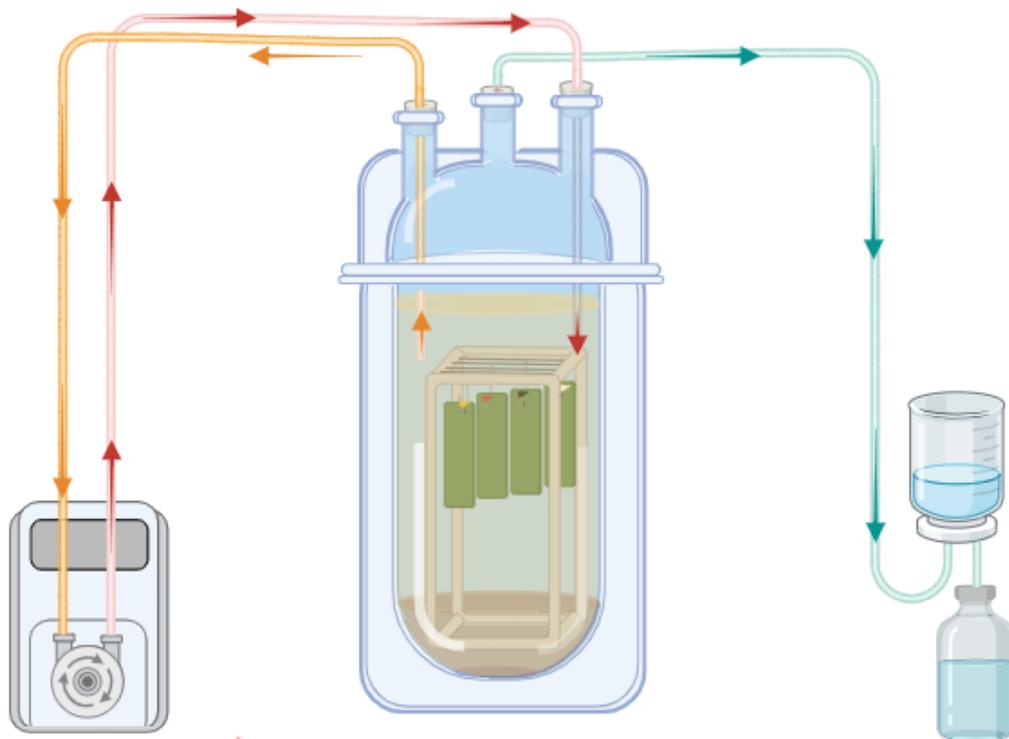


Figura 2.8 Fase I Adaptación, estabilización y crecimiento de microorganismos

En la Tabla 2.4 se muestran los parámetros de operación del RAIFI durante la Fase I, siendo el fin de la extensión de dicha fase cuando el reactor presentó una remoción del 80 % ( $\pm$  5 %) en el monitoreo de  $DQO_T$ .

Tabla 2.4 Condiciones de operación en la Fase I del RAIFI

Alimentación		TRH	Recirculación		Descarga de efluente	
DQO	pH		Frecuencia	Tiempo	Frecuencia	Cantidad [mL]
5 g	7	24 h	Diaria	30 min	Diaria	700

- Fase II Adaptación y crecimiento de biopelícula

La fase II, se inició una vez que en el RAIFI se presentaron remociones de  $DQO_T$  cercanas al 80 %, por lo que fue retirado el sustrato con el inóculo, se dejó sedimentar durante 24 h en condiciones anaerobias, posteriormente se retiró el sustrato y cuantificó la biomasa (inóculo) para conocer la generación de esta y la proporción, siendo un buen indicativo del desarrollo de biopelícula; una vez realizada la cuantificación se tomó la mitad y se regresó al reactor RAIFI para posteriormente alimentar con el resto de los 1500 mL con sustrato, se dejó reposar durante dos días en los cuales sólo se le realizó recirculación durante 30 min cada día, pasado este tiempo se volvió a alimentar y se siguió con el monitoreo de  $DQO_T$ ,  $DQO_s$ , STV, ST y pH hasta que se presentaron remociones de  $DQO_T$  mayores al 50 % como indicativo de su estabilización y buen funcionamiento de la DA. Esta fase tuvo como propósito monitorear si aún con la mitad de la biomasa presente más la formación de biopelícula en cada uno de los MS, seguía presentando una buena degradación de materia orgánica, lo cual fue un indicador del desarrollo de biopelícula en los MS.

- Fase III Obtención de biopelículas y monitoreo de actividad

Al entrar a la última fase, se realizó la remoción completa de la biomasa presente en el RAIFI que no estuviera adherida al MS, es decir que se encontrara principalmente

en el fondo del reactor, y al igual que en la Fase II, esta fue sedimentada y cuantificada para observar si existió aumento / decremento o en su defecto permanencia de la cantidad de biomasa presente en el reactor durante la segunda fase, una vez retirada la biomasa se adicionó 1500 mL de sustrato, equívalete a la totalidad del volumen útil de RAIFI. El objetivo de la tercera fase fue la comprobación de la generación de la biopélicula en el MS y el rol que tienen en la cantidad de materia orgánica degradada sólo y únicamente por acción de la biopélicula generada en el MS impregnadas de material grafénico para poder concluir que efectivamente se obtuvo una biopélicula en el ms y que están degradando materia orgánica, siendo crucial el monitoreo y estabilización del pH, carga orgánica presente en la alimentación, mezcla y salida del reactor, presentándose las condiciones de operación de esta fase en la Tabla 2.5

Tabla 2.5 Condiciones de operación en la Fase II del RAIFI

Alimentación		TRH	Recirculación		Descarga de efluente	
DQO	pH		Frecuencia	Tiempo	Frecuencia	Cantidad [mL]
5 g	7	24 h	Diaria	30 min	Diaria	750 mL

- Análisis y monitoreo

Se realizó un seguimiento del análisis de  $DQO_T$  y  $DQO_S$ , pH, ST y STV a la alimentación del reactor en el día 1 y posteriormente a partir del día 10, así como al efluente del reactor para analizar las remociones de la concentración de carga orgánica por medio de la siguiente ecuación como un indicador del buen funcionamiento del proceso.

$$\% \text{ Remoción } DQO = \frac{DQO_{\text{entrada}} - DQO_{\text{salida}}}{DQO_{\text{entrada}}} * 100 \quad ( 2.4 )$$

### 2.4.2 Caracterización de biopelículas obtenidas

Posterior a los 30 días, 1 MS representativo de cada material impregnado y uno blanco previamente inoculados fueron extraídos del RAIFI y caracterizados por medio de SEM, además de realizarles ST y STV.

### 2.6 Pruebas de Potencial Bioquímico de Metano (PBM)

Las PBM se realizaron por triplicado mediante una adaptación a lo establecido por Holliger *et al.*, (2016,2021) en donde fueron empleadas botellas de suero de 125 mL con un volumen útil de trabajo de 75 mL y 50 mL de espacio de cabeza, utilizando como sustrato fracción líquida de residuos de frutas y verduras previamente caracterizado a una concentración de 5 g de DQO/L y llevado a un pH neutro de 7.12 para todos los casos, valor perteneciente al rango de pH óptimo para una alta tasa de rendimientos de recuperación de metano que va desde pH de 6 a 7.5 según lo reportado por Zamri *et al.*, (2021); posteriormente se agregó a cada botella un MS impregnado e inoculada correspondiente a cada material grafénico (Figura 2.9), en el caso de la prueba blanco se ingresó un MS inoculado sin impregnar y se procedió a cerrar las botellas herméticamente empleando tapones de caucho butílico y cinchos de aluminio, así como a realizar una purga de oxígeno al espacio de cabeza mediante el uso de nitrógeno gaseoso al 99 % por un periodo de 1 min en cada botella.

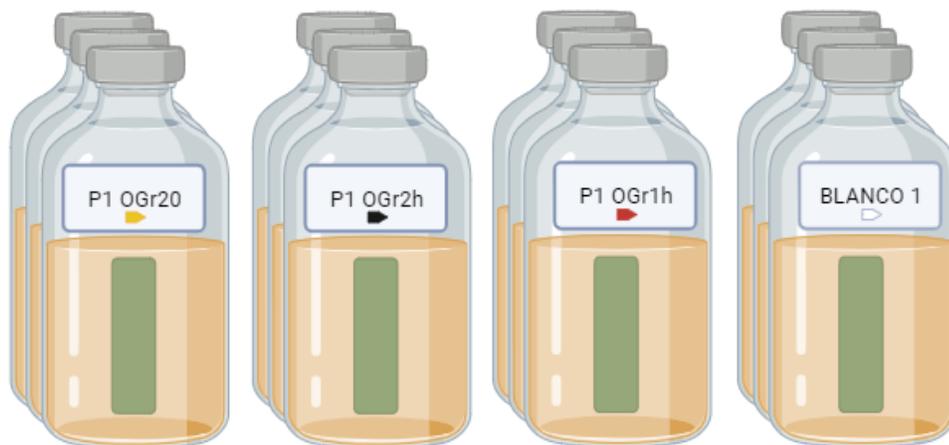


Figura 2.9 Pruebas de PBM

Las botellas en donde se realizaron las PBM fueron incubadas a una temperatura de  $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  (Figura 2.10), se realizó agitación manual diaria por un periodo de 1 min, las condiciones de trabajo se muestran en la Tabla 2.5 terminando el experimento cuando la producción diaria de metano fue menor al 1 % de volumen de metano acumulado durante tres días consecutivos, expresándose como volumen de gas metano seco bajo condiciones estándar por g de DQO<sub>T</sub> añadidos.



Figura 2.10 Pruebas de PBM de los OGr

## 2.7 Monitoreo de la eficiencia de biodegradabilidad anaerobia

El monitoreo de la eficiencia de biodegradabilidad anaerobia se realizó por medio de un sistema de desplazamiento de líquido, realizando un monitoreo del volumen de producción de biogás en intervalos regulares en días alternados 1-1 bajo las condiciones especificadas en la Tabla 2.6, mediante el empleo de jeringas de vidrio con válvula de cierre incluida y sistema Luer-Lock con capacidad de 60 mL, el gas extraído se hizo burbujear en una solución de NaOH al 3 % con fenolftaleína como indicador para verificar la presencia de NaOH y lograr remover el CO<sub>2</sub> por medio del NaOH con la formación de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) presente en el biogás y medir sólo el biometano.

Tabla 2.6 Condiciones de operación de las PBM

Alimentación			Temperatura	Agitación		Monitoreo	
DQO <sub>T</sub>	pH	Volumen	de incubación	Frecuencia	Tiempo	Frecuencia	Sistema
5 g	7.12	75 mL	35 °C ± 2 °C	Diaria	60 s	Regular 1-1 día	Desplazamiento NaOH

## 2.8 Evaluación del Potencial de Producción de Biogás experimental

Se realizaron cálculos para la medición manométrica del biogás a partir de los datos experimentales obtenidos de las PBM con la finalidad de poder evaluar el Potencial de producción de Biogás por medio de las ecuaciones descritas en el trabajo de Hafner *et al*, (2020), presentadas a continuación.

Cálculo para la estandarización de la producción de Metano

$$V_{std} = V_{meas} * \frac{(P_{meas} * P_{H_2O})}{101.325 \text{ kPa}} * \frac{273.15 \text{ K}}{(T_{meas} + 273.15)} \quad (2.5)$$

Donde

$V_{std}$	Volumen de biogás estandarizado	
$V_{meas}$	Volumen de biogás medido	
$P_{meas}$	Presión de gas	kPa
$P_{H_2O}$	Presión parcial de vapor de agua	kPa
$T_{meas}$	Temperatura al momento de la medición	° C
273.15	Temperatura estándar (0 ° C)	K
101.325	Presión estándar	kPa

Se realizó el cálculo de la presión de vapor de agua a temperatura medida para obtener la producción de biogás seco, el cual para biogás se asume que la presión de vapor es la presión de saturación de vapor debido a que se espera que el biogás esté cerca del equilibrio con la fase acuosa por medio de la ecuación de Magnus

$$p_{H_2O} = 0.61094 e^{\left(\frac{17.625 * T_{meas}}{243.04 + T_{meas}}\right)} \quad (2.6)$$

Donde

$P_{H_2O}$	Presión parcial de vapor de agua	kPa
$T_{meas}$	Temperatura al momento de la medición	° C
0.61094	Factor constante para la conversión PH <sub>2</sub> O en kPa	
17.625	Constante empírica de la fórmula de Magnus	
243.04	Constante empírica de la fórmula de Magnus	

Cálculo de la producción de CH<sub>4</sub> por medio del método 1 presentado por Hafner *et al.*, (2020).

$$x_{CH_4,n} = \frac{x_{CH_4}}{x_{CH_4} + x_{CO_2}} \quad (2.7)$$

Calculo del potencial bioquímico de metano experimental

$$PBM = \frac{V_{CH_4}}{g SV} \quad (2.8)$$

Calculo del porcentaje de biodegradabilidad experimental

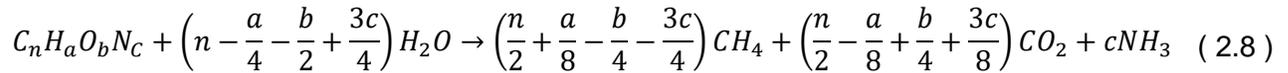
$$BD_{EXP COD(\%)} = \left( \frac{(DQO_0 - DQO_F)}{COD_0} \right) * 100 \quad (2.9)$$

El PBM del sustrato de frutas y verduras agregado el material de soporte impregnado con los nanomateriales, así como el control Blanco fue calculado mediante la fórmula a continuación. La evaluación del Potencial de Producción de Biogás se llevó a cabo por medio del método teórico, siendo determinado mediante el conocimiento de la composición elemental, química o la DQO del sustrato, en donde se asumió que el sustrato fue completamente degradado.

## 2.9 Determinación de PBM teórico mediante composición elemental

El Potencial teórico de Producción de metano basado en la composición química puede ser obtenido a partir de la composición elemental del sustrato (C, H, O, N)

calculado mediante el empleo de la ecuación de Symons y Buswell como describen Bres *et al.*, (2022) y Cárdenas-Cleves *et al.*, (2016).



Donde:

$n$	Número de moles de carbono
$a$	Número de moles de hidrógeno
$b$	Número de moles de oxígeno
$c$	Número de moles de nitrógeno

Posteriormente se procedió al cálculo del PBM teórico a partir de datos obtenidos del análisis elemental por medio de la ecuación de Boyle (2.9) mostrada a continuación:

$$PBMT (mL CH_4 gVS^{-1}) = \frac{\left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4} - \frac{3c}{8}\right) * 22.4 * 1000}{(12n + a + 16b + 14c)} \quad (2.9)$$

Donde

22.4	Volumen de 1 mol de gas ideal a condiciones std
1000	Factor de conversión del volumen de L a mL
$12 + 1 + 16 + 14$	Pesos moleculares de elementos que conforman la masa molar del sustrato.

## 2.10 Determinación de PBM teórico mediante análisis de DQO

Se realizó el cálculo del PBM teórico a partir de los datos de DQO fijados en las pruebas experimentales (5 gr/L) haciendo empleo de las ecuaciones 2.10 y 2.11 (Yasim y Buyong., 2023).

$$n_{CH_4} = \frac{DQO}{64 (g/mol)} \quad (2.10)$$

$$PBM_{TDQO} = \frac{n_{CH_4}RT}{p SV_{agregados}} \quad (2.11)$$

Donde

$n_{CH_4}$	Cantidad de metano molecular	mol
$R$	Constante de gas ideal	atm L/ mol K
$T$	Temperatura de la botella de vidrio	K
$p$	Presión atmosférica	atm
$SV_{agregados}$	Sólidos volátiles agregados	g

Posteriormente se realizó el cálculo del porcentaje del índice de biodegradabilidad (% IBD) mediante la ecuación 2.12 presentada a continuación, la cual está indicada por los rendimientos de CH<sub>4</sub>.

$$\% \text{ error} = \frac{PBM_{exp} - PBM_{teórico}}{PBM_{exp}} * 100 \quad (2.13)$$

$$\% \text{ IBD} = \frac{PBM_{exp}}{PBM_{Teórico}} * 100 \quad (2.12)$$

Finalmente, se realizó el cálculo del porcentaje de error la diferencia entre la producción experimental de la biodegradabilidad y la producción experimental teórica mediante la siguiente ecuación:

## **CAPÍTULO 3**

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPITULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Síntesis de OGr empleando el método de Hummers modificado

#### 3.1.1 Oxidación

De la etapa de oxidación se obtuvo una mezcla de color marrón intenso, la cual presentó un pH de 2.03 y se lavó hasta alcanzar un pH de 6.98. De esta mezcla, posterior al secado, se obtuvieron hojuelas grandes de coloración negro intenso y partes grisáceas mostradas en la Figura 3.1.

