5. Resultados y Discusión

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos en la evaluación de las condiciones de cultivo y purificación sobre las propiedades estructurales y de transporte de las membranas de celulosa bacteriana, de acuerdo con la metodología presentada en el capítulo anterior. Se realizaron las curvas de producción de celulosa a 25 y 30°C para tres fuentes de carbono: glucosa, sacarosa y glicerol y se evaluó el efecto de la temperatura y la fuente de carbono en la producción de celulosa y el espesor de las membranas obtenidas. Posteriormente se usó esta información, para obtener membranas con un espesor de 50 μm y se varió el método de purificación de la celulosa: se usaron como agentes purificantes agua destilada, NaOH 1N y NaOH 5N con temperaturas de 60°C y 90°C y tiempos de exposición al agente de 10 y 30 minutos. Las membranas obtenidas se caracterizaron con análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Difracción de Rayos X (DRX), Adsorción de Nitrógeno, Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR), Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Por último, se realizaron pruebas de transporte a través de las membranas: Grado de Hinchamiento, Permeabilidad Hidráulica, Test de Retención de Solutos, Diálisis, Permeación de Gases y Pervaporación.

5.1 Fermentaciones

Las fermentaciones se analizaron en dos etapas: primero se realizaron las curvas de producción de celulosa en el tiempo, con el fin de evaluar el comportamiento del microorganismo frente a las fuentes de carbono y la temperatura, y, además determinar el tiempo requerido para obtener membranas de 50μm bajo diferentes condiciones de cultivo. En la segunda etapa se empleó esta información para obtener membranas con un espesor de 50 μm y se varió el método de purificación de la celulosa: se usaron como agentes purificantes agua destilada, NaOH 1N y NaOH 5N con temperaturas de 60°C y 90°C y tiempos de exposición al agente de 10 y 30 minutos. En la figura 5.1 puede apreciarse la celulosa producida por cultivo estático, situada entre la fase aérea y el medio de cultivo.

Figura 5.1. Celulosa producida por cultivo estático.

Los resultados de la producción de celulosa para las tres fuentes de carbono se aprecian en la figura 5.2. La producción de celulosa es mayor a 30°C para las tres fuentes de carbono. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en trabajos anteriores (Carreño y Caicedo, 2005; Surma-Ślusarska y colaboradores, 2008). Al usar sacarosa como fuente de carbono la producción de celulosa es la más alta para las dos temperaturas, seguida de la glucosa y el glicerol. Sin embargo, en los primeros cinco días de fermentación la producción de celulosa es menor a partir de sacarosa. Es posible que este comportamiento obedezca a que el microorganismo no sintetiza invertasa, enzima encargada de convertir la sacarosa en glucosa + fructosa, y por ello le toma un tiempo desarrollar la ruta metabólica necesaria para consumir la sacarosa y producir celulosa (Tonouchi y colaboradores, 1998a).

Tonouchi y colaboradores (1998b), encontraron que diferentes microorganismos del género *Acetobacter* sintetizan celulosa a partir de sacarosa por medio de la enzima levansacarasa, que hidroliza la sacarosa a glucosa + levana, este último, un polímero de la fructosa. Mikkelsen y colaboradores (2009) reportan que para 48 horas de cultivo estático, la cantidad de celulosa producida a partir de sacarosa es menor que la producida a partir de glucosa y glicerol; y para 96 horas de cultivo la cantidad de celulosa producida a partir de sacarosa es mayor que la producida a partir de las otras fuentes de carbono.

La forma de las curvas de producción de celulosa es similar a la obtenida por Hornung y colaboradores (2006), quienes a través de una ecuación logística del tipo Monod estudian la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático. La estabilización de la curva a partir del día 25 obedece a problemas en la transferencia de sustrato desde el seno del líquido a las bacterias productoras de celulosa, que son las que se encuentran próximas a la fase gaseosa. La velocidad del difusión del sustrato a través de la matriz polimérica es menor que la velocidad de consumo por parte del microorganismo para la producción de celulosa, y por ello éste consume sólo para mantenimiento celular.

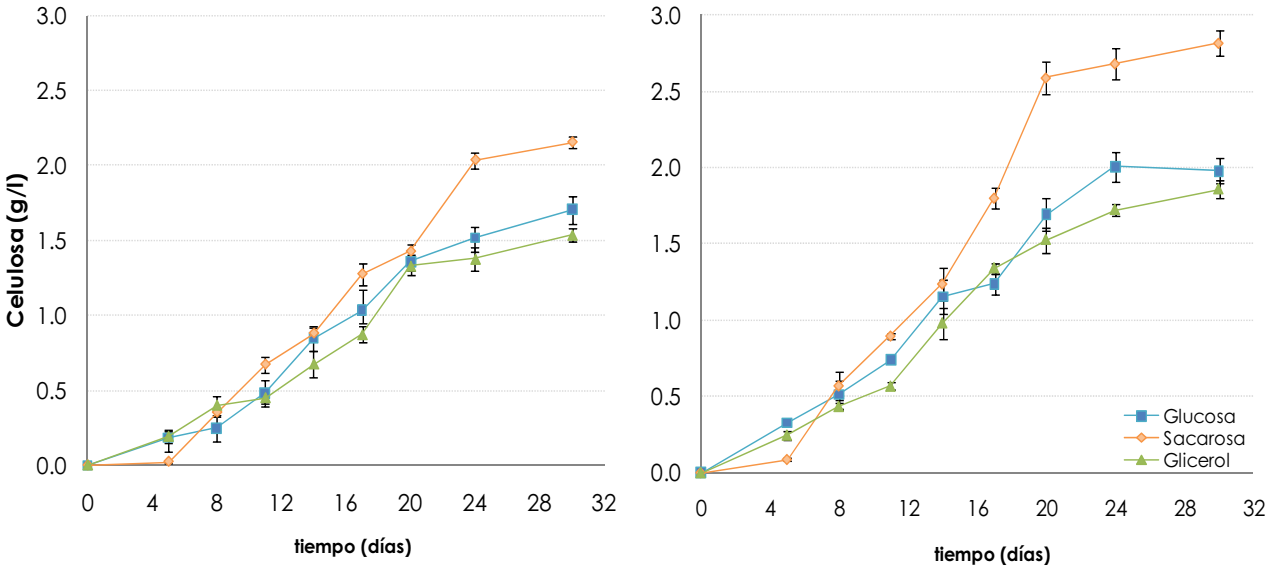

Figura 5.2. Producción de celulosa a 25ºC (izquierda) y 30ºC (derecha) a partir de tres fuentes de carbono: Glucosa, Sacarosa y Glicerol

Un comportamiento análogo se presenta en este trabajo, pero en un período de tiempo mayor, pues tras 5 días de cultivo la sacarosa es la que presenta las menores producciones de celulosa y sólo a partir del día 10 son mayores. La producción de celulosa a partir de glicerol es menor a la obtenida con glucosa, sugiriendo que el microorganismo desarrolla una ruta metabólica que puede ser más compleja que la empleada para asimilar glucosa o sacarosa. Sternberg y colaboradores (1986) encontraron que algunas cepas de *Acetobacter xylinum* pueden convertir glicerol en dihidroxiacetona-fosfato y/o gliceraldehído 3-fosfato durante la producción de celulosa. La dihidroxiacetona-fosfato es el precursor usado en la síntesis de celulosa, mientras el gliceraldehído 3-fosfato se convierte en ácido glicérico (Habe y colaboradores, 2009; Habe y colaboradores, 2010).

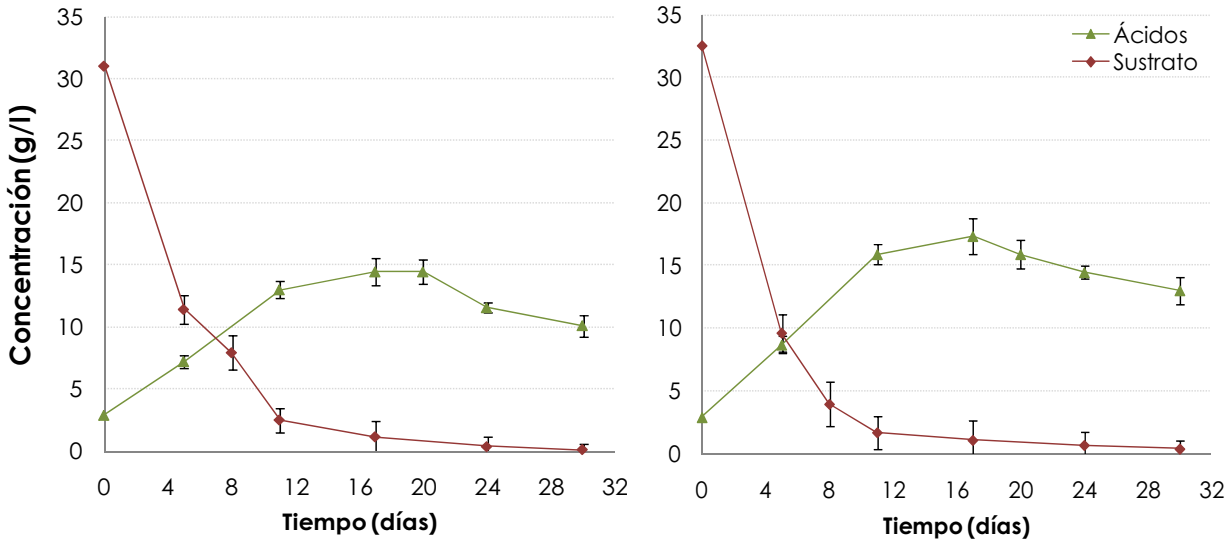

Figura 5.3. Variación de sustrato y ácidos a 25ºC (izquierda) y 30ºC (derecha) empleando glucosa como fuente de carbono.

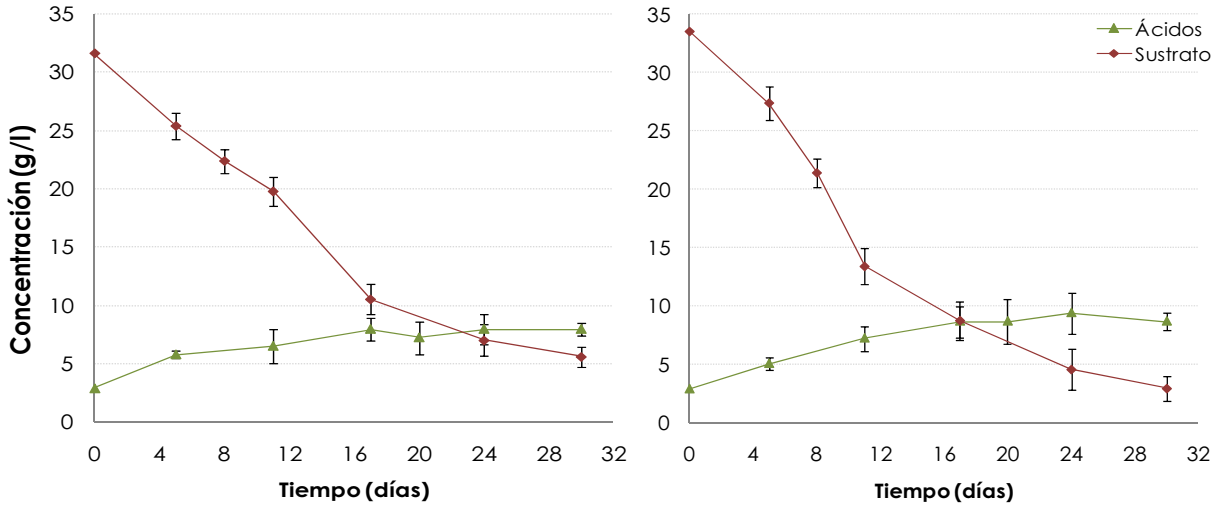

Figura 5.4. Variación de sustrato y ácidos a 25ºC (izquierda) y 30ºC (derecha) empleando sacarosa como fuente de carbono.

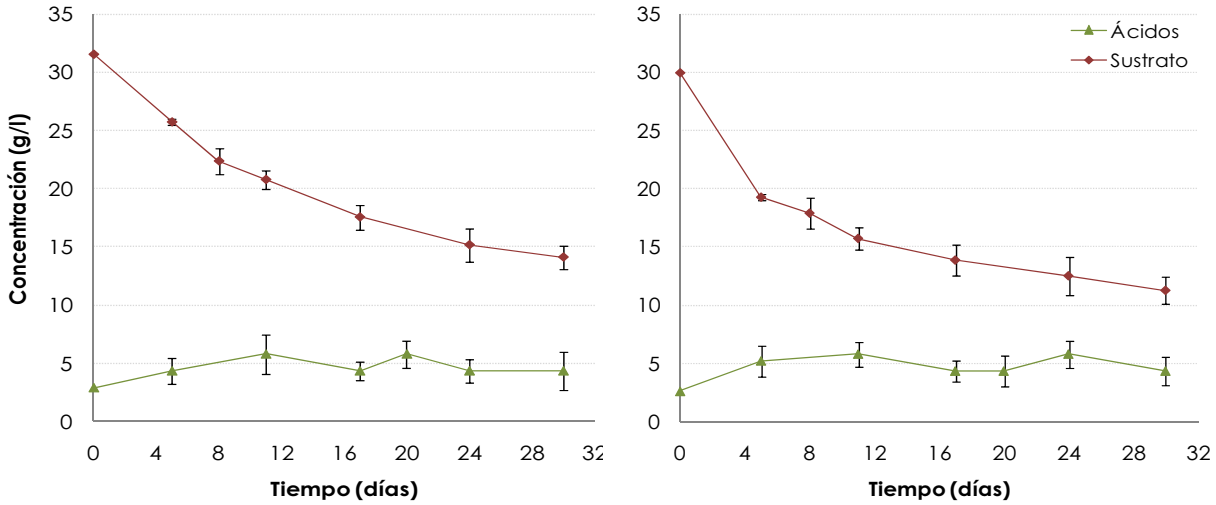

Figura 5.5. Variación del sustrato y ácidos a 25ºC (izquierda) y 30ºC (derecha) empleando glicerol como fuente de carbono.

El consumo de azúcares y producción de ácidos para las tres fuentes de carbono se aprecian en las figuras 5.3 a 5.5. La mayor velocidad de consumo de glucosa se efectúa dentro de los primeros diez días de cultivo tanto a 25 como 30ºC (2.56 y 2.85 $g_{glucosa}$/día respectivamente), tiempo durante el cual la velocidad de producción de ácidos es máxima (0.71 y 0.88 $g_{ácido}$/día). Cuando se emplea sacarosa la velocidad de consumo de azúcares es menor (1.20 y 1.55 $g_{sacarosa}$/día respectivamente), al igual que la producción de ácidos (0.32 y 0.39 $g_{ácido}$/día); en el caso del glicerol, la velocidad de consumo de sustrato es la más bajas de los tres sustratos estudiados(0.82 y 1.28 $g_{glicerol}$/día respectivamente) así como la producción de ácidos (0.26 y 0.28 $g_{ácido}$/día). Al finalizar el cultivo, la totalidad de la glucosa fue consumida, mientras la sacarosa quedó presente en el medio (17 y 9%) y en mayor cantidad el glicerol (44 y 37%).

La aparición de ácidos en el medio se debe a que el microorganismo sintetiza especialmente ácido glucónico, cetoglucónico, y glicérico (Oikawa y colaboradores, 1995; Pourramezan y colaboradores, 2009; Habe y colaboradores, 2010). El empleo de glucosa produce una mayor cantidad de ácidos que la sacarosa y el glicerol, sugiriendo que aquel sustrato estimula la acción oxidativa del microorganismo en mayor proporción que los otros estudiados en este trabajo. La baja acidez del medio a lo largo de todo el tiempo de cultivo con el empleo de la sacarosa y el glicerol puede explicarse de la siguiente manera: Para la sacarosa, la hidrólisis a glucosa + levana hace que la parte convertida en ésta última no esté disponible para oxidación a ácidos; en cuanto a la glucosa, habrá una parte que irá a la síntesis de celulosa y otra estará disponible para la síntesis de ácidos; de ahí su presencia en el medio.

En el caso del glicerol, Sternberg y colaboradores (1986) proponen que el microorganismo convierte este sustrato en dihidroxiacetona fosfato, que puede ser precursor de la síntesis de celulosa, pero también puede convertirse en D-gliceraldehído 3-fosfato (ésta reacción es reversible), precursor del ácido glicérico. El que esta última conversión sea reversible permite una mayor disponibilidad del sustrato para la síntesis de celulosa y de esta manera la producción de ácido glicérico sería menor. Adicionalmente, un menor descenso del pH permite conservar la viabilidad celular, lo que favorece las probabilidades de incrementar la producción de celulosa. La producción de ácidos se encuentra alrededor de 5 g/l (la menor producción de las tres fuentes de carbono) para las dos temperaturas de cultivo, el máximo se produjo sobre el día 5 y después se mantiene estable, de donde se puede concluir que el ácido se genera los primeros días de cultivo y posteriormente esa parte de la ruta metabólica se bloquea y se favorece la producción de dihidroxiacetona fosfato, precursor de la celulosa.

El factor de rendimiento celulosa/sustrato $Y_{P/S}$ se aprecia en la figura 5.6. A 25°C el rendimiento es similar para sacarosa y glicerol, mientras que a 30°C es éste último el que permite un mayor rendimiento seguido de la sacarosa y glucosa. Esto tiene relación con lo expuesto anteriormente en la producción de ácidos, pues el glicerol es el sustrato que permite la menor cantidad de ácidos en el medio, de manera que del total de sustrato consumido una mayor parte es convertida en celulosa. No todo el glicerol fue consumido durante el tiempo de cultivo, por lo que puede obtenerse una cantidad de celulosa similar a la obtenida a partir de glucosa empleando glicerol con una concentración 30-50% inferior.

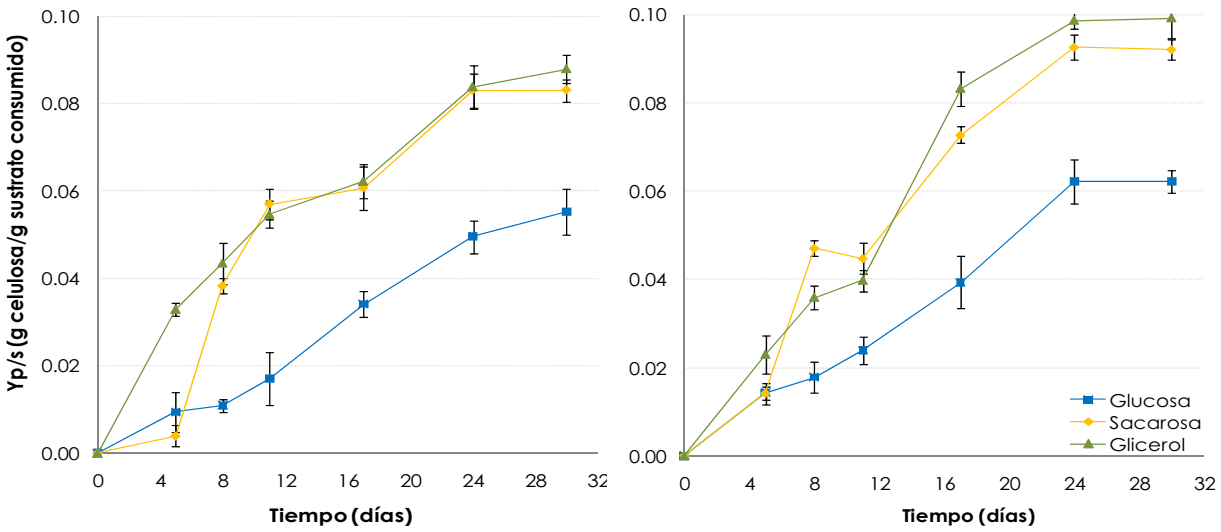

Figura 5.6. Rendimiento $Y_{P/S}$ en función del tiempo para las tres fuentes de carbono a 25°C (izquierda) y 30°C (derecha)

El rendimiento obtenido con sacarosa es similar al obtenido con el empleo de glicerol; si bien el microorganismo consumió mayor cantidad de sacarosa a lo largo del tiempo de cultivo, también produjo celulosa en mayor cantidad que con el empleo del glicerol. El rendimiento a partir de glucosa se ve afectado por la mayor cantidad de ácido en el medio que disminuye la disponibilidad del sustrato para la producción de celulosa, además de disminuir la viabilidad celular.

En la figura 5.7 se aprecia cómo varía el espesor de las membranas con el tiempo de cultivo. El espesor es mayor a 30°C cuando se emplean glucosa y sacarosa como fuentes de carbono; con glicerol no se producen variaciones significativas del espesor con la temperatura del cultivo.

Para obtener membranas de 50 μm se necesitan 15 días con glucosa y sacarosa y 20 días con glicerol si la temperatura es de 25°C; si la temperatura es de 30°C, se necesitan 12, 13 y 17 días al emplear glucosa, sacarosa y glicerol respectivamente.

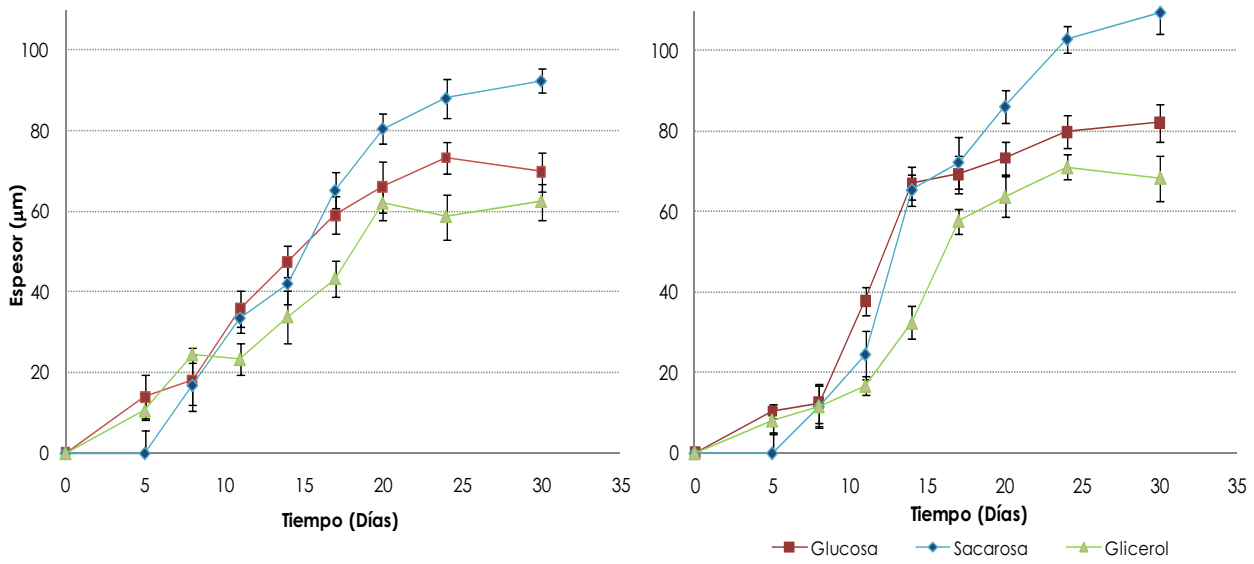

Figura 5.7. Espesor de las membranas secas en función del tiempo para las tres fuentes de carbono a 25°C (izquierda) y 30°C (derecha)

Las figuras 5.8 a 5.10 muestran la celulosa producida una vez extraída del medio de cultivo y purificada. Al salir del cultivo, la celulosa lleva consigo el microorganismo que la produjo, así como algunos componentes del medio. Por ello es necesario someterla a un tratamiento de purificación, en este caso con NaOH. En la figura 5.9 se observa la celulosa tratada, de un color blanco, libre de impurezas.

