

Article:

Obtaining Polylactic Acid as an Input for the Production of Biopolymeric Material from Whey

Anny Rosales¹ , Franklin García² , Vincenzo Storaci³ , Jhonny J. Medina B.^{1*} ,

¹ Laboratorio de Polímeros, Centro de Investigaciones Químicas, Facultad de Ingeniería,

² Departamento de Química, Estudios Básicos, Facultad de Ingeniería,

³ Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología,

Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela

Recibido: agosto 2021

Aceptado: noviembre 2021

* Autor para correspondencia: J. Medina. e-mail: polimerosciq@gmail.com,

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.6428019>

Abstract

The research consisted of using whey from semi-industrial and artisanal cheese factories as raw material for the production of polylactic acid (PLA). Initially, the physicochemical properties of the collected whey were determined. For the fermentation, the microorganism *Lactobacillus casei* was used, the process was carried out by loading for 24 hours and the purification of the resulting lactic acid (LA) was achieved by means of the liquid-liquid separation technique with 1-butanol, reaching the concentrations $(18.53 \pm 0.05) \% w/v$ for the solution obtained from the aqueous phase and $(21.90 \pm 0.05) \% w/v$ of the organic phase. The AL polycondensation reaction was carried out in the presence of zinc, obtaining a polymer with a melting point of $173 \pm 1^\circ C$, density $1.3 \pm 0.1 g/mL$ and hardness of 62 Shore A. In addition, a hydrolytic degradability study showed a weight loss of $4.13 \pm 0.01 \%$ of the material.

Keywords: whey; lactic acid; polylactic acid (PLA); fermentation; *Lactobacillus casei*.

Artículo:

Obtención de ácido poliláctico como insumo para la producción de material biopolimérico a partir de suero lácteo

Resumen

La investigación consistió en utilizar el suero lácteo procedente de las fabricas semi industriales y artesanales de quesos, como materia prima para la producción de ácido poliláctico (PLA). Inicialmente se determinaron las propiedades fisicoquímicas de los sueros recolectados. Para la fermentación se empleó el microorganismo *Lactobacillus casei*, el proceso se llevo a cabo por carga durante 24 horas y la purificación del ácido láctico resultante (AL) se logró mediante la técnica de separación líquido-líquido con 1-butanol, alcanzando las concentraciones $(18,53 \pm 0,05) \% p/v$ para la solución obtenida de la fase acuosa y $(21,90 \pm 0,05) \% p/v$ de la fase orgánica. La reacción de policondensación del AL se realizó en presencia de zinc, obteniéndose un polímero con punto de fusión de $173 \pm 1^\circ C$, densidad $1,3 \pm 0,1 g/mL$ y dureza de 62 Shore A. La espectroscopía de infrarrojo reveló bandas características del AL. Además, un estudio de degradabilidad por hidrólisis, mostró una pérdida de peso del $4,13 \pm 0,01 \%$ del material.

Palabras clave: suero lácteo; ácido láctico; ácido poliláctico (PLA); fermentación; *Lactobacillus casei*.

1. Introducción

El avance de los niveles de contaminación ambiental debido a los desechos en la industria láctea ha propiciado la búsqueda de alternativas eficientes y económicas para su aprovechamiento [1]. El suero de leche es el subproducto más abundante, el cual se obtiene en el proceso de fabricación de queso [2].

El lactosuero puede ser clasificado, según sus propiedades fisicoquímicas, como *ácido* o *dulce*. En el primer grupo, se encuentran aquellos que provienen de la fabricación de quesos frescos de pasta blanda, obtenidos a partir de leche de vaca y/o de cabra. En el proceso, la lactosa se ha transformado en ácido láctico, siendo ricos en calcio y fósforo. En cambio, el *dulce* resulta de la manufactura de quesos de pasta cocida y prensada (vaca y/o ovejas) [3], es pobre en ácido láctico, calcio y fósforo [4]. Otra forma de clasificar los lactosueros es mediante el método aplicado para la precipitación de la caseína (separación del coágulo de la leche), en el caso del *dulce*, para la coagulación se emplea la renina a pH 6,5 [5], mientras que para la obtención del *ácido* se utiliza la fermentación o adición de ácidos orgánicos o minerales [6].

Por sí mismo, el suero lácteo no puede ser comercializado como un producto alimenticio, ya que posee bajo porcentaje de fuentes aprovechables para la nutrición humana como lactosa (3,3 – 6,0 %) y proteínas (0,32 – 0,70 %) [7]. En consecuencia, la mayor parte pasa al agua del desagüe industrial convirtiéndose en un efluente con alto grado de contaminación, debido a su gran demanda biológica y química de oxígeno [8]. No obstante, dado los nutrientes que posee, puede ser utilizado como sustrato para el crecimiento de microorganismos capaces de producir ácido láctico (AL) [9].

El AL (ácido 2-hidroxi-propanoico) es un ácido orgánico, de elevado valor por sus diversas aplicaciones en la industria de alimentos, farmacéutica, química, entre otras [10]. Este compuesto puede ser producido por síntesis química o biotecnológica. La obtención química está basada en la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico originando un lactonitrilo que puede ser hidrolizado a ácido láctico [11]. La otra ruta se fundamenta en la reacción a alta presión de acetaldehído con monóxido

de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador. El proceso es costoso dado que el petróleo es la base de la materia prima.

