PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS VIA FERMENTATIVA UTILIZANDO CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum*

Juan Felipe Franco Ramírez

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
MANIZALES, FEBRERO de 2004

PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS VIA FERMENTATIVA UTILIZANDO CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum*

Juan Felipe Franco Ramírez
Código 398020

Línea de Profundización Procesos Químicos, Catalíticos y Biotecnológicos

Modalidad
PROYECTO FINAL

Directora
Ingeniera Química, M. Sc. Alneira Cuellar

Trabajo presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Químico.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
MANIZALES, FEBRERO de 2004

TABLA DE CONTENIDO

		Pág.
RESUMEN		VIII
ABSTRACT		IX
INTRODUCCION		1
1.	GENERALIDADES	2
1.1	El microorganismo	2
1.1.1	Medios de cultivo	2
1.2	Polisacáridos microbianos	4
1.2.1	Características y propiedades de los polisacáridos microbianos	5
1.2.2	Variables que afectan la producción de polisacáridos	6
1.2.3	Por qué producir polisacáridos	8
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1	El microorganismo	10
2.2	Preparación del inóculo	10
2.3	Ensayos de Fermentación	10
2.4	Cinéticas de biomasa, sustrato y producto	11
2.4.1	Determinación de biomasa	12
2.4.2	Determinación de sustrato	12
2.4.3	Separación y determinación de la cantidad de biopolímero	12
2.4.4	Determinación del pH.	12
2.5	Modelos cinéticos	12
2.6	Caracterización del polímero	15
2.6.1	Pruebas de disolución y ebulloscopía	15
2.6.2	Microscopia Electrónica de Barrido en Ambiente (ESEM) y Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)	15
2.6.3	FTIR	16
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	17
3.1	Reconocimiento del microorganismo	17

3.2 El producto 17
3.3 Cinéticas de biomasa, sustrato y biopolímero 18
3.4 Caracterización de los polímeros 21
3.4.1 Generalidades 21
3.4.2 Pruebas de dilución y ebulloscopía 22
3.4.3 ESEM y EDS 24
3.4.4 FTIR 30
4. CONCLUSIONES 37
5. RECOMENDACIONES 39
6. BIBLIOGRAFIA 41
ANEXOS 43

INDICE DE ANEXOS

		Pag.
ANEXO 1.	MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS. Preparación y Composición	44
ANEXO 2.	DETERMINACIÓN DE BIOMASA	46
ANEXO 3.	DETERMINACIÓN DE SUSTRATO	47
ANEXO 4.	SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE BIOPOLÍMERO	48
ANEXO 5.	Muestra de cálculo para el desarrollo del modelo cinético y tablas de datos cinéticos	49
ANEXO 6.	Microscopia Electrónica de Barrido en Ambiente (ESEM)	53
	Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)	
ANEXO 7.	Espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	56

INDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Colonias de Rhizobium en diferentes medios	3
Figura 2	Equipo utilizado para los ensayos de fermentación	11
Figura 3	Diagrama de flujo para las mediciones de biomasa, sustrato y polímeros	13
Figura 4	Colonias de Rhizobium leguminosarum en medio MacConkey	17
Figura 5	Polisacáridos extracelulares producidos durante la fermentación	18
Figura 6	Cinética de crecimiento celular	18
Figura 7	Consumo de Sustrato	19
Figura 8	Cinética de formación de producto P1	20
Figura 9	Gráficas de los datos de temperatura de ebullición de las disoluciones	23
Figura 10	Micrografía general de P1 a 800 aumentos	25
Figura 11	Resultados del análisis elemental EDS para P1	26
Figura 12	Detalle de posibles impurezas presentes en P1	26
Figura 13	Detalle de los poros presentes en P1	27
Figura 14	Micrografías general de P2 a 400 aumentos	28
Figura 15	Resultados del análisis elemental EDS para P2	29
Figura 16	Detalle de las especies de fibras presentes en P2	29
Figura 17	Espectro FTIR obtenido para el polisacárido P1	31
Figura 18	Espectro FTIR obtenido para el polisacárido P2	32
Figura 19	Banda correspondiente a una frecuencia entre los 2845 – 3040 cm^{-1}	33
Figura 20	Banda correspondiente a una frecuencia entre los 2100 – 2690cm^{-1}	33
Figura 21	Banda correspondiente a una frecuencia entre los 2015 – 2185cm^{-1}	34
Figura 22	Banda correspondiente a una frecuencia entre los 2385 – 2650cm^{-1}	34
Figura 23	Banda correspondiente a una frecuencia entre los 1695 – 1725cm^{-1}	35
Figura 24	Banda correspondiente a una frecuencia entre los 645 – 840cm^{-1}	35

INDICE DE TABLAS

		Pág.
TABLA 1	Principales polisacáridos reconocidos	6
TABLA 2	Modelos Cinéticos y valores de las constantes	21
TABLA 3	Temperaturas de ebullición de las disoluciones	22

RESUMEN

Rhizobium leguminosarum es una bacteria reconocida por su habilidad para fijar nitrógeno en plantas leguminosas, así como por su capacidad para producir polisacáridos de tipo extracelular y capsular (adheridos a la pared celular) por fermentación de azúcares como lactosa o sacarosa.

Se utilizaron reportes de condiciones óptimas de operación con respecto a la formación de producto para establecer los valores de velocidad de agitación, composición del medio de cultivo, tiempo de reacción, pH y temperatura de trabajo.

Se obtuvieron dos exopolisacáridos diferentes, uno de ellos sobrenada en medio con etanol (P1) y el otro precipita (P2). Durante el proceso se hizo el seguimiento cinético de crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y formación del polisacárido P1, logrando obtener un modelo que representa el sistema.

Se hizo una primera aproximación a la caracterización de los biopolímeros obtenidos por las técnicas instrumentales FTIR, EDS y ESEM.

Palabras claves: Biopolímeros, Exopolisacáridos, Rhizobium, FTIR, ESEM.

ABSTRACT

Rhizobium leguminosarum is a very known bacteria because of its ability to fix atmospheric nitrogen on the roots of legumes such as peas and beans, also because of its capacity to produce extracellular and capsular polysaccharides by sugars fermentation.

There was used some literature reports to establish the best values for operation conditions such as agitation speed, culture medium composition, reaction time, pH and working temperature.
Two different extracellular polysaccharides were produced. One of them, (P1), floats in ethanol medium and the other one, (P2), precipitates. A Kinetics model that describes the process was obtained from the biomass, substrate and product (P1) concentration versus time data.
FTIR, ESEM and EDS instrumental techniques were used to give a first approximation to the biopolymers characterization.

Key words: Biopolymers, Extracellular polysaccharides, Rhizobium, FTIR, ESEM.

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de obtener compuestos químicos de manera biológica ha llevado a los investigadores a experimentar nuevas alternativas para su producción y ha sido entonces cuando los procesos biotecnológicos han empezado a ocupar un lugar de privilegio en la industria mundial. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los biopolímeros, una diversa y muy versátil clase de nuevos materiales con potenciales aplicaciones en muchos de los sectores de la economía. Estos van desde polisacáridos como Dextranos, Alginatos y Xantanos hasta poliésteres como los Poli-hidroxialcanoatos (PHA´s). Los polisacáridos, definidos como polímeros de unidades de azúcar unidas por enlaces glicosídicos, han adquirido una importancia cada vez mayor en el mercado debido a las ya reconocidas aplicaciones en campos como la farmacéutica, medicina, alimentos y la industria petroquímica.
La obtención de este tipo de biopolímeros vía fermentativa es un proceso que está siendo ampliamente estudiado; el número de polisacáridos que se descubren cada día va en aumento y con ello la cantidad de nuevas estructuras con propiedades diversas que le abren las puertas a nuevas aplicaciones.

La bacteria Rhizobium leguminosarum que ha sido utilizada como biofertilizante en la industria agrícola por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en plantas leguminosas, es además un microorganismo capaz de producir tres biopolímeros diferentes, que hasta el momento no han sido muy estudiados; dos de ellos son polisacáridos extracelulares, que se encuentran en el medio de cultivo y un tercero que está adherido a la pared celular como polisacárido capsular.

En el presente trabajo se presenta de manera general un estudio de la producción a nivel laboratorio de los biopolímeros extracelulares obtenidos por fermentación con la bacteria *Rhizobium leguminosarum* y una primera aproximación a su caracterización física y química por técnicas instrumentales.

1. GENERALIDADES

1.1 EL MICROORGANISMO: *Rhizobium leguminosarum.*

Las bacterias del genero *Rhizobium* son un grupo de microorganismos genéticamente diversos y fisiológicamente heterogéneos, que están en una misma clasificación en virtud de su capacidad para nodular plantas del grupo *Leguminosae* [1]. En esta simbiosis las bacterias tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en plantas leguminosas, las cuales le suministran a la bacteria carbohidratos necesarios para su crecimiento y mantenimiento.
La fijación biológica de nitrógeno, simbiosis Rhizobium-leguminosa, disminuye el uso de fertilizantes nitrogenados, reduciendo así costos de producción y contribuyendo a la protección del medio ambiente al evitar la contaminación del aire, suelo y agua por uso de dichos fertilizantes [2]; de ahí la importancia de este tipo de bacterias.

Taxonómicamente la bacteria Rhizobium leguminosarum se clasifica así:
Familia III: *Rhizobiaceae*
Género I: *Rhizobium*
Especie: Rhizobium leguminosarum

En general las bacterias de la familia Rhizobiaceae son células morfológicamente clasificadas como bacilos Gram negativas, aeróbicas, que crecen a temperaturas optimas entre 25 y 30 ºC, y pH neutro [3]. Forman colonias circulares convexas de aspecto gelatinoso y son productoras de gomas extracelulares en medios que contienen gran cantidad de carbohidratos.

1.1.1 Medios de cultivo: *Requerimientos nutricionales para su crecimiento*.

Las bacterias del género Rhizobium son microorganismos microaeróbicos, quimiorganotróficos, que se pueden agrupar en cepas de crecimiento lento, cuyos tiempos de generación están entre 8 y 12 horas, y en cepas de crecimiento rápido con tiempos de generación entre 3 y 4 horas; los requerimientos nutricionales varían según esta clasificación.

Las fuentes de carbono pueden ir desde mono y disacáridos como manitol, glucosa, fructuosa y sacarosa, hasta ácidos orgánicos como el succinato y el citrato entre otros, para el caso de cepas de crecimiento rápido; las cepas de crecimiento lento presentan algunas excepciones, por ejemplo no metabolizan sacarosa.

Nitratos y sales de amonio son las fuentes de nitrógeno más comunes para este tipo de bacterias, sin embargo otras fuentes nitrogenadas orgánicas como la urea, aguas de macerado de maíz y extracto de levadura pueden ser utilizadas.
Los requerimientos minerales como el fósforo y el azufre son agregados en forma de fosfato y sulfato solubles respectivamente. Otros minerales que requiere Rhizobium son además Fe, Ca, Zn, Mn y Co [3].

La siguiente figura muestra colonias de Rhizobium en diferentes medios de cultivos sólidos utilizados para el mantenimiento de la cepa.

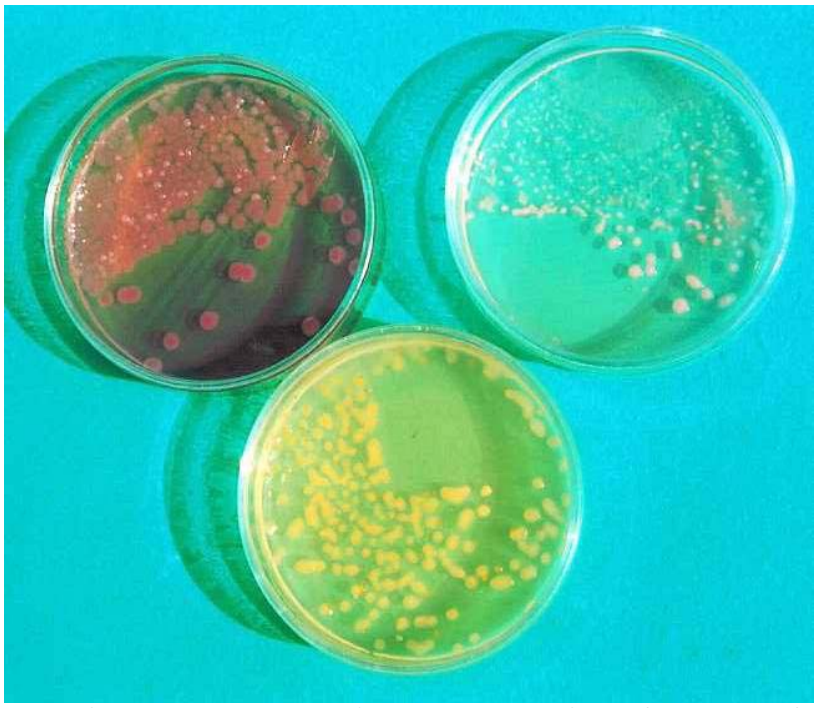


Fig. 1 Colonias de Rhizobium en diferentes medios. MacConkey (arriba izquierda), EL-Marc (arriba derecha), EL-Mabt (abajo)*.

* El Anexo 1 muestra las composiciones de los medios de cultivo mencionados en la figura.

1.2 POLISACÁRIDOS MICROBIANOS.

En forma genérica se conoce como polisacáridos a los polímeros de origen biológico constituidos por unidades de carbohidratos unidas por enlaces glicosídicos. Estas macromoléculas se encuentran ampliamente distribuidas en plantas (terrestres y acuáticas), hongos, bacterias, moluscos y mamíferos, en donde se encuentran formando parte de la pared celular, espacio extracelular o de estructuras de reserva de energía [4].

Los microorganismos producen por lo menos tres tipos diferentes de polisacáridos: estructurales, (como los constituyentes de la pared celular); intracelulares de reserva (como el glicógeno) y los de naturaleza extracelular. Entre todos ellos, los polímeros extracelulares, como es el caso de la xantana, el alginato, el dextrano, etc., son los que hasta ahora se les ha dado mayor uso a nivel industrial.

Las bacterias del genero *Rhizobium* tienen la capacidad de producir tipos diferentes de polisacáridos, principalmente exopolisacáridos (extracelulares), compuestos por carbohidratos que son secretados al medio a través de la pared celular; estos a su vez pueden ser de carácter ácido o neutro. Dentro de los exopolisacáridos ácidos encontrados a partir de *Rhizobium* se destacan el succinoglicano, galactoglucano y glucoronan [3]; el primero es un biopolímero producido por Shell Co. que ha sido utilizado como espesante y como estabilizante de emulsiones. En general se ha identificado que los polímeros de carácter ácido obtenidos están compuestos por unidades de D-glucosa, D-galactosa y ácido pirúvico.
Los exopolisacáridos de carácter neutro son polímeros capsulares constituidos por D-glucosa, D-galactosa y D-manosa en relaciones molares 1:3:2, formando unidades repetidas de hexasacáridos con características muy similares a las que se reportan para el curdlan [3], reconocido polímero, compuesto por fibras insolubles de bajo valor calórico, que no posee olor ni sabor, usado como aditivo para alimentos y que además tiene la propiedad de gelificar térmicamente y de forma irreversible. Este tipo de biopolímeros son también una alternativa en la microbiología por ser más elásticos y flexibles que el agar.

1.2.1 Características y propiedades de los polisacáridos microbianos.

Los polisacáridos microbianos varían considerablemente en sus propiedades físicas, incluyendo sus características reológicas. Varios exopolisacáridos presentan un comportamiento pseudoplástico, lo que significa que la viscosidad aparente disminuye conforme se incrementa la deformación del fluido, esto es, las soluciones se "adelgazan" con la agitación [4]. Este comportamiento es característico para el caso de la xantana y el alginato. Una de las propiedades más importantes de varios polisacáridos de interés industrial es su habilidad para formar geles y algunos de estos polímeros requieren la presencia de iones para ello. Los geles deben sus características a la formación de redes entrecruzadas de cadenas de polímeros. El curdlan, por ejemplo, no es soluble en agua a temperatura ambiente, pero cuando se calienta a 54ºC es perfectamente soluble. Un incremento mayor de la temperatura lleva a la gelificación de la molécula, la cual es altamente estable [4]. Los alginatos forman geles en presencia de cationes divalentes, particularmente el calcio. La gelificación de alginatos inducida por iones divalentes se basa en su capacidad para atar iones específicamente, acompañada por cambios conformacionales. Los iones calcio se unen específicamente a los residuos de ácido gulurónico de la molécula debido a que éstos adoptan una conformación que favorece tal interacción.

La tabla 1 describe los principales polisacáridos microbianos reconocidos hasta ahora, enunciando los principales organismos que los producen, el monómero por el que están constituidos y la forma como se encuentra organizada la estructura del polímero.

Tabla 1. Principales polisacáridos reconocidos.