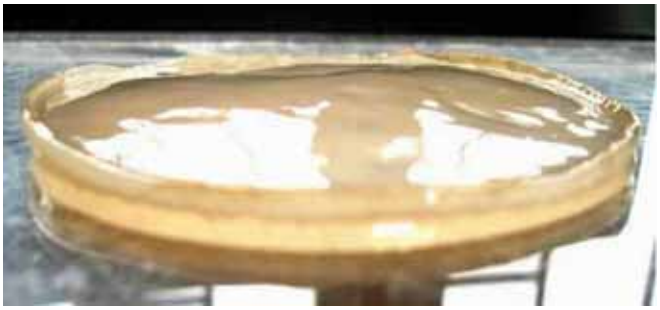

Figura 5.8. Celulosa húmeda extraída del medio de cultivo

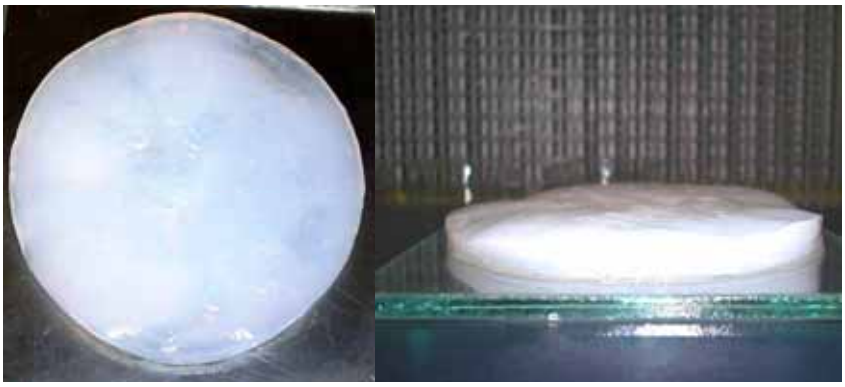

Figura 5.9. Celulosa húmeda después del tratamiento de purificación. Izquierda: Superficie. Derecha: Vista de la sección transversal

En la figura 5.10 se observa la diferencia entre una membrana tratada y una no tratada con NaOH; la presencia de impurezas le da un color amarillento y opaco, mientras que la membrana tratada presenta un color blanco y traslúcido. Adicionalmente, se observó que algunas membranas tratadas con agua destilada presentaron ataque microbiológico después de 30 días de almacenamiento; en consecuencia se hace necesario el tratamiento con una agente químico para preservar su integridad y favorecer su posterior uso.

Figura 5.10. Membranas de celulosa después del secado. Izquierda: Sin tratamiento de purificación. Derecha: Tratada con NaOH 1N

Una vez determinados los tiempos de cultivo requeridos para obtener las membranas, se realizaron las fermentaciones que tuvieron como objetivo la obtención de las membranas que se emplearían en la caracterización. Se varió el método de purificación y se observó que a pesar de usar NaOH en concentraciones altas (1N y 5N) no se presentó degradación de la estructura. Con el fin de establecer el grado de compactación de la membrana con el tratamiento se determinó la densidad aparente; los resultados se presentan en las figuras 5.11-5.13. Las membranas obtenidas a partir de glucosa presentan una disminución gradual de la densidad aparente con la severidad del tratamiento; las obtenidas a partir de sacarosa por su parecen sufrir mayores variaciones, mientras en las obtenidas a partir de glicerol es notoria la diferencia en la densidad de las membranas tratadas con NaOH 1N y con 5N siendo estas últimas las que presentan la menor densidad debido a que se solubiliza una mayor cantidad de celulosa. La densidad aparente presenta valores similares para las membranas a partir de glucosa y glicerol (entre 0.60 y 0.80 g cm^{-3}), mientras que las obtenidas a partir de sacarosa presentan un valor superior (entre 0.85 y 0.95 g cm^{-3}).

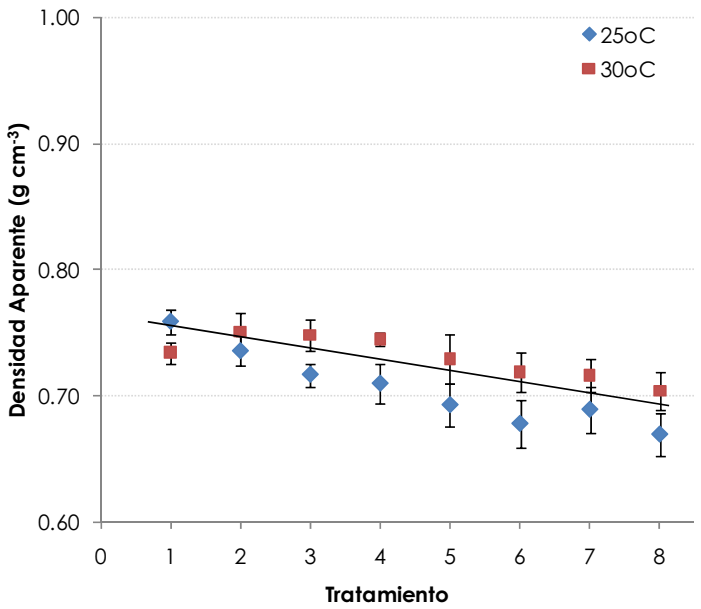

Figura 5.11. Densidad aparente de las membranas obtenidas a partir de glucosa. Los números indican el tratamiento con NaOH al que fue sometida la membrana: 1. 1N, 10 min, 60°C. 2. 1N, 30 min, 60°C. 3. 1N, 10 min, 90°C. 4. 1N, 30 min, 90°C. 5. 5N, 10 min, 60°C. 6. 5N, 30 min, 60°C. 7. 5N, 10 min, 90°C. 8. 5N, 30 min, 90°C

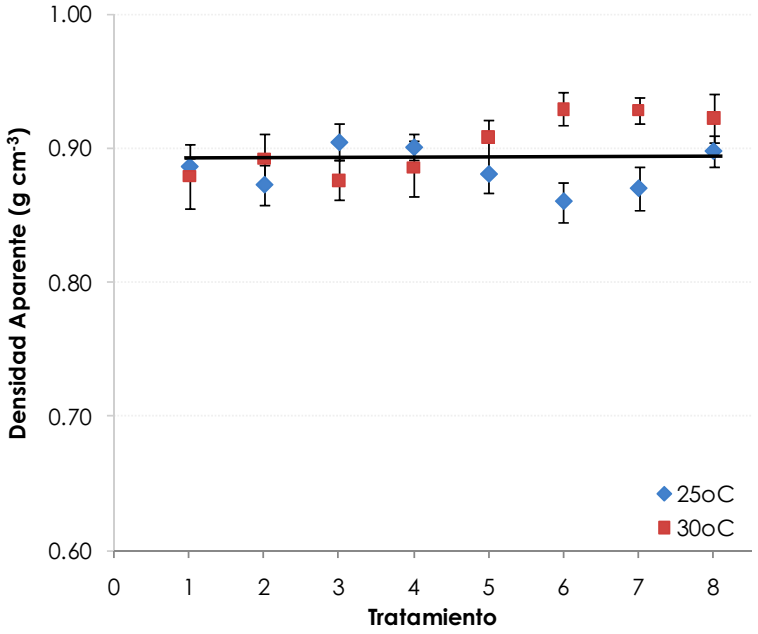

Figura 5.12. Densidad aparente de las membranas obtenidas a partir de sacarosa. Los números indican el tratamiento con NaOH al que fue sometida la membrana: 1. 1N, 10 min, 60°C. 2. 1N, 30 min, 60°C. 3. 1N, 10 min, 90°C. 4. 1N, 30 min, 90°C. 5. 5N, 10 min, 60°C. 6. 5N, 30 min, 60°C. 7. 5N, 10 min, 90°C. 8. 5N, 30 min, 90°C

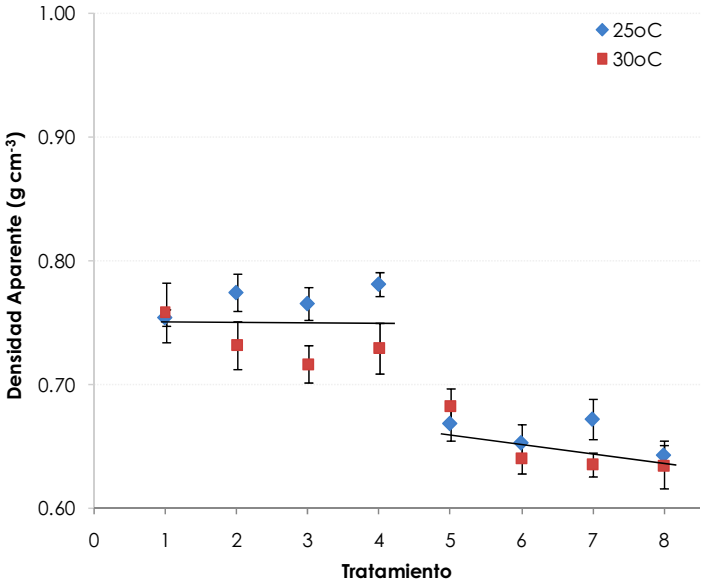

Figura 5.13. Densidad aparente de las membranas obtenidas a partir de glicerol. Los números indican el tratamiento con NaOH al que fue sometida la membrana: 1. 1N, 10 min, 60°C. 2. 1N, 30 min, 60°C. 3. 1N, 10 min, 90°C. 4. 1N, 30 min, 90°C. 5. 5N, 10 min, 60°C. 6. 5N, 30 min, 60°C. 7. 5N, 10 min, 90°C. 8. 5N, 30 min, 90°C

5.2 Caracterización Estructural

5.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido

La figura 5.14 muestra la superficie de una membrana tratada con agua destilada y otra con NaOH. Puede apreciarse que si el tratamiento se realiza sin agente químico, la membrana presenta restos de los microorganismos provenientes de la etapa de fermentación, lo que no sucede si el tratamiento se hace con un agente químico.

La membrana tratada con agente químico presenta espacios vacíos de menor tamaño que la membrana tratada únicamente con agua, probablemente debido a que el agente químico solubiliza las fibras de celulosa más delgadas, facilita las interacciones de puentes de hidrógeno entre las cadenas de celulosa y reduce el tamaño de los espacios vacíos.

La figura 5.15 muestra la estructura de las membranas. Se aprecia la formación en capas, tal como lo reportan Borzani y De Souza (1995). No se observan poros cilíndricos en la sección transversal de la membrana; sin embargo, en la figura 5.12.a) se observa la presencia de poros en las diversas capas de la membrana, por lo que puede afirmarse que se trata de una estructura porosa que presenta alta tortuosidad (Sokolnicki y colaboradores, 2006). Al observar con detalle la figura 5.15.b) se aprecia una variación en la densidad de capas a través del espesor de la membrana, tal como lo reportan Klemm y colaboradores (2001). Se evidencian varias zonas, con un marcado contraste en el número de capas,

correspondiendo la menor cantidad a la zona inferior, lo cual se debe a que estas capas se formaron en la primera fase de la etapa fermentativa, cuando existe menor cantidad de microorganismos capaces de producir celulosa. Esto se debe a que la formación de las capas de celulosa está asociada al crecimiento celular; a medida que aumenta la cantidad de microorganismos la cantidad de celulosa también se incrementa.

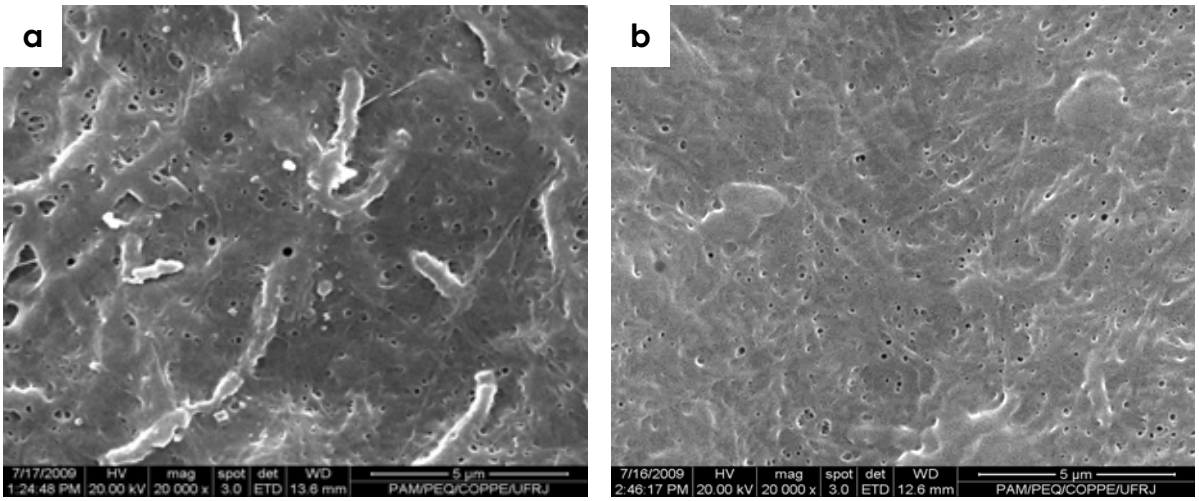

Figura 5.14. Imágenes de membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de glucosa a 30°C. a) Membrana tratada sin agente químico. b) Membrana tratada con NaOH 1N por 10minutos a 60°C

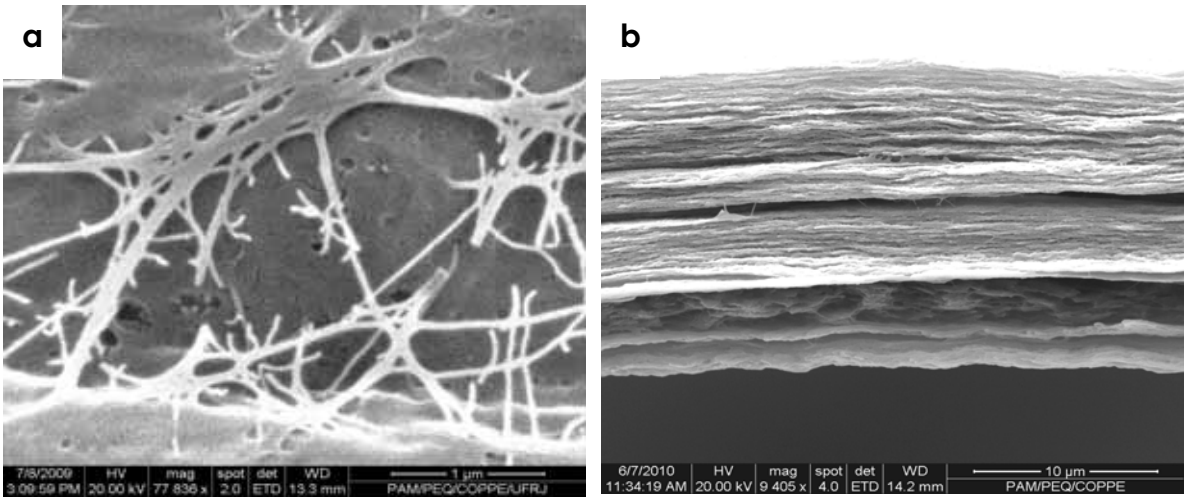

Figura 5.15. Imágenes de la membrana de celulosa bacteriana obtenida a partir de glucosa y tratada con NaOH 1N por 10 minutos a 60°C. a) Vista de la superficie y de algunas capas interiores. b) Vista de la sección transversal

Las figura 5.16 presenta imágenes de las superficies superior e inferior de las membranas obtenidas a partir de las 3 fuentes de carbono en la que no se aprecian mayores diferencias entre las dos superficies de las membranas correspondientes a cada fuente de

carbono; el origen de los poros en cada capa de la membrana puede explicarse si se considera la eliminación de los microorganismos durante el tratamiento de purificación, liberando los espacios por ellos ocupados.

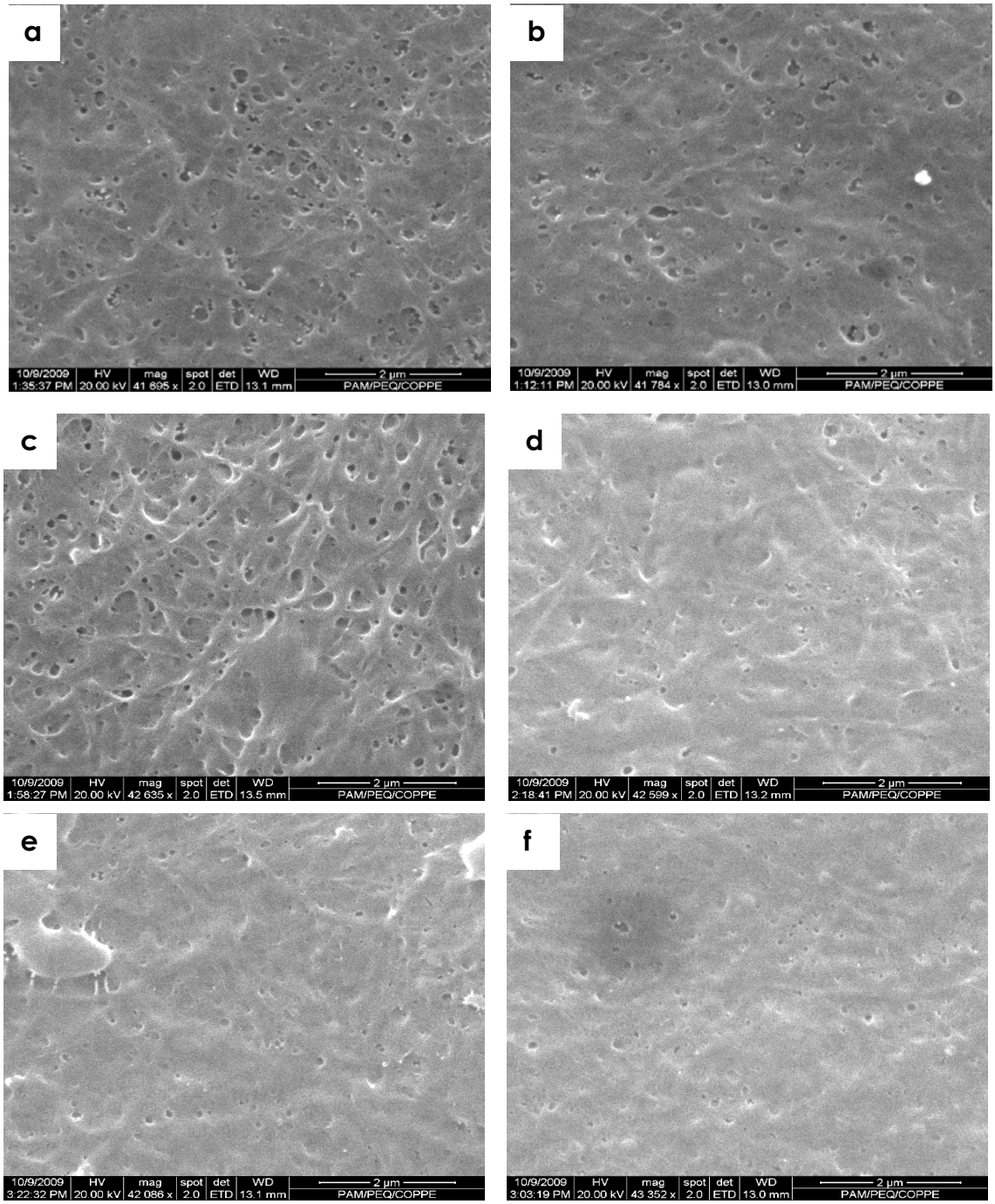

Figura 5.16. Imágenes de membranas de celulosa bacteriana obtenidas a 25oC y tratadas con NaOH 1N por 10 minutos a 60°C. a) Membrana a partir de glucosa, cara superior b) Membrana a partir de glucosa, cara inferior c) Membrana a partir de sacarosa, cara superior d) Membrana a partir de sacarosa, cara inferior e) Membrana a partir de glicerol, cara superior f) Membrana a partir de glicerol, cara inferior.

La cantidad de poros presentes en las dos superficies de las membranas no aumenta considerablemente exceptuando la membrana obtenida a partir de sacarosa, lo que puede interpretarse con los resultados de la etapa de fermentación, donde la sacarosa fue la fuente de carbono que presentó la mayor producción de celulosa en el medio, y como se ha reportado en trabajos anteriores, la producción de celulosa se encuentra asociada al crecimiento, por lo cual una mayor producción de celulosa implica mayor cantidad de microorganismos presentes y por lo tanto después del tratamiento químico, mayor cantidad de espacios vacíos en la membrana (Marx-Firgini y Pion, 1974; Naritomi y colaboradores, 1998b). La membrana a partir de glicerol presenta menor cantidad de espacios vacíos, lo que es un indicativo de la formación de éstos con el crecimiento celular.

La figura 5.17 muestra la estructura de la sección transversal de una membrana tratada con agua destilada y otra tratada con agente químico.

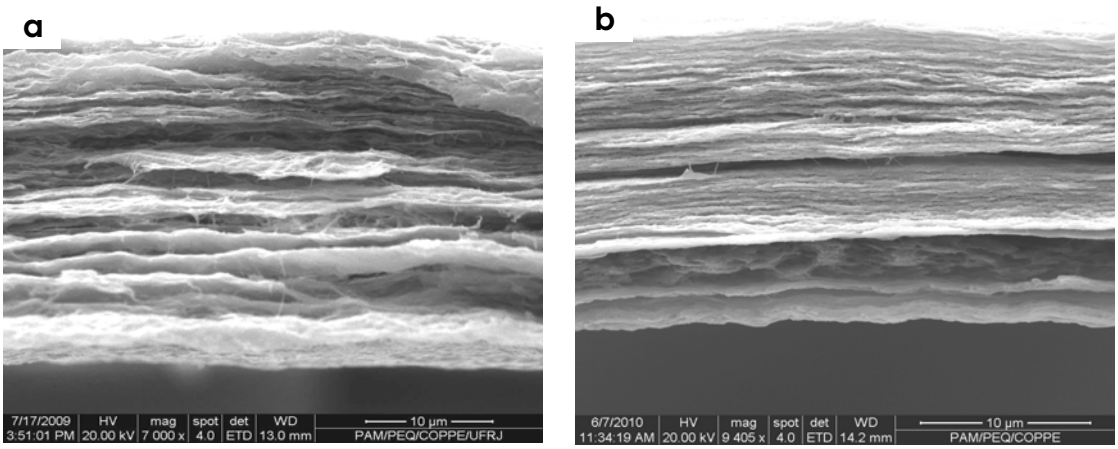

Figura 5.17. Imágenes de la sección transversal de membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de glucosa a 30°C. a) Membrana tratada con agua destilada b) Membrana tratada con NaOH 1N por 10 minutos a 60°C.

La membrana tratada sólo con agua presenta gran cantidad de fibras finas de celulosa, que incluso se entrelazan en las distintas capas, mientras que en la membrana tratada con agente químico las capas se compactan aún más y las fibras más finas desaparecen, probablemente debido a que el tratamiento químico solubiliza estas fibras finas, y define y acomoda las capas de la membrana.

