UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Fisicoquímicas y de Transporte en Membranas de Celulosa Bacteriana

Ing. Luz Dary Carreño Pineda

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ingeniería
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá D.C., Colombia
2011

Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Fisicoquímicas y de Transporte en Membranas de Celulosa Bacteriana

Ing. Luz Dary Carreño Pineda

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ingeniería

Director:
Ing. Luis Alfonso Caicedo Mesa D.Sc.

Codirector:
Ing. Carlos Arturo Martínez Riascos D.Ing.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ingeniería
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá D.C., Colombia
2011

A mi familia, aquellos que Dios escogió para quererme, cuidarme, acompañarme y enseñarme cómo vivir una vida que no es necesariamente igual a la de los demás, sin apartarme de los principios y valores que caracterizan un buen ser humano.

A mis amigos, la familia que escogí, con quienes he crecido y compartido momentos maravillosos y pruebas difíciles y que aún siguen a mi lado a pesar del paso del tiempo, de las circunstancias y los cambios que éstos generan, aceptándome y queriéndome como soy.

A todos ustedes dedico este trabajo, fruto de un esfuerzo inmenso que no sería posible sin su constante apoyo, su compañía, sus sonrisas y sin su amor. Gracias por estar a mi lado, por creer en mis sueños y ser parte de ellos.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos aquellos que hicieron posible el desarrollo de este trabajo, especialmente a:

El ingeniero Luis Alfonso Caicedo Mesa, director del proyecto, por su apoyo a nivel académico y personal, sin el cual no habría sido posible realizar esta tesis. Agradezco su voto de confianza al creer en mis capacidades para abordar esta tarea, y el estar pendiente de los pormenores de este trabajo. Su dedicación y empeño en mi adecuada formación y su acompañamiento a lo largo de este tiempo permitieron culminar exitosamente este proyecto.

El ingeniero Carlos Arturo Martínez Riascos, codirector del proyecto, por el acompañamiento dado al trabajo y por toda su colaboración en la ejecución de los recursos asignados a la tesis.

El ingeniero Juan Carlos Serrato, director del laboratorio de ingeniería bioquímica, por su colaboración y asesoría en la etapa de producción de las membranas y en las pruebas de HPLC; a Ricardo Cortés por su ayuda en las pruebas de adsorción de nitrógeno.

A todos los profesores del Departamento de Ingeniería Química con quienes he compartido durante estos años, y quienes también fueron mis tutores y colegas en las labores de docencia, especialmente los profesores Luis Fracisco Boada, Jorge Spinel, Gabriel Rocha y Julio César Vargas.

El profesor Pedro Bejarano, quien voluntariamente me ofreció su colaboración en la revisión final del documento, por su ayuda en esta ardua tarea.

Mi amigo Daniel del Río, por su colaboración en los análisis de resultados de las pruebas de difracción de rayos X y adsorción de nitrógeno, por su paciencia y disposición para enseñarme lo necesario para analizar estos resultados.

A mis compañeros de posgrado, con quienes compartí estos años de aprendizaje con sus alegrías y muchas lecciones de vida.

El profesor Alberto Claudio Habert de la COPPE- UFRJ por recibirme como pasante para realizar las pruebas de caracterización de las membranas en el Laboratorio de Processos com Membranas e Polímeros PAM. Agradezco su asesoría, sus cuidados, sus esfuerzos para que mi portugués mejorara día a día y las nutridas discusiones acerca del avance del proyecto. También quiero agradecer a todo el personal de PAM en cabeza de la profesora Cristina Cardoso, directora del laboratorio, a la profesora Elizabeth por su colaboración en las pruebas de TGA y FT-IR y por las discusiones que se generaron alrededor de los resultados de estas pruebas, a Mariana, Sandra Paula y Boby, por su ayuda en las pruebas de caracterización; a mis compañeros de sala, Jader, Joel, Sandro, Liliane, y Daniela, por su amena compañía y su colaboración en el día a día en el laboratorio, por su paciencia y por las lecciones de portugués.

El grupo de colombianos residentes en Río de Janeiro y estudiantes de la UFRJ quienes fueron mi guía y mi compañía el tiempo que compartimos, por las discusiones que tuvimos acerca de los trabajos que desarrollamos, que al ser de áreas diferentes fueron útiles para enriquecer la discusión de resultados de este trabajo. Un agradecimiento muy especial al profesor Ricardo Ramírez por toda su colaboración y orientación desde mi llegada a Rio de Janeiro. También quiero agradecer a Selma y a las personas que me recibieron en su casa y me trataron como una hija más, compartiendo conmigo momentos inolvidables.

El programa de Becas de Estudiantes Sobresalientes de Posgrado de la Universidad Nacional de Colombia por la beca de estudios suministrada, necesaria para el sostenimiento durante el periodo de estudios.

La División de Investigación de Bogotá (DIB), por el apoyo financiero suministrado para el desarrollo de la tesis doctoral.

El programa Doctorados Nacionales de Colciencias por el apoyo suministrado para realizar la pasantía doctoral.

Resumen

En el presente trabajo fueron sintetizadas membranas de celulosa bacteriana a partir de un aislado nativo de *Acetobacter xylinum*. Se variaron como condiciones de cultivo la temperatura y la fuente de carbono, y como condiciones de purificación el agente purificante, la temperatura y el tiempo de exposición, y se evaluó el efecto de estas condiciones sobre las propiedades fisicoquímicas y de transporte de las membranas. Se caracterizaron con pruebas de difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido, microscopía electrónica de barrido, análisis infrarrojo y adsorción de nitrógeno. Las membranas obtenidas presentaron un alto grado de cristalinidad (entre 72 y 91%), temperaturas de descomposición entre 360 y 385°C. Fueron hechas pruebas de permeabilidad hidráulica, retención de solutos, diálisis y pervaporación. Debido a la baja porosidad, los *flux* de permeado en los distintos procesos de separación son bastante bajos. Se obtuvieron coeficientes de permeabilidad hidráulica entre 1 y 57 $lm^{-2}h^{-1}bar^{-1}$. Las membranas obtenidas a partir de glucosa son selectivas para la separación de la mezcla N_2/O_2. En las pruebas de pervaporación, las membranas alcanzaron selectividades entre 2.5 y 6. Las membranas obtenidas a partir de glucosa y glicerol presentaron el mejor desempeño en las diversas pruebas de separación.

Palabras Clave: Celulosa Bacteriana, Fermentación Estática, Cristalinidad, Separación por Membranas, Permeabilidad Hidráulica, Permeación de Gases, Pervaporación.

Abstract

In this work bacterial cellulose membranes were made using a local *Acetobacter xylinum* strain. The effect of culture variables (temperature and carbon source) and purification conditions (chemical agent, temperature and purification time) on membrane properties were investigated. Membranes were characterized by X ray diffraction, differential scanning calorimetry, scanning electron microscopy, infrared spectroscopy and N_2 sorption. A high cristallinity index was achieved (72-91%); the decomposition temperatures were between 360-885°C. Membranes were tested by hydraulic permeability, solute rejection, dialysis and pervaporation. Hydraulic permeability coefficients were between 1 and 57 $lm^{-2}h^{-1}ba^{r-1}$. Membranes made from glucose and glycerol showed the best behavior in the several membrane separation tests.

Keywords: Bacterial cellulose, Static culture, Cristallinity index, Membrane separation, Hydraulic permeability, Gas permeation, Pervaporation.

Contenido

Resumen Vi
Lista de Figuras Ix
Lista de Tablas Xiii
1. Introducción…… 1
2. Celulosa Bacteriana: Generalidades, Técnicas de Cultivo y Condiciones de Fermentación…….. 5
2.1 Introducción…… 5
2.2 Celulosa de Origen Bacteriano a Partir de Bacterias del Género *Acetobacter*…… 7
2.2.1 Características de la Celulosa Bacteriana……... 8
2.2.2 Biosíntesis de Celulosa Bacteriana…….. 9
2.2.3 Función Fisiológica…… 11
2.3 Técnicas de Fermentación……..…… 11
2.3.1 Cultivo Estático…….. 12
2.3.2 Cultivo Agitado…… 13
2.3.3 Efecto de de la composición del medio sobre la producción de celulosa bacteriana…… 13
2.3.4 Efecto de las condiciones de cultivo sobre las propiedades de la celulosa bacteriana…… 19
2.4 Aplicaciones de la Celulosa Bacteriana…….. 22
3. Membranas de Celulosa Bacteriana..... 25
3.1 Introducción……... 25
3.2 Morfología de las Membranas…….. 26
3.3 Procesos de Separación que Utilizan Membranas…… 27
3.4 Transporte a Través de Membranas…… 28
3.4.1 Modelos para Membranas Porosas…… 30
3.4.2 Modelos para Membranas Densas…….. 31
3.5 Membranas de Celulosa Bacteriana…… 38
3.5.1 Efecto de las condiciones de fermentación sobre las propiedades de transporte…… 39
3.5.2 Efecto de las condiciones de Purificación…… 39
3.5.3 Efecto del método de secado…… 41
3.5.4 Membranas de Celulosa Bacteriana en Procesos de Pervaporación…. 42
4. Metodología……... 45
4.1 Preparación de las Membranas……..... 45
4.1.1 Fermentaciones…… 45

4.1.2 Construcción de las Curvas de Producción de Celulosa..... 47
4.1.3 Obtención de las Membranas..... 48
4.2 Caracterización Estructural..... 49
4.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido..... 49
4.2.2 Difracción de Rayos X (DRX)..... 50
4.2.3 Adsorción de Nitrógeno..... 50
4.2.4 Espectroscopía Infrarrojo (FT IR)..... 50
4.2.5 Termogravimetría (TGA)..... 50
4.2.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)..... 51
4.3 Determinación de las Propiedades de Transporte..... 51
4.3.1 Grado de Hinchamiento..... 51
4.3.2 Permeabilidad Hidráulica..... 51
4.3.3 Retención De Solutos..... 53
4.3.4 Diálisis..... 54
4.3.5 Permeación De Gases..... 54
4.3.6 Pervaporación..... 55

5. Resultados y Discusión..... 57
5.1 Fermentaciones..... 57
5.2 Caracterización Estructural..... 66
5.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido..... 66
5.2.2 Difracción de Rayos X (DRX)..... 70
5.2.3 Adsorción de Nitrógeno..... 77
5.2.4 Espectroscopía Infrarrojo (FT IR)..... 80
5.2.5 Análisis Termogravimétrico (TGA)..... 83
5.2.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)..... 85
5.3 Determinación de las Propiedades de Transporte..... 87
5.3.1 Grado de Hinchamiento..... 87
5.3.2 Permeabiidad Hidráulica..... 91
5.3.3 Retención de Solutos..... 97
5.3.4 Diálisis..... 101
5.3.5 Permeación de Gases..... 103
5.3.6 Pervaporación..... 105

6. Conclusiones y Sugerencias..... 109
6.1 Conclusiones..... 109
6.2 Sugerencias..... 111

A. Anexo. Norma ASTM D3663-03. Determinación de Área Superficial..... 113
B. Norma Anexo. ASTM D3663-03. Distribución de Tamaño de Poro..... 117
Bibliografía..... 123

Lista de Figuras

Figura 1.1. Mercado de membranas en los últimos años para Estados Unidos…… 2
Figura 1.2. Revisión Tecnológica…….…… 3
Figura 2.1. Estructura de la celulosa……... 6
Figura 2.2. Interconversión de los polimorfos de la celulosa……..... 6
Figura 2.3. Enlaces en los puentes de hidrógeno para la estructura de celulosa I_α y I_β.. 7
Figura 2.4. Biosíntesis de Celulosa Bacteriana…….. 10
Figura 2.5. Esquema de la formación de la celulosa y su excreción al medio de cultivo a través de la membrana celular del microorganismo *Acetobacter xylinum*…….. 10
Figura 2.6. Fracción másica de celulosa Iα en cristales de celulosa bacteriana vs temperatura de cultivo……... 19
Figura 2.7. Variación de la proporción de celulosa I_α con la concentración de polímeros solubles en el medio de cultivo……..... 21
Figura 3.1. a). Tipos de Membranas. b). Estructura de cada uno de los tipos de membranas……. 27
Figura 3.2. Esquema del transporte a través de una membrana densa de acuerdo con el modelo de solución difusión…….. 32
Figura 3.3. Permeabilidad de gases en membranas de celulosa bacteriana.....…….. 42
Figura 3.4. Permeabilidad de solventes puros y mezclas binarias (60/40 v/v org/agua) en membranas de celulosa bacteriana…… 43
Figura 4.1. Esquema del sistema de permeación empleado en las pruebas de permeabilidad hidráulica…….. 52
Figura 4.2. Sistema empleado en las pruebas de diálisis……... 54
Figura 4.3. Esquema del sistema empleado en las pruebas de permeación de gases…. 55
Figura 4.4. Esquema del sistema empleado en las pruebas de pervaporación……. 56
Figura 5.1. Celulosa producida por cultivo estático…….. 58
Figura 5.2. Producción de celulosa a 25°C y 30°C a partir de tres fuentes de carbono: Glucosa, Sacarosa y Glicerol…… 59
Figura 5.3. Variación sustrato y ácidos a 25°C y 30°C empleando glucosa como fuente de carbono …… 59
Figura 5.4. Variación sustrato y ácidos a 25°C (izquierda) y 30°C (derecha) empleando sacarosa como fuente de carbono …….. 60
Figura 5.5. Variación sustrato y ácidos a 25°C y 30°C empleando glicerol como fuente de carbono ……..……. 60
Figura 5.6. Rendimiento $Y_{P/S}$ en función del tiempo para las tres fuentes de carbono a 25°C y 30°C…… 62
Figura 5.7. Espesor de las membranas obtenidas en función del tiempo para las tres fuentes de carbono a 25°C y 30°C……. 63
Figura 5.8. Celulosa húmeda extraída del medio de cultivo…….. 63
Figura 5.9. Celulosa húmeda después del tratamiento de purificación……. 63
Figura 5.10. Membranas de celulosa después del secado……. 64
Figura 5.11. Densidad aparente de las membranas obtenidas a partir de glucosa…… 65
Figura 5.12. Densidad aparente de las membranas obtenidas a partir de sacarosa…… 65

Figura 5.13 Densidad aparente de las membranas obtenidas a partir de glicerol…..… 66
Figura 5.14. Imágenes de membranas de celulosa bacteriana. a) Membrana tratada sin agente químico. b) Membrana tratada con NaOH……..... 67
Figura 5.15. Imágenes de membranas de celulosa bacteriana. a) Vista de la superficie y de algunas capas interiores. b) Vista de la sección transversal…… 67
Figura 5.16. Imágenes de las superficies superior e inferior de membranas de celulosa bacteriana…… 68
Figura 5.17. Imágenes de la sección transversal de membranas de celulosa bacteriana 69
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……..... 70
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…… 71
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 ……. 71
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…….. 72
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 ……..…….. 72
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 …..……..... 77
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…….. 78
Figura 5.25. Espectro Infrarrojo para las membranas obtenidas a partir de glucosa a 25°C sometidas a diferentes tratamientos de purificación…….. 81
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…… 82
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…… 82
Figura 5.28. Análisis Termogravimétrico para las membranas obtenidas a partir de glucosa a 25°C y 30°C sometidas a diferentes tratamientos de purificación……... 84
Figura 5.29. Análisis termogravimétrico (TG y su derivada (DTG) para la membrana obtenida a partir de glucosa a 25°C y tratadacon NaOH 1N 10 minutos a 60°C…… 84
Figura 5.30. Termogramas DSC para las membranas obtenidas a partir de glucosa a 25°C sometidas a diferentes tratamientos de purificación…….. 86
Figura 5.31. Grado de Hinchamiento para membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de diferentes sustratos a 25°C…… 88
Figura 5.32. Grado de Hinchamiento para membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de diferentes sustratos a 30°C…… 88
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…… 89
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 ……..…….. 90

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…….. 90
Figura 5.36. Masa de agua vs tiempo para una membrana de celulosa bacteriana obtenida a partir de glicerol…….. 91
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……. 92
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……..... 93
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…….. 93
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…… 94
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……..... 94
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……..... 95
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…….. 95
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……... 96
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…… 96
Figura 5.46. *Flux* de permeado de diferentes solutos para la membrana de mayor permeabilidad hidráulica…… 98
Figura 5.47. *Flux* de permeado de diferentes solutos para la membrana de menor permeabilidad hidráulica…… 99
Figura 5.48. Retención para la membrana de mayor permeabilidad hidráulica…… 99
Figura 5.49. Retención para la membrana de menor permeabilidad hidráulica…… 100
Figura 5.50. Composición de Na_2SO_4 en el alimento y permeado para las membranas... 101
Figura 5.51. Composición de úrea en el alimento y permeado para las membranas..... 102
Figura 5.52. Permeación de gases para membranas obtenidas a partir de glucosa, sacarosa y glicerol a 30°C…… 103
Figura 5.53. Flux de permeado en la prueba de pervaporación……... 106
Figura 5.54. Composiciones en el alimento y el permeado en pruebas de pervaporación para membranas obtenidas a partir de glucosa…….. 107
Figura 5.55. Composiciones en el alimento y el permeado en pruebas de pervaporación para membranas obtenidas a partir de sacarosa…….. 107
Figura 5.56. Composiciones en el alimento y el permeado en pruebas de pervaporación para membranas obtenidas a partir de glicerol…….. 108

Lista de Tablas

Tabla 2.1. Comparación de diferentes características de las celulosas bacteriana y vegetal…… 8
Tabla 2.2. Producción de celulosa para cinco cepas de microorganismos usando tres fuentes de carbono…… 15
Tabla 2.3. Efecto de la adición de polímeros solubles sobre la producción de celulosa en cultivo agitado…… 17
Tabla 2.4. Efecto de las Adición de co-sustratos al Medio de Cultivo sobre la Producción de CB en Cultivo Agitado…….. 18
Tabla 3.1. Principales procesos de separación que utilizan membranas…… 28
Tabla 3.2. Resumen de condiciones de purificación de celulosa bacteriana reportadas en la literatura…… 40
Tabla 3.3. Transporte de Oxígeno a través de membranas de celulosa bacteriana tratadas con agentes de purificación……... 41
Tabla 3.4. Características de Pervaporación en Membranas de Celulosa Bacteriana para varias mezclas de solventes orgánicos con agua (60/40 v/v) a 35°C……... 44
Tabla 3.5. Energía de Activación para pervaporación de mezclas etanol/agua en varias membranas…… 44
Tabla 4.1. Condiciones de Purificación de la Celulosa Bacteriana…….. 49
Tabla 4.2. Métodos empleados para la determinación de las concentraciones del permeado en el test de retención de solutos…… 53
Tabla 5.1. Cristalinidad de membranas de celulosa bacteriana…….. 73
Tabla 5.2. Distancia entre interplanar y relación de celulosa I_α/I_β para membranas de celulosa bacteriana…… 75
Tabla 5.3. Tamaño de cristal para membranas de celulosa bacteriana…… 76
Tabla 5.4. Radio medio de poro y área superficial de membranas de celulosa bacteriana…….. 79
Tabla 5.5. Enlaces asociados a la estructura de Celulosa……... 80
Tabla 5.6. Resultados del análisis termogravimétrico de membranas de celulosa bacteriana…….. 85
Tabla 5.7. Resultados del análisis calorimétrico de membranas de celulosa bacteriana…….. 87
Tabla 5.8. *Flux* de permeado ($moles^{*}cm^{-2*}s^{-1}$) de Na_2SO_4 y Úrea para las membranas empleadas en las pruebas de diálisis…… 102
Tabla 5.9. Selectividad ideal para las membranas obtenidas a partir de las tres fuentes de carbono…… 104
Tabla 5.10. Selectividades para agua $\alpha_{H2O/EtOH}$ para las diferentes membranas…….. 108

1. Introducción

La tecnología de membranas se ha convertido en una parte importante de las técnicas de separación en la industria, debido al uso relativamente bajo de energía (puesto que no involucra cambio de fase de las sustancias a separar), alta selectividad y capacidad de separación de mezclas que no son fácilmente separables por procesos convencionales como las mezclas de isómeros y las azeotrópicas. Las áreas de la ingeniería que se han visto favorecidas con estas aplicaciones son principalmente las industrias de alimentos, papel, medicina, petroquímica, de separación y purificación de gases, y recuperación de sustancias valiosas en aguas o gases de desechos industriales. Los reportes de estas aplicaciones en la literatura aumentan considerablemente así como su implementación en la industria, lo que permite pensar que en un futuro próximo será una tecnología de uso corriente en todos los países debido a la creciente demanda de mejores soluciones ambientales y tecnologías más limpias en los procesos de producción.

