



**UNIVERSIDAD  
DE BURGOS**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y  
CIENCIA DE LOS ALIMENTOS  
ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

---

***EXTRACCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO  
DE DISOLUCIONES ACUOSAS  
DILUIDAS UTILIZANDO NIOSOMAS  
Y MICROFILTRACIÓN CON  
MEMBRANAS CERÁMICAS***

---

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**Patricia Torres García**

**Julio 2021**

Tutor: José Manuel Benito Moreno



**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL  
TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS  
CURSO: 2020/2021**

D. José Manuel Benito Moreno informa de que la alumna Dña. Patricia Torres García ha realizado el trabajo "Extracción de ácido cítrico de disoluciones acuosas diluidas utilizando niosomas y microfiltración con membranas cerámicas" bajo su tutela, y considera que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO \*

(\*) En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 1 de julio de 2021

Fdo.: José Manuel Benito Moreno

**ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU**

Dña. Patricia Torres García y D. José Manuel Benito Moreno, autora y tutor del Trabajo Fin de Grado, autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido

Acceso abierto

Acceso abierto con periodo de embargo

Burgos, a 1 de julio de 2021

Fdo.: Patricia Torres García

Fdo.: José Manuel Benito Moreno

Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos de investigación PID2019-104950RB-I00, financiado por la Agencia Estatal de Investigación, y BU050P20 y BU301P18, financiados por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>2. DESARROLLO TEÓRICO</b> .....	3
<b>2.1. Ácido cítrico: propiedades y aplicaciones</b> .....	3
<b>2.2. Tensioactivos</b> .....	4
<b>2.3. Niosomas</b> .....	5
<b>2.4. Tecnología de membranas: microfiltración tangencial</b> .....	6
<b>3. OBJECTIVES</b> .....	7
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	8
<b>4.1. Reactivos utilizados</b> .....	8
<b>4.2. Formulación de niosomas y medida de sus propiedades</b> .....	8
<b>4.3. Proceso de extracción niosomal con membranas</b> .....	10
<b>4.3.1. Etapa de recirculación total</b> .....	12
<b>4.3.2. Etapa de concentración</b> .....	12
<b>4.3.3. Limpieza de la membrana</b> .....	12
<b>4.4. Determinación de la cantidad de ácido cítrico no encapsulado mediante HPLC</b> .....	13
<b>5. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN</b> .....	13
<b>5.1. Grado de extracción de ácido cítrico</b> .....	13
<b>5.1.1. Efecto del volumen de fase dispersa añadida a la alimentación</b> .....	15
<b>5.1.2. Efecto de la concentración inicial de ácido cítrico</b> .....	15
<b>5.2. Variación de la densidad de flujo de permeado</b> .....	16
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	17
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	18

## RESUMEN

El ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) es un compuesto muy utilizado en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y química. Este ácido se produce en procesos de fermentación por el microorganismo *Aspergillus niger*, obteniendo unas disoluciones con muy bajas concentraciones, siendo necesarias varias etapas posteriores de concentración y purificación muy costosas, por lo que se están buscando actualmente métodos alternativos más sencillos y rentables. En este trabajo se evalúa la posibilidad de utilizar tecnologías limpias como son los procesos con membranas, para la extracción del ácido cítrico con niosomas y microfiltración de forma simultánea, utilizando una membrana cerámica tubular Filtanium (Tami) de microfiltración de TiO<sub>2</sub> de 0,2 micras de tamaño de poro, con el fin de recuperar el ácido cítrico presente en disoluciones acuosas diluidas a diferentes concentraciones y distintos volúmenes de fase dispersa de niosomas.

Se realizaron cuatro experiencias (1: 5mM ácido cítrico y 10 mL de niosomas; 2: 5 mM ácido cítrico y 30 mL de niosomas; 3: 10 mM ácido cítrico y 30 mL de niosomas; 4: 20 mM de ácido cítrico y 30 mL de niosomas). Para la formulación de niosomas se utilizaron los tensioactivos Span 80 (20 mol/m<sup>3</sup>) y SDS (4 mol/m<sup>3</sup>) y se aplicaron ultrasonidos. Una vez formulados, se añadieron al tanque de alimentación y las experiencias se realizaron en dos etapas, con las mismas condiciones de temperatura (20 °C) y presión transmembrana de 0,3 bar. En la primera etapa se trabajó con recirculación total de permeado y retenido para la extracción del ácido cítrico bajo condiciones de concentración constante, y en la segunda etapa se trabajó en modo de concentración estudiando el comportamiento de la membrana y la variación de la densidad de flujo de permeado durante el proceso de concentración de la alimentación.

Se pudo llegar a obtener un grado de extracción de ácido cítrico del 22,17% para una concentración inicial de 20 mM de ácido cítrico en la alimentación y un volumen añadido de 30 mL de niosomas como agente extractante. Se aplicó un modelo teórico para ajustar los datos experimentales, obteniendo buenos resultados.

Con este tipo de tecnologías se pueden abaratar costes de producción en la industria, siendo fácil de implantar a gran escala.

## ABSTRACT

Citric acid (2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid) is a widely used compound in food, pharmaceutical, cosmetic and chemical industries. This acid is produced in fermentation processes by the microorganism *Aspergillus niger*, obtaining very diluted solutions, which are very expensive to concentrate and purify. This study evaluates the possibility of using clean technologies such as membranes for the extraction of citric acid using a combined niosome extraction-microfiltration process, using a tubular microfiltration TiO<sub>2</sub> ceramic membrane Filtanium (Tami) of 0.2 microns of pore size, in order to recover the of citric acid present in dilute aqueous solutions at several concentrations and different volumes of the niosomes' dispersed phase.

Four experiments were carried out (1: 5 mM citric acid and 10 mL of niosomes; 2: 5 mM citric acid and 30 mL of niosomes; 3: 10 mM citric acid and 30 mL of niosomes; 4: 20 mM of citric acid and 30 mL of niosomes). Span 80 (20 mol/m<sup>3</sup>) and SDS (4 mol/m<sup>3</sup>) surfactants were used for the formulation of niosomes, applying ultrasounds. Once formulated, they were added in the feeding tank and the experiments were carried out in two stages, with the same temperature conditions (20 °C) and a transmembrane

pressure of 0.3 bar. The first stage was performed in total recirculation mode to extract the citric acid under constant concentration conditions, and the second stage was carried out in concentration mode studying the behavior of the membrane and the permeate flux variation during the feed concentration process.

It was possible to obtain a 22.17% citric acid extraction degree for a feed concentration of 20 mM and a dispersed phase volume of 30 mL of niosomes used as extracting agent. A theoretical model was applied to fit the experimental data, obtaining good results.

With this type of technology, it is possible to reduce production costs, being easy to implement and carry out at an industrial scale.

**Keywords:** Citric acid, extraction, niosomes, Span 80, SDS, microfiltration, surfactants.

## 1. INTRODUCCIÓN

El ácido cítrico es un ácido orgánico que se encuentra presente en casi todos los tejidos animales (músculos, huesos y sangre) y vegetales. Como su nombre indica, es especialmente abundante en los cítricos (limón, mandarina, ciruela, naranja, etc.), siendo responsable de su sabor agridulce (Muñoz-Villa et al., 2014).