POLISACARIDO	ORGANISMO	TIPO DE POLIMERO	MONOMERO	UNIONES
DEXTRANOS	BACTERIAS: *Leuconostoc mesenteroides, L. dextranicum, Acetobacter sp*	Ramificado Cadenas cortas	D-glucopiranosa	α1-6 (cadena principal) y α1-3, α1-2 o α1-4 en las ramificaciones
PULULANOS	HONGOS: *Aureobasidium pullulans*	Lineal	D-glucopiranosa	α1-4 (mayoria) y pocas α1-6
ALGINATOS	BACTERIAS. *Pseudomonas aeruginosa, Azotobacter vinelandii*	Lineal	d- manuronico d- glucuronico (4:1 a 20:1)	β 1-4 y α1-4
XANTANOS	BACTERIA: *Xanthomonas campestris*	Lineal con ramificaciones de trimeros acidicos (pentasacarido)	d-glucosa (principal) , 6 – Oacetil-manosa, glucuronico, manosa y piruvato	β 1-4 α1-3 β 1-2
GELANOS	*Pseudomonas*	Tetrasacarido	2 (D-glucosa) + L-ramnosa+ D-glucuronico	

1.2.2 Variables que afectan la producción de polisacáridos.

Concentraciones del Medio de cultivo.

Como ya se dijo las fuentes de carbono pueden ir desde mono y disacáridos como manitol, glucosa, fructuosa y sacarosa, hasta ácidos orgánicos como el succinato y el citrato entre otros.

Lancheros [3] comparó glucosa, lactosa, manitol y sacarosa como fuentes de energía para la producción de polisacáridos por *Rhizobium*, determinando que la sacarosa en concentraciones de 10 g/l fue la que presento mayor rendimiento con respecto a la cantidad de producto obtenido. Sin embargo se sugiere que concentraciones mayores de la fuente de carbono favorecen la producción de polisacáridos [3]. Peña y

Galindo [5],[6] reportan la sacarosa en concentraciones de 20 g/l, como fuente de carbono en la producción de alginato.
Como fuente de nitrógeno Lancheros [3] determinó que utilizar una mezcla de nitrato de calcio y extracto de levadura en relación 0.2 : 0.2 g/l favorece la formación de producto.

Temperatura y pH.

Según trabajos realizados en la producción de Alginatos, Dextranos y Xantanos [5] [6] [7] [8] a valores de la temperatura que estén entre 29 y 34 ºC se obtiene la mayor producción de polisacáridos. Así mismo cuando se utiliza Rhizobium como microorganismo, la temperatura no tiene un efecto significativo sobre la producción del biopolímero cuando se trabaja en rango entre 28 y 32 ºC [3].
En las mismas referencias se reporta que un valor neutro de pH favorece la formación de polisacáridos, como es el caso de Lancheros [3] donde se mencionan valores entre 6.5 y 7.2 para fermentaciones industriales con cepas de Rhizobium.

Aireación y mezclado:

Estos dos factores son determinantes en la producción de polisacáridos sobre todo a gran escala en donde surgen dificultades que no son apreciables a nivel laboratorio, debido a que al incrementar el tamaño del equipo, cambia la relación superficie volumen y la presión hidrostática [4].

Si se considera un fermentador como un cilindro se tiene que el área, que determina la transferencia de calor y el nivel de aireación superficial, se incrementa al cuadrado con la escala; mientras que el volumen es función cúbica de la escala lo que hace que la relación área volumen se modifique con el solo aumento de tamaño del equipo. Lo que significa entonces que la transferencia de oxígeno que ocurre a través de la superficie del líquido sea muy importante en el fermentador pequeño y prácticamente despreciable en fermentadores de gran escala [4].
En cuanto a la presión hidrostática se tiene que en las fermentaciones industriales la presión en el fondo es muy alta mientras que en fermentadores de laboratorio la diferencia de presión entre la superficie y el fondo es prácticamente despreciable. Debido a esta situación, gases como el CO_2, el cual es producto de la fermentación, incrementan su presión parcial en el fondo de los fermentadores donde la presión

hidrostática es elevada, dando como consecuencia cambios importantes en el rendimiento del proceso y en las características moleculares del polímero producto.

Con respecto al mezclado uno de los aspectos más importantes en el escalamiento de fermentaciones de exopolisacáridos es la selección y empleo de impulsores adecuados. El impulsor óptimo debe ser formador de burbujas pequeñas y lograr el mayor nivel de homogeneidad posible.
Para el caso de algunos cultivos donde se producen polisacáridos, el uso combinado de impulsores de tipo axial y de agitadores de tipo turbina Rushton, proveen una adecuada transferencia de oxígeno, además de un excelente mezclado.

1.2.3 Por qué producir polisacáridos. *Aplicaciones reconocidas de estos polímeros microbianos.*

Desde un punto de vista tecnológico, los polisacáridos constituyen productos de alto valor agregado, cuyo rango de aplicaciones se extiende cada vez más. En los últimos años se ha intensificado el interés en el uso de polisacáridos microbianos, principalmente propiciado por las propiedades únicas de estas macromoléculas y la posibilidad de obtener un producto con una calidad constante y un precio relativamente estable [9] [10].
Sin duda alguna la industria de los alimentos ha liderado el uso de polisacáridos de origen microbiano, con la aprobación para que productos como el dextrano, la goma xantana y el curdlan pudieran ser utilizados en alimentos; la comercialización de estos biopolímeros ha venido creciendo, abriéndole las puertas en nuevos mercados industriales.
La posibilidad de caracterizar estos productos y determinar sus propiedades físicas, permite comprender la relación entre su estructura, la función que estos pueden llegar a cumplir y su uso industrial.
El caso especifico de la goma xantana, que debido a sus excelentes propiedades reológicas es usado como aditivo para estabilizar emulsiones aceite agua, estabilizar la espuma formada en procesos de producción de cerveza y como inhibidor para la formación de cristales en alimentos, es una muestra clara de cómo estos productos se han establecido con un mercado a nivel industrial.

Otros polisacáridos como el glucano, usado para mejorar la textura de alimentos como pastas, el pullulan, polímero altamente soluble en agua que es usado para mantener el sabor y la apariencia de frescura en

los alimentos, el gelano utilizado como agente gelificante en la industria de los elementos de aseo personal y como reemplazo del agar como medio de mantenimiento para cultivos celulares, son muestra de cómo productos diferentes a los polisacáridos microbianos tradicionales también han encontrado un espacio importante en el mercado industrial.

Mas allá están las aplicaciones que estos productos pueden presentar en la medicina y biomedicina, caso concreto la celulosa de origen microbiano que puede actuar como sustituto de piel temporal en el ser humano gracias a sus altas propiedades mecánicas en estado húmedo [4] o el mismo glucano que puede ser usado como una droga biomédica contra algunas infecciones virales.
Nuevas y posibles aplicaciones para estos productos estarán supeditadas a las estructuras y propiedades físico químicas que puedan llegar a tener estos polisacáridos microbianos. Los nuevos polisacáridos tal vez encuentren aplicación en la industria de cosméticos y farmacéutica, sin embargo, estos productos microbianos siempre tendrán que competir contra los polímeros provenientes de plantas o polímeros sintéticos, que, a pesar de tener inferiores propiedades físicas y ecológicas, cuentan con procesos de producción mucho mas económicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 El microorganismo.

Se utilizó la bacteria *Rhizobium Leguminosarum* cepa 32 suministrada por la Corporación del Instituto Colombiano Agropecuario, CORPOICA.

La cepa fue mantenida en tubos de ensayo verticales con medio BHI – Agar a 17ºC, de donde se repicó a cajas Petri con medio MacConkey y se conservó a 30ºC. Estas cajas Petri eran renovadas semanal o quincenalmente para evitar contaminación. A la bacteria extraída del tubo se le realizó caracterización por tinción Gram.

2.2 Preparación del inóculo.

El inóculo se preparó en medio de cultivo líquido enriquecido, previamente esterilizado durante 15 minutos y se inoculó con la cepa conservada en caja Petri, tomando una asada de biomasa hasta alcanzar una turbidez establecida según escala de MacFarlan. El volumen del inóculo fue de 10ml, volumen correspondiente al 10% del volumen a inocular (100ml). El inóculo preparado se incubó a 30ºC durante 45 horas, tiempo correspondiente a más o menos la mitad de la fase exponencial del crecimiento de la célula según lo reportado por Lancheros [3].

2.3 Ensayos de Fermentación.

El equipo a utilizado fue un baño termostatado con control electrónico de agitación y temperatura, disponible en el laboratorio de procesos de productivos de la Universidad Nacional, sede Manizales. Las fermentaciones se realizaron en erlenmeyers de 500ml con tapón de gasa y 100ml de medio de cultivo estéril, durante 72 horas, a una temperatura de 32ºC y una velocidad de agitación de 100upm.

La composición del medio de cultivo fue, según reportadas por Lancheros [3] y Peña [5],[6], la siguiente: Sacarosa 20g, Extracto de Levadura 0.2g, Nitrato de Calcio 0.2g, NaCl 0.6g, $MgSO_4*7H_2O$ 0.2g, K_2HPO_4 0.5g por 1000ml de agua destilada. La figura 2 muestra el equipo utilizado para las pruebas.

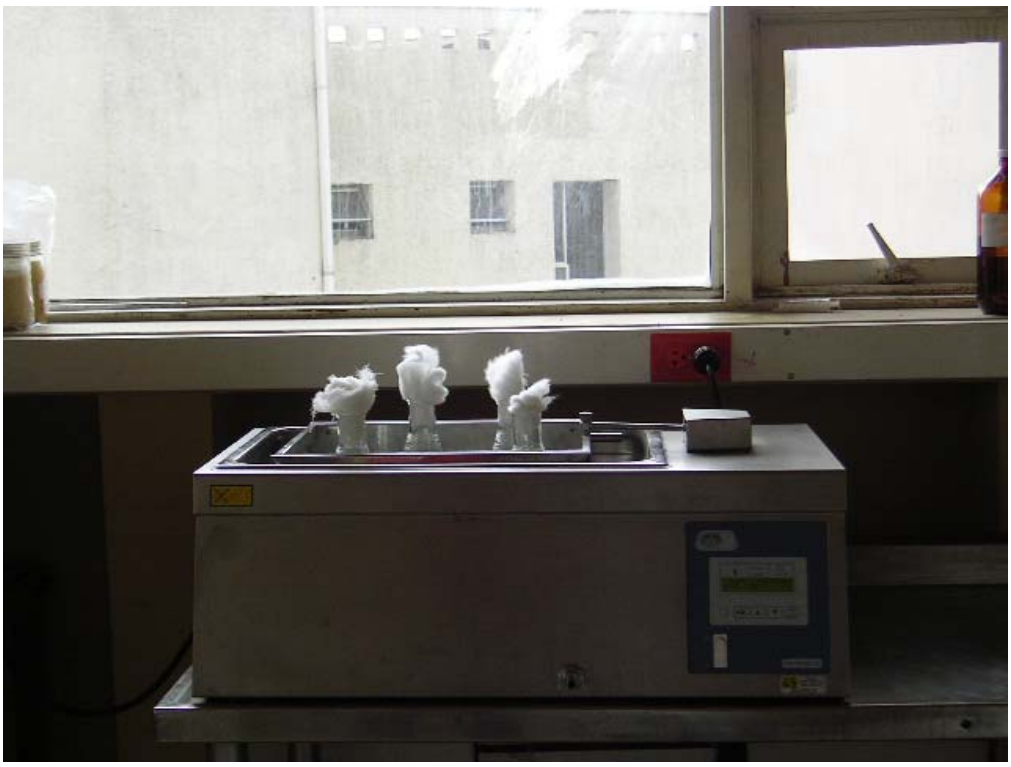


Fig. 2 Equipo utilizado para los ensayos de fermentación.

2.4 Cinéticas de biomasa, sustrato y producto.

Se realizaron ensayos en erlenmeyers de 100ml con 50ml de medio de cultivo y un inóculo del 10% durante las 72 horas de reacción. Para cada mediada se tomaba un erlenmeyer diferente y a la muestra se le determinó biomasa, consumo de sustrato y la cantidad de polisacárido producido. Además se midió el pH al comienzo y final de la fermentación.

La figura 3 muestra el diagrama de flujo del procedimiento.

2.4.1 Determinación de biomasa.

La concentración de células fue determinada gravimetricamente según se metodología expuesta por Peña [6]. EL procedimiento detallado se expone en el Anexo 2.

2.4.2 Determinación de sustrato.

La determinación de la sacarosa consumida se realizó por refractometría. EL procedimiento completo se describe en el Anexo 3.

2.4.3 Separación y determinación de la cantidad de biopolímero.

La cantidad de biopolímero producida fue cuantificada gravimétricamente, los polisacáridos producidos fueron separados por precipitación selectiva con etanol. Se centrifuga la muestra previamente para separar la biomasa, el sobrenadante se pone en etanol, dejar en reposo de 24 a 48 horas hasta que decante el más pesado de los dos polisacáridos y el otro sobrenade en el etanol, se seca y se pesa. EL procedimiento detallado se describe en el Anexo 4.

2.4.4 Determinación del pH.

La medida del pH del medio de cultivo se realizó con un potenciómetro, previamente calibrado, al comienzo y final de la fermentación.

2.5 Modelos cinéticos.

Para modelar el crecimiento de biomasa se utilizó el modelo denominado logístico, que presenta la siguiente forma:

$$\frac{dX}{dt} = kX(1 - \beta X)$$

Este modelo incluye un factor de inhibición K [h^{-1}] y una constante asociada al mantenimiento celular β [g P / g X h]. Al integrar esta ecuación se obtiene:

$$X = \frac{Xoe^{kt}}{1 - \beta Xo\left(1 - e^{kt}\right)}$$

Si el crecimiento de biomasa se ajusta al modelo logístico, una gráfica de X contra t es de forma sigmoide y tiende a un valor de crecimiento estacionario Xs.

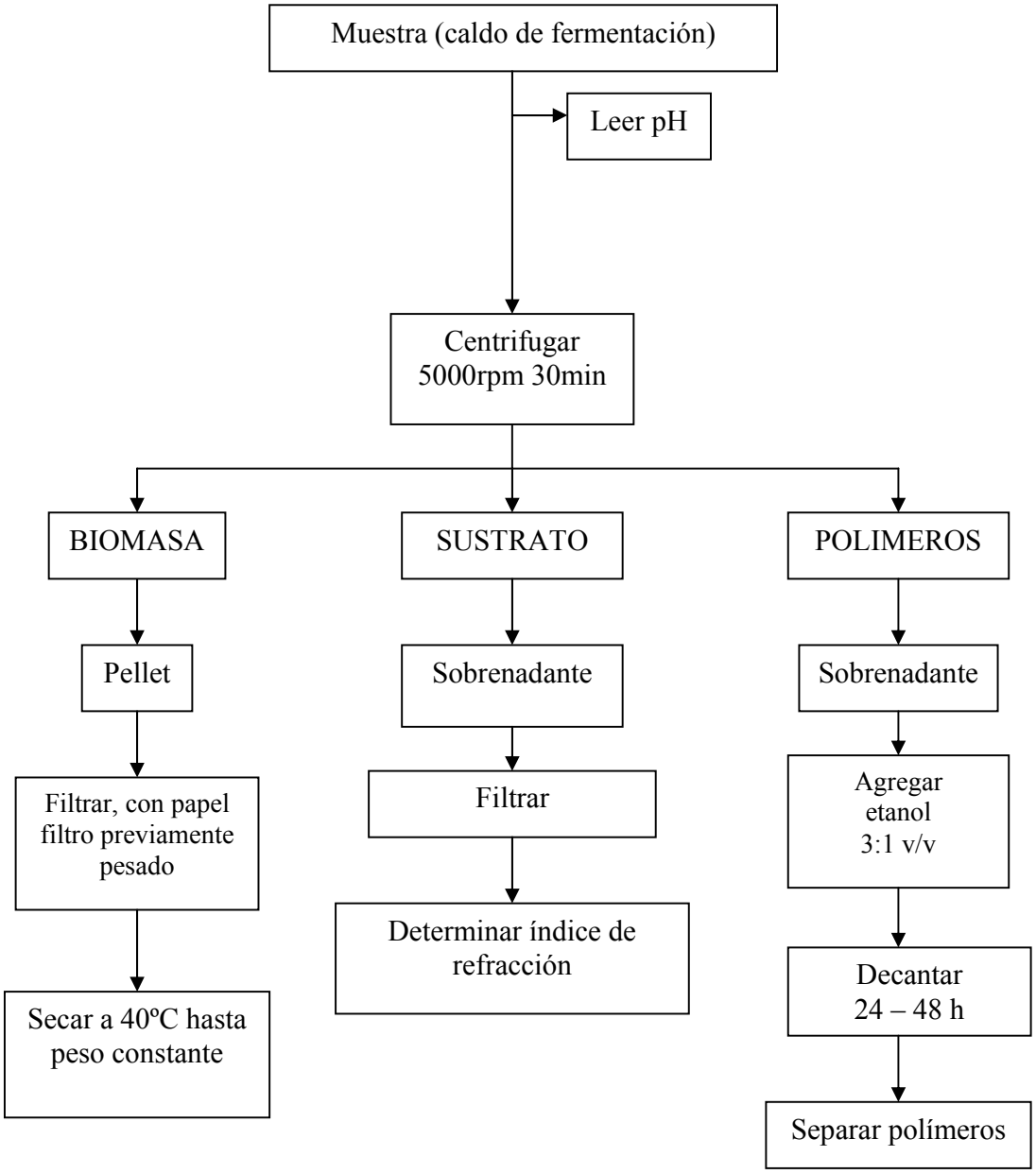


Fig. 3 Diagrama de flujo para las mediciones de biomasa, sustrato y polímeros.