La mayor parte de las membranas poliméricas que existen en el mercado son obtenidas a partir de compuestos de origen sintético y de celulosa vegetal (Figura 1.1); sin embargo, últimamente se han desarrollado algunas membranas a partir de otros polímeros naturales y combinaciones de naturales y sintéticos, que se han probado en procesos de separación como ultrafiltración, permeación de gases y pervaporación.

A medida que se desarrollan nuevos materiales para la producción de membranas, se hace necesario caracterizarlos y evaluar el efecto que tiene el método de síntesis sobre las propiedades estructurales y de transporte, que van a tener un efecto directo sobre el desempeño en un proceso específico de separación.

En el departamento de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia se han realizado algunos trabajos del empleo de membranas obtenidas a partir de polímeros sintéticos en procesos de pervaporación (Lucena y colaboradores, 1999; Plaza y colaboradores, 2000; Angulo y colaboradores, 2003; Gómez y colaboradores, 2003; Moncada y Boyacá, 2004; Rincón y colaboradores, 2004). Otros trabajos se han orientado a la obtención de monómeros como el ácido itacónico (Duarte y colaboradores, 1995) y biopolímeros como los polihidroxialcanoatos (Barbosa y Moreno, 2002), polímeros solubles a partir del hongo del té (Guevara, 1994; Avila y Caicedo, 2007) y celulosa bacteriana (Caicedo y colaboradores, 2002).

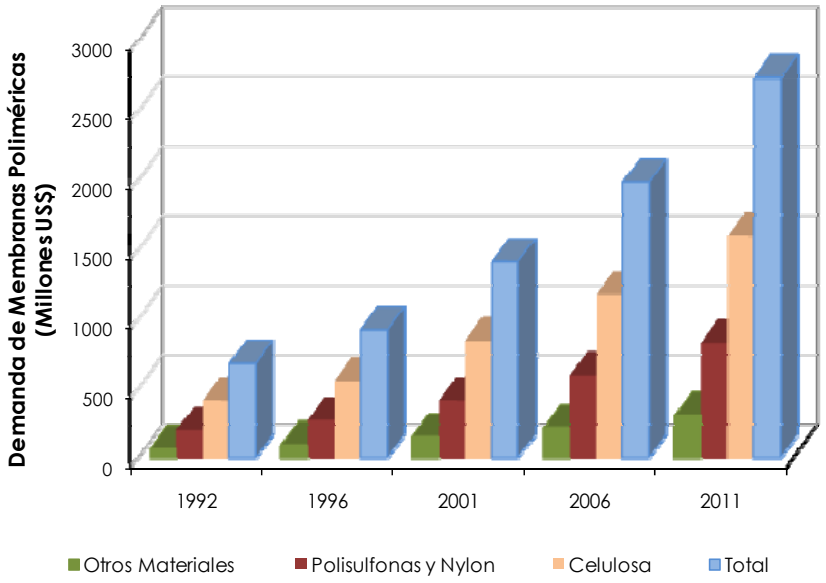

Figura 1.1. Mercado de membranas en los últimos años para Estados Unidos
[Atkinson, 2002; Fredonia, 2006]

Para el presente trabajo se planteó la posibilidad de aprovechar el conocimiento generado a través de todos estos trabajos para producir membranas a partir de un biopolímero y caracterizarlas con el fin de evaluar sus propiedades estructurales y su desempeño en diversos procesos de separación. Se eligió como biopolímero celulosa de origen bacteriano debido a su pureza, conformación estructural, carácter hidrofílico y facilidad de obtención, y el escaso conocimiento existente sobre su estructura.

La literatura acerca de la celulosa bacteriana es extensa y ha aumentado con el paso de los años, el interés por este biopolímero ha crecido bastante, especialmente en los últimos cinco años. Se han estudiado diversas áreas tales como la biosíntesis, la estructura, la producción por cultivo estático y agitado, y las aplicaciones, que abordan una gran proporción de las publicaciones (figura 1.2).

La mayor parte de las aplicaciones encontradas en la literatura se encuentran en el área de la salud. Son escasos los trabajos dedicados al uso de celulosa bacteriana como agente de separación, así que es ésta un área atractiva para explorar.

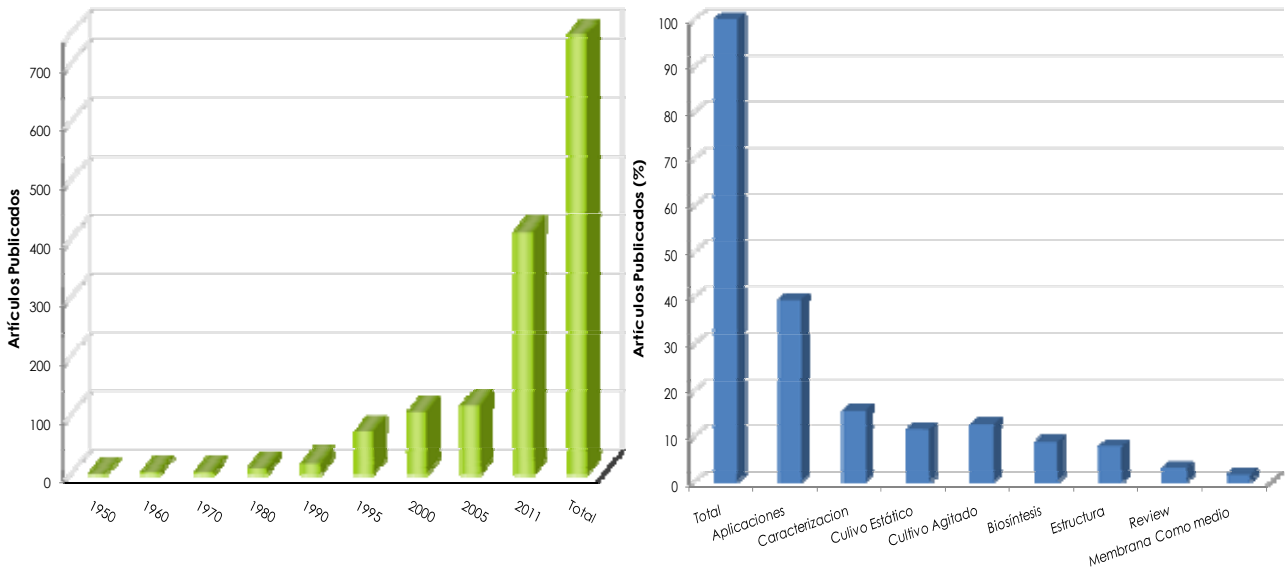

Figura 1.2. Revisión Tecnológica: Izquierda: Publicaciones sobre celulosa bacteriana con el tiempo. Derecha: Temas tratados en las publicaciones sobre celulosa bacteriana

En este contexto se estableció como hipótesis de trabajo que las variables de cultivo (temperatura, fuente de carbono,) y purificación (agente purificante, concentración y tiempo de exposición) de las membranas de celulosa bacteriana producidas por un aislamiento nativo de *Acetobacter xylinum* obtenido y caracterizado en nuestro laboratorio, afectan las características fisicoquímicas y su consecuente desempeño en un proceso de separación.

Se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

Evaluar el efecto de la temperatura y fuente de carbono como variables de cultivo, y el agente purificante, concentración y tiempo de exposición como variables de tratamiento, en las propiedades fisicoquímicas y de transporte de membranas de celulosa bacteriana producidas por fermentación estática utilizando un aislado nativo de *Acetobacter xylinum*.

Objetivos Específicos

- Obtener las membranas de celulosa bacteriana por fermentación estática utilizando un aislado nativo de *Acetobacter xylinum*, variando las siguientes condiciones de cultivo: temperatura (25°C y 30°C) y fuente de carbono (glucosa, sacarosa y glicerol).
- Evaluar el efecto del agente purificante, temperatura del proceso de purificación y tiempo de exposición al agente, en la estructura de la membrana.
- Caracterizar fisicoquímica y estructuralmente las membranas obtenidas.
- Evaluar las propiedades de transporte de las membranas obtenidas.

Aporte Esperado con el Presente Trabajo

Con este trabajo se pretende encontrar las características de transporte de las membranas a partir de sus condiciones de obtención, y por consiguiente, determinar su aplicación en un proceso específico de separación.

Se espera que los resultados de este estudio sean el punto de partida para la síntesis de membranas de celulosa pura y sus derivados, con aplicaciones en procesos de separación específicos de acuerdo a sus propiedades. De esta manera se amplía y fortalece la línea de investigación en membranas del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Nacional, que posee un campo de acción con atractivas posibilidades comerciales y de generación de ingresos y de empleo en el país, generando productos de alto valor agregado y gestión tecnológica.

El documento está estructurado en 6 capítulos: El capítulo 2 presenta una revisión bibliográfica acerca de la celulosa bacteriana, sus propiedades y métodos de obtención; en el capítulo 3 se encuentra el marco teórico acerca de las membranas y los modelos de transporte a través de éstas. La metodología que permitió el desarrollo del trabajo se encuentra detallada en el capítulo 4. En el capítulo 5 aparecen los resultados obtenidos y su discusión. Finalmente en el capítulo 6 se encuentran las conclusiones y recomendaciones.

2. Celulosa Bacteriana: Generalidades, Técnicas de Cultivo y Condiciones de Fermentación

La celulosa es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza. Tiene gran variedad de aplicaciones como en la fabricación de papel y textiles y explosivos, la industria alimenticia, y la obtención de azúcares fermentables, además de otras específicas en el campo de la medicina y de la biotecnología asi como la fabricación de membranas utilizadas como agentes se separación. La mayor parte de la celulosa usada en la industria es de origen vegetal; sin embargo, en los últimos años la celulosa de origen bacteriano ha ganado importancia debido a sus propiedades mecánicas, pureza y alto grado de cristalinidad que la vuelven atractiva para aplicaciones específicas. En el presente capítulo se hace una revisión acerca de la celulosa bacteriana: generalidades, obtención, técnicas de fermentación y aplicaciones, asi como los retos y soluciones que hasta el momento se han reportado para hacer de este polímero un producto de uso común en un futuro cercano.

2.1 Introducción

La celulosa es la molécula biológica más abundante, y constituye el mayor porcentaje de los biopolímeros en la tierra, siendo inclusive mayor que todos los demás juntos (Jonas y Farah, 1998; Vandamme y colaboradores, 1998; Mathews y colaboradores, 2006). Su estructura, lineal, está formada por 2000 a 14000 unidades de β-(1,4) glucosa en cadenas no ramificadas que interactúan entre sí con enlaces tipo puentes de hidrógeno (figura 2.1). Es un biopolímero insoluble en agua, posee regiones con un alto ordenamiento (cristalinas), y regiones donde el grado de ordenamiento es bajo. Presenta varias formas cristalinas, dando lugar al polimorfismo de la celulosa.

Se conocen seis diferentes estructuras (I, II, III_I, III_{II}, IV_I y IV_{II}) que pueden ser convertidas unas en otras como lo muestra la figura 2.2 (O´Sullivan, 1997; Akerholm, 2003; Akerholm y colaboradores, 2004).

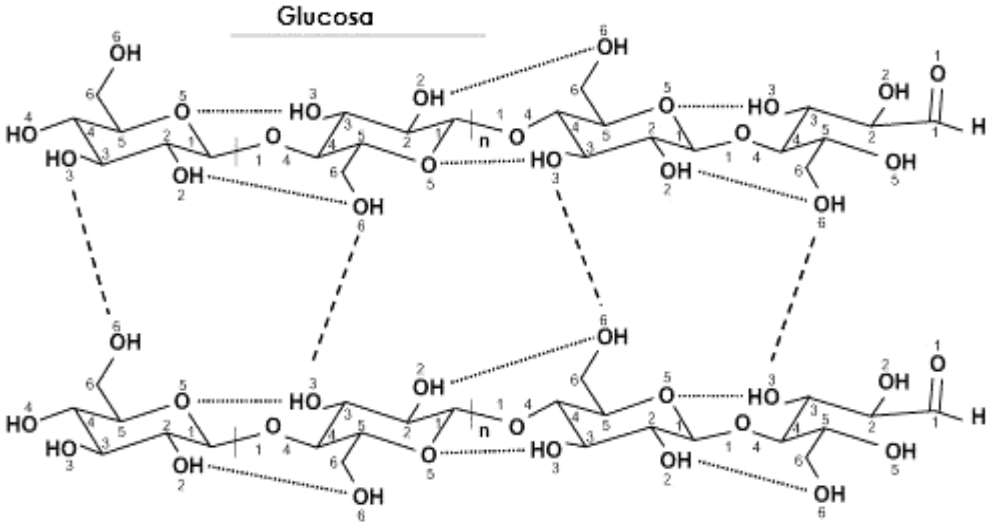

Figura 2.1. Estructura de la celulosa. [Festucci-Buselli y colaboradores, 2007]

La estructura de la celulosa I, llamada también celulosa nativa, es la que se encuentra en mayor proporción en la naturaleza, y coexiste como la mezcla de dos formas cristalinas, I_α y I_β. Estas dos estructuras difieren en el modo de unión de las cadenas por los enlaces de puentes de hidrógeno, como se aprecia en la figura 2.3. La celulosa I_α no es la estructura más estable y puede convertirse por medio de calor en celulosa I_β que es más estable.

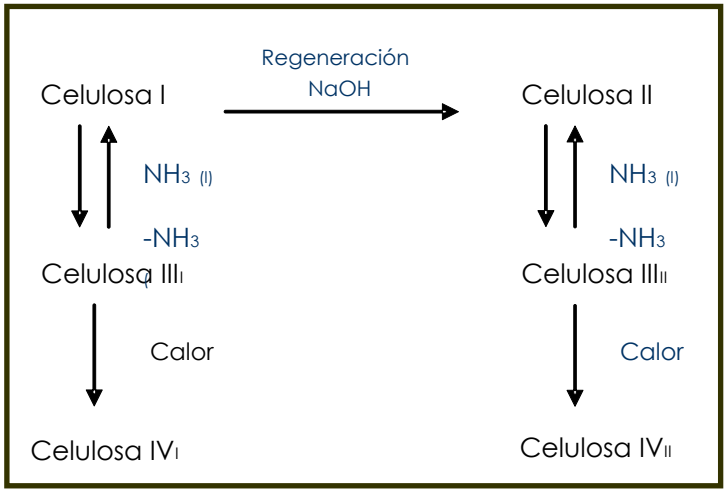

Figura 2.2 Interconversión de los polimorfos de la celulosa. [O´Sullivan, 1997]

La celulosa producida por organismos primitivos tiene un mayor componente de la estructura I_α, mientras que en la celulosa de origen vegetal predomina la estructura I_β O´Sullivan, 1997. Estas dos formas alotrópicas coexisten en una misma fibrila en diferentes proporciones dependiendo de su origen.

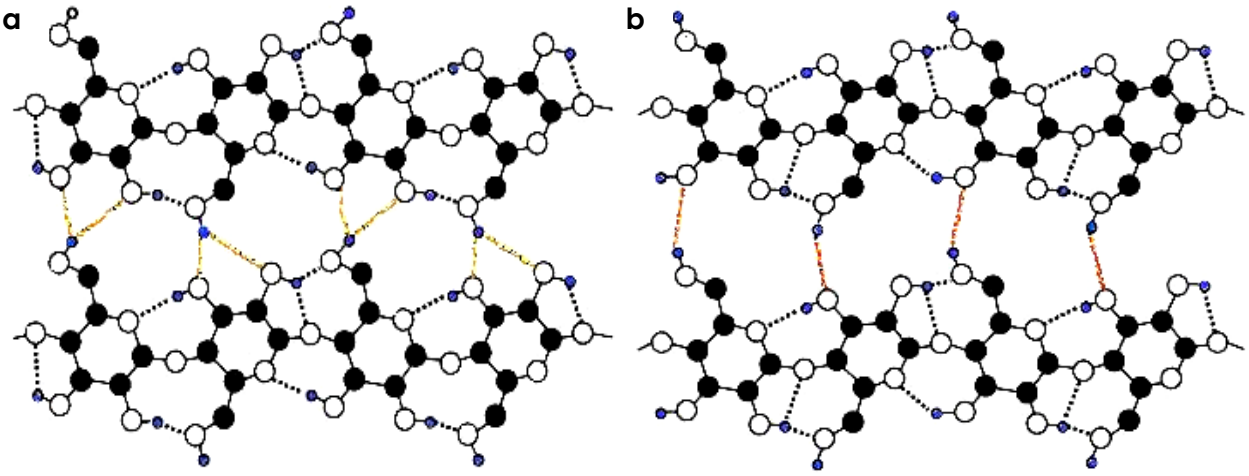

Figura 2.3 Enlaces en los puentes de hidrógeno para la estructura de celulosa I_α (a) y I_β (b). •Átomos de Carbono. ○Átomos de Oxígeno. • Átomos de Hidrógeno. La línea punteada amarilla representa la unión de puente de hidrógeno entre cadenas. [Festucci-Buselli y colaboradores, 2007]

2.2 Celulosa de Origen Bacteriano a Partir de Bacterias del Género *Acetobacter*

La celulosa bacteriana (CB) es un polímero extracelular sintetizado por bacterias principalmente del género *Acetobacter*. Aunque su formación fue reportada por primera vez en 1886 por J. Brown, sólo ha sido objeto de atención a partir de la segunda mitad del siglo XX debido a su alto grado de cristalinidad y conformación reticulada, que la hace atractiva en diversas aplicaciones, especialmente en el área de la salud (Jonas y Farah, 1998; Bielecki y colaboradores, 2002).

La celulosa es sintetizada por bacterias pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina* (Dudman, 1959; Jonas y Farah, 1998). Los productores más eficientes son las bacterias Gram-Negativas del género *Acetobacter*, *Acetobacter xylinum* (reclasificadas como *Gluconoacetobacter xylinus*), las cuales se usan como microorganismos modelo en los estudios básicos y aplicados sobre celulosa bacteriana. Muchas investigaciones se han enfocado en el mecanismo de síntesis del biopolímero, así como en su estructura y en las propiedades que determinan su uso práctico (Hirai y colaboradores, 1987; Czaja y colaboradores, 2006).

2.2.1 Características de la Celulosa Bacteriana

Algunas investigaciones sobre celulosa bacteriana muestran que la composición química es idéntica a la de la celulosa de las plantas, aunque presenta diferencias significativas respecto a su conformación estructural y propiedades físicas (Jung y colaboradores, 2005; Keshk, 2006a).

Como se planteó, una de las características más importantes de la celulosa bacteriana es su pureza, que la distingue de la celulosa vegetal, usualmente asociada a hemicelulosa y lignina (Bielecki y colaboradores, 2002).

Otra característica importante de la CB es su alto grado de cristalinidad (mayor a 60%); estos cristales están compuestos de celulosa tipo I_α y I_β; la relación entre las dos formas cristalinas depende del microorganismo y de las condiciones de cultivo (fuente de carbono, suplementos, temperatura) (Jonas y Farah, 1998).

Una vez purificada, la celulosa bacteriana es no tóxica, no alergénica, biocompatible y biodegradable (Duvey y colaboradores, 2002). Otras características son: alto grado de polimerización, alta resistencia mecánica, y temperaturas de degradación superiores a las de la celulosa vegetal como puede observarse en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Comparación de diferentes características de las celulosas bacteriana y vegetal.

