

PRODUCCION DE MATERIALES CON VALOR AGREGADO A PARTIR DE
MICELIO DE ASPERGILLUS NIGER UTILIZANDO AGUA SUBCRITICA

JAIME ANDRES GARCIA DIOSA

Ingeniero Químico

UNIVERSIDAD DEL VALLE
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
GRUPO DE INVESTIGACION EN TERMODINAMICA APLICADA
SANTIAGO DE CALI

2016

PRODUCCION DE MATERIALES CON VALOR AGREGADO A PARTIR DE
MICELIO DE ASPERGILLUS NIGER UTILIZANDO AGUA SUBCRITICA

JAIME ANDRES GARCIA DIOSA

Ingeniero Químico

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Magister en Ingeniería con énfasis en Ingeniería Química

Director

GUSTAVO BOLAÑOS

Ingeniero Químico, M.Sc., Ph.D.

Escuela de Ingeniería Química

UNIVERSIDAD DEL VALLE

ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

GRUPO DE INVESTIGACION EN TERMODINAMICA APLICADA

SANTIAGO DE CALI

2016

Santiago de Cali, Enero 2016

Esta tesis titulada “Producción de materiales con valor agregado a partir de micelio de *Aspergillus niger* utilizando agua subcrítica” y elaborada por el Ingeniero Químico Jaime Andrés García Diosa, se presenta a la facultad de Ingeniería de la Universidad del Valle como requisito parcial para optar al título de Magister en Ingeniería con énfasis en Ingeniería Química.

Hemos revisado esta tesis y recomendamos su aceptación.

Gustavo Bolaños, Ph.D.
Director

NOMBRE JURADO
Jurado

NOMBRE JURADO
Jurado

RESUMEN

La quitina es un biopolímero que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, y constituye la segunda sustancia más abundante en la misma luego de la celulosa [1]. Es un polisacárido biodegradable que se encuentra presente en muchos seres vivos. Tanto el biopolímero como sus derivados tienen aplicaciones en diferentes sectores de la economía, como la industria de alimentos, la química analítica y el tratamiento de contaminantes residuales [2,3]. Sin embargo, el uso potencial más importante de estas sustancias se encuentra en aplicaciones médicas y farmacéuticas, en donde se usan en forma de fibras o películas bioabsorbibles, para la fabricación de material de vendajes, la liberación controlada de fármacos y la aceleración de la cicatrización de heridas [4].

El mercado global de la quitina y sus derivados ha venido creciendo durante la última década de una forma exponencial y hoy alcanza los US\$63000 millones [5]. Con el fin de suplir esta demanda mundial, industrialmente la quitina se obtiene de exoesqueletos de crustáceos mediante un proceso químico que usa altas cantidades de soda cáustica [6]. Este proceso posee problemas que afectan el precio final del producto, como son los altos costos de producción, la insuficiente calidad de la quitina y consecuentemente de sus derivados, los bajos niveles de producción y los elevados niveles de contaminación causados por el proceso de producción [5].

En el grupo de investigación en termodinámica aplicada se viene desarrollando un proceso para el aislamiento de quitina y complejos quitina-glucano a partir de micelio del hongo *Aspergillus niger*, un subproducto de la fabricación industrial del ácido cítrico. El proceso utiliza agua subcrítica; es decir, agua a temperaturas inferiores a la del punto crítico de esta sustancia (374 °C) y presiones suficientemente altas para que el agua se encuentre en fase líquida a la temperatura de operación. Este proceso presenta ventajas importantes: (1) se lleva a cabo con un solvente muy abundante y económico (agua); (2) requiere tiempos de residencia de pocos segundos; (3) no hay efluentes tóxicos resultantes; y (4) el proceso se lleva a cabo de manera continua, no por tandas.

En este trabajo de investigación se modificó sustancialmente un equipo experimental desarrollado en un trabajo anterior, a fin de hacer más sencilla y confiable su operación, y se desarrolló un diseño experimental para explorar el efecto de variables de operación del proceso tales como temperatura y tiempo de residencia sobre el rendimiento y propiedades del producto, el cual corresponde a complejos quitina-glucano. Se obtuvo una gran variedad de productos, cada uno con diferentes propiedades. Se observaron rendimientos entre 30% y 73%, con una proporción de quitina entre 24% y 52%, y pesos moleculares entre 798 y 24812 Da. Posteriormente se realizaron corridas experimentales adicionando hiposulfito de sodio a la mezcla reactiva micelio-agua y se concluyó que la reacción de Maillard tiene una influencia importante en las propiedades y rendimiento del producto.

Finalmente, se siguieron procedimientos reportados en la literatura para la fabricación de membranas de nanofibras, y membranas rígidas, a fin de explorar la producción de materiales de alto valor agregado a partir de los complejos quitina-glucano obtenidos. Los resultados muestran que es posible producir nanofibras por medio de ultrasonido, y además que su morfología microscópica y macroscópica depende en gran medida del solvente utilizado en el proceso y de la concentración del soluto.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus más sinceros agradecimientos:

A Dios por habernos regalado el don de la vida para lograr llevar a buen término este proyecto.

Al Director del proyecto, Dr. Gustavo Bolaños, por su apoyo, orientación y la oportunidad de realizar este proyecto.

Al grupo de investigación en termodinámica aplicada y fluidos supercríticos y todos sus integrantes, por su colaboración en las diferentes etapas del proyecto.

A Gloria Lasso y al laboratorio de investigación y docencia de la Escuela de Ingeniería Química por el préstamo de equipos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	iv
AGRADECIMIENTOS.....	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
CAPITULOS	
1. INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTOS	1
1.1 ASPERGILLUS NIGER.....	2
1.2 QUITINA.....	4
1.3 AGUA SUBCRITICA	6
1.4 INVESTIGACION PROPUESTA	9
2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	11
2.1 EQUIPO CONTINUO PARA TRATAMIENTO EN AGUA SUBCRÍTICA	11
2.2 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA MINIMA DE REACCIÓN	14
2.3 DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE REACCIÓN.....	15
2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL	17
2.5 EFECTO DE LA REACCION DE MAILLARD	19
2.6 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	19
2.6.1 Descripción del procedimiento	19

Tabla de contenido (continuación)

	Pág.
2.6.2 Caracterización química del producto	21
2.7 FABRICACION DE MEMBRANAS.....	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.1 TEMPERATURA MINIMA DE REACCIÓN.....	25
3.1.1 Espectros infrarrojo (IR)	25
3.1.2 Rendimiento y análisis elemental	27
3.2 RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	28
3.3 MODELOS ESTADÍSTICOS	34
3.4 RESULTADOS DEL ESTUDIO SOBRE INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN DE MAILLARD	37
3.5 MEMBRANAS DE COMPLEJOS QUITINA-GLUCANOS	40
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
4.1 CONCLUSIONES	44
4.2 RECOMENDACIONES.....	45
APENDICES	
A. Reactor.....	47
B. Intercambiador de calor	50
REFERENCIAS.....	56

LISTA DE TABLAS

TABLA	Pág.
1. Composición química de la pared celular del A. niger.....	3
2. Condiciones de operación de las corridas experimentales para determinar la temperatura mínima de reacción.....	15
3. Condiciones de operación y codificación de las corridas experimentales.	18
4. Resultados de los productos obtenidos de las condiciones de la Tabla 2.....	28
5. Resultados de la caracterización del producto para las diferentes corridas experimentales.....	33
6. Coeficientes del modelo matemático para cada variable de respuesta.....	34
7. Resultados de la caracterización para la emulsión con hiposulfito de sodio.....	38
8. Cuadro comparativo del rendimiento para las corridas con y sin hiposulfito de sodio.....	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
1. Esquema de la pared celular fúngica.	3
2. Estructura química de la quitina	4
3. Algunas propiedades del agua como función de temperatura y presión.	8
4. Esquema del equipo continuo para tratamiento de micelio en agua subcrítica.	12
5. Esquema del comportamiento de las temperaturas del fluido durante su paso por los sistemas de calentamiento y enfriamiento.....	16
6. Diagrama de bloques del procedimiento experimental.....	20
7. Espectros IR de los productos obtenidos en las corridas de la Tabla 2 y de la suspensión de micelio liofilizado.....	26
8. Espectros IR de los productos obtenidos en las corridas 1 a 4.	30
9. Espectro IR de los productos obtenidos en las corridas 5 a 8.....	31
10. Espectro IR de los productos obtenidos en las corridas 9 a 12.....	32
11. Superficie de respuesta y gráfica de contorno para el rendimiento	35
12. Superficie de respuesta y gráfica de contorno para la concentración de quitina.....	36
13. Superficie de respuesta y gráfica de contorno para el peso molecular.....	36
14. Espectros IR de las corridas de la Tabla 8.....	39
15. Fotografías del solido recuperado de la etapa de centrifugación para el tratamiento con ultrasonido durante A) 30 minutos y B) 60 minutos.	40
16. Fotografías e imágenes SEM de los sólidos recuperados y liofilizados tratados con ultrasonido durante	41
17. Fotografía e imágenes SEM del agua sobrenadante recuperado y liofilizado de la muestra tratada durante 60 minutos con ultrasonido.....	42
18. Fotografía e imágenes SEM de la mezcla agua sobrenadante y etanol (50:50) liofilizado.....	43

Lista de figuras (continuación)

FIGURA	Pág.
A.1. Vista frontal de A) placa central y B) placa externa de aluminio.....	48
A.2. Esquema del reactor ensamblado.	48
A.3. Fotografía del reactor montado y acoplado al equipo.....	48
B.1. Esquema lateral de un tramo del intercambiador de calor.....	50
B.2. Fotografías A) Intercambiador de calor en operación B) tubing intercambiador tramo 1 C) tubing intercambiador tramo 2.	51
B.3. Fotografía de la zona de enfriamiento del equipo.....	55

1. INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTOS

Aspergillus niger es un hongo que se utiliza en la producción industrial de ácido cítrico mediante fermentación, proceso después del cual el hongo que se recupera se conoce como “micelio”. Este material es fuente importante de quitina, un biopolímero natural muy abundante (el segundo después de la celulosa), el cual posee un número elevado de aplicaciones en el desarrollo de adsorbentes, fibras, películas, etc., para una variedad de sectores de la economía [1,2].

La quitina y sus derivados son polímeros biocompatibles, biodegradables, no tóxicos, antimicrobianos e hidratantes. Varios de ellos muestran alta biocompatibilidad y efectos positivos en la curación de heridas. En efecto, estudios preliminares han demostrado que el recubrimiento de heridas con vendajes a base de quitina puede acelerar la reparación de diferentes tejidos facilitando la contracción de las heridas, y regula la secreción de agentes inflamatorios como interleuquina 8, prostaglandina E, β interleucina 1 y otros [8]. En consecuencia, la quitina y sus derivados tienen aplicaciones sumamente importantes en ingeniería de tejidos.

El micelio de *Aspergillus niger*, al ser un subproducto industrial, posee un suministro estable, es de fácil manipulación y tiene un precio bajo, 12.5 US\$/ton [9]. Este precio contrasta con el valor de la quitina comercial, la cual se cotiza a valores entre 10 y 60 US\$/kg [10], esto permite observar que existe un potencial económico importante en la producción de quitina o quitosano, particularmente en regiones donde se cuenta con plantas de ácido cítrico, tal como en el Valle del Cauca.

A nivel mundial el mercado del quitosano, que es el principal derivado de la quitina, fue de 13700 toneladas en el año 2010, y se estimó en 21400 toneladas para el 2015. Este aumento de la demanda representa un crecimiento exponencial del mercado debido al gran número de aplicaciones novedosas para estos biopolímeros, lo que traduce para el año 2015 un mercado global para la quitina y sus derivados de US\$63000 millones [5].

La separación de la quitina y su posterior transformación a quitosano, no obstante, se suele realizar mediante la utilización de grandes cantidades de soda cáustica, entre dos y

cinco veces la cantidad de micelio en base seca [6], lo cual conlleva problemas significativos de manejo y disposición de efluentes líquidos. Por ello, es deseable desarrollar un proceso que no posea tales problemas de manejo ambiental.

En este proyecto se estudió la obtención de la quitina y complejos quitina-glucanos a partir de micelio de *Aspergillus niger* utilizando las propiedades del agua a condiciones subcríticas, principalmente su facilidad para romper enlaces químicos. Este método resulta ser mucho más conveniente en términos económicos para producción industrial, al no requerir ni producir sustancias tóxicas y al usar el solvente más abundante y barato del planeta: agua. Adicionalmente, se estudió la fabricación de membranas de nanofibras de complejos quitina-glucanos, como un primer paso hacia el desarrollo de vendajes para el recubrimiento de heridas.

1.1 ASPERGILLUS NIGER

La Figura 1 muestra un esquema de la pared celular fúngica. Esta es una estructura con gran plasticidad, que da forma a la célula, controla su permeabilidad y la protege de cambios osmóticos. Está compuesta básicamente por polisacáridos (quitina, glucano, manano, entre otros) y proteínas que generalmente están asociadas a éstos formando glucoproteínas [11]. La capa externa está formada por un complejo de manoproteínas y glicoproteínas, que se une en forma directa con los 1-3 β -glucanos, o en forma indirecta con los 1-6 β -glucanos. Por su parte, la capa interna está constituida por un complejo conformado por β -glucanos (1-3, 1-6) unidos a la quitina por los extremos no reductores [12]. Se conoce que la quitina es la responsable de la rigidez y forma de la pared celular [13,14].

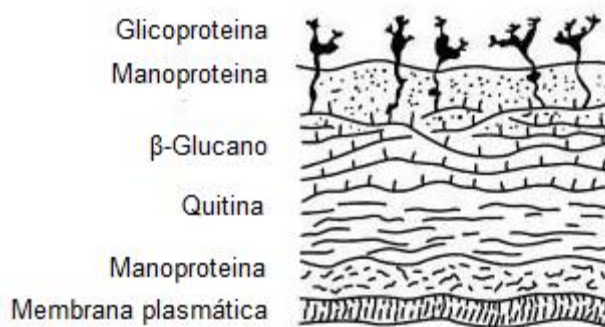


Figura 1. Esquema de la pared celular fúngica [15].

La Tabla 1 muestra la composición química de la pared celular del *A. niger*. Está compuesta básicamente de polisacáridos heteropoliméricos, lípidos, quitina, proteínas y ácidos nucleicos y minerales [13,14]. Stagg [16] afirma que la pared celular puede dividirse en una parte álcali-soluble y otra álcali-resistente. La primera puede disolverse en agua caliente, fenol o álcali; la segunda no es soluble en estos componentes y está compuesta por glucanos (52.4%), quitina (29.4%) y trazas de galactosa y manosa. Los glucanos insolubles corresponden al 58.7% del total de los glucanos presentes en la pared celular.

Tabla 1. Composición química de la pared celular del *A. niger* [14].

Compuesto		Concentración (%)
Azúcares		45.5 a 51.3
D-glucosa	D-galactosa	
D-manosa	D-arabinosa	
D-glucosamina	D-galactosamina	
Lípidos no ligados		7.4
Lípidos ligados		11.5
Quitina		14.7 a 18.2
Proteína		8.3
Cenizas		4.0
Ácidos nucleicos		0.2 a 0.35

1.2 QUITINA

La quitina es un biopolímero de N-acetilglucosamina y residuos de glucosamina que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, y constituye la segunda sustancia más abundante en la misma, luego de la celulosa [1]. Es un polisacárido no tóxico y biodegradable que forma una sustancia córnea y se encuentra presente en muchos organismos vivos.

La Figura 2 muestra la estructura química de la quitina. Su nombre químico es (1-4)-2-acetamino-2-deoxy- β -D-glucano [17]. Una comparación entre los valores estimados del análisis elemental de un espécimen de quitina purificada con los valores teóricos para acetil-glucosamina sugiere que la quitina está unida con acetil-glucosamina, glucosamina y moléculas de agua. Varios autores han estimado que la quitina contiene 82.5% de acetil-glucosamina, 12.5 % de glucosamina y 5% de agua [17].