El consumo de sustrato fue descrito por la siguiente expresión, en donde se tiene en cuenta que las células consumen sustrato para su crecimiento, para síntesis de producto y para generar la energía necesaria para las actividades de mantenimiento como lo son el control de su pH interno y el intercambio de componentes celulares [11].

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}}\frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{p/s}}\frac{dP}{dt} - k_e X$$

$Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$ son los respectivos rendimientos reales de biomasa y producto con respecto al sustrato y k_e es un coeficiente de mantenimiento en [gS / gX h]. Para facilitar los cálculos se agruparon estas constantes y se reorganizó la ecuación anterior quedando:

$$\frac{dS}{dt} = -\delta\frac{dX}{dt} - \eta X$$

Con

$$\delta = -\frac{1}{Y_{x/s}} - \frac{\alpha}{Y_{p/s}} \qquad \text{en} \quad [\text{gS / gX}]$$

$$\eta = \frac{\beta}{Y_{P/S}} + k_e \qquad \text{en} \quad [\text{gS / gX h}]$$

Finalmente la cinética de formación de producto fue descrita por el modelo de *Leudeking – Piret*. Modelo sugerido por Ollis [12] y Peña [8] para procesos de formación de polisacáridos. Aclarando que el modelo sólo se obtuvo para el polisacárido (P1) que sobrenada en el etanol.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha\frac{dX}{dt} + \beta X$$

El primer término del lado derecho de la ecuación hace referencia al producto formado durante el crecimiento celular y el segundo término hace referencia al producto formado durante la etapa de mantenimiento celular.

La resolución del modelo se hizo por el método grafico expuesto por Ollis [12] y se encontraron los valores para las constantes de las expresiones de velocidad. El Anexo 5 presenta una muestra de cálculo para el desarrollo del modelo.

2.6 Caracterización del polímero.

2.6.1 Ensayos de disoluciones y ebulloscopía.

Se prepararon diferentes disoluciones variando la concentración de los polisacáridos, utilizando como solvente el agua, que era el solvente reportado por la bibliografía.
Además de observar el comportamiento de la disolución, se midieron las temperaturas de ebullición de las soluciones con el fin de establecer si éstas aumentaban con la concentración y se presentaba una tendencia lineal que permitiese tratar de encontrar el peso molecular de los polímeros por el método de ebulloscopía.
Las concentraciones trabajadas fueron 2, 3, 4, 5, 6 y 7 g/l tanto para P1 como para P2. Con los datos obtenidos de construyeron gráficas de delta de temperatura de ebullición sobre concentración contra la concentración.

2.6.2 Microscopia Electrónica de Barrido en Ambiente (ESEM) y Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)

Se obtuvieron imágenes con un microscopio electrónico Philips ESEM XL 30 TMP, disponible en el laboratorio de Física del Plasma de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. Tanto para el ESEM como para el EDS se operó el microscopio en modo ambiental debido a las características eléctricas de las muestras analizadas, obteniéndose simultáneamente los espectros con las micrografías. Las imágenes se obtuvieron con aumentos entre 400x y 1600x; la presión en la cámara de medida varió

de 3.7 a 6 torr, según la muestra a analizar. Se tomaron varias imágenes de cada polímero y a algunos puntos se les realizó análisis elemental por el EDS con el fin de obtener una aproximación cualitativa de los elementos presentes en la muestra y además comparar si en diferentes puntos de la misma muestra se encontraban los mismos elementos.

El Anexo 6 muestra más detalladamente lo que se hizo y explica las características del las imágenes obtenidas, además de otras imágenes de biopolímeros tomadas en ESEM.

2.6.3 Espectrofotometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Se tomaron espectros en un espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) Perkin Elmer Spectrum BX, ubicado en el laboratorio de física del plasma de la sede de la Universidad, con el fin de obtener una aproximación inicial a la química del polímero, identificando los posibles grupos funcionales que lo conformen.

Por tratarse de muestras sólidas el equipo se operó en modo de transmitancia para el cual las muestras que no puedan ser maceradas se colocan directamente en el equipo con una geometría muy similar a la que tuviera la pastilla si las muestras fueran preparadas en polvo.

La toma de los espectros se realizó de la siguiente forma:

- toma de un espectro background para corregir el medio en el rango de 3200 a 450cm^{-1}, número de barridos 25, resolución 4cm^{-1}.
- toma del espectro de la muestra en el rango de 3200 a 450cm^{-1}, número de barridos 25, resolución 4cm^{-1}.

En el Anexo 7 se detalla un poco más las características del equipo de del método.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

3.1 Reconocimiento del microorganismo.

Se realizó la caracterización de la bacteria por tinción Gram, dando como resultado bacteria Gram negativa, observándose en microscopio células de color rosado con formas de bacilos y cocobacilos con bipolaridad. Se repicó en medio sólido MacConkey y crecieron colonias de color rosado pálido característico de cepas de Rhizobium como se muestra en la figura 4.

Fig. 4. Colonias de Rhizobium leguminosarum en medio MacConkey.

3.2 El producto.

Durante los ensayos de fermentación realizados se obtuvieron dos biopolímeros extracelulares uno que denominaremos P1, el cual sobrenada al agregar el etanol, y otro denominado P2, que precipita en el medio con etanol. La figura 5 muestra los dos polisacáridos obtenidos después de haber sido separados y secados según el procedimiento descrito en el numeral 2.4.3.

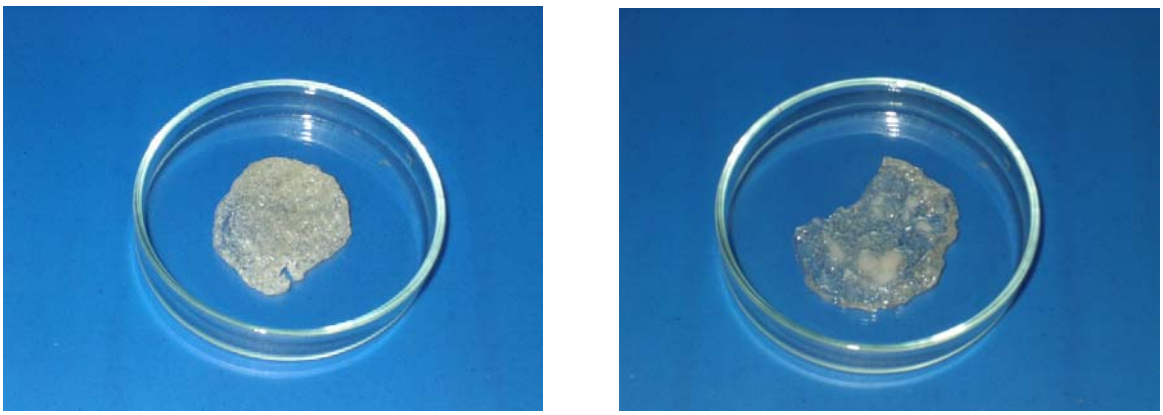


Fig. 5 Polisacáridos extracelulares producidos durante la fermentación. P1 (izquierda) sobrenada en el medio con etanol, P2 (derecha) precipita en el medio con etanol.

3.3 Cinéticas de biomasa, sustrato y biopolímero

Se realizaron tres ensayos cinéticos diferentes a las mismas condiciones de velocidad de agitación y temperatura con el fin de verificar la reproductividad de los datos en diferentes corridas y verificar si era posible obtener una cantidad de producto más o menos constante en el proceso.

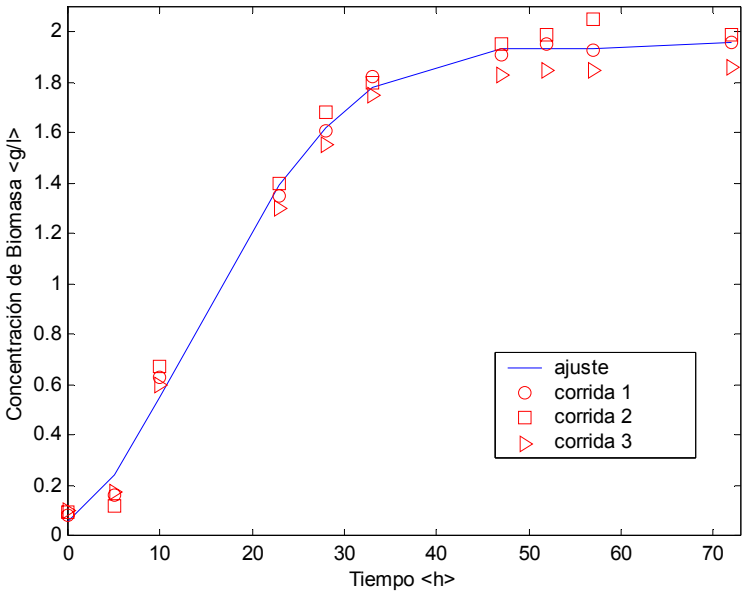


Fig. 6 Cinética de crecimiento celular

La figura 6 muestra la cinética del crecimiento de biomasa durante las 72 horas de la fermentación donde se alcanzó una concentración máxima de biomasa de 1.99 g/l y una velocidad especifica μ de 0.14 h^{-1} calculada por el modelo logístico descrito en el numeral 2.5.

La figura 7 muestra los datos de concentración de sacarosa durante el transcurso de la fermentación, observándose que el consumo de sustrato empieza con el crecimiento celular, así mismo se nota que la sacarosa no es consumida en su totalidad alcanzándose una concentración final de 12.34 g/l, 11.95 g/l y 13.23 g/l para cada uno de los tres ensayos, por lo que se concluye que no se trata de una situación de sustrato limitante.

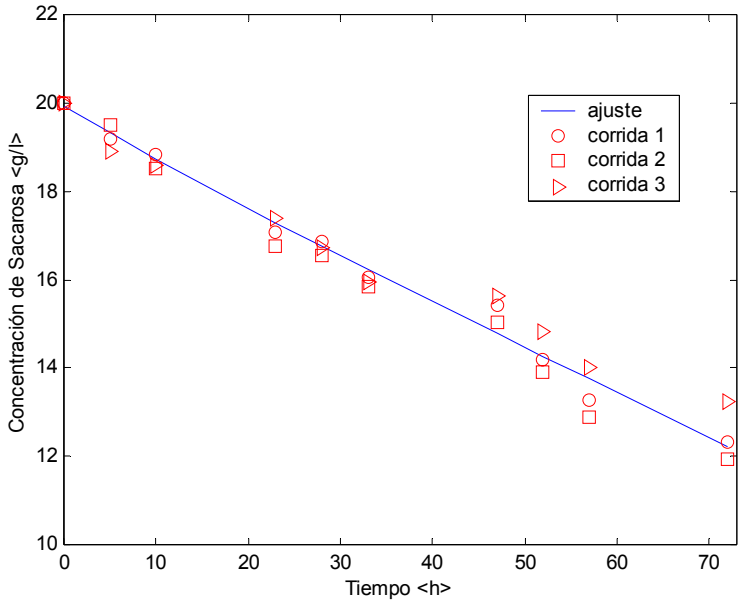


Fig. 7 Consumo de Sustrato

Para el producto sólo se le hizo un seguimiento cinético al polisacárido que sobrenada en el medio con etanol P1. La figura 8 muestra los datos de la evolución de la concentración de P1 durante el tiempo de fermentación. Alcanzándose una concentración máxima final de producto de 3.4 g/l durante las 72 horas de reacción. Se puede observar que hay producción de P1 durante la fase de crecimiento exponencial de las células (entre 0 y 35 horas) y también durante la fase estacionaria del crecimiento celular (entre las 35 y 72 horas), lo que hace de P1 un metabolito parcialmente asociado al crecimiento. Este resultado

corrobora lo expuesto por Lancheros [3] quien encontró que el polímero que sobrenadaba en el medio con etanol era un metabolito asociado y no asociado al crecimiento.

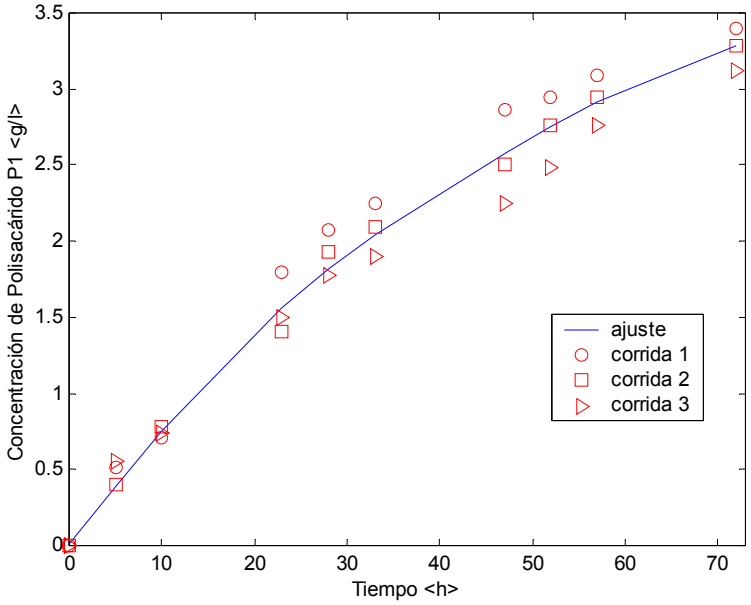


Fig. 8 Cinética de formación de producto P1

Debido a que no se le hizo un seguimiento cinético al polímero P2, no se pudo determinar si era un metabolito asociado o no asociado al crecimiento; sin embargo, cualitativamente se observó formación de este producto cuando las células aún se encontraban en su etapa de crecimiento exponencial y cuando estas se encontraban en la fase estacionaria del crecimiento.

Durante todos los ensayos que se realizaron hubo formación de ambos polisacáridos P1 y P2. Lancheros [3] sugiere que existe una relación en la producción de ambos metabolitos, es decir, que la velocidad de formación de uno depende directamente de la del otro polímero. Esta hipótesis no se pudo comprobar con este trabajo, quedando así planteado un estudio cinético más profundo que permita fundamentar la veracidad o no de la hipótesis anterior.

La medida inicial y final del pH fue 7.01 y 5.3 respectivamente, lo que no necesariamente significa que los polisacáridos obtenidos sean metabolitos de carácter ácido; el descenso en el pH se debe generalmente a las transformaciones químicas de los nutrientes del medio de cultivo, por ejemplo el consumo de calcio y magnesio puede dejar nitratos (ácido nítrico) y sulfatos (ácido sulfúrico) presentes en el medio, causando la disminución del pH.

La resolución del modelo para encontrar los valores de las constantes de las expresiones de velocidad se realizó según se especificó en el numeral 2.5., una muestra de cálculo se presenta en el Anexo 5. La tabla 2 muestra las expresiones y el modelo resuelto.

Tabla 2. Modelos Cinéticos y valores de las constantes.

$\frac{dX}{dt} = 0.14X(1-0.015X)$	$X = \frac{0.12e^{0.14t}}{1-0.0018\left(1-e^{0.14t}\right)}$
	$k = 0.14h^{-1}$
$\frac{dS}{dt} = -11.38\frac{dX}{dt} - 6.6X$	$\delta = 11.38\frac{gS}{gX}$
	$\eta = 6.6\frac{gS}{gX.h}$
$\frac{dP}{dt} = 0.89\frac{dX}{dt} + 0.015X$	$\alpha = 0.89\frac{gP}{gX}$
	$\beta = 0.015\frac{gP}{gX.h}$

3.4 Caracterización de los polímeros.

3.4.1 Generalidades.

El polímero que sobrenada en el medio con etanol P1 es un material no flexible, un poco rígido que tiende a parecer una pasta. A simple vista y al tacto pretende ser rugoso y se aprecia poca uniformidad en su superficie, característica que puede ser propia del material o bien pudo ser causada por un secado tal vez demasiado rápido que lo que hizo fue romper el material y hacer que adquiriera ese aspecto rugoso.

El polímero que precipita en el medio con etanol P2 es un material más flexible que P1, tiene apariencia de goma, al aplicarle un esfuerzo y estirarlo el material cede hasta un punto donde se rompe. Tiene una superficie más suave al tacto y aparentemente más uniforme; es además un material transparente y ligeramente más denso que P1.

Ambos polímeros por características propias de los polisacáridos deben ser ramificados y amorfos, se reporta en la bibliografía que son hidrosolubles pero, como se mencionará posteriormente, tal vez el agua no sea el mejor solvente para este tipo de polímeros.

