



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNO-  
LOGÍA Y MATERIALES

MODELACIÓN MATEMÁTICA DE LOS FENÓMENOS ANTI-BIOFOULING EN  
MEMBRANAS DE OSMOSIS REVERSA MODIFICADAS CON NANOPARTÍCULAS  
DE COBRE

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

RODRIGO SEBASTIÁN QUEZADA MUSTARÓS

PROFESOR GUÍA:  
J. CRISTIAN SALGADO HERRERA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
ANDREINA GARCIA GONZÁLEZ  
ÁLVARO OLIVERA NAPPA  
HUMBERTO ESTAY CUENCA

SANTIAGO DE CHILE

2019

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR  
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: RODRIGO SEBASTIÁN QUEZADA MUSTARÓS  
FECHA: 2019  
PROF. GUÍA: J. CRISTIAN SALGADO HERRERA

MODELACIÓN MATEMÁTICA DE LOS FENÓMENOS ANTI-BIOFOULING EN  
MEMBRANAS DE OSMOSIS REVERSA MODIFICADAS CON NANOPARTÍCULAS  
DE COBRE

La incrustación (*fouling*) biológica es una de las mayores causas de daño en membranas para sistemas de purificación de agua por osmosis reversa (OR). La modificación de las membranas mediante la adición de nanopartículas (NPs) metálicas u óxidos, con características antimicrobianas, han demostrado mejorar la resistencia de la membrana al *biofouling*. Sin embargo, el mecanismo tóxico varía dependiendo del tipo de nanopartícula incorporada. En el caso de las modificaciones con cobre, los mecanismos de acción de las nanopartículas de cobre y su incidencia cuando se encuentran en la membrana modificada aún no son claros.

En el presente trabajo se estudiaron los parámetros y mecanismos por los cuales las NPs inducen efectos nocivos, esto mediante un estudio de las vías tóxicas para 3 tipos de membranas con distintas modificaciones con cobre: nanopartículas de cobre elemental (Cu-NPs), nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs) y un oligómero de cobre formado a partir de sal de cobre (Cu-MPD), todo esto con el objetivo de caracterizar y estudiar los mecanismos biocidas del cobre en estas membranas modificadas, junto a la generación de un modelo que describa la capacidad biocida de las nanopartículas en membranas de osmosis reversa.

A partir de la bibliografía revisada se encontró que el efecto tóxico más preponderante de las NPS en membrana corresponde a la disolución de las NPs con liberación de iones, los cuales inducen toxicidad en células al superar una concentración dada. Todos estos efectos están sujetos a características de la nanopartícula como su tipo, tamaño y forma, y también a las condiciones de medio. Este efecto fue estudiado mediante un seguimiento de la cinética de disolución, tanto en suspensión como en membrana. Además, se realizaron pruebas con las membranas en presencia de un cultivo de *E. coli*, en donde se monitoreó la viabilidad de las bacterias mediante conteo de colonias viables (CFU) y se obtuvieron indicadores para cuantificar el efecto tóxico del cobre. Estos no mostraron diferencias apreciables entre los cobres estudiados, los cuales con capaces de mantener un alto nivel de inhibición (mayor al 90 %), incluso luego de alcanzada la fase exponencial de crecimiento del microorganismo.

Se obtuvieron cinéticas de primer orden de disolución que varían según el tipo de cobre utilizado. Debido a las diferencias observadas en las cinéticas de disolución, se plantearon 2 modelos para describir la liberación de iones de cobre desde las membranas modificadas. Los modelos obtuvieron una buena correlación con los datos experimentales. El análisis de estos modelos permitió identificar que la carga efectiva de cobre en membrana es uno de los fenómenos más relevantes para caracterizar la eficiencia biocida de las mismas, dado que define la tasa de liberación de iones y el tiempo de vida del cobre en la membrana. Finalmente, a partir del modelo anti-*biofouling* propuesto, se obtuvo que las membranas de Cu-MPD presentan una ventaja frente a las NPs, dado que alcanzan un poder biocida similar con menor carga de cobre, con un efecto más perdurable en el tiempo. La metodología utilizada puede ser implementada en otros modelos que incluyan el uso de nanopartículas.