En la actualidad, el 99% de la producción de ácido cítrico a nivel se lleva a cabo de forma industrial mediante fermentación a partir de melazas o azúcares (sacarosa), utilizando principalmente para ello el hongo *Aspergillus niger*. La producción de ácido cítrico mediante fermentación se puede dividir en tres pasos que incluyen la preparación e inoculación del caldo de fermentación, la fermentación, y la recuperación / purificación de los productos (Corrá et al., 2021).

El ácido cítrico es un producto de alta demanda a nivel mundial. Sus principales usos se encuentran en la industria alimentaria, debido a sus características como agente acidulante, antioxidante, saborizante y regulador de pH. También puede actuar como sustancia quelante para formar complejos estables con iones metálicos, por lo que su uso en la industria farmacéutica, cosmética y química es también muy importante (Corrá et al., 2021).

Una de las mayores dificultades que presenta la recuperación del ácido cítrico, y otros ácidos orgánicos obtenidos por vía biotecnológica, es la baja concentración que presentan en el medio de fermentación (generalmente entre 1 y 8 g/L en disolución acuosa). La recuperación del ácido cítrico se realiza habitualmente mediante precipitación, cristalización o extracción con disolventes orgánicos en procesos con múltiples etapas. Todo ello implica un elevado coste de operación que representa, en muchos casos, el 50% del coste total de producción (Reyes et al., 2013). El uso de disolventes orgánicos genera además un elevado impacto ambiental. Por ello, se están buscando técnicas alternativas de separación que abaraten los costes y ofrezcan soluciones viables más económicas y medioambientalmente más sostenibles.

Una de las tecnologías más novedosas en este campo es el uso de tensioactivos como agentes de extracción. Estos compuestos, por sus características estructurales, son capaces de formar agregados (micelas, vesículas, niosomas, etc.) y capturar moléculas, tanto hidrófilas como hidrófobas, pudiendo ser separados posteriormente de las corrientes acuosas mediante membranas de ultra o microfiltración. De esta forma, los solutos pueden ser retenidos después de ser atrapados por los agregados de

tensioactivos, mientras que las especies no capturadas pasan a través de las membranas (Geanta, 2009).

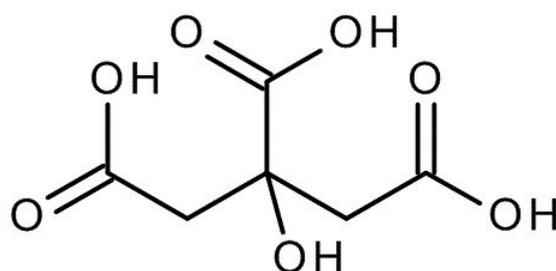
El uso de niosomas como agentes de extracción de ácidos orgánicos ha sido probado a lo largo de los últimos años por los miembros del grupo de investigación *Biotecnología Industrial y Medioambiental* de la Universidad de Burgos (Fraile et al., 2015; Roque et al., 2015; Roque 2020). El trabajo que se presenta en esta memoria se basa en los resultados previos, obtenidos por los mismos autores, para la extracción de ácido láctico y ácido cítrico de disoluciones acuosas diluidas

El trabajo presentado en esta memoria se basa en la utilización de unos métodos alternativos de extracción y concentración del ácido cítrico, más económicos y respetuosos con el medio ambiente, evitando el uso de disolventes orgánicos. La tecnología empleada en este trabajo se puede considerar como una *tecnología limpia*, que combina el uso de niosomas como agentes de extracción del ácido cítrico de disoluciones acuosas diluidas y la posterior concentración de dichos niosomas utilizando membranas de microfiltración (Geanta, 2009; Roque et al., 2015). Para la formulación de niosomas se utilizaron tensioactivos aniónicos (dodecilsulfato sódico, SDS) y no iónicos (monooleato de sorbitano, Span 80) de grado alimentario y bajo coste, mientras que la concentración y recuperación de los niosomas con el ácido extraído se realizó mediante ultrafiltración utilizando membranas tubulares cerámicas y presiones de operación relativamente bajas (0,3 bar) para minimizar el consumo energético.

## 2. DESARROLLO TEÓRICO

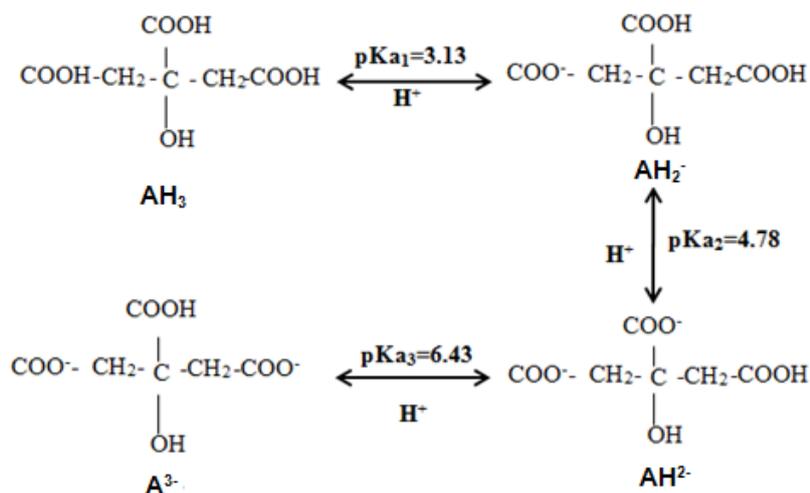
### 2.1. Ácido cítrico: propiedades y aplicaciones

El ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) es un sólido cristalino blanco que puede presentarse de forma anhidra o como monohidrato (Muñoz-Villa et al., 2014). Su estructura química se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Estructura química del ácido cítrico (Muñoz-Villa et al., 2014).

Tiene un peso molecular de 192,14 g/mol, una densidad de 1,665 kg/m<sup>3</sup> y un punto de fusión de 153 °C. Es altamente soluble en agua, con una solubilidad de 1,33 g/mL a 20 °C, moderadamente soluble en etanol, e insoluble en disolventes orgánicos como cloroformo, benceno y tolueno. En disoluciones acuosas, el ácido cítrico sufre una disociación dependiendo del pH, según se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Equilibrio químico de disociación del ácido cítrico en función del pH de la disolución acuosa, con los valores de pKa calculados a 25 °C.

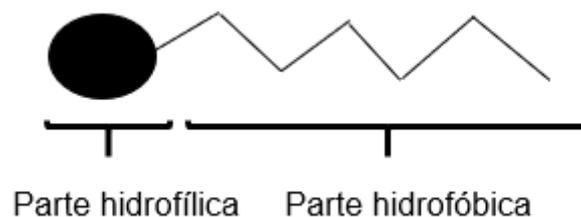
Como se ha comentado anteriormente, el ácido cítrico es un producto de alta demanda a nivel mundial, con una producción anual de aproximadamente 2 millones de toneladas. Es considerado como un aditivo alimentario seguro, por lo que un 70% del ácido cítrico producido se utiliza en la industria alimentaria y de bebidas, como agente acidulante para la conservación y mejora de las propiedades organolépticas de los alimentos. En la industria láctea se utiliza en la producción de helados y quesos, debido a sus propiedades antioxidantes, acidulantes y emulsionantes (Apelblat, 2014).