3.4.2 Pruebas de dilución y ebulloscopía.

Se hicieron varias diluciones a diferentes concentraciones de polímero tanto para P1 como para P2, con el fin de establecer si efectivamente el agua es el solvente correcto para estos compuestos o si por el contrario es necesario encontrar un solvente más afín al polímero. Además, las diluciones se hicieron con el fin de medir su punto de ebullición y observar su comportamiento con el aumento de la concentración y si fuera posible determinar el peso molecular de los polisacáridos por el método de puntos de ebullición.

La tabla 3 muestra los valores de las concentraciones utilizadas y los datos de temperaturas de ebullición obtenidos en los ensayos que se realizaron.

Tabla 3. Temperaturas de ebullición de las disoluciones

CONCETRACION	TEMPERATURA ºC	
C [g/l]	P1	P2
0	92.0	92.0
2	92.3	92.6
3	92.5	93.0
4	92.5	93.4
5	92.8	93.5
6	93.0	93.7
7	92.7	94.0

Con estos datos se construyeron las gráficas que se muestran a continuación en la figura 9. Se puede apreciar claramente en la figura 9a como para el caso de P1 los datos son aleatorios y no presentan una tendencia lineal. En la figura 9b se puede apreciar que para P2 los datos también son muy dispersos a pesar de que si se observa en la tabla 3 los resultados obtenidos para la temperatura de ebullición de la solución aumentan con la concentración.

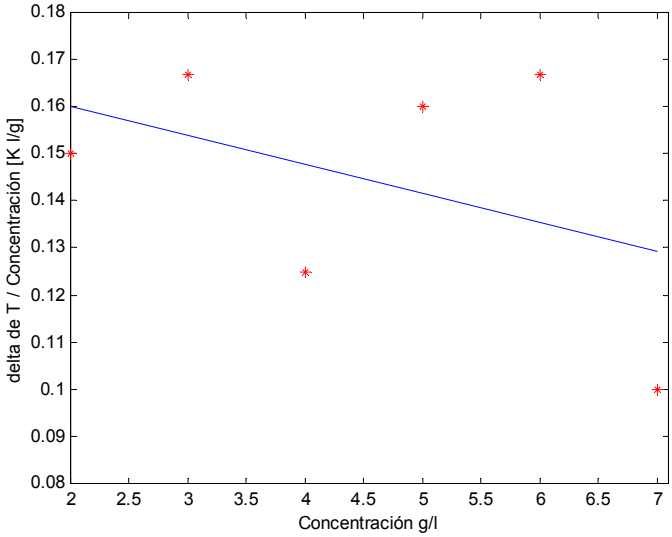


Fig. 9a Gráfica para P1

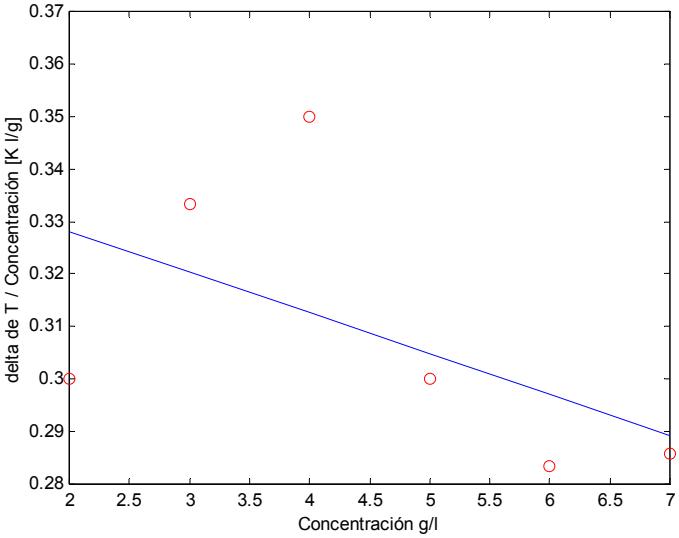


Fig. 9b Gráfica para P2

Fig. 9 Gráficas de los datos de temperatura de ebullición obtenidos para las disoluciones.

El comportamiento que tuvieron los puntos de ebullición para ambos polímeros y al observar las disoluciones después de un tiempo, se puede establecer que tal vez los polisacáridos no son totalmente solubles en agua y es por eso que los puntos de ebullición de las disoluciones no son mayores a medida que se aumenta la concentración, para el caso de P1, y no presentan una tendencia constante de aumento, para el caso de P2. Además, en algunas disoluciones se presenta precipitado después de un tiempo de disolver el polímero.

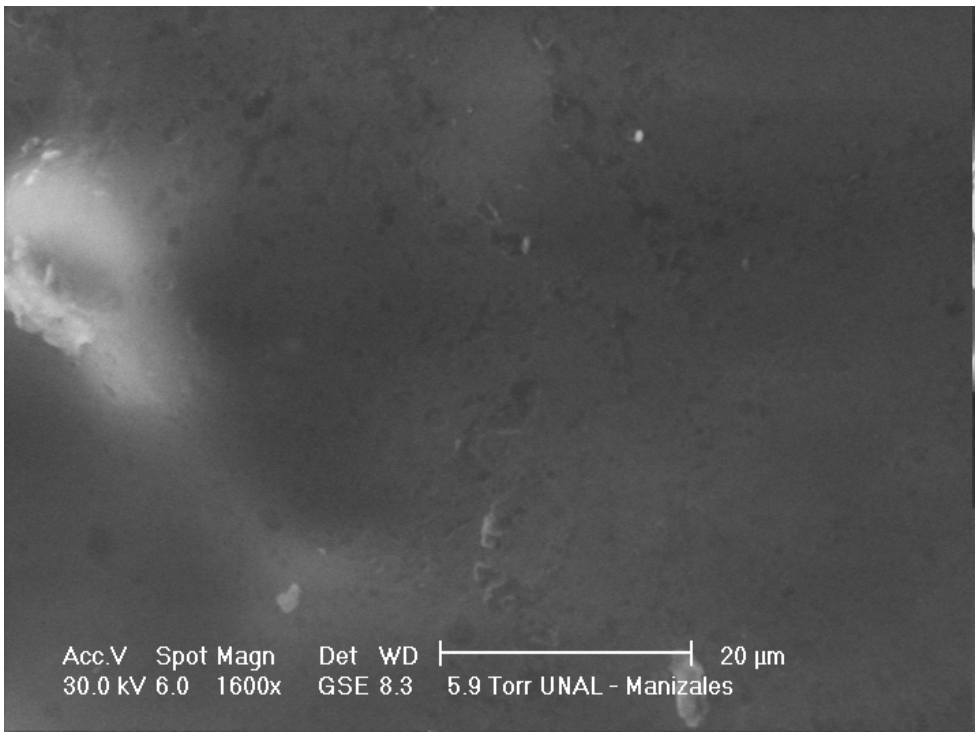
Queda planteado entonces un estudio que permita identificar una o varias sustancias que puedan ser utilizadas como solventes para estos polisacáridos, ya que el agua no fue el mejor solvente.

3.4.3 ESEM y EDS

Como se menciono en el numeral 2.6.2 se analizó la superficie de los biopolímeros obtenidos en el microscopio electrónico de barrido con modo ambiental ESEM; esto permitió tener una primera aproximación a lo que es el uso de estas técnicas instrumentales en este tipo de materiales y se trató de hacer una descripción lo más completa posible de lo que las imágenes entregaron.

Las figuras 10 a y b correspondientes al polisacárido P1 muestran una superficie de aspecto suave, con algunas especies de poros que se pueden apreciar mejor en la figura 10b, además con algunas nubes blancuzcas que pueden ser agua aún presente en el polímero.

En los puntos marcados de ambas figuras se tomaron análisis elementales con EDS. Los espectros que se obtuvieron se muestran en las figuras 11a y 11b. Se observa, como era de esperarse, que se presenta principalmente carbono y oxígeno y por supuesto, hidrógeno aunque el equipo no lo identifique. Otros elementos que se presentan como el cloro, potasio, fósforo y calcio pueden ser impurezas debidas principalmente a un mal lavado de las muestras. Para ambos puntos se presenta prácticamente la misma composición.



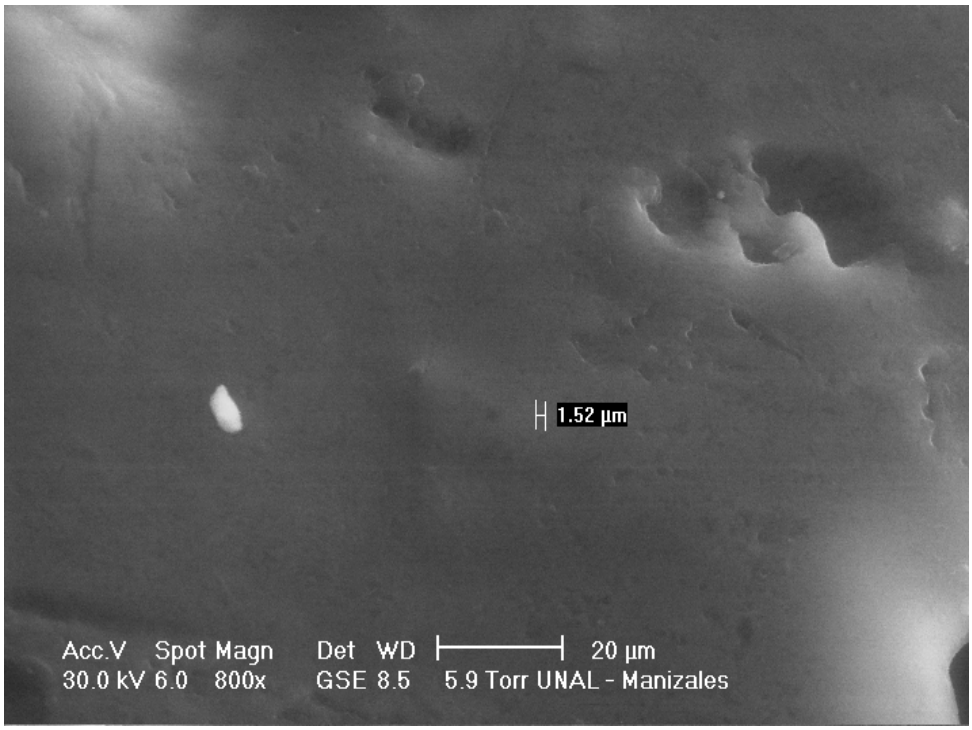


Fig. 10a (arriba) y 10b (abajo) Micrografía general de P1 a 800 aumentos.

En la figura 12 se ve una ampliación de otra zona de la muestra que presenta pequeñas partículas que pueden ser impurezas. La figura 13 muestra en detalle los poros presentes, midiendo los más significativos entre 50 y 80 micrómetros; sin embargo, estos poros podrían no ser propios del material y haberse formado en el proceso de secado acumulando algo de agua en su interior. Se aprecia como los poros no son uniformes y presentan una silueta blanca alrededor o en su parte inferior; se asume que esta puede ser agua que aún esta atrapada entre los mismos.

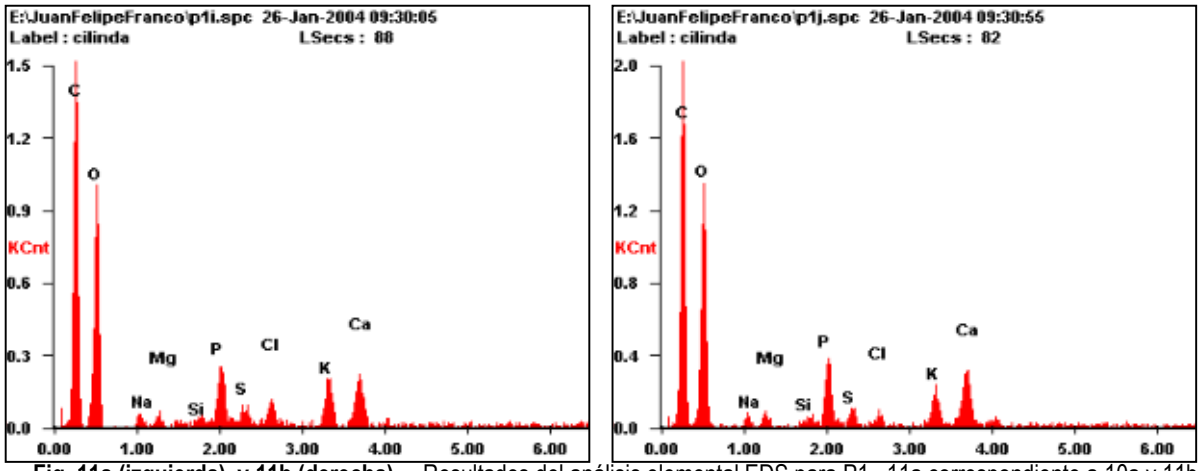


Fig. 11a (izquierda) y 11b (derecha) Resultados del análisis elemental EDS para P1. 11a correspondiente a 10a y 11b correspondiente a 10b.

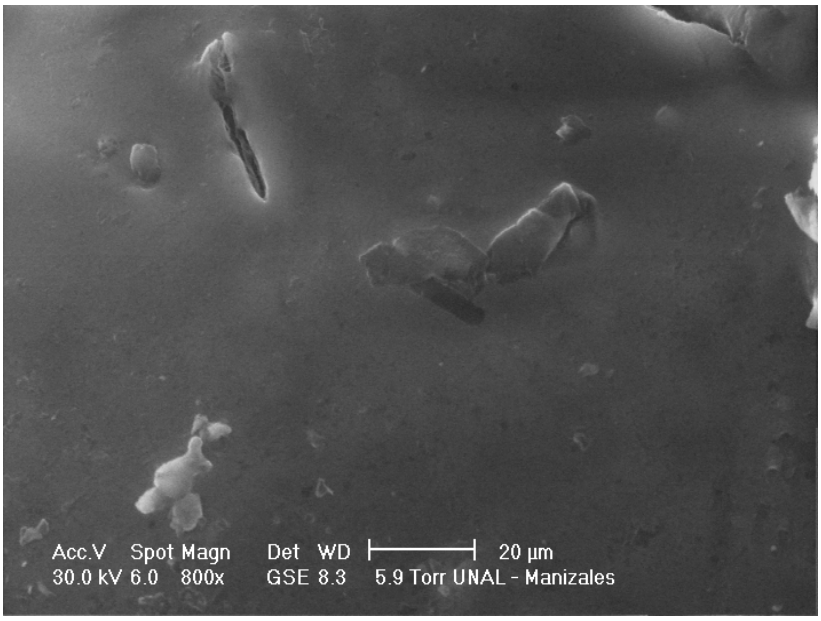


Fig. 12 Detalle de posibles impurezas presentes en P1.