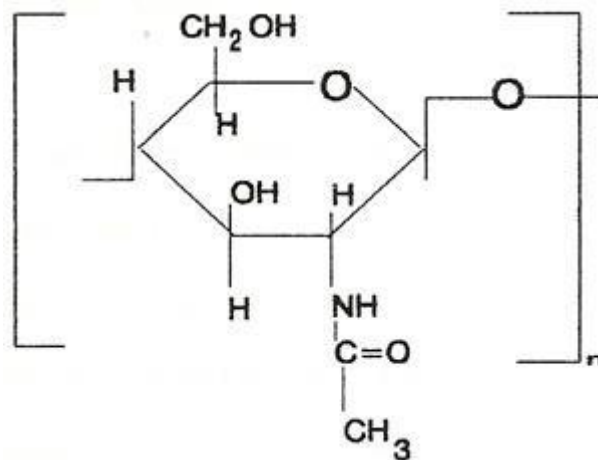


Figura 2. Estructura química de la quitina [17]

La quitina se encuentra presente tanto en el reino animal como en el vegetal. En animales inferiores, la quitina existe como la mayor sustancia esquelética orgánica de invertebrados y se encuentra principalmente en anélidos, artrópodos y moluscos; y en menor grado en celenterados y nemátodos [18]. La quitina también se encuentra asociada a

otros constituyentes, tales como lípidos y proteínas, recubriendo las paredes de estómago, de tráquea, y en uniones de músculos, esqueletos internos y alas.

En el reino vegetal su presencia se limita a hongos (*Eumycetes*) y algas verdes (*Chlorophyceae*). Todos los hongos con excepción a los *Ooomycetae* y *monoblepharideae* en *phycomycetes*; y *saccharomycetes* y *laboulbeniales* en *ascomicetes*, tienen paredes celulares quitinosas, pero se encuentra asociada estrechamente con otras sustancias orgánicas como el glucano. No obstante, la mayor cantidad de quitina en el mundo se obtiene de crustáceos y hongos [17]. Las dificultades encontradas en el aislamiento de la quitina probablemente son inherentes a métodos basados en la remoción de contaminantes, más que por la extracción del material requerido.

La quitina se obtiene como un sólido amorfo, casi insoluble en agua, ácidos diluidos, álcalis concentrados, alcohol y otros solventes orgánicos. Puede disolverse en ácido clorhídrico o sulfúrico concentrado pero presenta degradaciones apreciables de la cadena. Es soluble en ácido fórmico, ácido metanosulfónico, N,N-dimetilacetamina con 5% de cloruro de litio, alcohol hexafluoroisopropílico, hexafluoracetona y una mezcla de 1,2-dicloroetano y ácido tricloroacético [17].

La quitina se ha convertido en tema de estudio de muchos investigadores y aunque solo se disuelve en algunos solventes, se le ha encontrado diversas aplicaciones. Una de ellas, aunque no la más común, es su utilización en la fabricación de columnas de cromatografía [4]. También se usa en la inmovilización de enzimas para la industria alimenticia, en la clarificación de jugos de frutas y en el procesamiento de leche [2]. Asimismo, la quitina se usa en el tratamiento de contaminantes industriales, incluyendo líquidos de desecho con bajo nivel radioactivo [3] y como adsorbente de complejos de tiosulfato de plata y algunos actínidos.

La quitina se puede procesar para producir películas o fibras, las cuales tienen propiedades antialérgicas, desodorantes, antibacteriales y de control de humedad. Los derivados de estas fibras se usan como aglutinantes en el proceso de fabricación de papel [4]. Sin embargo, el uso potencial más importante de la quitina se encuentra en aplicaciones médicas y farmacéuticas, en donde se usa en forma de fibras o películas, para

la fabricación de material de vendajes, la liberación controlada de fármacos y la aceleración de la cicatrización de heridas [4]. Sus propiedades mecánicas la hacen una buena opción para fabricar materiales de sutura para cirugía. Según se reporta en la literatura [7], su uso para este propósito en 132 pacientes fue satisfactorio en términos de reacción de tejidos y cicatrización, indicando una biocompatibilidad satisfactoria. Las pruebas de toxicidad, pirogenicidad y mutagenicidad fueron negativas en todos los aspectos.

La quitina también se usa como excipiente en forma de película, gel o polvo para aplicaciones que implican mucoadhesividad. Otro uso interesante es en mezcla con hidroxiapatita y quitosano, para formar una pasta de auto-endurecimiento para la regeneración ósea guiada en el tratamiento de defectos óseos periodontales [4].

1.3 AGUA SUBCRITICA

Se conoce como agua en estado subcrítico, la que se encuentra a temperaturas y presiones cercanas pero inferiores a las de su punto crítico (374 °C y 3204 psi); es decir, temperaturas entre 150 y 374 °C, y presiones superiores a la presión de vapor correspondiente a la temperatura de operación, para garantizar la existencia de la fase líquida. Al ser económica, atóxica y no inflamable, esta sustancia ha venido ganando cada vez más atención como solvente amigable con el medio ambiente y como medio de reacción, haciéndola atractiva para una gran variedad de aplicaciones, particularmente en el ámbito de la “química verde” [19].

La Figura 3 muestra algunas propiedades del agua como función de la temperatura y de la presión. A condiciones subcríticas, la molécula de agua sufre una reorganización estructural, que modifica de forma considerable sus propiedades [20]. A medida que aumentan la temperatura y la presión, disminuyen drásticamente la constante dieléctrica, la viscosidad y la densidad, convirtiendo el agua en un medio que permite llevar a cabo reacciones más rápidas, homogéneas y eficientes [21].

El agua a condiciones ambiente es buen solvente de sales, pero no de hidrocarburos y gases. Sin embargo, a 200 °C y 220 psi su capacidad para disolver compuestos apolares se

asemeja a la del metanol a presión atmosférica y temperatura ambiente [20,21]. Lo anterior se debe a que a medida que aumenta la temperatura, aumenta la energía cinética molecular y se induce un campo eléctrico que modifica la distribución de carga de las moléculas. Esto origina la ruptura de los puentes de hidrógeno, lo cual cambia la polaridad del agua y aumenta su capacidad para disolver compuestos apolares y gases [21].

En efecto, el agua subcrítica se ha utilizado ampliamente para la extracción de compuestos orgánicos, tales como naftalenos, clorofenoles, pesticidas y antioxidantes, ya que no sólo es altamente eficiente, sino que además presenta ventajas en comparación con otros solventes orgánicos por ser más económica y permitir la recuperación de solutos sin necesidad de implementar etapas adicionales de separación [20].

La elevada temperatura favorece la capacidad de autodisociación del agua, aumentando la producción de iones hidronio e hidroxilo. Esto hace que el agua funcione como reactivo y catalizador en diversos tipos de reacciones, haciendo innecesaria la adición de ácidos, bases o compuestos organometálicos. Es por ello que se ha empleado para promover reacciones de hidrólisis de aminas, ésteres y aminoácidos, al igual que síntesis de amidas y alquilación de Friedel-Crafts [21]. Actualmente se investiga su aplicación en reacciones de conversión de biomasa y tratamiento de aguas [22].

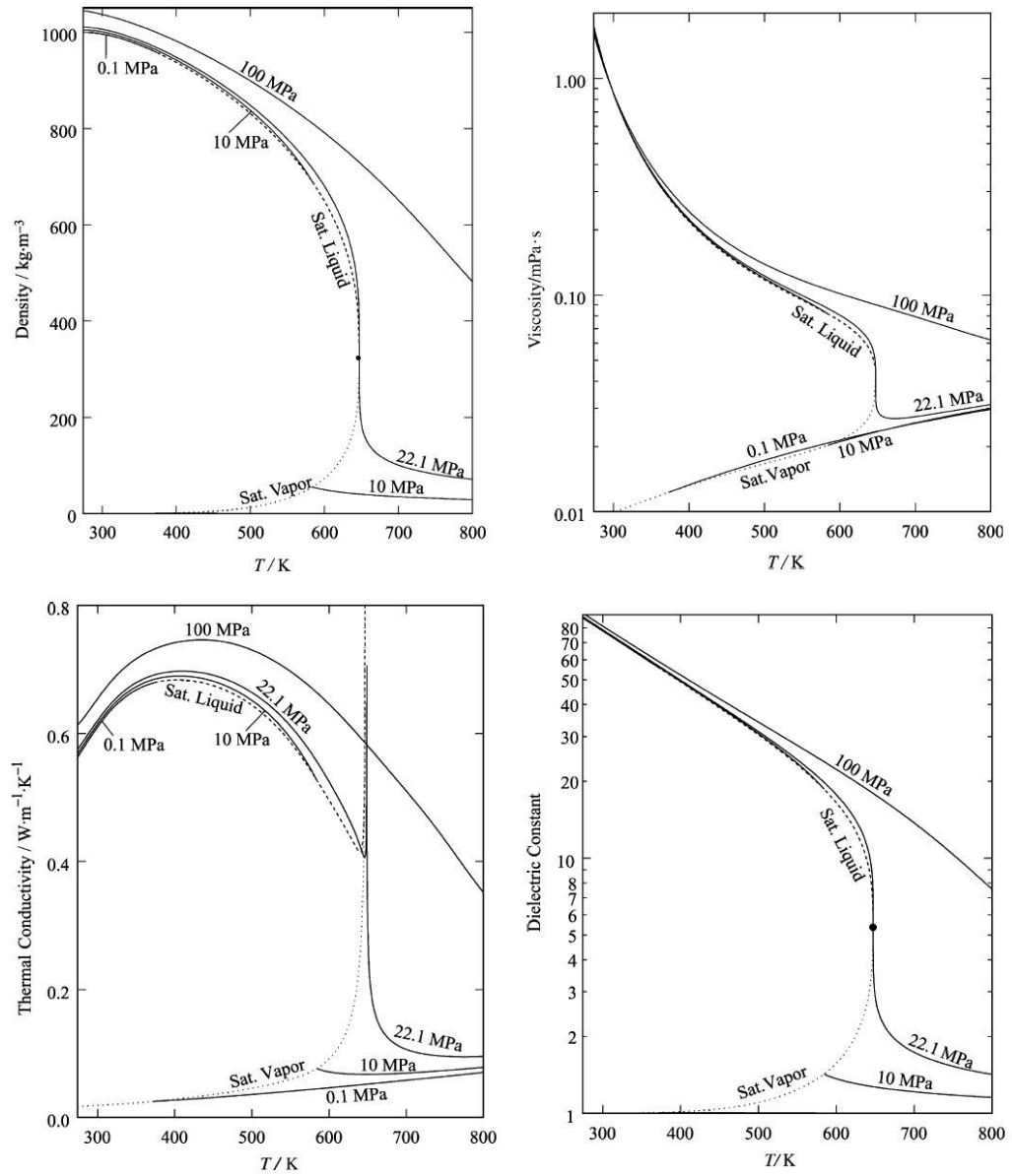


Figura 3. Algunas propiedades del agua como función de temperatura y presión [23].

1.4 INVESTIGACION PROPUESTA

Desde hace varios años se han venido desarrollando procesos para la obtención de quitina y quitosano a partir de micelio de *Aspergillus niger*, muchos de ellos por vía química o enzimática [24–26]. Sin embargo, en las plantas industriales dedicadas a la producción de quitina o quitosano usando soda cáustica para procesos de desproteínización o deacetilación, se requieren tiempos prolongados de reacción (1 a 24 horas), obteniendo al final un efluente básico, que debe neutralizarse y tratarse para su reutilización o para evitar la contaminación del medio ambiente [1].

Según un reporte de *Global Industry Analysts, Inc.* [5], los mayores problemas que impactan el mercado de la quitina y sus derivados son el alto costo de producción, la falta de la calidad del producto en el mercado, la escasa producción y la elevada contaminación durante el proceso de producción, todos estos problemas relacionados con el método químico de obtención tradicional y la fuente de la materia prima (crustáceos). Por esta razón la investigación de nuevos métodos de producción de quitina y sus derivados, así como el uso de fuentes alternas de materia prima, han sido el foco de investigación y de interés a nivel mundial en los recientes años. Entre ellos se encuentra el proceso enzimático, el cual no ofrece altos rendimientos comparados con los del método de reacción alcalina. Además, el costo de las enzimas es bastante elevado con relación al de los reactivos químicos [25].

En la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad del Valle, el grupo de investigación en termodinámica aplicada y fluidos supercríticos que dirige el Dr. Gustavo Bolaños ha propuesto un proceso que permite producir complejos quitina-glucanos a partir de micelio de *Aspergillus niger* utilizando agua subcrítica [27]. Entre las características del proceso se destacan el no emplear sustancias diferentes al agua, y los bajos tiempos de reacción (del orden de pocos segundos). Este proceso recientemente ha sido objeto de una solicitud de patente colombiana [28] y de otra solicitud de patente internacional vía PCT [29].

Para esta investigación se planteó como objetivo general: Estudiar la posibilidad de producir materiales con valor agregado a partir de micelio de *Aspergillus niger* mediante

reacción en agua subcrítica. Como objetivos específicos se consideraron los siguientes:

1. Modificar el aparato continuo de reacción en agua subcrítica existente, con el fin de:
 - i. incluir una zona de precalentamiento de controlada.
 - ii. controlar con mayor precisión la temperatura promedio de reacción.
 - iii. mejorar la zona de enfriamiento en términos de transferencia de calor y de evitar taponamientos de la línea.
2. Evaluar la posible importancia de la reacción de Maillard a las temperaturas y presiones de operación del proceso.
3. Explorar la producción de membranas a partir del producto obtenido de la reacción en agua subcrítica.

2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

En este capítulo se presenta una descripción detallada del equipo utilizado para llevar a cabo la reacción del micelio en agua subcrítica de forma continua. Se definen las variables de control, rangos de temperatura y de tiempo de reacción en que se realiza el diseño experimental; por último, se describe el procedimiento experimental realizado para el estudio.

2.1 EQUIPO CONTINUO PARA TRATAMIENTO EN AGUA SUBCRÍTICA

La Figura 4 muestra un esquema del equipo continuo para tratamiento de micelio en agua subcrítica, el cual se rediseñó y se modificó partiendo del equipo construido previamente por Ordoñez y García [27] en el grupo de investigación. El equipo está diseñado para operar a temperaturas hasta 350 °C, presiones hasta 4200 psi, y tiempos de residencia hasta 50 segundos. Las especificaciones técnicas y los detalles de diseño de las modificaciones realizadas al equipo se muestran en los Apéndices A y B.

La parte inicial del equipo es un sistema de bombeo de agua que está conformado por un recipiente de PVC en donde se almacena el agua, la cual se bombea mediante una bomba dosificadora MiltonRoyB (Modelo MBP0518HCBM4TLNNCEST11). La bomba posee una perilla que permite regular el flujo mediante el ajuste de la carrera del pistón entre 0 y 100%. Para mantener una cabeza de presión constante durante el bombeo, el recipiente de PVC se mantuvo presurizado con aire seco a 15 psig. Después de la bomba hay una válvula de alivio que se abre a 4000 psig para proteger la integridad mecánica del equipo en caso de alguna sobrepresurización.

El agua bombeada a alta presión se puede dirigir directamente al precalentador para alcanzar estado estacionario antes de la inyección del micelio, o a un inyector de micelio una vez se ha alcanzado estado estacionario. El inyector de micelio está conformado por un cilindro de alta presión fabricado en el laboratorio a partir de *tubing* de alta presión de 1", el cual contiene un pistón móvil.