Al ser también biodegradable y seguro tanto para la industria como para los consumidores, biodegradable y fácilmente metabolizado y eliminado del cuerpo, el ácido cítrico es el ingrediente de muchos productos farmacéuticos (por ejemplo, se utiliza como anticoagulante en el transporte y almacenamiento de plasma sanguíneo), cosméticos y artículos de aseo (Apelblat, 2014).

En el sector químico es un agente complejante y/o quelante de metales como hierro, cobre, níquel, cobalto, cromo y magnesio. En el sector cosmético aparece como componente en la formulación de numerosas cremas y lociones por su efecto emulsificante y antioxidante. También se utiliza en una amplia gama de aplicaciones industriales: eliminación de depósitos de calcio en circuitos de vapor o de agua caliente, limpieza de metales, producción de reactivos fotográficos y tintas, aditivo de cementos para construcción, así como en industria papelera y textil (Apelblat, 2014).

## 2.2. Tensioactivos

Los tensioactivos, tensioagentes o *surfactantes* son compuestos químicos que poseen una estructura molecular anfipática, constituida por un grupo hidrofóbico (soluble en aceites y otros compuestos no polares) y un grupo hidrofílico (soluble en agua), como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Estructura de una molécula de tensioactivo (Roque, 2020).

Debido a su estructura, cuando estos tensioactivos se añaden a una solución acuosa en una concentración superior a la concentración micelar crítica (CMC), forman agregados esféricos denominados *micelas*, en los que los grupos hidrofílicos se orientan hacia el agua y los hidrofóbicos se enfrentan unos a otros hacia el interior del agregado, de tal forma que se minimiza el contacto con el agua (Roque, 2020).

Según la naturaleza polar de la parte hidrofílica, los tensioactivos se pueden clasificar en aniónicos, no-iónicos, catiónicos y anfóteros.

En este trabajo se han utilizado dos tipos de tensioactivos para la formulación de los niosomas: un tensioactivo no iónico (Span 80) y un tensioactivo aniónico (SDS), descritos a continuación.

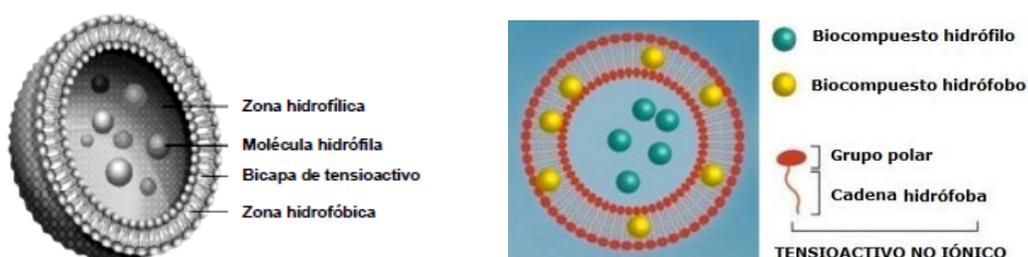
- **Span 80** (monooleato de sorbitano,  $C_{24}H_{44}O_6$ ): es un tensioactivo no iónico, con peso molecular de 428,62 g/mol. No es tóxico y es de grado alimentario (aditivo E494). Se presenta en forma de fluido viscoso de color amarillento y se puede utilizar como humectante, estabilizante y emulsionante (Roque, 2020).
- **SDS** (dodecil sulfato sódico,  $NaC_{12}H_{25}SO_4$ ): es un tensioactivo aniónico, con peso molecular de 288,38 g/mol. Se presenta en forma de sólido blanco soluble en agua, es biodegradable, de grado alimentario (E487), tiene baja toxicidad y un bajo coste de fabricación (Roque, 2020).

El SDS actúa como modificador de la membrana de los niosomas de Span 80, disminuyendo el tamaño de partícula y proporcionando dispersiones más estables (Geanta et al., 2013).

### 2.3. Niosomas

En este trabajo se utilizaron niosomas como agentes de extracción del ácido cítrico, una nueva tecnología poco utilizada.

Los niosomas son vesículas formadas por una o más bicapas de agentes tensioactivos no iónicos que encierran una cavidad acuosa. En medio acuoso las moléculas de tensioactivo se disponen de forma que las cabezas hidrofílicas se sitúan hacia el interior y exterior de la vesícula, mientras que las colas hidrofóbicas se enfrentan dentro de la bicapa (Figura 4). La estructura de los niosomas hace que sean capaces de encapsular compuestos de carácter hidrofílico e hidrofóbico dentro de su cavidad acuosa o en la bicapa, respectivamente.



**Figura 4.** Representaciones de un niosoma.

Los niosomas son parecidos a los liposomas (vesículas formadas por fosfolípidos) en cuanto a la estructura y forma. Sin embargo, desde un punto de vista técnico los niosomas presentan ciertas ventajas frente a los liposomas debido a que poseen mayor estabilidad química, alta pureza, bajo costo, uniformidad de contenido y fácil manejo y almacenamiento. Todas estas características, unidas a su facilidad de producción a gran escala y a su bajo coste, gran compatibilidad con otros tensioactivos y nula toxicidad, han hecho crecer recientemente el interés de la industria por nuevas aplicaciones de los niosomas, especialmente las relacionadas con tecnologías respetuosas con el medio ambiente (Ge et al., 2019). Los niosomas son ampliamente utilizados en aplicaciones farmacéuticas, basándose en la encapsulación de principios activos en su interior.

A diferencia de las micelas, los niosomas son termodinámicamente inestables y requieren el aporte de energía para su formación. Las características de los niosomas, fundamentalmente su tamaño, eficiencia de encapsulación y estabilidad, dependerán del método de preparación, del tipo de agente tensioactivo utilizado y de la formulación del medio.

Existen múltiples técnicas para la formación de niosomas (hidratación de película lipídica, microfluidización, homogenización a alta presión, etc.), que se clasifican en función del tipo de niosoma que interese producir. En el presente trabajo se utilizó la técnica de ultrasonificación, un método simple, rápido y que evita el uso de disolventes orgánicos.

#### **2.4. Tecnología de membranas: microfiltración tangencial**

Una membrana se define de forma genérica como una barrera física semipermeable que permite el paso selectivo de determinadas sustancias a su través, reteniendo otras (Strathmann, 2011). Es necesaria una fuerza impulsora que provoque el paso de la alimentación a través de la membrana. Esta fuerza puede ser generada con gradientes de concentración, presión, temperatura o potencial eléctrico. De esta forma se obtienen dos corrientes de salida: una corriente rica en solutos que no son capaces de atravesar la membrana, denominada *retenido* o *concentrado*, y una corriente de *permeado* con los solutos que han atravesado la membrana. La permeabilidad de un determinado soluto vendrá dada por su tamaño, la afinidad química con el material de la membrana y la movilidad de los componentes a su través.