*Para José Camacho, Q.E.P.D.*



# Agradecimientos

Primero que nada quiero disculparme por cualquier posible persona a la que tengo que agradecer por esto y que no haya agregado (mi cabeza a veces no me acompaña tan bien como quisiera). Voy a partir agradeciéndole a mi familia. A mi padre, Arnoldo, que ha sido un pilar fundamental en mi vida y un ejemplo a seguir de cara al futuro. A mi madre, Susana, la cual me hizo aprender lo mucho que se puede amar a un hijo. Con ambos estaré eternamente agradecido por su amor, paciencia, entrega y compañía. A mis hermanos, Arnoldo y Álvaro, con los cuales hemos pasado muy buenos momentos juntos y que me han hecho gran parte de quien soy ahora. A Jackline y Camila, quienes me hicieron sentir afortunado por tener una familia tan bella y unida. A mi madrina, Maria Elena, por todo el cariño entregado y, por último, a Javiera y Nicolás, quienes me hacen reír cada vez que nos reunimos.

Seguiré con los primeros amigos que, pese a que ya no nos vemos tan seguido, dejaron una huella eterna en mi y también me acompañaron en mi proceso de crecimiento, y siguen siendo un aporte a mi vida. Gracias Antonio, por las risas, por la buena onda y por ser el mejor amigo que puedo imaginar. Gracias Franco, por el cariño e infinita disposición, eres la persona más amable que conozco. Gracias Ignacio, por las risas, juntas y juegos. Los trabajos en tu casa eran de las mejores cosas del colegio. Y gracias Tomás, que pese a que te uniste después al grupo, has sido un amigo fundamental y tu entusiasmo y buena onda me contagia para ser una mejor persona.

Debo continuar con la Universidad de Chile, en la cual he conocido a personas fantásticas, con las cuales he pasado momentos inborrables y que me han hecho crecer como persona. Gracias Felipe, por mostrarme y recordarme que en la universidad también se crece en lo humano, no sólo en el conocimiento. Gracias por las horas y horas de juego y la paciencia. Gracias Monserrat, por todos los paseos, conversaciones y tiempo juntos, tú le das color a las cosas. Además agradecer al Dondo, a Alex, al Andy, a Nicolás, a JP y a Martín, por su compañía, tanto en plan común como en el resto de mi instancia en la universidad. Pasando al departamento de Ingeniería Química, Biotecnología y Materiales, agradecer a los BT's Lindos (+ Benja). Gracias Lorna, por todo. Gracias Daniela, Daniel, Benjamín, Felipe y Josefa, su amistad y compañía son el tesoro máspreciado que tengo en mi paso por el departamento. Y gracias a todo el resto de personas en el departamento con las que compartí y disfrute algún momento en la salita.

Pasando a un plano más laboral, quiero agradecerle a José y Marcela por su ayuda para sacar este proyecto adelante, su aporte fue fundamental para terminar esto. Además, agradecerle al Profe Salgado, por su ayuda, comentarios y confianza en mí, como también a la

profesora Andreína, quien confió en mí para este trabajo, y siempre me recibió y aconsejó con una sonrisa. También agradecer a todo el PMDC Lab, sus comentarios y críticas ayudaron a pulir este trabajo. Finalmente agradecer a todos los docentes y funcionarios del departamento por su aporte a mi formación y su cordialidad.

Y por último (pero no menos importante) te quiero agradecer a ti, Nathalie, por tu compañía, que ha trascendido por las etapas de mi vida. Gracias por el tiempo juntos. Las conversaciones, salidas, paseos, descansos y comidas. Estar y compartir contigo alegra mi vida.