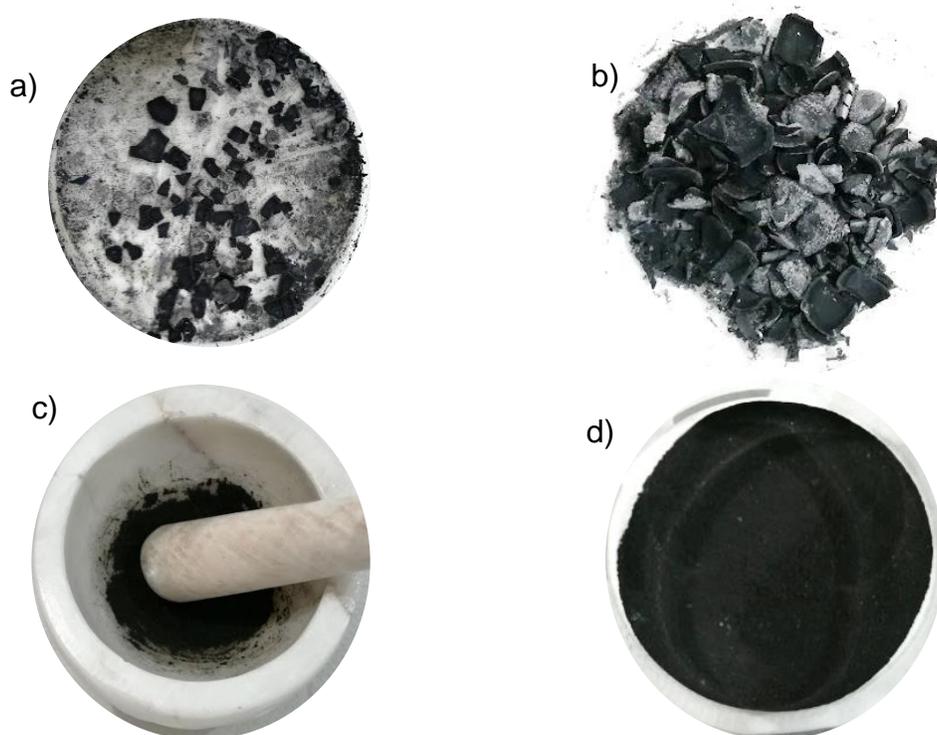


Figura 3.1 Secado y refinado del og, donde a) og después del secado b) Hojuelas secas de og c) Estandarización de tamaño de og y c) og en polvo

### 3.1.2 Exfoliación

El material exfoliado y dispersado después de la sonicación presentó un tono negro uniforme como se observa en la Figura 3.2.



Figura 3.2 Exfoliación de og/ obtención de OG

### 3.1.3 Reducción

Se obtuvo una solución acuosa de coloración negra y apariencia uniforme (Figura 3.3) que presentó pH de 2.89 la cual fue llevada a pH neutro. Como resultado se observó un material muy sedimentable en agua mostrada en la Figura 3.4 y una textura fina y suave posterior a su secado.

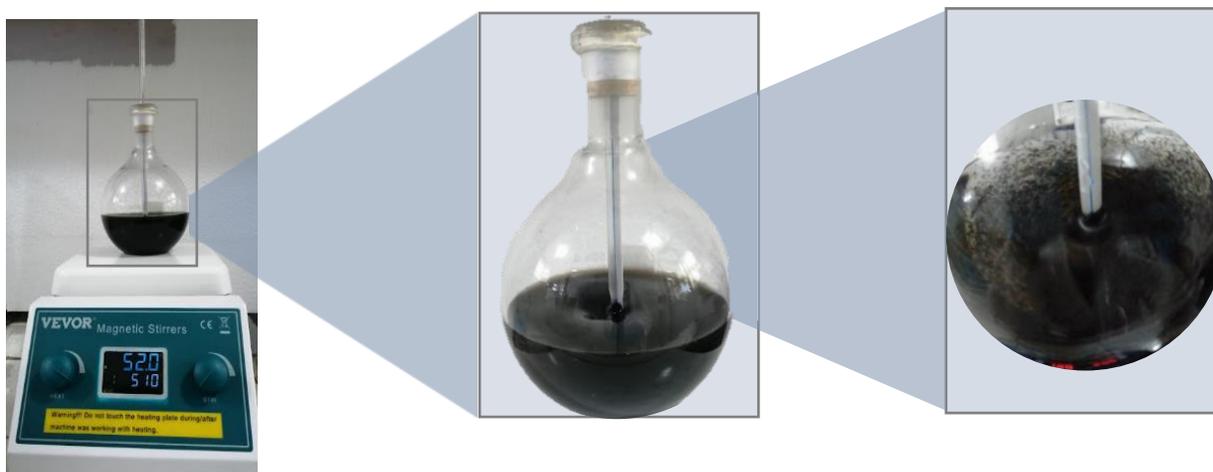


Figura 3.3 Reacción de reducción de OG

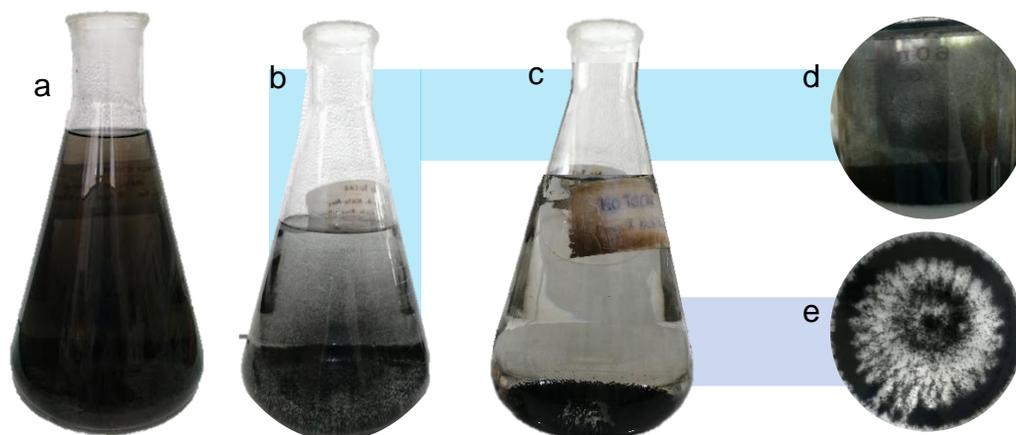


Figura 3.4 Lavado y filtrado de OGr. Donde a) OGr en solución inicial b) OGr primer enjuague c) OGr pH neutro d) Filtración de OGr e) Sedimentación de OGr

### 3.1.4 Rendimientos

Los rendimientos de los diferentes OGr obtenidos se presentan en la Tabla 3.1, los cuales fueron determinados tomando como base de cálculo 100 mg iniciales de OG que fueron sometidos a cada uno de los procesos de reducción, teniendo un promedio de rendimiento para los OGr 20 min h OGr 1 h y OGr 2 h sintetizados del 62.98 %, cada uno de los materiales fueron dispuestos en viales de cristal mostrados en la Figura 3.5.



Figura 3.5 Almacenamiento de los diferentes OGr obtenidos

Tabla 3.1 Rendimientos de los diferentes OGr obtenidos

Material	OGr 20 min	OGr 1 h	OGr 2 h
Rendimientos	60.80 %	63 %	65.15 %

De acuerdo a lo mostrado en la Tabla 3.1 se observa un margen inferior de rendimiento de 60 % correspondiente al OGr de 20 min, mientras que el margen superior de rendimientos fue del 65.15 % el cual corresponde a los rendimientos en la obtención del OGr 2 h, dichos rendimientos son comparables a los obtenidos por Marcano *et al.*, (2010) quienes obtuvieron rendimientos del 54 %, 57 % y 76 % en su proceso de síntesis de OGr empleando los métodos Mejorado, Hummers modificado y Hummers, mientras que Shin *et al.*, (2014) lograron un rendimiento de 68.5 % en el proceso de síntesis de Puntos Cuánticos de Grafeno y Shen *et al.*, (2009) obtuvieron un rendimiento en la obtención de OG en OGr del 80 %, siendo los datos presentados un margen de rendimientos aceptable con posibilidad a realizar mejoras como se establece en el Apéndice A Recomendaciones.

### 3.2 Caracterización de OGr

La caracterización de los diferentes OGr obtenidos, se realizó en colaboración con el TecNM/ Instituto Tecnológico de Querétaro, la cual consistió de acuerdo con lo establecido en el apartado de metodología del presente trabajo.

#### 3.2.1 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

Se realizó el análisis por FTIR del material base para la obtención del OGr, en este caso del grafito grado técnico (GT) para observar su composición con respecto a la concentración de grupos funcionales presentes en su estructura, también, se realizó el análisis al OG obtenido de la oxidación y dispersión del GT para observar los cambios en su estructura como resultado de la oxidación a la que fue sometido el nanomaterial con respecto al material de partida y por último se realizó un análisis al OGr que es obtenido de la reducción a 20 minutos y se comparó la concentración de

grupos funcionales presentes en su estructura con respecto a sus precursores, dicha comparativa se aprecia en la Figura 3.6.

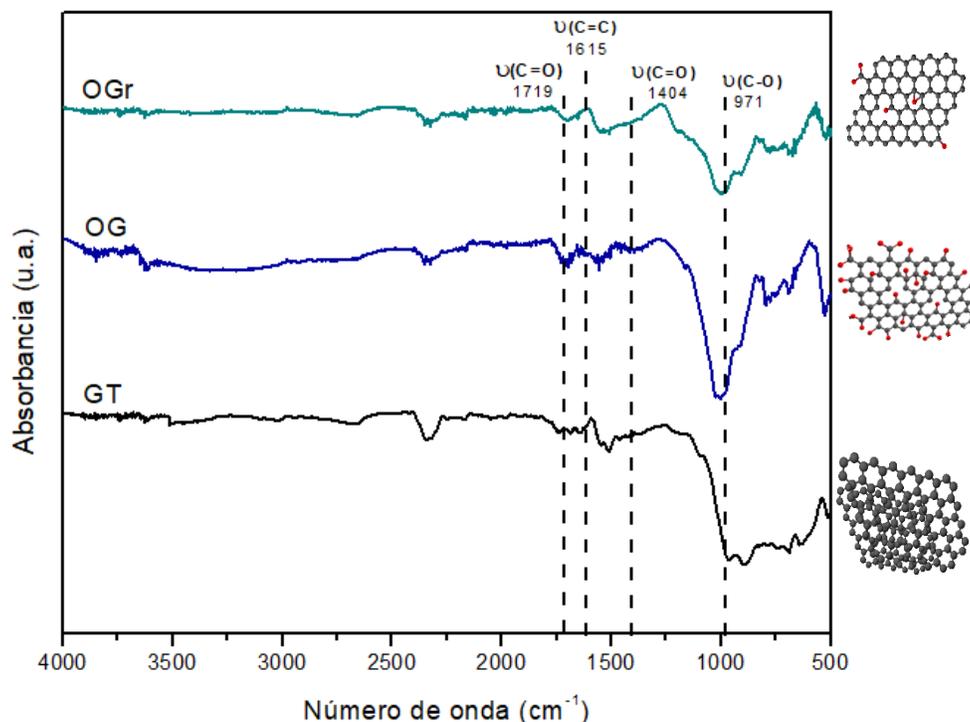


Figura 3.6 Espectro FTIR de GT, OG y OGr <sub>20 min</sub>

En el espectro del grafito (GT) (Figura 3.6) se observó la presencia de grupos oxigenados en su estructura en el ancho de banda  $971\text{ cm}^{-1}$  generada por la vibración del estiramiento de los enlaces de C-O, mientras que los espectros de OG y OGr a diferencia del GT presentan vibraciones de estiramiento ( $\nu$ ) de los grupos carboxílicos C=O en el ancho de banda  $1719\text{ cm}^{-1}$ , mientras que a los  $1615\text{ cm}^{-1}$  se encuentran los correspondientes a grupos C=C y a los  $1404\text{ cm}^{-1}$  se tuvo evidencia de la presencia de grupos C=O. Mediante el análisis de los espectros presentados en la Figura 3.7, se observó que los picos presentes en el espectro del OGr en comparación con los presentados en el OG tienen menor pronunciación, esto debido a la reducción en la concentración de oxígeno residual presente en la estructura del material por medio de los diferentes grupos funcionales oxigenados. Los valores obtenidos son similares a

los reportados por Ramos-Galicia *et al.*, (2021), quienes obtuvieron evidencia en el ancho de banda  $990\text{ cm}^{-1}$  vibraciones por estiramiento de enlaces C-O en el análisis del grafito natural utilizado, mientras que, para el OG y OGr reportaron la presencia de los grupos funcionales de C=O, C=C y C-O en los anchos de banda de 1719, 1600 y  $1400\text{ cm}^{-1}$  utilizando la técnica de espectroscopia FTIR, de igual manera, otros autores como De la Luz-Asunción *et al.*, (2015), Olorunkosebi *et al.*, (2021) y Santamaría-Juárez *et al.*, (2019) han reportado valores semejantes como se puede observar en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Comparativa de espectros FTIR de materiales precursores

Autor	Material	Numero de onda de grupos funcionales			
		$\nu(\text{C} = \text{O})$	$\nu(\text{C} = \text{C})$	$\nu(\text{C} - \text{O})$	$\nu(\text{C} - \text{O})$
Presente trabajo	GT, OG y OGr	1719	1615	1404	971
De la Luz-Asunción <i>et al.</i> , (2015)	GT, OG y OGr	1700	1630	1400	1050
Alam <i>et al.</i> , (2017)	GT, OG y OGr	1735	1622- 1630	1414	1116
Santamaría-Juárez <i>et al.</i> , (2019)	GT, OG y OGr	1734	1625	1430	1055
Ramos-Galicia <i>et al.</i> , (2021)	GT, OG y OGr	1719	1600	1400	990
Olorunkosebi <i>et al.</i> , (2021)	GT, OG y OGr	1730- 1740	1630- 1650	1413	1092

Así mismo, los resultados de los análisis de los materiales de OGr a 20 min, 1h y 2h se presentan en la Figura 3.7, en donde se observó diferencias importantes respecto a la concentración de grupos funcionales oxigenados en la estructura de los materiales, presentando atenuaciones sustanciales en las intensidades de bandas que corresponden a los grupos C=O, C=C, y principalmente al grupo C-O, lo que es atribuido al tiempo de exposición al proceso de reducción por AA, observándose intensidades más pronunciadas conforme el tiempo de reducción es más corto, siendo el OGr 20 min el OGr con más presencia de grupos funcionales oxigenados, por lo tanto se le atribuye un carácter más reactivo, mientras que por el contrario, el OGr 2 h es el material con menor cantidad de grupos oxigenados, llegando a ser casi nula su presencia en el material, dichos resultados presentan consistencia con lo reportado

por Bueno-López, *et al.*, (2020) así como Olorunkosebi *et al.*, (2021) quienes observarán en los números de onda mostrados en la Tabla 3.3, una disminución de grupos funcionales oxigenados cuanto más largo era el tiempo de reducción.

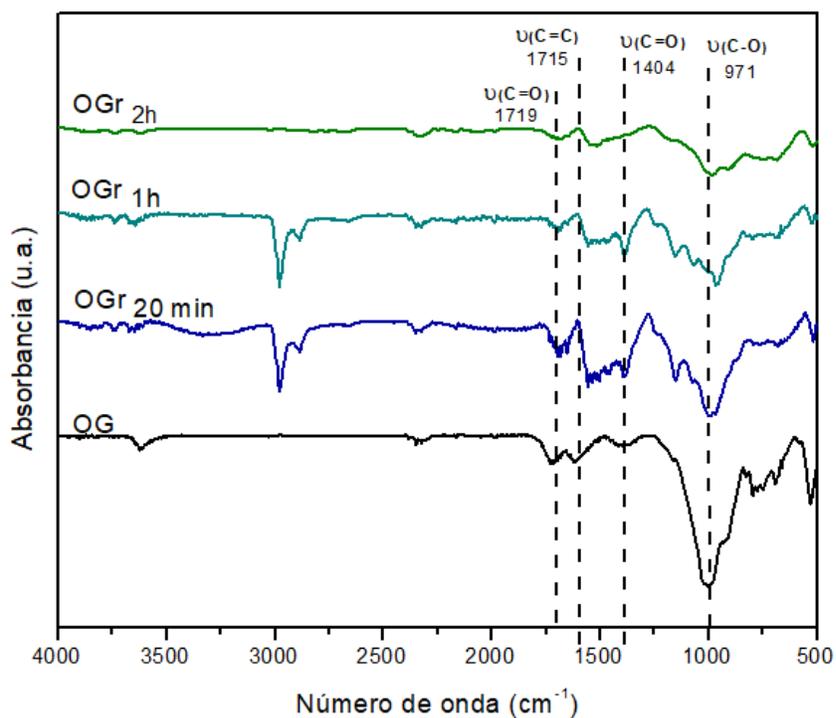


Figura 3.7 Espectro FTIR de OG, OGr

Tabla 3.3 Comparativa de espectros FTIR de OG y OGr con bibliografía

Autor	Material	Número de onda de grupos funcionales			
		$\nu(C=O)$	$\nu(C=C)$	$\nu(C=O)$	$\nu(C-O)$
Presente trabajo	OG, OGr <sub>s</sub>	1719	1615	1404	971
Olorunkosebi <i>et al.</i> , (2021)	GT, OG <sub>s</sub>	1730-1740	1630-1650	1413	1092
Bueno-López <i>et al.</i> , (2020)	OG, OGr <sub>s</sub>	1730	1570	1200-1400	900-1100

### 3.2.2 UV- Visible

La caracterización de los materiales gráfenicos por medio de la técnica de UV-visible se muestra gráficamente en la Figura 3.8 a) y b) en donde son mostradas las transiciones electrónicas de los enlaces C=C y C=O de G, OG y OGr, pudiéndose realizar una comparación entre los espectros de los OGr obtenidos y también entre los espectros de los materiales precursores como lo es el grafito técnico y el óxido de grafeno por medio del cambio de las señales de las transiciones de sus enlaces, de los cuales, en el caso del espectro correspondiente al GT (Figura 3.8 a)) muestra un pico tenue característico a los 274 nm, dicho valor coincide con lo reportado por Fauzi, *et al.*, (2021) en el rango ultravioleta (190-380 nm) debido a la señal emitida por el enlace C=C ( $\pi - \pi^*$ ), además se observan los picos de la absorción característica del OG a los 226 nm resultado de las transiciones  $\pi - \pi^*$  ( $sp^2$ ) de los orbitales menor energéticos a los de mayor energía correspondientes a los enlaces C=C mientras que para los enlaces C=O las transiciones  $n - \pi^*$  se presenta un hombro en la señal a los 301 nm como indicadores de la presencia de los grupos funcionales oxigenados ( $sp^3$ ) en la estructura del nanomaterial siendo estos resultados comparables con lo reportado en bibliografía como se muestra en la Tabla 3.4.