Los procesos de separación con membranas se emplean de forma creciente desde hace más de 40 años. Su uso en el campo de la tecnología de alimentos tiene numerosas ventajas en comparación con otras técnicas convencionales, como es su posibilidad de operación a temperatura ambiente (ideal para el tratamiento de productos sensibles a

las altas temperaturas) y sin cambios de fase. Además, puede combinarse con otras operaciones unitarias y permite operar en condiciones continuas y discontinuas de producción. Su principal desventaja es la polarización por concentración y el posterior ensuciamiento de la membrana a lo largo del tiempo de operación, lo que provoca una disminución de la densidad de flujo de permeado y la necesidad de parar el proceso cada cierto tiempo para limpiar la membrana, lo que acorta la vida útil de la misma.

Los procesos de separación con membranas más utilizados son aquellos en los que la fuerza impulsora es la presión, principalmente microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (OI). Su espectro de aplicaciones se clasifica en función del tamaño de poro de la membrana y de la presión aplicada, denominada diferencia de presión transmembrana (PTM) (Strathmann, 2011).

En el presente trabajo se utilizó la microfiltración (MF) con membranas tubulares cerámicas (Figura 5). En esta técnica se opera a presiones comprendidas entre 0,1 y 2 bar, con membranas cuyo diámetro de poro oscila entre 0,1 y 10  $\mu\text{m}$ . La membrana seleccionada en este caso tiene un diámetro de poro (0,2  $\mu\text{m}$ ) adecuado para retener los niosomas y obtener una elevada densidad de flujo de permeado. Además, se opera de forma que la alimentación circule por el módulo de membrana con *flujo tangencial*, es decir, el flujo de alimentación es paralelo a la superficie de la membrana: en esta situación se minimiza la acumulación de solutos sobre dicha superficie al ejercer una fuerza de arrastre sobre los mismos y, por lo tanto, el ensuciamiento de la membrana, siendo posible mantener una elevada densidad de flujo de permeado durante más tiempo (Strathmann, 2011).



**Figura 5.** Diagrama de operación de una membrana tubular.

### 3. OBJECTIVES

The main objective of this work has been to study the technical feasibility of a niosome extraction-microfiltration hybrid process using  $\text{TiO}_2$  tubular ceramic membranes (0,2  $\mu\text{m}$  pore diameter) for citric acid recovery from dilute aqueous solutions. Microfiltration, an environmental-friendly separation process, has been used to separate and concentrate the niosomes with the extracted citric acid.

The following specific objectives have also been established to achieve this main goal:

1. To study the variation of the citric acid extraction degree over time when niosome dispersions with different volumes were added to the feed.
2. To study the effect of feed citric acid concentration on the variation of the citric acid extraction degree over time.
3. To study the variation of permeate flux with the volume concentration ratio for the experiments performed in this work.

4. To apply a theoretical model in order to obtain the citric acid extraction degree over time and to compare it with the experimental results.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos utilizados

Todos los experimentos se llevaron a cabo con disoluciones acuosas sintéticas de ácido cítrico como alimentación, utilizando los siguientes reactivos:

- Ácido cítrico ( $C_5H_8O_7$ ), con peso molecular 192,14 g/mol, suministrado por VWR Chemicals con una pureza del 99,9%.
- Tensioactivos para la formulación de los niosomas:
  - Dodecilsulfato sódico (SDS): es un tensioactivo aniónico de fórmula molecular  $C_{12}H_{25}NaSO_4$  y peso molecular 288,38 g/mol. Es un sólido pulverulento de color blanco suministrado por Sigma-Aldrich, con una pureza mínima del 99,0%.
  - Span 80 (monooleato de sorbitano): tensioactivo no iónico, de fórmula molecular  $C_{24}H_{44}O_6$  y peso molecular 428,62 g/mol. Es un líquido viscoso de color amarillo suministrado por Sigma-Aldrich, con una pureza mínima del 95%.

Los reactivos utilizados en el análisis cromatográfico del ácido cítrico mediante HPLC son:

- Ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), líquido incoloro con una pureza mínima del 85% en disolución acuosa. Peso molecular: 98 g/mol. Suministrado por Sigma-Aldrich.
- Dihidrógenofosfato de potasio ( $KH_2PO_4$ ): polvo cristalino de color blanco con un peso molecular de 136,1 g/mol y una pureza mayor del 98%. Suministrado por Panreac. Utilizado junto con el ácido fosfórico para la preparación del tampón fosfato.
- Ácido maleico ( $C_4H_4O_4$ ), utilizado como patrón interno. Producto líquido, con un peso molecular de 116,07 g/mol y pureza mayor del 99%. Suministrado por Fluka.
- Metanol ( $CH_4O$ ) para cromatografía (99,9%). Peso molecular: 32,04 g/mol. Suministrado por Hipersolv Chromanorm. Usado como eluyente de limpieza del HPLC.

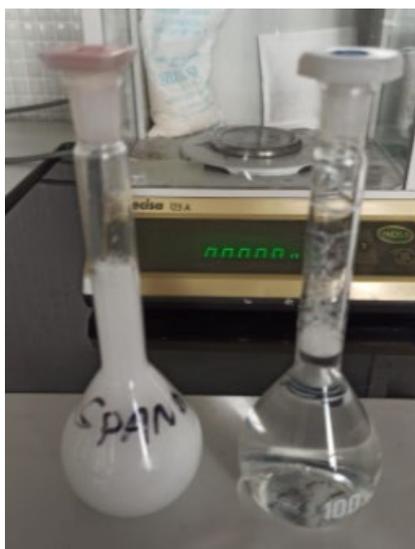
Se utilizó también hidróxido de sodio (NaOH, 99%, Scharlau) para la limpieza de la membrana utilizada después de cada experimento.

Para todos los análisis y métodos se usó agua ultrapura Tipo I Milli-Q (Merck-Millipore), obtenida a partir de agua destilada Tipo II mediante un equipo de purificación Ecomatic 3L DP50L (Wasserlab).

### 4.2. Formulación de niosomas y medida de sus propiedades

La formulación de los niosomas se realizó a partir de las siguientes disoluciones acuosas de los tensioactivos Span 80 y SDS (Figura 6), preparadas al menos 24 horas antes de su utilización, pesando las cantidades exactas de tensioactivo en una balanza analítica (Sartorius, precisión de  $\pm 0,0001$  g) y adición de agua desionizada hasta un volumen final de 100 mL utilizando matraces aforados.

- Disolución A: disolución acuosa de Span 80 con una concentración de 0,04 mol/L (40 mM). Esta disolución se preparó y se dejó agitando como mínimo 24 horas antes de su uso, con el fin de disolver bien el tensioactivo e hidratar y relajar las cadenas carbonadas que conforman su estructura molecular. Debe guardarse en oscuridad, ya que el Span 80 se puede degradar con la luz.
- Disolución B: disolución acuosa de SDS con una concentración de 0,008 mol/L (8 mM).