Los elevados costos económicos de fabricación empleando las vías de síntesis química, así como la dependencia de otras industrias para su obtención y los problemas propios de la impureza del producto, hacen de los procesos basados en producción biotecnológica, mediante fermentación con diferentes tipos de microorganismos y sustratos, la mejor opción para la elaboración de AL [12].

Por tratarse de un método que emplea materias primas renovables y además es amigable con el ambiente, la producción biotecnológica del AL ha adquirido gran importancia industrial [13]. Asimismo, ofrece varias ventajas como el asequible costo de los sustratos, moderadas temperaturas de producción y bajo consumo de energía [14].

La importancia de la bioconversión del suero lácteo en AL radica en la posibilidad que ofrece para producir su polímero correspondiente (ácido poliláctico, mejor conocido por sus siglas en inglés como PLA), el cual es biodegradable y gran competidor frente a otros plásticos de origen petroquímico por su amplio rango de propiedades, desde el estado amorfo hasta el estado cristalino [15]. Existen cuatro métodos para la preparación del PLA: la policondensación directa del ácido láctico, la condensación azeotrópica, la polimerización en estado sólido y la polimerización por apertura de anillo [16, 17].

La meta del trabajo fue presentar una alternativa para aprovechar el suero lácteo, subproducto de la manufactura de quesos, como fuente para la producción de PLA; los resultados que aquí se exponen son considerados un valioso aporte para investigaciones a futuro, cuyo interés sea disminuir el grado de contaminación ambiental generado por el vertido del lactosuero en los cuerpos de aguas naturales y por el uso de plásticos de origen petroquímico [18].

2. Metodología

2.1. Recolección de las muestras

Las muestras de suero lácteo se recolectaron en Puerto Cumarebo, municipio Zamora del estado Falcón. Para su selección se aplicó un muestreo de tipo aleatorio simple al azar, según lo indicado en la norma COVENIN 1769-81 [19]. La primera denominada A1 fue tomada en una factoría de propiedad familiar, en la cual preparan queso de manera artesanal; mientras que la segunda designada como A2, se recogió en la empresa LACSA C.A, donde la elaboración de este producto es semi-industrial. Los sueros fueron trasladados en envases plásticos al laboratorio y divididos en dos porciones. Una parte de los mismos fue sometida a un proceso de calentamiento y a la otra permaneció sin alteración alguna.

2.2. Tratamiento del suero

El tratamiento de una porción de cada una de las muestras consistió en desnatado y desproteínización de acuerdo con la metodología planteada por Urribarrí y colaboradores [2]. Para el primer procedimiento, se realizó el pre-calentamiento de los sueros a temperaturas entre 70 y $100 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un tiempo de 30 minutos. Luego, se retiraron de la fuente de calor y se dejaron en reposo, para finalmente, filtrarlos y retirar los sólidos formados. Para el segundo proceso se utilizó un autoclave, las condiciones de operación fueron ajustadas a $115 \pm 1^\circ\text{C}$ y 10 psig durante 20 minutos. Una vez alcanzada la temperatura ambiente en el sistema, fueron centrifugados, decantados y filtrados sus sobrenadantes.

2.3. Determinación de variables fisicoquímicas

Los parámetros evaluados para la caracterización de las muestras de suero con y sin tratamiento térmico fueron: % azúcar ($^\circ\text{Brix}$), contenido de ácido láctico (AL), acidez iónica, % cenizas y la cantidad de proteínas presentes. Las metodologías utilizadas son mencionadas a continuación:

- % azúcar ($^\circ\text{Brix}$). La medida se realizó siguiendo los pasos estipulados por la norma NTE INEN 0273 [20], para ello, se utilizó

el brixómetro modelo TI-RBX0032(A) marca *Trans*.

- *Contenido de ácido láctico (AL) y % de cenizas*. Las variables fueron determinadas empleando los procedimientos descritos en la normas COVENIN 658:1997 [21] y COVENIN 368:1997 [22] respectivamente.
- *Acidez iónica*. Se midió el pH de las muestras mediante un pH-metro modelo 410A marca *ORION*, de acuerdo con la técnica establecida en la norma COVENIN 1315:79 [23].
- *Cantidad de proteínas*. Fue valorada mediante el proceso indicado por Periago et al. [24].

2.4. Fermentación láctica

Una vez obtenidos los resultados de la evaluación de las variables fisicoquímicas en los sueros con y sin tratamiento térmico se procedió a seleccionar el suero más adecuado para llevar a cabo la fermentación láctica. El microorganismo utilizado fue *lactobacillus casei*, de acuerdo con la investigación realizada por Rosales [25], donde comprobó que se trata de una bacteria de costo asequible y que aunque requiere de nutrientes, los mismos son de fácil adquisición.

Tabla 1: Composición del medio de cultivo

Especies	Cantidad utilizada
Suero desnatado y desproteínizado	$1,00 \pm 0,01$ L
Extracto de levadura	$1,00 \pm 0,01$ g
Carbonato de calcio (CaCO_3)	$30,00 \pm 0,01$ g
Fosfato mono-potásico (KH_2PO_4)	$0,50 \pm 0,01$ g
Fosfato di-potásico (K_2HPO_4)	$0,50 \pm 0,01$ g
Sulfato de magnesio (MgSO_4)	$0,20 \pm 0,01$ g
Sulfato de manganeso (MnSO_4)	$0,03 \pm 0,01$ g

El suero seleccionado se suplementó con los reactivos mostrados en la Tabla 1, para crear un medio de cultivo óptimo para la inoculación. La fermentación se realizó en fiolas tapadas con algodón y gasa, en un equipo con control de temperatura y agitación, durante 24 horas. También, se midió el pH, el contenido de AL y $^\circ\text{Brix}$ tanto antes como después del proceso fermentativo.