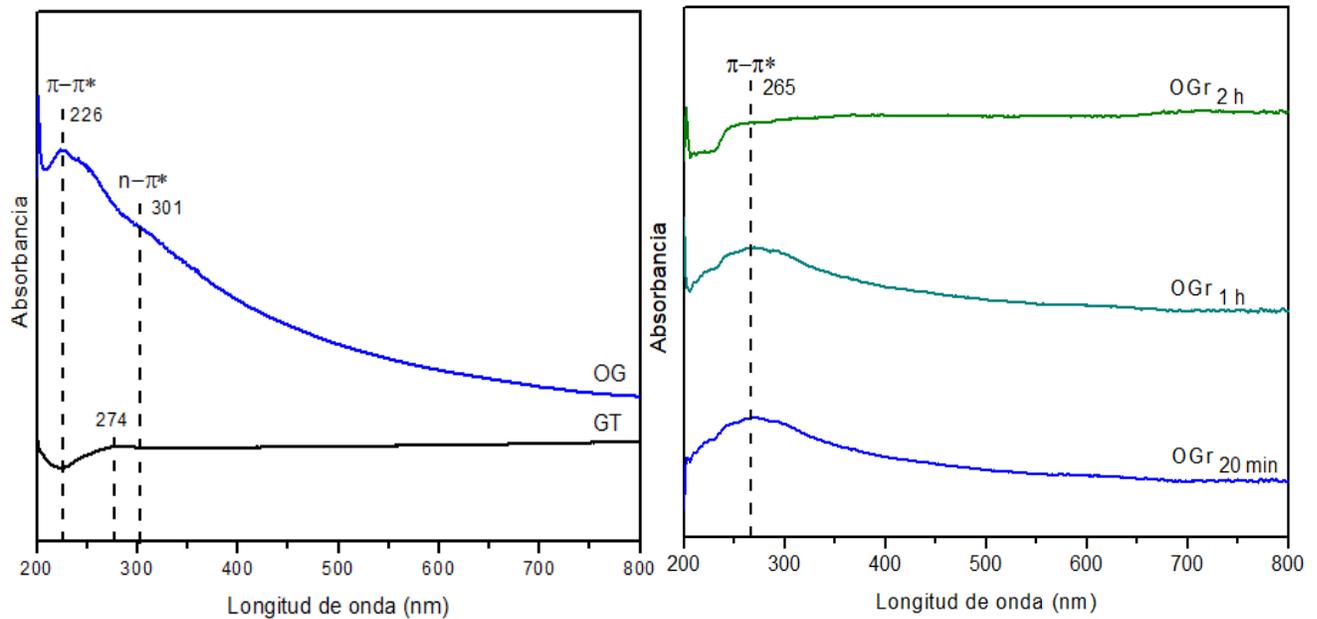


Figura 3.8 Espectro UV-vis a) GT y b) OG, OGr 20, OGr 1h y OGr 2 h

Así mismo para el caso de los espectros de absorbancia de los tres materiales obtenidos mediante los grados de reducción del OG mostrados en la Figura 3.8 b) se observa un pico de absorción a los 265 nm correspondiente a las transiciones  $\pi-\pi^*$  de los electrones de los enlaces aromáticos C=C relacionados con la estructura a base de carbón del OGr, observándose un desplazamiento hacia el rojo (380-780 nm) a 265 nm, esto es atribuido a la eliminación parcial de los grupos funcionales oxigenados en la superficie del nanomaterial de OG y al aumento de los enlaces aromáticos, haciendo que los electrones tiendan a excitarse fácilmente a energías más bajas, además de que se aprecia la desaparición gradual del hombro alrededor de los 300 nm en los OGr 20 min y 1 h hasta que finalmente en el espectro de OGr 2 h muestra una nula señal de los enlaces C=O debido a la eliminación exitosa de la mayor parte de los grupos funcionales oxigenados ( $sp^3$ ) debido al proceso de reducción.

Tabla 3.4 Comparativa de espectros UV-vis de OG y OGr con bibliografía

Autor	GT	OG		OGr
	C=C ( $\pi - \pi^*$ )	C=C ( $\pi - \pi^*$ )	C=O ( $n - \pi^*$ )	C=C ( $\pi - \pi^*$ )
Presente trabajo	274	226	301	265
Fauzi, <i>et al.</i> , (2021)	274	230	300	230-260-267
Loryuenyong <i>et al.</i> , (2013)	-	230	303	255
Sadhukhan <i>et al.</i> , (2016)	-	239	300	259-265
Alam <i>et al.</i> , (2017)	-	212	246	240
Trikkalotis <i>et al.</i> , (2021)	-	230	300	-
Olorunkosebi <i>et al.</i> , (2021)	-	230	302	-
Alabid <i>et al.</i> , (2022)	-	-	-	255-265
Báez., (2023).	-	228	310	265

### 3.2.3 SEM

En las micrografías realizadas por medio de SEM se pueden observar las morfologías superficiales de los nanomateriales, donde en la Figura 3.9 (a) se muestra la micrografía del GT a una magnificación de 30 000x, en el cual se observa la estructura

robusta formada por diversas capas (plaquetas) cristalinas compactadas, mientras que la Figura 3.9 (b) se observa el GT posterior al proceso de oxidación dando origen al og a una magnificación de 1 500x donde se aprecia la estructura del nanomaterial conformado por múltiples placas bidimensionales agrupadas, así como algunas otras estructuras menos definidas y más rugosas en la superficie esto es atribuido a los grupos funcionales oxigenados resultado de la oxidación realizada por medio del método de Hummers modificado, mientras que en el caso del OG (Figura 3.9 (c)) se observan un caso similar donde se distinguen estructuras escamosas apiladas siendo estas las capas de grafeno oxidadas además de algunas otras estructuras más finas, es decir con menor número de capas las cuales en ambos casos presentan bordes con un mayor grosor y también ondulaciones características que coinciden con lo reportado por Lunavictoria Beltrán, (2020).

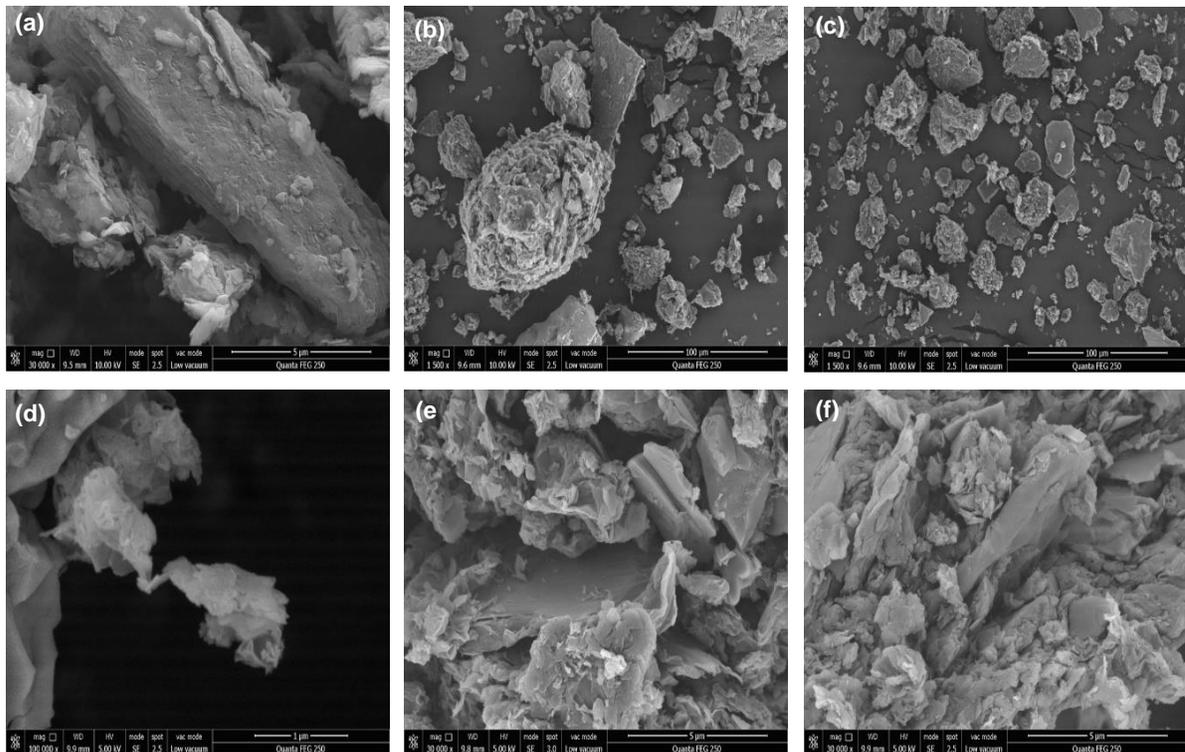


Figura 3.9 Micrografías SEM (a) GT, (b) og, (c) OG, (d) OGr 20 min, (e) OGr 1 h y (f) OGr 2 h.

La Figuras 3.9 (d), (e) y (f) muestran las micrografías obtenidas del OGr 20 min, OGr 1 h y OGr 2 h en las que se aprecian diferentes placas o laminas en posiciones aleatorias agrupadas y muy desordenadas que poseen superficies, especialmente sus bordes, arrugadas u onduladas y finas estas características coinciden con la descripción realizada por Lunavictoria Beltrán, (2020), así como por Fauzi *et al.*, (2021) e Hidayat *et al.*, (2017).

### 3.3 Obtención, adecuación y caracterización del sustrato

La obtención y adecuación de los residuos de frutas y verduras así como la caracterización del sustrato resultante se realizó según lo establecido en el apartado 3 del capítulo 2 del presente trabajo de investigación.



Figura 3.10 Residuos alimenticios recolectados

#### 3.3.1 Obtención del sustrato

Para la elaboración del sustrato fueron empleados 4.25 kg de jitomate, 1.1 kg de lechuga y 0.54 kg de naranja, teniendo un total de 5.89 kg de residuos de frutas y verduras, los cuales son mostradas en la Figura 3.10, mientras que en la Figura 3.11 se observa la reducción de tamaño como parte del acondicionamiento de los residuos, dando como resultado una composición de 74 %, 17.08 % y 8.78 % respectivamente.

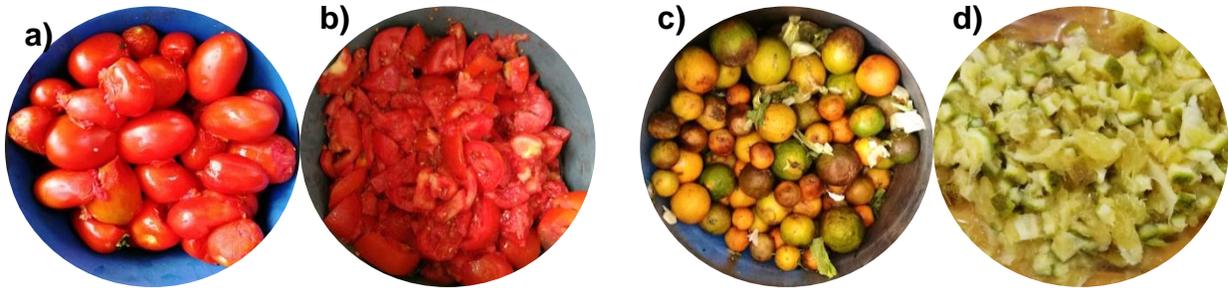


Figura 3.11 Acondicionamiento de residuos para elaboración de sustrato

### 3.3.2 Acondicionamiento del sustrato

Se obtuvo como sustrato una fracción líquida de color naranja – marrón mostrada en la Figura 3.12, producto de los residuos de frutas y verduras acondicionados y procesados de acuerdo a lo descrito en la sección 2.3.2

### 3.3.3 Caracterización fisicoquímica del sustrato

La caracterización fisicoquímica de los sustratos elaborados a partir de frutas y verduras destinados para ser empleados las fases de inoculación del MS son mostrados en la Tabla 3.5, las cuales fueron divididas de acuerdo a la etapa en la que fueron empleados, además dichos valores son próximos a los reportados por Orduña Gaytan *et al.*, (2018)

Tabla 3.5 Caracterización fisicoquímica del sustrato empleado en el proceso de inoculación.

Parámetro	pH	DQO <sub>T</sub> [g / L]	DQO <sub>s</sub> [g / L]	% SV	% ST	Densidad [g / mL]
<b>Etapas I</b>						
Valor	5.31 ± 0.2261	54.12 ± 0.4874	48.40 ± 2.0307	88.78 ± 0.9495	4.41 ± 0.0753	1.05
<b>Etapas II y III</b>						
Valor	4.01 ± 0.5523	36.78 ± 0.0146	27.89 ± 1.6789	75.81 ± 0.4053	1.55 ± 0.0131	1.063 g/mL

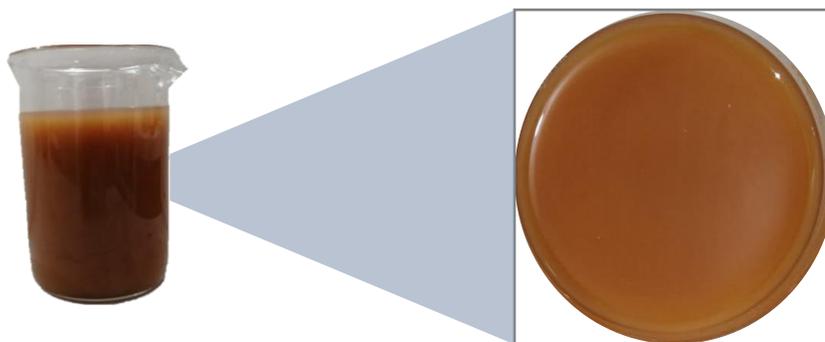


Figura 3.12 Sustrato caracterizado

Los resultados de la caracterización del tercer sustrato preparado de acuerdo a lo establecido en la metodología empleado para las pruebas de Potencial Bioquímico de Metano son mostradas en la Tabla 3.6, en donde se aprecia la caracterización fisicoquímica del mismo sustrato en su estado sin acondicionar (crudo) y acondicionado, es decir, se llevó a una concentración de  $DQO_T$  de 5 g/L y un pH neutro, presentado valores muy cercanos a los reportados en la Tabla 3.5, y estos a su vez de los valores de la caracterización fisicoquímica del sustrato de frutas y verduras variadas reportado por Xu *et al.*, (2018) respecto al valor de ST, proporción C:N (Tabla 3.23) así como pH.

Tabla 3.6 Caracterización fisicoquímica del sustrato empleado en pruebas de PBM

pH	$DQO_T$ [g/L]	$DQO_S$ [g/L]	% SV	% STV	% Ceniza	% Humedad	Densidad
<b>Sustrato crudo</b>							
$4.50 \pm 0.0781$	$54.12 \pm 0.0032$	$48.40 \pm 1.1405$	$85.07 \pm 0.0611$	$2.42 \pm 0.0178$	$14.92 \pm 0.0611$	$97.57 \pm 0.0178$	1.081 g/mL
<b>Sustrato acondicionado</b>							
$7.32 \pm 0.0781$	$5.025 \pm 0.0032$	$4.33 \pm 1.1405$	$64.17 \pm 0.0611$	$0.23 \pm 0.0178$	$35.82 \pm 0.0611$	$99.76 \pm 0.0178$	1.02 g/mL

### 3.4 Acondicionamiento de NPs

#### 3.4.1 Acondicionamiento e incorporación de nanomateriales

Se realizó el acondicionamiento e incorporación de los nanomateriales grafénicos mediante la impregnación de una matriz sintética polimérica comercial (3M) de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.4, obteniendo un ligero tono oscuro como se muestra en la Figura 3.13, posterior a la impregnación del MS llevada a cabo bajo las mismas condiciones, se registraron los pesos de cada uno de los MS antes y después de la impregnación, así como la cantidad de material impregnado en mg como se observa en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7 Peso de material impregnado en MS

MS	Pesos de MS con material impregnado [mg]								
	OGr 20 min			OGr 1 h			OGr 2 h		
	FS	FI	MI	FS	FI	MI	FS	FI	MI
1	389.6	391.7	<b>2.1</b>	349.8	352	<b>2.2</b>	318	320.3	<b>2.3</b>
2	320.3	321.9	<b>1.6</b>	365.4	367.4	<b>2</b>	336.1	338.3	<b>1.3</b>
3	291.7	293.1	<b>1.4</b>	320.1	321.7	<b>1.6</b>	361.1	362.8	<b>1.6</b>
4	312.9	314.1	<b>1.2</b>	300.5	301.9	<b>1.4</b>	315.9	317.5	<b>1.6</b>

MSS = Material de soporte seco (mg)  
 MSI = Material de soporte impregnado (mg)  
 MI = Material impregnado (mg)



Figura 3.13 MS a) natural b) impregnado con OGr

La Figura 3.14 muestra los resultados del análisis por FTIR realizados al MS impregnado con OGr en los que se compararon los espectros del MS sin adición del nanomaterial grafénico (F Blanco) con respecto a los MS impregnados, partiendo del análisis de los principales grupos funcionales que se encuentran presentes en los OGr mostrados previamente en las Tablas 3.3 y 3.4 concentrados ahora en la Tabla 3.8, en los que se observa que el grupo funcional con mayor presencia en el MS impregnado con OGr es el grupo carboxilo, mismo caso del grupo funcional predominante en el material de OGr obtenido; además se identificó un nuevo pico importante en el número de onda de los 2900-3000  $\text{cm}^{-1}$  presente en los espectros del MS impregnados, mientras que en el MS sin impregnar la señal es más tenue, dicho pico corresponde al grupo hidroxilo ( $-OH$ ), indicando la presencia de agua ligada a la estructura del MS como remanente del proceso de impregnación de los nanomateriales en medio acuoso (Agua destilada).