# Tabla de Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes generales . . . . .	1
1.2. Descripción del proyecto . . . . .	3
1.3. Motivación del proyecto . . . . .	4
<b>2. Objetivos y Limitaciones</b>	<b>6</b>
2.1. Objetivos . . . . .	6
2.1.1. Objetivo general . . . . .	6
2.1.2. Objetivos específicos . . . . .	6
2.2. Limitaciones . . . . .	6
<b>3. Marco Teórico</b>	<b>8</b>
3.1. Bio-incrustación . . . . .	8
3.2. Nanopartículas como agentes biocidas . . . . .	10
3.2.1. Factores clave . . . . .	10
3.2.2. Mecanismos de toxicidad de NPs . . . . .	13
3.3. Membranas de osmosis reversa modificadas . . . . .	15
3.3.1. Confección de membranas compuestas de capa fina modificadas con cobre	15
3.3.2. Parámetros de diseño relevantes en membrana . . . . .	17
3.4. Modelos y parámetros de estudio . . . . .	18
<b>4. Metodología</b>	<b>22</b>
4.1. Materiales . . . . .	22
4.1.1. Reactivos y equipos utilizados . . . . .	22
4.1.2. Software . . . . .	22
4.2. Procedimiento . . . . .	23
4.2.1. Búsqueda de mecanismos y modelos . . . . .	23
4.2.2. Estudio experimental de nanopartículas en membranas de OR modifi- cadas . . . . .	23
4.2.3. Confección del modelo . . . . .	25
<b>5. Resultados y Discusiones</b>	<b>27</b>
5.1. Pruebas de liberación de iones . . . . .	27
5.2. Pruebas biocidas e indicadores de viabilidad . . . . .	31
5.3. Modelo de liberación de iones . . . . .	34
5.3.1. Modelo para oligómero de cobre . . . . .	35
5.3.2. Modelo para nanopartículas . . . . .	40

5.3.3. Conexión entre modelos . . . . .	47
5.4. Propuesta de modelo anti-biofouling . . . . .	47
<b>6. Conclusiones</b>	<b>50</b>
6.1. Recomendaciones . . . . .	52
<b>Bibliografía</b>	<b>52</b>
<b>7. Anexos</b>	<b>58</b>
7.1. Protocolo de confección de membranas de OR modificadas . . . . .	58
7.1.1. Confección de soportes de polisulfona (PS) . . . . .	58
7.1.2. Confección de capa de poliamida modificada . . . . .	59
7.2. Protocolo de prueba de liberación de iones . . . . .	61
7.3. Protocolo de pruebas biocidas . . . . .	62
7.4. Masa de nanopartículas en membranas modificadas . . . . .	63
7.5. Diagrama de Pourbaix del cobre disuelto en agua . . . . .	63
7.6. Estimación de masa inicial en membranas de NPs . . . . .	64
7.7. Balance para conexión entre modelos de liberación de iones . . . . .	65
7.8. Códigos . . . . .	65
7.8.1. Ajuste de modelo de lixiviación a oligomero de cobre . . . . .	65
7.8.2. Ajuste de modelo de núcleo sin reaccionar para nanopartículas . . . . .	69
7.8.3. Funciones de costos para minimización . . . . .	75
7.8.4. Ecuaciones diferenciales . . . . .	76

# Índice de Tablas

3.1. Concentraciones mínimas bactericidas de nanopartículas en cepa de <i>E. coli</i> .	20
5.1. Tasa de muerte de bacterias en membranas modificadas a diferente tiempos del experimento . . . . .	34
5.2. Inhibición del crecimiento bacteriano por parte de las distintas membranas modificadas . . . . .	34
5.3. Valores de parámetros ajuste para modelo de lixiviación por disolución . . .	38
5.4. Masa inicial de cobre en experimentos con NPs ajustado mediante modelo de lixiviación por disolución . . . . .	40
5.5. Parámetros modelo ajustado de núcleo sin reaccionar para experimentos con nanopartículas . . . . .	46
5.6. Parámetro de liberación de iones . . . . .	47
5.7. Parámetros biocidas y de liberación de iones para cada membrana . . . . .	48
7.1. Reactivos y cantidades necesarias para la preparación del soporte de polisulfona	58
7.2. Reactivos y cantidades necesarias para la síntesis de la capa de poliamida modificada con Cu-NPs para una membrana de osmosis reversa . . . . .	59
7.3. Tiempos de toma de muestra en prueba de liberación de iones . . . . .	61
7.4. Tiempos de muestra para medir viabilidad en pruebas biocidas . . . . .	62