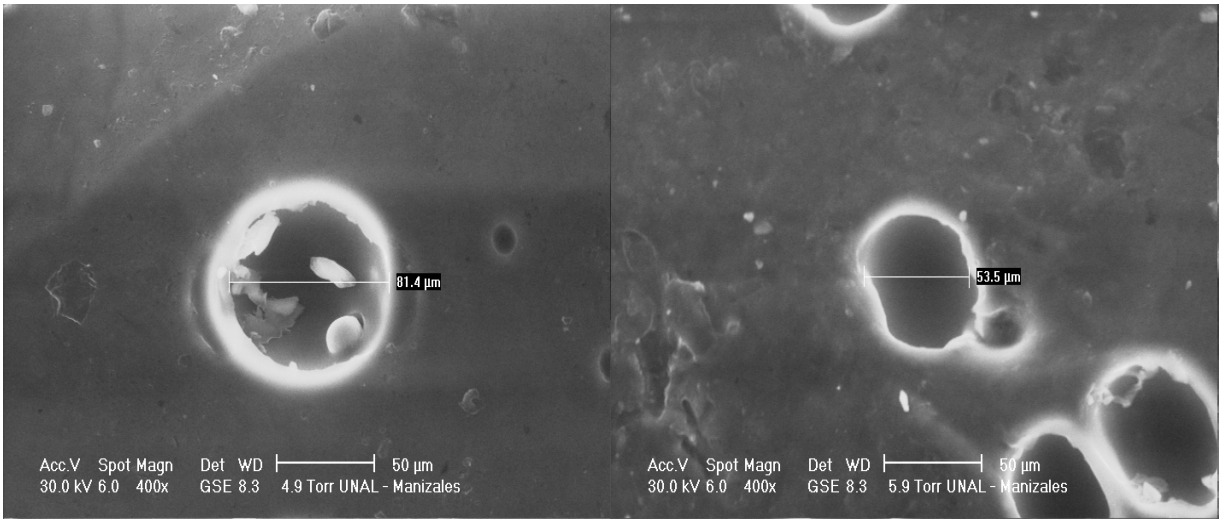
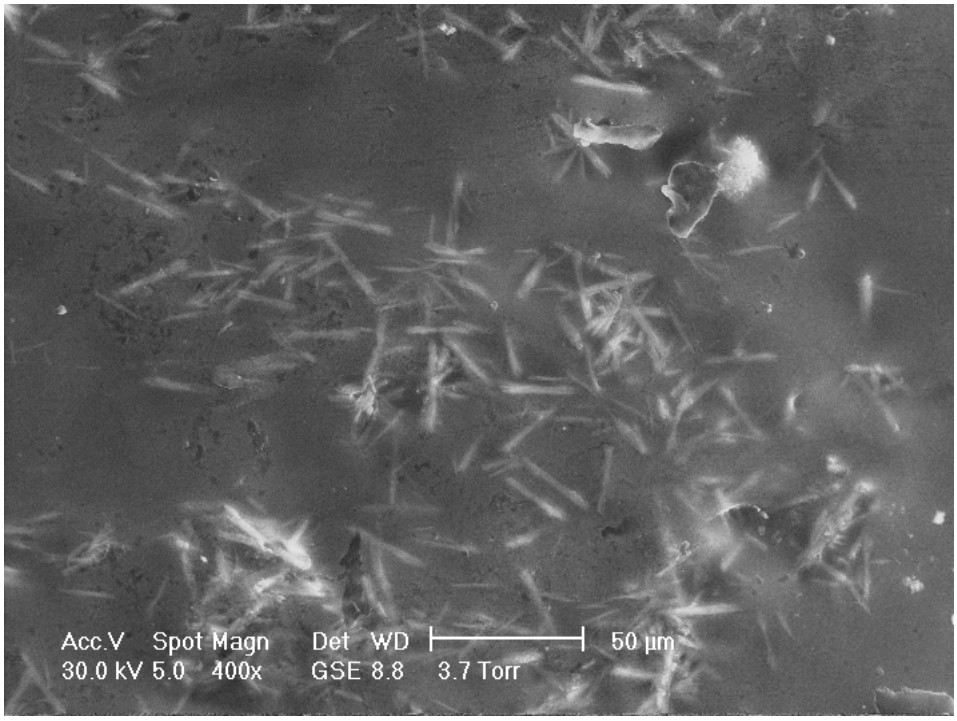


Fig. 13 Detalle de los poros presentes en P1

Para el polisacárido P2 las figuras 14a y 14b muestran una imagen general de su superficie, observándose una gran cantidad de pequeñas fibritas repartidas aleatoriamente. No parecen estar organizadas de alguna manera específica y tampoco están distribuidas uniformemente en el espacio. Parece ser una superficie muy heterogénea pero de apariencia suave es decir no se nota muy porosa, al menos comparándola con la superficie de P1. En la misma figura 14 abajo, se destaca un poro aislado que no parece ser característico del material puesto que no se repite.

Al igual que a P1 la superficie del polisacárido P2 se le hizo un análisis elemental por EDS. La figura 15 muestra el espectro encontrado, en donde se destaca la presencia de carbono y oxígeno que eran los elementos que se esperaba encontrar, además del hidrogeno que, como se menciono anteriormente, la técnica no lo identifica. Los demás elementos que muestra el espectro en muy bajas cantidades son seguramente impurezas. Comparando este resultado con el obtenido para las muestras del polisacárido P1 se puede apreciar que el porcentaje de carbono presente es mucho mayor, al igual que el del oxígeno.



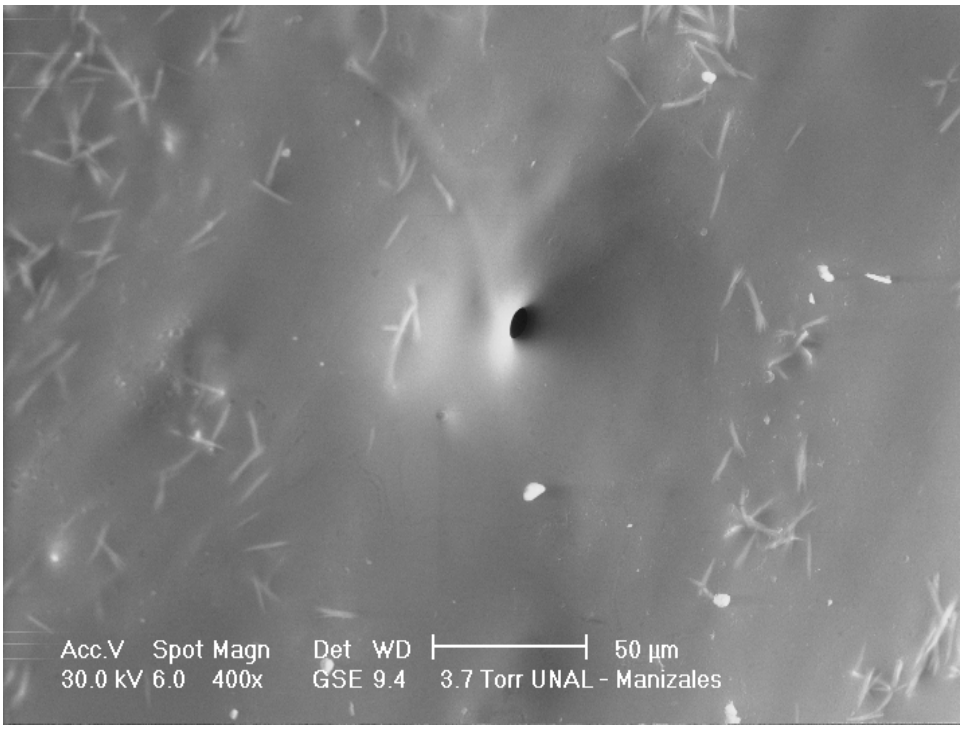


Fig. 14a (arriba) y 14b (abajo) Micrografías general de P2 a 400 aumentos

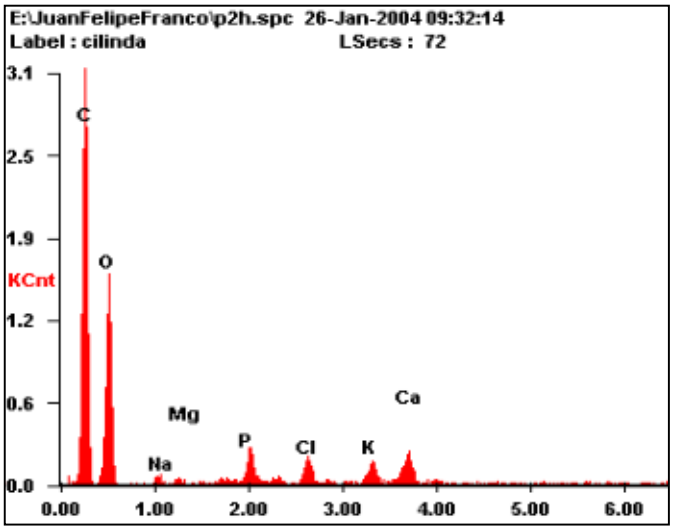


Fig. 15 Resultados del análisis elemental EDS para P2.

La figura 16 muestra en detalle las microfibras o dendritas que se observaban en la figura 14, se pueden apreciar ramilletes de estas fibritas y otras que están distribuidas solas alrededor de estos; no es muy preciso lo que se pueda decir de más al respecto. Se intentó tomar análisis elemental EDS en estas fibras pero al hacer pasar el haz de electrones por el punto de la muestra éste la fundía y no permitía obtener resultados.

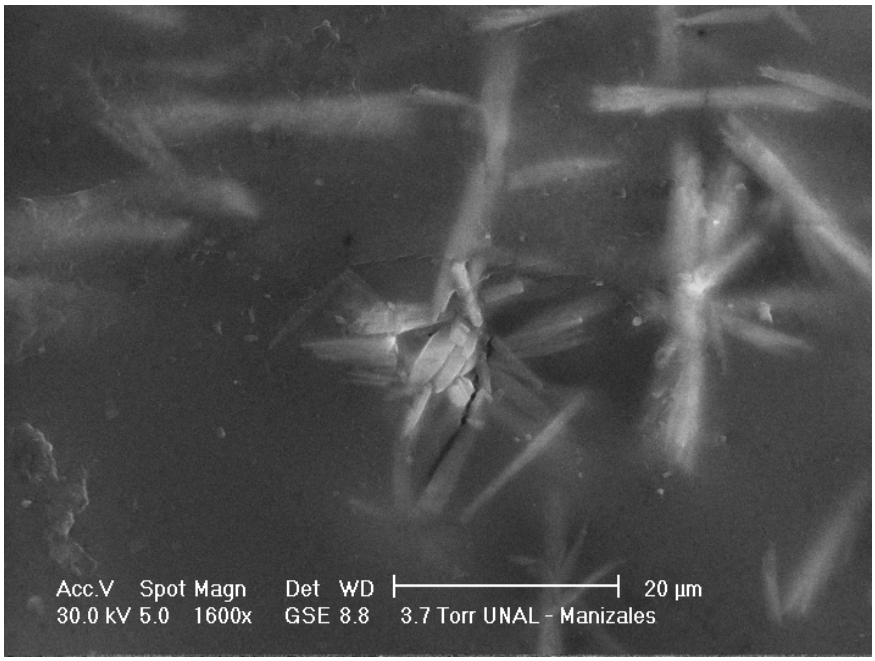


Fig. 16 Detalle de las especies de fibras presentes en P2.

Como primera aproximación al uso de esta técnica en estos biopolímeros, se intentó hacer una descripción muy cualitativa de lo que se observaba en las micrografías. Sería muy interesante el estudio de otras técnicas como AFM y XRD para ser aplicadas en este tipo de materiales y ser usadas para complementar las imágenes obtenidas por el ESEM permitiendo ampliar con más detalle la descripción de su superficie.
El Anexo 6 muestra algunas imágenes de superficies obtenidas por ESEM de otros biopolímeros, por ejemplo del poli-ácido láctico PLA, presentaos por Li [15].

3.4.4 FTIR

Como se mencionó en el numeral 2.6.3, se le realizó a los polisacáridos un análisis en el espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier FTIR, con el objetivo de identificar los grupos funcionales representativos en los materiales obtenidos y hacer una aproximación a la química del polímero.
Las figuras 17 y 18 muestran los espectros obtenidos para los polisacáridos P1 y P2 respectivamente, dados en porcentaje de transmitancia contra número de onda en cm^{-1}.

Por referencias de estudios anteriores, Lancheros [3] y Wei [17] y por lo observado en el análisis elemental por EDS, se esperaba encontrar básicamente enlaces carbono hidrógeno, carbono oxígeno e hidrógeno oxígeno, correspondientes a unidades de azúcares como galactosa, manosa y glucosa. Al comparar ambos espectros se puede observar que tanto P1 como P2 parecen tener una composición similar y la diferencia entre ambos no es notoria a simple vista.
Se tuvieron dificultades tratando de interpretar los espectros; primero se trató de comparar con espectros de azúcares conocidos pero no se tuvo éxito. Además se compararon con espectros de biopolímeros presentados en la literatura, pero no se encontró similitud. Se hizo entonces un recorrido por la base de datos del software del equipo y se trató de identificar a qué posibles grupos funcionales correspondían los picos de los espectros. La figuras 19 a 24 muestran las bandas por regiones, identificando a que posible grupo funcional corresponden.

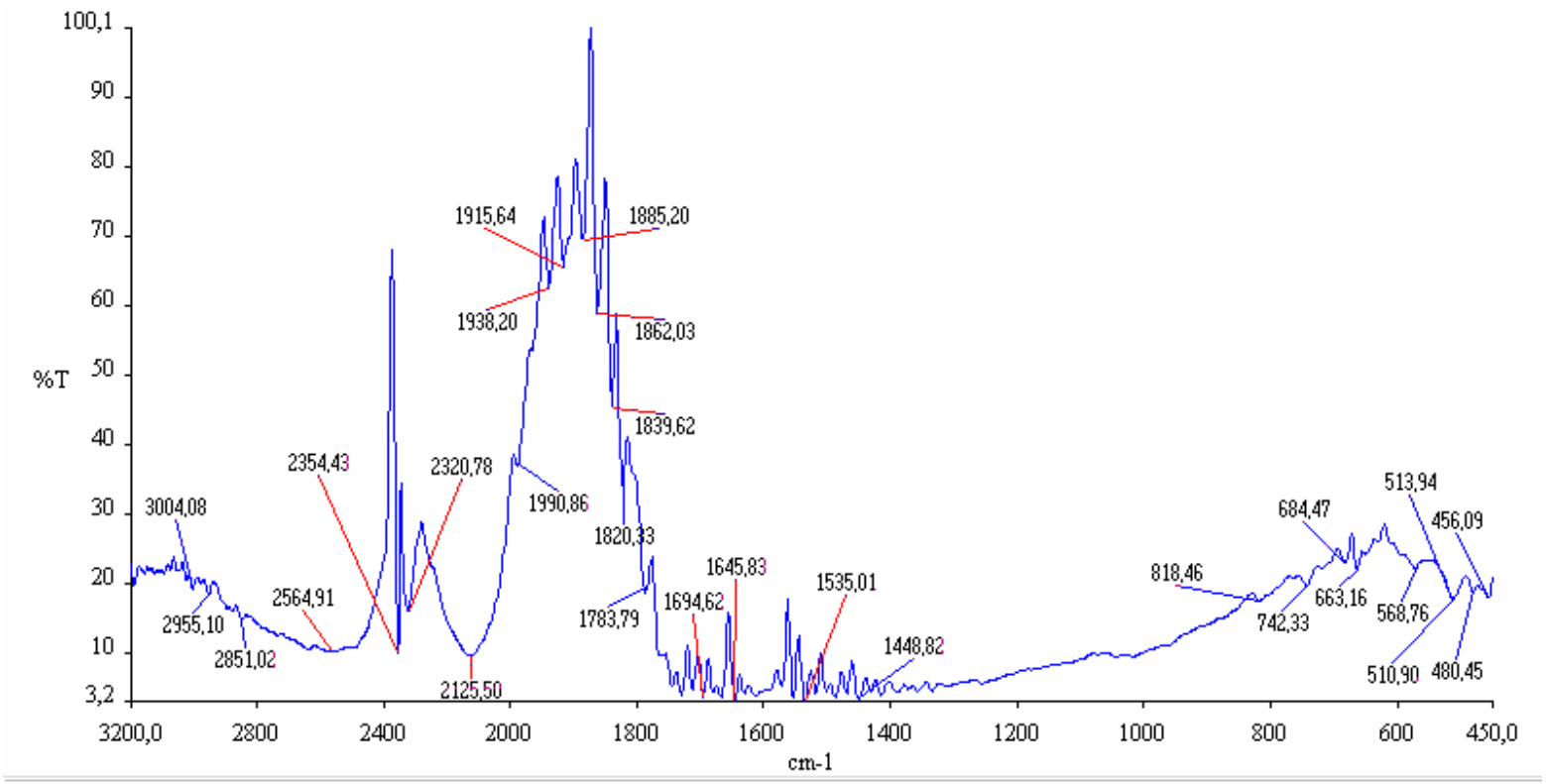


Fig. 17 Espectro FTIR obtenido para el polisacárido P1

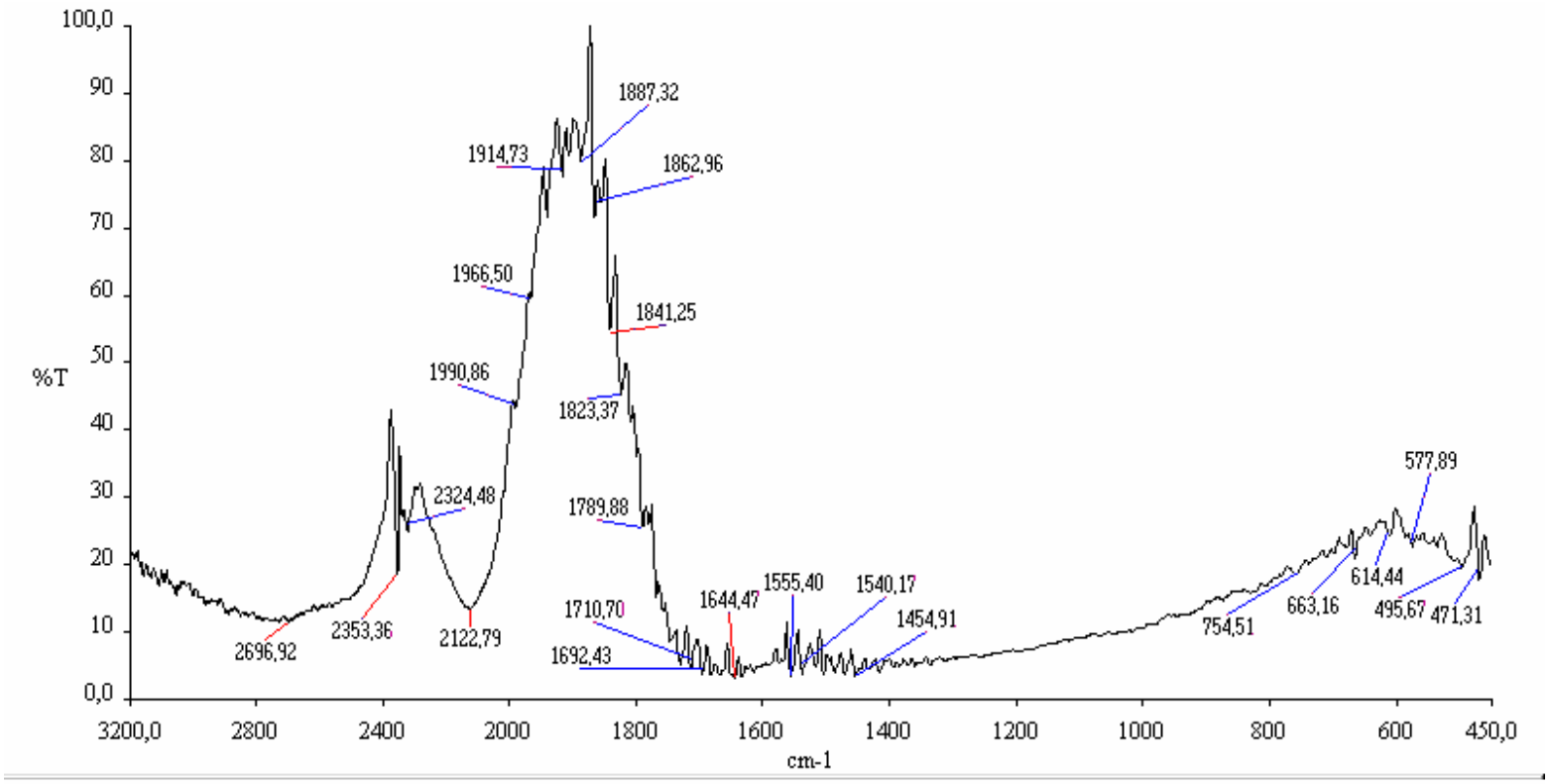


Fig. 18 Espectro FTIR obtenido para el polisacárido P2

Se presentan ahora una serie de figuras en donde se resalta la banda del espectro que podría pertenecer al grupo funcional que se muestra en la parte superior derecha de la misma figura.