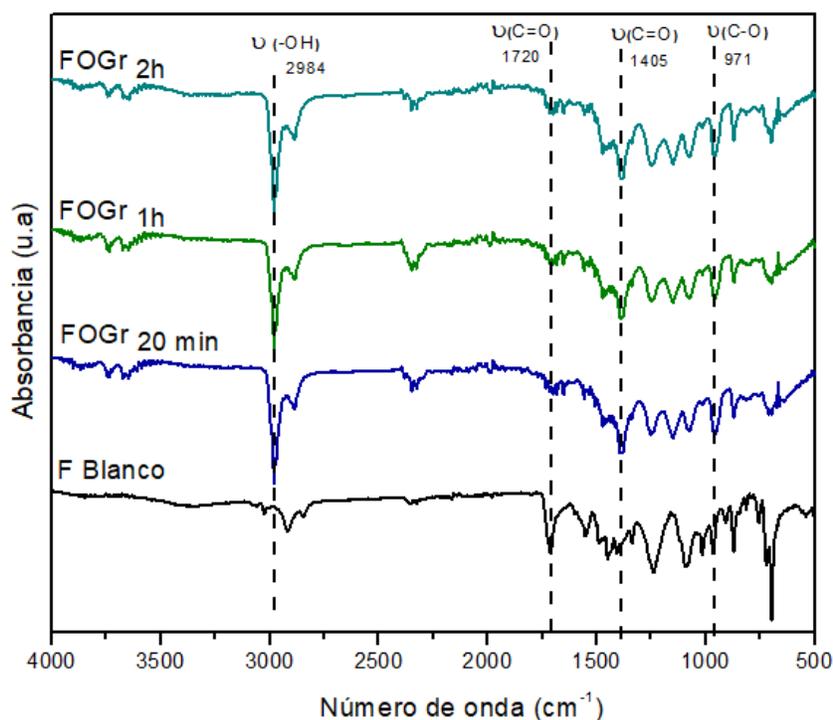


Figura 3.14 Espectro FTIR de MS impregnado con OGr

Tabla 3.8 Caracterización por FTIR de MS impregnado

Grupo funcional	Carbonilo $\nu(C=O)$	Carboxilo $\nu(C=O)$	Epoxi $\nu(C-O)$	Hidroxilo $\nu(-OH)$
Material OGr	1719	1404	971	2990
MS impregnado	1720	1405	971	2984

Los resultados mostrados en la Figura 3.14 en donde se observa una mayor presencia del grupo carboxilo ( $1405\text{ cm}^{-1}$ ) en las láminas de los OGr sintetizados revelan una mayor reactividad en los bordes de los mismos, esto debido a la formación de grupo enlaces covalentes típicamente en los bordes de los materiales grafénicos que han sido oxidados, sirviendo como sitios efectivos de anclaje para inmovilizar diversas especies catalíticamente activas (Sachdeva 2020; Stankovich *et al.*, 2006; Kotsyubynsky *et al.*, 2021), además de influir en el carácter anfifílico del material, el cual será mayormente hidrofílico en los bordes dando indicios de la manera en la que interactúa con su entorno incluyendo los microorganismos encargados de la DA.

### 3.5 Desarrollo de biopelícula

El desarrollo de la biopelícula, se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.5, en la Figura 3.15 (a) se aprecia el montaje de las matrices sintéticas impregnadas de OGr en una estructura rectangular de acero inoxidable utilizada como soporte para la suspensión de las mismas, cada una de las matrices poliméricas empleadas como material de soporte impregnadas fueron identificadas mediante colores, los cuales indican cada uno de los materiales de OGr del cual están impregnadas, mientras que en la Figura 3.15 (b) se observan el inóculo previamente caracterizado (ver Tabla 3.9) dispuesto en el fondo del Reactor Anaerobio de Inoculación de MS Impregnados (RAIFI) así como la estructura de soporte con los MS en posición, y finalmente en la Figura 3.15 (c) se observa la instalación del FAIFI con sus ductos de alimentación y

descarga conectados a la bomba peristáltica funcionando en recirculación, además del conducto de biogás (ducto ubicado en la parte superior central de color azul).

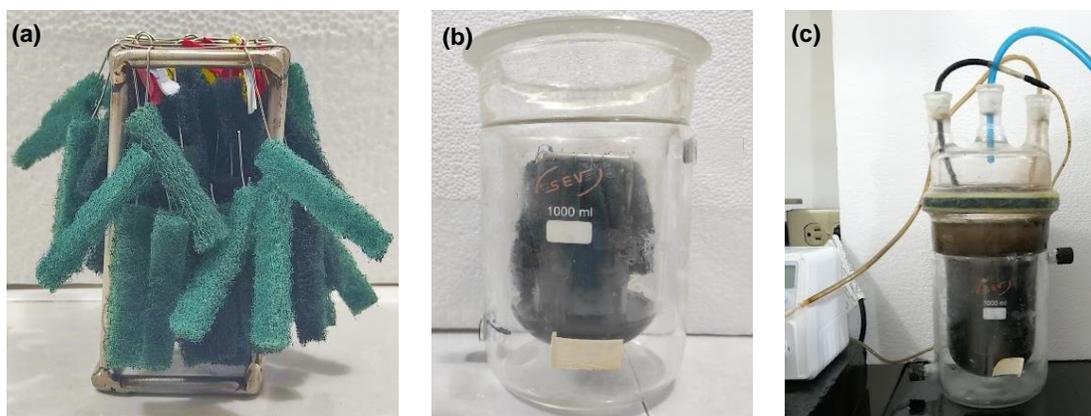


Figura 3.15 Montaje y operación del RAIFI. Donde (a) MS impregnado en estructura de soporte, (b) Adición de Inóculo en RAIFI, (c) FAIFI funcionando

Tabla 3.9 Caracterización inicial del inóculo

Parámetro	pH	DQO <sub>T</sub> [g/L]	DQO <sub>s</sub> [g/L]	% SV	% STV
Valor	8.93 ± 0.0011	84.2 ± 0.0861	68 ± 0.0583	41.51 ± 0.0519	4.49 ± 0.0043

Los resultados del monitoreo realizado del proceso de desarrollo de biopelícula en el material de soporte por medio de % de remoción de DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>s</sub> son presentados en la Figura 3.16, en el donde pueden ser observadas tres fases: la primer fase corresponde al proceso de adaptación, crecimiento de microorganismos e inicio de la formación de la biopelícula en el material de soporte, la cual tuvo una duración de 54 días en los cuales se alcanzó 84.69 % de remoción de DQO<sub>T</sub> y 77.1875 % de DQO<sub>s</sub>, dando paso a la segunda fase la cual tuvo una duración más corta con respecto a la primera siendo de 9 días tiempo en el que la biopelícula terminó de desarrollarse y empozó el monitoreo de la actividad de degradación del sustrato de la biopelícula formada alcanzaron remociones de DQO<sub>T</sub> de 56.19 %, siendo crucial esta etapa ya que permitió completar desarrollo la biopelícula y dio pauta para realizar la evaluar la

interacción de la biopelícula que se encuentra en contacto con el material de soporte que contiene el material de OGr; finalmente la fase III permitió analizar la actividad de la biopelícula formada en el material de soporte sin la presencia de alguna fuente de inóculo con respecto al sustrato, alcanzando la estabilización del sistema rápidamente y una remoción de  $DQO_T$  del 55.91 % en un periodo de 15 días (Ver Tabla 3.10) mostrando evidencia de la buena interacción del OGr y el consorcio de microorganismos responsables de realizar el proceso de la DA.

Se puede observar que las tendencias de la estabilización de los sistemas por medio de biopelículas presentados en el presente trabajo comparte una similitud en el comportamiento del sistema a lo reportado por Orduña Gaytán y Alvarado Lassman, (2023) y Solano De La Cruz, (2020) quienes obtuvieron periodos más cortos de estabilización de digestores anaerobios empleando una matriz sintética en donde fueron desarrolladas biopelículas.

La Tabla 3.10 muestra el concentrado de las remociones de  $DQO_T$  y  $DQO_s$  ( $DE \leq 2\%$ ) en las diferentes fases de inoculación, pudiendo observarse la disminución de días de estabilización así como el volumen de inóculo presente en el RAIFI.

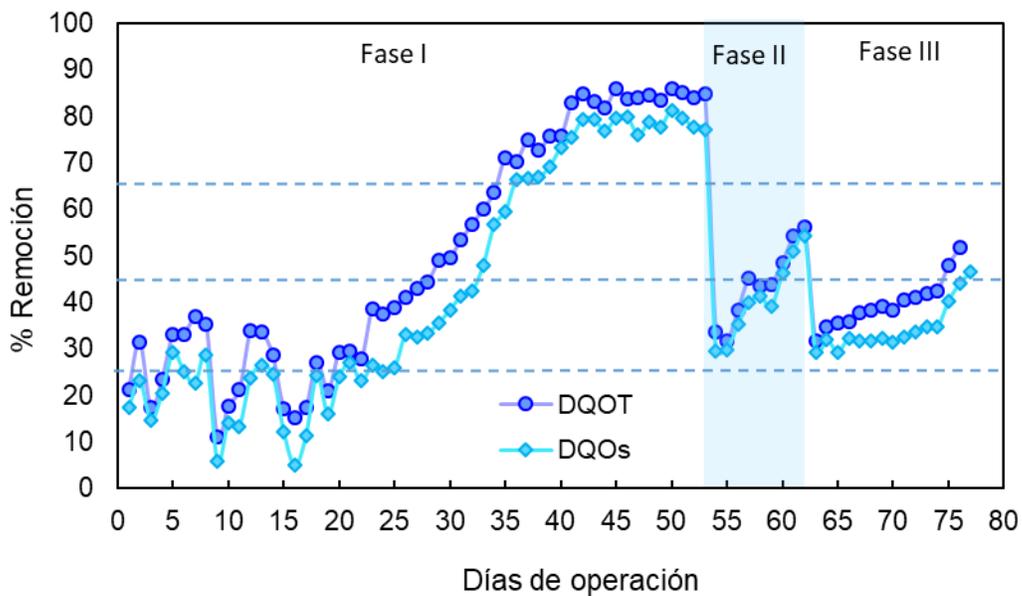


Figura 3.16 Monitoreo % Remoción de DQO

Tabla 3.10 % Remoción presentada por las fases de inoculación de MS.

	Fase I	Fase II	Fase III
Duración	54 días	9 días	15 días
$DQO_T$	84.69	56.19	55.91
$DQO_S$	77.18	54.36	46.47
Presencia de inóculo	100 %	50 %	0 %

Los materiales grafénicos como el OGr presentan entre sus propiedades fisicoquímicas la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano o por el contrario promover el crecimiento y metabolismo de los microorganismos (Zhang y Tremblay, 2020), siendo este último fenómeno el que fue observado durante el proceso de inoculación de los MS, en donde al finalizar de cada una de las tres fases se obtuvieron registros de incrementos en el volumen del inóculo con respecto a la cantidad inicial de inóculo depositado en el RAIFI (100 mL), ya que para el final de la primer etapa se obtuvo un 25 % más de inóculo que el volumen inicial el cual después de su cuantificación fue retirado el 50 % (62.5 mL) del total del inóculo del fondo del reactor lo que marcó el final de la primer fase e inicio de la segunda fase, sin embargo para el final de esa segunda fase, como se muestra en la Tabla 3.11 se obtuvo una generación del 9.6 % con respecto al valor inicial, esto puede ser atribuido al corto periodo de tiempo con el que contó esta fase debido a la rápida estabilización del proceso.

Tabla 3.11 Biomasa generada al final de fase I y II

Fase I	Fase II
25 %	9.6 %

El monitoreo del % de remoción de ST y STV en las tres diferentes fases es mostrado gráficamente en la Figura 3.17, donde se puede observar fluctuaciones importantes en

el porcentaje de las remociones de ST y STV en los primeros 21 días de operación esto debido al periodo de adaptación, siendo similar a los 28 días de adaptación reportados por Solano De la Cruz, (2020) en un Reactor de Biopélcula Anaerobio, posteriormente a los 21 días empezó a mostrar una tendencia al alza constante en las remociones indicando la estabilización del proceso de DA hasta que alcanzó 73.12 % de remoción de ST y 61.17 % de STV en el final de la primera fase a los 54 días, las remociones obtenidas al final de las fases II y III se muestran en la Tabla 3.12 ( $DE \leq 2\%$ ) coincidiendo en el comportamiento mostrado en el monitoreo del % de remoción de DQO para cada etapa, así como una rápida estabilización en la fase II y III, siendo el comportamiento de la tendencia al alza de las remociones de ST y STV obtenidas similar al reportado por Orduña Gaytan y Alvarado Lassman, (2023) en un reactor de biopélcula anaerobio.

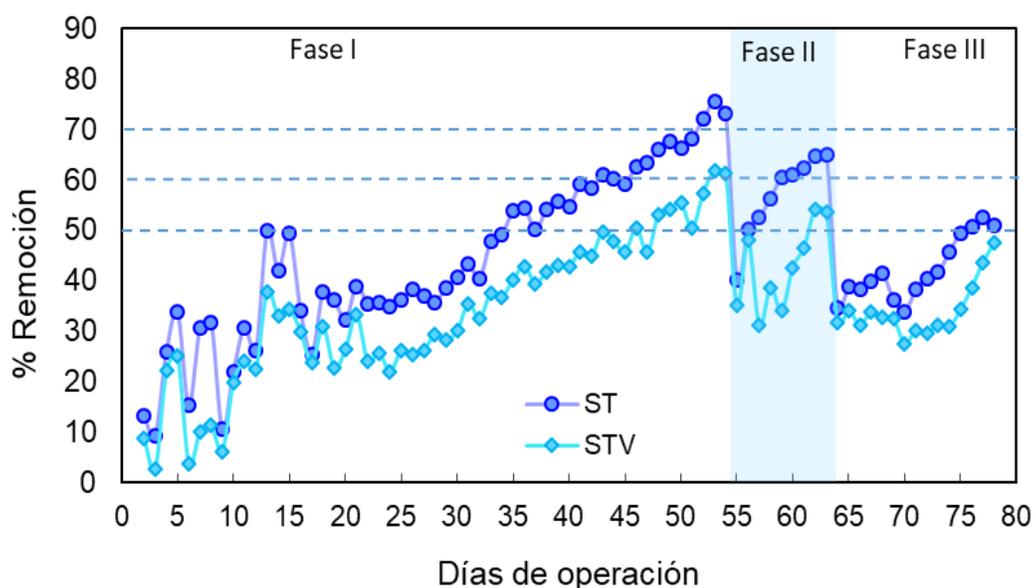


Figura 3.17 Monitoreo % Remoción de ST y STV

Tabla 3.12 % Remociones de ST y STV en el proceso de inoculación de MS.

Fase I		Fase II		Fase III	
<i>ST</i>	<i>STV</i>	<i>ST</i>	<i>STV</i>	<i>ST</i>	<i>STV</i>
73.12 ±	61.17	64.92	53.61	51	47.57

En el monitoreo realizado de pH se presentaron variaciones importantes en los primeros días de operación del RAIFI en las muestras correspondientes a la mezcla y de salida del reactor, las cuales mostraron una rápida tendencia de disminución atribuyéndose de acuerdo a Garcia-Peña *et al.*, (2011) a la rápida producción de AGVs promovida por alta biodegradabilidad que presenta el sustrato de Frutas y Verduras (FyV) , por lo que se implementó la neutralización del sustrato con NaHCO<sub>3</sub> hasta un pH de alimentación constante en rangos superiores a 7.3; los valores de pH en el efluente durante los primeros 7 días se presentaron en el rango de 5.99 a 7.08, a partir del día 7 se presentaron valores de pH más homogéneos siendo el mínimo presentado en el día 12 de 6.68, además, fue a partir del día 40 que los valores de pH de salida se mantuvieron mucho más constantes en el rango de 7.05 y 6.93, a su vez los periodos de estabilización de pH fueron más cortos en las fases II y III como se puede observar en la Figura 3.18 y Tabla 3.13 donde cada valor mostrado cuenta con una DE ≤ 2 %.