2.5. Métodos de purificación del AL

El suero lácteo de la fermentación fue filtrado y el líquido obtenido se llevó a destilación simple. El destilado se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se centrifugó para retirar posibles impurezas y compuestos insolubles. Posteriormente, el sobrenadante fue purificado mediante dos métodos: obtención de lactato y separación líquido-líquido.

Obtención de lactato

Se tomaron $100,0 \pm 0,1$ mL del sobrenadante obtenido de la centrifugación y se le agregó $0,5042 \pm 0,0001$ g de carbonato de calcio para la formación del lactato de calcio. Se evaporó el exceso de agua de la solución, empleando temperaturas entre $40-60 \pm 1^\circ\text{C}$ por 1 hora con agitación continua. Luego se le agregó $0,5 \pm 0,1$ mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, se filtró para remover el precipitado formado. El líquido resultante es el AL purificado [25].

Separación líquido-líquido

Se tomaron $200,0 \pm 0,1$ mL del sobrenadante del centrifugado y se le agregó $1,0 \pm 0,1$ mL de ácido sulfúrico concentrado. A la solución resultante se le agregó igual volumen de 1-butanol. Mediante agitación magnética fue mezclado durante 30 minutos y luego se dejó en reposo por 24 horas. La solución fue decantada para retirar el precipitado formado y fue agitada nuevamente durante 10 minutos y finalmente centrifugada. El sobrenadante obtenido se filtró y se pasó a embudos de separación dejándose en reposo hasta observar la separación de las fases. A la capa superior (correspondiente al éster) se le agregó agua y ácido sulfúrico para hidrolizarla, y mediante un proceso de destilación simple se recuperó el AL. El destilado y el residuo recuperado se reservaron para la caracterización del ácido purificado [25].

2.6. Técnicas de identificación del AL

Para el reconocimiento del AL en el destilado y los líquidos residuales se llevaron a cabo análisis de acidez iónica, determinación del % p/v y otros parámetros de interés tales como:

Miscibilidad en agua. La prueba se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Lozano et al. [26] basado en el método básico para medir solubilidad.

Índice de refracción. La metodología de análisis corresponde a la norma COVENIN 2450-87 [27] empleando un refractómetro marca *Bausch y Lomb* tipo *Abbe* modelo 3L.

Densidad. La medida se fundamentó en la técnica del picnómetro expuesta por Velásquez[28].

Punto de ebullición. La propiedad se evaluó siguiendo las pautas de la norma ASTM D 1120-72 [29].

Espectroscopía de infrarrojo. Para la obtención de los espectros fue utilizado el equipo FT-IR *Spectrometer* modelo *Spectrum* 1000 acoplado a un dispositivo informático para el análisis mediante del programa *Spectrum* v2.00; con una resolución de 1 cm^{-1} en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} .

2.7. Síntesis del material polimérico

La síntesis del polímero a partir del ácido láctico obtenido en el proceso de purificación se realizó mediante un proceso de policondensación en tres etapas: pre-concentración, oligomerización o deshidratación y polimerización.

Pre-concentración. Se evaporó 1/3 de una alícuota de solución de ácido láctico purificado a una temperatura comprendida entre $(40\text{ y }60) \pm 1^\circ\text{C}$. Luego, se diluyó $2,0 \pm 0,1$ mL de la solución pre-concentrada con $20,0 \pm 0,1$ mL de agua destilada, (fueron realizados varios procedimientos de pre-concentración, hasta lograr el volumen necesario para la etapa de oligomerización).

Oligomerización. Se colocaron $200,0 \pm 0,1$ mL del AL resultante de la etapa de pre-concentración en un balón de capacidad de 1 litro y se adaptó al sistema de destilación al vacío. Luego se procedió a calentar la solución hasta alcanzar una temperatura de $100 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, se aplicó vacío hasta 635 mmHg por 45 minutos.

Polimerización. Para finalizar la síntesis, se agregó zinc como catalizador manteniendo la temperatura de operación $(100 \pm 1^\circ\text{C})$ y bajando la

Tabla 2: Características fisicoquímicas de los sueros con y sin tratamiento

Parámetro	Sin tratamiento		Con tratamiento		Diferencia	
	S A1	S A2	S A1	S A2	S A1	S A2
Acidez iónica (pH \pm 0,01)	4,53	4,31	4,37	3,91	- 0,16	- 0,40
% azúcar ($^{\circ}$ Brix \pm 0,10)	8,30	4,90	8,40	5,00	+ 0,10	+ 0,10
% cenizas \pm 0,02 % p/p	5,76	3,59	5,63	3,52	- 0,13	- 0,07
Contenido de ácido láctico \pm 0,05 g/L suero	11,99	12,93	12,18	13,89	+ 0,19	+ 0,96
Cantidad de proteínas \pm 0,10 %	15,00	15,30	12,50	14,60	- 2,50	- 0,70

Notación: S A1: suero de quesera de propiedad familiar; S A2: suero de empresa *LACSA*, C.A.

presión hasta 508 mmHg. Condiciones que fueron mantenidas durante 1 hora y 30 minutos aproximadamente.