**Figura 6.** Disoluciones de Span 80 (blanco) y SDS (transparente).

Partiendo de los volúmenes adecuados de las disoluciones anteriores, se prepararon, en matraces aforados, de 10 a 30 mL (dependiendo del experimento a realizar) de una disolución con una concentración final de Span 80 (20 mM) + SDS (4 mM), enrasando con agua Milli-Q hasta el volumen requerido. Estas son las concentraciones óptimas para la formulación de los niosomas con estos tensioactivos, según estudios previos (Roque, 2020).

Las muestras formuladas convenientemente se sometieron a ultrasonidos (US) para la formación de los niosomas, utilizando un homogeneizador ultrasónico Vibra-cell VCX 500 (Sonics & Materials Inc.), equipado con una sonda bicilíndrica de aleación de titanio de 3 mm de diámetro. Para ello, se introducen 10 mL de muestra en un tubo Falcon de centrífuga, se sujeta el tubo y se introduce la sonda de ultrasonidos en el interior de la disolución, aproximadamente a 1 cm de su base, procurando que esté bien centrada y que no toque las paredes ni el fondo del tubo. Una vez colocada, se aplican los ultrasonidos bajo las siguientes condiciones de operación (se pueden programar en el controlador del equipo):

- Tiempo de ultrasonidos: 5 minutos en pulsos de 5 segundos (tiempo total de duración del proceso de aproximadamente 10 minutos)
- Amplitud de los ultrasonidos: 30%
- Potencia de ultrasonidos: 500 W

Una vez formulados los niosomas, se tapa el tubo Falcon y se introduce en la centrífuga (Eppendorf 5804) durante 45 minutos a una velocidad de 9000 rpm, con el fin de eliminar

las pequeñas partículas metálicas que se hayan podido desprender de la sonda de ultrasonidos y que pueden interferir en la medida de las propiedades de los niosomas.

Posteriormente, se recoge el sobrenadante y se miden las siguientes propiedades de los niosomas formulados, utilizando un equipo Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd.):

- Tamaño de partícula, mediante el método de dispersión dinámica de luz láser (DLS). Mediante este método se puede determinar tanto la distribución del tamaño de partícula como el diámetro hidrodinámico medio y el índice de polidispersión (IPD). El tamaño de partícula de cada muestra se midió por triplicado en una cubeta de polipropileno, añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de muestra y 1950  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q.
- Índice de polidispersión (IPD). Es una medida de la anchura de la distribución del tamaño de las partículas y su valor está comprendido entre 0 y 1. Cuanto menor sea este valor de IPD, mayor será la uniformidad de la muestra.
- Potencial zeta. Se determina a través del cálculo de la movilidad electroforética y es una medida de la estabilidad de una dispersión coloidal, ya que es un indicador de la magnitud de la fuerza repulsiva entre partículas coloidales debido a su carga eléctrica superficial. Esta medida se realiza en unas celdas capilares, que poseen dos electrodos de oro en los laterales, permitiendo el paso de la corriente eléctrica a su través. La muestra será la misma que la utilizada para medir el tamaño de partícula y el IPD, utilizando una jeringuilla para llenar la celda de medida, realizando cada medida por sextuplicado.

Se considera que los niosomas están bien formulados cuando tienen un diámetro medio de aproximadamente 250 nm, con IPD < 0,3 y potencial zeta negativo (en este caso) con un valor de al menos  $-30$  mV.

### **4.3. Proceso de extracción niosomal con membranas**

El dispositivo utilizado para llevar a cabo el proceso combinado de extracción con niosomas y microfiltración se muestra en la Figura 7. Está formado por un tanque encamisado de alimentación de 500 mL de capacidad, una bomba peristáltica (Masterflex l/s economy drive, Cole Parmer, CRS rotor EW-07518-00) para impulsar la alimentación hacia el módulo de la membrana y dos manómetros para medir la presión a la entrada y a la salida del módulo de membrana, determinando así la presión transmembrana (PTM) como la media de las dos medidas, una válvula de aguja situada en la corriente del retenido para modificar la presión, y un depósito para recoger el permeado. En todos los experimentos se utilizó una membrana cerámica tubular monocanal Filtanium (Tami Industries) de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), con 254 mm de longitud, 6 y 10 mm de diámetro interno y externo, respectivamente, y un área efectiva de membrana de  $47 \text{ cm}^2$ .



**Figura 7.** Dispositivo experimental utilizado.

En todas las experiencias se utiliza como alimentación 400 mL de una disolución acuosa de ácido cítrico de concentración conocida (5, 10 o 20 mM) y un volumen de fase dispersa (10 o 30 mL) conteniendo los niosomas formulados según lo indicado en el apartado 4.2: Span 80 (20 mM) y SDS (4 mM).

Se midió el pH de las diferentes alimentaciones y permeados con un pH-metro Crison GLP 22 equipado con un electrodo tipo T2-02 para medios acuosos. El valor del pH de las disoluciones de ácido cítrico utilizadas como alimentación fue 3.35 (5 mM), 3.26 (10 mM) y 3.12 (20 mM). No se obtuvo apenas variación en la medida del pH de las alimentaciones y los permeados.

Las condiciones de operación para todos los experimentos fueron las siguientes: PTM = 0,3 bar, T = 20 °C y posición 4 del rotor de la bomba (proporciona un caudal de agua de 36 L/h). En la Tabla 1 se indican el resto de las condiciones de los experimentos realizados en este trabajo.

**Tabla 1.** Condiciones de los 4 experimentos realizados para este trabajo.

EXPERIMENTO	FASE DISPERSA (NIOSOMAS)	ALIMENTACIÓN (ÁCIDO CÍTRICO)	
	Volumen (mL)	Volumen (mL)	Concentración (mM)
1	10	400	5
2	30		5
3			10
4			20

Previamente al comienzo de la experimentación se comprobó que la membrana estaba limpia, midiendo la densidad de flujo de permeado con agua Milli-Q, Ec. (1), que debe ser aproximadamente el mismo (130 L/m<sup>2</sup> h) después de cada limpieza.

$$J = \frac{V_p}{t A} \quad (1)$$

donde  $J$  es la densidad de flujo de permeado,  $V_p$  es el volumen de permeado recogido en un tiempo  $t$ , y  $A$  es el área efectiva de la membrana ( $47 \text{ cm}^2$ ).

En todas las experiencias se han llevado a cabo dos etapas consecutivas que se describen a continuación.