Tabla 3.13 pH de las etapas de inoculación de MS

Fase I		Fase II		Fase III	
<i>pH M</i>	<i>pH S</i>	<i>pH M</i>	<i>pH S</i>	<i>pH M</i>	<i>pH S</i>
7.05	6.98	7.12	6.98	7.1	6.89

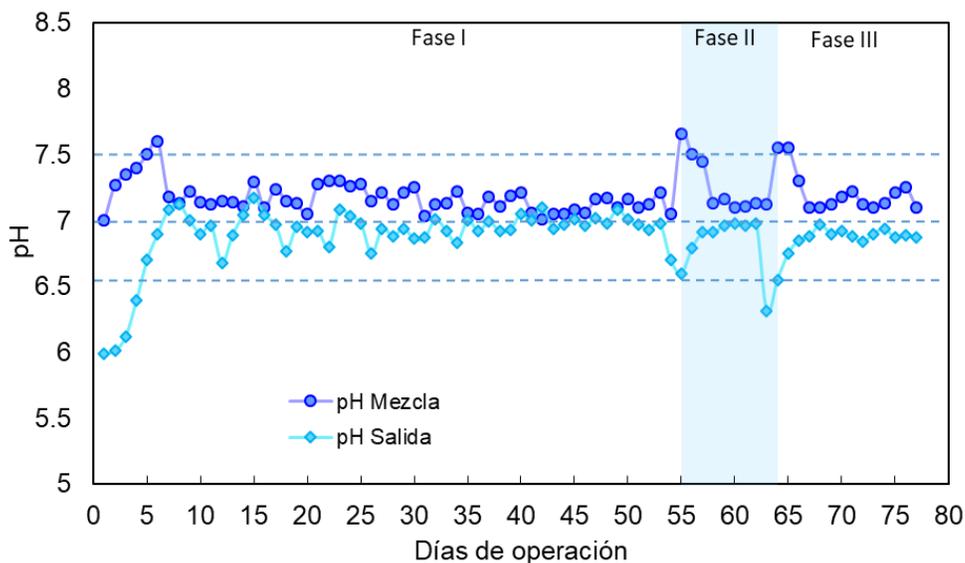


Figura 3.18 Monitoreo pH en las 3 fases inoculación

Los resultados de la caracterización del inóculo al final de la primer y segunda etapa del proceso de inoculación se muestran a continuación en la Tabla 3.14, en los que se aprecia una tendencia de descenso con respecto a los valores iniciales mostrados en la Tabla 3.9 tanto para los valores de pH como para la DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub>, caso contrario para el caso de los SV.

Tabla 3.14 Caracterización de inóculo retirado

Fase	pH	DQO <sub>T</sub> [g/L]	DQO <sub>S</sub> [g/L]	% SV	% STV
I	8.02 ± 0.0741	46.325 ± 1.345	34.2 ± 0.258	74.11 ± 0.4901	2.6044 ± 0.1192
II	6.92 ± 0.0741	3.6 ± 1.345	2.9 ± 0.258	69 ± 0.4901	1.57 ± 0.1192

El método SEM tal como lo reportan Cayetano *et al.*, (2022) fue empleado para la obtención de micrografías de las biopelículas desarrolladas sobre los MS impregnados con los nanomateriales de OGr con el propósito de observar las morfologías bacterianas en las biopelículas desarrolladas mostradas en la Figura 3.19 (a) con magnificación de 12 500x, (b) presentando una magnificación de 30 000x y (c) con magnificación de 30 000x, corresponden a las biopelículas desarrolladas en el MS impregnado con OGr 20 min, 1 h y 2 h respectivamente, en las que se aprecia el crecimiento y adherencia de las bacterias y arqueas responsables de la DA dando lugar a diversas colonias en los MS confirmando el efecto favorable del nanomaterial conductor adicionado (OGr) y la transferencia de electrones entre especies (Dang *et al.*, 2017) además de una adecuada concentración empleada ya que no se presentó inhibición; asimismo en los tres casos se aprecian estructuras tipo “hilos” entre los m.o. que sugieren la formación de estructuras similares a pilis reportadas por Muratçobanoglu *et al.*, (2021) presentes en reactores con presencia de materiales conductores, lo que lleva a un favorecimiento del mecanismo DIET.

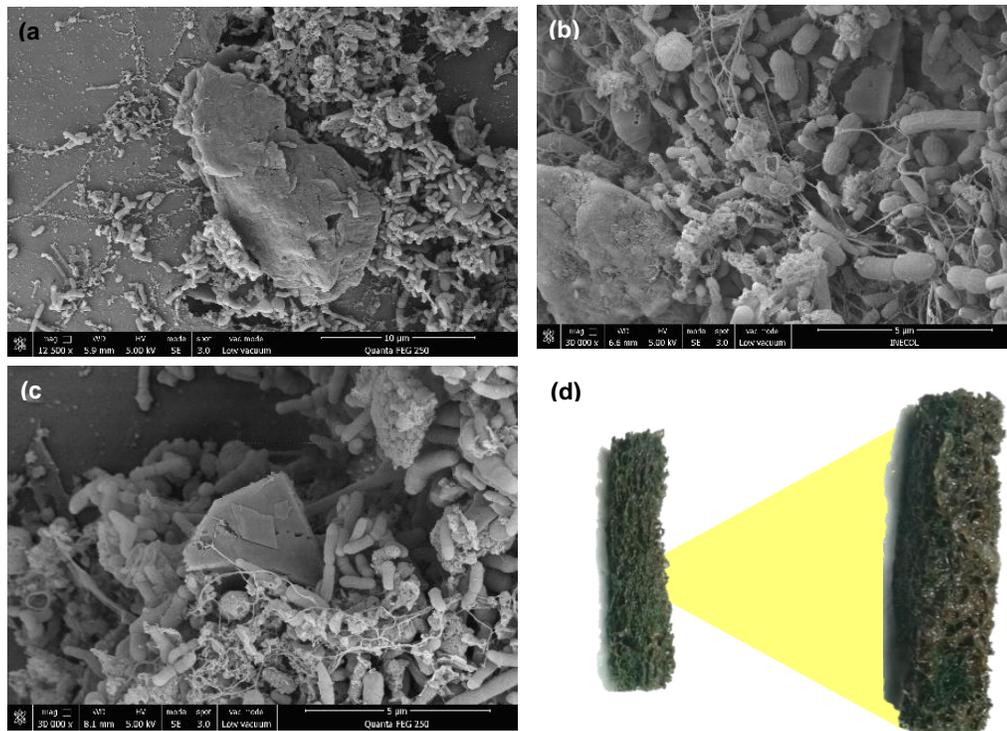


Figura 3.19 Micrografías SEM de biopélicas formadas en MS.

- (a) SEM biopélica en MS OGr 20 min. (b) SEM biopélica en MS OGr 1 h. (c) SEM biopélica en MS OGr 2h. (d) Biopélica en MS.

Como parte de la caracterización física de la biopélica generada tras la inoculación del MS se muestra la cantidad de biomasa generada (MVA) en la Tabla 3.15, siendo el MS impregnado con OGr 1 h quien presenta la mayor cantidad de MVA con 0.1445 g, seguido por el MS OGr 2 h y finalmente el MS OGr 20 min, lo que se confirma que la concentración empleada de 30 mg /30 mL en las que fue impregnado el MS así como la cantidad de material de OGr impregnados en los MS presentaron un efecto benéfico en el crecimiento bacteriano y la formación de biopélica concordando con lo reportado por Zhang y Tremblay., (2020), así como ElMekawy *et al.*, (2017), entre otros autores, donde describen que en las concentraciones adecuadas (bajas concentraciones) los materiales grafénicos incrementan el crecimiento bacteriano sirviendo como sustrato para su adhesión y multiplicación celular además de intervenir en funciones específicas en el metabolismo celular.

Tabla 3.15 Peso (g) de biopelícula generada.

Material de soporte	OGr 20 min	OGr 1 h	OGr 2 h
g de biomasa	$0.1144 \pm 0.0614$	$0.1445 \pm 0.0762$	$0.1191 \pm 0.0634$

### 3.6 Pruebas de Potencial Bioquímico de Metano

Los resultados de las PBM experimentales así como las determinaciones del PBM teórico por medio del análisis elemental y de la DQO de realizados conforme a lo establecido en Capítulo 2 del presente trabajo se muestran a continuación.

#### 3.6.1 Análisis Experimental

Los resultados experimentales de las pruebas de PBM mostrados a continuación fueron obtenidos tras un periodo de 28 días de incubación, el monitoreo de la producción de biogás en las cuatro cinéticas realizadas es presentado en la Figura 3.20 en la que se observa un pico de producción para todos los casos al inicio del experimento, seguido de una tendencia a la baja de producción de mL de biogás normalizado conforme transcurre el tiempo.

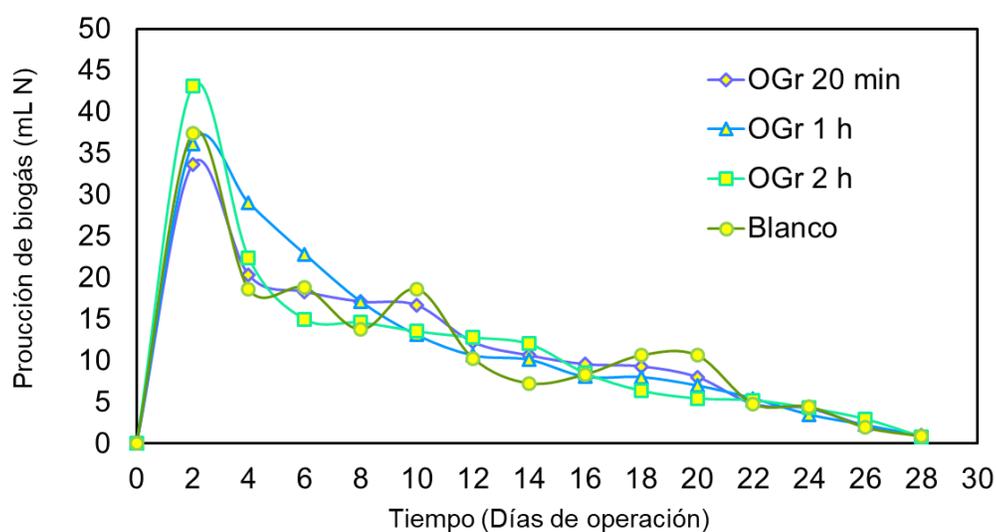


Figura 3.20 Producción de biogás

A partir de la Figura 3.20 se observó que el pico más alto de producción de biogás y rendimientos de metano se presentó en el segundo día de monitoreo, destacando la prueba adicionada con el nanomaterial de OGr 2 h, la cual presentó la mayor producción de biogás seguida por la prueba sin adición de nanomaterial (Blanco), la prueba adicionado con OGr 1 h y finalmente la prueba adicionada con OGr 20 min, sin embargo con el transcurso del tiempo de incubación la prueba adicionada con OGr 1h presentó una mayor producción de biogás en comparación con el resto de las cineticas, así como una tendencia más estable en comparación con las demás pruebas realizadas especialmente la del blanco cuyo comportamiento presentó fluctuaciones a lo largo del experimento; a su vez, las tendencias presentadas por las 4 cineticas del día 2-10 mostraron variaciones significativas en la producción de biogás entre sí sin presentar una tendencia estable, siendo a partir del día 10 hacia el final de las pruebas en las que las producciones de biogás presentadas por las cineticas adicionadas con OGr se estabilizan siguiendo una tendencia similar reportándose un caso similar por Xie *et al.*, (2020)

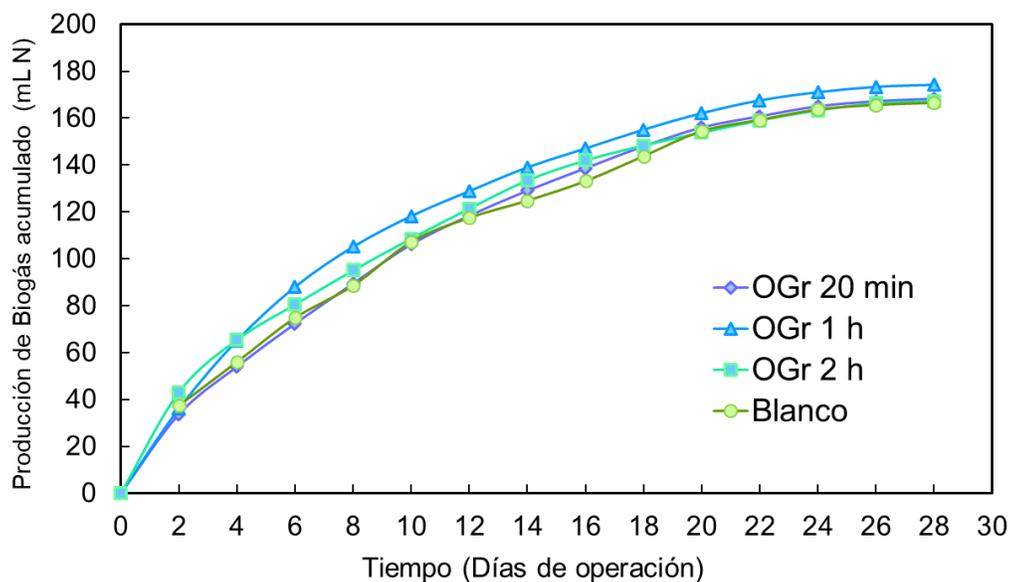


Figura 3.21 Producción de biogás acumulado

La Figura 3.21 muestra la producción de biogás acumulado en el periodo de duración de las cuatro cinéticas realizadas del PBM, en las que se observa un aumento notable

en la producción de biogás como resultado de la adición del material grafénico OGr 1 h en comparación a la prueba blanco siendo esta la prueba con mejores resultados como se aprecia en la Tabla 3.16 presentando una producción de 174.22 mL N seguida de las pruebas adicionadas con OGr 20 min y OGr 2 h en ese orden, sin embargo está ultima presentó valores cercanos de producción de biogás acumulado a la prueba Blanco la cual obtuvo la menor cantidad de mL de biogás acumulado con 166.52 mL N, sin embargo no existe la suficiente evidencia de que la dosis empleada del nanomaterial grafenico represente un potencial efecto de inhibición del proceso de DA.

Tabla 3.16 mL de biogás acumulado (mL N)

OGr 20 min	OGr 1 h	OGr 2 h	Blanco
168.24 ± 0.37	174.22 ± 0.55	167.15 ± 0.51	166.52 ± 0.55

Los resultados del análisis del biogás producido son presentados en la Figura 3.22 en las que se aprecia las proporciones en porcentaje del contenido de metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono presentadas por cada una de las cinéticas realizadas.

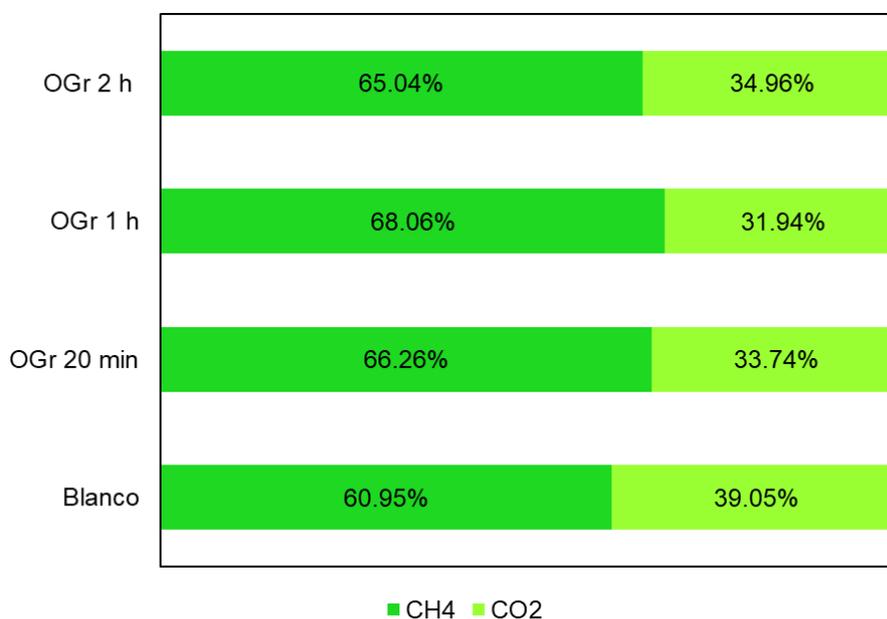


Figura 3.22 Composición de la producción de biogás

A partir de la Figura 3.22 se observa que el biogás producido en las pruebas adicionadas con OGr en todos los casos obtuvieron concentraciones superiores al 65 % de metano contrastando con los resultados obtenidos de la prueba blanco, la cual obtuvo un valor de 60.95 % de metano del biogás producido, de las tres cinéticas adicionadas con MS impregnado con OGr el mayor contenido de metano en su composición la presentó la prueba que contenía MS impregnado con OGr 1 h con un 68.06 % de metano y un 31.94 % de dióxido de carbono, seguido del MS con OGr 20 min que presentó 66.26 % de metano en su composición y finalmente el OGr 2 h con un 65.04 %.