Después, de forma inmediata se transfirió el producto a moldes (específicos para su solidificación) y colocados en un desecador.

2.8. Propiedades y capacidad de degradación

Para la caracterización del polímero obtenido se determinaron la densidad y el punto de fusión aplicando los procedimientos de Torrelavega [30] y Sánchez [31] respectivamente. Adicionalmente, se le realizó una espectroscopía de infrarrojo. La presencia de zinc se comprobó mediante el ensayo a la llama descrito por Hurtado [32]. Para la evaluación de la dureza se realizó lo indicado por la norma ASTM D2240-15 [33], utilizando un durómetro tipo A, modelo 360 L.

Estudio de degradabilidad. Para los ensayos de degradación hidrolítica, se observó la metodología expuesta en la norma ASTM F1635-16 [34].

3. Discusión de resultados

3.1. Propiedades fisicoquímicas

La Tabla 2 recoge los valores obtenidos para las variables fisicoquímicas analizadas en los sueros con y sin tratamiento térmico.

Acidez iónica. La medida está representada por la lectura del pH que se encuentra entre (3,91 y 4,53) \pm 0,01 para ambas muestras. Además, se observa que después del tratamiento de desnatado y

desproteínizado, estas cifras bajan en 0,16 unidades para la de la quesera de propiedad familiar y en 0,40 unidades para la proveniente de la empresa *LACSA*. Los valores encontrados están dentro del rango establecido por Callejas *et al.* [4] como sueros del tipo ácido, en donde se indica que todo lactosuero que posea un pH < 5 clasifica dentro de esta categoría. La disminución del pH después del tratamiento concuerda con el comportamiento reportado por Urribarrí *et al.* [2], debido a que hubo eliminación de agua y aumentó la concentración de ácido láctico.

% de azúcar. Los valores reportados en la Tabla 2 muestran que el suero procedente de la quesera familiar tiene mayor contenido de azúcares fermentables, en comparación con el de la empresa *LACSA*; característica que está presente tanto en las muestras sin tratar como en las sometidas a tratamiento. También, se observó un leve aumento del porcentaje de azúcar, este comportamiento indica que son un buen sustrato para la fermentación [35]. El cambio observado se debe a que parte del agua se evaporó a causa del proceso térmico aplicado, concentrando así las soluciones.

% de cenizas. El resultado es mayor en el suero de la quesera familiar en comparación con el de la empresa *LACSA*. El tratamiento aplicado permitió la disminución de este parámetro de 5,79 \pm 0,02 % p/p a 5,63 \pm 0,02 % p/p para el primer caso y para el segundo de 3,59 \pm 0,02 % p/p a 3,52 \pm 0,02 % p/p. Apreciándose de esta forma, que el procedimiento resultó más efectivo para la muestra artesanal por presentar una disminución de 0,13 unidades, mientras que la otra de tipo semi-

Tabla 3: Características del medio de cultivo inoculado con *Lactobacillus casei*

Parámetro	Antes de fermentar	Después de fermentar	Cambios producidos
Acidez iónica (pH \pm 0,01) Adim	6,00	5,24	- 0,76
% de azúcar ($^{\circ}$ Brix \pm 0,1) $^{\circ}$ Brix	10,0	8,4	- 1,6
Contenido de ácido láctico (AL \pm 0,05) g AL/L	1,38	7,73	+ 6,35

industrial, solo disminuyó 0,07 unidades. Los valores reportados para este parámetro se encuentran dentro del rango establecido por Parra [6] para un suero ácido y su disminución concuerda con lo reportado por Urribarrí *et al* [2].

Ácido láctico (AL). La determinación de su contenido fue mayor en el suero de la empresa LACSA en comparación con la muestra de origen artesanal. Después de la aplicación del tratamiento, el incremento fue de 0,96 y 0,19 unidades en cada uno de los casos respectivamente. El aumento del compuesto fue a causa del procedimiento realizado [35].

Contenido de proteínas. La muestra de la empresa LACSA arrojó un valor más alto en comparación con el de la quesera familiar. Después del tratamiento se observó que la disminución de este parámetro resultó mayor en el producto artesanal que en el producto semi-industrial, el cual mostró poca variación. En la Tabla 2 se evidencia que la cantidad de proteínas, encontrada en los sueros evaluados antes del procedimiento térmico fue superior a la reportada por varios autores [4, 6, 36]. Los investigadores coinciden que el porcentaje de esta variable se sitúa en un rango de (6 – 12) % aproximadamente. Por lo tanto fue necesario la aplicación de un proceso de desproteinización para disminuir la cantidad de proteínas presentes en la solución, como lo indicó Urribarrí *et al.* [2].

En virtud a los resultados, se establece que los sueros son de tipo ácido y que el tratamiento térmico aplicado resultó efectivo para disminuir las impurezas presentes en ellos, como son las cenizas y las proteínas [37]. Además, se determinó que la muestra tratada, procedente de la factoría familiar, fue la mejor opción a utilizar como sustrato, para la aplicación de un proceso fermentativo

mediante el uso de microorganismos, al poseer un mayor contenido de azúcares fermentables y menor cantidad de proteínas en comparación a la aportada por la empresa LACSA.