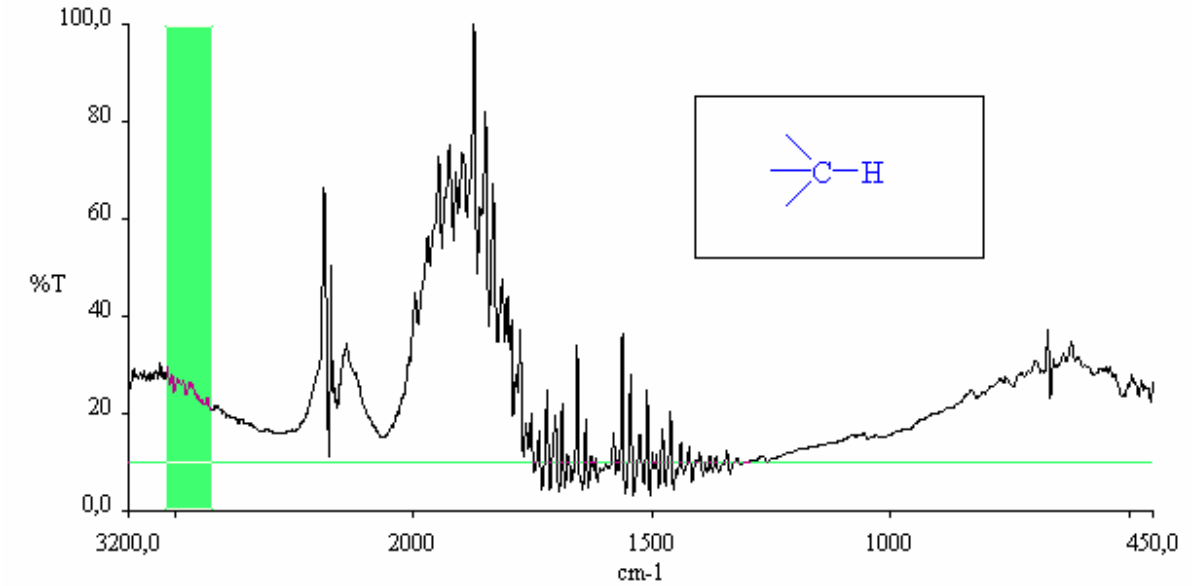


Fig. 19 Banda correspondiente a una frecuencia entre los 2845 – 3040 cm^{-1}. Posible estructura del grupo funcional alquilo.

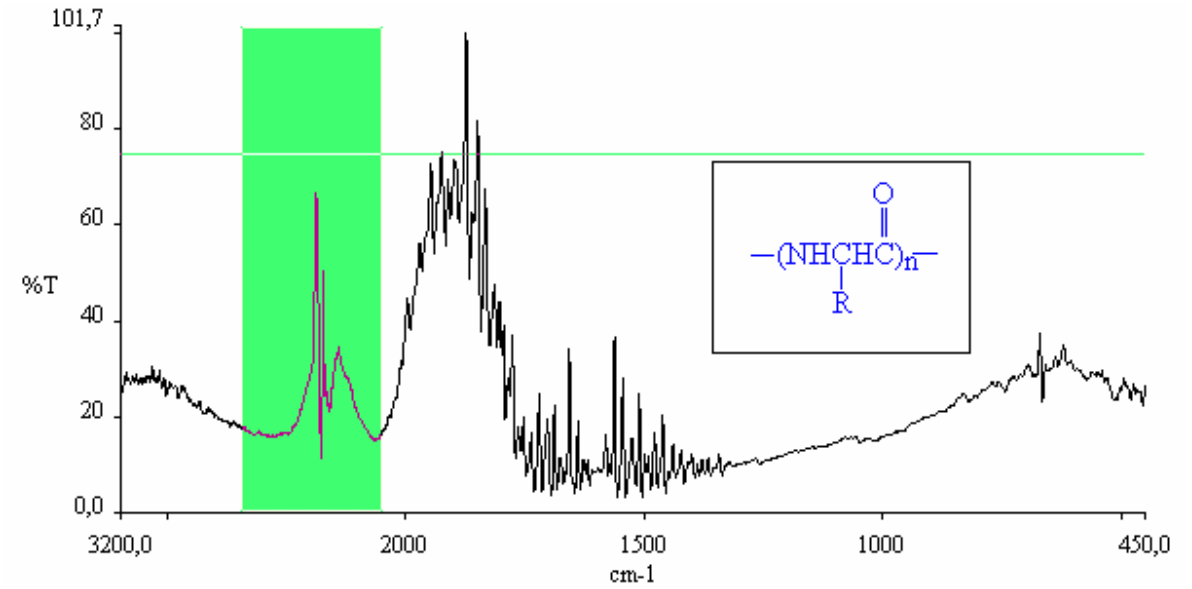


Fig. 20 Banda correspondiente a una frecuencia entre los 2100 – 2690cm^{-1}. Posible estructura de un grupo funcional amida secundaria alifática.

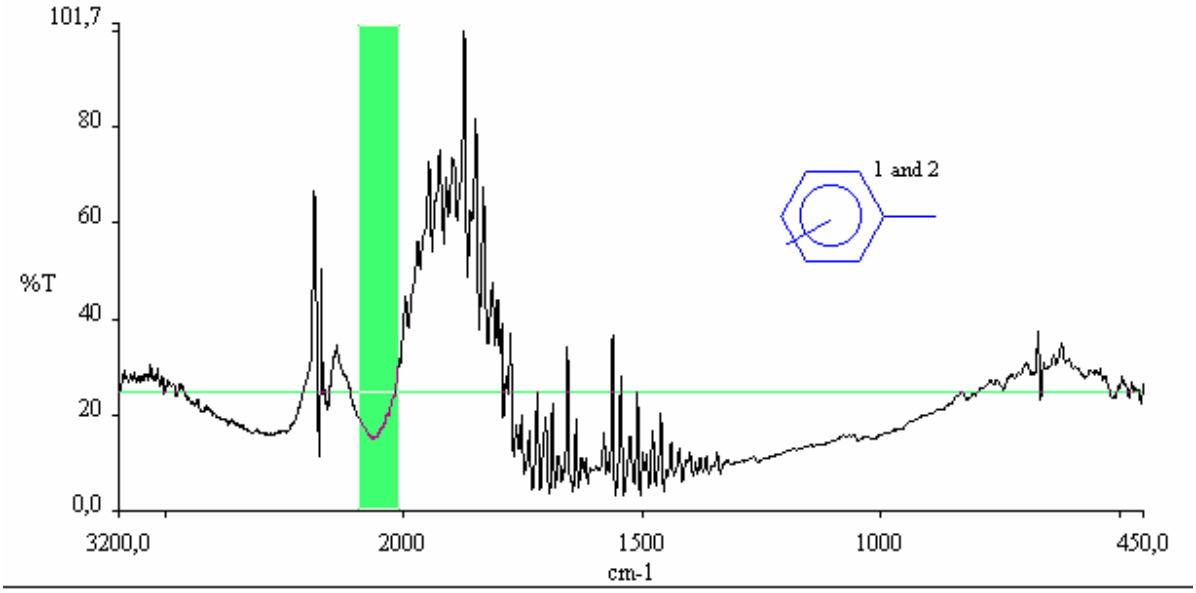


Fig. 21 Banda correspondiente a una frecuencia entre los 2015 – 2185cm^{-1}. Posible estructura de un grupo funcional aromático.

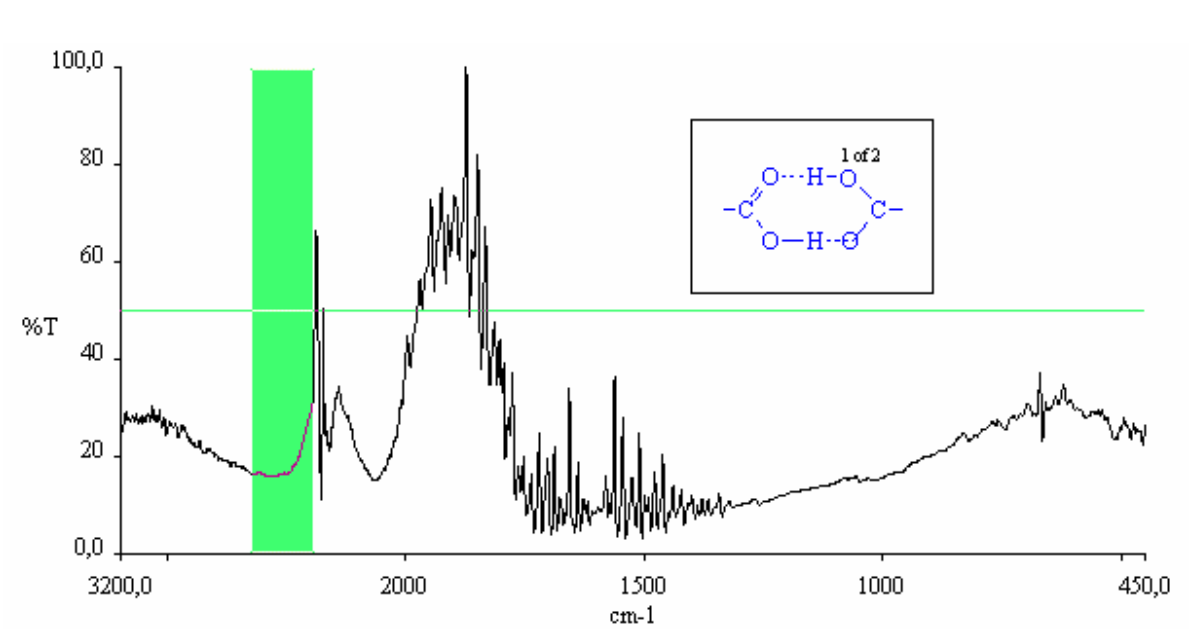


Fig. 22 Banda correspondiente a una frecuencia entre los 2385 – 2650cm^{-1}. Posible estructura de un grupo funcional ácido.

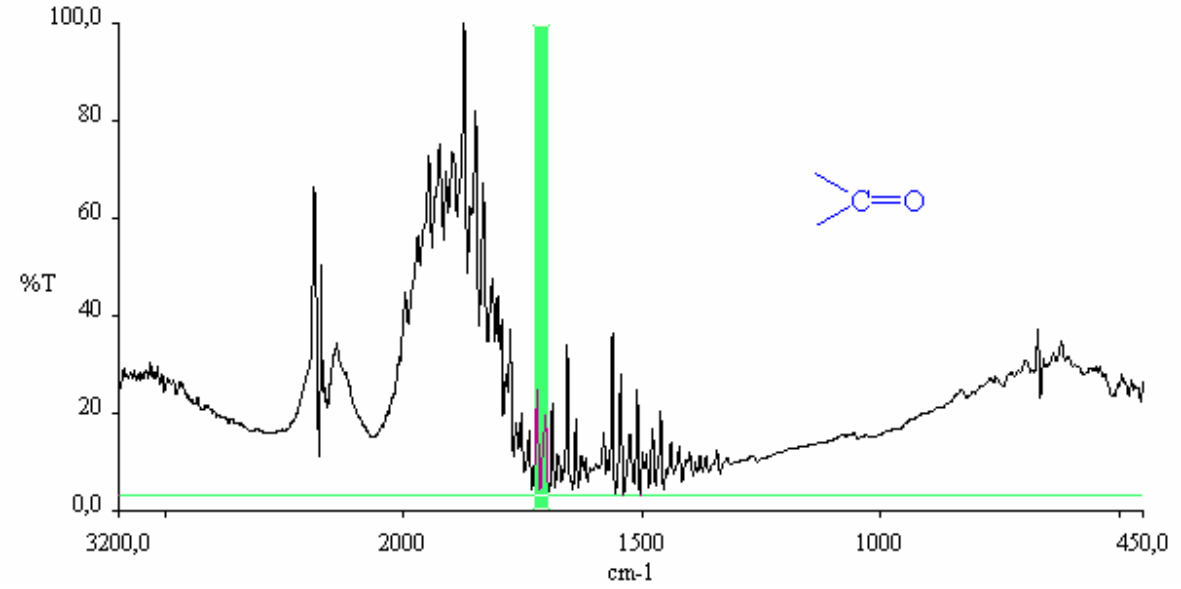


Fig. 23 Banda correspondiente a una frecuencia entre los 1695 – 1725cm^{-1}. Posible estructura de un grupo funcional carbonilo.

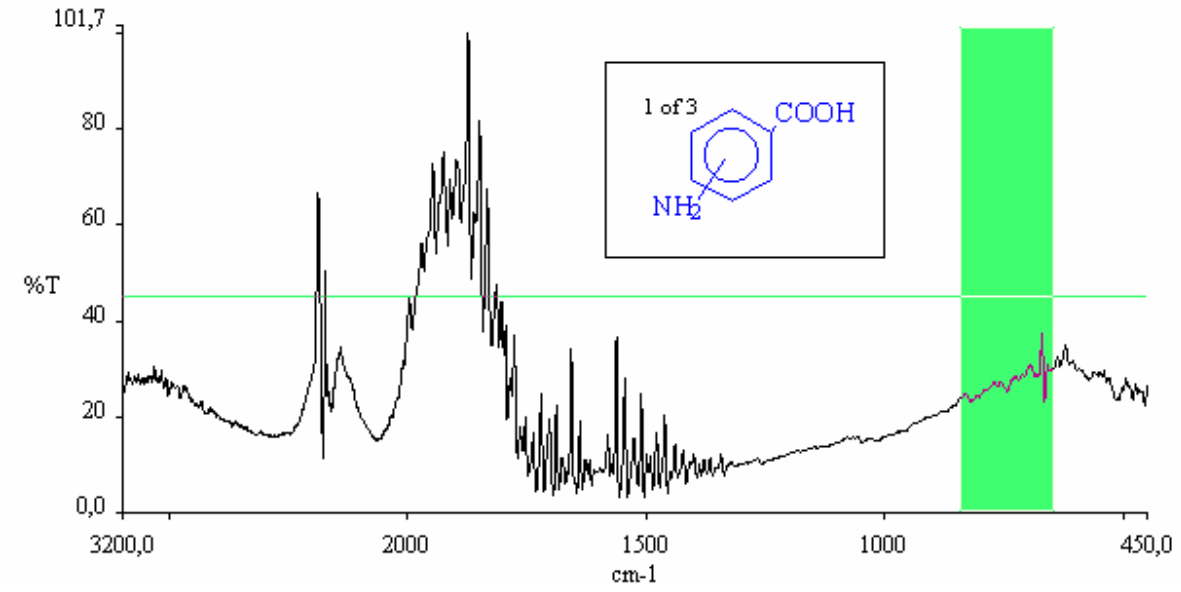


Fig. 24 Banda correspondiente a una frecuencia entre los 645 – 840cm^{-1}. Posible estructura de un grupo funcional amino ácido.