#### **4.3.1. Etapa de recirculación total**

Antes de empezar un experimento se vacía completamente de agua (o de disolución) todo el circuito, se añaden 400 mL de la disolución de ácido cítrico al tanque de alimentación, se conecta la bomba en la posición 4 (caudal de 36 L/h previamente calculado) y, sin aplicar presión, se deja recircular la alimentación a través del circuito durante 5 minutos (con la salida del permeado tapada). Transcurridos esos 5 minutos, se abre la salida del permeado, se fija la presión (0,3 bar) y se deja recircular la alimentación a través del circuito durante 15 minutos. Se trabaja en modo de recirculación total, es decir, tanto el retenido como el permeado se recirculan al tanque de alimentación. A los 10 minutos aproximadamente se toma una muestra (3,5 mL) de la alimentación dentro del tanque (previamente se ha tomado otra muestra de la alimentación inicial).

Transcurridos los 15 minutos de recirculación, se añade al tanque de alimentación la disolución de niosomas (10–30 mL, dependiendo del experimento), empezando en ese momento a tomar datos del tiempo de operación. Se mantienen las condiciones de operación (0,3 bar, posición 4, recirculación de retenido y permeado al tanque de alimentación) y se van tomando muestras de permeado (3,5 mL cada una, aproximadamente): la primera nada más añadir los niosomas y después cada 3 minutos, aproximadamente, durante un tiempo total de 45 minutos.

#### **4.3.2. Etapa de concentración**

Transcurridos los 45 minutos de la etapa anterior, se retira la salida del permeado del tanque de alimentación y se va recogiendo en un vaso situado sobre la balanza (trabajo en modo de concentración: se recircula sólo el retenido al tanque de alimentación y no el permeado). Se va anotando el peso de permeado recogido a lo largo del tiempo. Se detiene el experimento (parando la bomba) cuando se han recogido aproximadamente 300 mL de permeado.

Se coge una muestra del permeado final (en el vaso sobre la balanza) y del retenido final (en el tanque de alimentación). Se mide el pH, tamaño y potencial zeta de las muestras. Se mide la concentración de ácido cítrico mediante HPLC en todas las muestras recogidas en ambas etapas.

#### **4.3.3. Limpieza de la membrana**

Después de cada experimento se siguió un protocolo de limpieza de la membrana, procediendo de la siguiente forma:

- a) Vaciado del circuito y aclarado con agua Milli-Q (3-5 minutos, sin presión).
- b) Limpieza con una disolución de NaOH 0,1 M durante 20 minutos a una presión de 0,1-0,2 bar en modo de recirculación total.

- c) Aclarado con agua (1 o 2 veces).
- d) Medida final de J a 0,3 bar en la posición 4 de la bomba, para comprobar si se ha limpiado correctamente. Si este flujo es inferior al flujo de permeado inicial, se deberá volver a repetir el proceso de limpieza hasta conseguir un flujo similar al inicial.

#### **4.4. Determinación de la cantidad de ácido cítrico no encapsulado mediante HPLC**

La concentración de ácido cítrico se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizando un cromatógrafo Shimadzu. Este cromatógrafo es un equipo formado por varios módulos: un desgasificador modelo DGU-14, un controlador de bomba modelo FCV AL VP, una bomba modelo LC-10AD VP y un inyector automático modelo SIL-10AD VP. El detector SPD-M20A fue un diodo array (DAD). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: se utilizó una columna de fase reversa ACE 5C18 (ACE HPLC columns) con un diámetro interno de 4,6 mm y 250 mm de longitud. Como fase móvil se utilizó una disolución tampón fosfato formada por 0,2% v/v de ácido fosfórico y 0,16% en peso de dihidrógenofosfato potásico, con un flujo de 1,2 mL/min. La longitud de onda fue de 216 nm. Se ha utilizado como patrón interno ácido maleico (500 ppm). Las muestras fueron preparadas con 1,5 mL de la propia muestra y 30  $\mu$ L de la disolución de ácido maleico. El volumen de muestra inyectado fue de 40  $\mu$ L, con un tiempo de medida de aproximadamente 12 minutos. Se midieron dos réplicas por muestra.

Previamente se realizó un calibrado con disoluciones de ácido cítrico de concentración conocida entre 2 mM y 6 mM. Al finalizar el análisis cromatográfico, la columna de HPLC se limpió mediante dos etapas; en primer lugar, se pasó agua Milli-Q durante al menos 30 minutos con un flujo de 1 mL/min y finalmente se pasó metanol-agua (85-15) durante al menos 30 minutos a un flujo de 1 mL/min.

## **5. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Grado de extracción de ácido cítrico**

En primer lugar, es importante indicar que todos los niosomas formulados en este trabajo tenían un tamaño comprendido entre 200 y 300 nm, un índice de polidispersión (IPD) entre 0,2 y 0,3, y un potencial zeta de  $-60$  a  $-70$  mV. Después de realizar los experimentos se volvieron a medir estos parámetros en el retenido y el permeado final: en el retenido se obtuvieron valores similares, mientras que en el permeado se constató la ausencia total de niosomas.

En la etapa de extracción (recirculación total) se recogen muestras de 3,5 ml de permeado cada 3 minutos, con el objetivo de determinar la concentración de ácido cítrico que no ha sido encapsulado por los niosomas, debido a que se ha comprobado experimentalmente que los niosomas con el ácido cítrico encapsulado no pueden atravesar la membrana, ya que tienen un tamaño mayor de 200 nm. Esta concentración se determina por HPLC, calculando mediante la Ec. (2) el grado de extracción del ácido cítrico por los niosomas (Roque et al., 2015).

$$EE_{A,t} = \frac{C_{A(NS)t} V_{(F)t}}{C_{A(W)}^0 V_{(W)}^0} = \frac{C_{A(W)}^0 V_{(W)}^0 - \sum C_{A(p)i} V_{(p)i} - C_{A(p)t} V_{(F)t-1}}{C_{A(W)}^0 V_{(W)}^0} \quad (2)$$

Donde:

$EE_{A,t}$	Grado de extracción de ácido cítrico
$C_{A(NS)t}$	Concentración de ácido cítrico extraído en los niosomas a tiempo t
$V_{(F)t}$	Volumen de alimentación a tiempo t
$C_{A(W)}^0$	Concentración inicial de ácido cítrico en la alimentación
$V_{(W)}^0$	Volumen inicial de alimentación
$C_{A(p)i}$	Concentración de ácido cítrico en cada muestra i de permeado, retirado para analizar por HPLC
$V_{(p)i}$	Volumen de muestra de permeado recogida para analizar (3,5 mL)
$C_{A(p)t}$	Concentración de ácido cítrico a tiempo t
$V_{(F)t-1}$	Volumen de la alimentación a tiempo t-1

Los resultados se evaluaron calculando la relación molar entre el ácido cítrico extraído en los niosomas y su cantidad total presente en la dispersión inicial. Se calculó mediante el balance de materia mostrado en la Ec. (2), asumiendo un modelo de dos fases en el que la concentración total de ácido cítrico en el volumen total de alimentación,  $V_{(F)}$ , es la suma de la fracción extraída por los niosomas,  $C_{A(NS)}$ , y el ácido cítrico no extraído que queda libre en la fase continua y que atraviesa la membrana de MF pasando al permeado.