CARACTERÍSTICA	CELULOSA BACTERIANA	REFERENCIA	CELULOSA VEGETAL	REFERENCIA
Dimensiones de las cadenas	70-80 nm 133 nm 100-117 nm	Yamanaka y col. (1989) Bielecki y col. (2002) Ougiya y col. (1998)	Pino: $3.0\text{-}7.5*10^{-2}$ mm Abedul: $1.4\text{-}4.0*10^{-2}$ mm	Bielecki y col. (2002)
Grado de Polimerización	16000-20000	Bielecki y col. (2002)	13000-14000	Bielecki y col. (2002)
Módulo de Young (MPa)	4.9		Algodón: 0.085	
Densidad Específica	0.99	Yamanaka y col. (1989)	Algodón: 0.19	Yamanaka y col. (1989)
Temperatura de Degradación (ºC)	200-270		Algodón: 150	

2.2.2 Biosíntesis de Celulosa Bacteriana

Las bacterias del género *Acetobacter* producen celulosa a partir de fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, glicerol, manitol o arabitol (Oikawa y colaboradores, 1995b; Matsuoka y colaboradores, 1996; Bielecki y colaboradores, 2002; Ishihara y colaboradores, 2002; Keshk y Sameshima, 2005). La síntesis de celulosa consta de dos etapas principales: la primera es la conversión de la fuente de carbono en uridin difosfato glucosa(UPD- glucosa), que es el sustrato usado para producir la celulosa; la segunda etapa es la formación de la celulosa y su excreción al medio del cultivo (Ross y colaboradores, 1991; Bielecki y colaboradores, 2002; Chawla y colaboradores, 2009).

La primera etapa inicia con el ingreso del sustrato al microorganismo y su conversión a glucosa-6-fosfato por la enzima glucoquinasa; posteriormente, la glucosa-6-fosfato pasa a glucosa-1-fosfato por la acción de la enzima fosfoglucomutasa. En el siguiente paso, la glucosa-1-fosfato es convertida en UDP-glucosa en presencia de la enzima UDPG pirofosforilasa; finalmente, por la acción de la enzima celulosa sintasa, que es la encargada de realizar la polimerización de la glucosa, se forma la celulosa (Ross y colaboradores, 1991; Han y Robyt, 1998). La figura 2.4 presenta un esquema del metabolismo de las bacterias *Acetobacter* para la producción de celulosa.

La segunda etapa es la polimerización de la glucosa seguida de la excreción de la celulosa al medio de cultivo. La membrana celular del microorganismo posee una serie de poros de 3.5 nm alineados diametralmente. En la cara interna de la membrana se encuentra el complejo enzimático celulosa-sintasa rodeando cada uno de los poros (Marx-Firgini y Pion, 1974).

La celulosa es excretada al medio de cultivo como una subfibrila elemental de 1.5 nm de longitud. Al juntar estas subfibrilas se forma una microfibrila y la unión de estas microfibrilas produce las fibras de celulosa (figura 2.5) (Zaar, 1979; Han y Robyt, 1998; Horii y colaboradores, 1999; Saxena y Brown Jr, 2000; Bielecki y colaboradores, 2002).

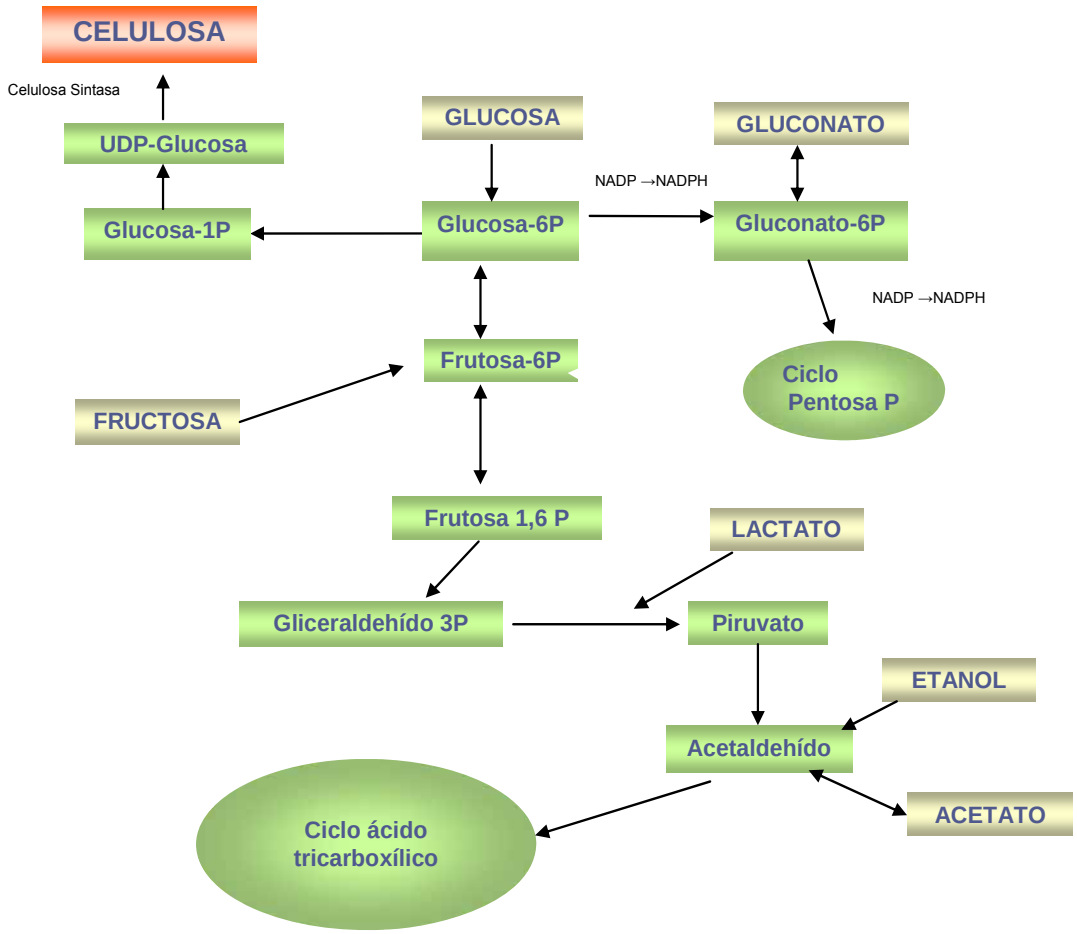

Figura 2.4. Biosíntesis de Celulosa Bacteriana. [Adaptado de Caicedo y colaboradores, 2002]

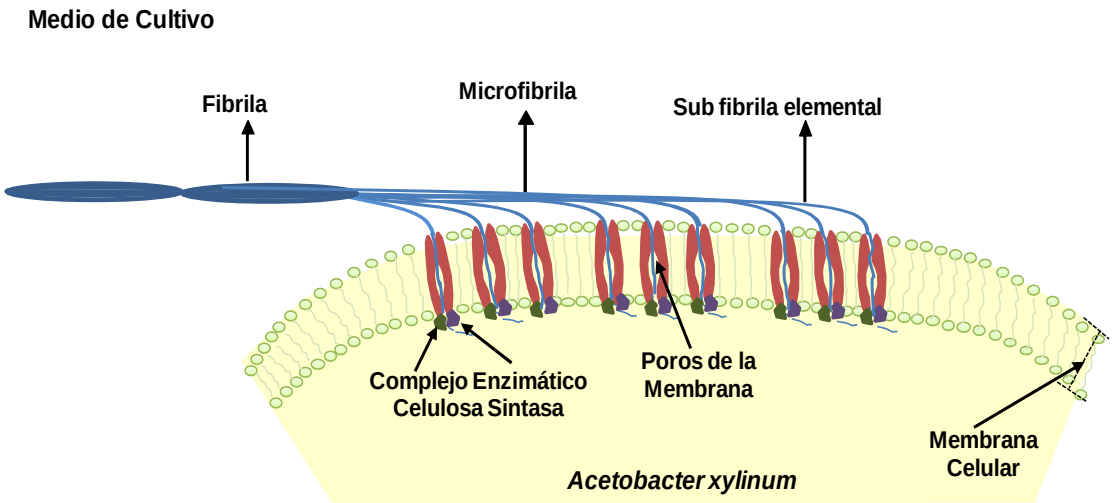

Figura 2.5 Esquema de la formación de la celulosa y su excreción al medio de cultivo a través de la membrana celular del microorganismo *Acetobacter xylinum*.

2.2.3 Función Fisiológica

Todas las bacterias productoras de celulosa conocidas hasta hoy, se distinguen porque el polímero producido se encuentra en forma de agregados extracelulares, atribuidos principalmente a la autoafinidad que presenta el material. En hábitat natural, muchos microorganismos sintetizan polisacáridos extracelulares, los cuales envuelven las células, CB es un ejemplo de estos polisacáridos. En el caso de las especies de *Rhizobium* y *Agrobacterium*, el polímero facilita la adhesión celular en interacciones simbióticas e infecciosas (Ross y colaboradores, 1991), mientras que para *A. xylinum* y *Sarcina ventriculi*, la celulosa confiere protección mecánica, química y biológica dentro del hábitat natural.

En ese caso las células productoras son atrapadas en la red del polímero, que mantiene la población en la interfase aire-líquido. La matriz polimérica facilita el suministro de nutrientes a la célula, pues éstos se concentran mejor debido a las propiedades de adsorción con las que cuenta la estructura de celulosa y permite que el microorganismo se encuentre en condiciones más favorables que si el microorganismo se encontrara solamente en el medio acuoso (Ross y colaboradores, 1991; Bielecki y colaboradores, 2002).

En el caso del cultivo de *A. xylinum*, en condiciones estáticas (ausencia de agitación), la celulosa se produce en forma de película en la interfase aire/líquido. Se presume que en este caso, el propósito de la síntesis de la celulosa es proveer una matriz superficial firme, que permita al microorganismo, un aerobio estricto, estar cerca a la fase gaseosa (Ross y colaboradores, 1991).

Otros autores suponen que la celulosa sintetizada juega un importante papel de almacenamiento de alimento que el microorganismo utilizaría en momentos de escasez. La presencia de exo y endoglucanasas, en el caldo de cultivo de algunas fermentaciones con *A. xylinum* confirmarían esta suposición (Okamoto y colaboradores, 1994; Tahara y colaboradores, 1998; Bielecki y colaboradores, 2002).

2.3 Técnicas de Fermentación

Las técnicas utilizadas para producir CB son el cultivo estático y el agitado. Con cada técnica se obtiene celulosa con una morfología diferente. A continuación se presentan algunos trabajos que estudian el efecto de las diferentes técnicas de cultivo en la producción de CB.

2.3.1 Cultivo Estático

En el cultivo estático la celulosa se encuentra en forma de película. Estudios realizados muestran que en un primer estado, el microorganismo incrementa su población gracias al consumo de oxígeno disuelto que se encuentra en el medio de cultivo; durante este tiempo, el microorganismo sintetiza cierta cantidad de celulosa en el medio líquido. Sólo las bacterias que se encuentran en las inmediaciones de la interfase aire/medio de cultivo y tienen disponibilidad de oxígeno, pueden mantener su actividad y producir celulosa, la cual se forma por capas superpuestas; a medida que transcurre el tiempo de fermentación, el espesor de la membrana se incrementa por generación de nuevas capas en la superficie formando una estructura de capas suspendidas en el medio de cultivo (Borzani y De Souza, 1995; Klemm y colaboradores, 2001).

Las bacterias que permanecen en la fase líquida del medio de cultivo se encuentran en un estado de letargo, y pueden ser reactivadas y usadas como inóculo en una fermentación posterior (Klemm y colaboradores, 2001). El inconveniente con las fermentaciones en cultivo estático surge porque requiere tiempos largos y una gran área superficial, lo que no hace práctica su producción a gran escala.

Existen estudios en los que se examinan las variables que afectan el escalado; Caicedo y colaboradores (2001), estudiaron la relación entre la concentración inicial de sustrato para glucosa y la relación área superficial/volumen de medio, encontrando producción óptima de celulosa en una concentración de glucosa de 20-50 g/l y una relación área superficial/volumen de medio de 0.3- 0.8 cm^{-1}, intervalo en el cual la producción de celulosa es la máxima y el espesor no cambia significativamente.

En este método de cultivo se han utilizado como reactores frascos cónicos, frascos Roux y bandejas. En cuanto a la morfología de la membrana, algunas investigaciones muestran la existencia de tres zonas a través de su espesor: la capa superficial, la intermedia y la inferior. La capa inferior presenta una baja densidad de celulosa debido a que la producción de celulosa está asociada al crecimiento celular y los primeros días de cultivo éste es bajo; a medida que aumenta la población celular la densidad de la celulosa producida aumenta y esto se aprecia en la zona media de la membrana; la superficial se caracteriza por ser una estructura compacta y con una intensa población celular. (Klemm y colaboradores, 2001).

Se ha estudiado extensamente la celulosa producida en cultivo estático puesto que las membranas obtenidas tienen uso potencial en diversos campos, especialmente en medicina y en procesos de separación. Algunos de estos estudios se enfocan en el escalado con miras a una mayor producción, mientras que otros se concentran en las propiedades de la estructura como conformación, propiedades térmicas y mecánicas, cristalinidad, etc (Hwang y colaboradores, 1999; Astley y colaboradores, 2003; Baranov y colaboradores, 2003; Caicedo y colaboradores, 2003; Czaja y colaboradores, 2004; Chawla y colaboradores, 2009).

2.3.2 Cultivo Agitado

Al realizar las fermentaciones en cultivo agitado se pueden obtener pellets de celulosa o aglomeraciones amorfas de las fibras, lo cual depende del tipo de reactor empleado. Estos cultivos pueden realizarse por lotes o en continuo; se utilizan reactores de tanque agitado o reactores *airlift*. El cultivo agitado se investiga con miras a escalar el proceso a nivel industrial.

Las bajas productividades reportadas, menores que en cultivos estáticos, hacen que no sea fácil su escalamiento, especialmente por el hecho de que el cultivo agitado favorece el crecimiento de células no productoras de polímero que consumen el sustrato denominadas celulosa(-); esto se atribuye a mutaciones que lesionan la maquinaria enzimática encargada de la polimerización de la glucosa (Schramm y Hestrin, 1954; Yang y colaboradores, 1998).

Se han aislado y caracterizado cepas altamente productoras en cultivo agitado, tales como *Acetobacter xylinum* BCR5 (Yang y colaboradores, 1998), *Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans* BPR2001 y *Acetobacter sp. A9* (Son y colaboradores, 2001).

Otro problema que presenta este método de cultivo es la habilidad de las células de *Acetobacter* para convertir la glucosa en ácidos glucónico y cetoglucónico por lo que implica que se remueve la glucosa del medio pero en detrimento de la producción de celulosa.

2.3.3 Efecto de de la composición del medio sobre la Producción de Celulosa Bacteriana

- **Cultivo Estático**

Schramm y Hestrin (1954), realizaron uno de los primeros trabajos sobre producción de celulosa bacteriana. Concluyeron que la producción de celulosa es función del suministro de oxígeno tanto para cultivo estático como agitado, pues bajo una atmósfera de nitrógeno no hubo producción significativa mientras que la producción óptima se encontró utilizando aire enriquecido.

Posteriormente Hestrin y Schramm (1954), desarrollaron un medio definido, usado como referencia para estudios de celulosa bacteriana, compuesto por: glucosa 2% (p/v), peptona 0.5%, extracto de levadura 0.5%, fosfato disódico 0.27%, ácido cítrico 0.115% y pH 6.0. Este medio es conocido como H-S.

Estudios posteriores se encaminaron a describir la síntesis del biopolímero, así como la ruta oxidativa de la fuente de carbono (Schramm y colaboradores, 1957; Gromet y colaboradores, 1957).

Dudman (1959), presentó un estudio acerca del efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de celulosa y encontró que el uso de glicerol como fuente de carbono aumenta la producción de celulosa en un 40%, comparado con glucosa y fructosa. En el caso de las fuentes de carbono complejas, este mismo autor muestra cómo al utilizar melaza hidrolizada se obtienen producciones hasta 88% superiores a las alcanzadas en medios con glucosa como fuente de carbono.

Embuscado y colaboradores, (1994a), evaluaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de celulosa: la glucosa presentó las menores producciones, mientras la fructosa, fructosa + sacarosa y fructosa + lactosa presentaron las mayores producciones. El comportamiento de la glucosa se explica por el descenso drástico de pH que sufre el medio al usar esta fuente de carbono, mientras que con las otras este descenso es menor.

De las fuentes de nitrógeno estudiadas, se encontró que las mayores producciones de celulosa se presentaron al combinar extracto de levadura y peptona. Embuscado y colaboradores (1994b), a través de un estudio de optimización con dos fuentes de carbono, sacarosa y fructosa, encontraron que las concentraciones que permiten la máxima producción de celulosa son 24.8 y 76.5 g/l respectivamente.

Oikawa y colaboradores (1995a), usaron arabitol como fuente de carbono y obtuvieron celulosa en cantidad seis veces superior al cultivo empleando glucosa. El pH final del medio al usar arabitol fue 5.8 mientras que con glucosa fue 3.4. El descenso del pH se debe a que se presenta mayor producción de ácido cetoglucónico, cuando se usa glucosa, comparada con el arabitol, caso en el cual su producción es muy baja. En otros ensayos estos mismos autores utilizaron manitol como fuente de carbono y obtvieron una producción de celulosa tres veces superior a la alcanzada con glucosa por las razones ya expuestas (Oikawa y colaboradores, 1995b).

Watanabe y Yamanaka (1995), examinaron los efectos de la tensión de oxígeno en la fase gaseosa del medio de cultivo, y encontraron que si se incrementa aumenta la producción de celulosa; sin embargo, cuando el valor de la tensión de oxígeno supera el 15% la producción de celulosa comienza a decrecer. En contraste, al aumentar la tensión de oxígeno crece la cantidad de CO_2 producida, por lo que se concluye que el incremento de la tensión de oxígeno estimula el proceso oxidativo de la ruta metabólica en detrimento de la producción de celulosa.

Budhiono y colaboradores, (1999), utilizaron agua de coco con algunos suplementos para evaluar la producción de celulosa; se concluyó que agregar sacarosa 1% (p/v) es suficiente para obtener la máxima producción de celulosa. En cuanto a la fuente de nitrógeno, el $(NH_4)_2HPO_4$ mostró el mejor comportamiento.

Ramana y colaboradores (2000) evaluaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno y encontraron que usar sacarosa o manitol como fuente de carbono en cultivo estático aumenta la producción con respecto a la glucosa; las fuentes de nitrógeno que reportaron las mejores productividades fueron la peptona y el hidrolizado de caseína, y las de menor producción fueron el sulfato de amonio y la harina de soya. Ishihara y colaboradores (2002), evaluaron la xilosa como fuente de carbono y encontraron que presenta producciones menores que las obtenidas con glucosa.

Keshk y colaboradores (2006a), emplearon melaza de remolacha como fuente de carbono y obtuvieron un aumento en la producción de celulosa de 31% con respecto al uso de glucosa como única fuente de carbono; este aumento se atribuye a la cantidad de micronutrientes adicionales presentes en la melaza, especialmente sulfuros y nitrógeno orgánico, que favorecen el crecimiento del microorganismo. Keshk y Samejima (2006b, 2006c), realizaron un estudio para evaluar la producción de celulosa bacteriana a partir de melaza de caña, con diversas cepas de *Acetobacter xylinum*, adicionando lignosulfonato al medio y encontraron que con o sin lignosulfonato la producción de celulosa es mayor que cuando se emplea glucosa como fuente de carbono. Los resultados se presentan en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Producción de celulosa para cinco cepas de microorganismos usando tres fuentes de carbono. [Adaptado de Keshk y Samejima, 2006]

Cepa de Acetobacter xylinum	(1) Medio HS		(2) Medio con Melaza			(3) Medio con Melaza y Lignosulfonato		
	Celulosa (g/l)	pH Final	Celulosa (g/l)	Incremento (%)	pH Final	Celulosa (g/l)	Incremento (%)	pH Final
ATCC 10245	1.15	2.62	1.86	61.74	4.99	1.48	28.70	4.90
IFO 13772	3.33	2.69	5.79	73.87	3.88	5.99	79.88	3.95
IFO 13773	2.24	2.77	2.82	25.89	3.95	3.21	43.30	4.01
IFO 14815	0.68	2.84	1.37	101.47	4.15	1.24	82.35	4.00
IFO 15237	0.77	2.78	2.34	203.90	4.20	2.25	192.21	4.00

Medio de cultivo: 1: Medio Hestrim- Schramm. 2: Melaza 4%. 3. Melaza 4%, Lignosulfonato 1%. Temperatura de cultivo: 28°C. pH inicial: 6.0. Tiempo: 6 días.