De lo planteado en las anteriores figuras se pueden destacar los posibles grupos ácidos identificados en las figuras 22 y 24 que confirmaría el carácter ácido de los metabolitos producidos por cepas de Rhizobium, según lo propuesto por Lancheros [3] y Wei [17]. La posible presencia de grupos amino y

amida le daría también una característica especial al polisacárido propia de compuestos denominados aminosacáridos como la quitina y la glucosamina [24].
No fue posible establecer una interpretación más completa y detallada de los espectros para P1 y P2 (figuras 17 y 18); simplemente se propone que se consideren ambos polímeros como polisacáridos con unidades ácidas y nitrogenadas pegadas a las cadenas de azúcares.

Resumiendo la caracterización de los polímeros se puede decir que se tiene un polímero P1 apreciado como un material poco flexible, con apariencia de pasta, de superficie rugosa, con poros que pueden ser propios del material. P2 es un material más flexible que P1, de apariencia suave como una goma, que presentó una serie de fibrillas o dendritas en las imágenes obtenidas por ESEM.
Ambos polímeros parecen tener un carácter pseudoplástico, es decir, sus soluciones se adelgazan con la agitación. Tanto P1 como P2 están básicamente formados por carbono, hidrógeno y oxígeno como lo presentó el análisis elemental por EDS. Del espectro infrarrojo que se obtuvo no fue posible obtener una interpretación completamente precisa de la química de los polisacáridos; sin embargo se propone la presencia de grupos ácidos y nitrogenados.

Tratar de identificar algunas posibles aplicaciones industriales para los biopolímeros a partir de la caracterización hecha sería un poco apresurado. Si se toman los resultados presentados por Lancheros en [3] se espera que este tipo de polisacáridos tengan aplicación especialmente como estabilizantes y emulsificantes de soluciones; sin embargo, por las características físicas de los polímeros obtenidos se propone que pueden ser compuestos con pesos moleculares mayores a los de los polisacáridos encontrados por Lancheros [3], lo que les permitiría ser empleados para otras nuevas aplicaciones.
Sería valioso realizar una caracterización más precisa de estos polímeros, sobretodo desde el punto de vista reológico y calorimétrico, que permita establecer con mayor certidumbre posibles aplicaciones industriales para los biopolímeros producidos en este trabajo.

4. CONCLUSIONES

- Se estudió la producción a nivel laboratorio de los polisacáridos producidos por la cepa *Rhizobium leguminosarum,* utilizando los valores óptimos de las variables del proceso seleccionados de la revisión bibliográfica que se hizo. Se obtuvieron dos polisacáridos extracelulares que se encuentran en el medio de cultivo, tal como lo había sugerido Lancheros [3]. Uno de ellos, P1, sobrenada en medio con etanol y al secarlo tiene la apariencia de una pasta; el otro, P2, precipita en el mismo medio y al secarlo se aprecia como una goma.

- El sustrato seleccionado por mejores rendimientos según bibliografía fue la sacarosa, el cual se trabajó en concentraciones más altas de las propuestas por otros autores, alcanzando una mayor producción de polisacárido P1 comparada con la reportada en otros trabajos [3], [17]. No se trató de una situación de sustrato limitante ya que la concentración final de sacarosa era aún muy alta (12.34 g/l) al final de la fermentación, consideración que fue importante en el momento de plantear el modelo cinético.

- Se comprobó que P1 es un metabolito asociado y no asociado al crecimiento y se plantea que P2 también sea un metabolito parcialmente asociado al crecimiento, ya que se observa que se produce tanto en la etapa de crecimiento exponencial de las células como en la fase estacionaria.

- El seguimiento cinético realizado a la biomasa permite observar una fase exponencial de crecimiento que va hasta las 35 horas de reacción y una fase estacionaria de crecimiento entre las 35 y 72 horas.

- Al aplicar el modelo cinético para cada una de las tres variables, biomasa, sustrato y producto, a los demás datos que se obtuvieron para diferentes corridas, este ajustaba, lo que representa la aplicabilidad del modelo en el proceso.

- Las pruebas de disolución que se realizaron utilizando como solvente agua, demostraron que este no era un buen solvente para los polisacáridos, pues estos no disolvían completamente o después de un

tiempo de reposo formaban precipitado. Además al medir los puntos de ebullición de las disoluciones estos no presentaron una tendencia con el aumento de la concentración.

- La toma de las micrografías por ESEM mostró que P1 presenta una superficie con una ligera rugosidad que se aprecia en las imágenes de mayor acercamiento, además de una serie de poros de gran tamaño que no se pudo establecer si eran propios del material. Para P2 las imágenes mostraron una superficie bastante heterogénea, en donde se observaban una serie de pequeñas fibritas distribuidas aleatoriamente en la superficie.

  El análisis de elementos que se hizo por EDS básicamente confirmó que ambos polímeros P1 y P2 están compuestos en gran parte por carbono, oxígeno y por supuesto, hidrógeno, aunque este método no lo detecta.

- De la interpretación de los espectros infrarrojos obtenidos para ambos polisacáridos se puede rescatar la posible presencia de grupos ácidos, aminoácidos y amidas secundarias que pueden estar pegados de las unidas de azúcares que conforman el polisacárido.

5. RECOMENDACIONES

- La principal recomendación que se hace es continuar trabajando en el tema, las herramientas están a la mano y vale la pena continuar. La cepa queda en tubos con medio de mantenimiento en el laboratorio de procesos productivos de la sede, lista para trabajar en cualquier momento.

- La determinación de las cantidades de biomasa y polisacáridos se hizo gravimétricamente, métodos con los que se maneja cierta incertidumbre, sobre todo al comienzo del cultivo, en donde las concentraciones son muy bajas; por lo que se recomienda utilizar otros métodos analíticos e instrumentales para su determinación.

- Realizar el seguimiento cinético a ambos polisacáridos producidos P1 y P2 con el fin de establecer si hay o no una relación en la producción de ambos metabolitos, y si la hay encontrar una expresión que las relacione.

- Ya que la bibliografía reporta la importancia de variables como la agitación y la aireación en el proceso, se recomienda realizar estudios en un reactor de mayor volumen, encaminados a determinar la influencia de estas variables en la producción de los polisacáridos.

- Se recomienda hacer una caracterización un poco más profunda, con pruebas reológicas y calorimétricas, que permitan encontrar algunas otras propiedades de los biopolímeros. Desarrollar trabajos orientados al estudio y manejo de otras técnicas instrumentales disponibles en la sede y aplicarlos en la caracterización de los biopolímeros producidos.

- Fue muy interesante y apasionante tener la experiencia de trabajar con organismos biológicos, como lo es la bacteria Rhizobium leguminosarum. Los conocimientos y la experiencia adquirida en el manejo microbiológico de la cepa fueron muy valiosos y fue la base fundamental para que el trabajo se pudiese realizar.

- Quizás antes de empezar el proyecto no se tenía una verdadera dimensión de lo que se estaba proponiendo y sólo cuando se empieza a experimentar y a buscar respuesta a los fenómenos que se presentaban es cuando con nuestra habilidad como ingenieros debemos confrontar esa "teoría" con la realidad que estamos viviendo en el proceso. Por eso se recomienda ubicarnos y limitarnos mucho más en el momento de proponer los objetivos de los trabajos de investigación, sobre todo en pregrado.

- La posibilidad de utilizar recursos propios de la región como lo fue la cepa *Rhizobium leguminosarum* y de buscar otras posibles alternativas para ser utilizadas como sustratos, sin duda alguna favorecerá desde el punto de vista de costo de producción a la economía del proceso, pensando claro en la posibilidad de un futuro desarrollo industrial.

6. BIBLIOGRAFIA

[1] Ferrara, Ronald.; Angeles, María del Carmen. ; Rodríguez, María de las Nieves. Manual de Agro-Microbiología. Editorial Trillas. México, 1993.

[2] Chica, Beatriz Helena. Identificación de Cepas Nativas de Rhizobium asociadas con las leguminosas de la Zona Cafetera. Tesis para optar al titulo de Magíster en Microbiología. Universidad Católica de Manizales, 1998.

[3] Lancheros, Ruth J. *Producción de Polisacáridos por Fermentación Empleando Cepas de Rhizobium.* Trabajo para optar al título de Magíster en Ing. Química. Universidad Nacional de Colombia, 2001.

[4] Peña, C. *Factores de fermentación que determinan la producción industrial de polisacáridos microbianos.* Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, México. 2001.

[5] Peña C.,Campos N., Galindo E. *Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of Azotobacter vinelandii cultured in shake flasks.* Appl. Microbiol. Biotechnol. (1997) 48: 510 - 515.

[6] Trujillo, M. A., Peña, C., Ramirez, O., Galindo, E. *Effect of Oscillating Dissolved Oxygen Tension on the Production of Alginate by Azotobacter vinelandii.* Biotechnol. Prog. 2001, 17, 1042-1048.

[7] Peña, C., Galindo, E., Díaz, M. *Effectiveness factor in biological external convection: study in high viscosity systems.* Journal of Biotechnology 95 (2002) 1–12.

[8] Peña, C. Galindo, E., Trujillo, M. A. *Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of Azotobacter vinelandii.* Enzyme and Microbial Technology 27 (2000) 390–398.

[9] Sutherland, Ian W. *Novel and established applications of microbial polysaccharides.* TIBTECH, Vol. 16, Enero 1998

[10] Sutherland, Ian W. *A sticky business. Microbial polysaccharides: current products and future trends.* Microbiology TODAY, Vol. 29, Mayo 2002.

[11] Doran, P. *Principios de ingeniería de los bioprocesos.* Acribia S.A. 1998.

[12] Ollis and Baileys. *Biochemical Engineering Fundamentals*, Mc Graw-Hill.

[13] Varela, H. *Cinética de las Fermentaciones*. 2002.

[14] Raimaond, S., Carraher, Ch. *Introducción a la Química de los Polímeros*. Reverté S.A. 1995.

[15] Li, Suming. Girard, A. Garreau, H. Vert, Michel. *Enzymatic degradation of polylactide stereocopolymers with predominant d-lactyl contents.* Polymer Degradation and Stability, Vol. 71 (2001) 61-67

[16] Zagorski, D. Shelukhov, I. Milinchuk, V. AFM and SEM investigation of polymers irradiated in cosmic space.

[17] Wei, Guor-Jien, Song , Shuh-Chyung, Lin, Liang-Ping, Her, Guor-Rong. *Structural studies of extracellular polysaccharide produced by Rhizobium fredii Tu6, a polysaccharide with nonasaccharide repeating units.* Department of Chemistry, Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, Republic of China. 1996.

[18] Craver, Clara D., Provder, T. *Polymer Characterization*. ACS, 1990.

[19] Krause, A. Lange, A. Ezrin, M. *Plastics Analysis Guide.* Hanser. NY, 1983.

[20] Stokes, D.J. *Recent advances in electron imaging, image interpretation and applications: environmental scanning electron microscopy.* Cambridge, 2003.

[21] Bache, I.C. Anderson, V. Jones, R. Donald, A.M. *The Use of Environmental SEM to Observe Phase Structure in Biopolymer Mixtures.* Cambridge, 2003.

[22] *FTIR SPECTROSCOPY OF BIOPOLYMERS.* Documento.

[23] Tucker, M. and others. *Fourier Transform Infrared Quantitative Analysis of Sugars and Lignin in Pretreated Softwood Solid Residues.* Applied Biochemistry and Biotechnology Vol. 91–93, 2001

[24] Solomons, G. Fryhle, C. *Organic Chemistry.* Seventh edition. John Wiley and Sons, N.Y.,2000.

[25] Nurbas, M. *Production and Characterization of Biopolymers by Using Alcaligenes eutrophus (ATCC 17699).* Paper # 132.

[26] Atkinson, B. Reactores Bioquímicos. Reverté S.A. 1986.

ANEXOS

ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS. Preparación y Composición

- Suspender 50g de polvo en 1 litro de agua destilada
- Calentar y agitar hasta hervir
- Esterilizar por 15 minutos a 121 ºC y 15 psi

MacCONKEY AGAR (BBL)

Composición por litro:

Gelatina digerida por pancreáticas	17g
Caseina digerida por pancreáticas	1.5g
Tejido animal digerido por pépticas	1.5g
Lactosa	10g
Sales biliares	1.5g
Cloruro de sodio	5.0g
Rojo neutro	0.03g
Violeta cristal	0.001g
Agar	13.5g

El MARC

Composición por litro:

Fosfato de potasio	1.0g
Sulfato de magnesio	0.2g
Cloruro de sodio	0.18g
Glucosa	9.0g
Extracto de levadura	1.5g
Agar/Agar	12g
Rojo congo	10ml

El MABT

Composición por litro:

Fosfato de potasio	1.0g
Sulfato de magnesio	0.18g
Cloruro de sodio	0.2g
Glucosa	9.0g
Extracto de levadura	1.5g
Azul de bromotimol 5%	5.0ml

ANEXO 2. DETERMINACIÓN DE BIOMASA

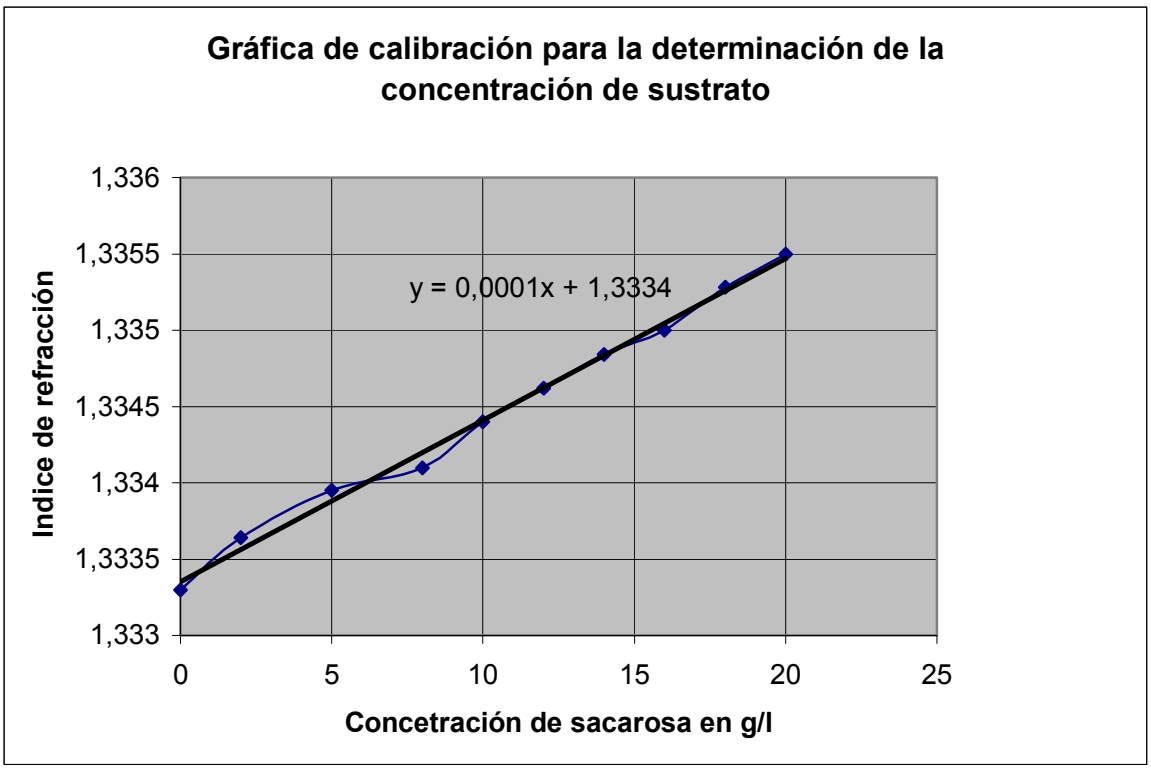
Para la determinación de la concertación total de células en el medio de cultivo se tiene el siguiente procedimiento:

1. Tomar la muestra del medio de cultivo, centrifugar a 4000rpm durante 30 min.
2. Filtrar en embudo, con papel filtro previamente pesado.
3. Secar en estufa a 70 ºC hasta peso constante.
4. Dejar enfriar en el desecador y pesar.

ANEXO 3. DETERMINACIÓN DE SUSTRATO

Para la determinación de la concertación de sacarosa por refractometría se tiene el siguiente procedimiento:

1. Tomar la muestra del caldo de cultivo, centrifugar.
2. Filtrar el sobrenadante.
3. Previamente se ha ajustado el equipo de tal manera que a 20 ºC y con agua destilada, marque un valor de índice de refracción de 1.333 o 0% de sacarosa y se ha realizado una curva de calibración, que se muestra a continuación.
4. Leer el valor del índice de refracción de la muestra manteniendo la temperatura constante y observando la lectura en la escala derecha del refractómetro.
5. Si la solución es muy oscura, para efectuar una lectura directa, se puede diluir con solución concentrada de sacarosa.



ANEXO 4. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE BIOPOLÍMERO

Procedimiento:

1. Centrifugar el caldo de fermentación a 5000rpm durante 30 minutos.
2. Al sobrenadante se le agrega etanol al 92% en relación volumen 3:1.
3. Dejar reposar entre 24 y 48 horas.
4. Cuidadosamente retirar el polímero que flota en el etanol y depositarlo en frascos previamente tarados y pesados.
5. Retirar el etanol y cuidadosamente con ayuda de un agotador de vidrio retirar el polímero que se encuentra adherido en el fondo del recipiente en forma de gel y depositarlo en frascos previamente pesados.
6. Llevar los frascos a estufa a 40ºC y secar hasta peso constante (entre 2 y 3 días).
7. Determinar la cantidad de polisacáridos por diferencia de pesos.