# Índice de Ilustraciones

1.1. Corte transversal sobre una membrana de microfiltración mediante microscopía electrónica de barrido. . . . .	1
3.1. Etapas de formación de la bio-película. . . . .	9
3.2. Factores clave involucrados en la capacidad biocida de nanopartículas . . . .	10
3.3. Formación de corona y agregación de NPs . . . . .	11
3.4. Esquema de los distintos mecanismos de toxicidad de nanopartículas metálicas y de óxido-metales . . . . .	14
3.5. Representación esquemática de la membrana TFC poliamida modificada con nanopartículas de cobre . . . . .	15
3.6. Representación esquemática de la unión entre NPs con carga positiva y la membrana de osmosis reversa . . . . .	16
3.7. Estructura propuesta para el oligomero de cobre (Cu-MPD) luego de la reacción redox entre la sal de cobre y la diamina . . . . .	17
5.1. Cinética de liberación de iones y pH para nanopartículas de cobre elemental (Cu-NPs) en suspensión (a) y en membrana (b). Los puntos muestran las mediciones de cobre disuelto en solución en los distintos tiempos de muestra, mientras que la línea indica el cambio en el pH a lo largo del experimento. . .	28
5.2. Cinética de liberación de iones y pH para nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs) en suspensión (a) y en membrana (b). Los puntos muestran las mediciones de cobre disuelto en solución en los distintos tiempos de muestra, mientras que la línea indica el cambio en el pH a lo largo del experimento. . .	30
5.3. Cinética de liberación de iones y pH para sal de cloruro de cobre (CuCl <sub>2</sub> ) y membrana con oligómeros de cobre (Cu-MPD). Los puntos muestran las mediciones de cobre disuelto en solución en los distintos tiempos de muestra, mientras que la línea indica el cambio en el pH a lo largo del experimento. . .	31
5.4. Recuento de unidades formadoras de colonia (CFU) a <i>E. coli</i> . . . . .	32
5.5. Gráfica del ratio de muertes de bacterias (BKR) para todo el espectro de tiempo del experimento . . . . .	33
5.6. Esquema de cinética de liberación de iones desde las membranas de oligómero de cobre (Cu-MPD). . . . .	35
5.7. Esquema de balance de masa para membranas de oligómero de cobre (Cu-MPD) .	36
5.8. Ajuste de modelo de lixiviación con control de disolución para membranas de oligómero de cobre . . . . .	38

5.9. Ajuste de modelo de lixiviación con control de disolución para membranas de oligómero de cobre con constante ajustada . . . . .	39
5.10. Esquema de modelo de núcleo sin reaccionar . . . . .	41
5.11. Esquema de cinética de liberación de iones en membranas con nanopartículas de cobre . . . . .	42
5.12. Ajuste de modelo de núcleo sin reaccionar para nanopartículas de cobre elemental y óxido de cobre en suspensión . . . . .	44
5.13. Ajuste de modelo de núcleo sin reaccionar para nanopartículas de cobre elemental y óxido de cobre en membrana . . . . .	45
5.14. Tiempo de vida de las nanopartículas de cobre elemental y óxido de cobre . . . . .	46
7.1. Equipo de <i>casting knife</i> utilizado para la formación de los soportes de polisulfona (PS) . . . . .	59
7.2. Diagrama de Pourbaix para cobre en agua a 25°C. Extraído de [70] . . . . .	63
7.3. Ajuste de modelo de lixiviación con control de disolución para membranas con nanopartículas de cobre elemental (Cu-NPs) . . . . .	64
7.4. Ajuste de modelo de lixiviación con control de disolución para membranas con nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs) . . . . .	64



# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Antecedentes generales

La incrustación o *fouling* en membranas de sistemas de filtración corresponde a la disminución del flux debido a interacciones físicas específicas, o químicas que ocurren entre la membrana y componentes del flujo de alimentación, lo cual representa una problemática grave que sufren los sistemas de filtración con membranas y que hasta el día de hoy no ha podido ser mitigado eficientemente [1]. Las especies retenidas en la membrana dependen del objetivo del tratamiento, el tipo y condiciones del agua de alimentación, sus tratamientos previos y las propiedades de la membrana en uso [1, 2].