Asumiendo que, en el estado estacionario, la velocidad de extracción puede describirse mediante la velocidad de transferencia de materia entre fases, Ec. (3), se puede obtener un valor calculado de la concentración de ácido cítrico en la fase acuosa mediante la Ec. (4), siempre que se conozca el valor del coeficiente volumétrico global de transferencia de materia ( $K a$ ), y seguidamente se podrá obtener el valor de la eficacia de extracción teórica mediante la Ec. (2).

$$-\frac{dC}{dt} = Ka (C - C^*) \quad (3)$$

$$C = C^* + (C_0 - C^*) \text{Exp} [(K * a) * t] \quad (4)$$

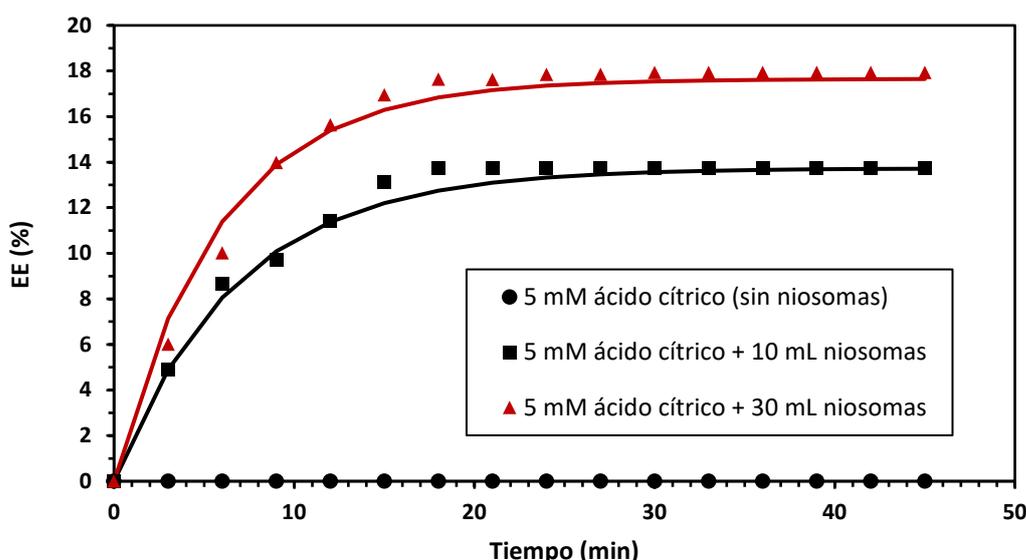
Donde:

$C$	Concentración calculada de ácido cítrico
$C^*$	Concentración de ácido cítrico en condiciones de equilibrio
$C_0$	Concentración inicial de ácido cítrico

$K$	Coeficiente global de transferencia de materia referido a la fase acuosa
$a$	Área específica para la transferencia de materia (área de interfase/volumen)
$t$	Tiempo

### 5.1.1. Efecto del volumen de fase dispersa añadida a la alimentación

En primer lugar se estudió el efecto que el volumen de la fase dispersa de niosomas añadida a la alimentación (5 mM de ácido cítrico) puede tener sobre el grado de extracción del ácido cítrico. Como puede observarse en la Figura 8, el grado de extracción fue nulo cuando no se añadieron niosomas, como cabría esperar. También puede observarse cómo el grado de extracción es un 22% superior cuando se utiliza un volumen de niosomas de 30 mL que cuando el volumen de fase dispersa es de 10 mL, alcanzando una eficacia de extracción del 17,63 %, con un buen ajuste entre los resultados experimentales y los teóricos.

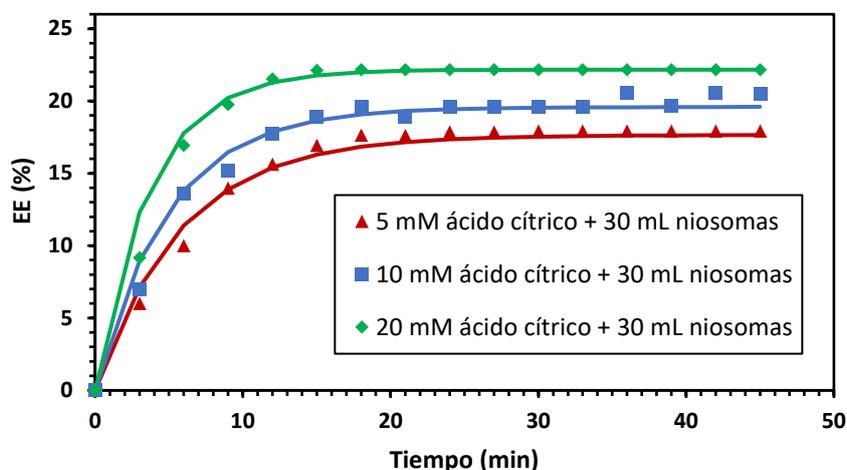


**Figura 8.** Efecto del volumen de fase dispersa (niosomas) añadido sobre el grado de extracción del ácido cítrico a lo largo del tiempo: datos experimentales (símbolos) vs. datos teóricos (líneas).

### 5.1.2. Efecto de la concentración inicial de ácido cítrico

En la Figura 9 se muestra el grado de extracción experimental y teórico a lo largo del tiempo para diferentes concentraciones iniciales de ácido cítrico en la alimentación y un mismo volumen de fase dispersa (30 mL de niosomas). Se obtuvo una mayor extracción de ácido cítrico en el experimento en el que se partía de una mayor concentración inicial (20 mM): dicho grado de extracción en el equilibrio es casi un 26% superior al obtenido para la alimentación de 5 mM de ácido cítrico (22,17% frente al 17,63%,

respectivamente), y más del 60% superior al obtenido en el experimento con menor volumen de fase dispersa añadido.



**Figura 9.** Efecto de la concentración inicial de ácido cítrico sobre el grado de extracción a lo largo del tiempo: datos experimentales (símbolos) vs. datos teóricos (líneas)

Los valores del coeficiente volumétrico global de transferencia de materia y el grado de extracción en el equilibrio se muestran en la Tabla 2 para todos los experimentos realizados. El coeficiente volumétrico global ( $K_a$ ) se obtuvo por ajuste de los valores experimentales a la Ec. (4), linearizando la misma mediante el uso de logaritmos.

**Tabla 2.** Valores del coeficiente global volumétrico ( $K_a$ ) referido a la fase acuosa y el porcentaje del grado de extracción del ácido cítrico, para los diferentes experimentos.