El aumento en la producción usando melaza de caña como fuente de carbono se atribuye a la razón expuesta anteriormente por Oikawa y colaboradores (1995a), y es que el uso de glucosa como única fuente de carbono promueve la producción por parte del microorganismo de ácido (ceto) glucónico, lo que no beneficia la producción de celulosa, puesto que este ácido no sólo disminuye la cantidad de glucosa disponible para su polimerización, sino que conduce a niveles de pH que afectan la viabilidad celular.

Surma-Ślusarska y colaboradores (2008), emplearon diversas fuentes de carbono para producir celulosa: glucosa, arabinosa, manosa, galactosa, xilosa y manitol; las fuentes de carbono que presentaron las mayores producciones fueron la glucosa y el manitol.

Kurosumi y colaboradores (2009), utilizaron jugo de diversas frutas como fuente de carbono para la producción de celulosa y encontraron que al suplementar los jugos con las fuentes de nitrógeno en las cantidades propias del medio H-S, la producción de celulosa aumenta desde 200% para el jugo de naranja, hasta 1800% para el jugo de manzana.

Mikkelsen y colaboradores (2009), encontraron que la sacarosa y el glicerol presentan producciones similares y más altas que las obtenidas con manitol, glucosa y fructosa, con respecto a las cuales el aumento en la producción es 12, 19 y 26% respectivamente.

En relación con la temperatura, la que permite la máxima producción de celulosa tanto para glucosa como para sacarosa como fuentes de carbono es 30°C. A 25°C y 35°C las producciones son similares y menores que a 30°C, mientras a 40°C no existe crecimiento del microorganismo y, consecuentemente, no se presenta producción de celulosa (Oikawa y colaboradores, 1995a; Carreño y Caicedo, 2005).

- **Cultivo Agitado**

Matsuoka y colaboradores (1996), con el propósito de producir celulosa en cultivo agitado desarrollaron un medio sintético para producción de celulosa en cultivo agitado, compuesto por: fructosa 4% (p/v), fosfato ácido de potasio 0.1%, sulfato de magnesio 0.025%, solución de sales mixtas 1% y de solución de vitaminas 1%. Este medio se utilizó como referencia y se comparó con éste mismo suplementado con lactato y metionina, y con un medio complejo que contiene licor de maíz, encontrando que el medio sintético alcanza producciones de celulosa 10% inferiores a las alcanzadas con el licor de maíz. El lactato al ser consumido por el microorganismo e ir hacia el ciclo del ácido tricarboxílico en la ruta metabólica, permite que la fructosa sea empleada para producción de celulosa. La metionina por su parte, estimula el crecimiento celular en las primeras etapas de cultivo, disminuyendo la fase *lag* y por tanto aumentando la velocidad de producción de celulosa.

Son y colaboradores (2001), encontraron que de las fuentes de carbono simples, la que presenta mejor producción de celulosa es la glucosa. Para medios complejos Bae y Shoda (2005b), encontraron a través de un trabajo de optimización en un medio con licor de maíz suplementado con fructosa, que al incrementar la viscosidad del medio con pequeñas cantidades de agar, la producción de celulosa en cultivo agitado aumenta.

Bae y Shoda (2005a), emplearon melaza como fuente de carbono previamente tratada con H_2SO_4 y encontraron que la producción de celulosa incrementa 76% respecto a la melaza sin tratar. Jung y colaboradores (2010), estudiaron diversas fuentes de carbono

simples y la que mejor rendimiento presentó fue el glicerol en una concentración de 30g/l. Los autores estudiaron también el efecto de varios co-sustratos sobre la producción y obtuvieron los mejores rendimientos con el empleo de ácido succínico.

También se ha estudiado el efecto de la adición de polisacáridos solubles al medio de cultivo sobre la producción de celulosa; se cree que disminuyen los esfuerzos cortantes dentro del reactor, y de esta forma reducen el riesgo de mutación de las células productoras a no productoras de celulosa. La tabla 2.3 presenta algunos de los polímeros usados en la fermentación y su efecto sobre la producción del biopolímero.

Con el fin de incrementar la producción de celulosa se estudió el efecto de la adición de algunos co-sustratos como CO_2, etanol y ácidos orgánicos. Naritomi y colaboradores (1998c), estudiaron el efecto del CO_2 y encontraron que éste inhibe el crecimiento del microorganismo y por ello disminuye la producción de celulosa. Por el contrario, la adición de lactato y etanol al medio de cultivo incrementa la producción de celulosa (Naritomi y colaboradores, 1998b; Naritomi y colaboradores, 1998a).

Tabla 2.3. Efecto de la adición de polímeros solubles sobre la producción de celulosa en cultivo agitado.

Polímero Empleado	Concentración de polímero (% p/v)	Incremento de Celulosa respecto al medio sin el polímero (%)	REFERENCIA
Alginato de Sodio	0,04	58	Zhou y col.(2007)
Copolímero poliacrilamida-ácido acrílico	0,3	140	Joseph y col. (2003) Joseph y col. (2003)
Acetan	0,15	54	Ishida y col. (2002)
Agar	0,15	56	Ishida y col. (2002) Ishida y col. (2002) Bae y col. (2004)
Agar	0.05	25	Chao y col. (2001)
Agar	0.1	33	
Goma Xantana	0.06	17	

Son y colaboradores (2001), evaluaron el efecto de la adición de varios co-sustratos, entre ellos algunos ácidos orgánicos. En todos los casos hubo un incremento en la celulosa obtenida con respecto al medio sin co-sustrato (tabla 2.4). El aumento en la producción de celulosa puede atribuirse a que la presencia de co-sustratos facilita la disponibilidad de la glucosa para producir celulosa por parte del microorganismo mientras el cosustrato se utiliza en el crecimiento y producción de energía, pues la mayor parte de estos compuestos se encuentran cerca del ciclo del ácido tricarboxílico en la ruta metabólica del microorganismo.

Respecto al tipo de reactor utilizado, Kouda y colaboradores (1996), estudiaron el efecto de la configuración del agitador dentro del fermentador de tanque agitado sobre la producción, utilizando diferentes agitadores como el de turbina, el de tornillo, el agitador tipo hélice, y el agitador maxblend® y encontraron que este último presenta el mejor desempeño, puesto que en un medio no newtoniano con una viscosidad que aumenta a medida que se produce la celulosa, este tipo de agitador facilita el transporte de oxígeno y nutrientes al microorganismo y disminuye las zonas muertas dentro del reactor. El principal inconveniente con los reactores de tanque agitado es la gran cantidad de energía que se necesita para mantener un buen mezclado, incrementando los costos de producción (Kouda y colaboradores, 1997a; Kouda y colaboradores, 1997b).

Tabla 2.4. Efecto de las Adición de co-sustratos al Medio de Cultivo sobre la Producción de CB en Cultivo Agitado. [Son y colaboradores, 2001]

Compuesto (2% p/v ó v/v)	Incremento en la producción de celulosa (%)
Etanol	36.5
Ácido Acético	10.3
Ácido Fumárico	17.9
Ácido Láctico	16.1
Ácido Málico	12.0
Ácido Pirúvico	28.7
Ácido Succínico	22.4

Medio Control: H-S
Medio de Cultivo: H-S con adición del cosustrato.
Microorganismo: *Acetbacter sp. A9*
T: 30°C

Chao y colaboradores (2001), presentaron una alternativa para enfrentar este problema utilizando reactores de columna de burbujeo, aunque la producción de celulosa decrece con respecto al tanque agitado; sin embargo, al emplear aire enriquecido la producción puede llegar a ser equivalente.

Cheng y colaboradores (2002), emplearon un reactor de columna de burbujeo y encontraron que este consume cerca de la sexta parte de la energía empleada en el reactor de tanque agitado, lo cual es una ventaja significativa al realizar el escalado del proceso. Al modificar el sistema de aireación de un reactor *airlift*, lograron que la producción de celulosa fuera tres veces superior a la obtenida por un reactor *airlift* no modificado, sin necesidad de emplear aire enriquecido.

Otro tipo de reactor empleado es el rotatorio; en un estudio realizado por Caicedo y colaboradores (2002), con un reactor de tambor rotatorio se mostró que éste no reduce significativamente la capacidad de producción del microorganismo comparado con el cultivo estático. Sin embargo, presentó problemas para un mezclado eficiente, debido a la

presencia de zonas muertas dentro del sistema. Una variante de este reactor es el empleado por Serafica y colaboradores (2002), que presenta discos de material polimérico en el eje rotatorio sobre los cuales se forma la celulosa; al emplear este tipo de reactor se obtuvo celulosa con una capacidad de retención de agua 2 veces superior a la obtenida por cultivo estático, además de reducir el tiempo de fermentación a la cuarta parte en relación con esta misma técnica de cultivo. Los reactores de película son aquellos donde se permite que el microorganismo forme una película biológica para que se adhiera. Esta es una manera de aumentar la densidad celular y por ende la producción de celulosa bacteriana. Cheng y colaboradores (2009b), emplearon un reactor de película y evaluaron el efecto del material de soporte sobre la producción de celulosa. Se evaluaron 13 diferentes soportes a partir de polipropileno y algunos aditivos y se encontró que el que presentó la mejor producción de celulosa fue el elaborado a partir de compuestos de soya; el aumento en la producción fue 2.5 veces mayor que la obtenida con el reactor sin los soportes.

2.3.4 Efecto de las condiciones de cultivo sobre las propiedades de la Celulosa Bacteriana

Las diferencias en la morfología de la celulosa obtenida por las diferentes técnicas de cultivo ocasionan variaciones en algunas de sus propiedades fisicoquímicas. Estas diferencias están asociadas a la temperatura de cultivo y a la presencia de polímeros solubles en el medio, entre otras. A continuación se resumen algunos trabajos que evalúan el efecto de las condiciones de cultivo sobre las propiedades de la celulosa obtenida.

- **Temperatura**

Se ha encontrado que el aumento de la temperatura de cultivo disminuye la fracción I_α de la celulosa, como puede observarse en la figura 2.6. Temperaturas de 10°C presentan la máxima fracción de celulosa I_α; sin embargo, a esta temperatura el crecimiento del microorganismo es limitado, así como la producción, que encuentra su máximo a temperaturas cercanas a los 30°C.

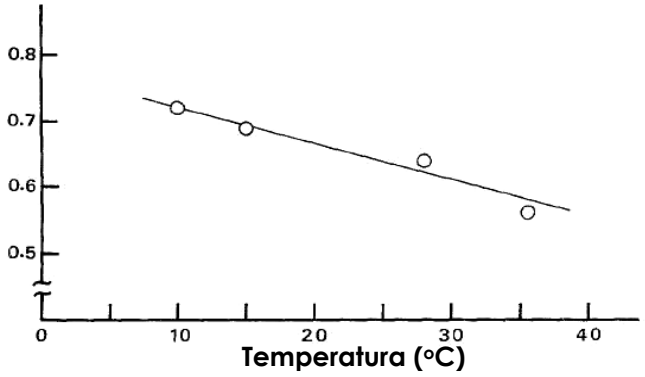

Figura 2.6. Fracción másica de celulosa $I\alpha$ en cristales de celulosa bacteriana vs temperatura de cultivo. [Adaptado de Horii, 1994]

De acuerdo con Yamamoto y Horii (1994), aún no se ha establecido la causa del incremento de celulosa I_α a bajas temperaturas. En sus trabajos Hirai y colaboradores (1997 y 2002), reportan que, a una temperatura de cultivo de 4°C y 86% de la población celular permite la producción de celulosa en forma de banda, mientras que el 14% restante la produce en forma de cordón. Este comportamiento se presenta cuando el microorganismo sufre fuertes restricciones tales como temperaturas bajas, medios muy viscosos o sólidos, que conducen a una baja movilidad celular, y ésta facilita la formación de celulosa tipo II.

- **Presión**

Hult y colaboradores (2003), hallaron que el incremento en la presión de cultivo de 1 a 30 atm disminuye el espesor de la película, y se presentan algunos cambios con respecto a la estructura de la celulosa: la cristalinidad aumenta de 80 a 85% y el ancho promedio de la microfibrila se incrementa de 36 a 80 nm. Si bien la presión induce cambios muy pequeños en la cristalinidad, el ancho de la microfibrila presenta variaciones más apreciables, debido, según los autores, a que una mayor presión contribuye a acortar las distancias entre microfibrilas, promoviendo su asociación en microfibrilas más grandes. También se observó que la presión máxima para que exista crecimiento celular y producción de celulosa es 30 atm (pues se hicieron ensayos hasta 50 atm); aunque una presión de 30 atm es muy alta y puede pensarse que no es posible el crecimiento celular, no se presentaron mayores cambios morfológicos en las células; sin embargo, se necesita un tiempo de cultivo 10 veces mayor para obtener una película de celulosa del mismo espesor que la obtenida a presión atmosférica.

- **Adición de polímeros solubles al medio de cultivo**

Entre las diferentes técnicas para modificar la estructura de la celulosa obtenida por fermentación, la adición de polímeros solubles ha sido una de las más estudiadas. Un trabajo pionero fue el de Ben-Hayyim y Ohad (1965), quienes al adicionar carboximetilcelulosa (CMC) al medio encontraron que se producía una orientación de las fibrillas formadas en la etapa inicial de la fermentación. Posteriormente Yamamoto y Horii (1994), hallaron que la adición de polímeros solubles como la CMC con varios grados de polimerización afecta notablemente la fracción de celulosa I_α, así como la concentración del polímero en el medio de cultivo, (figura 2.7). El índice de cristalinidad permanece casi constante pero la fracción I_α decrece, lo que indica que en presencia de polímeros solubles se induce la formación de celulosa I_β; también observaron que a concentraciones bajas de polímero se produce una reducción en el tamaño de la microfibrila (Hirai y colaboradores, 1998). Los mismos autores concluyen que la adición de xiloglucano (XG) al medio da lugar a comportamientos comparables a los de la CMC. Una explicación de este fenómeno es que la presencia de aditivos interfiere con la agregación de las microfibrilas en el ensamble de los cordones, probablemente porque se adhieren a la superficie de las subunidades fibrilares que son extruidas al medio de cultivo después de su biosíntesis (Yamamoto y colaboradores, 1996).

En lo referente a la reducción del tamaño del cristal, comentan que se debe a la menor fracción de celulosa I_α, lo que lleva a concluir que ésta cristaliza en microfibrilas anchas, mientras que la I_β lo hace preferiblemente en microfibrilas de menor tamaño (Yamamoto y colaboradores, 1996). Cheng y colaboradores (2009a), evaluaron diferentes aditivos para la producción de celulosa y encontraron que con la CMC el incremento de la concentración en el medio disminuye la cristalinidad de la celulosa y el tamaño del cristal.

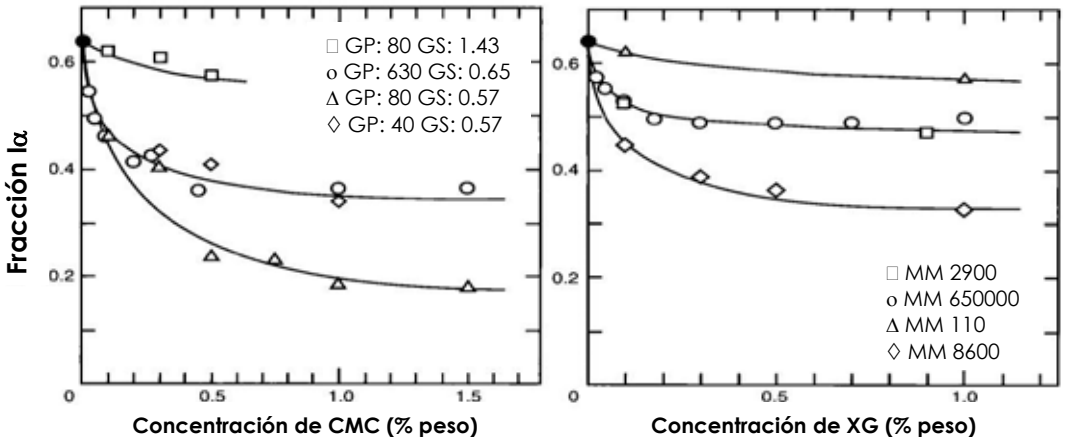

Figura 2.7. Variación de la proporción de celulosa Iα con la concentración de polímeros solubles en el medio de cultivo: carboximetilcelulosa (CMC) y Xiloglucano (XG). GP: Grado de polimerización. GS: Grado de Sustitución. MM: Masa Molecular. [Adaptado de Yamamoto y colaboradores, 1996]

Iwata y colaboradores (1998), evaluaron el efecto de compuestos de la madera como hemicelulosa y lignina sobre la producción de celulosa bacteriana. La presencia de hemicelulosas puede inducir la conversión de celulosa I_α a I_β. Por otra parte, Uhlin y colaboradores (1995), encontraron que en presencia de estos compuestos el ancho de la fibrila disminuye.

Keshk (2006), estableció que la adición de compuestos de la lignina no origina variaciones apreciables en la cristalinidad o en el tamaño de los cristales de celulosa; sin embargo, las microfibrilas presentaron un diámetro mayor que el de las fibrilas obtenidas en el medio sin lignina.

Estas variaciones provocaron un incremento en la resistencia a la tensión y en el módulo de Young de hasta 82% así como 32% en el grado de polimerización respecto a la celulosa obtenida en ausencia de lignina.

2.4 Aplicaciones de la Celulosa Bacteriana

Son numerosos los campos en los que la CB tiene aplicación; sin embargo, son pocas las aplicaciones a nivel comercial que se existen actualmente. Algunos productos comerciales son Biofill® , Gengiflex® desarrollados como sustituto temporal de la piel para cubrir heridas y en implantes dentales (Fontana y colaboradores, 1990; Yoshinaga y colaboradores, 1997; Chawla, 2009). Xylos Corp. también ha desarrollado biomateriales de celulosa bacteriana para aplicaciones biomédicas (Xylos Corp, 2001). En Filipinas se emplea como alimento llamado "nata de coco" (Vega García y Bontoux, 2001).

Se usa también como espesante, estabilizante y ligante en muchos productos alimenticios, especialmente aquellos con bajo o nulo contenido en grasas (Thompson y Hamilton, 2001). Se ha encontrado que la celulosa obtenida en cultivo agitado presenta mejores propiedades como espesante que la de cultivo estático, debido probablemente a la estabilidad de la estructura que le permite actuar como barrera mecánica y como soporte dentro de la emulsión (Ougiya y colaboradores, 1997).

Otra aplicación comercial de la celulosa bacteriana es en transductores acústicos, dada la gran resistencia mecánica que adquiere la celulosa después de ser sometida a un tratamiento químico (Yamanaka y colaboradores, 1989; Nishi y colaboradores, 1990, Ciechańska y colaboradores, 2002).

En el campo de la medicina se han evaluado varias aplicaciones. Una de ellas como sustituto temporal de la piel para el tratamiento de heridas, quemaduras, úlceras y abrasiones en la epidermis (Fontana y colaboradores, 1990; Czaja y colaboradores, 2006; Czaja y colaboradores, 2007, Cai y colaboradores, 2009). Para permitir que ese revestimiento tenga un mayor efecto antimicrobiano, Maneerung y colaboradores (2008) desarrollaron un compósito de celulosa bacteriana y nanopartículas de plata, que mostró su eficiencia para proteger de microorganismos tanto Gram-negativos como Gram-positivos.

Otra aplicación fue lograda por Klemm y colaboradores (2001), quienes desarrollaron implantes vasculares para microcirugía gracias al diseño de un reactor que permite obtener celulosa bacteriana en forma tubular. Estos implantes fueron probados *in vivo* en cerdos y se encontró que presentan buena compatibilidad con los tejidos del animal (Schumann y colaboradores, 2008). Se estudiaron también sus propiedades mecánicas con resultados son similares a los obtenidos por tejidos vasculares naturales (Bäckdahla y colaboradores, 2006).

Otros investigadores modificaron la superficie de estos implantes para aumentar su potencial hidrofílico y permitir así una mejor adhesión de las células (Charpentier y colaboradores, 2006; Andrade y colaboradores, 2010)

La celulosa bacteriana también se ha usado como soporte en ingeniería de tejidos, especialmente para reparar tejido cartilaginoso. En los trabajos de Lloyd (2004), Svensson y colaboradores (2005), Sanchavanakit y colaboradores (2006), Concaro y colaboradores (2007), Wang y colaboradores (2009), Zahedmanesh y colaboradores (2009), Brackmann y colaboradores (2010), Nwe y colaboradores (2010), el soporte de celulosa presentó buena resistencia mecánica, además de permitir la proliferación de keratocitos humanos y de conservar su viabilidad.