Tabla 3.17 % Aumento de concentración de biometano

OGr 20 min	OGr 1h	OGr 2 h
6.26 %	8.06 %	5.04 %

Significando aumentos en el contenido de metano del biogás producido por las pruebas adicionadas con OGr con respecto a la prueba blanco superiores al 5 % (Ver Tabla 3.18) siendo el aumento más significativo el presentado por la prueba adicionada con MS impregnada con OGr 1 h con un 8.06 %, demostrando así, en base a los resultados presentados previamente el efecto positivo de la adición de nanomaterial de OGr empleado en concentraciones 30 mg / mL no sólo en la producción de una mayor cantidad de biogás mejorando sus rendimientos, si no en la producción de un biogás rico en metano y se observa a su vez en la prueba blanco un buen desempeño del proceso de DA debido al desarrollo de una biopécula anaerobia, lo que significa en el caso de las pruebas adicionadas con nanomateriales un trabajo conjunto entre el consorcio bacteriano y los materiales conductores (OGr).

El monitoreo de los rendimientos de la producción de CH<sub>4</sub> (mL CH<sub>4</sub>/ g DQO<sub>removida</sub>) en las cuatro cinéticas realizadas es mostrada en la Figura 3.23, en la que se puede observar que para todos los casos de las pruebas que fueron adicionadas con OGr presentaron rendimientos superiores al presentado por la prueba que contiene la biopécula desarrollada en el MS sin nanomaterial grafenico impregnado a lo largo de

los días de monitoreo; siendo la prueba adicionada con OGr 1 h la que presentó no sólo una mayor producción de biogás si no un biogás rico en biometano con el mayor rendimiento de mL CH<sub>4</sub>/ g DQO<sub>removida</sub> producidos con respecto a lo obtenido por la prueba blanco, obteniendo 332.11 mL CH<sub>4</sub>/ g DQO<sub>removida</sub>, seguida por la prueba adicionada con OGr 20 min y finalmente el OGr 2 h ( Vert Tabla 3.18) demostrando el efecto positivo en el aprovechamiento y remoción de contaminantes organicos disponible por medio del empleo de un material de soporte poroso como son las matrices poliméricas sintéticas impregnadas con nanomateriales de OGr promotores del mecanismo DIET, a su vez que se comprueba que el grado de reducción de los nanomateriales si afecta el proceso de DA viéndose reflejado en los rendimientos presentados.

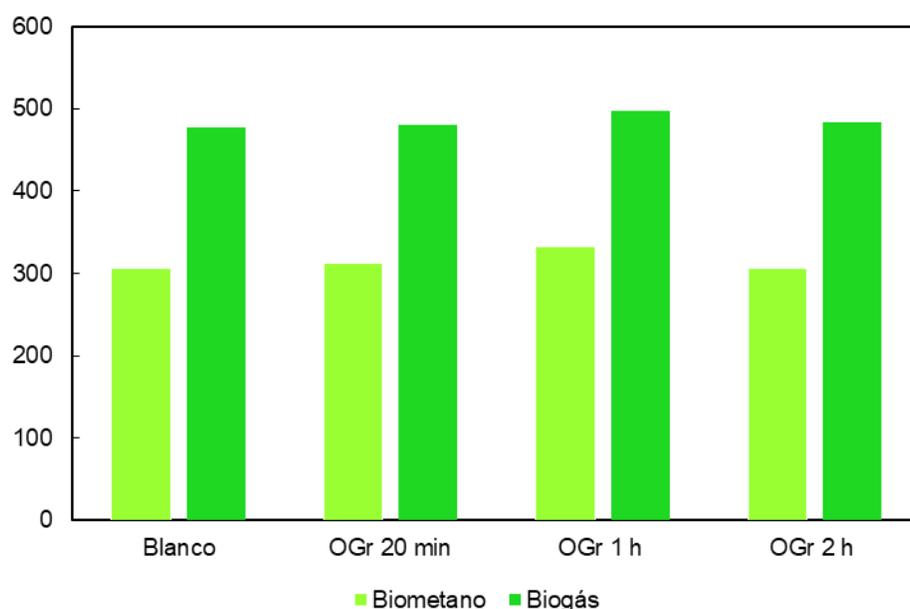


Tabla 3.18 Rendimientos de biogás y biometano.

	OGr 20 min	OGr 1 h	OGr 2 h	Blanco
Biogás	481.28	497.44	483.65	305.87
Biometano	312.04	332.11	306.34	305.87

### Evaluación del Potencial de Producción de metano experimental

Los resultados de la producción de biometano acumulado por gramo de sólidos volátiles agregados para cada una de las cinéticas realizadas de las pruebas de PBM son mostrados en la Figura 3.24, observándose que las pruebas que fueron adicionadas con OGr mostraron una mayor producción de biometano en comparación a la prueba blanco que contenía la biopelícula anaerobia desarrollada en el material de soporte sin la adición de OGr, observándose un incremento relevante ocurrido en la prueba adicionada con OGr 1 h presentando una rápida estabilización presentando una generación de biometano de 430.82 mL N / g SV agregado (Tabla 3.19), seguido de la prueba adicionada con OGr 20 min, OGr 2 h y blanco; las tendencias a una rápida estabilización de las curvas mostradas son atribuidas al empleo de un sustrato fácilmente degradable como lo es la fracción líquida de frutas y verduras, pero principalmente es atribuida a un óptimo desarrollo de una biopelícula anaerobia con presencia de arqueas metanogénicas y su interacción positiva con el OGr adicionado además del empleo de una concentración de 30 mg/mL adecuada (Filer *et al.*, 2019).

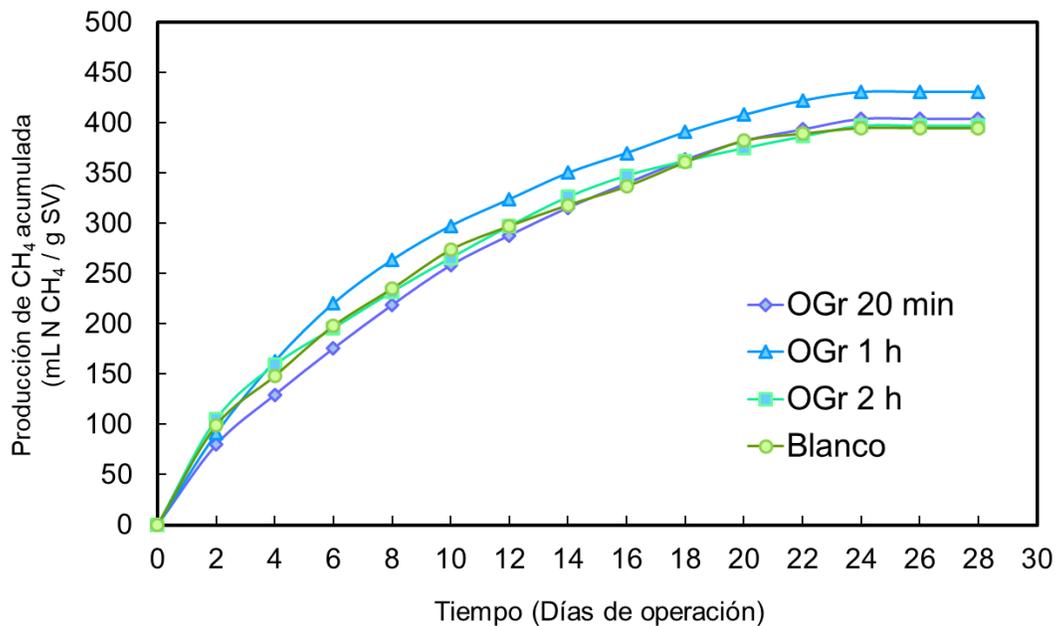


Figura 3.23 Producción de CH<sub>4</sub> acumulado (mL N CH<sub>4</sub>/g SV)

Tabla 3.19 mL N de biometano acumulado / g SV agregados

OGr 20 min	OGr 1 h	OGr 2 h	Blanco
(mL N CH <sub>4</sub> /g SV)			
404	431	397	395

A partir de los resultados obtenidos, se determinó el % de aumento en la producción de metano de las pruebas en las que fueron empleados los materiales grafénicos respecto a la prueba de control “Blanco” mostrados en la Tabla 3.20, destacando el OGr 1 h el cual presentó el mayor aumento en producción de metano, denotando un impacto deseable en la cantidad de metano generado para su aprovechamiento.

Tabla 3.20 % Aumento de producción de metano

OGr 20 min	OGr 1 h	OGr 2 h
2.31 %	9.11 %	0.55 %

Siendo notable el modo de implementación del OGr, en cual a diferencia de los trabajos presentados por autores como Bueno-López *et al.*, (2020), Dong *et al.*, (2019), Casabella-Font *et al.*, (2024) lo cuales aplicaron los nanomateriales aditivos en forma de una solución, mientras que Muratçobanoglu *et al.*, (2021), Dompara *et al.*, (2023), Xie *et al.*, (2020), Wang *et al.*, (2018), Chen *et al.*, (2020) no especifican el modo de adición de los materiales como Nano óxido de grafeno, Nano magnetita, Polvo de grafeno, Polvo de Carbón Activado, Biochar, cobalto, óxido de cobalto (II), óxido de cobalto (II, III) soportado sobre carbono, ya que en el presente trabajo los nanomateriales de OGr fueron implementados mediante la impregnación de MS, ayudando al crecimiento y la formación de biopelículas (Zhang y Tremblay *et al.*, 2020) que esto a su vez previene el lavado de los m.o. encargados del proceso de DA, los protegiéndolos de cambios bruscos en el medio asegurando su supervivencia, reproducción (Mirmohamadsadeghi *et al.*, 2019; Whitehead y Verran, 2015) y

promueve el contacto y la interacción de estos con el OGr favoreciendo el mecanismo DIET acortando los tiempos de estabilización y mejorando los rendimientos (Wang *et al.*, 2021), sin lugar a duda su impregnación en MS representa también una ventaja económica y ecológica ya que se emplea menor cantidad de material aditivo tomando en cuenta la el proceso de producción del OGr y se evita la pérdida del material reteniéndolo en la matriz polimérica no degradable y que estos materiales finalmente terminen en el medio ambiente.

La biodegradabilidad anaerobia experimental de las cuatro cinéticas realizadas es presentada en la tabla 3.21, en la que se observan para todos los casos valores  $\geq 90$  % siendo atribuidos a las características físicas del sustrato, siendo este fácilmente biodegradable debido a la baja cantidad de contenido de partículas lignocelulocicas (Triolo *et al.*, 2012; Cayetano *et al.*, 2021), sin embargo, la cinética adicionada con OGr 1h presentó un 96.28 % de biodegradabilidad del sustrato, siendo la mayor biodegradabilidad con respecto a las demás pruebas, dichos resultados concuerdan con lo reportado en bibliografía en donde se ha reportado que pretratamientos como ultrasonido (Zia *et al.*, 2022), pretratamientos químicos con ozono (Zamri *et al.*, 2021) así como la adición de nanopartículas de Fe- cero Valente (Barrena *et al.*, 2022) y el uso de materiales conductivos como lo es el OGr tiene la posibilidad de mejorar la biodegradabilidad de los sustratos como se observó en la Tabla 3.21, siendo factible su implementación en la DA (Casabella-Font *et al.*, 2024), siendo reforzando lo antes mencionando tomando en consideración que aunque la materia orgánica presente en el sustrato es 100 % biodegradable sólo cerca del 90 % en condiciones normales puede ser transformada en metano ya que el 10 % es utilizado para la producción de masa microbiana (Koch *et al.*, 2020), sin embargo, el hecho de que en la prueba blanco también se presentó una biodegradabilidad cercana al OGr es atribuido a la biopelícula desarrollada en el MS.

Tabla 3.21 % Biodegradabilidad anaerobia experimental

Blanco	OGr 20 min	OGr 1 h	OGr 2 h
95.74	96.10	96.28	96.00

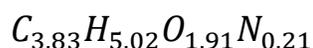
### 3.6.2 Análisis teórico

Los resultados del análisis elemental realizado para conocer la composición química elemental de la fracción líquida de frutas y verduras empleado como sustrato son mostrados a continuación en la Tabla 3.22 en donde se observan el % en peso de cada uno de los elementos.

Tabla 3.22 Análisis elemental de sustrato de F y V.

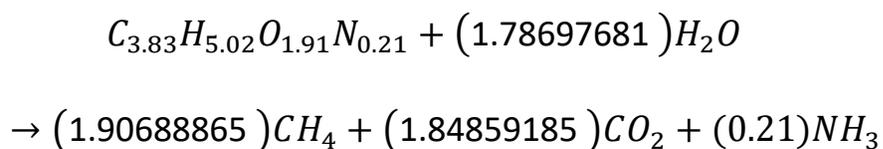
Resultados de la corrida	% N	% C	% H	% S	% O	% Cenizas
a	3.02	46.04	5.01	0.36	30.6414	14.9286
b	3	46.11	5.11	0.37	30.4814	14.9286
Promedio	$3.01 \pm 0.014$	$46.08 \pm 0.04$	$5.06 \pm 0.71$	$0.37 \pm 0.007$	30.5614	$14.9286 \pm 0.06$

A partir de los datos mostrados en la Tabla 3.22, se determinó la fórmula empírica del sustrato de Frutas y Verduras, cuyo contenido de azufre no es significativo por lo que no se consideró en la fórmula.



La ecuación estequiométrica de Symons y Buswell para la fracción líquida de frutas y verduras empleada como sustrato a partir de su composición elemental en la que se representa la reacción del proceso de la DA es mostrada a continuación, en los que la descomposición de un mol de materia orgánica en presencia de 1.78 moles de H<sub>2</sub>O

lleva a la producción de 1.90 moles de CH<sub>4</sub>, 1.84 moles de CO<sub>2</sub> y 0.21 moles de NH<sub>3</sub> (Nielfa y Polanco., 2015; Bres *et al.*, 2022; Yasim y Buyong, 2023)



Debido a la importancia del contenido de nutrientes para la conservación y crecimiento del consorcio bacteriano responsable del proceso de DA, la proporción de elementos como el C y N son parte sustancial de las caracterizaciones realizadas a los sustratos empleados como alimento para los m.o. anaerobios, donde la cantidad de nitrógeno presente en los residuos representa un factor crucial en la producción de biogás ya que mientras el carbono sirve para la obtención de energía, el nitrógeno es empleado para la construcción de estructuras celulares (Mirmohamadsadeghi *et al.*, 2019; Jain *et al.*, 2015) por lo que a partir de los resultados del análisis elemental, se determinó la relación elemental /N, mostrada a continuación en la Tabla 3.23, en la que la Fracción Líquida de Frutas y Verduras empleada como sustrato en las pruebas de PBM presentó una relación C/N de 17.85/1, similar a la relación 15.6/1 reportada por Lin *et al.*, (2011) en la caracterización de residuos de FyV, asimismo de la obtenida por Shen *et al.*, (2013) reportando una relación 18.88/1 y que además se encuentra dentro del rango de la relación C/N de 15.2-18.9 / 1 reportado por Xu *et al.*, (2018) para residuos de Frutas y Verduras.

Tabla 3.23 Relación elemental de N

Relación molar respecto N		
C	<b>17.8507106</b>	<b>C/N</b>
H	23.3629811	H/N
O	8.88893516	O/N
N	1	N/N
S	0.05297012	S/N

Con respecto a lo presentado en la Tabla 3.23, autores como Zamri *et al.*, (2021), Salgado-Hernández, (2022), Jain *et al.*, (2015), Zia *et al.*, (2022), entre otros, reportan una relación óptima de C/N = de 20-35/1 para el proceso de DA, siendo ligeramente inferior al rango óptimo para la relación C/N, ya que si este parámetro se encuentra por debajo de dichos valores, eso resulta en una utilización insuficiente de los recursos de carbono pudiendo generar una alta liberación de nitrógeno amoniacal total o una acumulación de AGV's, los cuales si bien son agentes intermediarios importantes también se consideran posibles inhibidores del proceso de la DA cuando estos se acumulan, sin embargo, algunas veces esa relación no es considerada como un factor limitante para el proceso ya que aditivos como el OGr ayudan a superar obstáculos como la acidificación del medio en la DA por acumulación de AGV's.

Los resultados de las determinaciones del PBM teórico obtenido en base a la composición elemental y la composición de la DQO, así como los % IBD respectivos son mostrados en la Tabla 3.24 donde son comparados respecto a los resultados obtenidos experimentalmente, al tratarse del mismo sustrato empleado y a las técnicas de estimación, se obtuvieron el mismo valor de  $PBM_{TAE}$  para las cuatro cinéticas realizadas, siendo el mismo caso para  $PBM_{TDQO}$ . Dichos resultados mostraron una sobre estimación del potencial de generación de metano en ambos casos, siendo el método de  $PBM_{TDQO}$  que muestra una menor confiabilidad en la estimación de la generación de metano ya que se obtuvieron los porcentajes de error más altos en comparación al método realizado por medio de composición elemental, siendo esto una limitante en el empleo de ambos métodos ya que asumen la conversión total de la materia orgánica para la producción de biogás (Achinas y Euverink, 2016; Nielfa *et al.*, 2015) y presentan valores muy distantes, además de % de error considerables.