5.2.2 Difracción de Rayos X (DRX)

La figura 5.18 muestra los resultados de difracción de rayos X para membranas obtenidas a partir de glucosa a 30°C, sometidas a tres tratamientos diferentes: Agua destilada, NaOH 1N (60°C, 10 min) y NaOH 5N (90°C, 30 min). Se aprecia la presencia de tres picos, cada uno de ellos presenta el componente tanto de la fase cristalina I_α como I_β; de acuerdo con Wada y colaboradores (2001), el pico 1 representa la proyección de los planos (1 1 0) de la fracción I_α y (1 $\bar{1}$ 0) de la fracción I_β; el pico 2 representa las proyecciones de los planos (0 1 0) I_α y (1 1 0) I_β y el pico 3 (1 1 0) I_α y (2 0 0) I_β. Estos picos se encuentran en 2θ alrededor de 14.4 para el pico 1, 16.6 para el pico 2 y 22.4 para el pico 3 (Phisalaphong y Jatupaiboon, 2008).

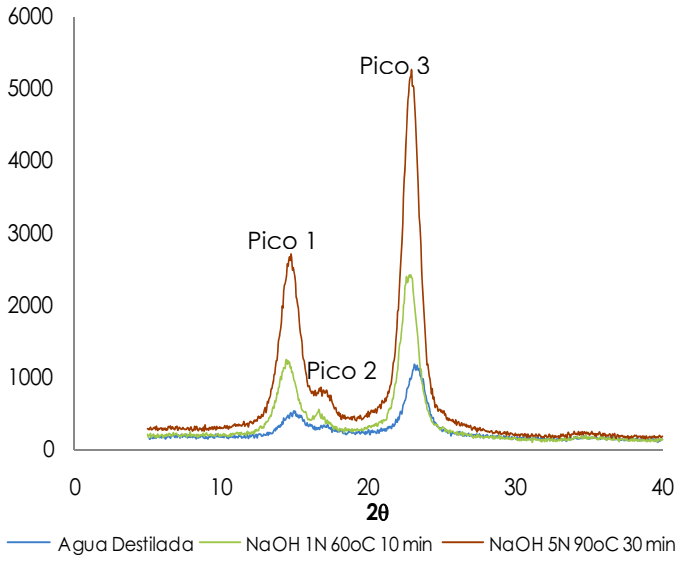

Figura 5.18. Difracción de rayos x para membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de glucosa a 30°C y sometidas a diferentes tratamientos.

Se observa que en los diferentes tratamientos persiste una mayor intensidad del pico 3 sobre los picos 1 y 2, y que sin importar la severidad del tratamiento el pico 2 no es perfectamente visible.

Las figuras 5.19 a 5.21 permiten apreciar el efecto de la temperatura de cultivo sobre la estructura de la membrana. Para un mismo tratamiento, en este caso el más severo (NaOH 5N, 90°C, 30 minutos), las membranas obtenidas a partir de glucosa y glicerol no presentan diferencias considerables. Por el contrario, en las membranas producidas a partir de sacarosa la intensidad de la señal es mayor en la que se obtiene a 30°C comparada con la de 25°C. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el tamaño del cristal y la cristalinidad, como se discutirá más adelante.

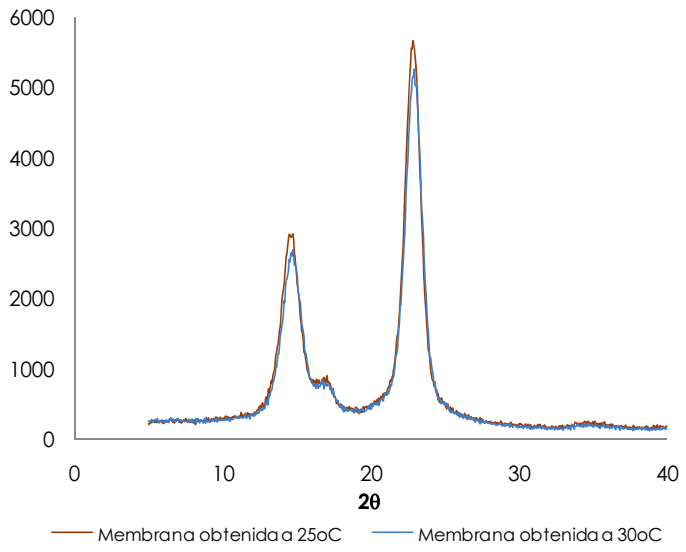

Figura 5.19. Difracción de rayos x para membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de glucosa a 25 y 30°C y tratadas con NaOH 5N a 90°C por 30 minutos

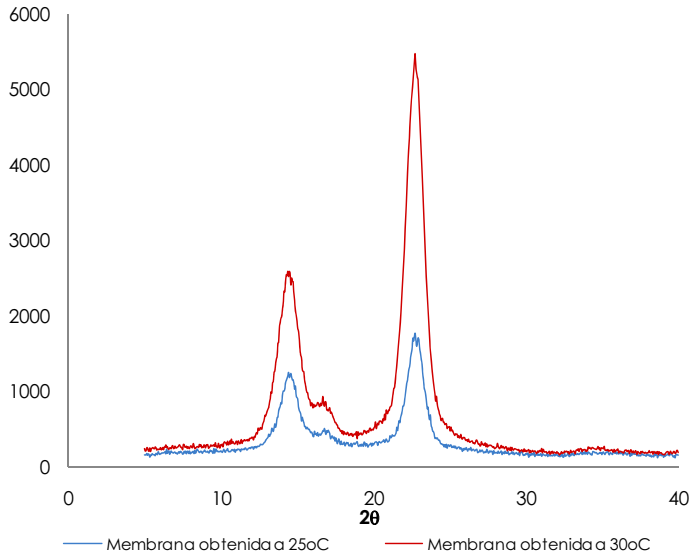

Figura 5.20. Difracción de rayos x para membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de sacarosa a 25 y 30°C y tratadas con NaOH 5N a 90°C por 30 minutos

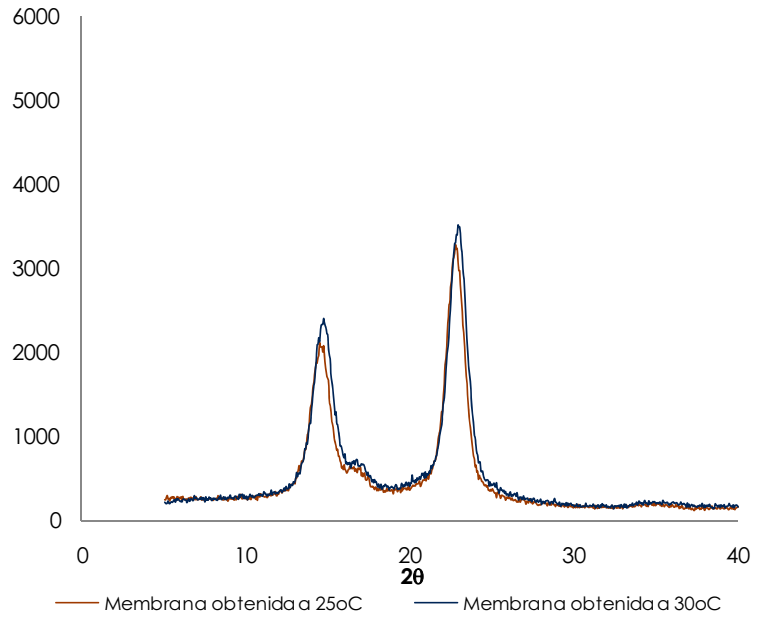

Figura 5.21. Difracción de rayos x para membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de glicerol a 25 y 30°C y tratadas con NaOH 5N a 90°C por 30 minutos

Para calcular el tamaño de cristal y la cristalinidad fue necesario realizar la deconvolución de los picos, para ello se usó el programa IGOR PRO®. Puede apreciarse el resultado en la figura 5.22 para la membrana obtenida a partir de glucosa a 30°C tratada con NaOH 1N a 60°C por 10 minutos.

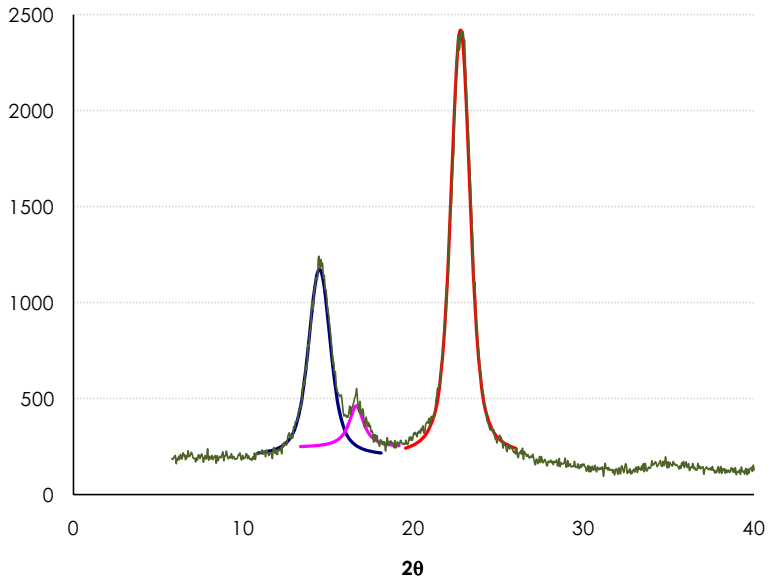

Figura 5.22. Difracción de rayos X con análisis de deconvolución de picos para la membrana de celulosa bacteriana obtenidas a partir de glucosa a 30°C y tratada con NaOH 1N a 60°C por 10 minutos

Se calculó la cristalinidad de las membranas con el fin de evaluar el efecto del tratamiento sobre esta propiedad; para ello se utilizó la siguiente ecuación (Keshk y colaboradores, 2006; Retegi y colaboradores, 2010):

$$Cristalinidad(\%) = \frac{I_{200} - I_{2\theta=18^o}}{I_{200}} \qquad (5.1)$$

donde I_{200} es la máxima intensidad del pico 3 y $I_{2\theta=18o}$ es la intensidad a 2θ=18º. Los resultados se recogen en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Cristalinidad de membranas de celulosa bacteriana.

Fuente de Carbono	Temperatura	Tratamiento de Purificación	Cristalinidad (%)
Glucosa	30ºC	Agua destilada	72.73
		NaOH 1N 60ºC 10 min	88.95
		NaOH 5N 90ºC 30 min	89.76
	25ºC	NaOH 1N 60ºC 10 min	90.06
		NaOH 5N 90ºC 30 min	90.85
Sacarosa	30ºC	NaOH 1N 60ºC 10 min	88.15
		NaOH 5N 90ºC 30 min	91.08
	25ºC	NaOH 1N 60ºC 10 min	74.98
		NaOH 5N 90ºC 30 min	82.23
Glicerol	30ºC	NaOH 1N 60ºC 10 min	90.62
		NaOH 5N 60ºC 10 min	79.53
		NaOH 5N 90ºC 30 min	87.76
	25ºC	NaOH 1N 60ºC 10 min	90.65
		NaOH 5N 60ºC 10 min	84.07
		NaOH 5N 90ºC 30 min	84.46

El grado de cristalinidad de las membranas es superior al reportado por varios autores (Watanabe y colaboradores, 1998; Keshk y colaboradores, 2006). Las membranas obtenidas a partir de glucosa tratadas con un agente químico presentan mayor cristalinidad que cuando se utiliza agua destilada. En las membranas tratadas el aumento de la severidad del tratamiento químico no afecta el índice de cristalinidad (las variaciones son del orden del 1%)

Las membranas obtenidas a partir de sacarosa presentan una cristalinidad es más alta en membranas obtenidas a 30°C que a 25°C; en las primeras se observa una variación del 3% en la cristalinidad con la severidad del tratamiento, mientras que en las segundas esta variación es del 9%, sugiriendo que contienen una mayor proporción de celulosa en fase amorfa que puede ser solubilizada con el tratamiento más agresivo, y de esta manera aumentar la cristalinidad del material.

En las membranas obtenidas a partir de glicerol se observa que la severidad del tratamiento disminuye el grado de cristalinidad de las membranas obtenidas tanto a 25°C como a 30°C (reducción de 7% en la cristalinidad), sugiriendo que al emplear esta fuente de carbono se obtiene celulosa con un tamaño de fibra menor, que puede hacerla susceptible al ataque por parte del NaOH. Esto puede estar acorde con el trabajo de Jung y colaboradores (2010), quienes reportan que la celulosa obtenida empleando glucosa como fuente de carbono presenta un ancho de fibra de 75 a 90 nm, mientras que al usar glicerol como fuente de carbono se obtiene un ancho de fibra de 65 a 80 nm.

Wada y colaboradores (2001), elaboraron un método para determinar la cantidad de celulosa I_α y I_β presentes en la fase cristalina de varios tipos de celulosa bacteriana y vegetal a partir de la distancia interplanar (d), obtenidos a partir de los resultados de difracción de rayos X, usando la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2dsen\theta \quad (5.2)$$

Donde n es una constante, λ es la longitud de onda de rayos X y θ es el ángulo de máxima intensidad del pico. Al aplicar este método se obtienen los resultados la relación de celulosa I_α/I_β que se presentan en la tabla 5.2.

Los resultados del cálculo de la distancia interplanar son congruentes con los obtenidos por Wada y colaboradores (2001), para celulosa bacteriana. Todas las membranas son ricas en celulosa I_α, que es una característica de este tipo de celulosa, pues en la de origen vegetal la estructura predominante es la I_β (Bielecki y colaboradores, 2002). En las membranas obtenidas a partir de glucosa a 30°C y sacarosa a 25°C, el tratamiento parece aumentar la cantidad de celulosa I_α presente en la estructura; las membranas obtenidas a partir de glicerol presentan el comportamiento inverso. De acuerdo con varios autores (O´Sullivan, 1997, Wada y colaboradores, 2001) la celulosa I_α es convertida a I_β por diversos métodos, especialmente por medio de calor; en el presente trabajo es posible que el cambio de temperatura sumado a la adición de NaOH permiten que esta transformación ocurra para las membranas obtenidas a partir de glicerol; sin embargo para las membranas obtenidas a partir de glucosa y sacarosa la literatura no reporta este cambio. Una explicación posible del aumento del contenido de celulosa I_α con el tratamiento es que las fibras están organizadas de manera que el tratamiento químico degrada la estructura cristalina I_β y por ello la relación I_α/I_β se incrementa.

Tabla 5.2. Distancia interplanar y relación de celulosa I_α/I_β para membranas de celulosa bacteriana.

Fuente de Carbono	Temperatura	Tratamiento	d_1(Å)	d_2(Å)	d_3(Å)	I_α:I_β
Glucosa	30°C	Agua destilada	0.597	0.521	0.384	6:4
		NaOH 1N 60°C 10 min	0.611	0.531	0.390	7.7:2.3
		NaOH 5N 90°C 30 min	0.604	0.521	0.388	9.6:0.4
	25°C	NaOH 1N 60°C 10 min	0.606	0.521	0.388	10:0
		NaOH 5N 90°C 30 min	0.607	0.523	0.389	9.9:01
Sacarosa	30°C	NaOH 1N 60°C 10 min	0.597	0.516	0.385	9.6:04
		NaOH 5N 90°C 30 min	0.612	0.528	0.391	10:0
	25°C	NaOH 1N 60°C 10 min	0.585	0.508	0.379	7.8:2.2
		NaOH 5N 90°C 30 min	0.610	0.525	0.390	10:0
Glicerol	30°C	NaOH 1N 60°C 10 min	0.611	0.529	0.392	9.3:0.7
		NaOH 5N 60°C 10 min	0.608	0.526	0.391	9.2:0.8
		NaOH 5N 90°C 30 min	0.604	0.525	0.388	7.5:2.5
	25°C	NaOH 1N 60°C 10 min	0.605	0.523	0.382	9.3:0.7
		NaOH 5N 60°C 10 min	0.591	0.514	0.383	8.3:1.7
		NaOH 5N 90°C 30 min	0.610	0.529	0.391	6.8:3.2

Para calcular el tamaño de partícula de la fase cristalina se utilizó la ecuación de Scherrer (Kim y colaboradores, 2002):

$$L = \frac{H\lambda}{BCos\theta} \quad (5.3)$$

Donde L es el tamaño de la fase cristalina perpendicular al plano, H es es una constante (asumiendo un perfil del pico tipo Gaus), λ es la longitud de onda de rayos X, B el ancho a la altura media del pico y θ es el ángulo de máxima intensidad del pico. Los resultados se presentan en la tabla 5.3 para membranas obtenidas a partir de las tres fuentes de carbono, a temperaturas de 25°C y 30°C y diversos tratamientos de purificación.

En las membranas obtenidas a partir de glucosa a 30°C se presenta un mayor efecto del tratamiento sobre el tamaño de partícula cristalina asociado al pico 2, que disminuye a medida que el tratamiento se hace más severo; los otros dos no presentan mayores variaciones, pero sí un efecto marcado del agente químico. Las membranas obtenidas a

25°C no parecen presentar un efecto marcado del tratamiento sobre el tamaño de partícula para ninguno de los planos.

Tabla 5.3. Tamaño de cristal para membranas de celulosa bacteriana

Fuente de Carbono	Temperatura	Tratamiento de Purificación	Tamaño de Cristal (Å)		
			Pico 1	Pico 2	Pico 3
Glucosa	30°C	Agua destilada	46	62	54
		NaOH 1N 60°C 10 min	56	80	63
		NaOH 5N 90°C 30 min	55	65	65
	25°C	NaOH 1N 60°C 10 min	53	70	65
		NaOH 5N 90°C 30 min	58	67	68
Sacarosa	30°C	NaOH 1N 60°C 10 min	56	75	65
		NaOH 5N 90°C 30 min	52	64	61
	25°C	NaOH 1N 60°C 10 min	54	62	63
		NaOH 5N 90°C 30 min	61	70	66
Glicerol	30°C	NaOH 1N 60°C 10 min	49	58	57
		NaOH 5N 60°C 10 min	54	55	56
		NaOH 5N 90°C 30 min	60	66	65
	25°C	NaOH 1N 60°C 10 min	48	56	56
		NaOH 5N 60°C 10 min	62	67	69
		NaOH 5N 90°C 30 min	60	68	66

Las membranas obtenidas a partir de sacarosa a 30°C presentan una notable disminución en el tamaño de partícula asociado al pico 2 con el tratamiento de purificación, pero en general el tamaño disminuye para todas las fases cristalinas. El comportamiento se invierte para las membranas obtenidas a 25°C, donde el tamaño aumenta de forma notoria con la intensidad del tratamiento para todas las fases cristalinas asociadas especialmente para los picos 1 y 2. Las membranas obtenidas a partir de glicerol a 25 y 30°C presentan aumento del tamaño de partícula con el tratamiento para todas las fases cristalinas. Una primera explicación para el aumento del tamaño de partícula con la intensidad del tratamiento puede fundamentarse en el hecho de que soluciones concentradas de NaOH solubilizan las fibras de celulosa; en este caso el NaOH puede estar actuando sobre la fase amorfa, permitiendo un acomodamiento de las fases cristalinas y dado que todos los tratamientos incluyeron un aumento de la temperatura, ésta podría estar actuar sobre el acomodamiento de los cristales, permitiendo el aumento de tamaño de partícula.

5.2.3 Adsorción de Nitrógeno

Las pruebas de adsorción y desorción de nitrógeno se realizaron para algunas de las membranas obtenidas. La figura 5.23 presenta el perfil obtenido por una de las membranas obtenidas a partir de sacarosa a 30°C.

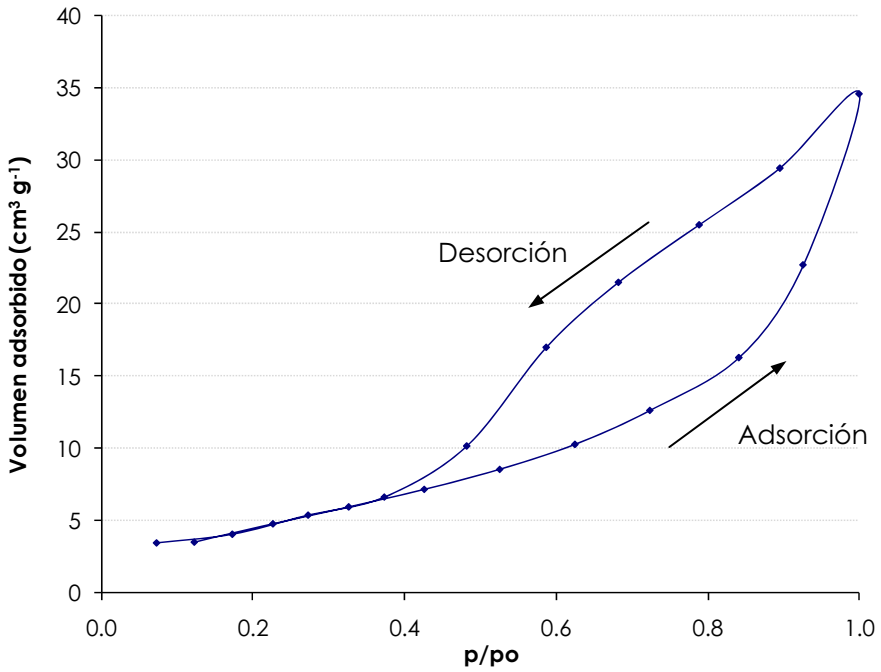

Figura 5.23. Perfil de Adsorcion y Desorción de N_2 para la membrana obtenida a partir de sacarosa a 30°C, tratada con NaOH 1N 60°C por 10 minutos

Se observa el fenómeno de histéresis (la curva curva de adsorción no coincide con la de desorción) debido a que se presenta la condensación del N_2 en los poros de la membrana. La presencia de este fenómeno es característica de estructuras donde los poros son abiertos por ambos extremos. El estudio de la trayectoria trazada por las curvas de adsorción y desorción en el ciclo de histéresis permite obtener una idea de la estructura de la membrana (Araque, 2003). Existen diferentes tipos de histéresis; cuando la curva de adsorción se desplaza hacia la zona de presiones relativas (p/p°) altas, mientras la desorción se produce a presiones intemedias, se está hablando histéresis tipo B, característica de estructuras capilares de cuerpo ancho y cuello corto y estrecho, comunes en materiales de naturaleza cristalina con empaquetamiento de partículas en forma de lámina, que permiten la formación de poros con forma de aberturas con paredes paralelas (Martín, 1990). Esta descripción de la estructura es coherente con lo observado en las imágenes de microscopía electrónica de barrido para las membranas (Figura 5.14 y 5.16). Esto significa que los poros son en realidad los debidos al espacio entre láminas no de los espacios vacios en la superficie.

Para realizar el cálculo del área específica y la distribución de tamaño de poro se utilizó la metodología descrita en las normas ASTM D 3662-03 y ASTM D 4641-94 (Anexos A y B). La figura 5.24 presenta la distribución de tamaño de poro para una de las membranas obtenidas a partir de sacarosa a 30°C.