ANEXO 5. Muestra de cálculo para desarrollo del modelo cinético y tablas con los datos de concentraciones y tiempos.

La resolución del modelo se hizo por el método grafico expuesto por Ollis [12] y se encontraron los valores para las constantes de las expresiones de velocidad. Este anexo presenta una muestra de cálculo para el desarrollo del modelo.

Para modelar el crecimiento de biomasa se utilizó el modelo denominado logístico, que presenta la siguiente forma:

$$\frac{dX}{dt} = kX(1 - \beta X)$$

Al integrar esta ecuación se obtiene:

$$X = \frac{Xoe^{kt}}{1 - \beta Xo\left(1 - e^{kt}\right)}$$

Reorganizando la ecuación para anterior y sacando logaritmo tenemos:

$$\ln\left[\frac{X(t)/Xs}{1 - X(t)/Xs}\right] = kt - \ln\left[\frac{Xs}{Xo} - 1\right]$$

Xs es el valor al que tiene la concentración de biomasa en la fase estacionaria obtenido de una gráfica de X contra t como la figura 6.

De una gráfica de $\ln\left[\frac{X(t)/Xs}{1 - X(t)/Xs}\right]$ contra ***t*** que corresponde a la de una línea recta de pendiente *K* y con intercepto en $\ln\left[\frac{Xs}{Xo} - 1\right]$, encuentro los valores para las constantes *k* y Xo.

Para la cinética de formación de producto se propuso el modelo de *Leudeking – Piret*. Ecuación que se muestra a continuación.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

Reemplazando la ecuación propuesta para $\frac{dX}{dt}$ en la ecuación anterior, separando variables, integrando y reorganizando se tiene:

$$P(t) - \beta\left(\frac{Xs}{k}\right).\left(1 - Xo/_{Xs}\left(1 - e^{kt}\right)\right) = \alpha\left(X(t) - Xo\right)$$

De una gráfica de el término de la izquierda de la ecuación contra *X(t) – Xo* sólo para los datos de crecimiento exponencial de las células, se obtiene el valor de α que es el valor de la pendiente de la recta. Antes es necesario encontrar el valor de β, para lo que se procede de la siguiente manera:

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{fase_estacionaria} = \beta Xs$$

Separando variables e integrando se tiene:

$$P = \beta X_s t$$

De una gráfica de P contra t para los datos de la fase estacionaria del crecimiento celular obtengo el valor de la constate β y la puedo utilizar para encontrar el valor de α según lo mostrado anteriormente.

El consumo de sustrato fue descrito por la siguiente expresión:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}}\frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{p/s}}\frac{dP}{dt} - k_e X$$

$Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$ son los respectivos rendimientos reales de biomasa y producto con respecto al sustrato y k_e

es un coeficiente de mantenimiento en [gS / gX h]. Para facilitar los cálculos se agruparon estas constantes y se reorganizó la ecuación anterior quedando:

$$\frac{dS}{dt} = -\delta \frac{dX}{dt} - \eta X$$

Con

$$\delta = -\frac{1}{Y_{x/s}} - \frac{\alpha}{Y_{p/s}} \qquad \text{en} \quad [gS / gX]$$

$$\eta = \frac{\beta}{Y_{P/S}} + k_e \qquad \text{en} \quad [gS / gX\ h]$$

Siguiendo el mismo procedimiento que para la ecuación que modela la formación de producto obtengo una expresión que me permite encontrar el valor de las constates δ y η .

Las tablas a continuación muestran los datos de las concentraciones para biomasa, sacarosa y P1 obtenidas durante el seguimiento cinético.

Concentración de biomasa (X) en g/l			
Corrida 1	Corrida 2	Corrida3	tiempo
0,08	0,09	0,1	0
0,16	0,12	0,17	5
0,63	0,67	0,6	10
1,35	1,4	1,3	23
1,61	1,68	1,55	28
1,82	1,8	1,75	33
1,91	1,95	1,83	47
1,95	1,99	1,85	52
1,93	2,05	1,85	57
1,96	1,99	1,86	72

Concentración de sacarosa (X) en g/l			
Corrida 1	Corrida 2	Corrida3	tiempo
20	20	20	0
19,2	19,5	18,9	5
18,83	18,5	18,6	10
17,08	16,75	17,4	23
16,87	16,54	16,71	28
16,06	15,83	15,94	33
15,41	15,03	15,64	47
14,2	13,9	14,82	52
13,28	12,87	14,01	57
12,34	11,95	13,23	72

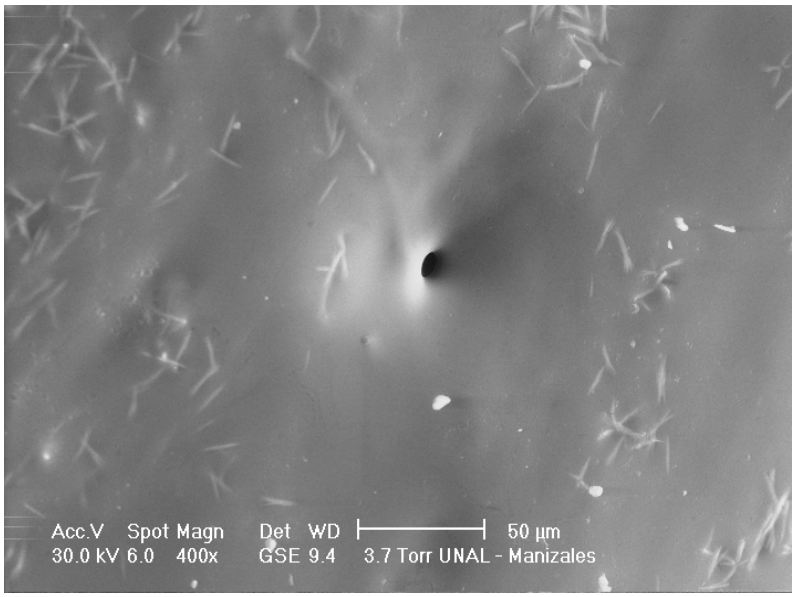
Concentración de P1(X) en g/l			
Corrida 1	Corrida 2	Corrida3	tiempo
0	0	0	0
0,51	0,4	0,55	5
0,71	0,78	0,74	10
1,8	1,41	1,5	23
2,07	1,93	1,78	28
2,25	2,09	1,9	33
2,86	2,5	2,25	47
2,95	2,76	2,48	52
3,09	2,95	2,76	57
3,4	3,28	3,12	72

ANEXO 6. Microscopia Electrónica de Barrido en Ambiente (ESEM) Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)

Medidas

Se obtuvieron imágenes con un microscopio electrónico Philips ESEM XL 30 TMP. Dadas las características eléctricas de las muestras analizadas se operó el microscopio en modo ambiental, de manera que no es necesaria la metalización. El análisis EDS fue realizado en el mismo modo de operación y los espectros se obtuvieron simultáneamente con las micrografías. Debido a la heterogeneidad morfológica de las muestras, se tomaron micrografías y espectros en diversas zonas para obtener mayor representatividad de la muestra en las medidas. La marca en cada micrografía indica el sitio exacto del microanálisis químico por EDS.

Detalle explicativo de las micrografías



Cada una de las micrografías SEM que se obtuvieron, tiene la información de las condiciones de operación del Microscopio en la barra de la parte inferior de la imagen. El significado es el siguiente:

Acc. V : Voltaje de aceleración utilizado en el canon de electrones .

Spot: Tamaño en área transversal del haz de electrones.

Mag: Magnificación para esa imagen.

Det: Tipo de detector de electrones utilizado (GSE: Gaseous Secondary electrons).

WD: Distancia de trabajo, es decir distancia entre la muestra y la salida del haz de electrones.

Exp: Numero de foto, no relevante.

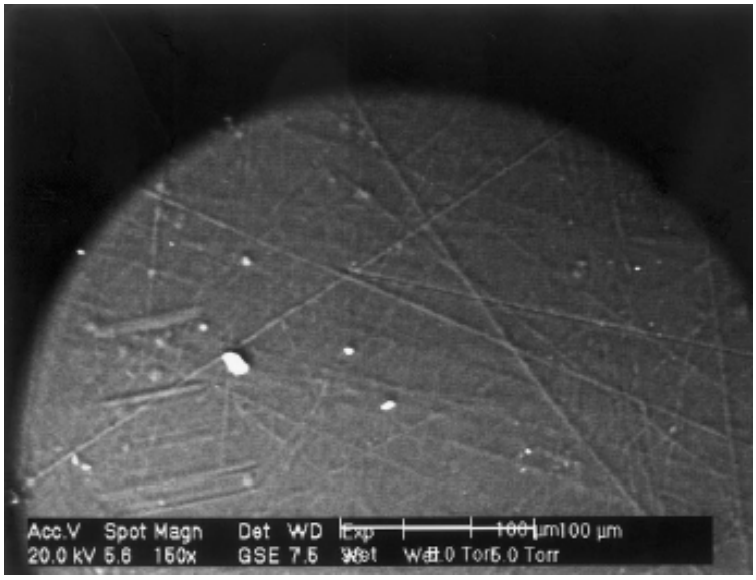
X Torr: La presión actual en la cámara de medida

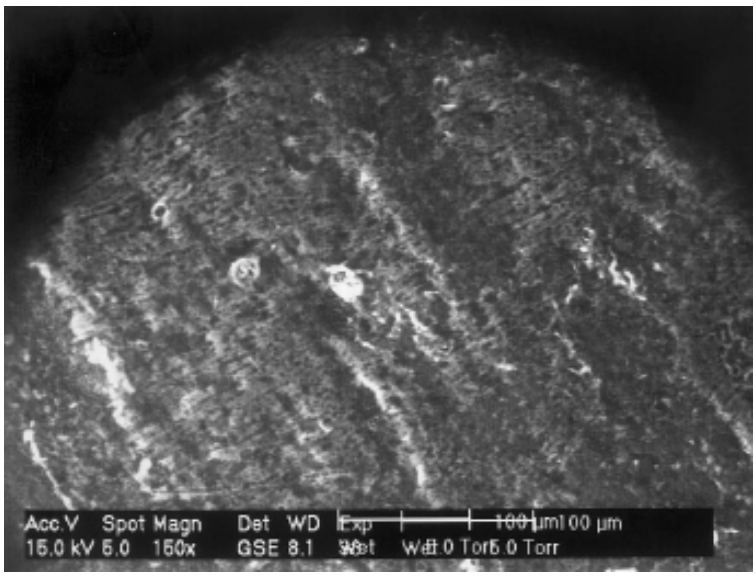
La información adicional es la escala y los créditos del sitio de obtención de la imagen.

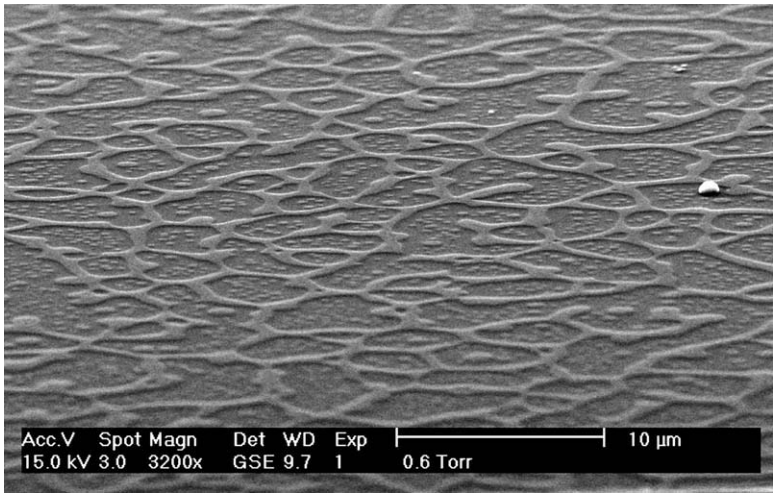
Observaciones

Las condiciones de presión para la medida de las dos muestras son distintas, ya que en el caso de la muestra catalogada como P1 se tuvieron efectos de carga que motivaron el aumento de la presión de trabajo en la cámara de análisis a 6 Torr.

A continuación se muestran algunas imagines obtenidas por ESEM para biopolímeros como el PLA, obtenidas por Li en [15]. Fueron usadas como comparación a las obtenidas para los polisacáridos de este trabajo.




Acc.V Spot Magn Det WD Exp
15.0 kV 5.0 150x GSE 8.1 1 0.0 Torr 5.0 Torr
100 µm


Acc.V Spot Magn Det WD Exp
15.0 kV 3.0 3200x GSE 9.7 1 0.6 Torr
10 µm

ANEXO 7. Espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier FTIR.

El espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) con que cuenta el laboratorio de física del plasma de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, es un Perkin Elmer Spectrum BX., con accesorios para analizar muestras sólidas y liquidas.

Para muestras sólidas se utiliza el modo de transmitancia para el cual las muestras deben ser preparadas así:

- se mezcla 200mg de KBr o KCl ambos compuestos son ventanas infrarrojas (no reaccionan al infrarrojo), con 2mg de la muestra, se maceran en el mortero y luego se coloca este polvillo en el molde que posteriormente se prensa para formar la pastilla, la cual se monta en el equipo.

Para muestras plásticas que no se pueden macerar se colocan en el equipo directamente con una geometría muy similar a la pastilla la cual tiene las dimensiones 2mm de espesor y 13mm de diámetro.

El accesorio para analizar líquidos es el de Reflectancia Total Atenuada (ATR), con ángulo de incidencia variable y lentes-portamuestras (kr5-45, ZeSe, Si). Este accesorio permite analizar cualquier tipo de líquidos. Se puede analizar líquidos utilizando el método de transmitancia a través del accesorio que posee una celda para cristales salinos (NaCl), el impedimento esta en que solamente se puede analizar líquidos que no tengan grupos O-H.

EL EQUIPO

Un espectrofotómetro de infrarrojo posee dos fuentes, una láser de 640nm (rojo) de longitud de onda la cual tiene la función mejorar la precisión en el recorrido de la fuente infrarroja y la fuente infrarroja que es generada por un filamento de hierro.

Consta además de un interferómetro tipo Michelson, el cual crea patrones de interferencia con la radiación que le incide (2 fuentes), el interferómetro es un arreglo de lentes y espejos, entre los cuales tenemos al Beam Splitter (divisor de haces) el cual transmite una parte del haz incidente y otra parte la refleja.

Dos espejos están separados a igual distancia del Beam splitter, pero uno de ellos se mueve alejándose y acercándose del Beam splitter. Cuando los rayos reflejado y transmitido se vuelven a encontrar y como el espejo se está moviendo hará que cambie la longitud de onda del haz reflejado entonces, cuando se superponen nuevamente ocurrirán fenómenos de interferencia constructiva y destructiva, es decir se obtiene un patrón complejo.

El detector que se utiliza comúnmente por su alta resolución es el semiconductor HgCdTe que posee propiedades fotoconductoras es decir como una fotocelda, cuanto mayor es la intensidad de la radiación incidente menor es la resistencia que se crea en el circuito amplificador.

Para tomar el espectro inicialmente se registra un interferograma, es decir, el patrón de interferencia creado bombardea la muestra creando a la salida de la muestra un patrón de interferencia distinto al que llamaremos interferograma.

Este interferograma es energía vs. Trayectoria de paso óptico, la trayectoria de paso óptico es la distancia que recorre el espejo móvil del interferómetro con respecto a una posición de referencia.

A este interferograma se le aplica la transformada rápida de Fourier para obtener un espectro en número de ondas. Es claro que la intensidad se convertirá en transmitancia o en absorbancia ya que la muestra dejará pasar menor radiación.

Entonces nuestro espectro queda transmitancia vs. Numero de ondas, el número de ondas es el inverso de la longitud de onda y es la unidad de referencia en espectroscopia infrarroja.

Teoría de vibraciones

Porque utilizar radiación infrarroja?, la respuesta esta en las vibraciones moleculares, ya que las moléculas vibran a una frecuencia que se encuentra en la región del infrarrojo, por lo tanto se crearan fenómenos de resonancia lo que implica que la molécula no se disociará sino que absorberá la radiación en cuantos de energía y libera esta energía vibrando de diversas maneras.

Estas vibraciones dependen de la geometría de la molécula, el número de átomos, y los momentos bipolares de las mismas, ya que si el momento bipolar se anula (simetría) no podrá vibrar en infrarrojo.

ESPECTROS

La toma de los espectros se realizó de la siguiente forma:

- toma de un espectro background para corregir el medio en el rango de 3200 a 450cm^{-1}, numero de barridos 25, resolución 4cm^{-1}.
- toma del espectro de la muestra en el rango de 3200 a 450cm^{-1}, número de barridos 25, resolución 4cm^{-1}.