3.2. Producción de ácido láctico

La elaboración de AL se realizó empleando un proceso fermentativo del suero lácteo tipo lote de 24 horas a 37 °C y 150 rpm utilizando el microorganismo *Lactobacillus casei* [38]. La Tabla 3 muestra los resultados de la caracterización del medio de cultivo antes y después del procedimiento. La variación de la acidez es debida al aumento de la concentración de AL. A mayor cantidad de la especie, mayor concentración de protones y por ende la disminución del pH. La acidez iónica disminuyó en 0,76 unidades, obteniéndose una medida final de 5,24; descenso que concuerda con el comportamiento reportado por García *et al.* [14] cuando existe la presencia de AL.

El porcentaje de azúcar final expresado como $8,4 \pm 0,1^{\circ}$ Brix frente a su magnitud inicial de $10,0 \pm 0,1^{\circ}$ Brix, confirma la actividad microbiana, disminución que concuerda con los estudios de Sánchez y colaboradores [31], donde justifican que las bacterias propician la formación de la especie de interés, consumiendo los azúcares fermentables presentes en la solución. El contenido de ácido láctico aumentó de 1,38 a 7,73 gramos por cada litro de suero, lo cual representa una producción del ácido de 6,35 gramos por cada litro de solución.

3.3. Selección del método de purificación para la recuperación del AL

La Tabla 4 expone los resultados de las propiedades evaluadas en las soluciones de suero lácteo fermentado, antes y después de ser sometido a dos metodologías experimentales para su aislamiento del medio, una es la obtención del lactato (método 1)

Tabla 4: Propiedades de la solución fermentada antes y después del proceso de purificación

Propiedad	Sin purificación	Método de obtención de lactato	Método de extracción	
			líquido – líquido con 1-butanol Fase acuosa	líquido – líquido con 1-butanol Fase orgánica
Miscibilidad en agua	Miscible	Miscible	Miscible	Miscible
Acidez iónica (pH \pm 0,01) Adim	5,24	4,20	3,79	3,45
Índice de refracción (Nd \pm 0,0001) Adim	1,3580	1,3850	1,4460	1,4445
Densidad ($\rho \pm$ 0,0001) g/mL	1,1342	1,1580	1,1916	1,2017
Punto de ebullición (Temperatura promedio \pm 1°C)	100	118	118	118
Contenido (AL \pm 0,05) % p/v	6,95	7,53	18,53	21,90

Presión ambiente: (712,60 \pm 0,05) mmHgTemperatura ambiente: (31,0 \pm 0,5) °C

y la otra utilizando extracción líquido – líquido con 1-butanol (método 2).

Con respecto a la miscibilidad en agua se encontró que los métodos empleados conducen a la obtención de una especie miscible en agua; hecho que concuerda con el trabajo de Munilla y Blanco [39], en donde se indica que el ácido láctico tiene la propiedad de ser soluble en medios polares. Por otra parte, la acidez iónica expresada inicialmente por un pH de $5,24 \pm 0,01$ tiende a disminuir después de la aplicación de ambos procedimientos. El método 2 reporta el menor valor de pH en la fase orgánica, las variaciones del parámetro coinciden con Gil *et al.* [40] y se consideran indicativo de una purificación efectiva del AL.

La determinación inicial del índice de refracción en la solución fermentada fue de $1,3580 \pm 0,0001$, luego de la aplicación de los procesos para su purificación, su magnitud se mantuvo para el método 1, mientras que para el método 2 se reportó $1,4460 \pm 0,0001$ en fase acuosa y $1,4445 \pm 0,0001$ para la fase orgánica. El cambio observado es debido al aumento de la concentración del AL en la solución. Al comparar los resultados de ambas metodologías, con el índice de refracción teórico del ácido láctico 1,4414 [25] se observa que el valor más cercano corresponde a la fracción del ácido en la fase orgánica del método 2. Un comportamiento similar se aprecia para la densidad, donde su resultado experimental de $1,2017 \pm 0,0001$ es más cercano al teórico de 1,2490 [25], en la misma partición del segundo procedimiento.

Con respecto al punto de ebullición de la solución, se observa que el mismo aumentó, en todos los casos,

de $100 \pm 1^\circ\text{C}$ a $118 \pm 1^\circ\text{C}$. Las cifras indican que la solución fermentada (sin purificar) está compuesta mayormente por agua, mientras que el valor de las alícuotas purificadas se asemeja más al valor teórico del ácido láctico 122°C [25], hecho que evidencia que el proceso de purificación resultó efectivo, tal y como lo indica Arellano [41].

Por último, en la Tabla 4 se visualiza que la concentración de ácido láctico en la solución sin purificar fue de 6,95 % p/v y que luego de la aplicación del método 1, este valor aumentó a 7,53 % p/v, mientras que para el método 2 reportó 18,53 % p/v para la solución obtenida de la fase acuosa y 21,90 % p/v de la fase orgánica. Los resultados concuerdan con el comportamiento reportado en la literatura [40, 41] debido a la eliminación de parte del agua presente en las soluciones por destilación y en el caso del método 2, por la eliminación de impurezas como parte del azúcar remanente en la solución.