Tabla 3.24 Resultados experimentales y teóricos del PBM

	Experimental		Composición Elemental				Composición DQO			
	PBM <sub>exp</sub> (mL CH <sub>4</sub> N/ g SV)	% IBD	PBM <sub>T</sub> (mL CH <sub>4</sub> N/ g SV)	% IB	% Error	FC	PBM <sub>T</sub> (mL CH <sub>4</sub> N/ g SV)	% IBD	% Error	FC
<b>Blanco</b>	395	95.74	523	75.5	-32.37	0.75	734.79	53.75	-86.02	0.53
<b>OGr<sub>20min</sub></b>	404	96.10	523	77.2	-29.42	0.77	734.79	54.98	-81.88	0.54
<b>OGr<sub>1 h</sub></b>	431	96.28	523	82.4	-21.32	0.82	734.79	58.65	-70.48	0.58
<b>OGr<sub>2 h</sub></b>	397	96	523	75.9	-31.71	0.75	734.79	54.02	-85.08	0.54

PBM<sub>exp</sub>: Potencial Bioquímico de metano experimental, PBM<sub>T</sub>: Potencial Bioquímico de Metano Teórico, IB: Índice de biodegradabilidad, FC: Factor de Corrección.

De acuerdo a los resultados del % IBD, las cinéticas adicionadas con OGr 1 h, seguidas de las adicionadas del OGr 20 min presentaron el mayor % IBD en ambos casos teóricos coincidiendo con la tendencia mostrada en los datos experimentales, sin embargo, dichos datos aún se encuentran lejos de los valores experimentales, aunque de acuerdo al % de error que muestra la desviación entre los valores obtenidos de PBM<sub>exp</sub> y PBM<sub>T</sub>, el método basado en el análisis de la composición elemental es el que presentó menor error respecto a los resultados experimentales contrastando con los resultados obtenidos del método empleado en la composición DQO, mostrando un caso similar a lo reportado por Nielfa *et al.*, (2015), debido a lo anterior mencionado se realizó la determinación de los factores de corrección de datos teóricos esto con el fin de obtener estimaciones más precisas a los determinados experimentalmente.

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos por medio de las técnicas de caracterización de los nanomateriales de OGr se concluye que existe evidencia de la obtención del material de OGr a diferentes grados de reducción a partir de grafito técnico. Los resultados obtenidos de las caracterizaciones realizadas a los OGr pueden ser comparados con valores reportados en bibliografía, los cuales demostraron que los nanomateriales OGr 20 seguido del OGr 1 h presentan mayor reactividad principalmente localiza en los bordes debido a la presencia en mayor cantidad del grupo carboxilo, además de una relación directamente proporcional en cuanto al grado de reducción y tamaño de partícula, a mayor grado de reducción se presenta un mayor tamaño de partícula debido al re apilamiento de láminas de OGr.

Los OGr en sus diferentes grados de reducción demostraron tener impactos positivos en el proceso de digestión anaerobia ayudando a alcanzar la estabilización del proceso de inoculación en periodos más cortos así como en alcanzar remociones significativas de DQO, además se demostró su eficiencia ayudando a superar uno de los obstáculos de la DA ya que por las características del sustrato empleado presenta una rápida producción de AGV's además de una relación C/N por debajo de la relación óptima provocando la acidificación del medio, por lo que la adición de los nanomateriales demostró ayudar en la estabilización del pH siendo esto un indicador de su impacto positivo, aunado a eso, la implementación de los nanomateriales impregnados en materiales de soporte a una concentración de 30 mg/mL presentaron beneficios importantes ya que demostraron una interacción favorable al crecimiento y supervivencia del consorcio bacteriano reflejado en el aumento en el volumen de inóculo inicial y a la MVA determinada, lo que contribuyó una rápida estabilización del proceso de DA.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas de PBM se observó una estimulación en la producción de biogás en presencia de los materiales de soporte impregnados con OGr al día 28 con respecto a las pruebas blanco, sin embargo se

demonstró que el grado de reducción del material OGr si tiene influencia sobre el proceso de DA reflejado en la producción de biometano, ya que las pruebas en las que se implementó el MS impregnado con OGr 1 h presentaron la producción de biogás más alta (431 mL N/ g SV) con un mayor contenido de CH<sub>4</sub> (68.06 %) así como un % IBD (96.28) mayor a los presentados en las pruebas con MS impregnado con OGr 20 min en cuanto al volumen de biogás producido (403.96 mL N/ gSV) contenido de metano (66 %) y el % IBD (96.10), representando la implementación del OGr 1 h una ventaja donde su impregnación en MS ayuda no sólo a promover el contacto directo con los microorganismos y evitar el lavado de estos mismos si no a el uso de cantidades más pequeñas y evitar su pérdida fuera del digestor, impactando en la economía del proceso así como evitando la contaminación del medio ambiente.

Los análisis teóricos de PBM no fueron representativos de los resultados experimentales obtenidos ya que presentaron sobre estimaciones importantes así como % de error considerables y valores muy alejados de los % IBD obtenidos experimentalmente esto es atribuido a la metodología ya que al ser el mismo sustrato empleado en todos los casos siendo la única variable de estudió la influencia del OGr implementado, por lo que las metodologías teóricas en base a resultados de análisis elemental y DQO no representaron los valores de la experimentación.

De acuerdo a lo antes mencionado, se considera factible el empleo del OGr en especial el OGr 20 min como mejorador del proceso de DA permitiendo una recuperación eficiente de energía de los residuos de frutas y verduras encaminado hacia un enfoque de economía circular.

## RECOMENDACIONES

### 1. Exfoliación

Después del análisis realizado a los resultados de la caracterización de los nanomateriales obtenidos donde se observó una aglomeración de material grafénico y una tendencia al re empalamiento del OG se recomienda la sustitución del baño de ultrasonido por un equipo de punta ultrasónica para la correcta exfoliación del og y así obtener un OGr de mayor calidad previniendo aglomeraciones.

### 2. Rendimientos de OGr

Se recomienda el uso de un embudo de poro ultra fino (4-5.5 micras) o en su defecto un embudo de poro G-3 (30 mm) de un volumen de 500 mL para el lavado, separación y recuperación de material grafénicos, ya que se observó que a menor tamaño de poro y mayor capacidad del embudo se presenta un mayor rendimiento de material de OGr en comparación de cuando fue empleado un embudo de 60 mL poro G-3 que fue utilizado inicialmente donde los rendimientos más altos fueron del 59 %, además de significar un ahorro de tiempo y cantidad de agua destilada utilizada para el lavado del material.

A su vez, se recomienda el empleo de una bomba de vacío en óptimas condiciones para acortar los tiempos de lavado y filtración de materiales, además de ser cuidadosos con el material de OGr seco debido a que las principales perdidas de material ocurren en las etapas posteriores al secado ya que presenta estática y el material suele “saltar”.

### 3. Concentración de OGr en la impregnación

Se recomienda el análisis de una concentración óptima en la impregnación del MS con el nanomaterial de OGr 1 h mediante un diseño de experimentos variando las concentraciones empleadas.

---

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelwahab, T. A. M., Mohanty, M. K., Sahoo, P. K., y Behera, D. 2020. Application of nanoparticles for biogas production: Current status and perspectives. *Energy sources, part a: recovery, utilization, and environmental Effects*. 1-13.

<https://doi.org/10.1080/15567036.2020.1767730>

Achinas, S., y Euverink, G. J. W. 2016. Theoretical analysis of biogas potential prediction from agricultural waste. *Resource-Efficient Technologies*. **2**(3):143-147.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reffit.2016.08.001>

Agarwal, V., y Zetterlund, P. B. 2021. Strategies for reduction of graphene oxide—A comprehensive review. *Chemical Engineering Journal*. **405**:127018.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127018>

Ajay, C. M., Mohan, S., Dinesha, P., y Rosen, M. A. 2020. Review of impact of nanoparticle additives on anaerobic digestion and methane generation. *Fuel*. 277:118234. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118234>

Alabid, K. I., Nasser, H. N., y Maleh, H. K. 2022. Reduction of Graphene Oxide by New Chemical and Green Methods. *Journal of Ultrafine Grained and Nanostructured Materials*. **55**(2):172-185. doi: 10.22059/jufgnsm.2022.02.09

Alam, S. N., Sharma, N., y Kumar, L. 2017. Synthesis of graphene oxide (GO) by modified hummers method and its thermal reduction to obtain reduced graphene oxide (rGO). *Graphene*. **6**(1):1-18. doi: 10.4236/graphene.2017.61001

Alimohammadi, M., y Demirer, G. N. 2022. Upgrading Anaerobic Sludge Digestion by Using an Oil Refinery By-Product. *Sustainability*. **14**(23):1-12.

<https://doi.org/10.3390/su142315693>

Alkhouzaam, A., Qiblawey, H., Khraisheh, M., Atieh, M., y Al-Ghouti, M. 2020. Synthesis of graphene oxides particle of high oxidation degree using a modified Hummers method. *Ceramics International*. **46**(15):23997-24007.

<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.06.177>

Báez, D. F. 2023. Graphene-Based Nanomaterials for Photothermal Therapy in Cancer Treatment. *Pharmaceutics*. **15**(9):2286.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092286>

Baniamerian, H., Isfahani, P. G., Tsapekos, P., Alvarado-Morales, M., Shahrokhi, M., Vossoughi, M., y Angelidaki, I. 2019. Application of nano-structured materials in anaerobic digestion: Current status and perspectives. *Chemosphere*. **229**:188-199.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.193>

Barrena, R., Moral-Vico, J., Font, X., y Sánchez, A. 2022. Enhancement of anaerobic digestion with nanomaterials: A mini review. *Energies*. **15**(14):5087.

<https://doi.org/10.3390/en15145087>

Bres, P. A., Beily, M. E., y Crespo, D. E. 2022. Ensayo potencial bioquímico metanogénico: una metodología clave para estimar la energía de las biomásas. *Ediciones INTA*. ISBN 978-987-679-321-6

Bueno-López, J. I., Díaz-Hinojosa, A., Rangel-Mendez, J. R., Alatraste-Mondragón, F., Pérez-Rodríguez, F., Hernández-Montoya, V., y Cervantes, F. J. 2020. Methane production enhanced by reduced graphene oxide in an anaerobic consortium supplied with particulate and soluble substrates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. **95**(11):2983-2990. doi 10.1002/jctb.6459

Cárdenas-Cleves, L. M., Parra-Orobio, B. A., Torres-Lozada, P., y Vásquez-Franco, C. H. 2016. Perspectivas del ensayo de Potencial Bioquímico de Metano-PBM para el control del proceso de digestión anaerobia de residuos. *Revista Ion*. **29**(1): 95-108. Universidad Industrial de Santander

Casabella-Font, O., Riva, M., Balcázar, J. L., Radjenovic, J., y Pijuan, M. 2024. Distinctive effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on methane production kinetics and pharmaceuticals removal in anaerobic reactors. *Bioresource Technology*. **403**:130849. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121343>

Cassani, L., y Gomez-Zavaglia, A. 2022. Sustainable food systems in fruits and vegetables food supply chains. *Frontiers in Nutrition*. **9**:829061.  
doi: 10.3389/fnut.2022.829061

Cayetano, R. D. A., Kim, G. B., Park, J. H., Lee, M. J., y Kim, S. H. 2021. Anaerobic digestion of waste activated sludge using dynamic membrane at varying substrate concentration reveals new insight towards methanogenic pathway and biofilm formation. *Chemical Engineering Journal*. **423**:130249.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130249>

Cayetano, R. D. A., Kim, G. B., Park, J., Yang, Y. H., Jeon, B. H., Jang, M., y Kim, S. H. 2022. Biofilm formation as a method of improved treatment during anaerobic digestion of organic matter for biogas recovery. *Bioresource technology*. **344**:126309.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126309>

Chen, J., Yun, S., Shi, J., Wang, Z., Abbas, Y., Wang, K., Han, F., Jia, B., Xu, H., Xing, T., y Li, B. 2020. Role of biomass-derived carbon-based composite accelerants in enhanced anaerobic digestion: focusing on biogas yield, fertilizer utilization, and density functional theory calculations. *Bioresource technology*. **307**:123204.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123204>

Colom, X., Cañavate, J., Lis, M. J., Sanjuan, G., y Gil, I. 2020. Análisis estructural de Óxidos de Grafeno (GO) y Óxidos de Grafeno reducidos (rGO). *Afinidad*. **77**(591): 167-174. <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/377162>

Coros, M., Pogacean, F., Turza, A., Dan, M., Berghian-Grosan, C., Pana, I. O., y Pruneanu, S. 2020. Green synthesis, characterization and potential application of

reduced graphene oxide. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*. **119**:113971. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2020.113971>

Corrales, L. C., Antolínez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A., y Corredor Vargas, A. M. 2015. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*. **13**(24):55-81.

Dang, Y., Sun, D., Woodard, T. L., Wang, L. Y., Nevin, K. P., y Holmes, D. E. 2017. Stimulation of the anaerobic digestion of the dry organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) with carbon-based conductive materials. *Bioresource technology*. **238**: 30-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.021>

De la Luz-Asunción, M., Sánchez-Mendieta, V., Martínez-Hernández, A. L., Castaño, V. M., y Velasco-Santos, C. 2015. Adsorption of phenol from aqueous solutions by carbon nanomaterials of one and two dimensions: Kinetic and equilibrium studies. *Journal of Nanomaterials*. **16**(1):422-422.

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/405036>

Deepa, C., Rajeshkumar, L., y Ramesh, M. 2022. Preparation, synthesis, properties and characterization of graphene-based 2D nano-materials for biosensors and bioelectronics. *Journal of Materials Research and Technology*. **19**:2657-2694.

<https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.06.023>

Dompara, I., Maragkaki, A., Papastefanakis, N., Floraki, C., Vernardou, D., y Manios, T. 2023. Effects of Different Materials on Biogas Production during Anaerobic Digestion of Food Waste. *Sustainability*. **15**(7):5698. <https://doi.org/10.3390/su15075698>

Dong, B., Xia, Z., Sun, J., Dai, X., Chen, X., y Ni, B. J. 2019. The inhibitory impacts of nano-graphene oxide on methane production from waste activated sludge in anaerobic digestion. *Science of the Total Environment*. **646**:1376-1384.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.424>

Edwiges, T., Frare, L. M., Alino, J. H. L., Triolo, J. M., Flotats, X., y de Mendonça Costa, M. S. S. 2020. Methane potential of fruit and vegetable waste: an evaluation of the semi-continuous anaerobic mono-digestion. *Environmental technology*.

<https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1515262>

Edwiges, T., Frare, L., Mayer, B., Lins, L., Triolo, J. M., Flotats, X., y de Mendonça Costa, M. S. S. 2018. Influence of chemical composition on biochemical methane potential of fruit and vegetable waste. *Waste Management*. **71**:618-625.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.030>

ElMekawy, A., Hegab, H. M., Losic, D., Saint, C. P., y Pant, D. 2017. Applications of graphene in microbial fuel cells: the gap between promise and reality. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **72**:1389-1403.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.10.044>

Emiru, T. F., y Ayele, D. W. 2017. Controlled synthesis, characterization and reduction of graphene oxide: A convenient method for large scale production. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. **4**(1):74-79.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbas.2016.11.002>

Fauzi, F., Azizi, F., Musawwa, M. M., y Dwandaru, W. S. B. 2021. Synthesis and Characterisations of Reduced Graphene Oxide Prepared by Microwave Irradiation with Sonication. *Journal of Physical Science*. **32**(2):1-13.

<https://doi.org/10.21315/jps2021.32.2.1>

Filer, J., Ding, H. H., y Chang, S. 2019. Biochemical methane potential (BMP) assay method for anaerobic digestion research. *Water*. **11**(5):921. doi: 10.3390/w11050921

Gahlot, P., Ahmed, B., Tiwari, S. B., Aryal, N., Khursheed, A., Kazmi, A. A., y Tyagi, V. K. 2020. Conductive material engineered direct interspecies electron transfer (DIET) in anaerobic digestion: mechanism and application. *Environmental Technology & Innovation*. **20**:101056. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101056>

Garcia-Peña, E. I., Parameswaran, P., Kang, D. W., Canul-Chan, M., y KrajmalnikBrown, R. 2011. Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: process and microbial ecology. *Bioresource Technology*. **102**(20):9447-9455. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.068

Hafner, S. D., Astals, S., Buffiere, P., Løjborg, N., Holliger, C., Koch, K., y Weinrich, S. 2020. Calculation of Methane Production from Manometric Measurements. *Standard BMP Methods Document*. **202**.

Hidayah, N. M. S., Liu, W. W., Lai, C. W., Noriman, N. Z., Khe, C. S., Hashim, U., y Lee, H. C. 2017. Comparison on graphite, graphene oxide and reduced graphene oxide: Synthesis and characterization. In AIP conference proceedings. *AIP Publishing*. **1892**(1).