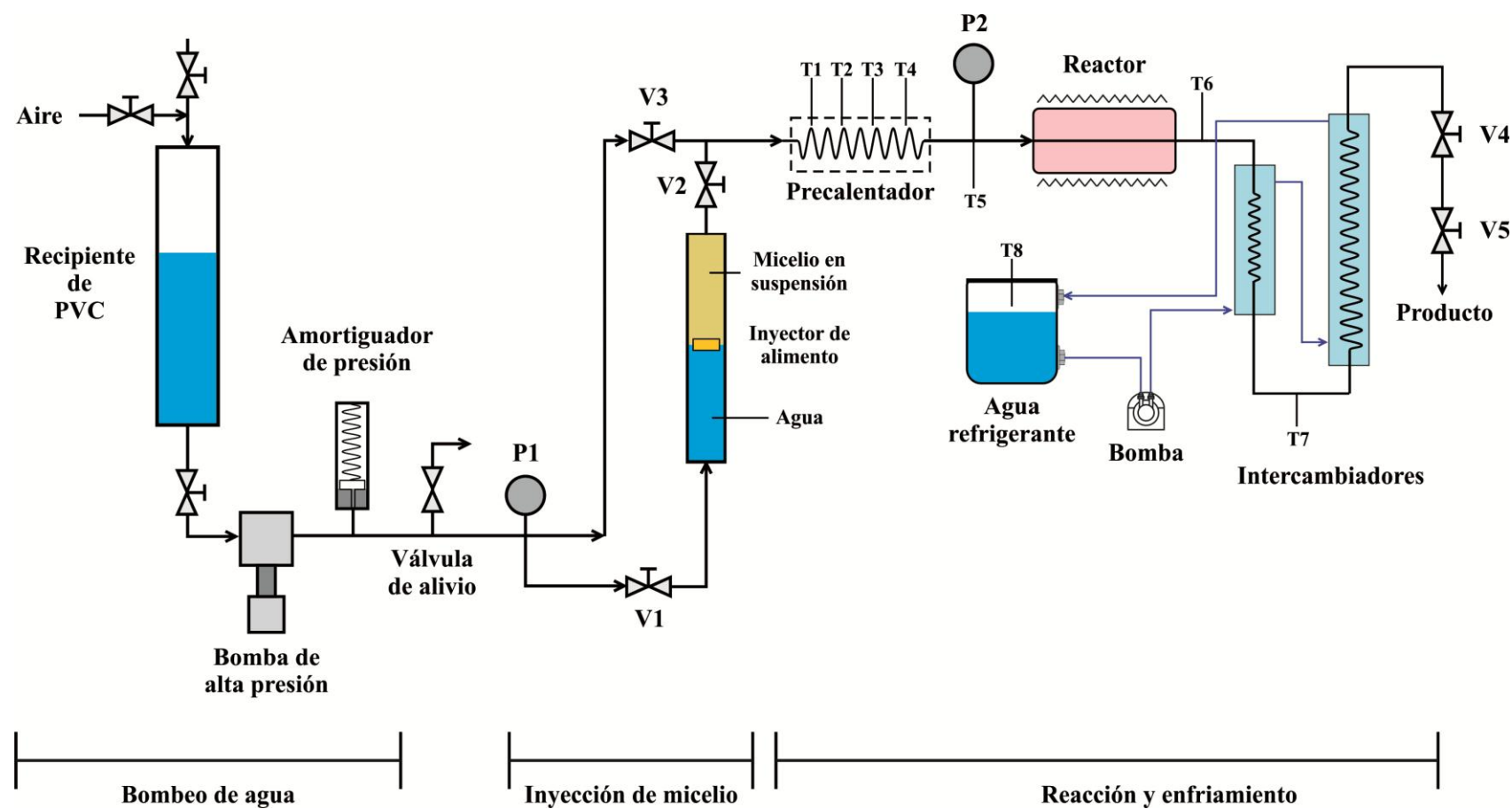


Figura 4. Esquema del equipo continuo para tratamiento de micelio en agua subcrítica.

Antes de cada corrida el cilindro con el pistón en el fondo se llena con una suspensión acuosa de micelio. La formulación de esta suspensión se encontró mediante experimentación, y corresponde a 91% agua destilada, 8.2% micelio seco y 0.7% nonilfenoletoxilato (arkopal) como emulsificante. Durante una corrida la inyección de dicha suspensión a la zona de reacción se efectúa bombeando agua a presión a la parte inferior del inyector mediante la bomba dosificadora. En esta forma, el inyector de micelio funciona como una jeringa y evita que la suspensión de micelio entre en contacto directo con la bomba.

El precalentador se construyó a partir de una pieza de *tubing* de alta presión de 1/8" de diámetro externo y 84 cm de longitud. El *tubing* se enrolló en un cilindro sólido de bronce en el cual se maquinaron estrías de sección semicircular, de 1/16" de radio, dentro de las cuales se insertó el *tubing*. El precalentador se calentó eléctricamente con una resistencia tipo cartucho de 1000 W, conectado a un controlador de temperatura PID con su respectiva termocupla tipo K como elemento sensor del ciclo de control.

La suspensión de micelio caliente se envía al reactor, el cual consta de dos placas de aluminio, cada una de 20 cm x 12 cm x 2 cm, calentadas por dos resistencias eléctricas de placas, de 250 W cada una. Entre las placas se construyó un canal, de tal manera que el *tubing* de alta presión de 1/8" estuviera en contacto con las placas, para mantener constante la temperatura del fluido que pasa por el *tubing*.

El fluido caliente que sale del reactor se hace pasar por un intercambiador de calor, que utiliza como medio refrigerante agua a aproximadamente 15 °C. El intercambiador está dividido en dos tramos. El primer tramo tiene un recorrido efectivo de 35 cm de *tubing* de alta presión de 1/8" y el segundo tramo tiene 223 cm de distancia efectiva. A la salida del segundo tramo se incluyó una válvula de aguja que permite regular flujo y presión del fluido durante la operación.

La temperatura en puntos claves del proceso se registró mediante 8 termocuplas tipo K, las cuales se distribuyeron de la siguiente manera: cuatro termocuplas sobre la pared del *tubing* del precalentador a 10, 42, 66 y 82 cm, respectivamente, desde el punto en el cual el *tubing* entra en contacto con el cilindro de bronce; una termocupla a la salida del

precalentador; una a la salida del reactor y otra más al final del primer tramo del intercambiador de calor; y por último, una termocupla en el tanque de agua refrigerante del intercambiador. Todas las temperaturas se registraron a intervalos de 1 s y se almacenaron usando un *Datalogger* (Graphtec GL220).

2.2 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA MINIMA DE REACCIÓN

Para conocer la temperatura a la cual la reacción del micelio en agua subcrítica se torna relevante y existe una ruptura significativa de los enlaces químicos de la pared celular del *A. niger* (ruptura esencial para obtener un producto rico en quitina), se realizaron corridas experimentales a diferentes temperaturas, manteniendo constante el tiempo de reacción. El producto obtenido se caracterizó mediante análisis químicos, principalmente análisis elemental (CNH) y espectroscopía FTIR, para identificar los cambios químicos en el producto.

La Tabla 2 muestra las condiciones de operación de las corridas experimentales para determinar la temperatura mínima de reacción. Se definió un tiempo de residencia para estas corridas de aproximadamente 10 s, el cual se mantuvo constante, y se varió la temperatura entre 150 y 240 °C. Este intervalo de temperaturas se estableció con base en el resultado de otros estudios científicos publicados, en los cuales se estudió el comportamiento de algunos biopolímeros en agua subcrítica o supercrítica [19,30,31].

Tabla 2. Condiciones de operación de las corridas experimentales para determinar la temperatura mínima de reacción

Código corrida experimental	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (s)
T1	150	10 - 12
T2	180	10 - 12
T3	200	10 - 12
T4	220	10 - 12
T5	240	10 - 12

2.3 DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE REACCIÓN

La Figura 5 muestra un esquema del comportamiento de las temperaturas del fluido durante su paso por los sistemas de calentamiento y enfriamiento. Evidentemente, existe un perfil de temperatura al cual se ve sujeta la suspensión reaccionante durante su paso por las diferentes secciones del equipo, por lo cual se hace necesario determinar un valor promedio de la temperatura de reacción.

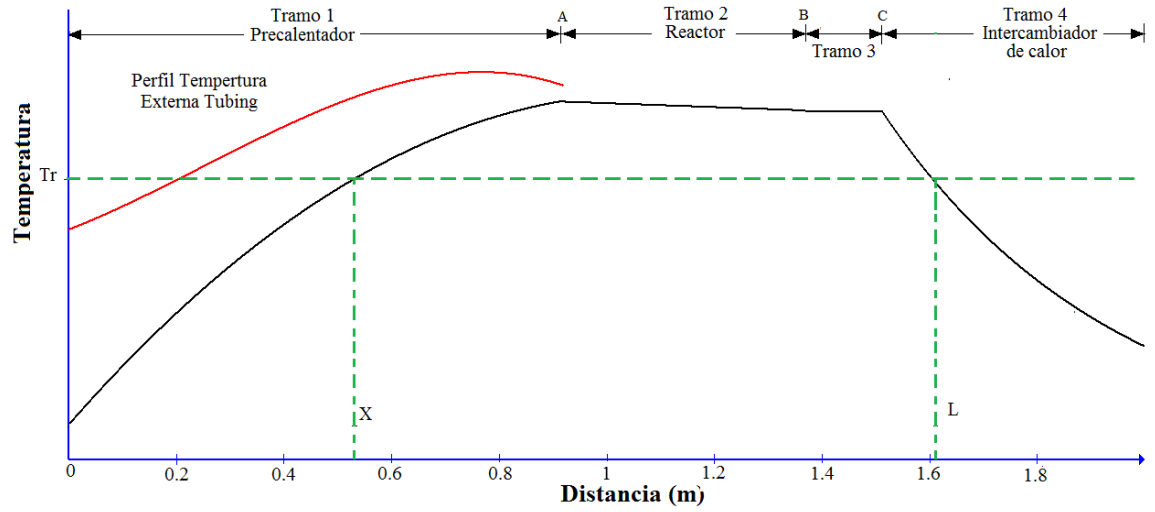


Figura 5. Esquema del comportamiento de las temperaturas del fluido durante su paso por los sistemas de calentamiento y enfriamiento.

El cálculo de la temperatura promedio durante la etapa de reacción se dividió en 4 etapas, cada una con su respectivo perfil de temperatura:

$$\bar{T} = \frac{1}{L-X} \left[\int_X^A T_{f1}(x) dx + \int_A^B T_{f2}(x) dx + \int_B^C T_{f3}(x) dx + \int_C^L T_{f4}(x) dx \right] \quad (1)$$

donde:

L = Distancia desde la entrada al precalentador hasta el punto donde el fluido se encuentra a una temperatura igual o mayor a la temperatura de reacción en el intercambiador de calor,

X = Distancia desde la entrada al precalentador hasta el punto donde el fluido alcanza la temperatura de reacción en el reactor,

A = Distancia desde la entrada al precalentador hasta la entrada al reactor (tramo1),

B = Distancia desde la entrada al reactor hasta la salida del mismo (tramo 2),

C = Distancia desde la salida del reactor hasta la entrada del intercambiador de calor (tramo 3).

T_{fi} = Perfil de temperatura del fluido en la sección i del aparato.

La distancia resultante de la resta entre L y X es el trayecto total en el cual el fluido se encuentra a una temperatura mayor o igual a la temperatura mínima de reacción (T_r). Como se mencionó, dicha temperatura es aquella a la cual la ruptura de enlaces químicos de la pared celular del micelio de *A. niger* comienza a ser relevante.

El perfil de temperatura del líquido en el precalentador se determinó usando datos de la temperatura superficial externa del reactor, medida por cuatro termocuplas ubicadas en diferentes puntos del reactor, junto con el balance de energía y la ecuación de transferencia de calor en un tubo [32]. El perfil de temperatura del fluido en el reactor y en el intercambiador de calor se calculó midiendo los cambios de temperatura del producto directamente con las demás termocuplas.

El tiempo de reacción promedio se definió entre el momento en el cual la temperatura del fluido alcanza el valor de la temperatura mínima de reacción en el precalentador, y el momento en que la temperatura desciende nuevamente hasta el valor mínimo en el intercambiador de calor. En consecuencia el tiempo de reacción promedio es la sumatoria de 3 tiempos de residencia en zonas diferentes: precalentador, reactor e intercambiador. Se calculó por medio de la ecuación:

$$\bar{t} = \frac{(A-X)A_T}{\bar{Q}_p} + \frac{(C-A)A_T}{\bar{Q}_r} + \frac{(L-C)A_T}{\bar{Q}_i} \quad (2)$$

donde:

A_T = área transversal del *tubing*,

$\bar{Q}_j$ = Caudales promedio del fluido en el precalentador (p), reactor (r) e intercambiador (i), respectivamente (es decir, solo en los trayectos donde la temperatura del fluido es mayor a la temperatura mínima de reacción).

2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar la separación efectiva de la quitina o complejo quitina glucano de la pared celular del *A. niger*, se realizaron corridas experimentales de acuerdo un diseño

central compuesto, el cual consta de un diseño factorial 2^2 aumentado con cuatro réplicas en los puntos centrales y de 4 puntos estrella. La Tabla 3 muestra las condiciones de operación y codificación de cada corrida experimental. En ella las corridas codificadas con las letras a, b y su combinación representan las corridas factoriales, los puntos p1, p2, p3 y p4 corresponden a los puntos centrales y los puntos estrella se representan como o1, o2, o3 y o4. Las variables de respuesta en cada corrida experimental son el rendimiento de producto, el peso molecular y la concentración de quitina. La presión de operación en todas las corridas se mantiene en 3000 psig, esta presión está por encima de la presión de vapor del agua y permite mantener la mezcla reactante en fase líquida.

Tabla 3. Condiciones de operación y codificación de las corridas experimentales.

Número de Corrida	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (s)	Código
1	230	6.0	(1)
2	230	12.0	a
3	250	6.0	b
4	250	12.0	ab
5	240	9.0	p1
6	240	9.0	p2
7	240	9.0	p3
8	240	9.0	p4
9	240	5.5	o1
10	254	6.5	o2
11	240	12.5	o3
12	226	6.5	o4

2.5 EFECTO DE LA REACCION DE MAILLARD

La técnica de extracción en agua subcrítica utiliza agua a temperaturas entre 100 y 374 °C a presiones lo suficientemente elevadas para encontrarse en estado líquido. Durante el proceso de extracción algunos componentes de la materia prima pueden interactuar con las sustancias nuevas formadas, produciendo componentes con propiedades y estructura diferentes al producto objetivo. En particular, se conoce que la reacción de Maillard es una reacción muy frecuente entre grupos carbonilos (como azúcares reductores) y un grupo amino (como amidas), que ocurre durante el calentamiento, almacenamiento prolongado, cocina doméstica y en el proceso industrial de alimentos, causando un pardeamiento no enzimático [34]. Concebiblemente, durante la reacción del micelio del *A. niger* en agua subcrítica podría ocurrir la reacción de Maillard debido a la interacción del grupo amino de la quitina con los azúcares reductores presentes, promovido por las altas temperaturas de las corridas experimentales. En efecto, aunque en forma muy escasa, en la literatura se ha reportado información sobre el efecto del agua subcrítica en la reacción de Maillard [33].

Para evaluar si la reacción de Maillard hace parte de la reacción en el medio subcrítico junto con la hidrólisis en el proceso estudiado, se realizaron corridas a condiciones muy semejantes a las corridas 1 a 4 de la Tabla 3 adicionando hiposulfito de sodio (en proporción del 1%) a la suspensión reaccionante, con el propósito de inhibir la reacción de Maillard y comparar el producto obtenido en estas condiciones con el producto obtenido sin adicionar hiposulfito de sodio. El método de caracterización fue el mismo realizado para las corridas del diseño experimental (análisis elemental, FTIR y rendimiento), que se describen más adelante.

2.6 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.6.1 Descripción del procedimiento

La Figura 6 muestra un diagrama de bloques del procedimiento experimental que

se siguió en este proyecto. Primero, el micelio de *Aspergillus niger* suministrado por Sucroal S.A., el cual se recibió húmedo, proveniente de la filtración del caldo de fermentación, se sometió a cinco lavados con agua destilada para remover impurezas solubles. Posteriormente, el micelio se secó en dos etapas: la primera en un horno de vacío y la segunda en un lecho fluidizado. El horno de vacío (JP Inglobal cia. Ltda) se operó a 65 °C y 0.2 atm, por 5 horas aproximadamente, e inmediatamente se traspasó el micelio caliente al lecho fluidizado (construido en el laboratorio a partir de un tubo de PVC de 3”) para finalizar el secado con aire seco a temperatura ambiente. El material seco se tamizó y se colectó el pasante malla 16 de la serie Tyler (diámetro promedio de partícula 1 mm), para servir como materia prima para elaborar la emulsión de micelio. Se trata de un sólido color marrón claro con una humedad absoluta de 14.3%, el cuál se almacenó a -20 °C antes de su utilización.