Espectroscopía de Infrarrojo (IR) del ácido láctico purificado

La Figura 1 muestra las IR de la solución purificada y del AL comercial. En ambos espectros se puede apreciar la existencia de las bandas características de los grupos carbonilo y OH proveniente del ácido carboxílico y el alcohol presente en la molécula de AL. En 1649 y 1719 cm^{-1} correspondientes a estiramientos del C=O, 2956 cm^{-1} del OH proveniente del alcohol y 3398 cm^{-1} del OH debido al ácido carboxílico.

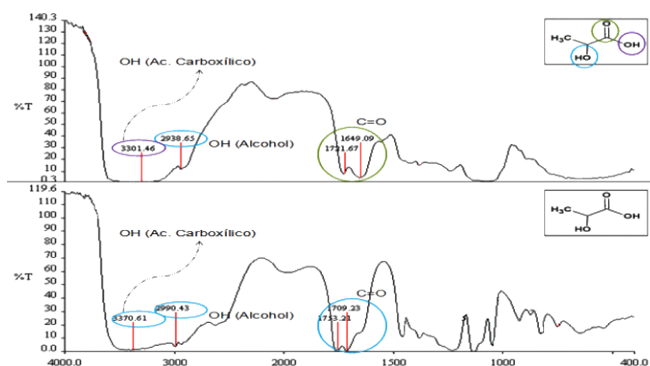


Figura 1: Espectros de infrarrojo del ácido láctico obtenido de la fase orgánica del método 2 mediante separación líquido-líquido (arriba) y de una muestra de ácido láctico comercial (abajo)

3.4. Obtención del polímero a partir de AL purificado

La Tabla 5 resume la información sobre el proceso de policondensación para la obtención del material polimérico. En la etapa de pre-concentración logró aumentar el contenido de AL de $21,90 \pm 0,05$ % p/v a $25\% \pm$ % p/v. Posteriormente, en la oligomerización disminuye el volumen del líquido contenido en el balón de reacción debido a la eliminación de agua por destilación. Finalmente, en la polimerización se observó una capa blanquecina sobre la superficie de la solución, lo cual indica la formación del polímero de interés [42].

3.5. Caracterización del producto polimérico

La Tabla 6 presenta las propiedades del polímero obtenido. Sus valores de densidad y punto de fusión fueron $1,3 \pm 0,2$ g/mL y $173 \pm 1^\circ\text{C}$ respectivamente, los cuales están dentro del rango establecido para el PLA [25]. Además, presentó una dureza de 62 ± 1 Shore A que establece que el material obtenido presenta resistencia a ser rayado o penetrado por otro cuerpo sólido, condición aceptable de acuerdo a lo estudiado por Aponte y Villazón [43]. Adicionalmente, la prueba del ensayo de la llama resultó negativa para la presencia de zinc lo cual se considera un resultado satisfactorio, ya que el reactivo utilizado en la polimerización tenía el objetivo el de funcionar como catalizador, en

Tabla 5: Proceso de policondensación

Etapas	Condición	Variación
Pre-Concentración	Contenido inicial (AL $\pm 0,05$) % p/v	21,90
	Contenido final (AL $\pm 0,05$) % p/v	25,00
Oligomerización	Volumen Inicial de la solución	200 mL
	Volumen Final de la solución	120 mL
Polimerización	Final	Formación del polímero (capa blanquecina sobre la solución)

consecuencia, no debe estar presente en el producto final.

Tabla 6: Caracterización del polímero obtenido

Propiedades	Valor obtenido	Rango de referencia
Densidad ($\rho \pm 0,2$) g/mL	1,3	1,24 – 1,64
Punto de fusión (Pf ± 1) $^\circ\text{C}$	173	170 – 183
Dureza Shore A (D ± 1) Adim	62	–
Prueba de ensayo a la llama	Negativo para la presencia de Zinc	–

Espectro de Infrarrojo del biopolímero

El espectro del producto obtenido presentó bandas de absorción características del PLA, como muestra la Figura 2. El pico que se presenta en $1.744,38\text{ cm}^{-1}$ indica la presencia del grupo C=O. La señal en $2.990,35\text{ cm}^{-1}$ es debido al grupo

Tabla 7: Variación ocurrida en el proceso de degradación hidrolítica

Parámetro		Buffer 1	Buffer 2	Agua de chorro
pH \pm 0,01 Adim	Valor inicial	4,03	10,07	7,31
	Valor final	4,00	10,06	7,21
	% de variación	0,74	0,10	1,37
Peso (P \pm 0,0001)g	Valor inicial	0,2758	0,2744	0,2588
	Valor final	0,2602	0,2650	0,2502
	% de variación	5,6563	3,4256	3,3230

Buffer 1: solución de pH=4; Buffer 2: solución de pH=10.

C-H y en $1219,94\text{ cm}^{-1}$ indica la presencia de los enlaces C-C en el polímero.