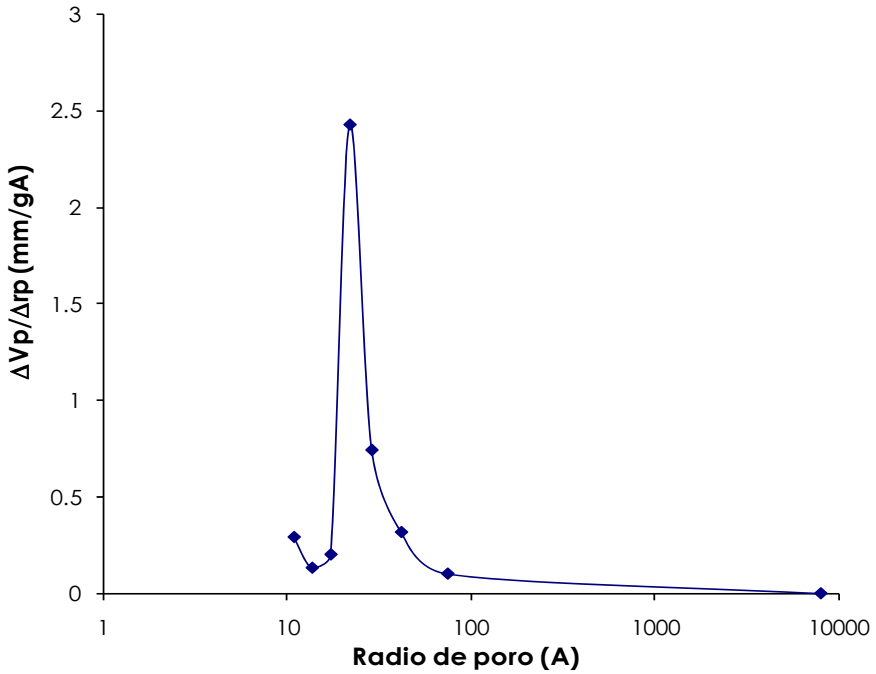

Figura 5.24. Distribución de tamaño de poro para la membrana obtenida a partir de sacarosa a 30°C, tratada con NaOH 1N 60°C por 10 minutos

Los poros de la membrana se catalogan como mesoporos (15-100 Å); No hay presencia de microporos en la estructura. Los resultados de radio de poro y área superficial para algunas membranas se resumen en la tabla 5.4.

El área superficial específica es bastante pequeña (menor a 50 m^2/g) para todas las membranas; esto quiere decir que la membrana tiene una porosidad muy baja; la estructura es entonces bastante compacta y presenta algunos mesoporos.

Tabla 5.4. Radio medio de poro y área superficial de membranas de celulosa bacteriana.

Fuente de Carbono	Temperatura de cultivo	Tratamiento de Purificación	RADIO DE PORO (Å)[a]	ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA (BET) (m^2/g)	ÁREA SUPERFICIAL TOTAL ACUMULADA S_T (m^2/g)
Glucosa	30°C	NaOH 1N 60°C 10 min	25	12.85	18.74
		NaOH 5N 90°C 30 min	23	12.13	18.41
	25°C	NaOH 1N 60°C 10 min	18	9.63	10.39
		NaOH 5N 90°C 30 mi	11	9.34	9.31
Sacarosa	30°C	NaOH 1N 60°C 10 min	21	19.82	28.22
		NaOH 5N 90°C 30 min	22	18.68	23.41
	25°C	NaOH 1N 60°C 10 min	20	19.56	27.18
		NaOH 5N 90°C 30 min	10	18.36	11.93
Glicerol	30°C	NaOH 1N 60°C 10 min	23	9.63	8.66
		NaOH 5N 90°C 30 min	25	16.17	23.41
	25°C	NaOH 1N 60°C 10 min	10	4.38	6.76
		NaOH 5N 90°C 30 min	30	15.44	13.52

a. Determinado como el pico de la curva de distribución de tamaño de poro.

En las membranas obtenidas a partir de las tres fuentes de carbono a 30°C no hay variación del radio medio de poro con el tratamiento, mientras en las membranas obtenidas a 25°C se presentan variaciones del orden de 100% para las tres fuentes de carbono; en las membranas obtenidas a partir de glucosa y sacarosa el tratamiento puede estar influyendo sobre las interacciones puente de hidrógeno alrededor del poro, las hace más fuertes y esto disminuye su tamaño. En las membranas obtenidas a partir de glicerol el tratamiento al disolver una mayor cantidad de celulosa tanto en la fase amorfa como la cristalina, permite el debilitamiento de estas interacciones y por ello el tamaño de poro aumenta.

El área superficial no presenta mayores variaciones para las membranas a partir de glucosa y sacarosa a 25°C y 30°C. Las membranas obtenidas a partir de glicerol presentan un aumento del área superficial con la severidad del tratamiento tanto para las membranas obtenidas a 25 como a 30°C. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en los análisis de XRD, y corroboran lo expuesto en la sección 5.2.2.

5.2.4 Espectroscopía Infrarrojo (FT IR)

Varios autores han reportado análisis de infrarrojo de celulosa bacteriana (Shirk y Greathouse, 1952; Bertocchi y colaboradores, 1997; Duvey y colaboradores, 2002; Kacurakova y colaboradores, 2002). La tabla 5.5 presenta algunos picos reportados en la literatura para la estructura de celulosa.

Tabla 5.5. Enlaces asociados a la estructura de Celulosa.

Longitud de Onda (cm^{-1})	Enlace	REFERENCIA
895	δ(C-1-H) enlace β-anomérico	Kacurakova y colaboradores (2002)
1000, 1015, 1030, 1115	ν (C-C), ν (C-O)	
1317, 1362	$\delta_s(CH_2)w$	
1426	δ_s CH_2 w	
1300-1500	δ(CH)	Stuart (2004)
2900-3000	ν (C-H)	
3330	ν (OH), puente de H	

δ: Deformación angular en el plano; ν: Deformación Axial; s: simétrico

Las membranas elaboradas en el presente trabajo fueron analizadas en el espectro de 400-4000 cm^{-1}. Los resultados del análisis infrarrojo para las membranas obtenidas a partir de glucosa y sometidas a diferentes tratamientos de purificación se presentan en la figura 5.24.

Se puede apreciar que los picos reportados en la literatura son visibles en las muestras analizadas. La estructura química de las membranas no presenta diferencias apreciables con el tratamiento, excepto por la membrana tratada con agua destilada que presenta un pico adicional a 1545 cm^{-1}; de acuerdo con Duvey y colaboradores (2002), este pico corresponde al enlace amida, que puede tener relación con proteínas y remanentes de biomasa presentes en esta membrana. El tratamiento con NaOH elimina estas impurezas, razón por la cual este pico no está presente en las membranas tratadas. De acuerdo conBertocchi y colaboradores (1997), los picos presentes a 897 y 1429 cm^{-1} ("tijereteo" del enlace CH_2) permiten confirmar la presencia de la estructura tipo I de la celulosa. Los picos a 1372 cm^{-1} (deformación angular del enlace C-H en el plano) y 2900 cm^{-1} (deformación de los enlaces C-H y CH_2) se usan para determinar el grado de cristalinidad.

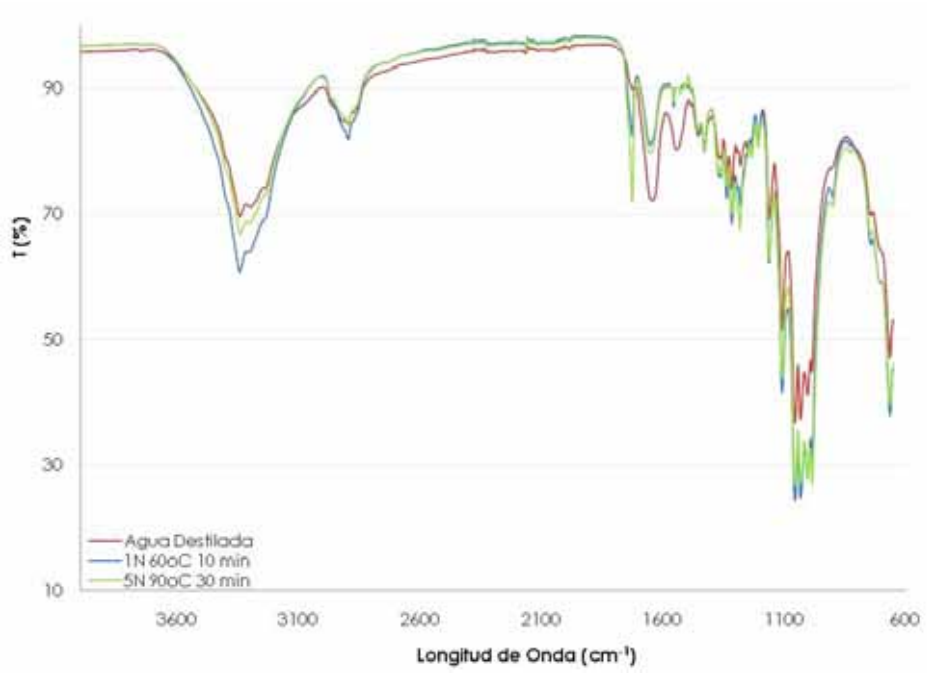

Figura 5.25. Espectro Infrarrojo para las membranas obtenidas a partir de glucosa a 25°C sometidas a diferentes tratamientos de purificación

En la figura 5.25 Se observa una disminución de la intensidad para el pico a 1372 cm^{-1}, y en menor medida para el pico a 2900 cm^{-1} para la membrana tratada con agua destilada, siendo congruente con lo encontrado en los análisis de difracción de rayos X, pues ésta membrana presentó la menor cristalinidad.

La figura 5.26 presenta el espectro infrarrojo para membranas obtenidas a partir de las tres fuentes de carbono. No se observan diferencias apreciables en la estructura de las membranas. Los picos que manifiestan la cristalinidad permiten apreciar que las membranas obtenidas a partir de glucosa y glicerol presentan la más alta, en comparación con las membranas obtenidas a partir de sacarosa, concordando con lo presentado en la tabla 5.1, donde la cristalinidad es de 90.04, 74.98 y 90.65 para las membranas obtenidas a partir de glucosa, sacarosa y glicerol respectivamente.

El pico correspondiente a la deformación de los enlaces -OH presenta diferencias significativas entre la membrana obtenida a partir de sacarosa y las demás. Esto puede ser un indicativo de diferencias en los arreglos -OH entre las diferentes cadenas de celulosa, que pueden tener efecto sobre el desempeño de la membrana. Se puede concluir que la celulosa obtenida de las tres fuentes de carbono presentan el mismo comportamiento en el espectro IR, con presencia de los picos que permiten identificar las características generales de la celulosa, estos no presentan mayores diferencias, mientras los picos que dan un indicativo del grado de cristalinidad, presentan diferencias de acuerdo con el sustrato, condiciones de cultivo y tratamiento.

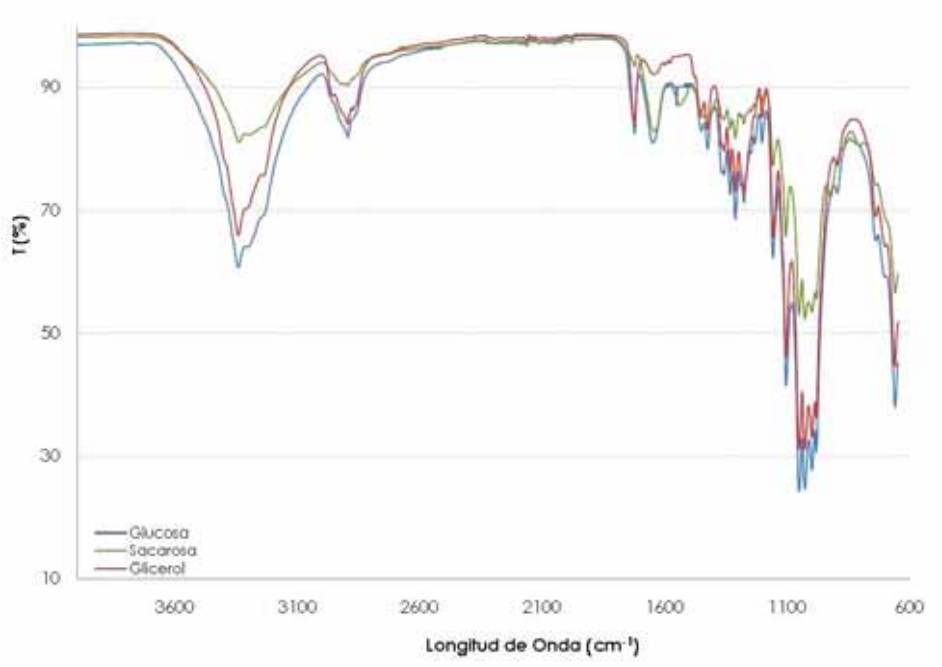

Figura 5.26. Espectro Infrarrojo para las membranas obtenidas a partir de glucosa, sacarosa y glicerol a 25°C y purificadas con NaOH 1N 60°C 10minutos

En la figura 5.27 se observa que las membranas obtenidas a 25°C y 30°C no presentan diferencias significativas en su estructura.

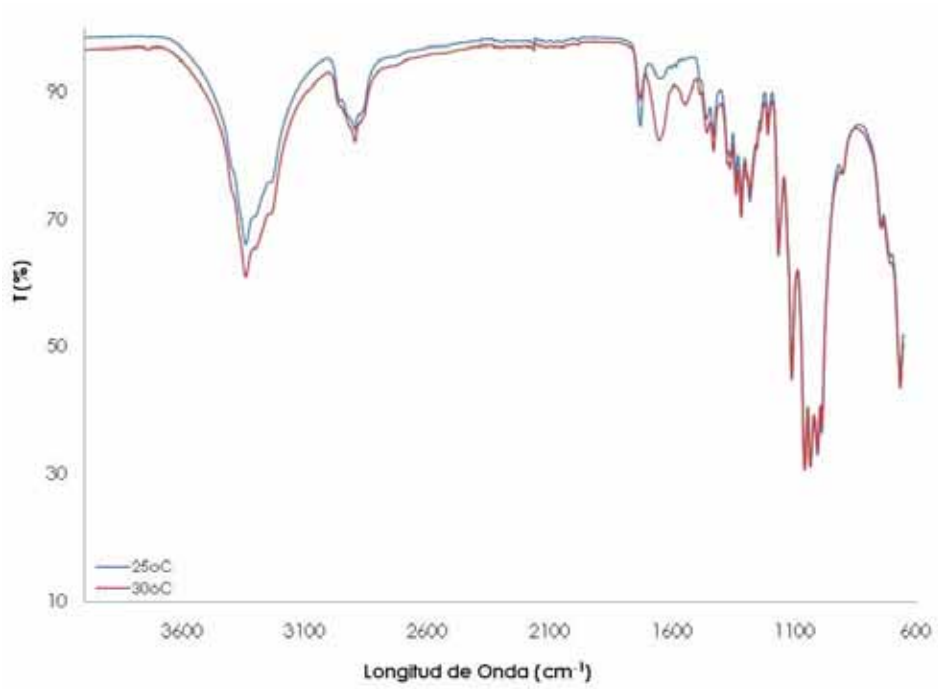

Figura 5.27. Espectro Infrarrojo para las membranas obtenidas a partir de glucosa, a 25°C y 30°C purificadas con NaOH 1N 60°C 10minutos

5.2.5 Análisis Termogravimétrico (TGA)

La figuras 5.28 y 5.29 presentan el comportamiento de las membranas de glucosa sometidas a análisis termogravimétrico. Antes de 100°C no existe una pérdida apreciable de peso, que podría asociarse a evaporación del agua contenida en la muestra, por lo que puede entenderse que la cantidad de agua en la estructura de las membranas es mínima. El segundo evento, que inicia alrededor de 200°C para las membranas tratadas con NaOH y 100°C para la tratada con agua destilada, puede estar asociado al inicio de la descomposición térmica o la pérdida de agua ligada.

Existe un tercer evento, que inicia alrededor de 250°C para las membranas tratadas y 170°C para la membrana tratada con agua destilada, donde ocurre una pérdida de peso con forma de "hombro", que determina el inicio de la degradación térmica (Suñol y colaboradores, 2003). Entre menor sea la temperatura de inicio de este evento, menor estabilidad térmica presenta la estructura, debido principalmente a la presencia de impurezas en la matriz polimérica que se degradan más rápidamente, y ello se evidencia en la pérdida de peso, tal como ocurre con la muestra tratada solamente con agua destilada.

El cuarto evento corresponde a una pérdida de peso a gran velocidad, asociada a la pirolisis de la celulosa. Se observa que para las membranas tratadas con NaOH esta pérdida de peso representa entre el 60 y el 70% del total de la muestra. Para la celulosa tratada con agua destilada, la pérdida de peso asociada a este evento es del 35%.

Las membranas obtenidas a partir de sacarosa y glicerol presentaron comportamientos similares a los de las membranas producidas con glucosa. La tabla 5.6 presenta los resultados obtenidos para las membranas probadas. La pérdida de peso a 100°C es muy baja para todas las membranas, un indicativo de que el contenido de agua es muy bajo, y en las membranas obtenidas a partir de glucosa y sacarosa este contenido disminuye un poco con la severidad del tratamiento. Las membranas producidas con glicerol presentan el comportamiento inverso. La temperatura de descomposición aumenta con la severidad del tratamiento para las membranas obtenidas a partir de glucosa tanto a 25 como a 30°C, mientras que ocurre lo contrario para las membranas obtenidas a partir de sacarosa y glicerol.

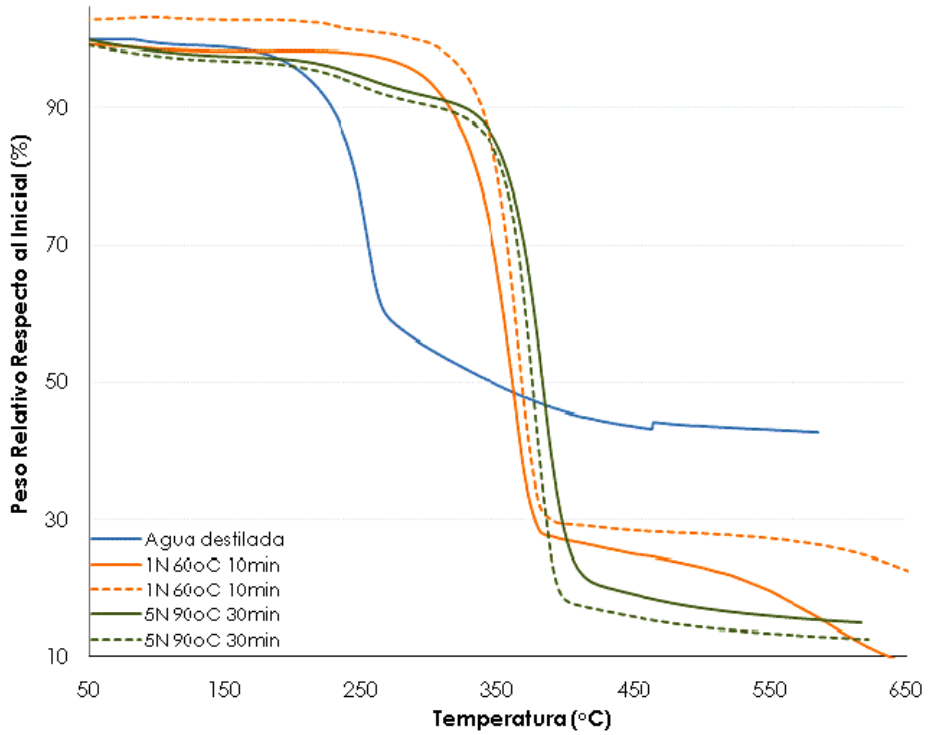

Figura 5.28. Análisis Termogravimétrico para las membranas obtenidas a partir de glucosa a 25°C (línea continua) y 30°C (línea punteada) sometidas a diferentes tratamientos de purificación

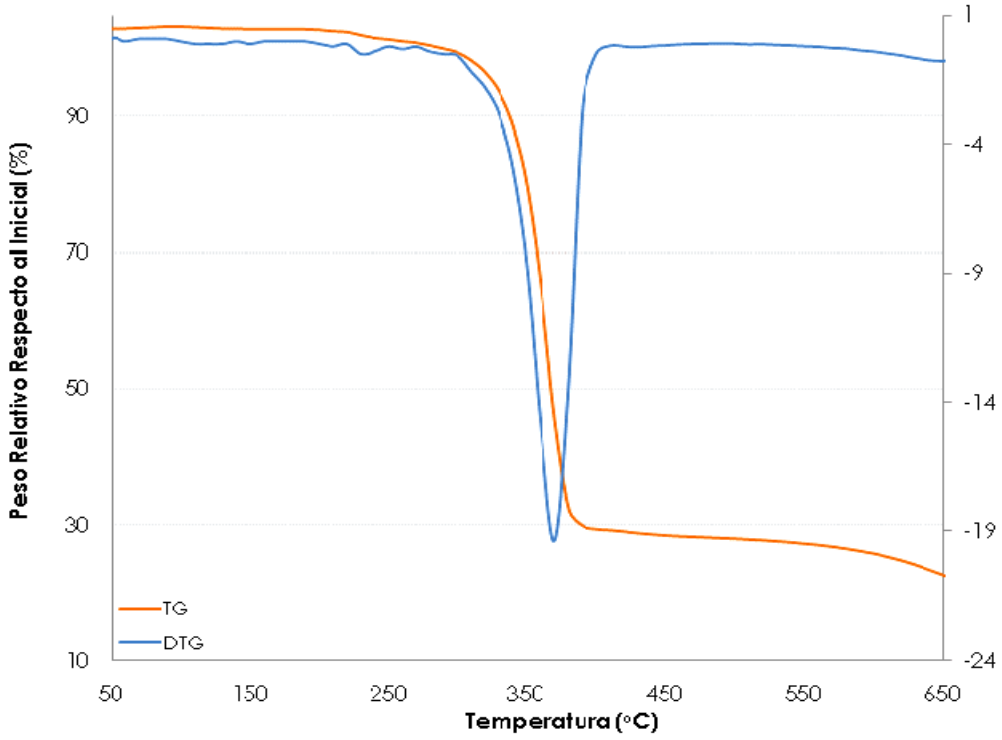

Figura 5.29. Análisis Termogravimétrico (TG) y su derivada (DTG) para la membrana obtenida a partir de glucosa a 25°C y tratada con NaOH 1N durante 10 minutos a 60°C.

Tabla 5.6. Resultados del análisis termogravimétrico de membranas de celulosa bacteriana.

Fuente de carbono	Temperatura de Cultivo	Tratamiento	Pérdida de peso a 100°C (%)	Temperatura de Descomposición	Temperatura de alcance de pérdida de peso en 20%
Glucosa	25°C	1N 60°C 10min	98.7	370.1	334.6
		5N 90°C 30min	98.3	384.4	357.7
	30°C	1N 60°C 10min	100	370.0	349.8
		5N 90°C 30min	97.6	376.1	354.4
Sacarosa	25°C	1N 60°C 10min	98.3	371.2	340.6
		5N 90°C 30min	97.9	372.3	346.2
	30°C	1N 60°C 10min	98.2	361.2	322.2
		5N 90°C 30min	97.6	375.5	347.7
Glicerol	25°C	1N 60°C 10min	97.7	384.5	331.2
		5N 90°C 30min	98.6	373.2	324.9
	30°C	1N 60°C 10min	97.4	381.6	343.4
		5N 90°C 30min	97.8	379.7	333.8

De acuerdo con George y colaboradores (2005), la temperatura de degradación de la celulosa está asociada a parámetros como el grado de polimerización y cristalinidad; esta última permite una estabilización de la estructura, y por ende un aumento en la temperatura de degradación. El aumento de la severidad del tratamiento de purificación incrementa el grado de cristalinidad para las membranas obtenidas a partir de glucosa y sacarosa tanto a 25°C como a 30°C (tabla 5.1), lo que se refleja en las temperaturas de degradación, y consecuentemente, en el contenido de agua en la membrana, pues a mayor cristalinidad, menor posibilidad de retener agua en la estructura. Las membranas obtenidas a partir de glicerol presentan el comportamiento contrario, lo que tendría explicación en el descenso del grado de cristalinidad con la intensidad del tratamiento de purificación.