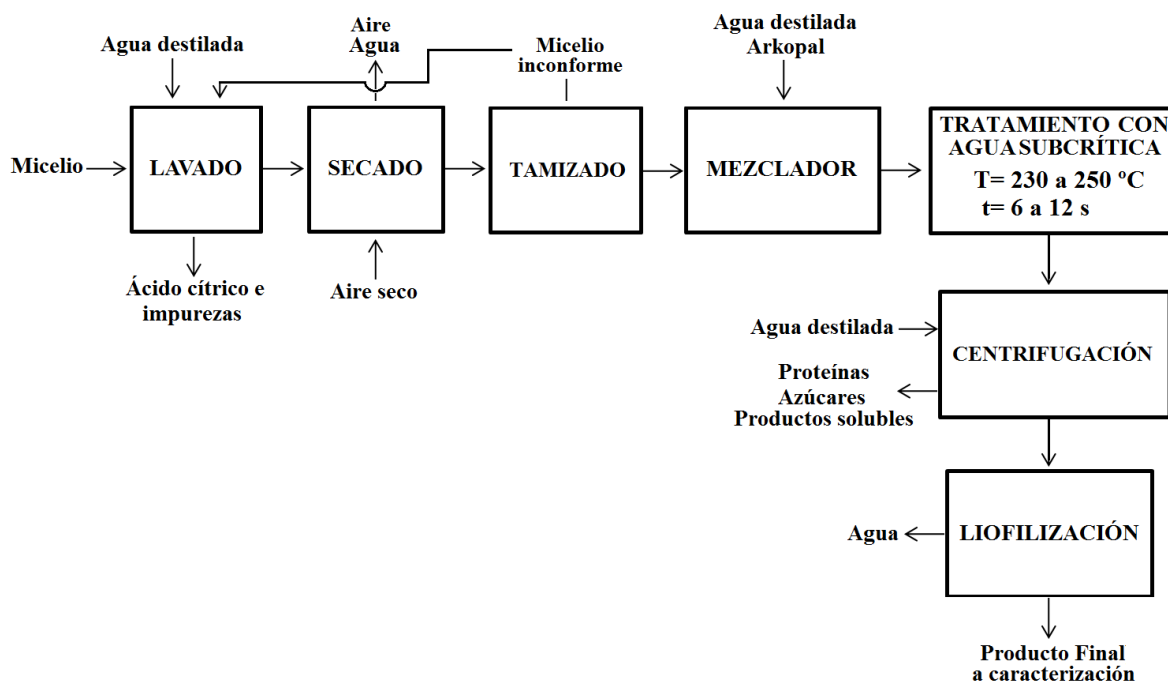


Figura 6. Diagrama de bloques del procedimiento experimental.

El micelio lavado, seco y tamizado se usó para preparar una suspensión acuosa para alimento al sistema de tratamiento en agua subcrítica. Mediante experimentación se encontró que una formulación adecuada de tal suspensión corresponde a 91.01% agua destilada, 8.24% micelio seco y 0.74% arkopal (como emulsificante). Ésta formulación permite que la suspensión permanezca estable por lo menos por 24 horas.

La suspensión del micelio se sometió al proceso de tratamiento en agua subcrítica, a temperaturas entre 230 y 250 °C y tiempos de reacción entre 6 y 12 s. Los productos de reacción se sometieron entonces a centrifugación a 2000 rpm por 10 min, para remover productos solubles, como proteínas y azúcares. Se usaron 5 centrifugaciones, lavando cada vez el sólido con agua destilada. La fase sólida resultante se almacenó a -20 °C por 24 horas o más y posteriormente se terminó de congelar usando nitrógeno líquido para someterla a liofilización. El sólido resultante se sometió finalmente a análisis químicos para su caracterización.

2.6.2 Caracterización química del producto

El producto liofilizado sirvió de base para calcular el rendimiento del proceso y para obtener una caracterización química, como se discute a continuación.

Rendimiento. El rendimiento de producto referente a la cantidad de micelio procesado se calculó sabiendo que la cantidad de micelio en base seca presente en la suspensión equivale al 7.06% en peso de la misma. Se usó la ecuación:

$$R = \frac{W_C}{W_m} \times 100\% \quad (3)$$

donde:

R = rendimiento del proceso (%),

W_C = cantidad de producto final sólido obtenido (g),

W_m = cantidad de micelio en base seca tratado (g).

Espectroscopía infrarroja (IR). La espectroscopía infrarroja es una de las técnicas que más se usan para la identificación de quitina y sus derivados [35]. Suministra información cualitativa sobre los grupos funcionales presentes. En esta investigación las muestras del micelio tratado con agua subcrítica (centrifugado, lavado y liofilizado) se usaron para preparar pastillas de KBr, y se analizaron en un espectrofotómetro *Jasco FT/IR-4100*.

Análisis elemental y concentración de quitina. El análisis elemental permite conocer el grado de acetilación de la quitina o si esta está asociada a otros grupos funcionales. En este trabajo los análisis elementales de muestras de micelio tratado se llevaron a cabo en un analizador elemental *Thermo Electron Flash EA 1112*.

Se desarrolló una expresión que permite calcular la concentración de quitina en cada muestra. Típicamente, una muestra de quitina reportada como “pura” posee un grado de desacetilación del 10%. Mediante un balance de átomos en este material, se obtiene la ecuación:

$$Q = 14.199 N \quad (4)$$

donde:

Q = concentración de quitina en la muestra (%),

N = contenido de nitrógeno en la muestra según análisis elemental (%).

De esta manera, para una muestra de quitina obtenida en el proceso, se usó el porcentaje de nitrógeno medido en el respectivo análisis elemental para determinar la concentración de quitina en la muestra con la Ecuación 4, bajo la suposición de que todas las proteínas se removieron en la centrifugación y lavado de la muestra. Por ejemplo, una muestra cuyo contenido de nitrógeno sea 2.3% tendría un contenido de quitina de 32.6% en peso [36].

Determinación del peso molecular. Existen varios métodos para determinar el peso molecular de un polímero. Uno de ellos utiliza la ecuación de Mark–Houwink [37], la cual relaciona la viscosidad intrínseca con el peso molecular mediante dos constantes k y α , cuyos valores dependen de cada mezcla polímero-solvente usada en la medición. La ecuación:

$$\eta = k (M_w)^\alpha \quad (5)$$

donde:

η = viscosidad intrínseca (mL/g),

M_w = peso molecular del polímero (Da),

k, α = constantes dependientes de la mezcla polímero solvente.

La literatura reporta el uso de varios solventes para llevar a cabo la disolución de la quitina [37]; sin embargo, afirma que una mezcla acuosa de 8% hidróxido de sodio y 4% urea no genera variaciones importantes en el grado de acetilación de la quitina ni en la viscosidad relativa de la muestra, haciéndola una mezcla estable para la medición del peso molecular. Adicionalmente, dicha mezcla no disuelve azúcares ligados a proteínas, lo cual ayuda a comprobar que el producto no está ligado a estas. Los valores de k y α reportados para la mezcla acuosa 8% hidróxido de sodio, 4% urea y quitina son, respectivamente, 0.26 y 0.56 a 25 °C [37].

2.7 FABRICACION DE MEMBRANAS

La fabricación de membranas o películas de complejos quitina-glucanos se basó en el procedimiento descrito por Li, Yang *et al.* [38]. Brevemente, se preparó una mezcla de agua destilada con 0.5% del producto liofilizado, se dejó en agitación constante por 24 horas. Luego la mezcla se sometió a ultrasonido entre 30 y 60 minutos utilizando una sonda de ultrasonido de titanio de ½” diámetro (Qsonica, modelo Q500), en ciclos de 1 s *On* y 1 s *Off*.

Para evitar el aumento de la temperatura de la muestra, esta se sumergió en un baño de agua-hielo. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, obteniendo un precipitado y agua sobrenadante. los sólidos resultantes se liofilizaron antes de su caracterización y el agua sobrenadante se dividió en tres partes. Cada una de ellas se mezcló con etanol acuoso de diferente concentración, y se sometió a liofilización para formar una membrana o esponja. Para la observación detallada de la estructura se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) *Phenom Pro X* disponible en el laboratorio de Centro de Excelencia de Nuevos Materiales en la Universidad del Valle.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 TEMPERATURA MINIMA DE REACCIÓN

La apariencia física de los productos obtenidos en todas las corridas de la Tabla 2 fue similar entre ellos, aunque fue notorio que a medida que la temperatura de la corrida aumentaba, disminuían los grumos en el producto colectado. Una vez realizado el proceso de lavado y liofilización de las muestras, todas las corridas correspondieron a un sólido color blanco crema.

3.1.1 Espectros infrarrojo (IR)

La Figura 7 muestra los espectros IR de los productos obtenidos en las corridas de la Tabla 2 y de la suspensión de micelio liofilizado. Al comparar todos los espectros se observó que las bandas de absorción son muy similares, con algunas diferencias en la intensidad debido a los diferentes grados de ruptura de los enlaces químicos en la pared celular del *A. niger* durante la reacción en agua subcrítica. Se puede observar que a partir del producto T3 la relación entre la intensidad de las bandas de absorción 3450 / 1030, correspondientes a la tensión del grupo OH y tensión del grupo C-O-C, respectivamente, es mayor que la unidad. Esto es la consecuencia de la ruptura de los grupos de los enlaces C-O-C que principalmente unen los monómeros para formar polímeros. Entre mayor sea la relación de las intensidades de las bandas 3450 / 1030 más corta es la cadena polimérica; es decir, existe mayor ruptura de enlaces durante la reacción.

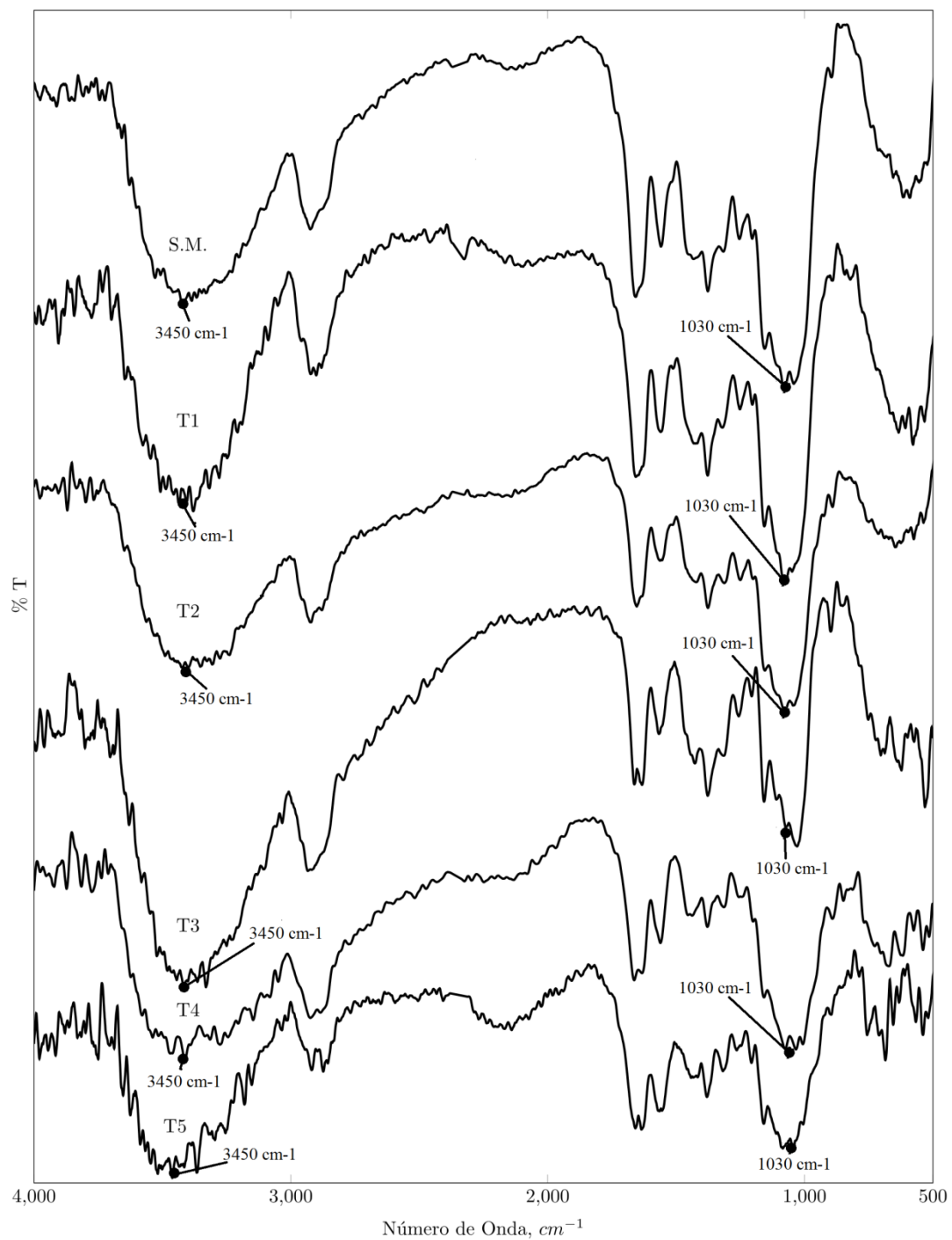


Figura 7. Espectros IR de los productos obtenidos en las corridas de la Tabla 2 y de la suspensión de micelio liofilizado.

3.1.2 Rendimiento y análisis elemental

En la Tabla 4 se muestran los resultados de los productos obtenidos a las condiciones de la Tabla 2. Note que las condiciones de operación a las cuales se llevaron a cabo los experimentos, difieren un poco de las planteadas en la Tabla 2 debido a que en el tratamiento con agua subcrítica se presentaron obstrucciones ocasionales durante la inyección del micelio. Estas obstrucciones se presentaron por la presencia de los sólidos en el producto de reacción en las válvulas V4 y V5 (figura 4), para evitar una sobrepresurización del sistema fue necesario operar manualmente estas válvulas durante el proceso de inyección y reacción.

La muestra con el código S.M. es la suspensión de micelio lavada varias veces con agua destilada y posteriormente liofilizada para tener un punto de referencia. El rendimiento de estas corridas varió entre 82.9 y 29.9%, y la concentración de nitrógeno varió entre 1.60 y 3.69%, se toma como referencia el porcentaje de nitrógeno debido a que los únicos componentes principales que tienen nitrógeno son las proteínas y la quitina, aunque no se puede saber con certeza con las pruebas desarrolladas hasta el momento, qué producto se encuentra desligado de proteínas o qué porción del nitrógeno hace parte de la quitina.

La transición brusca de las características de los productos obtenidos en las corridas T3 y T4, principalmente en los cambios de intensidad de las bandas de los espectros IR (relación 3450 / 1030), rendimiento (de 82.3 a 58.1) y %N (de 1.68 a 2.00), sugiere que entre 200 y 219 °C a un tiempo de residencia cercano a los 10 s, existe una temperatura a la cual la ruptura de enlaces químicos en la pared celular del *A. niger* en agua subcrítica es relevante.

Tabla 4. Resultados de los productos obtenidos de las condiciones de la Tabla 2

Código	Condiciones experimentales		Características Producto			
	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Rendimiento (%)	Análisis Elemental (%)		
				C	N	H
S.M.	-	-	-	43.70	1.60	6.96
T1	154	12.0	82.9	43.52	1.67	6.69
T2	181	10.0	82.1	43.69	1.72	6.89
T3	200	9.5	82.3	43.09	1.68	6.90
T4	219	11.3	58.1	43.22	2.00	6.60
T5	238	10.0	29.9	45.20	3.69	6.69

A partir de estos resultados y de acuerdo con resultados de reacciones en agua subcrítica y supercrítica reportados en la literatura [19,30,31,39], se consideró que la temperatura de reacción en los intervalos de tiempo de residencia cercano a los 10 segundos es de 200 °C, es decir, que a esa temperatura la ruptura de enlaces químicos de la pared celular es relevante en agua subcrítica a tiempos de residencia cercanos a 10 segundos. Por lo tanto, para las corridas experimentales de la Tabla 3, la temperatura y tiempo medio de reacción experimental se calcularon a partir de las Ecuaciones 1 y 3 con una temperatura mínima de reacción de 200 °C.

3.2 RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

Como en el producto de las corridas anteriores, la apariencia física de los productos obtenidos en todas las corridas fue similar entre ellos y corresponde a un sólido color blanco crema. Sin embargo, como se discutirá más adelante estos productos difieren ampliamente en sus características químicas.

Las Figuras 8, 9 y 10 muestran los espectros IR de los productos obtenidos en todas las corridas del diseño experimental. Al comparar con el espectro de la quitina reportado en la literatura [40], se puede notar que son prácticamente idénticos, con algunas pequeñas variaciones en la intensidad de las bandas de absorción, pero presentando la mayoría de los picos característicos de la quitina. Note que la intensidad de las bandas ubicadas alrededor de 1030 cm^{-1} es similar a las de las bandas ubicadas alrededor de 3450 cm^{-1} , lo que permite evidenciar la presencia de un polímero. Similarmente, la intensidad de las bandas ubicadas alrededor de 1656 cm^{-1} , indican que la quitina no sufrió una deacetilación significativa.

La Tabla 5 muestra los resultados de la caracterización del producto para las diferentes corridas experimentales. Note que las condiciones de operación a las cuales se llevaron a cabo todos los experimentos, difieren un poco de las planteadas en la Tabla 3. Por la misma razón planteada en la sección anterior.