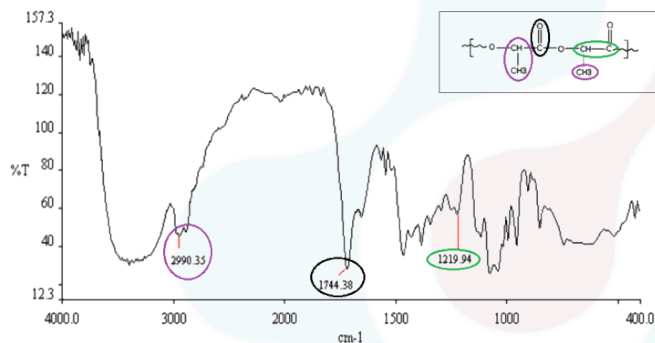


Figura 2: Espectro infrarrojo del polímero sintetizado

Degradación hidrolítica

La Tabla 7 muestra el comportamiento del polímero sintetizado cuando es sumergido en varias soluciones tales como, agua de chorro, buffer pH 4 y pH 10. En todos los medios, el valor de la fuerza iónica (pH) disminuyó después del proceso de degradación; el agua de chorro presentó mayor porcentaje de variación en comparación con los buffer. El hecho de que no cambien significativamente está justificado por Figueira [44]. En cambio, la variación del pH en el agua corriente del 1,37% concuerda con lo reportado por Zuluaga [45], que indica la concentración de grupos carboxilos por efecto de la degradación.

En cuanto al peso de las muestras también se evidenció que el mismo descendió en todos los casos, pero la mayor variación de este parámetro se

observó en aquella que fue sumergida en la solución buffer 1 (pH 4); disminución que concuerda con lo reportado por Mazarro [16], donde refieren que el cambio producido es debido a la ruptura de las cadenas poliméricas.

4. Conclusiones

El proceso biotecnológico basado en el uso lactosueros de desecho, fermentados mediante el microorganismo *Lactobacillus casei*, se presenta como una opción para la producción de AL. Los valores de densidad y punto de fusión demostraron que el material biopolimérico obtenido después de someter al ácido láctico a un proceso de poli-condensación corresponden a los reportados por la literatura para el PLA.

Agradecimientos

Al personal docente y técnico que labora en el Laboratorio de Polímeros del Centro de Investigaciones Químicas de la Facultad de Ingeniería y al personal del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias y Tecnologías, ambos de la Universidad de Carabobo por su apoyo en el desarrollo de esta investigación.

Financiamiento

Este trabajo es parcialmente soportado por el FONACIT, proyecto Nro 2011001269.

Conflicto de Intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses por la realización del presente trabajo.

Referencias

- [1] M. Elsaywy, K. Kim, J. Park, and A. Deep. Hydrolytic Degradation of Polylactic Acid (PLA) and its Composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79:1346–1352, 2017.
- [2] L. Urribarrí, A. Vielma, G. Páez, J. Ferrer, Z. Mármol y E. Ramones. Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Revista Científica / FCV-LUZ*, 14(4):297–302, 2004.
- [3] L. Borrás, E. Valiño y C. Rodríguez. Preparado microbiano con actividad ácido láctica como acelerante biológico en los procesos de fermentación para alimento animal. *Revista Ciencia y Agricultura*, 14(1):7–13, 2017.
- [4] J. Callejas, F. Prieto, V. Reyes, Y. Marmolejo y M. Méndez. Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. *Acta Universitaria*, 22(1):11–18, 2012.
- [5] A. Rojas, L. Montaña y M. Bastidas. Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Colombiana de Química*, 44(3):5–10, 2015.
- [6] R. Parra. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 62(1):49–68, 2009.
- [7] A. Morão and F. Bie. Life Cycle Impact Assessment of Polylactic Acid (PLA) Produced from Sugarcane in Thailand. *Journal of Polymers and the Environment*, 27:2523–2539, 2019.
- [8] M. Ho, K. Lau, H. Wang, and D. Hui. Improvement on the Properties of Polylactic Acid (PLA) using Bamboo Charcoal Particles. *Composites Part B. Engineering*, 81:14–25, 2015.
- [9] S. Liu, G. Wu, X. Chen, X. Zhang, J. Yu, M. Liu, Y. Zhang, and P. Wang. Degradation Behavior in Vitro of Carbon Nanotubes (CNTs)/Poly(lactic acid) (PLA) Composite Suture. *Polymers*, 11(6):1015, 2019.
- [10] V. García, R. Sendón, and A. Rodríguez. Antimicrobial Food Packaging Based on Biodegradable Materials. In J. Barros-Velázquez, editor, *Antimicrobial Food Packaging*, pages 363–384. Academic Press, San Diego, 2016.
- [11] Y. Zhou, L. Lei, B. Yang, J. Li, and J. Ren. Preparation and Characterization of Polylactic Acid (PLA) Carbon Nanotube Nanocomposites. *Polymer Testing*, 69:34–38, 2018.
- [12] A. Arrelano. Evaluación del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo mediante tecnología de membrana. Tesis de maestría, Posgrado de Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, México, 2013.
- [13] S. Sharma, A. Singh, A. Majumdar, and B. Butola. Tailoring the Mechanical and Thermal Properties of Polylactic Acid-Based Bionanocomposite Films Using Halloysite Nanotubes and Polyethylene Glycol by Solvent Casting Process. *Journal of Materials Science*, 54:8971–8983, 2019.
- [14] C. García, G. Arrázola y A. Durango. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas Agrarios*, 15(2):9–18, 2010.
- [15] B. Tyler, D. Gullotti, A. Mangraviti, T. Utsuki, and H. Brem. Polylactic Acid (PLA) Controlled Delivery Carriers for Biomedical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107:163–175, 2016.
- [16] R. Mazarro. *Síntesis de materiales poliméricos biocompatibles para la liberación controlada de fármacos mediante tecnología supercrítica*. Tesis doctoral, Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España, 2009.