También se ha probado como compósito con hidroxiapatita para reemplazo de tejido óseo (Hong y colaboradores, 2006; Wan y colaboradores, 2007; Rambo y colaboradores, 2008; Grande y colaboradores, 2009; Li y colaboradores, 2009a; Zhang y colaboradores, 2009; Zimmermann y colaboradores, 2009; Zheng y colaboradores, 2010; Zaborowska y colaboradores, 2010), y con alcohol polivinílico (PVA), para implantes de córnea, mostrando biocompatibilidad, y ausencia de necrosis en el tejido implantado (Jia y colaboradores, 2009; Jia y colaboradores, 2010; Wang y colaboradores, 2010).

Los sensores de glucosa normales están recubiertos con una membrana de celulosa de origen vegetal; una de sus principales desventajas es su corta vida útil. Al recubrir estos sensores con celulosa bacteriana, Ammon y colaboradores (1995), encontraron que aumenta su vida útil y estabilidad al contacto con la sangre.

Otras aplicaciones potenciales en el área de la medicina debido a sus propiedades son: como soporte para cultivo de células de mamíferos (Watanabe y colaboradores, 1993), inmovilización de enzimas y otras biomoléculas (Wu y Lia, 2008), sustrato para cultivo de tejidos (Li y colaboradores, 2009b) y en sistemas de liberación controlada de medicamentos (Stoica-Guzun y colaboradores, 2007).

En la industria del papel, la celulosa bacteriana se ha probado en la obtención de papel de alta calidad para restauración de documentos valiosos (Son y colaboradores, 2001; Surma-Ślusarska y colaboradores, 2008; Basta y El-Saied, 2009).

En el campo de la electrónica se han desarrollado membranas con alta conductividad eléctrica y dispositivos emisores de luz, incorporando algunos metales en la estructura de la celulosa (Legnani y colaboradores, 2008; Li y colaboradores, 2009c; Shen y colaboradores, 2009).

Se han modificado algunas membranas con paladio y platino para ser utilizadas en celdas de combustible, mostrando buena adhesión de las sustancias introducidas en la estructura de celulosa (Take y colaboradores, 2002; Evans y colaboradores, 2003; Mukai y colaboradores, 2006; Yang y colaboradores, 2009; Sun y colaboradores, 2010).

También se han probado membranas de celulosa bacteriana en procesos de separación. Debido a su estructura hidrofílica, pueden emplearse en separación de soluciones acuosas,

tales como filtración molecular, ultrafiltración, diálisis, permeación con vapor y pervaporación (Shibazaki y colaboradores, 1993; Duvey y colaboradores, 2002; Wanichapichart y colaboradores, 2002; Duvey y colaboradores, 2005; Sokolnicki y colaboradores, 2006; Saibuatong y Phisalaphong, 2010). Los trabajos dedicados a estudiar las membranas de celulosa bacteriana como agente de separación se presentarán con detalle en el capítulo III.

3. Membranas de Celulosa Bacteriana

Los procesos de separación con membranas han adquirido importancia a partir de la segunda mitad del siglo XX, debido principalmente a la reducción del consumo energético que presentan respecto a los procesos de separación convencionales. Este capítulo recoge algunos conceptos importantes de la separación a través de membranas y sus mecanismos de transporte, así como sus principales aplicaciones. Finalmente, se hace una revisión acerca de la evaluación de membranas de celulosa bacteriana como agentes de separación.

3.1 Introducción

Una membrana es esencialmente una barrera entre dos fases, que en presencia de una diferencia de potencial químico permite el paso de las especies con velocidades diferentes (Habert y colaboradores, 2006). Se tiene registro del primer estudio sobre membranas en 1748, cuando el francés Abbé Nollet descubrió que una vejiga de cerdo permite el paso preferencial del etanol cuando se pone en contacto un lado con una mezcla etanol/agua y el otro con agua pura. Nollet fue probablemente el primero que reconoció la relación entre una membrana permeable y la presión osmótica, acuñando así el término "Ósmosis" (Baker, 2004; Strathmann y colaboradores, 2006).

En 1855 Fick publicó sus leyes sobre la difusión, aún hoy día usadas para describir los procesos de transporte a través de membranas. Ese mismo año, Fick preparó y estudió una de las primeras membranas artificiales, hecha a partir de una solución alcohol/éter y nitrato de celulosa, llamada colodión (Lonsdale, 1982). Thomas Graham, conocido por sus leyes de difusión de gases, también realizó algunas mediciones de diálisis a través de membranas sintéticas a mediados del siglo XIX.

Graham también descubrió que el caucho presenta diferentes permeabilidades para diferentes gases, y por lo tanto que las membranas podían utilizarse para realizar separaciones de mezclas gaseosas. En 1887 van`t Hoff utilizó los experimentos hechos por Traube y Pfeffer sobre presión osmótica para desarrollar su ley límite, que explica el comportamiento de soluciones diluidas ideales; este trabajo lo llevó a la ecuación que lleva su nombre. Al mismo tiempo, el concepto de una membrana permeable perfectamente

selectiva fue propuesto por Maxwell y otros en el desarrollo de la teoría cinética de los gases (Baker, 2004).

En sus primeras etapas las membranas fueron primordialmente objeto de estudio con muy pocas aplicaciones prácticas. Esto cambió drásticamente en 1950 cuando despertó el interés por el uso de membranas en aplicaciones técnicas de importancia. Los avances en la química de polímeros dieron como resultado una gran cantidad de compuestos sintéticos que hicieron posible la preparación de nuevas membranas con propiedades de transporte específicas, además de excelentes propiedades mecánicas y térmicas. Uno de los mayores avances fue el desarrollo de membranas de acetato de celulosa para ósmosis inversa, las cuales permiten una elevada retención de sales y altos flux a presiones moderadas. Esta aplicación se convirtió en una herramienta efectiva para la producción de agua potable a partir de agua de mar (Strathmann y colaboradores, 2006).

Tan pronto se desarrollaron membranas eficientes, empezaron a diseñarse módulos apropiados como el de fibra hueca y espiral, con miras a llevar los procesos a escala industrial. El criterio para el diseño de dichos módulos incluye alta densidad de empaque de la membrana, facilidad de mantenimiento o reemplazo de la misma, confiabilidad y bajo costo. Para ósmosis inversa se utilizaban módulos en espiral, mientras que para hemodiálisis se utilizan los módulos capilares de fibras huecas (Kumano y Fujiwara, 2008).

3.2 Morfología de las Membranas

Las membranas presentan diferentes morfologías; pueden clasificarse en dos grandes grupos: densas y porosas (figura 3.1). En el caso de las membranas porosas se presume que existen caminos físicos fijos por donde se da el paso de las moléculas. No se espera que exista una interacción entre la sustancia a separar y el material de la membrana. En las membranas densas no hay presencia de caminos fijos; el paso de las moléculas a separar se da gracias a la movilidad segmental de las cadenas de la membrana.

Tanto las membranas densas como las porosas pueden ser isotrópicas o anisotrópicas, es decir, pueden o no presentar las mismas características a lo largo de su espesor.

La morfología de la membrana y el material que la constituye definen el proceso de separación en el cual puede ser empleada, así, una membrana porosa será empleada en procesos de micro, ultra y nanofiltración mientras una membrana densa se emplea preferencialmente en ósmosis inversa, permeación de gases y pervaporación. La estructura del material influye en propiedades como la permeabilidad y la selectividad; si la estructura es altamente cristalina, el flux se verá afectado debido a que las zonas cristalinas son impermeables; en cuanto a la selectividad, el material debe ser afín al componente a separar, es decir, si por ejemplo se quiere retirar agua, el material deberá ser hidrofílico, caso contrario, se prefiere hidrofóbico.

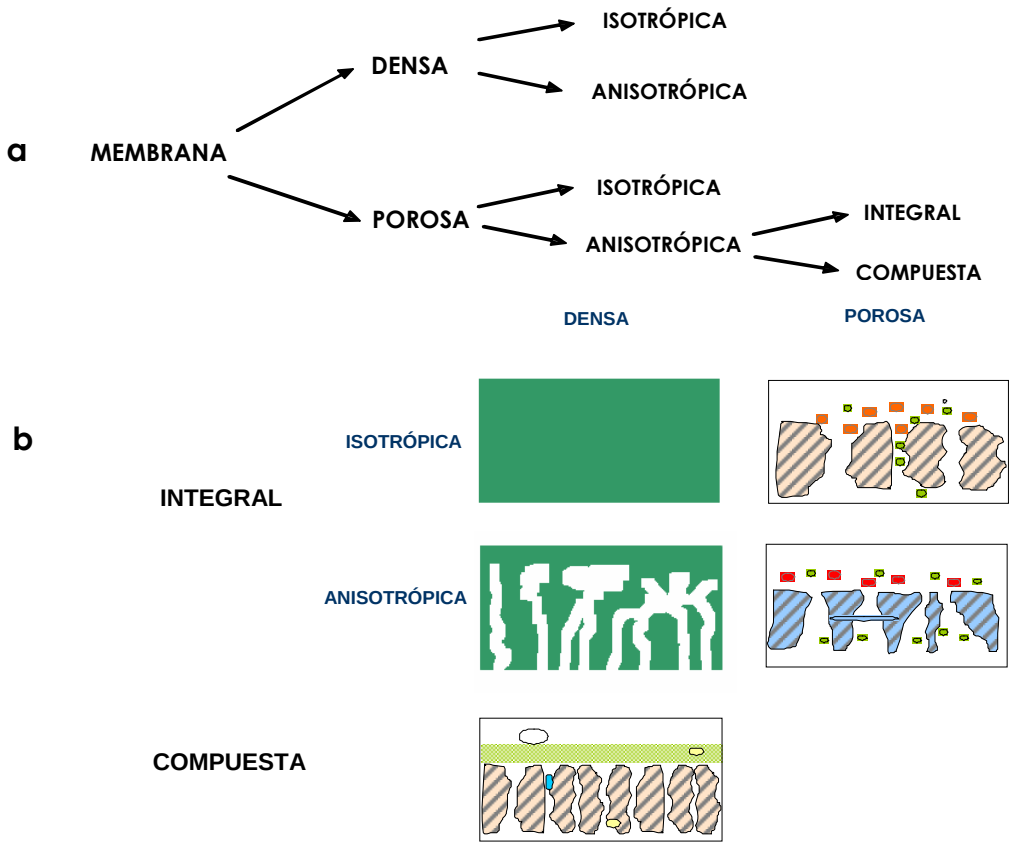

Figura 3.1. a). Clasificación de las Membranas. b). Eorfología de membranas.
[Adaptado de Strathmann, 2001; Caicedo y colaboradores, 2002; Baker, 2004; Habert y colaboradores, 2006]

3.3 Procesos de Separación que Utilizan Membranas

Para que ocurra el transporte a través de la membrana es necesaria la aplicación de una fuerza motriz. Esta fuerza puede ser un gradiente de potencial eléctrico o químico. Este potencial puede expresarse en términos del gradiente de presión o concentración dependiendo del proceso. La tabla 3.1 presenta los principales procesos de separación con membranas.

Tabla 3.1. Principales procesos de separación que utilizan membranas. [Adaptado de Habert y colaboradores, 2006]

PROCESO DE SEPARACIÓN	ALIMENTO	MECANISMO DE SEPARACIÓN	FUERZA IMPULSORA	APLICACIONES
Micro filtración	Líquido o gas	Tamaño	ΔP (0,5-2 atm)	Concentración de emulsiones, concentración de suspensiones celulares y reducción de turbidez.
Ultrafiltración	Líquido	Tamaño	ΔP (1-7 atm)	Separación de biomoléculas y virus de corrientes acuosas, remoción de aceites en microemulsiones.
Nanofiltración	Líquido	Tamaño	ΔP (5-25)	Purificación de enzimas, biorreactores de membrana.
Ósmosis Inversa	Líquido	Adsorción-difusión	ΔP ($\Delta\mu i$)	Desalinización de agua, tratamiento de aguas residuales.
Diálisis	Líquido	Tamaño y adsorción-difusión	ΔC	Hemodiálisis.
Electrodiálisis	Líquido	Intercambio iónico	ΔE	Concentración de soluciones salinas, purificación de aguas.
Permeación con gas y vapor	Gas o vapor	Adsorción-difusión	Δp_i	Separación de O_2/N_2, H_2/CH_4, H_2/N_2, CO_2/CH_4, y remoción de vapores orgánicos del aire.
Pervaporación	Gas o vapor	Adsorción-difusión	Δp_i	Deshidratación de compuestos orgánicos, remoción de trazas orgánicas de soluciones acuosas.

3.4 Transporte a través de Membranas

El punto de partida para describir la permeación de sustancias a través de membranas basado en la termodinámica es que todas las fuerzas motrices (diferencias de presión, temperatura, concentración y fuerza electromotriz), están interrelacionadas y que la fuerza impulsora genérica para producir el transporte de la sustancia es el gradiente de potencial químico (Wijmans y Baker, 1995). Así, el *flux* J del componente i puede describirse como:

$$J_i = -L_i \frac{d\mu_i}{dx} \qquad (3.1)$$

donde J_i es el *flux* del componente i, $d\mu_i/dx$ es el gradiente de potencial químico del componente i a través del espesor de la membrana y L_i es el coeficiente de proporcionalidad (no necesariamente constante) que vincula el *flux* (flujo por unidad de área) con la fuerza impulsora. El potencial químico puede expresarse en términos de las diferentes fuerzas motrices (diferencias de temperatura, presión, concentración).

En general, un proceso de separación con membranas se realiza a temperatura constante, mientras que se presentan gradientes de presión y concentración. Así, la expresión para el potencial químico puede ser:

$$d\mu_i = RTd\ln(\gamma_i C_i) + \upsilon_i dp \qquad (3.2)$$

donde C_i es la concentración molar (mol/mol) del componente i, γ_i el coeficiente de actividad, p la presión y v_i el volumen molar del componente i. Para fases incompresibles como un líquido o una membrana sólida, el volumen no cambia con la presión.

La eficiencia de separación de la membrana se conoce como selectividad, y puede definirse como la capacidad para permitir el paso de un componente sobre los demás. En procesos que utilizan membranas porosas la selectividad está directamente asociada al tamaño de las especies retenidas y de los poros de la membrana. La selectividad puede expresarse a través del coeficiente de rechazo:

$$R = \left(1 - \frac{C_p}{C_a}\right) * 100 \qquad (3.3)$$

Donde C_p y C_a son las concentraciones del soluto en el permeado y el alimento respectivamente.

En el caso de las membranas densas la selectividad depende de la afinidad de las especies con el material de la membrana y puede expresarse como:

$$\alpha_{A/B} = \frac{Y_A / Y_B}{X_A / X_B} \qquad (3.4)$$

Donde Y_i y X_i son las concentraciones del componente i en el permeado y el alimento respectivamente.

Uno de los fenómenos más importantes asociados al transporte a través de membranas es el de polarización de la concentración. Este fenómeno se presenta debido a que la velocidad del alimento en la superficie de la membrana es igual a cero, de la misma manera que la velocidad de un fluido en la pared de una tubería presenta este valor. Debido a la selectividad de la membrana, se va a presentar un aumento en la concentración de los solutos sobre la superficie; estos solutos al encontrarse en mayor concentración que en el seno del líquido, crean un movimiento difusivo desde la superficie de la membrana hacia la solución. Si se llega al equilibrio entre el flux que permea la membrana y el flux difusivo que va en sentido del seno del líquido, se crea un perfil de concentración del soluto próximo a la membrana. Este fenómeno de polarización de concentración es inherente a cualquier proceso selectivo; el espesor de la película próxima

a la superficie dependerá de factores como las condiciones de flujo (número de Reynolds) y la concentración del alimento.

3.4.1 Modelos para Membranas Porosas

Los procesos que involucran membranas porosas utilizan como fuerza motriz una diferencia de presión a través de éstas. El paso del permeado a través de la membrana se efectúa en grupos de moléculas. De manera general en las membranas porosas no se presenta gradiente de concentración a través de ellas; por lo tanto, el resultado de combinar las ecuaciones 3.1 y 3.2 es:

$$J_i = -L_i \frac{dP}{dx} \qquad (3.5)$$

Si el coeficiente L_i no depende del cambio de presión, la ecuación 3.3 puede integrarse a través del espesor de la membrana dx, obteniéndose una expresión similar a la ley de Darcy:

$$J = L_p \Delta P \qquad (3.6)$$

El coeficiente L_p depende, entonces, de la estructura física de la membrana y de la solución a permear. Este coeficiente es conocido como el coeficiente de permeabilidad hidráulica, puede interpretarse como una medida de la facilidad que presenta la membrana al paso de un solvente determinado (Habert y colaboradores, 2006). Se han desarrollado diferentes modelos para evaluar este coeficiente, uno de los cuales es el que considera la membrana como una matriz que contiene poros cilíndricos a través de su espesor.

El *flux* puede calcularse con la ecuación de Hagen-Poiseuille; en este caso, el coeficiente L_p puede evaluarse en términos del radio medio de los poros (r), la tortuosidad (τ), la porosidad de la membrana (ε), la viscosidad del medio (η) y el espesor de la membrana (Δz):

$$L_p = \frac{\varepsilon r^2}{8\eta\tau\Delta z} \qquad (3.7)$$

Si la estructura de la membrana se aproxima más a un medio poroso formado por esferas que se tocan tangencialmente (caso de los materiales sinterizados), L_p puede calcularse con el modelo de Kozeni-Carman:

$$L_p = \frac{\varepsilon^3}{K\eta S^2 (1-\varepsilon)^2 \Delta z} \qquad (3.8)$$

donde S representa el área superficial por unidad de volumen del medio poroso y K es la constante de Kozeni-Carman.

3.4.2 Modelos para Membranas Densas

En las membranas densas el transporte se efectúa moécula a molécula, contrario al transporte en membranas porrosas donde el transporte ocurre en grupos. La fuerza motriz es el gradiente de potencial químico, expresado como la diferencia de presiones parciales del componente i entre el alimento y el permeado. Para el transporte a través de membranas densas se han desarrollado algunos modelos. En ellos se tiene en cuenta que el transporte es primordialmente de carácter difusivo. A continuación se resumen algunos de los conceptos y modelos que explican el transporte a través de esta clase de membranas.

- **Ley de Fick**

La ley de Fick establece una relación lineal entre el *flux* del componente i que se difunde a través de la membrana y el gradiente de concentración entre el alimento y el permeado:

$$J = -D\nabla C \qquad (3.9)$$

Esta primera ley es aplicable cuando se alcanza el estado estable, en el cual el *flux* es constante con el tiempo. Si la difusión es unidireccional, la ecuación 3.7 se transforma en:

$$J = -D\frac{dC}{dz} \qquad (3.10)$$

Esta simplificación es válida si el espesor es mucho más pequeño que las otras dimensiones de la membrana (Klopffer y Flaconnèche, 2001). El coeficiente de difusión puede ser constante (para unas condiciones dadas del sistema), o dependiente de la concentración. Como puede apreciarse, al utilizar la ley de Fick para describir el transporte de un componente a través de una membrana, no se tienen en cuenta las interacciones soluto-membrana o $soluto_i$-$soluto_j$ en el caso de mezclas de solventes, es decir, asume un caso ideal, donde el flux del componente i y del componente j son independientes uno del otro. Sin embargo, son muchos los sistemas donde existen interacciones entre los componentes a permear, y entre los componentes y la membrana; estas interacciones se conocen como acoplamiento. Este fenómeno reduce la aplicabilidad de este modelo, especialmente en el caso de sistemas donde estas interacciones son apreciables. A pesar de ello, son muchos los trabajos en los que se emplea la ley de Fick para interpretar procesos de separación con membranas.