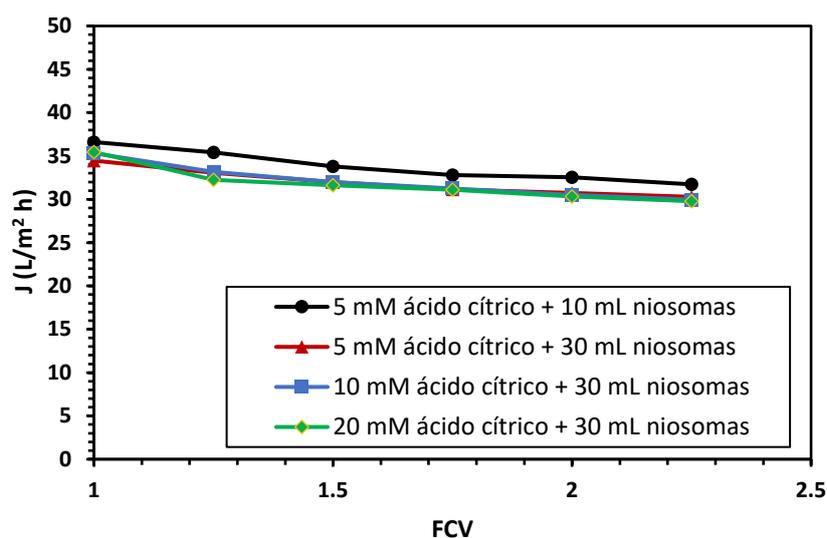
Experimento	$K_a$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$EE_{\text{equilibrio}}$ (%)
5 mM ácido cítrico + 10 mL niosomas	0,1449	13,73
5 mM ácido cítrico + 30 mL niosomas	0,1701	17,63
10 mM ácido cítrico + 30 mL niosomas	0,2009	19,59
20 mM ácido cítrico + 30 mL niosomas	0,2665	22,17

## 5.2. Variación de la densidad de flujo de permeado

Finalmente, en la Figura 10 se muestra la variación de la densidad del flujo del permeado ( $J$ ) frente al factor de concentración en volumen, definido de la siguiente forma:

$$FCV = \frac{V_0}{V_r} \quad (5)$$

siendo  $V_0$  el volumen inicial de alimentación (fase continua más fase dispersa añadida, es decir, 0,41 o 0,43 L, dependiendo del experimento) y  $V_r$  el volumen de retenido en cada instante para la etapa de concentración de los experimentos de MF. Se puede observar cómo la densidad de flujo de permeado es muy similar para todos los experimentos, con diferencias menores del 7% entre todos ellos, y va disminuyendo lentamente, debido a la polarización de concentración y el ensuciamiento de la membrana, hasta llegar a un FCV final de 2,25. No ha sido posible alcanzar menores valores de FCV debido al elevado volumen muerto del dispositivo experimental, que impide seguir con el experimento una vez obtenidos 230-240 mL de permeado. Como cabría esperar, las mayores  $J$  se obtuvieron para los experimentos con menor concentración de ácido cítrico en la alimentación y menor volumen de fase dispersa añadida, pero la buena noticia para un desarrollo posterior a gran escala del proceso es que la disminución de  $J$  no es tan acusada para los experimentos con el mayor volumen de fase dispersa (menos del 7% comparado con el de mayor  $J$ , como se ha indicado anteriormente).



**Figura 10.** Densidad de flujo de permeado ( $J$ ) frente al factor de concentración en volumen (FCV) para los experimentos de concentración (2ª etapa del proceso de extracción).

## 6. CONCLUSIONES

Se ha demostrado la viabilidad técnica del proceso combinado propuesto para la extracción del ácido cítrico utilizando niosomas y microfiltración. El mayor grado de extracción de ácido cítrico (22,17 %) se obtuvo añadiendo un volumen de niosomas de 30 mL sobre una alimentación inicial de 20 mM de ácido cítrico. En general, se puede afirmar que el grado de extracción aumenta al aumentar el volumen de fase dispersa añadida a la alimentación y la concentración de ácido cítrico en la misma, bajo las condiciones estudiadas en este trabajo.

Como cabría esperar, la densidad del flujo de permeado (J) va decreciendo a consecuencia de la polarización de concentración y el ensuciamiento de la membrana. La mayor densidad de flujo de permeado se obtuvo para el experimento con menor concentración inicial de ácido cítrico y menor volumen de niosomas, aunque la disminución de J no es muy diferente para todos los experimentos, habiendo diferencias de menos del 7% entre ellos.

Aunque los resultados obtenidos son prometedores, es necesario realizar experimentación adicional en un futuro para intentar aumentar el grado de extracción de ácido cítrico, como puede ser una extracción en varias etapas, utilizando el permeado obtenido en la MF como alimentación para una segunda etapa de extracción con niosomas y nueva microfiltración, o bien utilizar membranas de un tamaño de poro diferente.

## BIBLIOGRAFÍA

Apelblat, A. (2014). *Citric Acid* (1st ed.). Springer International Publishing, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11233-6>

Benito, J.M., Conesa, A., Rodríguez, M.A. (2004). Membranas cerámicas. Tipos, métodos de obtención y caracterización. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 43, 829-842. [http://boletines.secv.es/upload/20070322182141.43\[5\]829-842.pdf](http://boletines.secv.es/upload/20070322182141.43[5]829-842.pdf)

Corrá, B., de Jesús, F., Pizzorno, E., Sosa, S., Soto, D. (2021). Producción de ácido cítrico a partir de glicerol CITAC. Tesis de Grado. Universidad de la República, Uruguay. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12008/27352>

Fraile, R., Geanta, R.M., Escudero, I., Benito, J.M., Ruiz, M.O. (2015). Formulation of Span 80 niosomes modified with SDS for lactic acid entrapment, *Desalination and Water Treatment* 56, 3463-3475. <http://dx.doi.org/10.1080/19443994.2014.993726>

Ge, X., Wei, M., He, S., Yuan, W.-E. (2019). Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery. *Pharmaceutics* 11, 55. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020055>

Geanta, R.M. (2009). Recuperación de ácidos láctico y cítrico utilizando extracción micelar con membranas. Tesis Doctoral. Universidad de Burgos. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10259.1/59>

Geanta, R.M., Ruiz, M.O., Escudero, I. (2013). Micellar-enhanced ultrafiltration for the recovery of lactic acid and citric acid from beet molasses with sodium dodecyl sulphate. *Journal of Membrane Science* 430, 11-23. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.12.006>

Muñoz-Villa, A., Sáenz-Galindo, A., López-López, L., Cantú-Sifuentes, L., Barajas-Bermúdez, L. (2014). Ácido cítrico: compuesto interesante. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* 6(12), 18-23. Disponible en: <http://www.actaquimicamexicana.uadec.mx/articulos/12-4%20citricos.pdf>

Reyes, C., López, L., Rubí, H., Ramírez, O. (2013). Desarrollo de un bioproceso industrial de la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. En: Rodríguez Sánchez, M. y Aguirre Puente, J.A. (eds.), *Congreso Interdisciplinario de Cuerpos Académicos*. ECORFAN, México, pp. 137-151. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4783018>

Roque, L., Escudero, I., Benito, J.M. (2015). Lactic acid recovery by microfiltration using niosomes as extraction agents. *Separation and Purification Technology* 151, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.07.018>

Roque, L. (2020). Span 80: estudios de extracción y caracterización. Tesis Doctoral. Universidad de Burgos. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10259/5587>

Strathmann, H. (2011). *Introduction to Membrane Science and Technology*. Wiley-VCH, Weinheim, pp 251-270.