Se puede observar que las obstrucciones que se presentaron en todas las corridas experimentales, afectaron notablemente la reproducibilidad en los resultados que se obtuvieron en los puntos centrales del diseño (corridas 5 a 8). Así, en estas corridas el rendimiento en corridas varió entre 38.4 y 49.9%, la concentración de quitina varió entre 39.5 y 50.7 % y el peso molecular entre 3192.8 Da y 7812.8 Da. Esta última variable de respuesta tiene un mayor grado de incertidumbre debido a que la técnica usada para determinar el peso molecular es apropiada únicamente para la quitina pura.

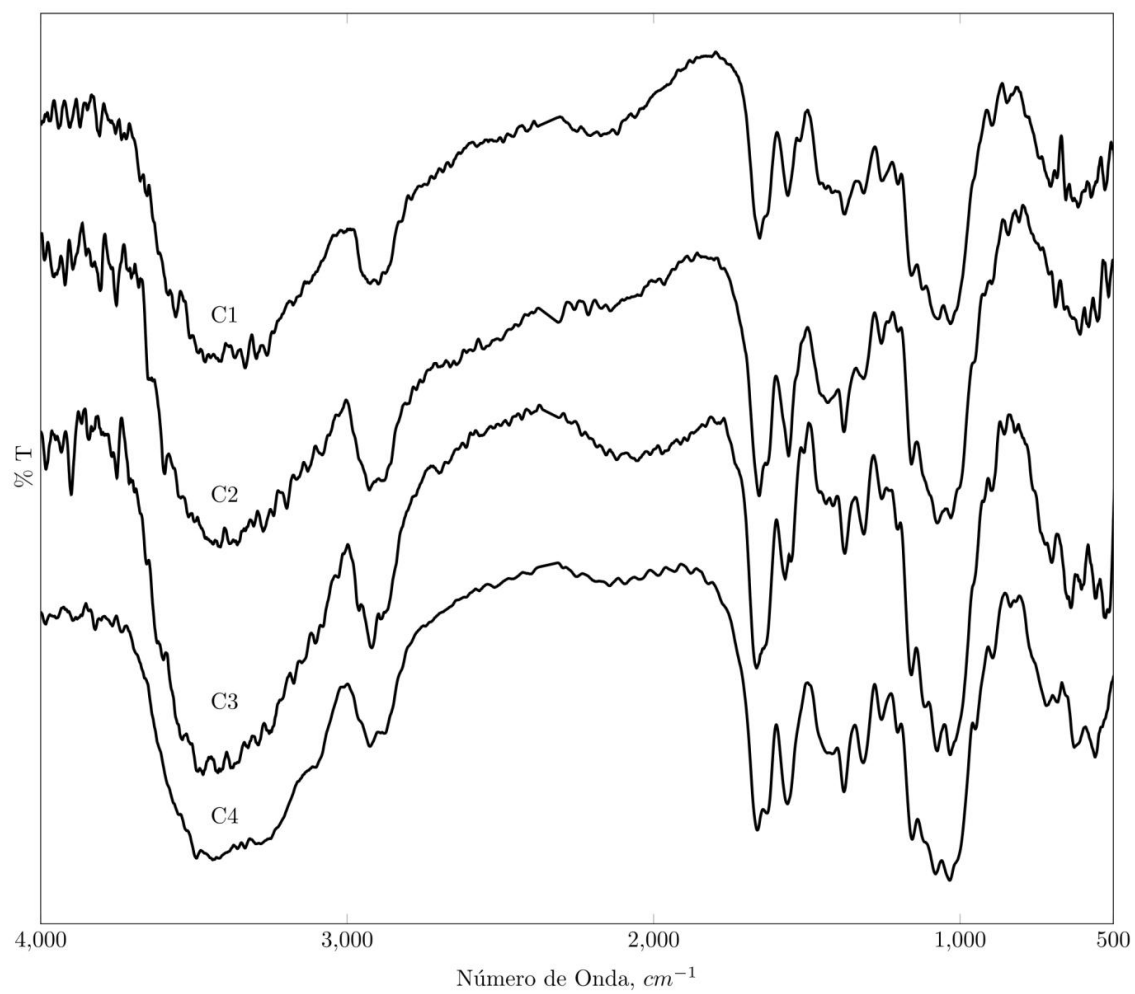


Figura 8. Espectros IR de los productos obtenidos en las corridas 1 a 4.

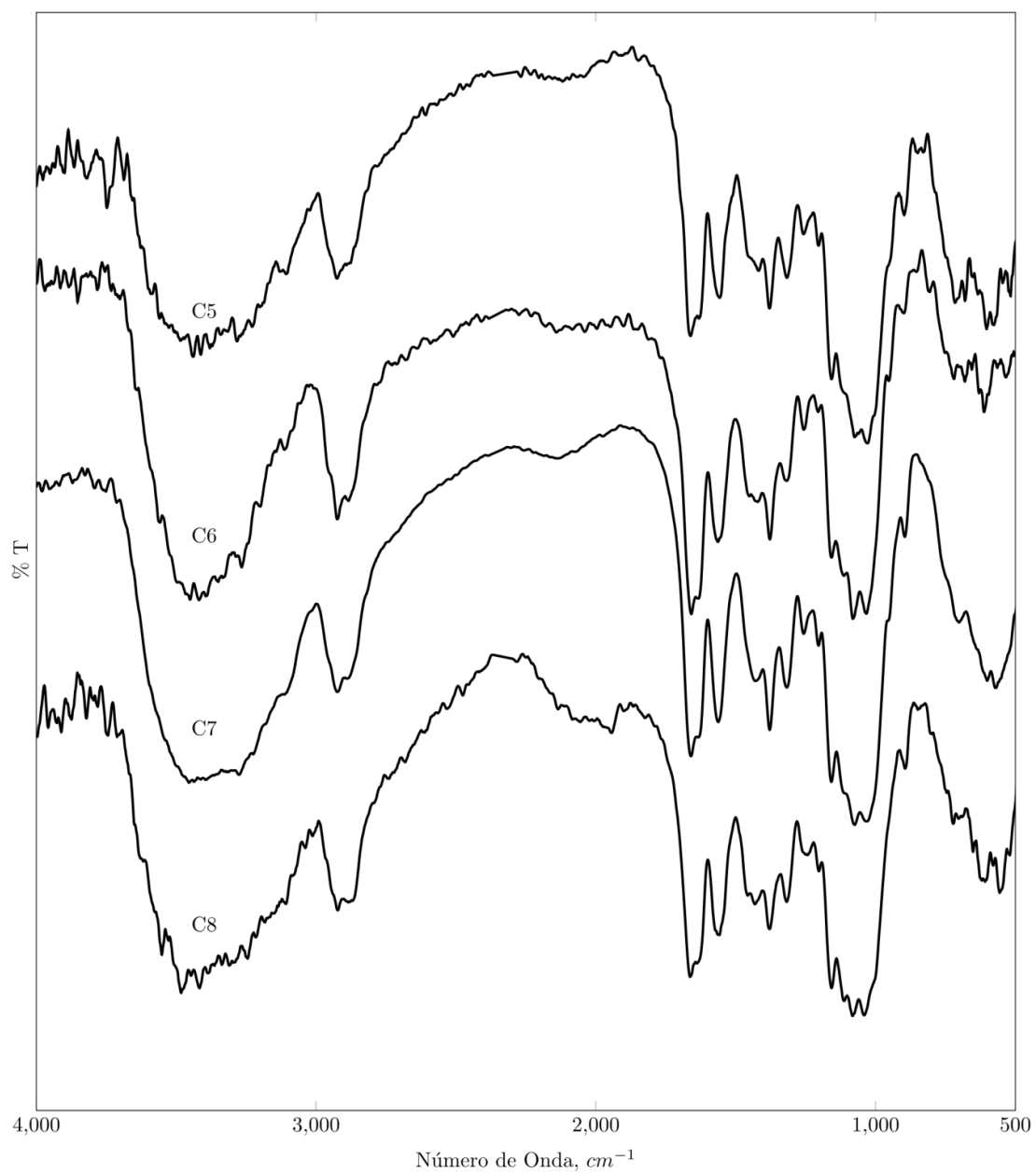


Figura 9. Espectro IR de los productos obtenidos en las corridas 5 a 8.

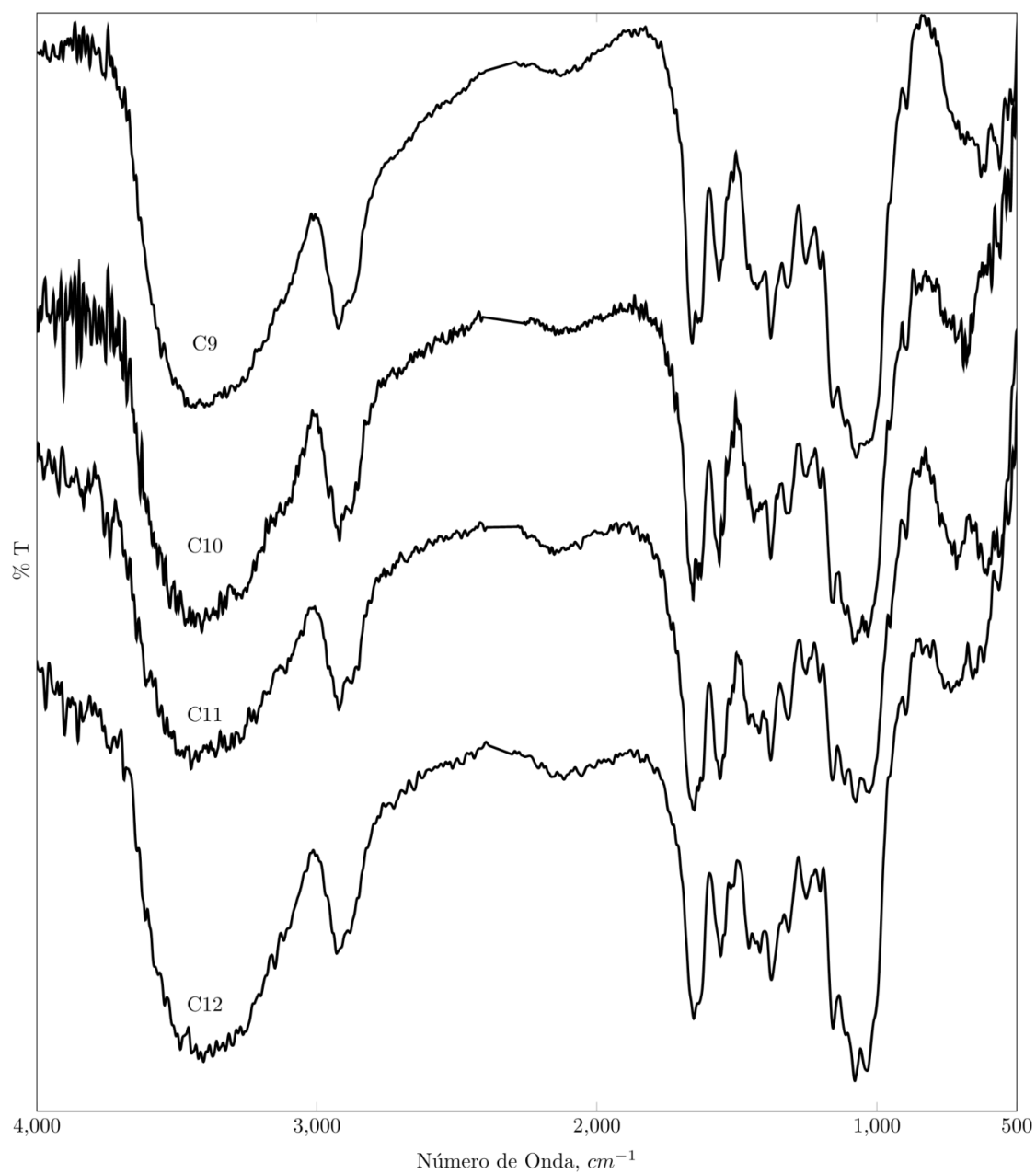


Figura 10. Espectro IR de los productos obtenidos en las corridas 9 a 12.

Tabla 5. Resultados de la caracterización del producto para las diferentes corridas experimentales.

Corrida	Condiciones de tratamiento			Características del producto				
	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Rendimiento (%)	Análisis elemental (%)			Concentración de quitina (%)	Peso molecular (Da)
				C	N	H		
1	228	6.5	72.9	43.07	1.77	6.94	25.1	2983.0
2	228	11.7	43.8	42.19	2.55	6.76	36.2	16767.6
3	241	6.5	42.5	42.29	2.63	6.75	37.3	1707.2
4	241	11.7	30.0	43.19	3.69	6.89	52.4	2852.0
5	233	9.3	38.4	41.73	2.78	6.75	39.5	3421.0
6	233	9.2	42.9	43.08	3.16	6.98	44.9	4053.6
7	233	9.2	39.7	42.97	3.57	6.64	50.7	3192.8
8	233	9.2	49.9	42.63	2.92	6.64	41.5	7812.8
9	232	5.8	58.5	45.10	1.95	6.82	27.7	1549.0
10	242	6.8	39.7	44.34	3.03	6.78	43.0	798.4
11	233	12.9	38.8	41.68	3.30	7.03	46.9	1407.6
12	222	6.4	64.2	42.26	1.71	6.79	24.3	24812.3

3.3 MODELOS ESTADÍSTICOS

Se realizó un ajuste de los datos del diseño experimental, incluidos los puntos axiales, para establecer de manera aproximada la relación entre cada una de las variables dependientes (rendimiento, concentración de quitina y peso molecular) y las variables independientes estudiadas en este proyecto (temperatura y tiempo). Para este ajuste se propuso un modelo polinomial de segundo orden dado por:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (6)$$

donde:

Y = variable de respuesta (rendimiento, concentración de quitina y peso molecular, respectivamente),

X_1 = temperatura normalizada al intervalo [-1 1],

X_2 = tiempo normalizado al intervalo [-1 1],

β_{ij} = coeficiente de la regresión para el efecto ij .

La Tabla 6 muestra los coeficientes del modelo matemático hallados para cada variable de respuesta, así como los coeficientes de correlación (R^2) de cada modelo. Estos valores se encontraron usando el procedimiento de ajuste descrito por Montgomery [41]. A partir de los signos y magnitudes de los coeficientes, se puede ver que la temperatura se convirtió en el factor de mayor importancia para las tres variables de respuesta (el valor absoluto del coeficiente β_1 es el mayor en cada caso).

Tabla 6. Coeficientes del modelo matemático para cada variable de respuesta

Variable	β_0	β_1	β_2	β_{12}	β_{11}	β_{22}	R^2
Rendimiento	48.37	-10.40	-9.57	4.56	0.62	0.09	0.97
Concentración de quitina	38.75	6.96	6.13	0.76	-2.64	0.51	0.96
Peso molecular	6806.3	-6469.7	3650.8	-3168.4	3199.9	-4040.6	0.75

Por otro lado, se hace evidente el efecto significativo que poseen las interacciones y los términos cuadráticos sobre el comportamiento del sistema, lo que confirma la adecuación de un modelo de segundo orden para describir la tendencia de los datos, en lugar de un modelo lineal. Además, los valores de los coeficientes de correlación calculados indican que el modelo matemático es confiable para describir el proceso.

En las Figuras 11, 12 y 13 se muestran las gráficas de superficie y contorno que se obtienen a partir de los modelos estadísticos encontrados. Estos modelos permiten estimar las características del producto obtenidas a un conjunto de condiciones de operación según la aplicación que se requiera.