A partir de la ecuación de Maxwell-Stefan, Schaetzel y colaboradores (2001a), obtuvieron una forma generalizada de la ley de Fick que tiene en cuenta los efectos del acoplamiento:

$$J_1 = -\frac{D_1}{V_1}\frac{d\phi_1}{dz} + J_2\frac{D_1}{D_{12}}\frac{\phi_1/V_1}{\left(\phi_1/V_1\right)+\left(\phi_2/V_2\right)+\left(\phi_M/V_M\right)}$$

$$J_2 = -\frac{D_2}{V_2}\frac{d\phi_2}{dz} + J_1\frac{D_2}{D_{12}}\frac{\phi_2/V_2}{\left(\phi_1/V_1\right)+\left(\phi_2/V_2\right)+\left(\phi_M/V_M\right)} \qquad (3.11)$$

donde V_i es el volumen molar, D_{ij} es la difusividad mutua entre los componentes, ϕ_i es la fracción en volumen del componente i y el subíndice M denota a la membrana. La relación D_i/D_{ij} hace referencia a la difusividad por acoplamiento; si ésta se hace igual a cero, J_1 y J_2 quedan expresados en la forma clásica de la primera ley de Fick.

Al evaluar el modelo y compararlo con resultados experimentales para la mezcla etanol-agua, la influencia del *flux* del etanol sobre el *flux* del agua es muy pequeña; los autores consideraron que para fines prácticos, en el sistema evaluado, la definición clásica de Fick es suficiente para describir el comportamiento.

- **Modelo de Solución-Difusión**

De acuerdo con el modelo de solución difusión, el transporte de sustancias a través de la membrana ocurre en tres etapas sucesivas (figura 3.2): 1. Las moléculas del solvente se disuelven en el polímero en la interfase alimento-membrana. 2. Las moléculas absorbidas migran a través de la membrana en dirección del espesor utilizando como mecanismo la difusión. 3. Las moléculas, se desorben desde la membrana en la interfase membrana-permeado.

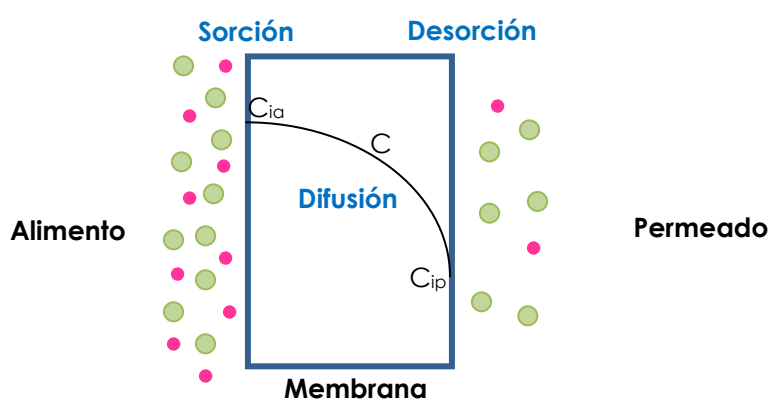

Figura 3.2. Esquema del transporte a través de una membrana densa de acuerdo con el modelo de solución-difusión.

Admitiendo la teoría de la doble película, se supone que existe un equilibrio local entre el alimento y su interfase, y entre el permeado y su interfase. Esta suposición implica que el gradiente de potencial químico es continuo de un lado a otro de la membrana y que las velocidades de absorción y desorción a ambos lados de la membrana son muy superiores a la velocidad de difusión a través de la membrana (Schaetzel y colaboradores, 2004).

Por otra parte, el modelo de solución-difusión asume que la presión en el interior de la membrana es constante e igual al valor de la presión en el lado del alimento, lo que quiere decir que el gradiente de potencial químico a través de la membrana se expresa sólo como un gradiente de concentración. Al combinar las ecuaciones 3.1 y 3.2 en ausencia de un gradiente de presión se tiene:

$$J_i = -\frac{RTL_i}{Ci}\frac{dC_i}{dx} \qquad (3.12)$$

Que es una forma análoga de la ley de Fick (Ec. 3.8), donde el término $\frac{RTL_i}{Ci}$ puede ser identificado por el coeficiente de difusión:

$$J_i = -D_i\frac{dC_i}{dx} \qquad (3.13)$$

En sus trabajos, Schaetzel y colaboradores (2004), presentaron la aplicación del modelo de solución-difusión a procesos específicos de separación con membranas, partiendo de los conceptos de equilibrio entre alimento-interfase y permeado-interfase, con lo cual se llega a la expresión:

$$J_i = K_i D_i f(C_{ia} - C_{ip}) \qquad (3.14)$$

En la que K_i es el coeficiente de solubilidad de la especie i, D_i es el coeficiente de difusividad y la función f depende de las condiciones específicas de cada proceso en particular. Los subíndices ia y ip hacen referencia a la concentración del componente i en el alimento y el permeado respectivamente. El producto K_iD_i es conocido como el coeficiente de permeabilidad P_i de la especie i y frecuentemente se emplea para caracterizar diversos sistemas con cierto éxito especialmente en permeación de gases.

Una de las desventajas de este modelo es que no contempla las interacciones entre el solvente y el polímero, como tampoco las interacciones entre las especies del solvente. Además, debido a que el *flux* se expresa en la forma de la ley de Fick, puede aplicarse con cierto éxito para describir la permeación de componentes puros pero no así para mezclas,

especialmente si no son ideales. A pesar de ello, varios autores la utilizan para sistemas multicompuestos.

Cuando se revisan detalladamente los desarrollos para cada una de las operaciones de separación se encuentran suposiciones que dan carácter ideal al sistema que no son válidas para todas las sustancias, especialmente en aplicaciones industriales (como es el caso de la mezcla etanol-agua por pervaporación), razón por la cual su uso se hace cuestionable. Este modelo no tiene en cuenta que la permeación de un componente no depende sólo de su propia fuerza motriz sino también del efecto de las otras fuerzas que actúan sobre el sistema, por lo cual no tiene en cuenta los fenómenos de acoplamiento.

Otro de sus inconvenientes es que, al presentar ese carácter ideal, no permite introducir parámetros propios del sistema y depende mucho de datos experimentales, razón por la cual su carácter predictivo es muy deficiente. Ello ha llevado a varios autores a desarrollar modelos que parten del de solución-difusión, pero que corrigen algunas de sus deficiencias.

Heintz y Stephan (1994), modificaron el modelo de solución-difusión e incluyeron los efectos del acoplamiento y de la polarización de la concentración en membranas compuestas. El modelo fue comparado con resultados experimentales para pervaporación de mezclas etanol-agua-membrana de PVA, y se encontró se ajusta bien cuando se tiene en cuenta el fenómeno de acoplamiento, mientras que cuando no se incluye los resultados difieren. Se encontró además, que el efecto de polarización de la concentración no es notable para este tipo de separación. Al incluir el efecto de acoplamiento y basarlo en la fracción total en volumen del solvente en el polímero para describir el transporte de especies en membranas altamente selectivas en pervaporación, se puede expresar el coeficiente de difusión de la forma:

$$D_{im} = D_{i0}\left(1 + \frac{1}{2}K(\Phi_u + \Phi_d)\right) \qquad (3.15)$$

donde D_{im} es el coeficiente de difusión de i en la membrana, D_{io} es la difusividad en el límite en que la concentración de solvente en la membrana es igual a cero, ϕ_u y ϕ_d son las fracciones en volumen en las secciones superior e inferior de la membrana respectivamente y K es una constante del acoplamiento solvente-polímero (Schaetzel y colaboradores, 2001; Schaetzel y colaboradores, 2004). Este modelo modificado se probó para la pervaporación de la mezcla etanol-agua-membrana de alcohol polivinílico y copolímero de ácido acrílico-ácido maleico, obteniendo buen ajuste con respecto a los datos experimentales, además de predecir el efecto de la presión del permeado sobre el *flux*.

- **Modelo Basado en la Termodinámica de Procesos Irreversibles**

Durante un proceso irreversible y espontáneo la entropía aumenta, y por ende, la energía disipada. La tasa de disipación de la energía libre por unidad de volumen está representada por la suma de los productos del *flux* por la fuerza motriz correspondiente. El flux del componente i a través de la membrana puede expresarse como:

$$N_i = \sum_{j=1}^{n-1} L_{ij} X_j \qquad (3.16)$$

donde N_i es el flux molar de la especie i, L_{ij} son los coeficientes fenomenológicos y X_j es la j-ésima fuerza, que en el caso de la permeación es el gradiente de potencial químico del componente j. Con el uso de las ecuaciones de la termodinámica de procesos irreversibles los efectos de acoplamiento son considerados automáticamente.

Hwang, 2004, presentó las ecuaciones de transporte a través de membranas para los distintos procesos a partir de los postulados de la termodinámica irreversible desarrollados por varios autores; se parte del hecho de que a diferencia de los procesos de separación convencionales, los procesos con membrana son de no equilibrio. Estos principios de no equilibrio establecen que la tasa de trabajo perdido asociado a la producción de entropía por unidad de área, debido a cualquier proceso irreversible puede expresarse como:

$$T\sigma = \sum_i J_i X_i \qquad (3.17)$$

donde T es la temperatura ambiente, y σ es la tasa de producción de entropía por unidad de área de la membrana. El desarrollo lleva a obtener una ecuación general:

$$T\sigma = -\sum_i J_i^* RT \ln(f_i) - NVdP \qquad (3.18)$$

donde J_i^* es el *flux* difusivo y f_i es la fugacidad. A partir de esta ecuación se encuentran las ecuaciones para la permeación de mezclas binarias de gases, ósmosis inversa, microfiltración, ultrafiltración, diálisis, pervaporación y electrodiálisis. Esta propuesta tiene la ventaja de considerar los fenómenos de acoplamiento, a pesar de encontrarse que presentan dimensiones más pequeñas que las interacciones principales. Cuando se obvian los términos que se refieren al acoplamiento, se reducen a las ecuaciones clásicas de transporte que ofrece la literatura (Hwang, 2004). Una de las razones por las que este modelo no es usado frecuentemente, es la dificultad para determinar experimentalmente los parámetros (Schaetzel y colaboradores, 2004).

- **Modelo de Maxwell- Stefan (M-S)**

La ecuación de M-S ha sido probada con relativo éxito en sistemas líquidos y poliméricos, a pesar de haberse elaborado para mezclas de gases. Los aspectos positivos de esta ecuación son: 1. Considera un flux no difusivo y acoplamiento entre las fuerzas que actúan en el sistema. 2. Fue desarrollada con una base teórica consistente, de manera que elimina limitaciones de tipo empírico (Wada, 1995).

Según este modelo, una molécula i en una mezcla multicompuesta se mueve bajo la influencia de una fuerza motriz d. Como resultado, las moléculas en la mezcla ejercen una fuerza de fricción, que se opone a la fuerza motriz. Cuando se alcanza el estado estacionario, la fuerza de fricción es igual a la fuerza motriz en sentido opuesto. Si el sistema está constituido por n componentes, la fuerza ejercida sobre la molécula i se expresa como:

$$d_i = -\sum_{j=1}^{n} \frac{x_i x_j}{\mathcal{D}_{ij}} (u_i - u_j) \qquad (3.19)$$

En la que d_i es la fuerza motriz, u_i y u_j son las velocidades medias de difusión de los componentes i y j respectivamente, $x_i x_j$ es un factor de concentración que representa la probabilidad de colisión de la molécula i con moléculas de tipo j. El coeficiente $\mathcal{D}_{ij}$ es la difusividad de Maxwell-Stefan (Taylor y Krishna, 1993). La ecuación 3.19 no es la forma en la que se aplica usualmente; para eliminar las velocidades se usa la definición de *flux* molar $N_i = C_i u_i$:

$$d_i = -\sum_{j=1}^{n} \frac{(x_i N_j - x_j N_i)}{c_t \mathcal{D}_{ij}}$$

$$\frac{x_i}{RT} \frac{d\mu_i}{dz} = -\sum_{j=1}^{n} \frac{(x_i N_j - x_j N_i)}{c_t \mathcal{D}_{ij}} \qquad (3.20)$$

O en términos del *flux* de difusión:

$$\frac{x_i}{RT} \frac{d\mu_i}{dz} = -\sum_{j=1}^{n} \frac{(x_i J_j - x_j J_i)}{c_t \mathcal{D}_{ij}} \qquad (3.21)$$

donde c_t es la densidad molar de la mezcla. Krishna y Standart (1976) presentaron una extensión de la ecuación 19 para sistemas líquidos, en la que el coeficiente de difusividad de M-S es sustituido por un coeficiente corregido con un factor termodinámico $\mathcal{D}_{ij}^{*}$. Son varios los trabajos en los que se ha utilizado el modelo de M-S y sus variaciones en aplicaciones de procesos de separación con membranas (Kerkhof, 1996).

Para describir el flux difusivo a través de membranas densas se utilizó la ecuación de M-S, llegando a la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d\omega_2}{d\omega_1} = \left(\frac{J_2 M_1}{J_1 M_2}\right) \frac{\omega_1 \mathcal{D}_{2M} + \mathcal{D}_{12} - \mathcal{D}_{2M}\omega_2}{\frac{\mathcal{D}_{2M}}{\mathcal{D}_{1M}}\left(\omega_1 \mathcal{D}_{1M} + \mathcal{D}_{12}\right) - \left(\frac{J_2 M_1}{J_1 M_2}\right)\omega_1} \qquad (3.22)$$

En la cual ω_i es la fracción másica del componente i, J_i es el flux molar y M_i la masa molar del componente i, D_{iM} es el coeficiente de difusión del componente i en la matriz polimérica y $\mathcal{D}_{12}$ es el coeficiente de difusión mutua entre los componentes 1 y 2. Heintz y Stephan (1994), probaron el modelo y lo compararon con resultados experimentales para la pervaporación de etanol-agua en una membrana de alcohol polivinílico (PVA). Izák y colaboradores (2003), usaron el mismo modelo y lo aplicaron al sistema etanol-tolueno en una membrana de polietileno (PE), obteniendo resultados similares a los experimentales, y la capacidad predictiva supera a la que presenta la ley de Fick.

Ghoreyshi y colaboradores, 2002, trabajaron un modelo para describir el transporte a través de membranas no porosas que usa parámetros difusivos y de equilibrio a partir de la ecuación de M-S para el fenómeno difusivo y del modelo de Flory-Huggins para interpretar el equilibrio:

$$\begin{pmatrix} -N_1 \\ -N_2 \end{pmatrix} = C_t \underbrace{\begin{pmatrix} B_{11} & B_{12} \\ B_{21} & B_{22} \end{pmatrix}^{-1}}_{\text{Acoplamiento Cinético}} \underbrace{\begin{pmatrix} \Gamma_{11} & \Gamma_{12} \\ \Gamma_{21} & \Gamma_{22} \end{pmatrix}}_{\text{Acoplamiento de Equilibrio}} \begin{pmatrix} \frac{\partial x_1}{\partial z} \\ \frac{\partial x_2}{\partial z} \end{pmatrix} \qquad (3.23)$$

La matriz de elementos B_{ij} se estructura a partir de la ecuación (3.19) para un sistema ternario sistema solvente binario-polímero y se define como:

$$B_{11} = \frac{x_2}{\mathcal{D}_{12}} + \frac{x_P}{D_{1P}} \qquad B_{12} = -\frac{x_1}{\mathcal{D}_{12}}$$
$$B_{21} = -\frac{x_2}{\mathcal{D}_{12}} \qquad B_{22} = \frac{x_1}{\mathcal{D}_{12}} + \frac{x_P}{D_{2P}} \qquad (3.24)$$

Los elementos Γ_{ij} se definen como:

$$[\Gamma] = \begin{pmatrix} \frac{\partial \ln a_1}{\partial x_1} & \frac{\partial \ln a_1}{\partial x_2} \\ \frac{\partial \ln a_2}{\partial x_1} & \frac{\partial \ln a_2}{\partial x_2} \end{pmatrix} \qquad (3.25)$$

Los resultados obtenidos muestran que el modelo representa bien el comportamiento del sistema, como en el caso de la pervaporación. Esto se debe a que los parámetros tanto difusivos como de equilibrio no consideran un sistema binario sino ternario, que tiene en cuenta las interacciones del polímero con los componentes del solvente.

Banat y colaboradores (1999), presentaron un modelo de transferencia de masa en sistemas multicompuestos y su aplicación a la destilación con membranas para mezclas azeotrópicas. El modelo tiene en cuenta los efectos de acoplamiento entre las diferentes especies y fue validado con datos publicados previamente para la mezcla azeotrópica ácido propiónico/agua. Se observó una buena capacidad predictiva, pues además tiene en cuenta el efecto de la temperatura y de la polarización de la concentración.

Izák y colaboradores (2003), realizaron una comparación de varios modelos de transporte a través de membranas con los resultados de la pervaporación en algunos sistemas, y concluyeron que el mejor modelo para describir esta operación es el de M-S.

Schaetzel y colaboradores (1997), elaboraron un modelo de transferencia de masa a través de membranas de intercambio iónico, partiendo de las ecuaciones de M-S, con buena capacidad predictiva, pues se ajusta bien a los resultados experimentales.

3.5 Membranas de Celulosa Bacteriana

En la literatura se encuentran pocos trabajos acerca del empleo de celulosa bacteriana como agente de separación. Se ha utilizado principalmente para selección de polioles, clarificación de jugo de frutas y en pervaporación de mezclas etanol-agua (Matsuoka y colaboradores, 1996; Krystynowicz y colaboradores, 2000; Duvey y colaboradores, 2002; Tiongson y colaboradores, 2002; Pandey y colaboradores, 2005; Duvey y colaboradores, 2005). A continuación se presenta un breve resumen de los estudios realizados con membranas de celulosa bacteriana.

3.5.1 Efecto de las condiciones de fermentación sobre las propiedades de transporte

Wanichapichart y colaboradores (2002), evaluaron el efecto de las condiciones de fermentación (cantidad inicial de inóculo y el medio de cultivo) sobre la permeabilidad hidráulica de membranas de celulosa bacteriana. Los resultados mostraron que con el medio de cultivo (H-S) las membranas obtenidas presentaron compactación cuando se emplearon en pruebas de permeabilidad hidráulica. Al utilizar como medio de cultivo agua de coco suplementada con sacarosa las membranas no presentaron este fenómeno.

Por otra parte, la membrana obtenida empleando la mayor cantidad inicial de inóculo presentó un coeficiente de permeabilidad hidráulica 8 veces menor que la obtenida con la cantidad menor. El porcentaje de retención de albúmina de suero bovino fue de 98.6% y 67.4% para las membranas obtenidas usando la mayor y la menor cantidad inicial de inóculo respectivamente. Se encontró además, que a pesar de que la densidad celular inicial de uno de los cultivos es el doble de la del otro, el espesor de la membrana no varió significativamente. Esto sugiere entonces que una mayor densidad celular incrementa las fibras de celulosa a nivel superficial, no transversal, lo cual reduce el número de espacio entre fibras en la membrana.

Caicedo y colaboradores (2002), determinaron la permeabilidad hidráulica de membranas obtenidas en un medio de cultivo al que se le adicionó propilenglicol en diferentes concentraciones, observando que las membranas obtenidas a los 9 días de cultivo en medios sin adición de propilenglicol presentan los mayores valores de hinchamiento en agua, seguidas por las correspondientes a los medios en los que se agregó 1 y 5% de propilenglicol, respectivamente. En este trabajo se mostró una relación inversa entre el grado de hinchamiento y la permeabilidad hidráulica.

3.5.2 Efecto de las condiciones de Purificación

Una vez finalizada la fermentación, la membrana de celulosa contiene la mayor proporción de masa celular presente en el medio de cultivo, además de proteínas y nutrientes, entre otros, lo que hace necesaria su limpieza antes de utilizarla en alguna aplicación posterior. La literatura muestra cómo cada uno de los autores emplea su propio método de purificación, usando agentes como NaOH, KOH, dodecil sulfato de sodio y Na_2CO_3 en diversas concentraciones, en un amplio intervalo de temperaturas y tiempos de exposición como puede observarse en la tabla 3.2. Sin embargo, es muy poco lo que se ha estudiado acerca de cómo las variaciones en estos tratamientos afectan la estructura y propiedades de la membrana.

Tabla 3.2. Resumen de condiciones de purificación de celulosa bacteriana reportadas en la literatura.