- [17] SR. Subramaniam, M. Samykano, SK. Selvamani, WK. Ngui, K. Kadirgama, K. Sudhakar, and MS. Idris. Preliminary Investigations of Polylactic Acid (PLA) Properties. In *AIP conference proceedings*, volume 2059, page 020038. AIP Publishing LLC, 2019.
- [18] G. Molins, M. Álvarez, N. Garrido, J. Macanás, and F. Carrillo. Environmental Impact Assessment of Polylactide(PLA)/Chicken Feathers Biocomposite Materials. *Journal of Polymers and the Environment (on line)* DOI: 10.1007/s10924-017-0982-9, 2017.
- [19] COVENIN. Norma 1769-81. Frutas toma de muestra. FONDONORMA. Caracas, 1981.
- [20] NTE INEN. Norma 0273: Melazas. Determinación de la densidad en grados Brix. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito, 1990.
- [21] COVENIN. Norma 658:1997. Leche y sus Derivados. Determinación de la acidez titulable (3er Revisión). Norma Venezolana Comisión Venezolana de Normas Industriales. FONDONORMA. Caracas, 1997.
- [22] COVENIN. Norma 368:1997. Leche y sus Derivados. Determinación de cenizas (2da Revisión). Norma Venezolana Comisión Venezolana de Normas Industriales. FONDONORMA. Caracas, 1997.
- [23] COVENIN. Norma 1315-79. Alimentos. Determinación del pH. (Acidez Iónica). Norma Venezolana Comisión Venezolana de Normas Industriales. FONDONORMA. Caracas, 1979.
- [24] M. Periago, G. Ros, C. Martínez, M. Santaella, D. Pérez, F. García y J. Santaella. Composición físico-química de la leche. Open courseware-Universidad de Murcia, Murcia, España, 2010.
- [25] A. Rosales. Aprovechamiento de suero lácteo como fuente para la producción de un biopolímero basado en ácido poliláctico. Trabajo especial de grado en ingeniería química, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela, 2017.
- [26] L. Lozano, A. Romero y J. Urbina. Manual prácticas de laboratorio I de química orgánica. *Revista de la Universidad Industrial de Santander*, 1(1):52–59, 2013.
- [27] COVENIN. Norma 2450-87. Hidrocarburos líquidos. Determinación del índice de refracción y la dispersión refractiva. Norma Venezolana Comisión Venezolana de Normas Industriales. FONDONORMA. Caracas, 1987.
- [28] A Velásquez. Determinación de la densidad de un líquido. *Revista UNAM Facultad de Ingeniería*, 3(2):5–9, 2007.
- [29] ASTM D 1120-72. Standard Test Method for Boiling Point of Engine Antifreeze. Standard of ASTM International, New York, USA, 2017.
- [30] J Torrelavega. Guía de prácticas en línea: Física I, Práctica Nro 4, Cálculo de la densidad. Universidad de Cantabria, Escuela Politécnica de Ingeniería de Minas, Santander, España.
- [31] D. Sánchez. Determinación del punto de fusión e índice de refracción de los compuestos orgánicos. Instituto de Ciencias Químicas y Ambientales, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador, 2012.
- [32] S. Hurtado. Laboratorio Virtual: Ensayo a la llama. Labovirtual. Blogspot (en línea), 2014.
- [33] ASTM D2240-15. Standard Test Method for Rubber Properties - Durometer Hardness. Standard of ASTM International, New York, USA, 2021.
- [34] ASTM F1635-36. Standard Test Method for in Vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants. Standard of ASTM International, New York, USA, 2017.
- [35] C. García, G. Arrazola y M. Villalba. Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1):136–143, 2013.
- [36] M. Álvarez. Caracterización fisicoquímica de los diferentes tipos de lactosueros producidos

- en la *cooperativa colanta ltda*. Trabajo de grado en ingeniería de alimentos, Corporación Universitaria Lasallista, Caldas, Colombia, 2013.
- [37] D. Suárez. Evaluación y simulación de la producción de ácido láctico con *lactobacillus casei* atcc 7469. Proyecto de grado en Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT (Escuela de Administración, Finanzas e Instituto Tecnológico), Medellín, Colombia, 2007.
- [38] A. Ríos. Caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo utilizando la tecnología de membranas. Trabajo de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, México, 2011.
- [39] M. Munilla y G. Blanco. Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. *ICIDCA (Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar)*, 39(1):49–59, 2005.
- [40] R. Gil, R. Domínguez, y J. Pacho. Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 23(2):79–90, 2008.
- [41] A. Arrellano. Evaluación del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo mediante tecnología de membrana. Trabajo de maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, México, 2013.
- [42] J. Medina, F. García, B. Paricaguán, J. Rojas, X. Castro y F. Lugo. Obtención de ácido láctico por fermentación del mosto del fruto de cují (*prosopisjuli flora*) y su posterior poli-condensación con zinc metálico a poli(ácido láctico) (PLA). *Revista Ingeniería UC*, 21(2):52–59, 2012.
- [43] J. Aponte y H. Villazón. Aspectos básicos de los materiales usados en ingeniería. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 11(2):15–40, 2001.
- [44] E. Figueira. Degradación hidrolítica a diferentes pH de un material compuesto poli(ácido láctico)/quitosano. Proyecto de grado, Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela, 2008.
- [45] F. Zuluaga. Algunas aplicaciones del ácido poli-L-láctico. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 37(142):125–142, 2013.