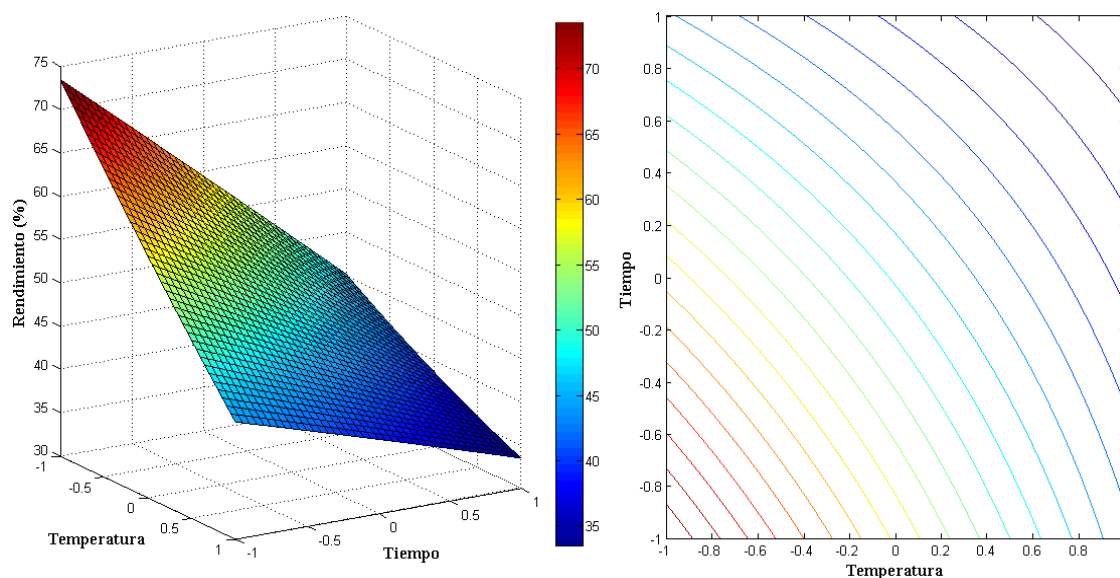


Figura 11. Superficie de respuesta y gráfica de contorno para el rendimiento

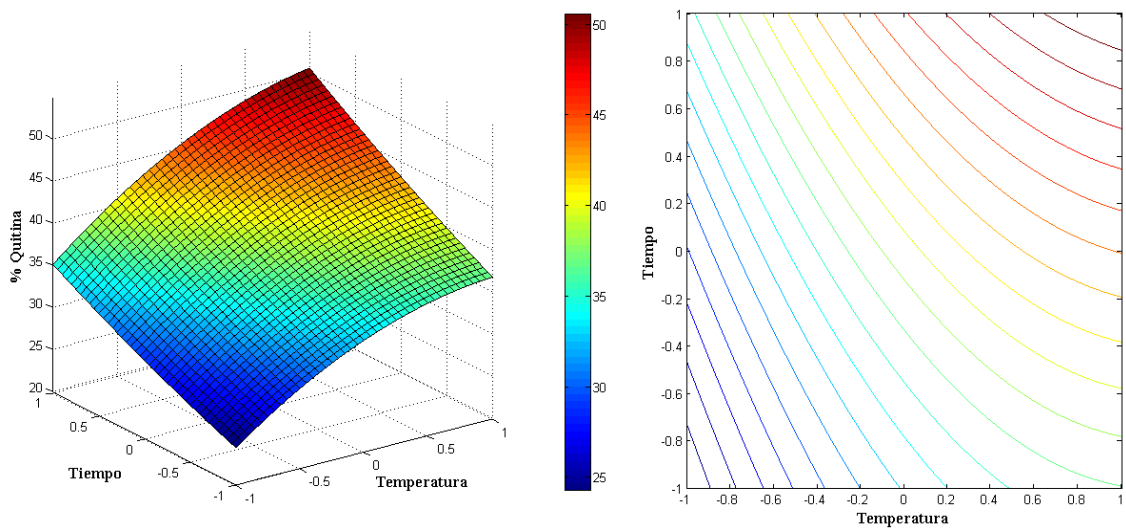


Figura 12. Superficie de respuesta y gráfica de contorno para la concentración de quitina.

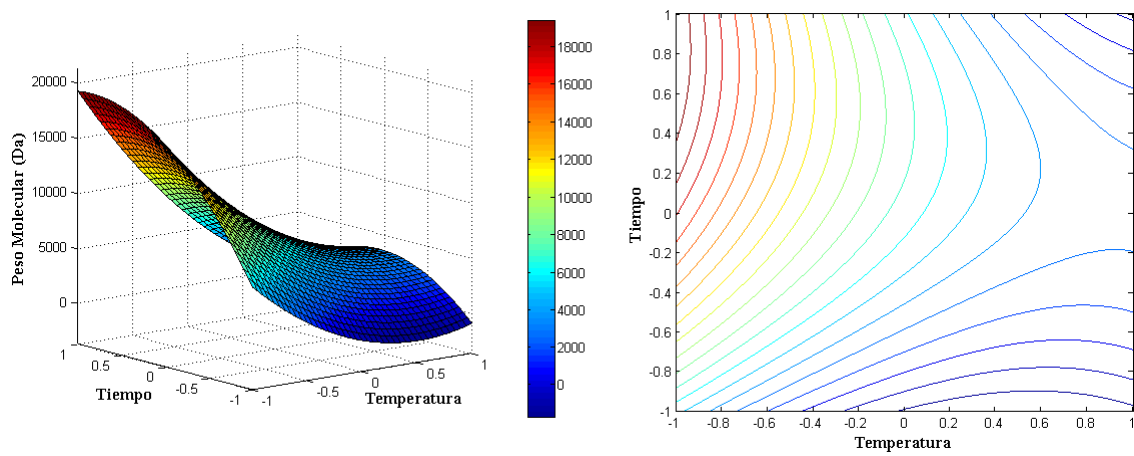


Figura 13. Superficie de respuesta y gráfica de contorno para el peso molecular.

3.4 RESULTADOS DEL ESTUDIO SOBRE INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN DE MAILLARD

Se realizaron corridas experimentales a las condiciones semejantes de las corridas 1 a la 4 de la Tabla 5, con la diferencia que a la emulsión preparada de micelio de *Aspergillus niger* se adicionó 1% en peso de hiposulfito de sodio, para inhibir la reacción de Maillard.

A diferencia de los productos de las corridas anteriores, se evidencia un olor a azufre que se hace más fuerte a medida que aumenta la temperatura de reacción de la corrida, además se hace evidente un cambio de color en el producto con una tonalidad café bastante notoria. Después de realizar las tandas de lavados y centrifugación para cada una de las muestras, el olor a azufre disminuyó en gran medida, pero los sólidos recuperados presentaron una tonalidad café clara, lo cual hace evidente un cambio significativo de este producto frente a las anteriores corridas.

La Tabla 7 muestra los resultados de la caracterización para la emulsión con hiposulfito de sodio. Debido a las obstrucciones durante las corridas experimentales, las condiciones de operación varían un poco respecto a las corridas 1 al 4 de la Tabla 5, y existe la presencia de azufre en los sólidos que no pudieron removerse en la serie de lavados y posiblemente se encuentran funcionalizados en los polímeros.

En la Figura 14 se muestran los espectros IR de las corridas de la Tabla 8. Se puede notar que la relación de las bandas de absorción 3450 / 1030 es menor a la unidad en todas las corridas, a diferencia de lo ocurrido en las corridas 1 a 4 de la Tabla 5 (Figura 8) donde esta misma relación es igual o mayor a la unidad, lo que implica que los productos obtenidos en las corridas H1 a H4 poseen cadenas poliméricas más largas.

La Tabla 8 muestra un cuadro comparativo del rendimiento para las corridas con y sin hiposulfito de sodio. Se observó una gran diferencia en los rendimientos obtenidos a condiciones de operación semejantes, lo cual indica que el producto con hiposulfito de sodio tiene más materia insoluble que el producto sin este compuesto por la misma inhibición de la reacción de Maillard, lo cual aparentemente corrobora la afirmación antes planteada: los productos obtenidos de las corridas H1 a H4 tienen cadenas poliméricas más largas, lo que

indica ciertamente que la reacción de Maillard influye de manera directa e importante en la reacción del micelio en agua subcrítica.

Tabla 7. Resultados de la caracterización para la emulsión con hiposulfito de sodio

Código	Condiciones Experimentales		Características Producto				
	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Rendimiento (%)	Análisis Elemental (%)			
				C	N	H	S
H1	228	6.8	77.6	43.03	1.77	6.83	0.07
H2	228	13.0	79.3	42.25	1.76	6.83	0.07
H3	242	6.9	81.5	43.15	1.71	6.97	0.11
H4	242	12.2	78.1	42.17	1.75	6.52	0.00

Tabla 8. Cuadro comparativo del rendimiento para las corridas con y sin hiposulfito de sodio

Corrida	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Rendimiento (%)
H1	228	6.8	77.6
1	228	6.5	72.9
H2	228	13.0	79.3
2	228	11.7	43.8
H3	242	6.9	81.5
3	241	6.5	42.5
H4	242	12.2	78.1
4	241	11.7	30.0

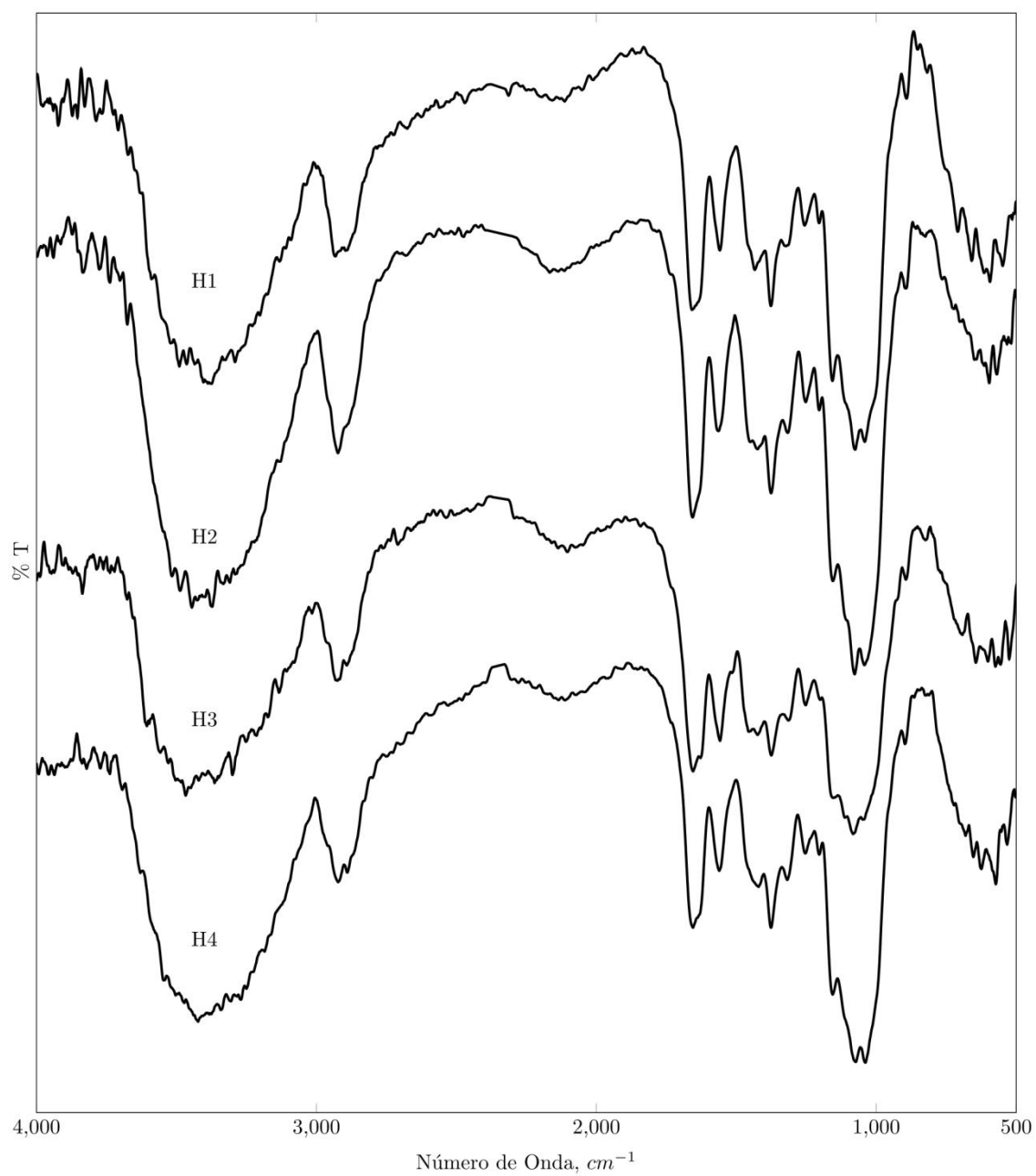


Figura 14. Espectros IR de las corridas de la Tabla 8.

3.5 MEMBRANAS DE COMPLEJOS QUITINA-GLUCANOS

Se tomó como materia prima el producto de la corrida 5 de la Tabla 5, debido a que es un punto central del diseño experimental y el resultado de los análisis químicos se aproxima mucho a un promedio de las otras corridas experimentales. Se llevó a cabo el procedimiento descrito con anterioridad (en el numeral 2.7), del cual se obtuvieron una “pasta” y agua sobrenadante del complejo quitina glucano al finalizar la etapa de centrifugación

En la Figura 15 se muestran algunas fotografías del sólido recuperado de la etapa de centrifugación para el tratamiento con ultrasonido durante 30 y 60 minutos. Note que los sólidos de la muestra con un tratamiento de ultrasonido de 60 minutos tienen una tonalidad oscura (gris).

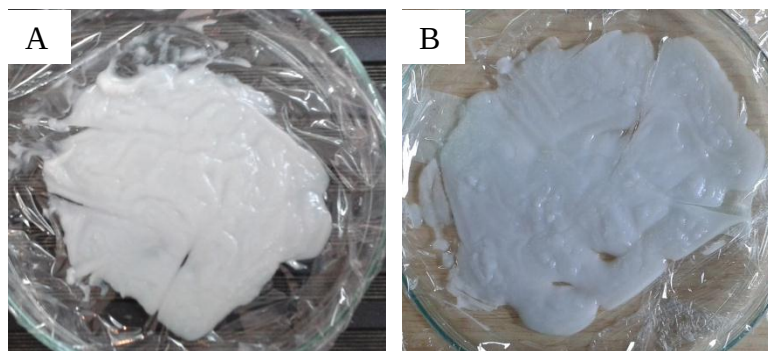


Figura 15. Fotografías del sólido recuperado de la etapa de centrifugación para el tratamiento con ultrasonido durante A) 30 minutos y B) 60 minutos.

Los sólidos centrifugados se congelaron súbitamente en nitrógeno líquido, para su liofilización y análisis estructural en un microscopio de barrido electrónico (SEM). Una parte del agua sobrenadante del tratamiento de 60 minutos se mezcló con etanol en proporción 50:50, ambas soluciones se sometieron a congelamiento rápido por nitrógeno líquido para posterior liofilización y análisis estructural por SEM. En la Figura 16 se muestran fotografías e imágenes SEM (ampliaciones entre 1.000x y 10.000x) de los sólidos recuperados y liofilizados tratados con ultrasonido durante 30 y 60 minutos.

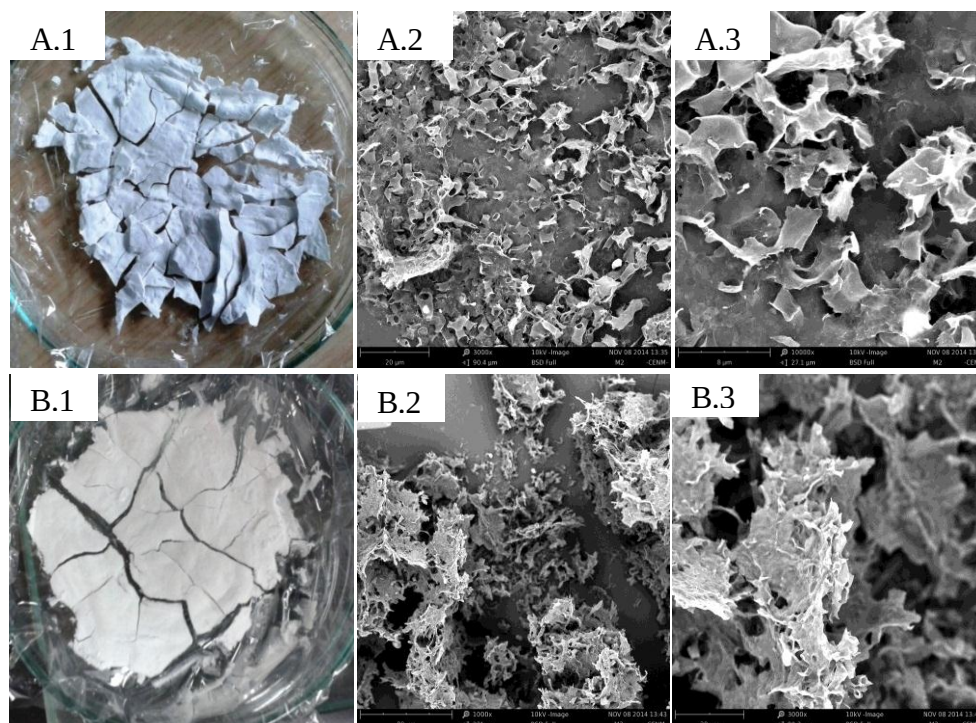


Figura 16. Fotografías e imágenes SEM (ampliaciones entre 1.000x y 10.000x) de los sólidos recuperados y liofilizados tratados con ultrasonido durante
A) 60 minutos y B) 30 minutos.