AGENTE	CONC.	TEMP	TIEMPO (h)	REF
NaOH	0.1 M	60°C	4	Bäckdahla y colaboradores (2006)
Dodecil sulfato de sodio	4% v/v	70°C	3	Sokolnicki y colaboradores (2006)
NaOH	4% v/v	70°C	1	
Dodecil sulfato de sodio	0,1% p/v	80°C	0,5	Iwata y colaboradores (1998)
NaOH	2% p/v	Ebullición	1	Yamanaka y colaboradores (1989)
NaOH	20% p/v	N.R	0,33	Shibazaki y colaboradores (1993)
NaOH	1% p/v	Ebullición	8	Yamamoto y Horii (1994)
NaOH	0,1% p/v	Ebullición	8	Yamamoto y colaboradores (1996)
NaOH	0,1N	80°C	0,33	Watanabe y colaboradores (1998)
NaOH	1% p/v	80°C	0,5	Shibazaki y colaboradores (1998)
NaOH	0,1% p/v	Ebullición	8	Hirai y colaboradores (1998)
NaOH	2% p/v	121°C	0,33	Thompson y Hamilton (2001)
NaOH	0.5 M	90°C	1	Son y colaboradores (2001)
NaOH	0,1% p/v	Ebullición	0,2	Caicedo y colaboradores (2001)
NaOH	0.25 N	80°C	2 h	Wanichapichart y colaboradores (2002)
NaOH	0.1 M	90°C	0,5	Cheng y colaboradores (2002)
NaOH	sln saturada	T ambiente	48	Duvey y colaboradores (2002)
NaOH	0.3 M	100°C	0,08	Jung y colaboradores (2005)
NaOH	1 M	80°C	1	Dammström y colaboradores (2005)
NaOH	1%	N.R	N.R	Yasuda y colaboradores (2005)
NaOH	sln saturada	T ambiente	48	Pandey y colaboradores (2005)
NaOH	sln saturada	T ambiente	48	Duvey y colaboradores (2005)
NaOH	0,1N	90°C	0,5	Zuo y colaboradores (2006)
NaOH/KOH/ Na_2CO_3	0.2 N	Ebullición	0,5	Zuo y colaboradores (2006)

Un primer estudio realizado por Shibazaki y colaboradores (1993), muestra cómo el tratamiento de la membrana con NaOH cambia las propiedades de transporte de ésta en un proceso de separación de polioles. Se encontró que la permeabilidad es mayor para la membrana sin tratamiento que en aquella que se sometió a tratamiento con NaOH.

George y colaboradores (2005b), encontraron que el tratamiento de purificación afecta las propiedades de transporte de la membrana de celulosa, disminuyendo el *flux* después del

tratamiento químico; la disminución cuando se utilizan los hidróxidos de sodio y de potasio es mayor que para sus respectivos carbonatos (tabla 3.3).

Se cree que la drástica disminución en el transporte obedece a que el tratamiento disminuye las distancias entre las fibras de la membrana, dificultando el paso del oxígeno a través de la misma.

Tabla 3.3. Transporte de Oxígeno a través de membranas de celulosa bacteriana tratadas con agentes de purificación. [George y colaboradores, 2005b]

Agente Purificante	***Flux* de O_2 ml/(m_2.día) a 23°C**
Sin Agente.	1370.97
NaOH	270.8
KOH	278.44
Na_2CO_3	485.8
K_2CO_3	490.2

3.5.3 Efecto del método de secado

Clasen y colaboradores (2006), evaluaron el efecto del método de secado de membranas de celulosa bacteriana sobre la permeabilidad de varios gases. Se compararon la evaporación convencional de solvente y la liofilización; los resultados muestran que el secado por evaporación disminuye drásticamente la permeabilidad en relación con la liofilización (figura 3.3). Los autores atribuyen este comportamiento al colapso de la porosidad provocado por la evaporación con la consecuente disminución en los espacios vacíos, mientras que la liofilización permite conservar gran parte de la estructura porosa de la membrana; este fenómeno fue observado en las imágenes de microscopía electrónica de barrido.

Tomé y colaboradores (2010), también encuentran que el secado por liofilización permite conservar la estructura y aún así presentar selectividad para algunos gases, especialmente el CO_2.

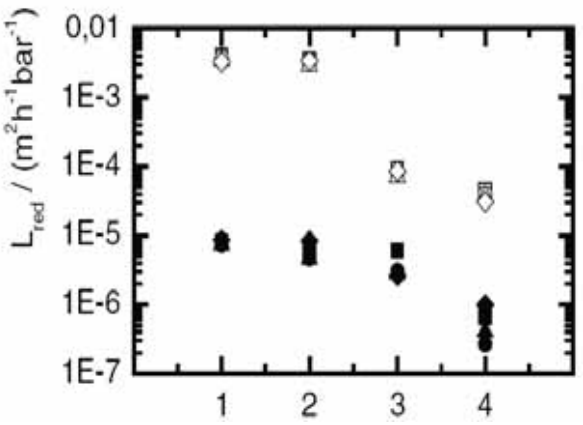

Figura 3.3. Permeabilidad de gases en membranas de celulosa bacteriana. Símbolos claros: secado por liofilización; símbolos oscuros: secado por evaporación □ Nitrógeno. ○ Oxígeno. △ CO_2. ◊ H_2O. Los números en el eje de las abcisas hacen referencia a 4 diferentes cepas de *Acetobarter xylinum:* 1. ATCC 14851 2. ATCC 10245 3. 11142 4. ATCC 23768. L_{red}: P*l. [Clasen y colaboradores, 20006].

3.5.4 Membranas de Celulosa Bacteriana en Procesos de Pervaporación

Duvey y colaboradores (2002), realizaron estudios con membranas de celulosa bacteriana en procesos de pervaporación de mezclas etanol/agua, enfocados en mejorar las condiciones de proceso, trabajando con membranas sin purificar y purificadas con NaOH. Se encontró que el *flux* de una mezcla 1:1 etanol: agua aumenta de 32.3 $g.m^{-2}.h^{-1}$ para la membrana sin tratamiento a 55.1 $g.m^{-2}.h^{-1}$ para la membrana tratada y la selectividad $\alpha_{H2O/etOH}$ pasa de 4.88 a 10.1, lo que hace que la membrana sea útil para deshidratar solventes orgánicos, especialmente en mezclas azeotrópicas. Al encontrar que las mejores separaciones ocurrieron para la composición de la mezcla azeotrópica, los autores elaboraron una membrana compuesta de celulosa bacteriana y quitosano, con el fin de mejorar las propiedades de la membrana de celulosa y obtuvieron una selectividad casi seis veces superior, aunque el *flux* sufrió un descenso del 29% respecto al presentado por la membrana sin modificar (Duvey y colaboradores, 2005).

Pandey y colaboradores (2005), elaboraron un trabajo relacionado con las características de pervaporación para membranas de celulosa bacteriana. Evaluaron el grado de hinchamiento de la membrana para varios compuestos orgánicos (acetona, formaldehido, etanol, etilenglicol y glicerol) y su correspondiente mezcla binaria con agua, encontrando que el hinchamiento es mayor para la mezcla que para el componente puro (figura 3.4), lo que implica que la membrana absorbe preferencialmente el agua. Sin embargo, para todos los compuestos excepto la acetona y el etanol el grado de hinchamiento entre el componente puro y la mezcla binaria es similar, mientras que para estos últimos el hinchamiento es significativamente superior para la mezcla binaria. Al realizar la desorción de los componentes de la membrana, se encontró que para todos los componentes el condensado fue rico en agua; los menores valores de selectividad de la absorción se presentaron precisamente en los sistemas con acetona y etanol, lo que los autores

atribuyen al excesivo hinchamiento por parte de las fibras de celulosa y su consecuente acoplamiento.

Debido a la fuerte interacción entre el agua y la celulosa, la membrana se torna accesible para aceptar el paso del otro componente.

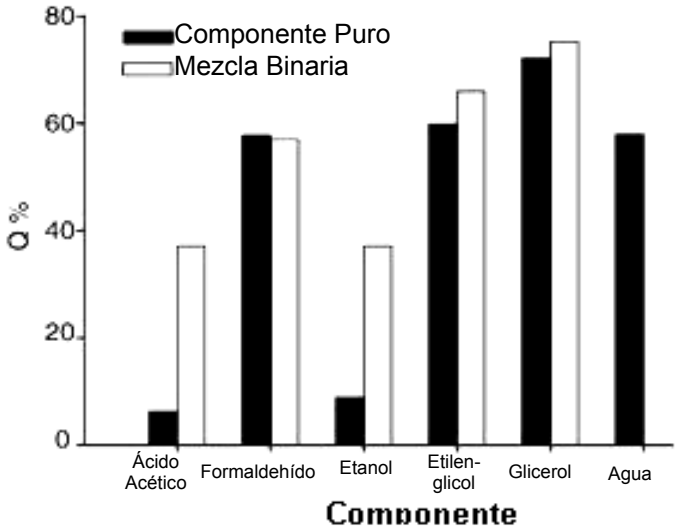

Figura 3.4. Hinchamiento de solventes puros y mezclas binarias (60/40 v/v org/agua) a 35°C en membranas de celulosa bacteriana. [Adaptado de Pandey y colaboradores, 2005]

Los autores también evaluaron estos sistemas en pervaporación y encontraron que en todos los casos el *flux* es bastante bueno y la composición del permeado es rica en agua, como puede observarse en la tabla 3.4, donde resulta evidente que la selectividad disminuye a mayor *flux*. Por otra parte, se observó que el *flux* incrementa con el aumento de la temperatura, lo cual se explica por el carácter difusivo de la pervaporación.

Caicedo y colaboradores (2003), realizaron pruebas de hinchamiento en membranas de celulosa bacteriana empleando agua pura y diversas mezclas etanol-agua, y encontraron que el hinchamiento disminuye con el aumento del contenido de etanol en la mezcla.

Pandey y colaboradores (2005), realizaron también la caracterización termodinámica del sistema etanol/agua/membrana de celulosa bacteriana, encontrando un valor de energía de activación de 10.2 kJ/mol, menor que el correspondiente a otros sistemas de referencia (tabla 3.5). Por esta razón la pervaporación de mezclas etanol/agua a través de membranas de celulosa bacteriana es más fácil que con las demás membranas.

Tabla 3.4. Características de Pervaporación en Membranas de Celulosa Bacteriana para varias mezclas de solventes orgánicos con agua (60/40 v/v) a 35°C. [Pandey y colaboradores, 2005]

Sistema	*Flux* J ($g.m^{-2}.h^{-1}$)	Composición del permeado (solvente: agua)	Selectividad α_p.*
Glicerol/Agua	92	0.8:99.2	186
Etilenglicol/Agua	270	2.2:97.8	66
Etanol/Agua	614	2.7:97.3	12
HCHO/Agua	310	7.5:92.5	54
Acetona/Agua	321	11.0:89.0	18

* $\alpha_p = \frac{Y_p / X_p}{Y_f / X_f}$ Donde Y y X son las fracciones másicas de agua y especie orgánica en el alimento (f) y el permeado (p) respectivamente.

Tabla 3.5. Energía de Activación para pervaporación de mezclas etanol/agua en varias membranas. [Pandey y colaboradores, 2005]

Membrana	Etanol en el Alimento (% peso)	Temperatura (°C)	Energía de Activación (kJ/mol)
PVA	20.9-61.1	20-50	35.6-36.5
PVA/MBA	20.9-79.9		38.7-41.1
PVA/P(AM-AANa)	44.3-61.1		34.8-35.6
Polímero Plasma	0-90	20-60	13.0-53.1
Fluoruro de Polivinilideno	80	30-80	21.0-23.0
Polieterimida	64	22-25	23.8
PVA combinado con Nylon 4	0-90	15-45	24.7-30.1
Celulosa Bacteriana	47.4	35-55	10.2

Como se puede observar, la literatura presenta una gran cantidad de trabajos relacionados con la producción de celulosa bacteriana y el efecto de sus condiciones de cultivo sobre la producción y algunas propiedades estructurales; adicionalmente, algunos trabajos muestran el potencial de las membranas de celulosa bacteriana en algunos procesos de separación. Sin embargo, no hay un trabajo que presente de manera integral el efecto de las condiciones de cultivo y purificación sobre las propiedades de transporte, razón por la cual este trabajo se enfoca en esa dirección.

4. Metodología

Este capítulo presenta la metodología experimental empleada en este trabajo para obtener y caracterizar membranas de celulosa bacteriana, el cual fue desarrollado en tres etapas consecutivas: en la primera, se obtuvo la celulosa bacteriana por fermentación estática; en la segunda, la celulosa fue sometida a un tratamiento de purificación y secado, y en la tercera se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas y de transporte de las membranas obtenidas.

4.1 Preparación de las Membranas

En la preparación de las membranas se incluye la descripción de la obtención de la celulosa por fermentación estática y su posterior tratamiento de purificación.

4.1.1 Fermentaciones

- **Preparación del pre-inóculo**

Se utilizó un aislado nativo de *Acetobacter xylinum* obtenido previamente a partir de un cultivo del hongo del té proveniente de la región de Boyacá, que fue guardado en cajas de petri en medio H-S con 2%(p/v) de agar. Para las fermentaciones este microorganismo fue activado en un medio que contiene, por cada litro: sacarosa (Carlo Erba Reagents) 50g, extracto de levadura (Oxoid Limited) 2 g, té, 4g. El pH fue ajustado en 5.5 usando una solución de HCl 1N (J.T. Baker®). El medio fue distribuido en tubos de ensayo (volumen de medio de 10 ml), esterilizado a 121°C durante 15 min y posteriormente inoculado e incubado a 30°C durante 6 días. Luego se almacenó a 4°C para ser utilizado en la producción de celulosa bacteriana.

- **Preparación del Inóculo**

El medio para preparar el inóculo fue igual al utilizado para preparar el preinóculo. La cantidad preparada era la necesaria para que el inóculo fuera el 10% del volumen total de fermentación para todos los ensayos. Una vez preparado, el medio se esterilizó a 121°C por 15 minutos y luego se inoculó con el preinóculo; posteriormente fue incubado a 30°C

durante 6 días y luego empleado en las corridas de fermentación utilizadas para construir las fermentaciones de construcción de las curvas de celulosa y obtener las membranas.

- **Selección de las variables de cultivo:**

En el capítulo 2 se presentaron las variables de cultivo más estudiadas en la producción de celulosa bacteriana:

- Microrganismo
- Fuente de carbono
- Temperatura de cultivo
- Concentración de la fuente de carbono
- Fuente de nitrógeno
- Concentración de la fuente de nitrógeno
- Adición de co-sustratos al medio de cultivo
- Adición de polímeros solubles al medio de cultivo

Como este será un primer estudio que integre el efecto de las variables de cultivo sobre las propiedades de transporte de las membranas, no es fácil incorporar todas las variables a la vez; por ello se eligieron dos variables que son la fuente de carbono y la temperatura de cultivo,

Las fuentes de carbono seleccionadas fueron glucosa, sacarosa y glicerol. Se escogió glucosa puesta que es la fuente de carbono con la que se han elaborado los estudios modelo en producción de celulosa; la sacarosa y el glicerol se seleccionaron teniendo en cuenta que la literatura reporta producción de celulosa con estas fuentes de carbono y a que en el país se presenta su disponibilidad con miras a un posible escalamiento del proceso.

La concentración de la fuente de carbono se eligió con base en el trabajo de Caicedo y colaboradores (2001); de acuerdo con éste, la producción óptima de celulosa se logra con concentraciones de glucosa entre 20 y 50 g/l. Se escogió una concentración dentro de este intervalo, 30g/l, y se fijó para las tres fuentes de carbono.

La literatura presenta temperaturas de cultivo que van desde los 4°C (Hirai y colaboradores, 2002) hasta los 35°C (Duvey y colaboradores, 2002). El inconveniente con temperaturas demasiado bajas es que la velocidad de producción de celulosa es limitada, debido a que el crecimiento del microorganismo también lo es. Se realizaron ensayos preliminares a 20°C, 25°C 30°C y 35°C empleando sacarosa como fuente de carbono y se encontró que el microorganismo no presenta crecimiento a 20°C, además de observarse que después de 15 días de cultivo sólo el 20% de la sacarosa fue consumida. A 35°C sí se presentó crecimiento; sin embargo el producto obtenido no fue celulosa bacteriana, sino un polímero soluble que

incrementa la viscosidad del medio de cultivo. Estas pruebas permitieron concluir que el microorganismo presenta cambios sustanciales en su metabolismo con la variación de la temperatura. Dado que a 25°C y 30°C hubo crecimiento y producción de celulosa, estas temperaturas fueron seleccionadas como variables dentro del presente estudio.

La fuente de nitrógeno seleccionada fue extracto de levadura con una concentración de 10g/l, ya que de acuerdo con Son y colaboradores (2001), es la fuente de nitrógeno y la concentración que produce la mayor cantidad de celulosa.

4.1.2 Construcción de las Curvas de Producción de Celulosa

Estas curvas se construyeron con el fin de estudiar la producción de celulosa y ácidos y el consumo de sustrato. El medio de cultivo, cuyo pH inicial se ajustó en 5.5 con una solución 1N de HCl estaba compuesto por:

Fuente de carbono: 3% (p/v)
- Glucosa (Carlo Erba Reagents),
- Sacarosa (Carlo Erba Reagents)
- Glicerol (J.T. Baker®),

Extracto de levadura (Oxoid Limited): 1% (p/v)

Temperatura de Cultivo:
- 25°C
- 30°C

Se emplearon recipientes de polietileno de 500cm^3 resistentes al calor. El área de fermentación de cada uno de los frascos era de 78.5cm^2 y el volumen de medio de cultivo fue 200ml. De esta manera se aseguraba una relación área/volumen de 0.39 cm^{-1} que de acuerdo con Caicedo y colaboradores (2001) permite la máxima producción de celulosa.

El medio fue esterilizado a 121°C durante 15 minutos, inoculado e incubado a 25 y 30°C sin agitación, tomando muestra cada 3 días; el tiempo total de fermentación fue 30 días, tomando muestra cada 3 días a partir del día 5. Las fermentaciones se realizaron por triplicado, con el fin de evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

- **Determinación de Celulosa**

Se adaptó el prodecimiento empleado por Yang y colaboradores (1998): La celulosa fue removida del medio por filtración, lavada con agua destilada y sometida a purificación durante 10 minutos con NaOH 1N (preparada a partir de NaOH (Merck) y agua destilada) a 90°C con el propósito de eliminar las sustancias elementos remanentes del medio de cultivo y los microorganismos. La celulosa fue removida del agente purificante y lavada sucesivas veces con agua destilada hasta eliminar completamente el NaOH (verificando con

fenolftaleína que no se presentara cambio de color en el agua de lavado), luego de lo cual, la celulosa fue colocada en placas de vidrio y secada en un horno a 30°C hasta obtener peso constante. Una vez secas, se determinó el peso de las membranas a través de una balanza analítica (Sartorius). El espesor se determinó por medio de un micrómetro (Mitutoyo). A través de un molde metálico de área conocida (78.54 cm^2) se cortaron las membranas, y con los datos de peso, área y espesor se determinó la densidad aparente.

- **Consumo de Azúcares**

La determinación de la concentración de azúcar presente en el medio de cultivo se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por su sigla en inglés) de acuerdo por la técnica reportada por Castro y colaboradores (2010). Se utilizó un cromatógrafo Waters, columna Sugar Pack I; como fase móvil se usó agua desionizada a 0.5 ml/min, temperatura del horno 84°C y detector de índice de refracción.

- **Producción de Ácidos**

Se determinó la acidez total del medio por titulación con una solución estandarizada de NaOH 0,1 N. La acidez total se expresó como g/l de ácido glucónico (Elnaghy y Megalia, 1975).

4.1.3 Obtención de las Membranas

Para obtener las membranas que posteriormente serían caracterizadas, se empleó la misma metodología en la etapa de fermentación descrita para la construcción de las curvas de celulosa. El tiempo de cultivo se ajustó con la información obtenida en esta fase, de manera que se obtuvieran membranas con un espesor de 50μm. Este espesor se seleccionó con base en experimentos previos, donde espesores adicionales de membrana no permiten obtener flux de permeado de agua a diferentes presiones, y a espesores menores la membrana podría presentar compactación de las diferentes capas al ser sometida a diferentes presiones, de acuerdo a lo reportado por Wanichapichart y colaboradores (2002).