5.2.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los resultados del análisis calorimétrico pueden apreciarse en la figura 5.30 para las membranas obtenidas a partir de glucosa. Un primer evento, entre 25 y 45°C, puede asociarse a la temperatura de transición vítrea del polímero, T_g. Posteriormente se presenta un pico endotérmico que puede atribuirse a evaporación del agua ligada presente en la estructura, o a la fusión de la fase cristalina del polímero a la temperatura T_m. Bertranm y Dale (1986) y Caicedo y colaboradores (2002), atribuyen este pico a pérdida de agua presente en la estructura, específicamente agua ligada.

George y colaboradores (2005b), asociaron este pico con la fusión de la fase cristalina de la estructura. Sin embargo los autores no reportan la temperatura de fusión para ser comparada con los datos de este trabajo.

La tabla 5.7 Presenta las temperaturas de transición vítrea y de fusión de la fase cristalina para las membranas tratadas. La temperatura de transición vítrea aumenta con la severidad del tratamiento de purificación para las membranas obtenidas a partir de glucosa y glicerol, pero no así para las producidas con sacarosa, donde ocurre lo contrario. Esto puede tener relación con el grado de cristalinidad de la estructura, pues a mayor grado de cristalinidad, mayor T_g.

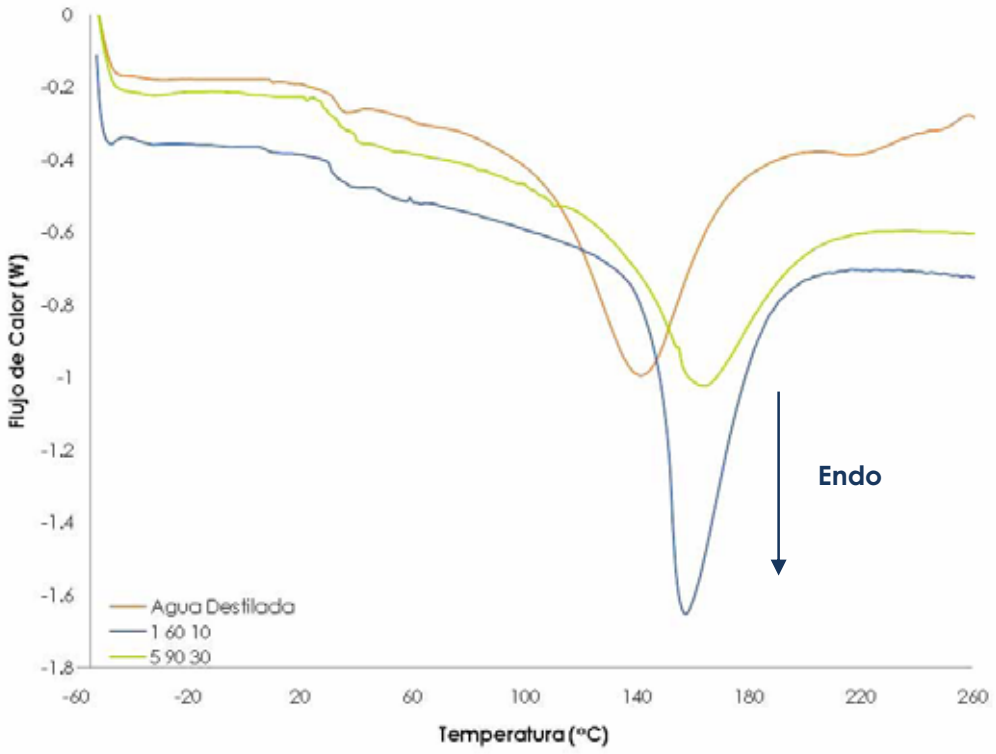

Figura 5.30. Termogramas DSC para las membranas obtenidas a partir de glucosa a 30°C sometidas a diferentes tratamientos de purificación

Tabla 5.7. Resultados del análisis calorimétrico de membranas de celulosa bacteriana.

Fuente de Carbono	Temperatura de Cultivo	Tratamiento	T_g
Glucosa	25°C	1N 60°C 10min	40.86
		5N 90°C 30min	43.49
	30°C	1N 60°C 10min	28.15
		5N 90°C 30min	31.25
Sacarosa	25°C	1N 60°C 10min	36.32
		5N 90°C 30min	28.19
	30°C	1N 60°C 10min	27.96
		5N 90°C 30min	23.04
Glicerol	25°C	1N 60°C 10min	30.63
		5N 90°C 30min	32.88
	30°C	1N 60°C 10min	27.82
		5N 90°C 30min	29.31

5.3 Determinación de las Propiedades de Transporte

5.3.1 Grado de Hinchamiento

La celulosa bacteriana posee carácter hidrofílico, al igual que la celulosa de origen vegetal (Duvey y colaboradores, 2002; George y colaboradores, 2005; Ramana y colaboradores, 2000). Esto puede evidenciarse en los resultados sobre grado de hinchamiento de las figuras 5.31 y 5.32 para las membranas producidas a 25 y 30°C respectivamente. El hinchamiento es mayor para las membranas obtenidas a 30°C. No existe un efecto marcado del tratamiento sobre el grado de hinchamiento.

En las membranas producidas a 30°C existen diferencias en el grado de hinchamiento entre las distintas fuentes de carbono, siendo las membranas obtenidas a partir de sacarosa las que presentan el menor grado de hinchamiento con respecto a las obtenidas a partir de glucosa y glicerol. Se observa que al finalizar el ensayo las membranas presentan cambio en una sola dimensión, el espesor, confirmando lo reportado por otros autores (Caicedo y colaboradores, 2003; Buyanov y colaboradores, 2010).

Los análisis de difracción de rayos x determinaron que la membrana posee una elevada proporción de estructura cristalina que no permite almacenar grandes cantidades de solvente, por lo que puede concluirse que el agua absorbida queda atrapada en mayor cantidad en los espacios existentes entre las capas de la membrana que en la fase amorfa presente en cada una de las capas.

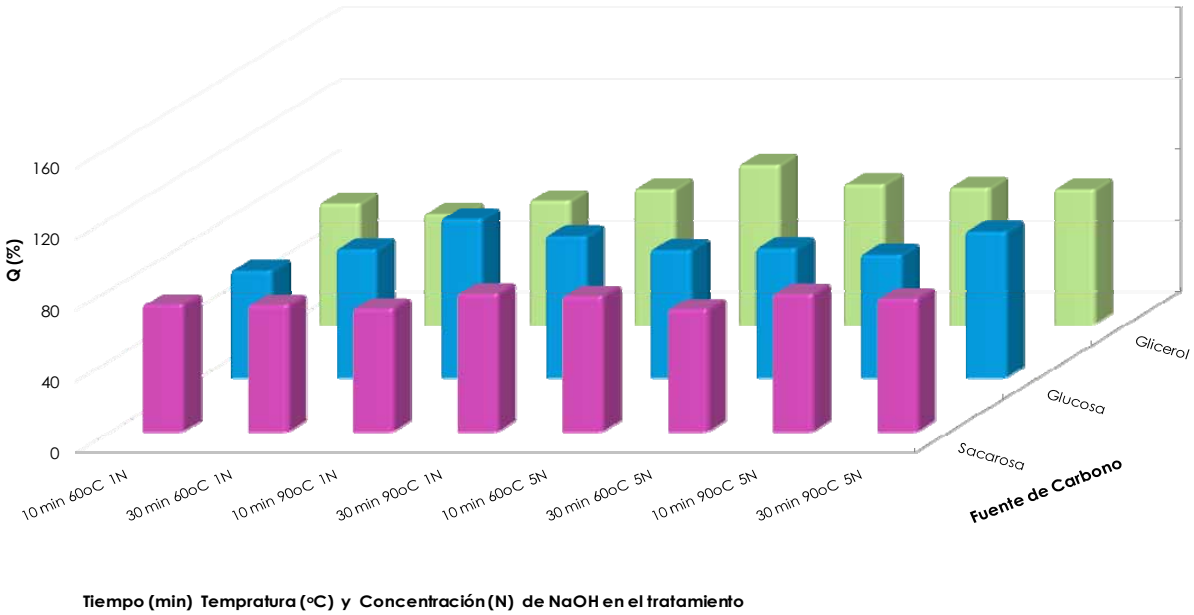

Figura 5.31. Grado de Hinchamiento para membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de diferentes sustratos a 25°C

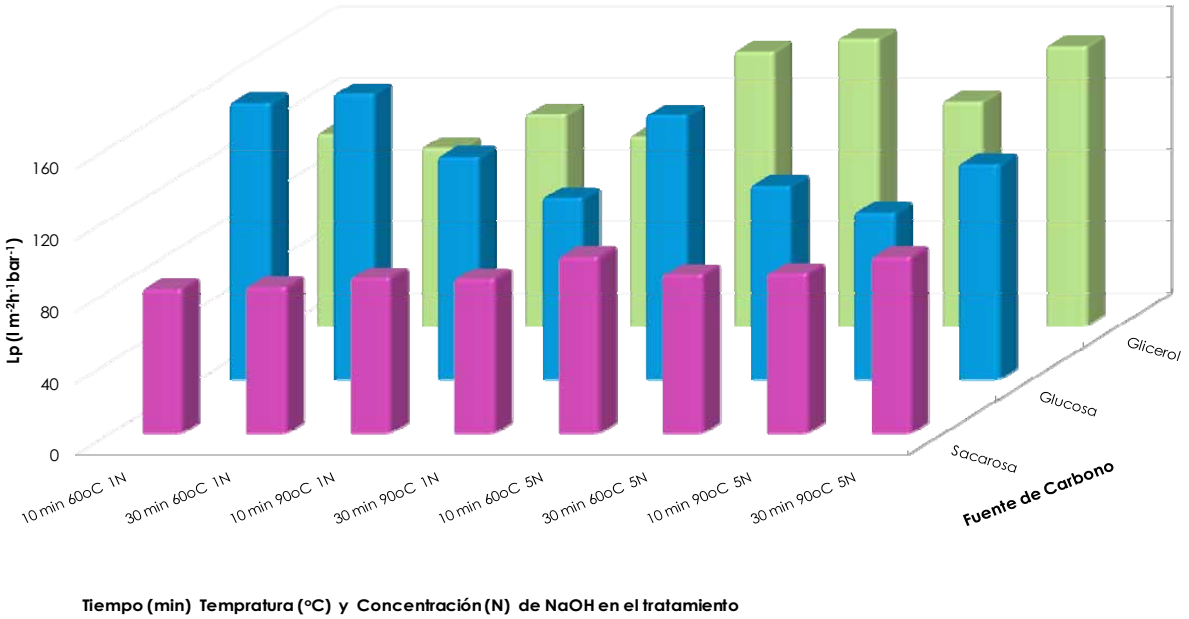

Figura 5.32. Grado de Hinchamiento para membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de diferentes sustratos a 30°C

Las membranas obtenidas a las dos temperaturas de cultivo no presentan mayores variaciones en el grado de hinchamiento antes del proceso de secado como se aprecia en las figuras 5.33 a 5.35; ninguna de las membranas sometidas a la prueba recuperó el grado de hinchamiento que poseía antes del secado. Esto puede tener origen en el método de secado al que fue sometida la membrana. Clasen y colaboradores (2006), evaluaron el efecto de diversas alternativas de secado en membranas de celulosa bacteriana y encontraron que las que se someten a secado por evaporación del solvente (empleado en este trabajo) presentan los menores valores de hinchamiento comparadas con los correspondientes al secado por liofilización; este último, aunque también presenta una reducción en la cantidad de agua absorbida, permite una mejor recuperación de la estructura que el secado por evaporación.

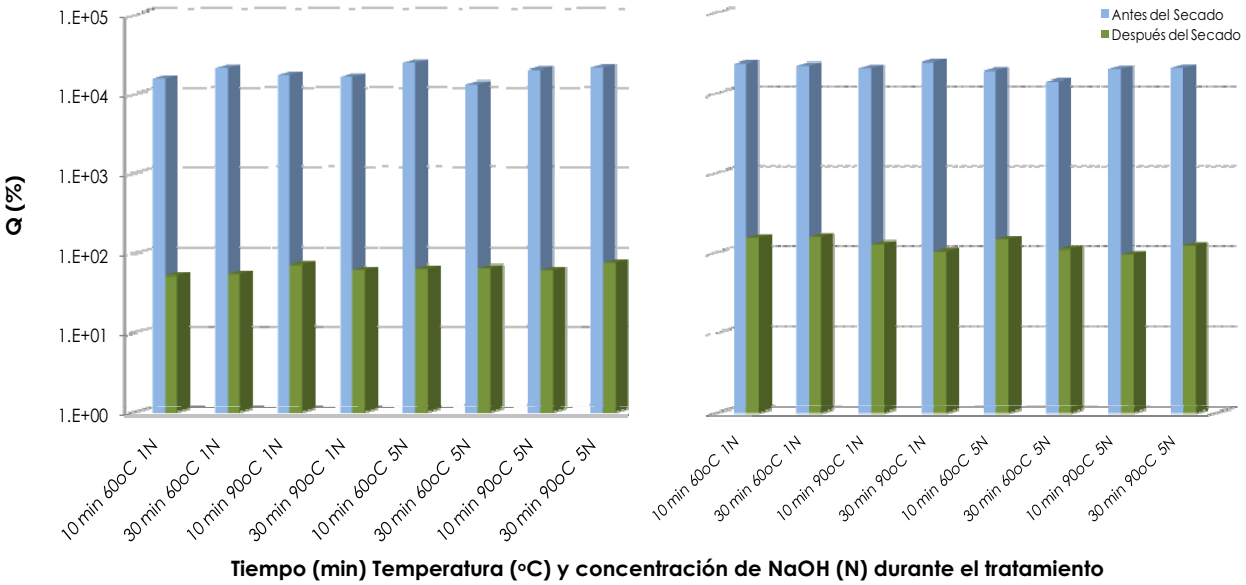

Figura 5.33. Grado de Hinchamiento para membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de glucosa a 25°C (izquierda) y 30°C (derecha) antes y después del secado

El fenómeno presentado durante este método de secado fue expuesto por Jie y colaboradores (2005); de acuerdo con estos autores las uniones tipo puente de hidrógeno entre agua-agua y agua-celulosa son lo suficientemente fuertes para formar algunas macro cavidades que se hacen cada vez más pequeñas a medida que se evapora el agua libre, dando lugar a uniones puente de hidrógeno entre las fibras de celulosa. Al realizar el hinchamiento de la membrana seca, estas uniones requieren una mayor energía de solvatación que no se alcanza fácilmente a las condiciones del ensayo. Como se expuso en la sección 1.1 la celulosa de origen bacteriano contiene una gran fracción de celulosa I_α, que se caracteriza por presentar mayor cantidad de puentes de hidrógeno que la celulosa I_β, de manera que a mayor cantidad de puentes de hidrógeno, mayor energía de solvatación, y en consecuencia, menor probabilidad de recuperar la capacidad de retención de agua propia de la celulosa antes del secado.

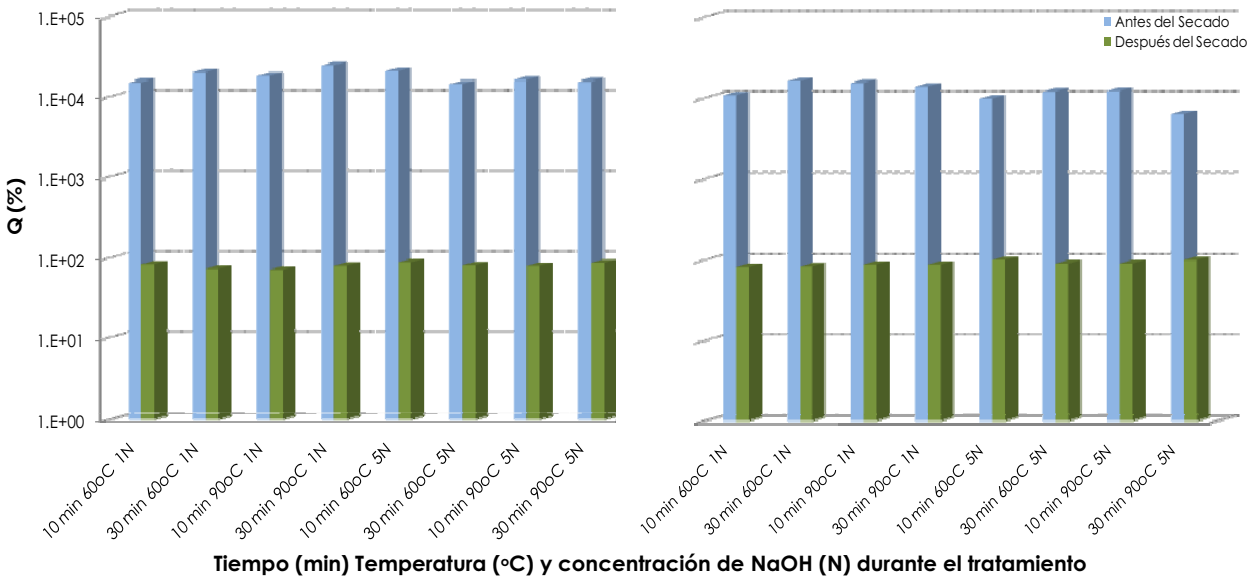

Figura 5.34. Grado de Hinchamiento para membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de sacarosa a 25°C (izquierda) y 30°C (derecha) antes y después del secado

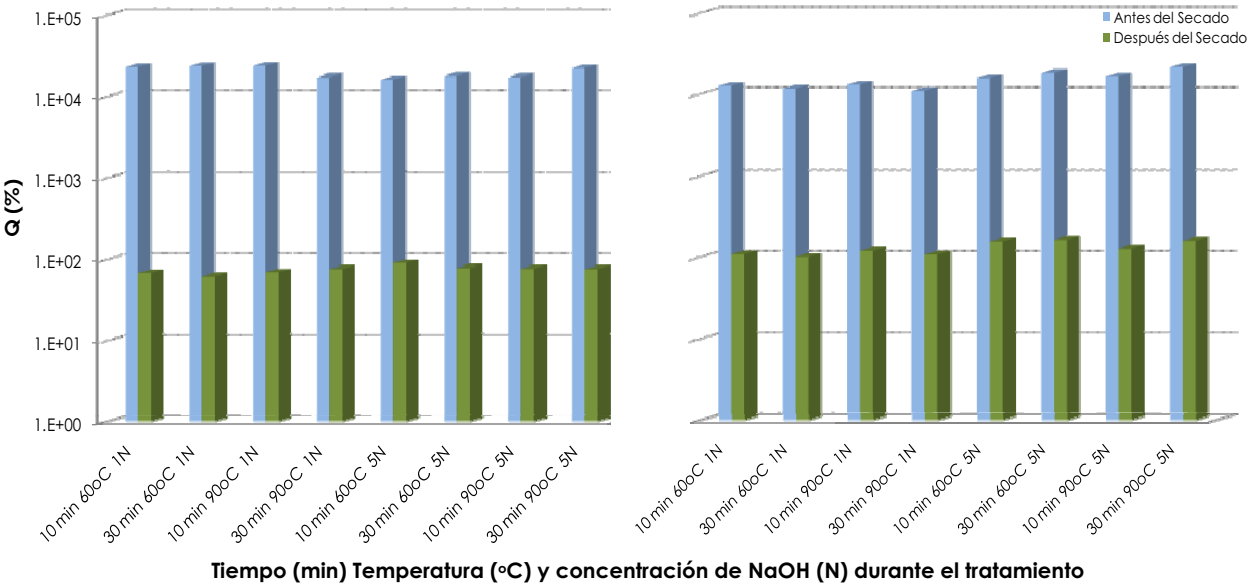

Figura 5.35. Grado de Hinchamiento para membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de glicerol a 25°C (izquierda) y 30°C (derecha) antes y después del secado

Después del proceso de secado, el hinchamiento de las membranas obtenidas a partir de sacarosa no presentan diferencias apreciables para las dos temperaturas de cultivo (figuras 5.32 y 5.33); si se tiene en cuenta que el espesor promedio de las membranas es el mismo (50 μm), y que aún así la cantidad de celulosa presente varía para cada una de ellas, puede afirmarse que la diferencia en la densidad se presenta en las distintas capas que forman la membrana, es decir, a nivel del área. Resultados similares fueron reportados por Wanichapichart y colaboradores (2002). Si se encuentran más fibras por unidad de área, la

probabilidad de agregación y colapso durante el proceso de secado sería mayor. Esto explicaría por qué a las membranas obtenidas a partir de sacarosa corresponden los menores valores de hinchamiento que a las membranas obtenidas a partir de glucosa y glicerol, pues para el mismo espesor que las demás, contienen mayor cantidad de celulosa. Por su parte, las membranas obtenidas a partir de glicerol, que presentan la menor cantidad de celulosa por unidad de área, son menos afectadas por el fenómeno de agregación de fibras y por ello su grado de hinchamiento es mayor.

5.3.2 Permeabiidad Hidráulica

Las membranas empleadas en las pruebas de permeabilidad hidráulica fueron sometidas hasta una presión de 12 bar sin presentar ruptura. En las figuras 5.36 y 5.37 se observan los resultados de permeado en función del tiempo y de *flux* en función de la presión para una de las membranas obtenidas a partir de glicerol a 25°C.

La membrana presenta un comportamiento estable con el aumento de la presión. El tiempo de estabilización empleado en las pruebas (30 minutos para cada presión) es suficiente para eliminar los efectos de la compactación de la estructura sobre el desempeño de la membrana. Esto se ve reflejado en la gráfica 5.40, donde no se aprecian mayores variaciones del flux de permeado con el tiempo para la presión de operación.

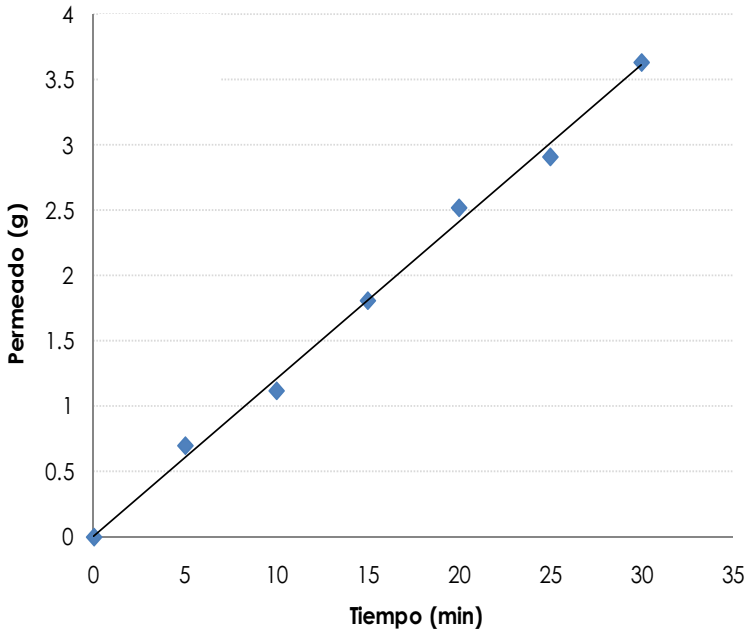

Figura 5.36. Masa de agua vs tiempo para una membrana de celulosa bacteriana obtenida a partir de glicerol

Por otra parte, es claro que no existen diferencias significativas en el *flux*, en los ensayos que se realizaron con variación ascendente y descendente de la presión (figura 5.37). En el intervalo de presiones estudiado, las membranas presentaron un comportamiento estable con el aumento de la presión, es decir, el aumento del *flux* con la presión se mantuvo constante, de lo cual se deduce que no se presentó ruptura de las membranas, y tampoco se produjo reducción del *flux* por fenómenos asociados a compactación excesiva o colapso de la estructura.