Comparando las imágenes A y B de la Figura 16, se observó que la estructura de los sólidos sometidos a 60 minutos de ultrasonido (Imagen A.2 y A.3) está conformada por láminas y capas pequeñas comparadas con la estructura los sólidos sometidos a 30 minutos de ultrasonido (Imagen B.2 y B.3) que son láminas más grandes, con ramificaciones y aparentemente menos frágiles. Esto último se pudo evidenciar en la apariencia de los sólidos recuperados y liofilizados de cada muestra. Los sólidos de la imagen A.1 están más fracturados que los sólidos de la imagen B.1. A partir de este análisis se puede deducir que la estructura de los sólidos recuperados sometidos a 60 minutos de tratamiento ultrasónico es mucho más porosa que los sólidos recuperados sometidos la mitad del tiempo en tratamiento ultrasónico, debido a que el sólido está conformado por estructuras mucho más pequeñas.

En la Figura 17 se muestran una fotografía e imágenes SEM (ampliaciones entre 1.000x y 10.000x) del agua sobrenadante recuperado y liofilizado de la muestra tratada durante 60 minutos con ultrasonido. Note en la fotografía (Imagen C.1) una estructura parecida a una red o tejido de fibras muy finas como resultado de la liofilización del agua sobrenadante, sin embargo la red se rompió con mucha facilidad, posiblemente debido a la baja concentración de sólidos de complejos quitina-glucano presentes en el agua sobrenadante, perdiendo rigidez la estructura. En las imágenes SEM (Imagen C.2 y C.3) se encontró una red de fibras de tamaño microscópico no uniforme, con algunas láminas.

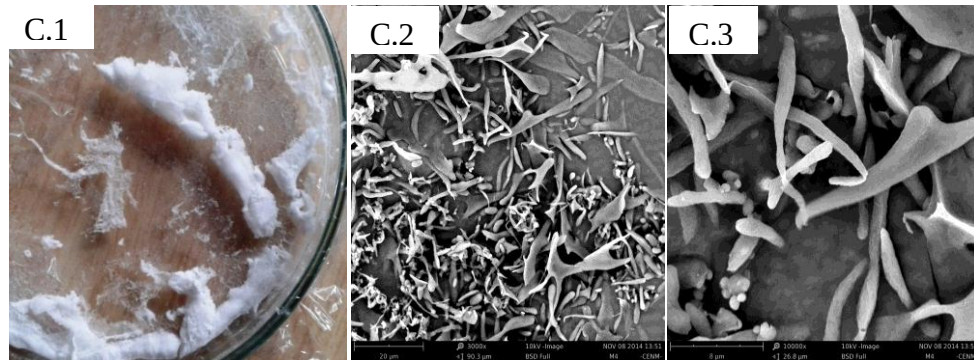


Figura 17. Fotografía e imágenes SEM (ampliaciones a 1.000x y 10.000x) del agua sobrenadante recuperado y liofilizado de la muestra tratada durante 60 minutos con ultrasonido.

Posteriormente, se separó una porción del agua sobrenadante recuperado de la muestra tratada durante 60 minutos con ultrasonido y se mezcla con etanol absoluto, en una proporción 50:50. En la Figura 18 se muestra una fotografía e imágenes SEM (ampliaciones entre 1.000x y 10.000x) de la mezcla agua sobrenadante y etanol (50:50) liofilizado. Se obtuvieron estructuras separadas en forma de hilos cortos pero sin formar una estructura unida o red (Imagen D.1), en las imágenes SEM (Imagen D.2 y D.3) se observaron pequeñas láminas de complejos quitina-glucano superpuestas.

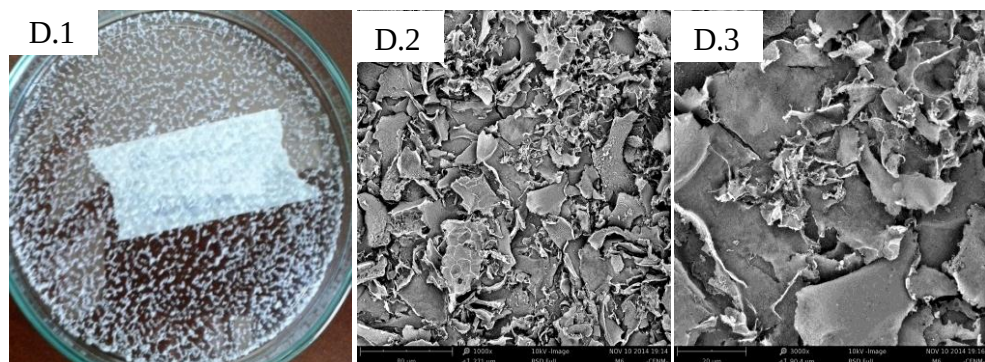


Figura 18. Fotografía e imágenes SEM (ampliaciones a 1.000x y 10.000x) de la mezcla agua sobrenadante y etanol (50:50) liofilizado.

Observe la importante diferencia de la estructura macro y microscópica entre el agua sobrenadante recuperado y liofilizado (Figura 17) y la mezcla liofilizada de agua sobrenadante y etanol (Figura 18), la primera forma una red de fibras microscópicas mientras que la segunda forma hilos cortos de capaz sobrepuestas, con tan solo adicionar etanol. Lo anterior da una clara evidencia que el solvente es un factor de gran importancia para la formación y ajuste de la morfología deseada para la elaboración de membranas con nanofibras de complejos quitina glucano.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

En esta investigación se exploró una alternativa de producir materiales con valor agregado a partir de micelio de *Aspergillus niger* mediante reacción en agua subcrítica. Para este efecto se modificó un equipo del laboratorio construido previamente por Ordoñez y García [27] para controlar con mayor precisión el promedio de temperatura de reacción y prolongar los tiempos de residencia, primeramente, se exploraron diferentes temperaturas a un tiempo de residencia semejante a 10 segundos. Se encontró que a una temperatura entre 200 °C y 219 °C, a un tiempo de residencia similar, existe una temperatura a la cual el rompimiento de enlaces de la pared celular es relevante, que se estableció como en el valor de 200 °C, para un tiempo de residencia cercano a 10 s.

El procedimiento del diseño experimental desarrollado permitió obtener rendimientos que variaron entre 30% y 73%, con una proporción de quitina de 24.3% a 52.4% y pesos moleculares entre 798 y 24812 Da. Esto implica que se puede desarrollar una gran variedad de productos con diferentes propiedades según se requiera, solamente modificando las condiciones de operación.

Las pruebas para evaluar la existencia del efecto de la reacción de Maillard en la reacción del micelio en agua subcrítica se realizaron adicionando hiposulfito de sodio para inhibir el efecto en la reacción, se obtuvo que hay una gran influencia de la reacción de Maillard en el producto final debido a cambios significativos en el rendimiento, % nitrógeno y en las bandas de absorción del espectro IR.

A partir de una de las muestras del diseño experimental, se elaboraron membranas de nanofibras y membranas rígidas del complejo quitina glucano, y se analizaron las estructuras al microscopio electrónico de barrido. Se encontró que es posible producir nanofibras a partir del complejo quitina glucano por medio de ultrasonido, y además que su morfología microscópica y macroscópica depende en gran medida al solvente utilizado en el proceso y la concentración del soluto.

4.2 RECOMENDACIONES

Para investigaciones posteriores se recomienda buscar una solución efectiva para las obstrucciones que se presentan con el producto durante la operación del equipo, específicamente en la válvula que controla la presión.

También es necesario estudiar de forma más detallada la cinética de la reacción del proceso con el fin de tener un mayor conocimiento sobre la variedad de productos que pueden obtenerse del micelio, así como empezar a estudiar el mecanismo de reacción de la reacción de Maillard para este proceso en específico.

Una recomendación importante es realizar un esfuerzo experimental con otros solventes a diferentes concentraciones para elaborar membranas y nanofibras a partir de complejos quitina-glucanos, así como evaluar la implementación de otros métodos planteados en la literatura para la elaboración de tales materiales.

Finalmente, debido a que existe una incertidumbre apreciable en el método utilizado para el cálculo del peso molecular (viscosimetría con Mark–Houwink), es necesario diseñar e implementar un método analítico efectivo y de fácil aplicación para la determinación no solo del peso molecular promedio del complejo quitina-glucano, sino incluso de la distribución de peso molecular del producto.

APENDICES

APÉNDICE A

REACTOR

A.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

La Figura A.1 se muestra una vista frontal de la placa central y placa externa de aluminio. El reactor está compuesto por 4 placas de aluminio, cada una con 6 orificios que permiten su acoplamiento mediante tornillos para formar un bloque compacto. Las dos placas centrales (cada una de longitud 20 cm, ancho 12 cm y espesor 4 cm), poseen un canal de sección semicircular de 1/16" de radio dentro del cual se coloca una pieza de *tubing* de 1/8". Este *tubing* se conecta con el *tubing* proveniente del precalentador. Las dos placas externas tienen las mismas dimensiones que las internas, excepto su espesor, que es 2 cm, y posee cada una una muesca para ajustar perfectamente con la resistencia eléctrica.

La Figura A.2 muestra un esquema del reactor ensamblado. El reactor se calienta mediante dos resistencias tipo placas, cada una con una potencia de 250 W a 110 V, con dimensiones de 120 x 200 x 3 mm. Ellas se ubican entre las placas internas y externas, y están conectadas a un controlador PID (Autonics, TC4S) que utiliza una termocupla tipo K de 4 cm de largo y 3/16" de diámetro como elemento sensor del ciclo de control de la temperatura. La termocupla se ubica en uno de los lados de una de las placas interiores, en un orificio abierto para ello, de 3 cm de profundidad y 3/16" de diámetro. Después de ensamblar todo el reactor, se utiliza una capa de 5 cm de lana mineral (Kaowool) para aislar térmicamente el reactor.

La Figura A.3 muestra una fotografía del reactor montado y acoplado al equipo. El soporte se construyó con perfilera de aluminio de 1" y remaches de 1/8" x 1/2". La estructura tiene forma de cajón, y es capaz de soportar un peso de 4 Kg sin deformarse.

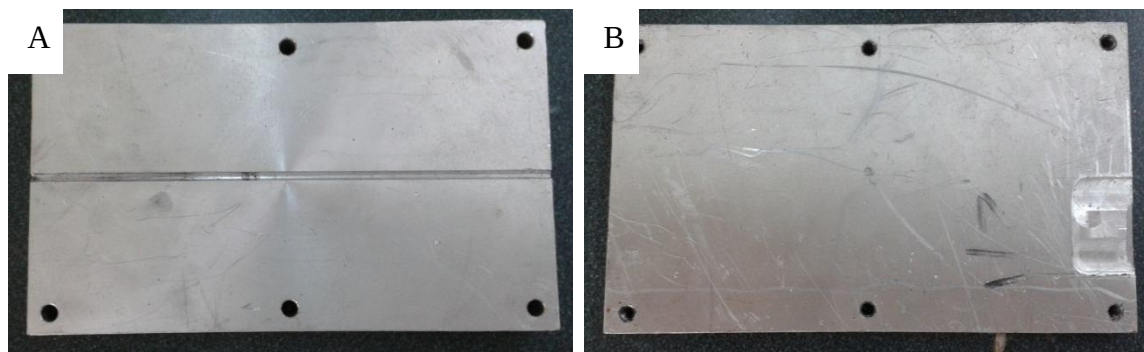


Figura A.1. Vista frontal de A) placa central y B) placa externa de aluminio.

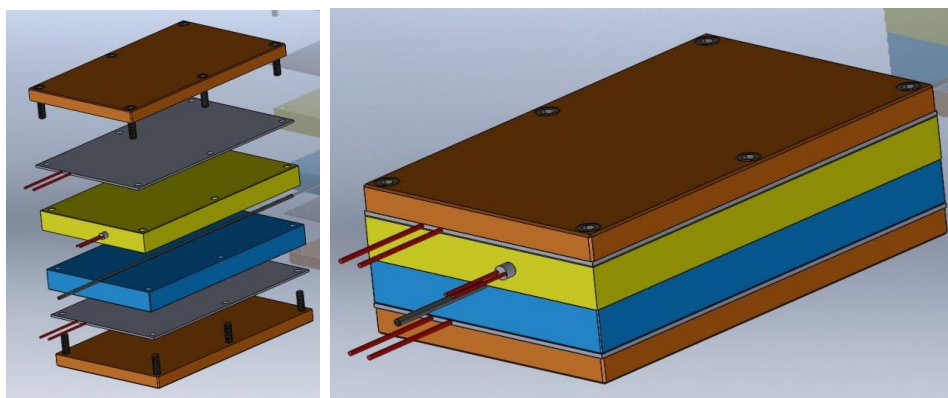


Figura A.2. Esquema del reactor ensamblado.



Figura A.3. Fotografía del reactor montado y acoplado al equipo.

A.2 CÁLCULOS DE DISEÑO

Con base en el trabajo previo de Ordoñez y García [27], se diseñó el reactor tomando en cuenta que el tiempo de reacción debe estar entre 6 y 11 segundos. La longitud del reactor debe ser lo suficientemente larga para tener un mayor control sobre el perfil de temperatura del fluido, y así favorecer un mejor cálculo de la temperatura promedio de reacción, es decir, que la temperatura promedio de reacción sea muy semejante a la temperatura del fluido en el reactor.

En dicha investigación previa, se estableció que para disminuir al máximo los tiempos de reacción en el intercambiador de calor es deseable tener caudales de trabajo bajos, menores a 0.5 mL/s, y que para obtener complejos quitina-glucanos con porcentajes de quitina mayores a 50% es necesario utilizar una temperatura superior a 230 °C.

Con esta información y simulando perfiles de temperatura con las Ecuaciones 1 y 2, con caudales entre 0.3 y 0.7 mL/s y temperaturas entre 230 y 260 °C, se encontró que con 40 cm de distancia efectiva a la temperatura de reacción, se obtienen tiempos de reacción promedio entre los 6 y 11 segundos.

Para la construcción se utilizó 35 cm de *tubing* de 1/8", de los cuales 20 cm está en contacto directo con las placas y el resto está libre para la conexión con el precalentador e intercambiador completando con las uniones utilizadas los 40 cm de distancia que se calculó.

APÉNDICE B

INTERCAMBIADOR DE CALOR

B.1 DESCRIPCIÓN GENERAL.

El efluente proveniente del reactor tiene temperaturas mayores a 200 °C; por lo tanto, fue necesario implementar un sistema de enfriamiento para hacer descender la temperatura del producto lo más cerca posible a la ambiente. El intercambiador diseñado se dividió en dos tramos para tener un punto de medición de temperatura después del primer tramo.

La Figura B.1 muestra un esquema de un tramo del intercambiador de calor. Se trata de un intercambiador de calor de coraza y tubo que se construyó a partir de un tubo de acero galvanizado de 1½", *tubing* de 1/8" doblado en forma de espiral y conexiones para la entrada y salida del fluido frío y caliente. Para el primer tramo del intercambiador se utilizaron 23 cm de carcasa y aproximadamente 42 cm de *tubing*. Para el segundo tramo se utilizaron 69 cm de carcasa y 224 cm de *tubing*. Los dos tramos de intercambiador en conjunto tienen la capacidad de enfriar un efluente desde 350 °C hasta 35 °C con agua de enfriamiento a 20 °C.

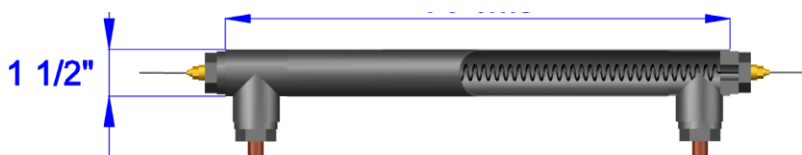


Figura B.1. Esquema lateral de un tramo del intercambiador de calor.

B.2 CÁLCULOS DE DISEÑO

Para el diseño del intercambiador de calor, se tomó en cuenta lo siguiente:

- La posibilidad de trabajar a condiciones de temperatura hasta 350°C, tomando esta temperatura como la máxima que se puede obtener a la salida del reactor.
- El líquido de enfriamiento es agua desionizada a una temperatura cercana a los 10 -

20 °C.