Las variables de cultivo son las mismas que se expusieron en el numeral 4.1.2

En cuanto a las condiciones de purificación, en la tabla 3.2 puede apreciarse una gran variedad de condiciones: El agente purificante (NaOH, dodecil sulfato de sodio, KOH, Na_2CO_3, con un amplio intervalo de concentraciones, temperatura y tiempo de exposición. Para evaluar la necesidad de emplear un agente químico, se emplearon como agentes purificantes agua destilada y soluciones de NaOH. En esta tabla puede observarse también, que para las soluciones con concentraciones inferiores a 1N de NaOH, el tiempo de purificación toma más de una hora. Pensando en el escalado, no es conveniente que el

tiempo de purificación sea tan largo; por ello se escogieron concentraciones de 1N y 5N, pues son suficientes para garantizar la purificación de la membrana y actuar sobre la estructura de la celulosa y tiempos de 10 y 30 minutos. Se escogió una temperatura intermedia (60°C) que garantice la purificación de las membranas en los tiempos asignados, y una alta (90°C) para observar el efecto de ésta sobre la estructura de la membrana. Las condiciones de purificación se resumen en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Condiciones de Purificación de la Celulosa Bacteriana

Agente Purificante	Concentración (N)	Temperatura (°C)	Tiempo de Exposición (min)
Agua Destilada		90	10
NaOH	1	60	10
	5	90	30

Los ensayos se realizaron por triplicado de manera que se asegurara reproducibilidad. En total se obtuvieron 144 membranas. Concluido el proceso de purificación, la celulosa fue lavada con agua destilada hasta eliminar por completo el agente y se secó a 30°C hasta obtener peso constante.

4.2 Caracterización Estructural

Para obtener un mejor entendimiento de la conformación estructural de las membranas obtenidas, se realizó la caracterización estructural. Las pruebas realizadas son las siguientes:

4.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido

La superficie de las membranas se estudió por medio de microscopía electrónica de barrido. Se utilizó un microscopio FEI Quanta 200. Para observar la sección transversal, las muestras fueron sumergidas durante un minuto en nitrógeno líquido, luego de lo cual se realizó el quiebre de la membrana en dirección perpendicular a la superficie y su posterior recubrimiento con una capa de oro de 300 Å (Miranda y colaboradores, 2009).

4.2.2 Difracción de Rayos X (DRX)

Esta prueba se realizó con el fin de determinar el grado de cristalinidad de las membranas. Se usó el procedimiento reportado por Watanabe y colaboradores (1998). Las pruebas se realizaron a 25°C en un equipo Rigaku modelo miniflex operado a 300 kV y 15 mA con radiación kα de cobre (1,5406Å). El intervalo de barrido fue de $5<2\theta<40$ con una velocidad de 1seg/paso.

4.2.3 Adsorción de Nitrógeno

Con el fin de investigar si las membranas presentan una estructura porosa, se realizaron pruebas de adsorción de nitrógeno. Las isotermas de adsorción de nitrógeno se obtuvieron en un equipo Autosorb 1 (Quanta Chrome) a 77 K previa desgasificación de las muestras durante dos horas. El cálculo del área superficial específica y el radio medio de poro se realizaron con el método de Brunauer, Emmett y Teller (método BET) y el método Barrett, Joyner, and Halenda (BJH) respectivamente, que se explican con detalle en las normas ASTM D4641-94 y ASTM D3663-03 (Anexos A y B).

4.2.4 Espectroscopía Infrarrojo (FT IR)

Para evaluar el grado de pureza de las membranas obtenidas y la eficiencia del método de purificación, además de apreciar cambios estructurales en la membrana, se realizaron análisis de espectroscopía infrarroja. Se cortaron muestras de membrana de aproximadamente 1cm^2 y se colocaron en un espectrómetro FT-IR Perkin Elmer Spectrum 100. Los espectros fueron registrados en el intervalo 500-4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} utilizando 16 barridos por espectro (Miranda y colaboradores, 2009).

4.2.5 Termogravimetría (TGA)

Para evaluar la estabilidad térmica de las membranas y determinar su temperatura de descomposición, se realizaron pruebas de termogravimetría. Se empleó el método reportado por George y colaboradores (2005b). Se utilizó un equipo Perkin Elmer Puris 1, en una atmósfera de nitrógeno con flujo de 20 ml/min, el calentamiento se realizó de 50°C a 600°C con una velocidad de 10°C/min.

4.2.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Esta prueba se realizó con el fin de evaluar la temperatura de transición vítrea (T_g) y la Temperatura de fusión u ordenamiento de la fase cristalina (T_m). Se empleó el método reportado por George y colaboradores (2005b). Se utilizó un equipo DSC 2910 (TA Instruments). La muestra fue pesada y colocada en una cápsula de aluminio que fue sellada.

Posteriormente se calentó bajo atmósfera de nitrógeno con un flujo de 100 ml/min. El calentamiento se efectuó de -50°C a 270°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

4.3 Determinación de las Propiedades de Transporte

Con el fin de evaluar las propiedades de transporte de las membranas obtenidas se realizaron algunas pruebas de permeación a través de ellas; estas pruebas son importantes porque permiten evaluar la capacidad de separación y determinar cuál es el proceso de separación en el que presentan mejor desempeño. Las pruebas realizadas son: grado de hinchamiento, permeabilidad hidráulica, retención de solutos, diálisis, permeación de gases y pervaporación.

4.3.1 Grado de Hinchamiento

Para determinar el grado de hinchamiento se cortaron trozos de membrana seca de 1cm^2, se pesaron y se colocaron en agua destilada y desmineralizada a 30°C durante 24 horas, al final de las cuales se secaron cuidadosamente con papel absorbente y se pesaron de nuevo (Caicedo y colaboradores, 2003). El grado de hinchamiento Q, se calculó como:

$$Q = \frac{W_h - W_s}{W_h} * 100 \qquad (4.1)$$

Donde:
Q: hinchamiento (%)
W_s: peso de la membrana seca (g)
W_h: peso de la membrana húmeda (g)

4.3.2 Permeabilidad Hidráulica

Para realizar este test, se utilizó un sistema de permeación que se encuentra en el laboratorio de Membranas y polímeros de la COPPE en la Universidad Federal de Río de Janeiro. Un esquema del sistema es mostrado en la figura 4.1. La membrana se sometió a hinchamiento con agua destilada y desmineralizada durante 24 horas previas al inicio del ensayo. Posteriormente fue colocada en la celda de permeación construida en acero inoxidable con un soporte de acero poroso, sobre el cual se coloca la membrana de celulosa y se cerró herméticamente. El área de la membrana es 20,5 cm^2. Para el ensayo se utilizó agua destilada y desmineralizada a 25°C. El sistema se inició ajustando la presión de alimentación con ayuda de la bomba y la válvula de entrada al rotámetro y se permitió la estabilización durante 30 minutos, después de lo cual se colectaron datos de peso cada 5 minutos durante una hora. Las presiones de trabajo fueron 3, 6, 9 y 12 bar.

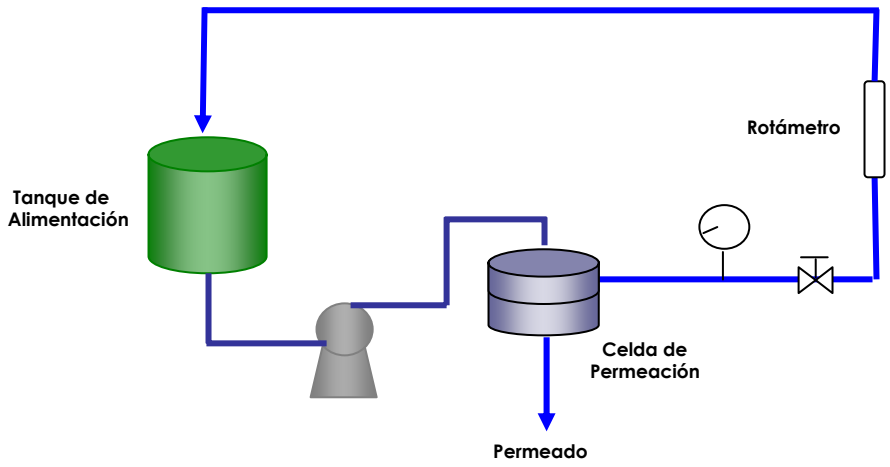

Figura 4.1. Esquema del sistema de permeación empleado en las pruebas de permeabilidad hidráulica.

El *flux* se determinó como la pendiente de la recta peso vs tiempo por unidad de área de la membrana:

$$Flux = \frac{volumen}{área * tiempo}\left(\frac{litros}{m^2 * hora}\right) \qquad (4.2)$$

El coeficiente de permeabilidad L_p se determinó como la pendiente de la recta *flux* vs presión (Wanichapichart y colaboradores, 2002):

$$J = L_p \Delta P \qquad (4.3)$$

Donde:

J: *flux*, litros $m^{-2}h^{-1}$
ΔP: presión, bar.

Esta prueba se realizó para las membranas obtenidas a partir de las tres fuentes de carbono (glucosa, sacarosa y glicerol), temperaturas de 25°C 30°C, y purificadas a las diferentes condiciones. En total se realizó la prueba de permeabilidad hidráulica a 48 membranas.

4.3.3 Retención de Solutos

Para este test se utilizó el sistema anterior, cambiando el alimento (agua), por soluciones 1%p/v de las siguientes sustancias:

- Dextrano con masa molar 70 kDa (Pharmacia AB, Suiza)
- Dextrano con masa molar 500 kDa (Pharmacia AB, Suiza)
- Alcohol polivinílico PVA con masa molar entre 85-124 kDa (Sigma Aldrich)

- Na_2SO_4 Anhidro (Vetec Química, Brasil)

La determinación de la concentración en el permeado se realizó por diferentes métodos de acuerdo con el soluto. Los métodos pueden verse en la tabla 4.2. Se construyeron curvas de calibración preparando soluciones patrón de diferentes concentraciones.

Tabla 4.2. Métodos empleados para la determinación de las concentraciones del permeado en el test de retención de solutos.

SOLUTO	DETERMINACIÓN
Dextrano	Dilución de la muestra en etanol y lectura por espectrofotometría a 485 nm
Na_2SO_4	Conductividad
PVA	Índice de Refracción

El sistema se estabilizó a la presión requerida durante 60 minutos, posteriormente se colectaron los datos con intervalos de tiempo de 15 minutos.

El coeficiente de rechazo de la membrana fue calculado como:

$$R = \left(1 - \frac{C_p}{C_a}\right) * 100 \qquad (4.4)$$

Donde:
R: Coeficiente de Rechazo, %
C_p: Concentración del soluto en el permeado
C_a: Concentración del soluto en el alimento.

4.3.4 Diálisis

Las pruebas de diálisis se realizaron para evaluar la capacidad de retención de la membrana en un sistema con un soluto en ausencia de gradiente de presión. Se emplearon un soluto orgánico, úrea (Vetec Química, Brasil) y uno inorgánico, Na_2SO_4 (Vetec Química, Brasil). El sistema utilizado es una cámara de flujo horizontal, construida en acrílico, provista de agitación en ambos lados de la cámara, como se ilustra en la figura 4.2. La membrana se sometió a hinchamiento con agua durante 24 horas previas al inicio del ensayo. Posteriormente fue colocada en la celda de permeación (área de la membrana= 63.62cm^2)y las dos cámaras se ajustaron de manera que no se presenten fugas. En el lado del alimento se colocó un litro de solución 1%p/v del soluto a probar, y en el lado del permeado se colocó un litro de agua destilada y desmineralizada. Se tomaron muestras del alimento y el permeado cada 30 minutos. La concentración de Na_2SO_4 fue evaluada por conductividad, y la de úrea por gravimetría.

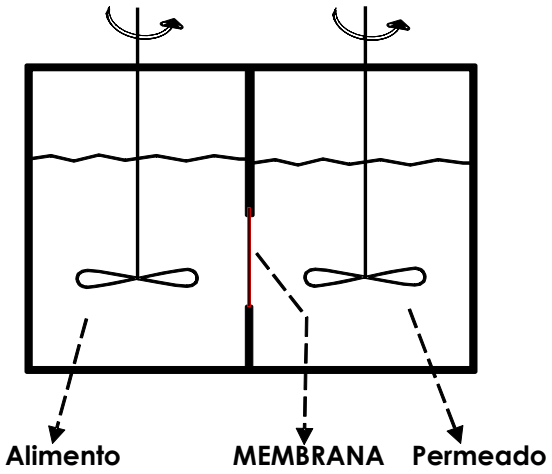

Figura 4.2 Sistema empleado en las pruebas de diálisis.

4.3.5 Permeación De Gases

Con el fin de evaluar la permeación de gas a través de la membrana y su selectividad, se realizaron pruebas de permeación de N_2, CO_2 y O_2 a 25°C. Se empleó un sistema de permeación disponible en el laboratorio de Membranas y polímeros de la COPPE en la Universidad Federal de Río de Janeiro; un esquema del sistema se presenta en la figura 4.3. La membrana seca fue colocada en la celda de permeación, construída en acero inoxidable con soporte de acero sinterizado y se cerró herméticamente. Posteriormente el sistema se sometió a vacío durante 10 minutos con el fin de eliminar residuos de gases utilizados en pruebas anteriores. Después de ajustar la presión del gas de alimentación se inició la toma de datos del permeado a través de un transductor de presión acoplado a un computador, que almacenaba los datos de corriente respecto al tiempo a través de un sistema de adquisición de datos IQ logger VmA-40. Estos datos fueron posteriormente convertidos a presión a través de una curva de calibración previamente elaborada. Se probaron membranas obtenidas a partir de las 3 fuentes de carbono.

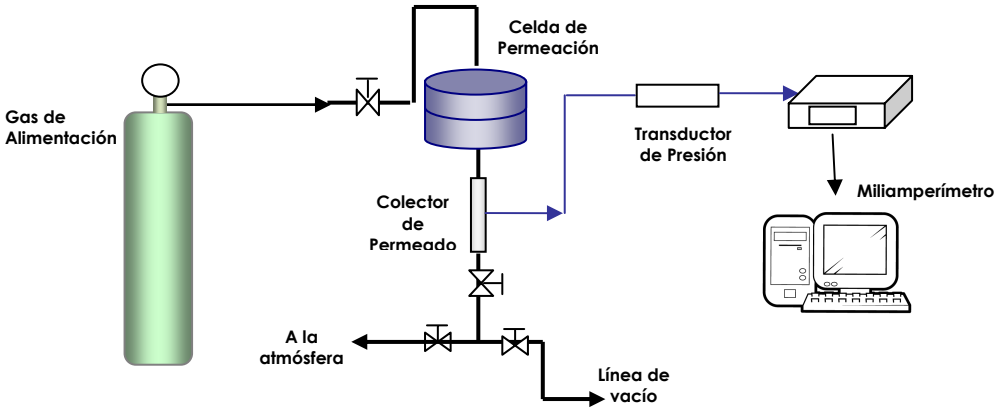

Figura 4.3 Esquema del sistema empleado en las pruebas de permeación de gases.

La permeabilidad del gas, expresada en GPU (Gas permeation Unit, $cm^3cm^{-2}s^{-1}cmHg^{-1}*10^6$) se calcula como:

$$P = \frac{dp}{dt} * \frac{V_{sistema}}{Área} * \frac{T_{CNTP}}{T_{ambiente}} * \frac{1}{p_{CNPT} * p} \qquad (4.5)$$

Donde:
P: Permeabilidad del gas, GPU
dp/dt: gradiente de presión con respecto al tiempo.
$V_{sistema}$: Volumen del colector de permeado, 12,6 cm^3.
A: Área de la membrana, 6,3 cm^2.
T_{CNTP}: Temperatura a condiciones normales de temperatura y presión, 273K.
T_{amb}: Temperatura de realización del ensayo, 303K
p_{CNTP}: Presión a condiciones normales de temperatura y presión, 76 cm Hg
p: Presión del sistema, 2 bar.

La selectividad ideal se determina como:

$$\alpha_{AB}^{ideal} = \frac{P_A}{P_B} \qquad (4.6)$$

Donde P_A y P_B son las permeabilidades de los componentes A y B puros

4.3.6 Pervaporación

Esta prueba se realizó para evaluar la capacidad de separación de las membranas en una mezcla líquida. Se utilizó etanol (Vetec Química, Brasil) y agua en una proporción 95%/5% v/v. El sistema de permeación, disponible en el laboratorio de Membranas y polímeros de la COPPE en la Universidad Federal de Río de Janeiro, se muestra en la figura 4.4. Se permitió el hinchamiento de la membrana en la mezcla 24 horas previo al ensayo. Pasado este tiempo, la membrana se ubicó en la celda de permeación, construída en acero inoxidable con soporte de acero sinterizado y se cerró herméticamente. Se ajustó la temperatura del alimento en 30°C a través de un baño termostatado; posteriormente se inició la alimentación a la celda de permeación con la ayuda de la bomba y se activó el sistema de vacío. El permeado una vez sale de la celda pasa a un sistema construido en vidrio, que posee una serie de válvulas que permiten al permeado ser colectado en uno u otro extremo. Una vez lleno el colector, se manipula el sistema de válvulas para permitir la recolección del permeado al otro lado sin necesidad de apagar el sistema.

Debido a que el permeado sale de la celda en forma de vapor, es necesario condensarlo y para ello los colectores se encuentran sumergidos en nitrógeno líquido.

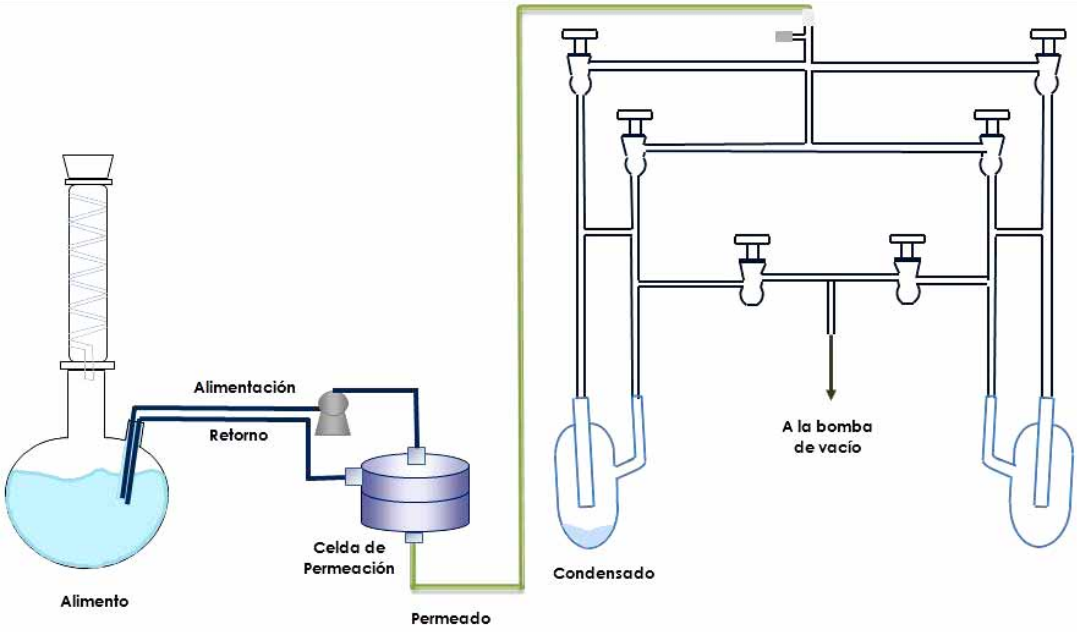

Figura 4.4. Esquema del sistema empleado en las pruebas de pervaporación.

Una vez se inició el sistema, se permitió su estabilización durante 1 hora, después de lo cual se inició la recolección de datos cada 60 minutos. Las muestras del permeado fueron pesadas con el fin de determinar el *flux*.

La composición del alimento y el permeado fue analizada por cromatografía de gases. El equipo utilizado fue un cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 500 equipado con una columna Supelco Equity ™ 17-01. La selectividad de la membrana se determinó como:

$$\alpha_{H_2O/EtOH} = \frac{Y_{H_2O}/Y_{EtOH}}{X_{H_2O}/X_{EtOH}} \quad (4.7)$$

Donde:
α : Selectividad de la membrana
Y_i, X_i: Composición de la sustancia i en el permeado y el alimento respectivamente.