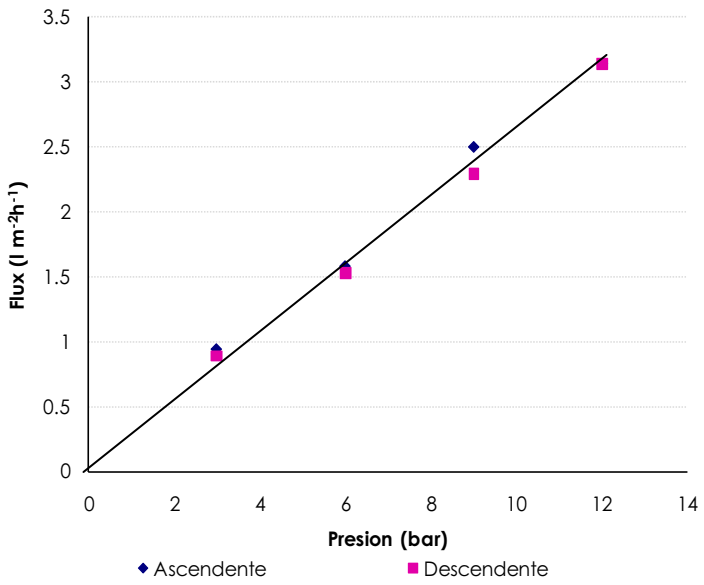

Figura 5.37. Efecto de la presión aplicada sobre el *flux* de permeado en la prueba de permeabilidad hidráulica para una membrana de celulosa bacteriana obtenida a partir de glicerol

Las figuras 5.38 y 5.39 presentan los resultados de las pruebas de permeabilidad para las membranas obtenidas a partir de las diferentes fuentes de carbono a 25 y 30°C. Las membranas producidas a 25°C presentan un L_p menor que el de las obtenidas a 30°C (variaciones de 80% para las obtenidas a partir de glucosa y de 50% para las obtenidas a partir de glicerol). Sin embargo, contrario a lo obtenido con las pruebas de hinchamiento, el tratamiento influye en la permeabilidad, especialmente en las membranas obtenidas a partir de glicerol y tratadas con NaOH 5N presentan una permeabilidad 73% mayor para las obtenidas a 25°C y 88 % mayor para las obtenidas a 30°C que cuando se utiliza NaOH 1N.

Las membranas obtenidas a partir de glucosa y sacarosa presentan variaciones menos marcadas de la permeabilidad con la concentración de NaOH en el tratamiento; de igual manera, tal como sucedió con las pruebas de grado de hinchamiento, presentan los valores más bajos. El tiempo de exposición de la membrana al agente químico no afecta significativamente la permeabilidad, comparado con factores como la fuente de carbono y la concentración del agente.

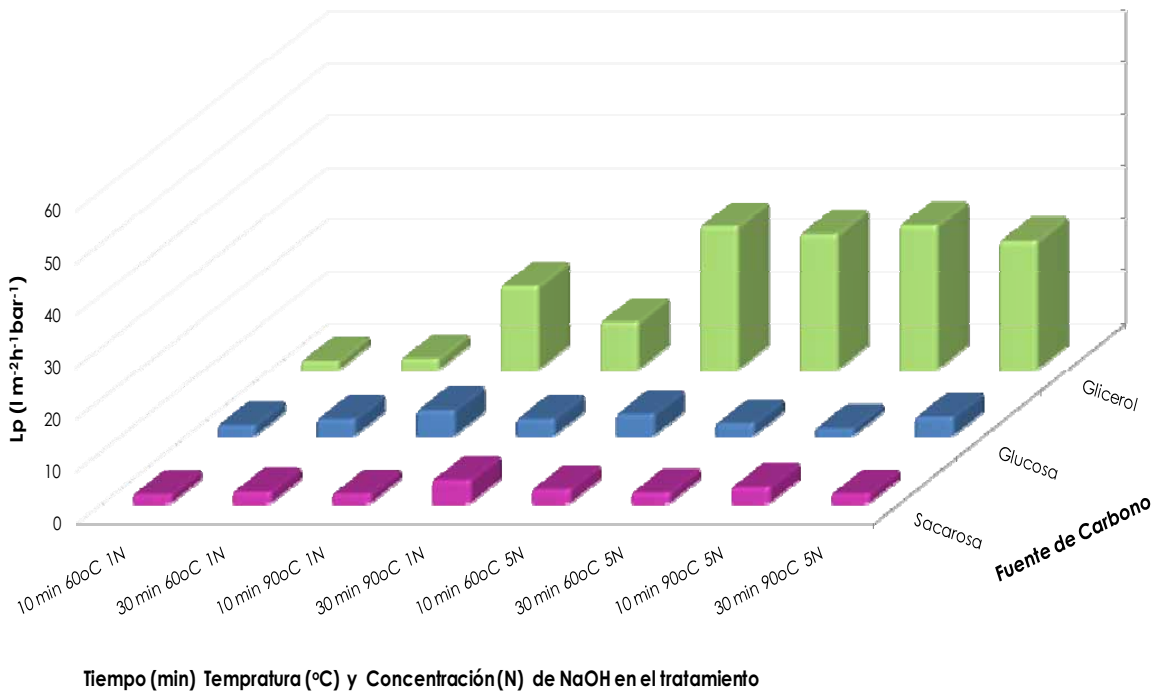

Figura 5.38. Coeficiente de permeabilidad hidráulica (L_P) para membranas obtenidas a 25°C a partir de las tres fuentes de carbono: glucosa, sacarosa y glicerol

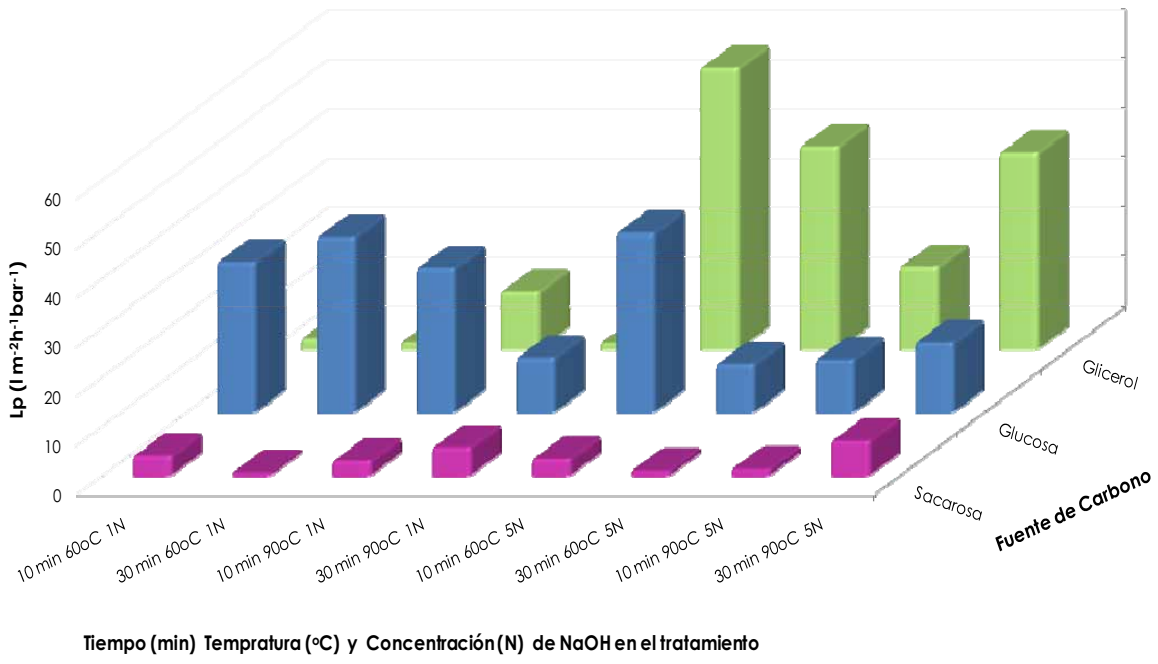

Figura 5.39. Coeficiente de permeabilidad hidráulica (L_P) para membranas obtenidas a 30°C y las tres fuentes de carbono: glucosa, sacarosa y glicerol

En las figuras 5.40 a 5.42 puede observarse una posible relación entre el L_p y el hinchamiento con el radio medio de poro y el área superficial; para las membranas obtenidas a partir de glucosa y glicerol, a mayor radio medio de poro, más fácil es el paso de líquido a través de la membrana.

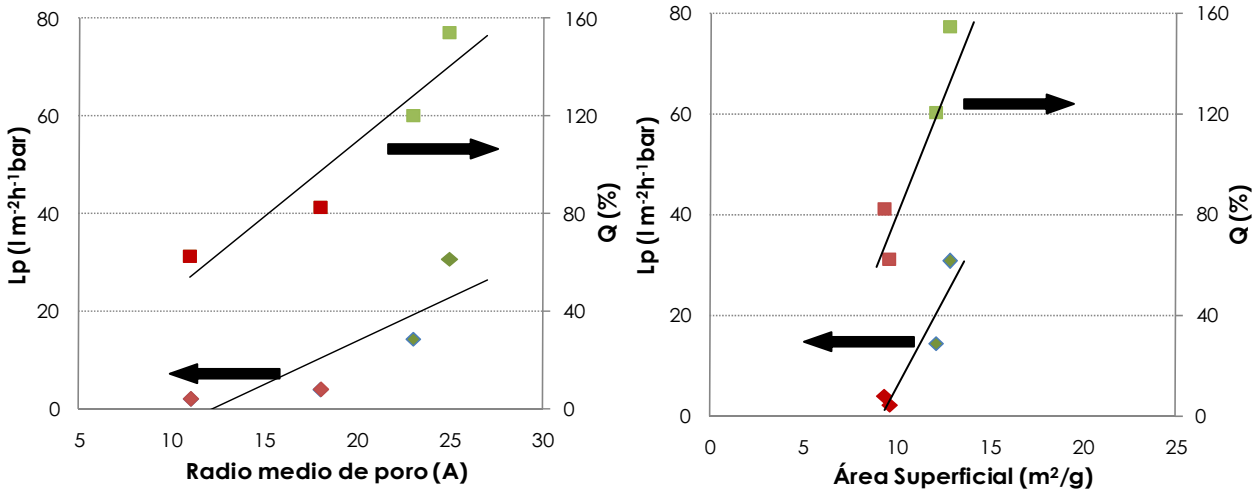

Figura 5.40. Relación entre el radio medio de poro y el área superficial con el grado de hinchamiento (Q) y el coeficiente de permeabilidad hidráulica (L_P) para membranas obtenidas a partir de glucosa. ■ Q (%). ♦ Lp (l m^{-2}h^{-1}bar^{-1}). Rojo: Membranas obtenidas a 25ºC. Verde: Membranas obtenidas a 30ºC.

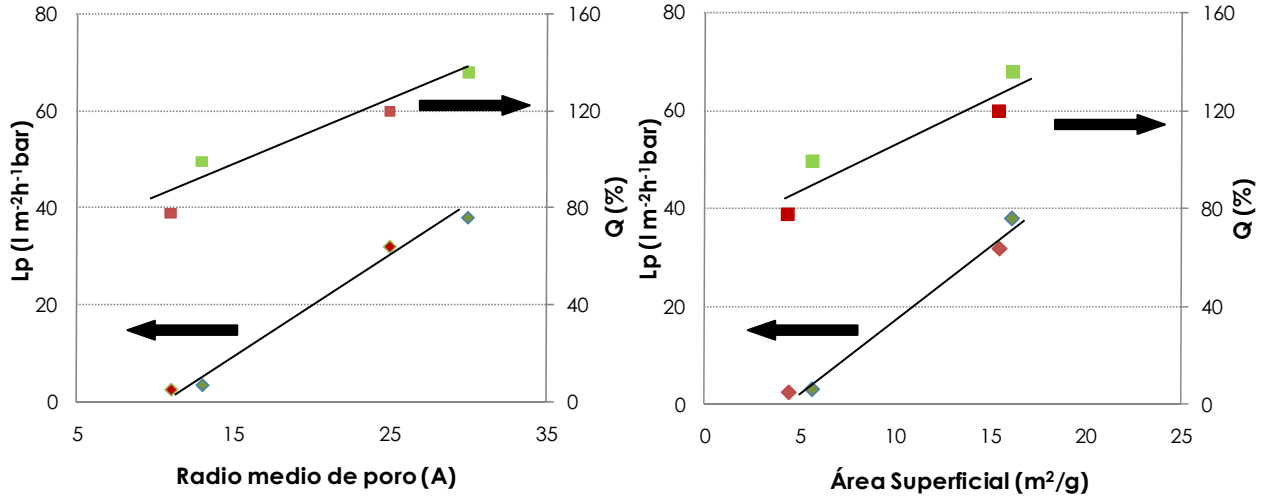

Figura 5.41. Relación entre el radio medio de poro y el área superficial con el grado de hinchamiento (Q) y el coeficiente de permeabilidad hidráulica (L_P) para membranas obtenidas a partir de glicerol. ■ Q (%). ♦ Lp (l m^{-2}h^{-1}bar^{-1}). Rojo: Membranas obtenidas a 25ºC. Verde: Membranas obtenidas a 30ºC.

Para las membranas producidas con sacarosa, la relación entre radio medio de poro y permeabilidad permanece casi constante, al igual que el hinchamiento. Sin embargo, aunque el radio medio de poro y el área superficial presentan valores similares y hasta superiores a los presentados por las membranas obtenidas a partir de glucosa y glicerol, la permeabilidad es significativamente menor, dando a entender que si bien la presencia de estos poros en la membrana es importante para el transporte de solvente, es más

importante la capacidad que tenga la membrana para retener agua en su interior, pues es ésta la encargada de facilitar el transporte a través de la misma. Esto puede apreciarse claramente en estas figuras, pues sólo si aumenta el grado de hinchamiento, lo hace también la permeabilidad con el tamaño de poro.

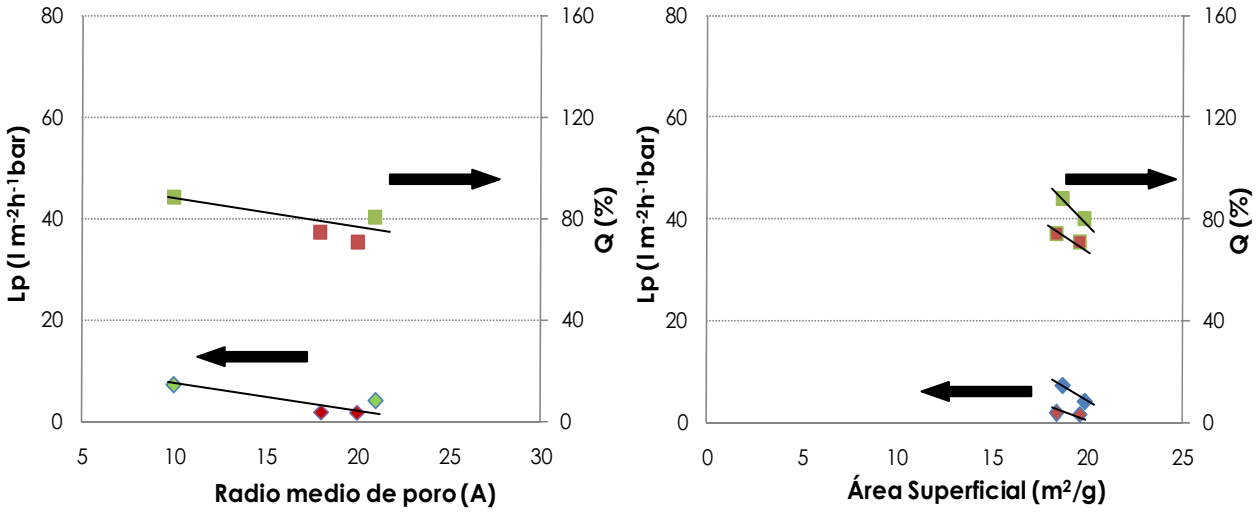

Figura 5.42. Relación entre el radio medio de poro y el área superficial con el grado de hinchamiento (Q) y el coeficiente de permeabilidad hidráulica (L_P) para membranas obtenidas a partir de sacarosa. ■ Q (%). ♦ Lp (l $m^{-2}h^{-1}bar^{-1}$). Rojo: Membranas obtenidas a 25ºC. Verde: Membranas obtenidas a 30ºC.

Las figuras 5.43 a 5.45, presentan la relación existente entre el grado de hinchamiento y la permeabilidad para las diferentes membranas. En términos generales, a medida que crece el grado de hinchamiento, aumenta la permeabilidad. Sin embargo este aumento es menor para las membranas obtenidas a 25ºC que para las obtenidas a 30ºC, para las tres fuentes de carbono.

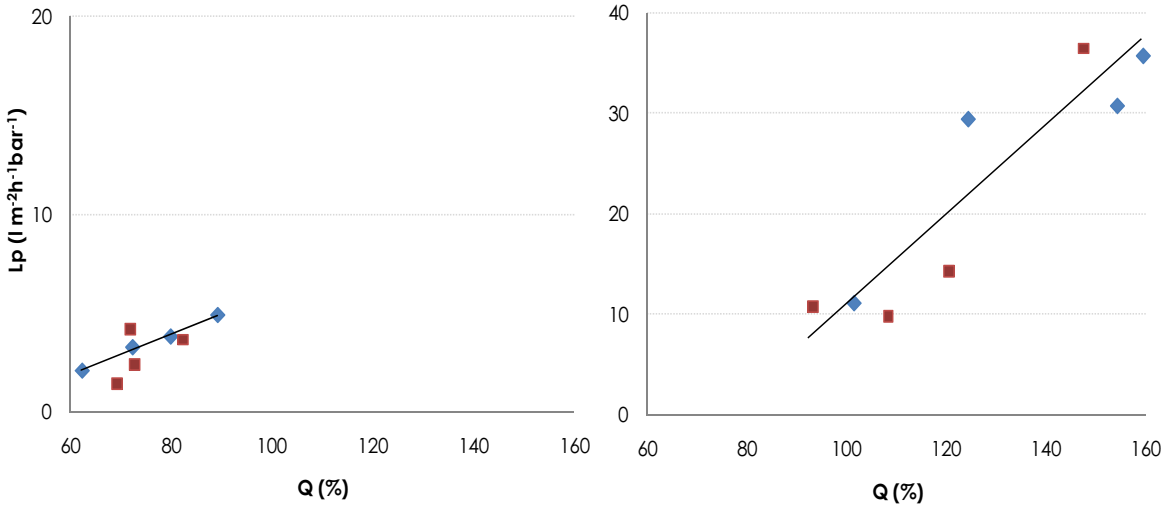

Figura 5.43. Relación entre el grado de hinchamiento (Q) y el coeficiente de permeabilidad hidráulica (L_P) para membranas obtenidas a partir de glucosa. Membranas obtenidas a 25ºC (izquierda) y 30ºC (derecha). Membranas tratadas con NaOH ♦ 1N y ■ 5N.

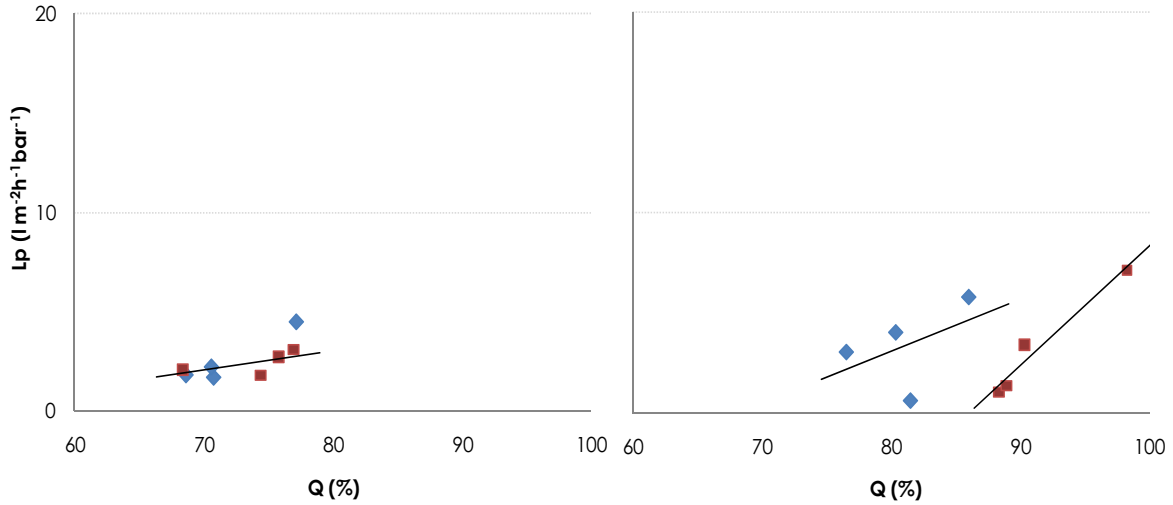

Figura 5.44. Relación entre el grado de hinchamiento (Q) y el coeficiente de permeabilidad hidráulica (L_P) para membranas obtenidas a partir de sacarosa. Membranas obtenidas a 25ºC (izquierda) y 30ºC (derecha). Membranas tratadas con NaOH ♦ 1N y ■ 5N.

El tratamiento no parece afectar significativamente estas propiedades, ni su relación, en el caso de las membranas obtenidas a partir de glucosa y sacarosa a 25ºC; sin embargo, para las membranas obtenidas a 30ºC y a partir de glicerol a las dos temperaturas de cultivo el tratamiento incrementa la proporcionalidad entre el grado de hinchamiento y la permeabilidad.

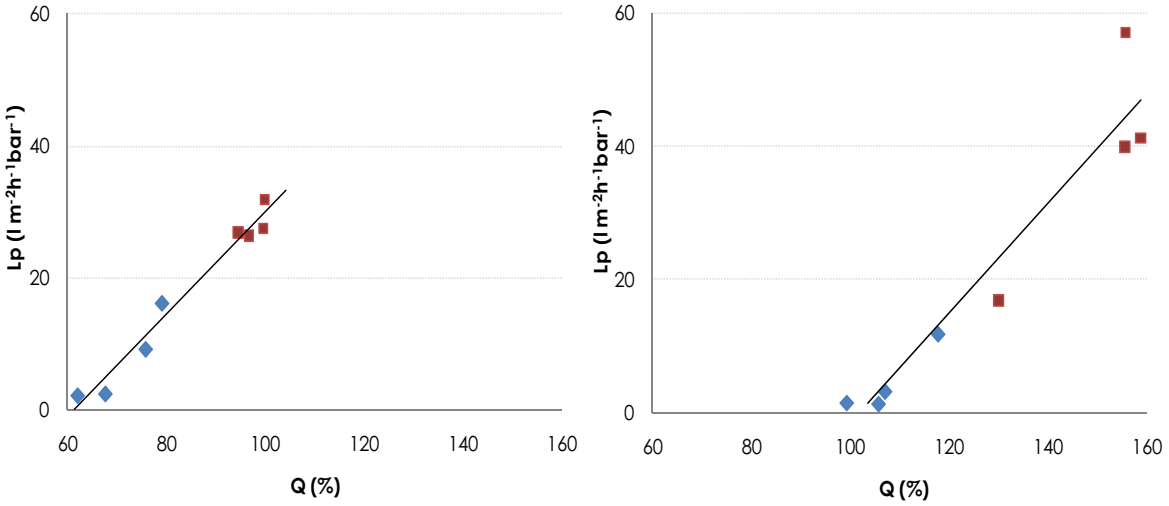

Figura 5.45. Relación entre el grado de hinchamiento (Q) y el coeficiente de permeabilidad hidráulica (L_P) para membranas obtenidas a partir de glicerol. Membranas obtenidas a 25ºC (izquierda) y 30ºC (derecha). Membranas tratadas con NaOH ♦ 1N y ■ 5N.