- Tener un punto de medición entre los dos tramos del intercambiador para calcular con mejor precisión el perfil de temperatura del fluido.
- El caudal del efluente es de 1.8 gph, capacidad máxima de la bomba disponible.

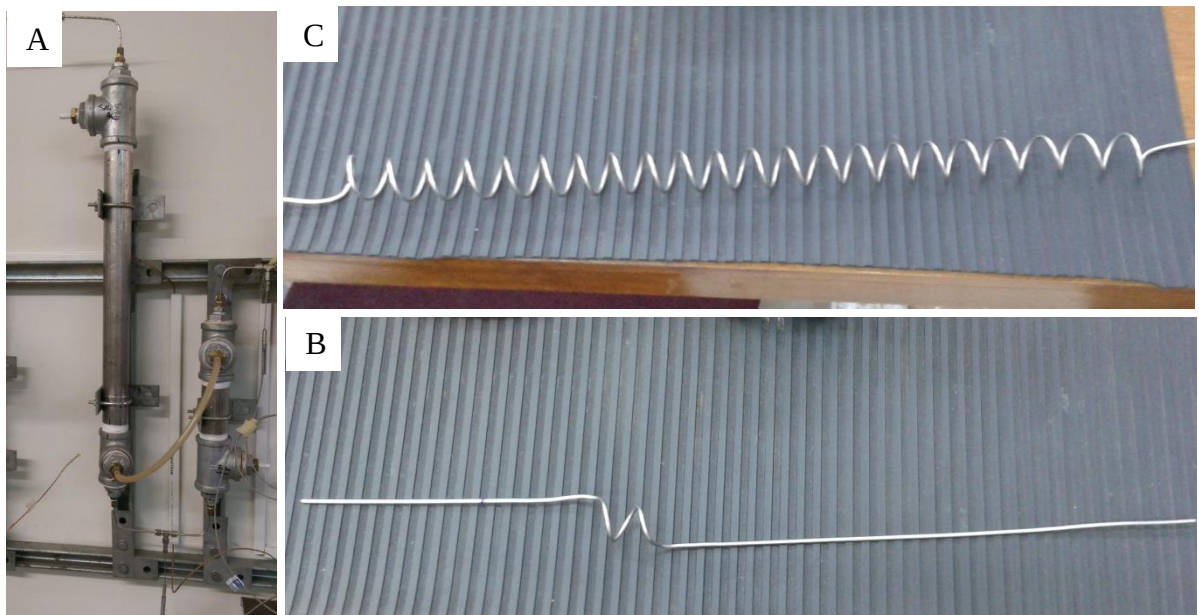


Figura B.2. Fotografías A) Intercambiador de calor en operación B) *tubing* intercambiador tramo 1 C) *tubing* intercambiador tramo 2.

B.2.1 Longitud de *tubing*, tramo 1.

En los perfiles calculados por Ordoñez y García [27], especialmente en la zona de enfriamiento se encuentra que para una temperatura de entrada del fluido al intercambiador de 230 °C existe una longitud de 24 cm de *tubing* necesarios para bajar la temperatura hasta 200 °C y para una temperatura de entrada del fluido de 260 °C, la longitud de *tubing* es 45 cm para bajar la temperatura. Con esa información se estima que a una distancia aproximada de 35 cm de *tubing* en contacto con agua fría es suficiente para que la temperatura del efluente

descienda hasta cerca de los 200 °C, con las condiciones del sistema de enfriamiento del equipo y de operación.

Finalizada la construcción del primer tramo del intercambiador de calor se obtuvieron 42 cm de *tubing* en contacto con el agua de enfriamiento, este valor excedente en 7 cm al cálculo realizado anteriormente (35 cm), debido a que uniones y reducciones del tubo galvanizado para la entrada del *tubing* de 1/8" ampliaron la carcasa del intercambiador en 7 cm.

B.2.2 Longitud de *tubing*, tramo 2.

Primero se halló la longitud total del *tubing* necesario en la fabricación del intercambiador de calor para descender la temperatura hasta 30 °C y luego se sustrae la longitud del primer tramo teórico, 35 cm. Para el cálculo de la cantidad de calor que se debe extraer del efluente caliente ($\dot{Q}$) se tiene en cuenta las siguientes condiciones:

- T entrada: 280°C
- T salida: 30°C
- Presión: 3000 psig.
- Flujo masico: 0.9 g/s, el máximo permitido por la bomba

Se realizó la simulación de un intercambiador de calor en el programa Aspen Plus 11.1, usando el modelo "Steam-TA" (tablas de vapor), dando como resultado $\dot{Q} = 978$ Watts. La ecuación general de un intercambiador de calor es [32]:

$$\dot{Q} = FUA\Delta T_m \tag{B.1}$$

donde:

F = Factor de eficiencia,

U = Coeficiente global de transferencia de calor [W/m²°C],

A = Área de contacto [m²],

ΔT_m = Cambio logarítmico de la temperatura [°C].

El ΔT_m se define como:

$$\Delta T_m = \frac{(T_{ih} - T_{oc}) - (T_{oh} - T_{ic})}{\ln \left(\frac{T_{ih} - T_{oc}}{T_{oh} - T_{ic}} \right)} \quad (B.2)$$

donde:

T_{ih} = Temperatura de entrada del fluido caliente, 280 °C,

T_{oc} = Temperatura de salida del fluido frio, 20 °C,

T_{oh} = Temperatura de salida del fluido caliente, 35 °C,

T_{ic} = Temperatura de entrada del fluido frio, 5°C.

Aplicando las condiciones mencionadas se tiene que $\Delta T_m = 106.5$ °C. Adicional a esto y despejando A de la Ecuación B.1 se obtiene:

$$A = \frac{\dot{Q}}{F U \Delta T_m} \quad (B.3)$$

Con base en los resultados de Ordoñez y García [27], se puede despejar una gran variedad de valores para el termino FU dependiendo de las condiciones de las corridas experimentales, se escoge el valor de mayor valor y que a su vez las condiciones de operación sean lo más cercanas posibles al estudio, se toma el de mayor valor debido a que el intercambiador va a ser optimizado y por ende el termino FU va a tender a tener un mayor

valor, entonces $FU = 350 \text{ W/m}^2\text{K}$.

Por lo tanto $A = 0.0262 \text{ m}^2$. Finalmente, y teniendo el área de contacto, se halló la longitud necesaria de *tubing* para construir el intercambiador:

$$L = \frac{A}{\pi D} \quad (\text{B.4})$$

donde:

L = Longitud del *tubing* [m],

D = Diámetro externo del *tubing* [m].

En este caso, el *tubing* tiene un diámetro de 1/8" ($3.18 \times 10^{-3} \text{ m}$), dando como resultado 263 cm de *tubing* de 1/8" como distancia total que se necesita en la zona de enfriamiento. Para hallar la longitud del tramo 2 simplemente se resta la distancia del tramo 1 calculado, 35 cm, obteniendo 228 cm de *tubing*.

Al terminar la construcción del segundo tramo del intercambiador de calor quedaron 224 cm de *tubing* efectivo en contacto con el agua de enfriamiento, la diferencia de 4 cm respecto a la calculada (228 cm), se utilizó para tener mayor espacio de acople de las uniones del intercambiador en el montaje total del equipo.

B.3 SISTEMA DE ENFRIAMIENTO

Como tanque de almacenamiento y enfriamiento se construyó un sistema de enfriamiento sencillo, que funciona con agua desionizada y agua congelada en botellas de 500 mL para mantener la temperatura del agua por debajo de los 15 °C.

El sistema de enfriamiento consta principalmente de un recipiente plástico de 8 L para almacenar agua desionizada con las botellas de agua congelada, el agua fría se bombea a $1600 \text{ cm}^3/\text{min}$ por una bomba centrífuga (*Fasco industries, inc.*) hacia el primer tramo del intercambiador de calor, pasa al segundo tramo por medio de mangueras de 3/8" y

finalmente retorna al recipiente plástico.

La Figura B.2 muestra una fotografía de la zona de enfriamiento del equipo. Durante la operación del equipo, se dispuso de una nevera pequeña con botellas de agua congeladas, para la rotación de las botellas constante y mantener el agua de enfriamiento a una temperatura baja.



Figura B.3. Fotografía de la zona de enfriamiento del equipo.

REFERENCIAS

- [1] M. D. Caprile, U. Nacional, B. Blanca, B. Aires. Obtención y Utilización de Quitina y Quitosano a partir de desechos de crustáceos. Libro resumen del Congreso Mundial ISWA: “Hacia un sistema integral de residuos sólidos urbanos”. (Argentina). 2005. <http://ars.org.ar> (visitada en Junio de 2015).
- [2] B. Krajewska. “Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review”. *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2)–(3):126 – 139, 2004.
- [3] F. Moattar, S. Hayeripour “Application of Chitin and Zeolite adsorbents for treatment of low level radioactive liquid wastes”. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 1 (1):45–50, 2004.
- [4] M. Rinaudo. “Chitin and chitosan : Properties and applications”. *Prog. Polym. Sci.* 31:603 – 632, 2006.
- [5] Global Industry Analysts. Reporte: “Chitin & Chitosan- A Global Strategic Business Report”. 2014. <http://www.strategyr.com> (visitada en Abril de 2015).
- [6] C. Peniche. Estudios sobre la quitina y quitosana. Disertación Doctoral. Facultad de Química. Universidad de la Habana (Cuba), 2006.
- [7] C. K. S. Pillai, W. Paul, C. P. Sharma. “Progress in Polymer Science Chitin and chitosan polymers : Chemistry , solubility and fiber formation.”. *Prog. Polym. Sci.* 34:641 – 678, 2009.
- [8] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. T. Sudheesh Kumar, S. V. Nair, H. Tamura. “Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications.”. *Biotechnol. Adv.* 29 (3):322 – 337, 2011.

- [9] Sucroal S.A. Informacion suministrada por correo Personal al tutor. 2011.
- [10] LJCCORPORATION, Pagina Web: http://eckorea.ecplaza.net/tradeleads/seller/2119664/water_soluble_chitosan_chitosan.html (Consultada Mayo de 2012)
- [11] J. Pontón. “La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina”. *Rev. Iberoam. Micol.* 25:78 – 82, 2008.
- [12] M. Giraudo, D. S. Vicente, M. Ugarte, K. D. “Determinación de glucomananos en pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* por electroforesis capilar de zona”. *ACE Rev. Enol.* 104, 2009.
- [13] I. R. Johnston. “The Composition of the Cell Wall of *Aspergillus niger*”. *Biochem. J.* 6 (96):651 – 658, 1965.
- [14] J. Ruiz Herrera. “Chemical Components of the Cell of *Aspergillus* Species”. *Arch. Biochem. Biophys.* 122:118 – 125, 1967.
- [15] G. Chi-Fung Chan, W. Keung Chan, D. Man-Tuen Sze. “The effects of β -glucan on human immune and cancer cells”. *Hematol Oncol. J.* 2 (25), 2009.
- [16] C. M. Stagg, M. S. Feather. “The characterization of a chitin-associated D-glucan from the cell walls of *Aspergillus niger*”. *Biochim. Biophys. Acta* 17 (1):64 – 72, 1973.
- [17] N. Cundumi, J. Arango. "Diseño del proceso de obtención de quitosana a partir de micelio, subproducto en la síntesis de ácido cítrico." Proyecto de grado, Ing. Química, Universidad del Valle, Cali (Colombia), 1994.
- [18] M. G. Peter. Chitin and Chitosan in Fungi - Polysaccharides. Biopolimers Online, 2005. <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/3527600035> (visitada Junio de 2015).

- [19] M. Sasaki, B. Kabyemela, R. Malaluan, S. Hirose, N. Takeda, T. Adschiri, K. Arai. "Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water". *J. Supercrit. Fluids* 13 (1)–(3):261 – 268, 1998.
- [20] J. Kronholm, K. Hartonen, M.-L. Riekkola. "Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures". *TrAC Trends Anal. Chem.* 26 (5):396 – 412, 2007.
- [21] A. Kruse, E. Dinjus "Hot compressed water as reaction medium and reactant". *J. Supercrit. Fluids* 39 (3):362 – 380, 2007.
- [22] G. Brunner. "Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes". *J. Supercrit. Fluids* 47 (3):373 – 381, 2009.
- [23] A. H. Harvey, D. G. Friend. "Chapter 1: Physical properties of water". In: *Aqueous Systems at Elevated Temperatures and Pressures: Physical Chemistry in Water, Steam and Hydrothermal Solutions*. Elsevier Ltd., Amsterdam, 2004.
- [24] Y. A. Skorik, A. V Pestov, Y. G. Yatluk. "Bioresource Technology Evaluation of various chitin-glucan derivatives from *Aspergillus niger* as transition metal adsorbents". *Bioresour. Technol.* 101 (6):1769–1775, 2010.
- [25] J. Cai. "Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant". *Carbohydr. Polym.* 2 (64):151 – 157, 2006.
- [26] L. Adámek, M. Beran, M. Petr. "Characterization of chitosan isolated from *aspergillus niger* industrial waste mycelium". *Poster of Food Research Institute Prague*, 2004.
- [27] J. Garcia, L. Ordoñez. Desarrollo de un proceso para la obtención de quitina a partir de micelio utilizando agua subcrítica. Proyecto de grado, Ing. Química, Universidad del Valle, Cali (Colombia), 2011

- [28] G. Bolaños, L. Ordoñez, J. Garcia. Complejos quitina-glucano y proceso para la preparación de los mismos a partir de biomateriales ricos en quitina. Solicitud de Patente Colombiana 2013-138097, 2013.
- [29] G. Bolaños, L. Ordoñez, J. Garcia. Complejos quitina-glucano y proceso para la preparación de los mismos a partir de biomateriales ricos en quitina. Solicitud Patente PCT/IB2013/059168, 2013.
- [30] S. Kumar, R. Gupta, Y. Y. Lee, R. B. Gupta. “Cellulose pretreatment in subcritical water: effect of temperature on molecular structure and enzymatic reactivity”. *Bioresour. Technol.* 101 (4):1337 – 1347, 2010.
- [31] M. Sasaki, A. Adsfumi, K. Arai, “Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment”. *Bioresour. Technol.* 86 (3):301 – 304, 2003.
- [32] F. Incropera, D. Dewitt. Fundamentos de Transferencia de Calor. Pearson Education, 4 edición. Pearson Educación, 1999.
- [33] C. Li, F. Liu, Y. Gong, Y. Wang, H. Xu, F. Yuan, Y. Gao. “Investigation into the Maillard reaction between ϵ -polylysine and dextran in subcritical water and evaluation of the functional properties of the conjugates”. *LWT - Food Sci. Technol.* 57 (2):612–617, 2014.
- [34] S. Kamboj, K. Singh, a. K. Tiwary, V. Rana “Optimization of microwave assisted Maillard reaction to fabricate and evaluate corn fiber gum-chitosan IPN films”. *Food Hydrocoll.* 44:260–276, 2015.
- [35] M. L. Duarte, M. C. Ferreira, M. R. Marvão, J. Rocha. “An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy”. *Int. J. Biol. Macromol.* 31 (1)–(3):1–8, 2002.

- [36] D. Slameova. “Protective effects of fungal (1-3)-beta--glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells”. *Cancer Lett.* 198 (2):153 – 160, 2003.
- [37] G. Li, Y. Du, Y. Tao, Y. Liu, S. Li, X. Hu, J. Yang. “Dilute solution properties of four natural chitin in NaOH / urea aqueous system”. *Carbohydr. Polym.* 80:970–976, 2010.
- [38] Y. Lu, Q. Sun, X. She, Y. Xia, Y. Liu, J. Li, D. Yang. “Fabrication and characterisation of α -chitin nanofibers and highly transparent chitin films by pulsed ultrasonication”. *Carbohydr. Polym.* 98 (2):1497–504, 2013.
- [39] M. Ocampo. Producción de un hidrolizado proteínico a partir de plumas de pollo: Aprovechamiento de un subproducto de la industria avícola. Proyecto de Grado, Ing. Química, Universidad del Valle, Cali (Colombia), 2010.
- [40] J. Desbrie, J. Brugnerotto, J. Lizardi, F. M. Goycoolea, W. Argu. “An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization”. *Polymer (Guildf)*. 42 (8):3569 – 3580, 2001.
- [41] D. Montgomey. Diseño y Análisis de experimentos. Limusa Wiley, 2 edición. Ciudad de México, 2005.