Holliger, C.; Alves, M.; Andrade, D.; Angelidaki, I.; Astals, S.; Baier, U.; Bougrier, C.; Buffière, P.; Carballa, M.; De Wilde, V.; et al., 2016. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Science and Technology*. **74**(11):2515-2522. doi: 10.2166/wst.2016.336

Holliger, C., Astals, S., de Laclos, H. F., Hafner, S. D., Koch, K., y Weinrich, S. 2021. Towards a standardization of biomethane potential tests: a commentary. *Water Science and Technology*. **83**(1):247-250. doi: 10.2166/wst.2020.569

Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable. s.f. Comisión Nacional de Energía Atómica. Recuperado el 2023, de Sistemas bioelectroquímicos aplicados a la remediación de efluentes y producción de energía. <https://www.argentina.gob.ar/cnea/ieds/proyectos-en-bioenergia-y-biorremediacion/sistemas-bioelectroquimicos-para-la-remediacion>

Jadhav, P., Muhammad, N., Bhuyar, P., Krishnan, S., Abd Razak, A. S., Zularisam, A. W., y Nasrullah, M. 2021. A review on the impact of conductive nanoparticles (CNPs in

anaerobic digestion: Applications and limitations. *Environmental Technology & Innovation*. **23**:101526. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101526>

Jain, S., Jain, S., Wolf, I. T., Lee, J., y Tong, Y. W. 2015. A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestión of municipal solid waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **52**:142-154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.091>

Kaushal, R., y Baitha, R. 2018. Biogas and methane yield enhancement using graphene oxide nanoparticles and Ca (OH)<sub>2</sub> pre-treatment in anaerobic digestion. *International Journal of Ambient Energy*. **42**(6):618-625. <https://doi.org/10.1080/01430750.2018.1562975>

Kaza, S., Yao, L., Bhada-Tata, P., y Van Woerden, F. 2018. What a waste 2.0: a global snapshot of solid waste management to 2050. *World Bank Publications*.

Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., y Dawson, L. 2011. The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste management*. **31**(8):1737-1744. doi:10.1016/j.wasman.2011.03.021

Koch K, Hafner SD, Weinrich S, Astals S and Holliger C. 2020. Power and Limitations of Biochemical Methane Potential (BMP) Tests. *Frontiers in energy research*. **8**:63. doi:10.3389/fenrg.2020.00063

Koch, K., Fernández, Y. B., y Drewes, J. E. 2015. Influence of headspace flushing on methane production in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Bioresource Technology*. **186**:173-178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.071>

Kotsyubynsky, V. O., Boychuk, V. M., Budzuliak, I. M., Rachiy, B. I., Zapukhlyak, R. I., Hodlevska, M. A., Kachmar, A.I., Biologubka, O.R. y Malakhov, A. A. 2021. Structural Properties of Graphene Oxide Materials Synthesized Accordingly to Hummers, Tour and Modified Methods: XRD and Raman Study. *Physics and Chemistry of Solid State*. **22**(1):31-38. doi: 10.15330/pcss.22.1.31.38

Kumar, N., Salehiyan, R., Chauke, V., Botlhoko, O. J., Setshedi, K., Scriba, Masukume M. y Ray, S. S. 2021a. Top-down synthesis of graphene: A comprehensive review. *FlatChem*. **27**:100224. <https://doi.org/10.1016/j.flatc.2021.100224>

Kumar, S. S., Ghosh, P., Kataria, N., Kumar, D., Thakur, S., Pathania, D., Kumar V., Nasrullah M., y Singh, L. 2021b. The role of conductive nanoparticles in anaerobic digestion: Mechanism, current status and future perspectives. *Chemosphere*. **280**: 130601. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130601>

Kusrini, E., Suhrowati, A., Usman, A., Khalil, M., y Degirmenci, V. 2019. Synthesis and characterization of graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide from graphite waste using modified hummers' method and zinc as reducing agent. *Synthesis*. **10**(6):1093-1104. doi: 10.14716/ijtech.v10i6.3639

Lin, J., Zuo, J., Gan, L., Li, P., Liu, F., Wang, K., Chen, L., y Gan, H. 2011. Effects of mixture ratio on anaerobic co-digestion with fruit and vegetable waste and food waste of China. *Journal of Environmental Sciences*. **23**(8):1403-1408. doi: 10.1016/S1001-0742(10)60572-4

Lin, R., Cheng, J., Zhang, J., Zhou, J., Cen, K., y Murphy, J. D. 2017. Boosting biomethane yield and production rate with graphene: The potential of direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion. *Bioresource technology*. **239**:345-352. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.017>

Loryuenyong, V., Totepvimarn, K., Eimburanaprat, P., Boonchompoo, W., y Buasri, A. 2013. Preparation and characterization of reduced graphene oxide sheets via water-based exfoliation and reduction methods. *Advances in Materials Science and Engineering*. **2013**(1):923403. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/923403>

Lunavictoria Beltrán, M. Á. 2020. Síntesis y caracterización de óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. <http://dspace.espech.edu.ec/handle/123456789/14311>

Marcano, D. C., Kosynkin, D. V., Berlin, J. M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., Alemany, L. B., Lu W. y Tour, J. M. 2010. Improved synthesis of graphene oxide. *ACS nano*. **4**(8):4806-4814. doi: 10.1021/nn1006368

Mata-Marquez, J. A. 2020. Síntesis y caracterización de óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido y su aplicación en fotocatalisis. Proyecto de Titulación de Licenciatura, IPN-ESIQUE.

Mirmohamadsadeghi, S., Karimi, K., Tabatabaei, M., y Aghbashlo, M. 2019. Biogas production from food wastes: A review on recent developments and future perspectives. *Bioresource Technology Reports*. **7**:100202.

Muratçobanoğlu, H., Gökçek, Ö. B., Mert, R. A., Zan, R., y Demirel, S. 2021. The impact of reduced graphene oxide (rGO) supplementation on cattle manure anaerobic digestion: Focusing on process performance and microbial syntrophy. *Biochemical Engineering Journal*. **173**:108080. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100202>

Nanda, S., y Berruti, F. 2021. Municipal solid waste management and landfilling technologies: a review. *Environmental chemistry letters*. **19**(2):1433-1456. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01100-y>

Nielfa, A., Cano, R., y Fdz-Polanco, M. 2015. Theoretical methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge. *Biotechnology Reports*. **5**:14-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.005>

Olorunkosebi, A. A., Eleruja, M. A., Adedeji, A. V., Olofinjana, B., Fasakin, O., Omotoso, E., Oyedotun, K.O., Ajayi E.O.B., y Manyala, N. 2021. Optimization of graphene oxide through various Hummers' methods and comparative reduction using green approach. *Diamond and Related Materials*. **117**:108456. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2021.108456>

Orduña Gaytán, F., y Alvarado Lassman, A. 2023. Tratamiento Híbrido de Aguas Residuales de la Industria Azucarera en un Biorreactor Anaerobio para la Producción

de Biogás Combinado con Sistemas Ecológicos. Tesis doctoral. Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Orizaba.

Orduña Gaytán, F., Vallejo Cantú, N. A., y Alvarado Lassman, A. 2018. Evaluación de la remoción de contaminantes en humedales artificiales sembrados en monocultivo con plantas ornamentales utilizando el efluente de un reactor anaerobio. Tesis de maestría. TecNM campus Orizaba.

Papargyropoulou, E., Lozano, R., Steinberger, J. K., Wright, N., y bin Ujang, Z. 2014. The food waste hierarchy as a framework for the management of food surplus and food waste. *Journal of cleaner production*. **76**:106-115.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.04.020>

Pererva, Y., Miller, C. D., y Sims, R. C. 2020. Existing empirical kinetic models in biochemical methane potential (BMP) testing, their selection and numerical solution. *Water*. **12**(6):1831. <https://doi.org/10.3390/w12061831>

Ramos-Galicia, L., Reyes-Vazquez, C. D., Martínez-Hernández, A. L., RodríguezGonzález, J. A., Rubio-González, C., Almendarez-Camarillo, A., y Velasco-Santos, C. 2021. Performance of Graphene Derivatives Produced by Chemical and Physical Methods as Reinforcements in Glass Fiber Composite Laminates. *Applied Composite Materials*. **28**:923-949. <https://doi.org/10.1007/s10443-021-09895-x>

Richen, L., y Murphy, J. 2021. European Commission. Recuperado el 2023, La digestión anaeróbica potenciada con grafeno aumenta sustancialmente el potencial de producción de biogas. <https://ec.europa.eu/research-andinnovation/es/projects/success-stories/all/la-digestion-anaerobica-potenciada-congrafeno-aumenta-sustancialmente>.

Sachdeva, H. 2020. Recent advances in the catalytic applications of GO/rGO for green organic synthesis. *Green Processing and Synthesis*. **9**(1):515-537.

<https://doi.org/10.1515/gps-2020-0055>

Sadhukhan, S., Ghosh, T. K., Rana, D., Roy, I., Bhattacharyya, A., Sarkar, G., Chakraborty, M., y Chattopadhyay, D. 2016. Studies on synthesis of reduced graphene oxide (RGO) via green route and its electrical property. *Materials Research Bulletin*. **79**:41-51. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.materresbull.2016.02.039>

Salgado-Hernández, E., Ortiz-Ceballos, Á. I., Martínez-Hernández, S., RosasMendoza, E. S., Dorantes-Acosta, A. E., Alvarado-Vallejo, A., y Alvarado-assman, A. 2022. Methane production of sargassum spp. biomass from the mexican caribbean: solid–liquid separation and component distribution. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **20**(1):219. <https://doi.org/10.3390/ijerph20010219>

Sánchez-Reyes, C., Patiño-Iglesias, M. E., Alcántara-Flores, J. L., Reyes-Ortega, Y., Pérez-Cruz, M. A., y Ortíz-Muñoz, E. 2016. Determinación del potencial bioquímico de metano (PBM) de residuos de frutas y verduras en hogares. *Revista internacional de contaminación ambiental*. **32**(2):191-198. doi: 10.20937/RICA.2016.32.02.05

Santamaría-Juárez, G., Gómez-Barojas, E., Quiroga-González, E., Sánchez-Mora, E., Quintana-Ruiz, M., y Santamaría-Juárez, J. D. 2020. Safer modified Hummers' method for the synthesis of graphene oxide with high quality and high yield. *Materials Research Express*. **6**(12):125631. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab4cbf>

Sanz Tejedor, A. s.f. Química Orgánica Industrial. (Universidad de Valladolid) Recuperado el 2023, de La industria de los agentes tesoactivos: <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-10.php>

SEMARNAT. 2017. Residuos Sólidos Urbanos y de Manejo Especial. Obtenido de Introducción al tema de manejo de residuos: [http://www.gob.mx/semarnat/acciones-yprogramas//residuos-solidos-urbanos-y-demanejoespecial\\$:~:text=Los%20RSU%20son%20los%20generados,en%20la%20v%C3%ADa%20p%C3%BAblica%20que](http://www.gob.mx/semarnat/acciones-yprogramas//residuos-solidos-urbanos-y-demanejoespecial$:~:text=Los%20RSU%20son%20los%20generados,en%20la%20v%C3%ADa%20p%C3%BAblica%20que)

Sharma, K. D., y Jain, S. 2020. Municipal solid waste generation, composition, and management: the global scenario. *Social responsibility journal*. **16**(6):917-948. doi: 10.1108/SRJ-06-2019-0210

Shen, F., Yuan, H., Pang, Y., Chen, S., Zhu, B., Zou, D., Liu, Y., Ma, J., Yu, L., y Li, X. 2013. Performances of anaerobic co-digestion of fruit & vegetable waste (FVW) and food waste (FW): single-phase vs. two-phase. *Bioresource technology*. **144**:80-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.099>

Shen, J., Hu, Y., Shi, M., Lu, X., Qin, C., Li, C., e Ye, M. 2009. Fast and facile preparation of graphene oxide and reduced graphene oxide nanoplatelets. *Chemistry of materials*. **21**(15):3514-3520. doi:10.1021/cm901247t.

Shin, Y., Lee, J., Yang, J., Park, J., Lee, K., Kim, S., Park Y., y Lee, H. 2014. Mass production of graphene quantum dots by one-pot synthesis directly from graphite in high yield. *Small*. **10**(5):866-870. doi: 10.1002/smll.201302286

Shojaeenezhad, S. S., Farbod, M., y Kazeminezhad, I. 2017. Effects of initial graphite particle size and shape on oxidation time in graphene oxide prepared by Hummers' method. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. **2**(4):470-475. doi:10.1016/j.jsamd.2017.09.003.

Singh, J., Jindal, N., Kumar, V., y Singh, K. 2023. Role of green chemistry in synthesis and modification of graphene oxide and its application: A review study. *Chemical Physics Impact*. **6**:100185. doi: 10.1016/j.chphi.2023.100185

Smith, A. T., LaChance, A. M., Zeng, S., Liu, B., y Sun, L. 2019. Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites. *Nano Materials Science*. **1**(1):31-47. <https://doi.org/10.1016/j.nanoms.2019.02.004>.

Solano De La Cruz, V., Vallejo Cantú, N. A., y Alvarado Lassman, A. 2020. Tratamiento de un agua residual azucarera utilizando un sistema híbrido (digestión anaerobiahumedal construido) (Doctoral dissertation, TecNM campus Orizaba).

Stankovich, S., Piner, R. D., Nguyen, S. T., y Ruoff, R. S. 2006. Synthesis and exfoliation of isocyanate-treated graphene oxide nanoplatelets. *Carbon*. **44**(15):3342-3347.

Tabandeh-Khorshid, M., Kumar, A., Omrani, E., Kim, C., y Rohatgi, P. 2020. Synthesis, characterization, and properties of graphene reinforced metal-matrix nanocomposites. *Composites Part B: Engineering*. **183**:107664.  
doi:10.1016/j.compositesb.2019.107664.

Tian, T., Qiao, S., Li, X., Zhang, M., y Zhou, J. 2017. Nano-graphene induced positive effects on methanogenesis in anaerobic digestion. *Bioresource technology*. **224**:41-47.  
doi:10.1016/j.biortech.2016.10.058.

Trikkaliotis, D. G., Christoforidis, A. K., Mitropoulos, A. C., y Kyzas, G. Z. 2021. Graphene oxide synthesis, properties and characterization techniques: a comprehensive review. *ChemEngineering*. **5**(3):64.  
<https://doi.org/10.3390/chemengineering5030064>

Triolo, J. M., Pedersen, L., Qu, H., y Sommer, S. G. 2012. Biochemical methane potential and anaerobic biodegradability of non-herbaceous and herbaceous phytomass in biogas production. *Bioresource technology*. **125**:226-232.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.079>

Ueda, J. M., Pedrosa, M. C., Heleno, S. A., Carcho, M., Ferreira, I. C., y Barros, L. 2022. Food additives from fruit and vegetable by-products and bio-residues: a comprehensive review focused on sustainability. *Sustainability*. **14**(9):5212.  
<https://doi.org/10.3390/su14095212>

Wang, B. 2016. Factors that influence the biochemical methane potential (BMP) test: Steps towards the standardisation of BMP test. Tesis Doctoral. Faculty of Engineering, Lund University

Wang, G., Li, Q., Gao, X., y Wang, X. C. 2018. Synergetic promotion of syntrophic methane production from anaerobic digestion of complex organic wastes by biochar: Performance and associated mechanisms. *Bioresource technology*. **250**:812-820. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.004>

Wang, P., Zheng, Y., Lin, P., Li, J., Dong, H., Yu, H., Qi L., Ren, L. 2021. Effects of graphite, graphene, and graphene oxide on the anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste: Attention to methane production and the fate of antibiotic resistance genes. *Bioresource Technology*. **339**:125585. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125585>

Whitehead, K. A., y Verran, J. 2015. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Current Opinion in Food Science*. **2**:84-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.02.003>

Wu, Y., Wang, S., Liang, D., y Li, N. 2020. Conductive materials in anaerobic digestion: From mechanism to application. *Bioresource technology*. **298**:122403. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122403

Xie, S., Li, X., Wang, C., Kulandaivelu, J., y Jiang, G. 2020. Enhanced anaerobic digestion of primary sludge with additives: Performance and mechanisms. *Bioresource Technology*. **316**:123970. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123970>

Xu, F., Li, Y., Ge, X., Yang, L., y Li, Y. 2018. Anaerobic digestion of food waste—Challenges and opportunities. *Bioresource technology*. **247**:1047-1058. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.020>

Yasim, N. S. E. M., y Buyong, F. 2023. Comparative of experimental and theoretical biochemical methane potential generated by municipal solid waste. *Environmental Advances*. **11**:100345. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2023.100345>

Zamri, M. F. M. A., Hasmady, S., Akhilar, A., Ideris, F., Shamsuddin, A. H., Mofijur, Rizwanul Fattah M., I. M. y Mahlia, T. M. I. 2021. A comprehensive review on anaerobic

digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **137**:110637. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110637>

Zhang, M., y Zang, L. 2019. A review of interspecies electron transfer in anaerobic digestion. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. **310**(4): 042026. doi:10.1088/1755-1315/310/4/042026

Zhang, T., y Tremblay, P. L. 2020. Graphene: an antibacterial agent or a promoter of bacterial proliferation? *IScience*. **23**(12). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101787>

Zhang, Z., Fraser, A., Ye, S., Merle, G., y Barralet, J. 2019. Top-down bottom-up graphene synthesis. *Nano Futures*. **3**(4):042003. <https://doi.org/10.1088/2399-1984/ab4eff>

Zhao, Z., Li, Y., Zhang, Y., y Lovley, D. R. 2020. Sparking anaerobic digestion: promoting direct interspecies electron transfer to enhance methane production. *IScience*. **23**(12), 101794. doi:10.1016/j.isci.2020.101794

Zia, M., Ahmed, S., y Kumar, A. 2022. Anaerobic digestion (AD) of fruit and vegetable market waste (FVMW): Potential of FVMW, bioreactor performance, co-substrates, and pre-treatment techniques. *Biomass Conversion and Biorefinery*. **12**(8):3573-3592. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00979-5>