De todo lo anterior puede concluirse que si bien la cristalinidad y la estructura mesoporosa de la membrana de celulosa tiene influencia sobre la permeabilidad, es el grado de hinchamiento la principal propiedad asociada con el transporte a través de la membrana. La fuente de carbono y la temperatura de cultivo afectan las propiedades de transporte en mayor grado que el tratamiento de purificación, en el cual sólo incide en las membranas cuyas fibras presentan un diámetro que las hace susceptibles al ataque del agente químico, que origina a su vez algunos espacios que permiten el paso del agua.

Caicedo y colaboradores (2002), explicaron el transporte a través de membranas de celulosa bacteriana con la teoría de agregados moleculares, expuesta en el trabajo de Uragami, y colaboradores, (1982), según la cual, el agua forma agregados moleculares cuyo tamaño varía dependiendo de si se trata de agua pura o de una mezcla entre agua y otro solvente, caso en el cual la composición es factor influyente. El ingreso a la membrana se realiza a través de los poros de la superficie y de la región amorfa de las capas de la membrana, los cuales, de acuerdo al método de obtención presentan grupos hidroxilo en diferentes cantidades y arreglos, que interactúan con los agregados. A mayor cantidad de hidroxilos presentes, menor *flux* de permeado.

Si se acepta este mecanismo de transporte, los agregados moleculares de agua presentarán tamaño similar en los diferentes ensayos, debido a que se trata de agua pura, y a que se mantuvieron constantes todas las condiciones de operación en las pruebas para las diferentes membranas. El hecho de que la fuente de carbono y la temperatura de cultivo sean las variables que más afectan la permeabilidad, da a entender que la velocidad de formación de las fibras de celulosa permite arreglos diferentes de los grupos hidroxilo presentes en las fibras de celulosa, y son entonces las interacciones entre los diversos arreglos de los grupos hidroxilo y el agua, las que originan variaciones en las permeabilidades. Así, a las membranas obtenidas a partir de sacarosa correspondería una mayor cantidad de grupos hidroxilo disponible para interactuar con el agua y por esta razón el flux de permeado es menor en comparación con las membranas producidas por las otras fuentes de carbono.

5.3.3 Retención de Solutos

Las pruebas de retención de solutos se realizaron para las membranas que presentaron la mayor y menor permeabilidad hidráulica; estas son respectivamente, la membrana obtenida a partir de glicerol a 30°C, tratada con NaOH 5N a 60°C durante 10 minutos (L_p= 57.07 $lm^{-2}h^{-1}bar^{-1}$), y la obtenida a partir de sacarosa a 25°C, tratada con NaOH 1N a 60°C durante 10 minutos (L_p= 1.70 $lm^{-2}h^{-1}bar^{-1}$). Los resultados pueden apreciarse en las figuras 5.46 y 5.47. Las dos membranas presentan una caída del *flux* de permeado con respecto al agua pura característico de la ultrafiltración tangencial, donde el *flux* de permeado de la solución aumenta proporcionalmente con la presión a valores bajos de ésta; sin embargo, a presiones mayores, el *flux* tiende a ser constante (*flux* límite) debido a un aumento de las especies retenidas en la superficie de la membrana (polarización de la concentración),

creando una resistencia adicional que se compensa con el incremento de la presión (Habert y colaboradores, 2006).

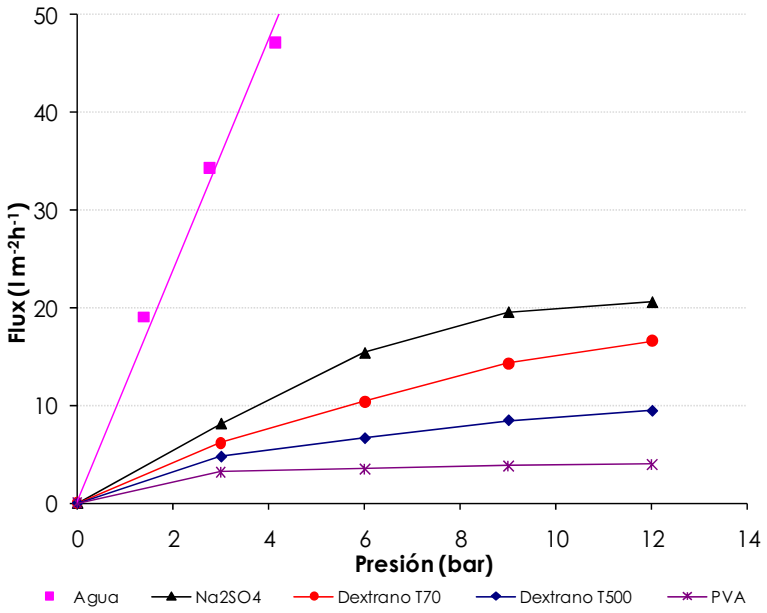

Figura 5.46. *Flux* de permeado de diferentes solutos para la membrana de mayor permeabilidad hidráulica

El *flux* de permeado de diferentes solutos en la membrana de mayor permeabilidad (figura 5.46) presenta una drástica caída con respecto al agua pura, y disminuye a medida que aumenta el tamaño de la molécula a retener, excepto para el PVA. De la misma manera, el *flux* límite se encuentra en valores superiores a 12 bar excepto para el PVA, que lo alcanza a los 3 bar. Para la membrana de menor permeabilidad (figura 5.47), la diferencia entre el *flux* de agua pura y el de las soluciones no presenta una variación significativa para presiones inferiores a 6 bar, debido probablemente al alto grado de compactación de la membrana, pues ésta presenta una de las mayores densidades aparentes (figura 5.12), con un consecuente aumento de la tortuosidad. Para presiones mayores se empieza a observar un comportamiento similar al encontrado con la membrana de alta permeabilidad hidráulica, es decir, el *flux* de permeado de todas las soluciones es menor que el encontrado para el agua pura, y el *flux* límite se encuentra a presiones superiores a 12 bar, siendo la solución de PVA la que tiende a alcanzarlo más rápidamente.

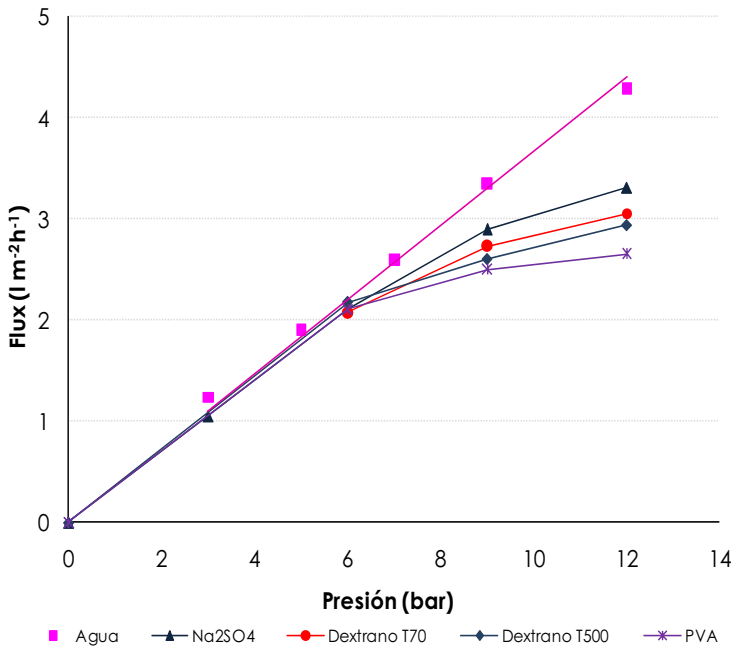

Figura 5.47. *Flux* de permeado de diferentes solutos para la membrana de menor permeabilidad hidráulica

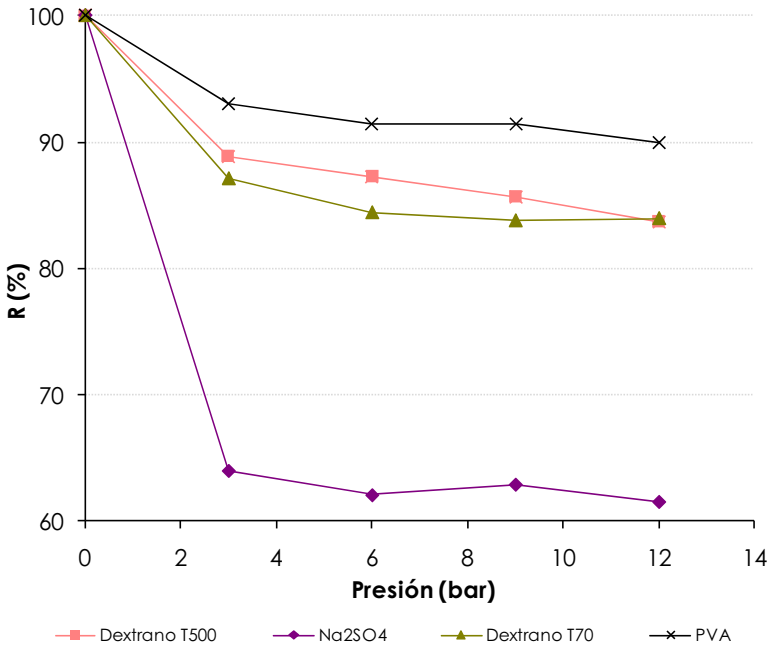

Figura 5.48. Retención para la membrana de mayor permeabilidad hidráulica

En el caso de la retención (figuras 5.48 y 5.49), el soluto más pequeño, el Na_2SO_4, presenta la menor retención (alrededor del 60%) sin variaciones significativas con la presión de trabajo; esto puede dar a entender que el soluto, debido a su tamaño, pasa con facilidad a través de los poros superficiales, y una vez en el interior de la membrana se transportan a través del agua presente gracias al hinchamiento. Estos valores de retención están acordes con los presentados por Hollman y Bhattacharyya (2002) para membranas de celulosa

bacteriana funcionalizada con poly(ácido L-glutámico). Dichos autores también encuentran que la retención no cambia significativamente con la variación de la presión de trabajo (y por ende el *flux* de permeado), debido a que el tamaño de poro permite el paso de la molécula de Na_2SO_4, y las interacciones entre el soluto y la membrana no son suficientes para interferir en su migración.

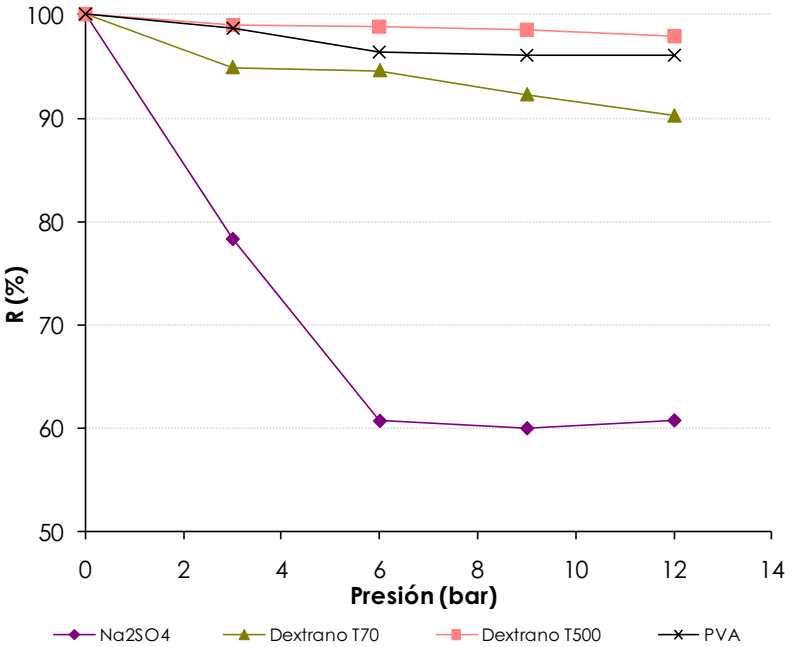

Figura 5.49. Retención para la membrana de menor permeabilidad hidráulica

La retención de los solutos de mayor peso molecular disminuye con la presión en las dos membranas. Se esperaría que a mayor peso molecular del soluto, mayor retención; sin embargo, lo que se observa es que la mayor retención la presenta el alcohol polivinílico (85-124 kDa), mientras que el dextrano de mayor peso molecular (500 kDa) presenta una retención similar al dextrano de menor peso molecular (70 kDa). Esto puede ser ocasionado por la estructura de los solutos, pues los dextranos son moléculas ramificadas, que poseen un alto grado de flexibilidad, lo cual favorece su paso a través de la membrana, mientras el PVA es una molécula lineal con una gran cantidad de grupos hidroxilo; la baja flexibilidad de la molécula permite que estos grupos se encuentren expuestos y disponibles para interactuar con los propios de la estructura de la membrana, dificultando su paso, y, disminuyendo el *flux* de permeado. Balmann y Nobrega (1989), encontraron en su trabajo que las moléculas de origen biológico como el dextrano son susceptibles de deformación bajo el efecto de la presión; estas deformaciones podrían facilitar el paso del dextrano a través de la membrana. Otro factor que explicaría esta diferencia en el *flux* es la viscosidad de las soluciones, pues las soluciones 1% p/v de dextrano T70 y T500 presentan viscosidades de 0,013 y 0,106 centi poises (cP) respectivamente (Pharmacosmos, 2011), mientras la de la solución de PVA es de 2 cP (Tao, 2003).

5.3.4 Diálisis

Las pruebas de diálisis se realizaron con dos membranas, obtenidas a partir de glucosa a 30°C (membrana 1) y sacarosa a 25°C (membrana 2), que presentaron alta y baja permeabilidad hidráulica, respectivamente. Se usaron dos solutos, uno orgánico y uno inorgánico, con el fin de determinar si la membrana facilita el transporte de alguno en particular. Los resultados se aprecian en las figuras 5.50 y 5.51.

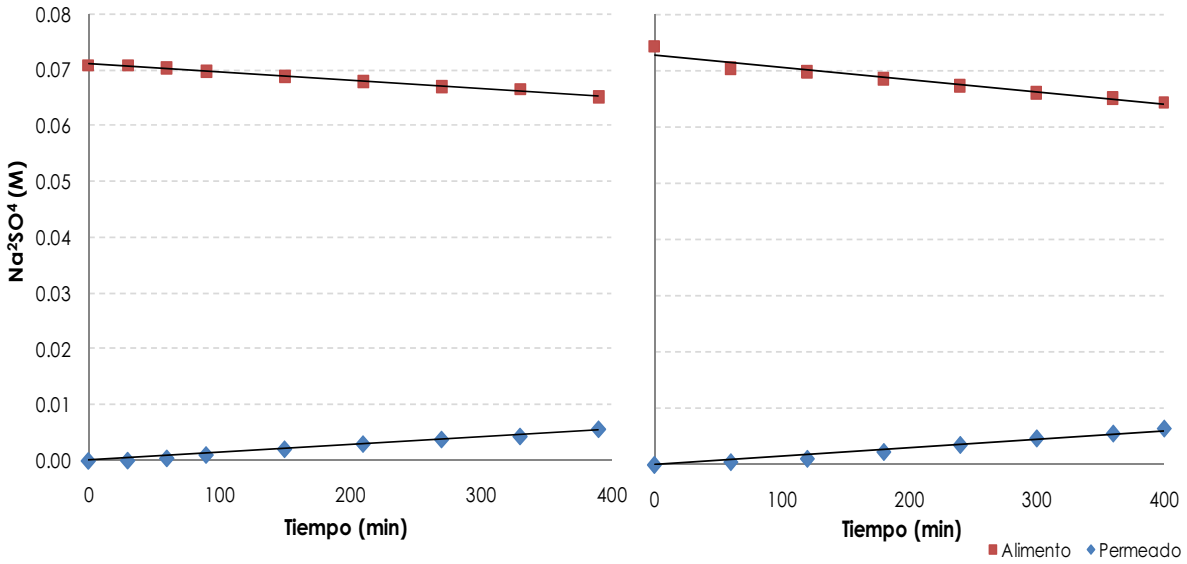

Figura 5.50. Composición de Na_2SO_4 en el alimento y el permeado para las membranas obtenidas a partir de sacarosa a 25°C (izquierda) y glucosa a 30°C (derecha)

La tabla 5.8 muestra que las velocidades de permeación para las dos membranas presentan el mismo orden de magnitud. Hollman y Bhattacharyya (2002), demostraron que el Na_2SO_4 no presenta interacciones significativas con la celulosa, razón por la cual su paso a través de la membrana no va a tener dificultades diferentes a las asociadas con la tortuosidad del material. Esto puede evidenciarse en la figura 5.50 donde el *flux* de permeado se mantiene constante con el tiempo; de existir interacciones entre las moléculas de Na_2SO_4 con la membrana, el *flux* de permeado disminuiría con el tiempo, debido a que estas posibles interacciones pueden aumentar la tortuosidad. Igual comportamiento se observa con la permeación de la solución de úrea (figura 5.51).

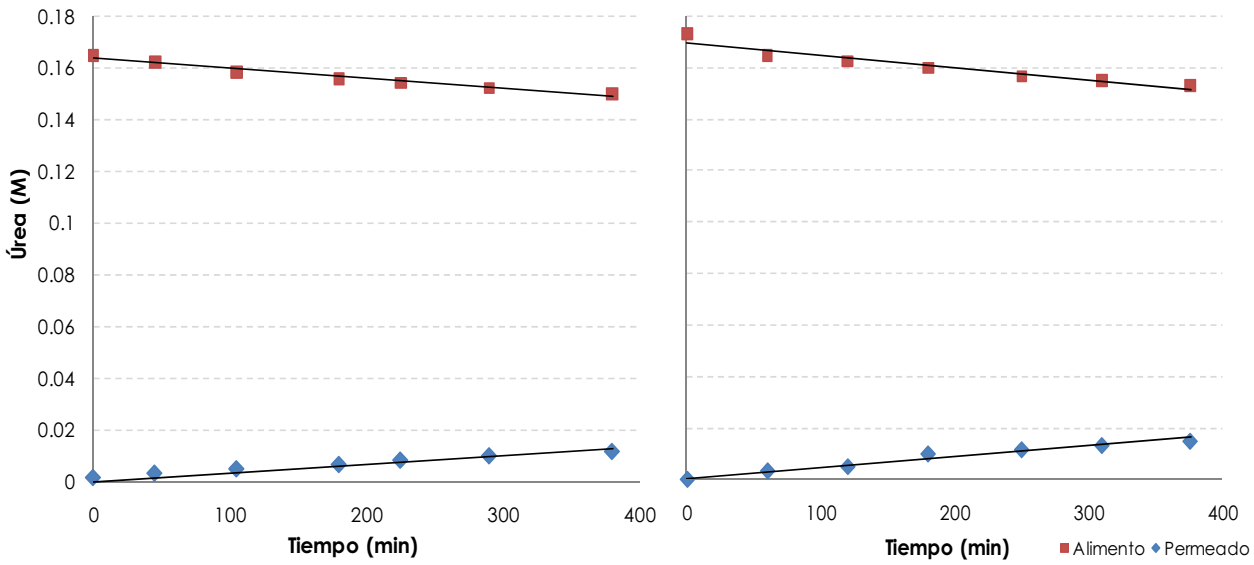

Figura 5.51. Composición de úrea en el alimento y el permeado para las membranas obtenidas a partir de sacarosa a 25ºC (izquierda) y glucosa a 30ºC (derecha)

Tabla 5.8. *Flux* (mol*m^{-2}*s^{-1}) de Na_2SO_4 y úrea para las membranas empleadas en las pruebas de diálisis.

Membrana	*Flux* Na_2SO_4	*Flux* Úrea
1	$3.64*10^{-5}$	$8.94*10^{-5}$
2	$4.72*10^{-5}$	$1.14*10^{-4}$

Membrana 1: Obtenida a partir de sacarosa a 25ºC.
Membrana 2: Obtenida a partir de glucosa a 30ºC

Gosting y Xkeley (1952) y Kuznetsova (2007) reportaron valores de coeficientes de difusión en agua para úrea y Na_2SO_4 respectivamente. Los valores de estos coeficientes para las concentraciones de las soluciones empleadas en el presente trabajo son $1.386x10^{-5}$ cm^2/s para la úrea y 1.123 $x10^{-5}$ cm^2/s para el Na_2SO_4; los dos coeficientes presentan el mismo orden de magnitud, es decir, la difusividad de estos dos solutos en agua es similar; En el presente trabajo, la diferencia de velocidades para las dos membranas es casi la misma, por lo que se creería que la estructura no interactúa con el soluto, sólo presenta la resistencia al flujo propia de la tortuosidad del material, que es mayor para la membrana obtenida a partir de sacarosa que para la obtenida a partir de glucosa.

Podría concluirse entonces que no se encontraron interacciones fuertes entre los dos solutos probados y la membrana y que, debido a que el tamaño de las especies no es muy grande, el transporte se realiza tanto en la matriz de celulosa como en la fase continua (que en este caso es agua), pero que es en esta última donde el transporte ocurre de manera significativa debido a la gran cantidad de agua que tiene la membrana por efecto

del hinchamiento. Sin embargo es necesario trabajar en la obtención de los coeficientes de difusión en estos sistemas con el propósito de cuantificar con mayor precisión el efecto de la estructura polimérica en el transporte, es decir, qué tanto varía el coeficiente de difusión efectiva en el sistema con respecto al coeficiente de difusión en agua.

5.3.5 Permeación de Gases

En las pruebas de permeación de gases realizadas con membranas de espesor similar a las empleadas con soluciones (y con agua), no se presentó flujo de gas, resultado que mantuvo no obstante haber aumentado la presión de operación hasta 10 bar. Este comportamiento permite concluir que el tratamiento de purificación es seguro y no deteriora la membrana. De hecho, para apreciar el flux de permeado fue necesario utilizar membranas de 10 μm de espesor, obtenidas durante los primeros diez días de cultivo. Los resultados se presentan en la figura 5.52.

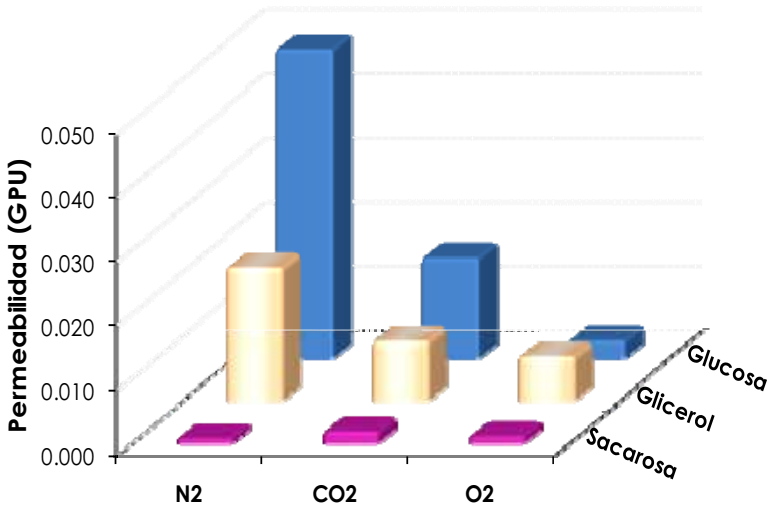

Figura 5.52. Permeación de Gases para membranas obtenidas a partir de glucosa, sacarosa y glicerol a 30°C. GPU (*Gas permeation Unit*, $cm^3*cm^{-2}*s^{-1}*cmHg^{-1}*10^6$)

Las permeabilidades son muy bajas para todas las membranas, pero especialmente para las obtenidas a partir de sacarosa; los valores son similares a los reportados por Clasen y colaboradores (2006) para membranas secadas por evaporación.

Esto se debe en gran medida a que las moléculas de gas se mueven preferencialmente por la fase amorfa en un polímero semicristalino; debido a que las membranas de celulosa bacteriana presentaron un alto grado de cristalinidad, la fase amorfa es muy reducida y por ello el gas presenta dificultad para transportarse a través de la membrana.

Las membranas obtenidas a partir de glucosa presentan los mayores flux de permeado para N_2 y CO_2, comparados con las membranas obtenidas a partir de sacarosa y glicerol; el flux de O_2 fue el más bajo de los tres gases probados para todas las membranas.

Estas pruebas de permeación de gases permitieron verificar que el transporte a través de la membrana se facilita por el hinchamiento, de acuerdo a lo expuesto en la sección 5.3.4. Debido a que las membranas para esta prueba no de sometieron a hinchamiento previo, las moléculas de gas no encontraron espacio suficiente para difundirse con mayor velocidad.

- **Selectividad Ideal**

La tabla 5.9 presenta los resultados de selectividad ideal para las membranas. Puede observarse que las mejores selectividades corresponden a la membrana obtenida a partir de glucosa y el mayor valor está asociado al sistema N_2/O_2.

Tabla 5.9. Selectividad ideal para la mezcla de gases en las membranas obtenidas a partir de las tres fuentes de carbono.

Selectividad Ideal	Fuente de Carbono		
	Glucosa	Sacarosa	Glicerol
N_2/O_2	16.75	0.70	3.02
CO_2/O_2	5.47	1.68	1.36

Si se supone que no existe interferencia entre moléculas en una mezcla, se puede decir que las membranas de celulosa a partir de glucosa permiten una mejor separación de mezclas de N_2 y O_2 o CO_2 y O_2, respecto a las demás membranas y que las de sacarosa no son buenas transportadoras de gases.

Las tres membranas presentan cierta selectividad para el CO_2, a pesar de ser el gas cuya molécula es la de mayor peso molecular de los tres que se probaron. Esto puede tener explicación en el diámetro cinético de las moléculas (*d*), que puede entenderse como el diámetro de poro necesario para garantizar el paso de una molécula a través de éste. Por esta razón, el CO_2 (*d*= 0,33nm), puede transportarse con mayor facilidad a través de la matriz polimérica que el N_2 (*d*= 0,364nm) y el O_2 (*d*= 0,346nm). El O_2, a pesar de tener un diámetro cinético menor que el del N_2, presentó la menor permeación de todos los gases, debido probablemente a interacciones entre las moléculas del gas y la membrana.

Belbekhouche y colaboradores (2011), elaboraron membranas de celulosa de carácter nano estructurado (similares a las membranas de celulosa bacteriana del presente trabajo), y determinaron experimentalmente los coeficientes de permeabilidad de O_2, N_2 y CO_2; los valores reportados presentan el mismo comportamiento que los obtenidos en el presente trabajo, es decir, son mayores para el N_2, seguidos por el CO_2 y por último el O_2. Los autores determinaron igualmente los coeficientes de difusión y de solubilidad, ya que de acuerdo con el modelo de solución-difusión (sección 2.4.2), el coeficiente de permeabilidad de un gas está dado por el producto de los coeficientes de estos; el coeficiente de solubilidad es el parámetro termodinámico que determina la afinidad entre las moléculas de gas y la membrana, mientras que el de difusividad es el parámetro cinético que determina la rapidez con que las moléculas del gas pasan a través de la estructura polimérica; el coeficiente de solubilidad reportado por dichos autores presenta el mismo orden de magnitud: sin embargo, el coeficiente de difusión es similar para el CO_2 y N_2, mientras que el coeficiente del O_2 es 20 veces menor que para el CO_2. Las membranas de celulosa bacteriana utilizadas en el presente trabajo podrían presentar el mismo resultado, si se tiene en cuenta que el oxígeno presenta la permeabilidad más baja. Sin embargo, es necesario realizar estudios detallados de solubilidad y difusividad para los distintos sistemas gas/membrana, con el fin de comprender y explicar mejor el fenómeno de permeación.

5.3.6 Pervaporación

Las pruebas de pervaporación se realizaron con las membranas obtenidas a partir de las tres fuentes de carbono glucosa, sacarosa y glicerol, a 25°C y 30°C, tratadas con NaOH 1N a 90°C por 10 min. El alimento fue una solución de etanol 95% p/v.

La figura 5.53 muestra los resultados del *flux* de permeado con el tiempo. Las membranas obtenidas utilizando sacarosa como fuente de carbono presentan el *flux* de permeado más alto, contrario a los resultados en las pruebas de permeabilidad hidráulica, donde éstas membranas presentaban el más bajo; sin embargo, la membrana obtenida a partir de sacarosa y 30°C presentó un *flux* similar al de las membranas producidas con glucosa y 30°C, y glicerol 25°C. La membrana que presenta el mejor *flux* es entonces la obtenida a partir de sacarosa y 25°C.

Esto puede deberse a dos factores: primero, al arreglo de los grupos hidroxilo presentes en la estructura, que interactúan no sólo con los presentes en el agua sino también en el etanol; las interacciones con este último pueden ser de un carácter más débil que las conformadas con el agua, y debido a que el etanol se encuentra en mayor proporción, serán más importantes a nivel global, dando como resultado un flux de permeado de los dos componentes; Por ello las membranas obtenidas a partir de sacarosa, que observadas por microscopía electrónica tenían mayor cantidad de poros, y cuyo radio medio de poro es comparable al presentado por las demás membranas, permite un mayor flux de permeado.

Segundo, el grado de hinchamiento, que si bien no se determinó cuantitativamente, sí se observa que es mucho menor el hinchamiento de la membrana en la solución de etanol al presentado por la membrana en agua pura; esto está acorde con los resultados encontrados por Duvey y colaboradores (2002) y Caicedo y colaboradores (2003,) el menor hinchamiento reduce la posibilidad de formación de clusters de agua y sus posibles interacciones con los grupos hidroxilo presentes en las fibras de celulosa y de esta manera el agua presente en la solución, al no formar clusters es libre de solubilizarse y difundirse a través de la estructura polimérica en mayor proporción que el etanol.

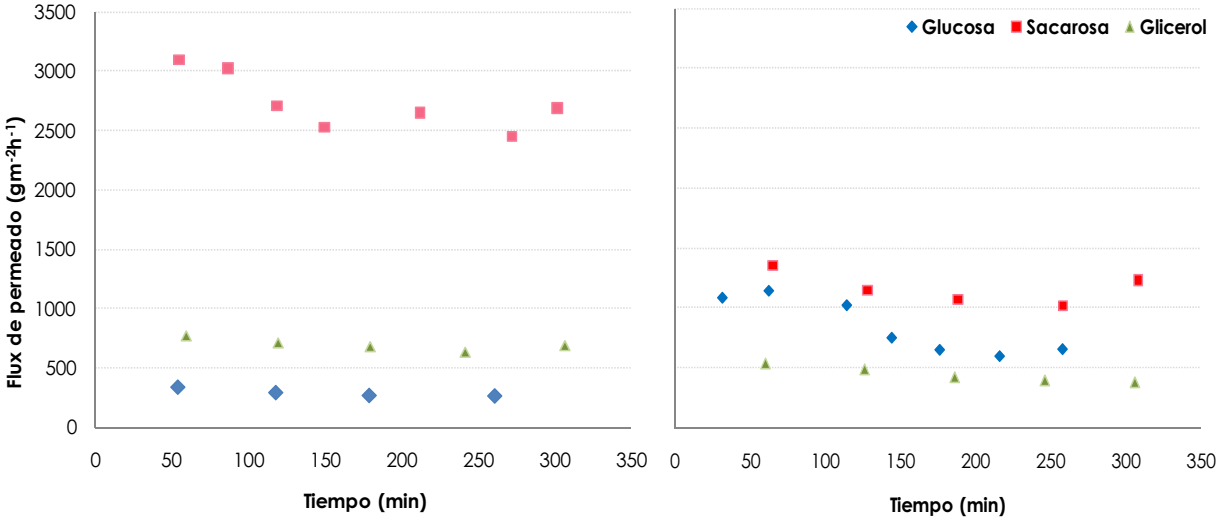

Figura 5.53. *Flux* de permeado en la prueba de pervaporación para membranas obtenidas a partir de glucosa, sacarosa y glicerol a 25°C (izquierda) y 30°C (derecha)

En el presente trabajo se encontró que la membrana que presenta el menor *flux* de permeado de agua es la obtenida a partir de glucosa a 25°C (58 $g*m^{-2}*h^{-1}$), y la de mayor *flux* es la obtenida a partir de sacarosa a 25°C (592 $g*m^{-2}*h^{-1}$), mostrando en todos los casos un mejor desempeño que las membranas evaluadas por Duvey y colaboradores (2002), quienes realizaron pruebas de pervaporación de la mezcla etanol/ agua con membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de sacarosa a 35°C, y encontraron que para composiciones del alimento superiores a 90% etanol el *flux* de agua en el permeado no superó los 40 $g*m^{-2}*h^{-1}$. La figuras 5.54 a 5.56 presenta las composiciones del alimento y permeado con el tiempo.

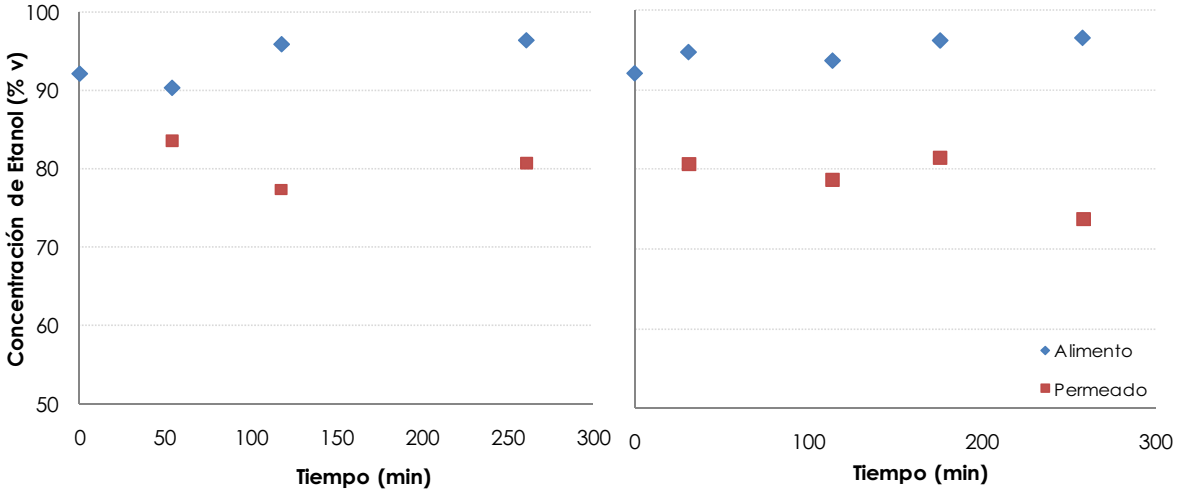

Figura 5.54. Composiciones en el alimento y permeado en pruebas de pervaporación para membranas obtenidas a partir de glucosa 25°C (izquierda) y 30°C (derecha)

En términos generales, permitir un período de estabilización de una hora es suficiente para obtener composiciones similares de alimento y permeado durante el período de duración del ensayo, es decir, se observa un régimen permanente para las 6 membranas.

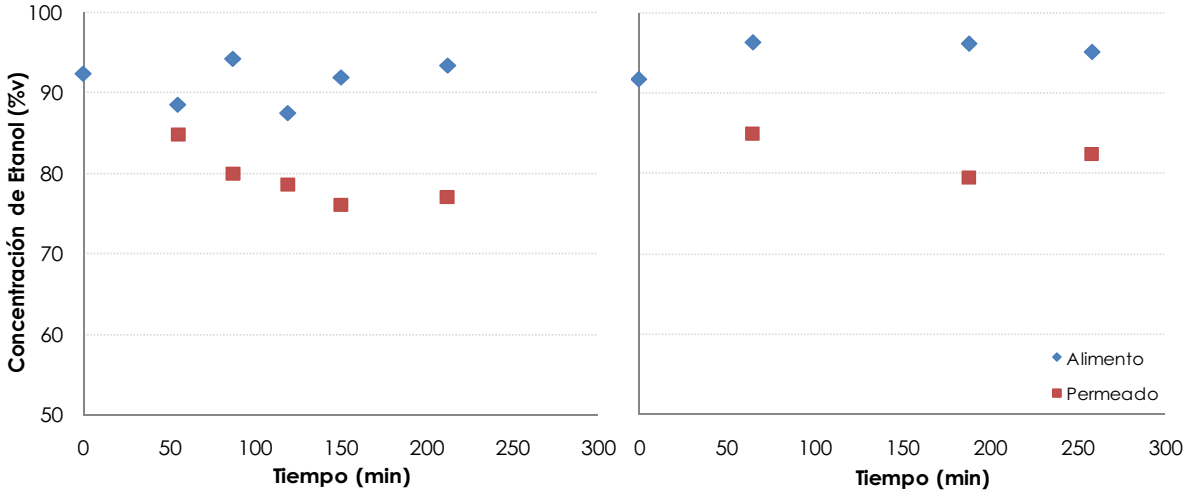

Figura 5.55. Composiciones en el alimento y permeado en pruebas de pervaporación para membranas obtenidas a partir de sacarosa 25°C (izquierda) y 30°C (derecha)

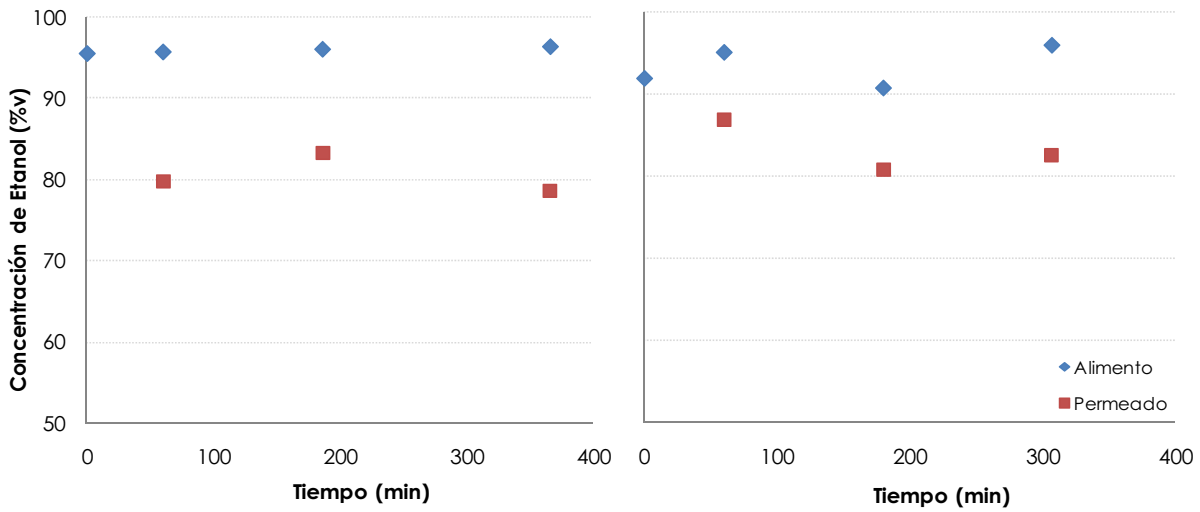

Figura 5.56. Composiciones en el alimento y permeado en pruebas de pervaporación para membranas obtenidas a partir de sacarosa 25°C (izquierda) y 30°C (derecha)

La tabla 5.10 presenta las selectividades para agua en las diferentes membranas.

Tabla 5.10. Selectividades para agua $\alpha_{H2O/EtOH}$ para las diferentes membranas.

Membrana		Selectividad
Fuente de Carbono	**Temperatura de Cultivo**	
Glucosa	**25°C**	3.972
	30°C	5.439
Sacarosa	**25°C**	2.751
	30°C	4.868
Glicerol	**25°C**	3.087
	30°C	5.794

Se observa que las selectividades son en general bajas. Sin embargo, las membranas obtenidas a partir de las 3 fuentes de carbono a 30°C presentan selectividades más altas que las reportadas por Duvey y colaboradores (2002), para la misma mezcla, cuyo valor es de 4.3 para la mezcla 90% etanol. Tal como se esperaba, la membrana obtenida a partir de sacarosa a 25°C, al presentar el mayor *flux*, presentó la menor selectividad de todas las membranas probadas.

6. Conclusiones y Sugerencias

6.1 Conclusiones

- Fue posible obtener membranas de celulosa bacteriana empleando como microorganismo *Acetobacter xylinum,* con propiedades estructurales y de transporte específicas. Las variaciones en las condiciones de cultivo y purificación afectan su desempeño en los diversos procesos de separación.

- La mayor producción de celulosa se logró con el uso de sacarosa como fuente de carbono y temperatura de 30°C; sin embargo, el mayor rendimiento producto/sustrato lo presentó el glicerol, lo que indica que microorganismo presenta mayor afinidad por la sacarosa, pero sigue una ruta metabólica menos eficiente.

- Las membranas presentaron una cristalinidad alta, con valores entre 75% y 91%, superiores a los reportados en la literatura; la temperatura de cultivo y la fuente de carbono tienen efecto sobre el grado de cristalinidad; el tratamiento de purificación no tiene un efecto sobre la cristalinidad para las membranas obtenidas a partir de glucosa y sacarosa; sin embargo influye notoriamente en las membranas obtenidas a partir de glicerol. El tratamiento químico no influye en el dominio de la estructura Iα sobre la membrana.

- Las membranas presentan una baja porosidad, reflejada en las pequeñas áreas superficiales (4-20 m^2/g); el grado de compactación de la celulosa es alto, debido al método de secado que favorece el acercamiento de las fibras.

- Los análisis de DSC y TGA permitieron observar que las propiedades térmicas (temperatura de descomposición y temperatura de transición vítrea) varían de acuerdo a la cristalinidad de la estructura.

- El proceso de secado influye en el arreglo de las fibras de celulosa de tal manera que la cantidad de agua retenida por hinchamiento después del secado es inferior a la que retiene antes de éste. El grado de hinchamiento no presenta diferencias significativas entre las membranas obtenidas a 25°C; sin embargo, en las membranas producidas a 30°C existen diferencias en el grado de hinchamiento: el mayor lo presentaron las membranas obtenidas a partir de glicerol.

- El alto grado de la cristalinidad afecta el *flux* de manera notoria, pues en general para todas las membranas fue bastante bajo. La permeabilidad hidráulica se ve afectada por la fuente de carbono y por la temperatura de cultivo. El tratamiento no influye de manera significativa para las membranas obtenidas a partir de glucosa y sacarosa; sin embargo, en las membranas obtenidas a partir de glicerol esta propiedad aumenta con la severidad del tratamiento de purificación.

- Las membranas son selectivas a la permeación de solutos: a mayor masa molar, mayor retención (se encontraron valores entre 60% y 99%). No se presentaron interacciones entre los solutos probados y las membranas, excepto el PVA, debido probablemente a la gran cantidad de grupos hidroxilo presentes en la molécula, que interactúan con los propios de la estructura de la celulosa. La retención de solutos en la membrana depende del peso molecular y la estructura del soluto. Macromoléculas lineales como el PVA presentaron la mayor retención.

- Las pruebas de permeación de gases mostraron que las membranas obtenidas a partir de glucosa presentan buena selectividad para separar N_2 de O_2 (16.75); Todas las membranas presentan selectividad para separar CO_2; sin embargo, debido a la elevada cristalinidad la permeabilidad es muy baja, inferior a 0.05 GPU.

- Las membranas preparadas permiten realizar separaciones de mezclas etanol-agua por pervaporación. Los valores de *flux* de permeado fueron superiores a los reportados en la literatura; sin embargo, la selectividad es baja y está influenciada por la fuente de carbono y la temperatura de cultivo en la etapa de fermentación.

La presente tesis permitió obtener publicaciones de reconocimiento nacional e internacional:

Artículo publicado en revista indexada:

- Carreño, L., Caicedo, L., Habert, A. "Effect of culture and purification conditions on physicochemical and transport properties in bacterial cellulose membranes". Chemical Engineering Transactions v. 20, pág. 327-332, 2010. Indexado en Scopus.

Trabajos presentados en eventos:

- Carreño, L., Caicedo, L. "Membranas de Celulosa Bacteriana en procesos de separación de mezclas etanol- agua". Presentación Oral, Memorias XXIV Congreso Colombiano de Ingeniería Química. Cali, Colombia, Octubre de 2007.

- Carreño, L., Caicedo, L. "Efecto de las condiciones de cultivo y purificación sobre las propiedades fisicoquímicas y de transporte en membranas de celulosa bacteriana". Presentación Oral, Memorias, Simpósio de Processos de Separação com Membranas. Río de Janeiro, Julio de 2009.

- Carreño, L., Caicedo, L., Habert, A. "Physicochemical and transport properties of bacterial cellulose membranes". Presentación Oral, Memorias, VII Congresso Iberoamericano de Ciência e Tecnologia de Membranas, CITEM 2010. Sintra, Portugal, Abril de 2010.

- Carreño, L., Caicedo, L., Habert, A. "Effect of culture and purification conditions on physicochemical and transport properties in bacterial cellulose membranes". Presentación Poster, Memorias, 2nd Industrial Biotechnology International Conference, IBIC 2010. Padua, Italia, Abril de 2010.

6.2 Sugerencias

- Debido a que las membranas obtenidas a partir de glucosa y glicerol presentan propiedades de transporte que las hacen atractivas para procesos de separación como retención de solutos, permeación de gases y pervaporación, es necesario evaluar el efecto de la concentración de la fuente de carbono sobre la producción de celulosa especialmente para el glicerol, ya que presenta el mayor rendimiento producto/sustrato; esta evaluación permitiría disminuir los costos de producción con miras al escalamiento del proceso. Al emplear glucosa es necesario evaluar el control de pH en el medio del cultivo para evitar la inhibición del microorganismo debido a la producción de ácidos.

- El elevado grado de cristalinidad de las membranas es un impedimento para obtener un alto *flux* de permeado en los diversos procesos de separación, por lo cual es necesario evaluar algunos métodos para que éste descienda; uno de ellos podría ser la adición de un polímero soluble en el medio de cultivo. Otra manera de disminuir la cristalinidad es conservar la fase amorfa de la estructura; para ello se sugiere evaluar algunos agentes químicos más suaves que el NaOH en la purificación de la celulosa, de manera que se evite solubilizar las fibras más finas.

- Para evitar la excesiva compactación de la celulosa durante el secado, se recomienda regular la velocidad de evaporación del agua. Se propone el uso de un solvente con polaridad diferente a la del agua, de manera que esta última abandona lentamente la matriz polimérica y desfavorece la interacción de los grupos hidroxilo entre las fibras de celulosa.

- Se sugiere realizar un estudio detallado de diálisis en las membranas, con el fin de determinar los coeficientes de difusión efectiva y la interacción de los solutos con la matriz polimérica.

- Debido a la alta selectividad en la permeación de gases presentada por la membrana obtenida a partir de glucosa, se sugiere realizar pruebas con la mezcla N_2/O_2 o directamente con aire para evaluar la selectividad real. De igual manera se sugiere realizar pruebas con gases orgánicos para evaluar la selectividad.