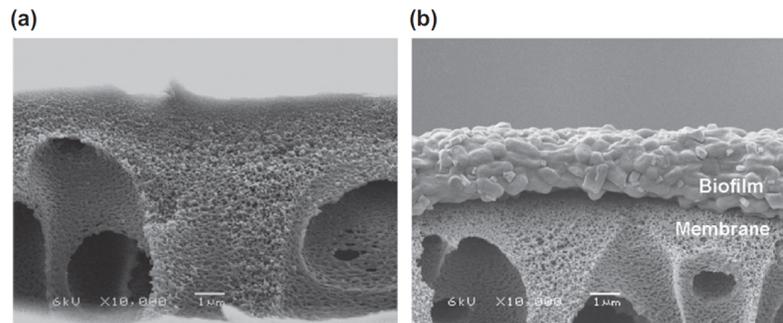


Figura 1.1: Corte transversal sobre una membrana de microfiltración mediante microscopía electrónica de barrido. (a) membrana original y (b) membrana con bio-película después de 4 días de operación. Adaptado de [1]

Cuando las interacciones que llevan a esta disminución del desempeño en la membrana son causadas por agentes biológicos, se está en presencia de lo que se conoce como *fouling* biológico o *biofouling*. Este tipo de incrustaciones es particularmente desafiante debido a que es resistente a pre-tratamientos químicos o de otra índole, esto debido a que los microorganismos presentes en la membrana generan una bio-película en la cual son capaces de crecer y replicarse (ver Figura 1.1) [1, 3, 4]. Actualmente, se tiene que un 45 % de todos los casos de incrustación en membranas son biológicos, teniendo alta incidencia tanto para sistemas de nanofiltración (NF), como para las membranas de osmosis reversa (OR), utilizadas en general

en los sistemas de desalinización de agua [2, 5]. Dentro de los métodos más comunes de mitigación del *fouling* en membranas se encuentran el pre-tratamiento del agua de alimentación para remover selectivamente los agentes incrustantes y/o las especies que promueven el crecimiento biológico, la modificación y mejora del modulo de operación del sistema de filtrado y la modificación de la membrana para disminuir su interacción con los agentes incrustantes y/o hacerla más resistentes a estos [1, 5, 6].

Las membranas utilizadas en los sistemas de Osmosis Reversa suelen ser de 2 tipos: Las membranas asimétricas de acetato de celulosa (AC), preparadas mediante el método de inversión de fases de una emulsión producida entre el polímero de celulosa y un solvente orgánico. El otro tipo corresponden a las membranas compuestas de capa fina (TFC). Estas últimas se conforman de 2 capas: un soporte grueso de polisulfona (PS), la cual le otorga resistencia, y encima una capa densa, comúnmente de poliamida, formada a partir de monómeros activos de *m*-fenildiamina (MPD) y cloruro de trimesoil (TMC), la cual está en contacto con el flujo de alimentación y separa el agua de los contaminantes a través de difusión [2, 7, 8]. Estas membranas presentan ventajas frente a las de acetato de celulosa, con un mejor desempeño selectivo y productividad, pero son altamente sensibles a la formación de bio-películas en su superficie debido a la deposición y crecimiento indeseado de microorganismos, mermando su desempeño y vida útil. En la búsqueda de modificaciones para las membranas que permitan evitar la formación de *biofilms*, es que nace el interés en las nanopartículas.

Las nanopartículas corresponden a una familia de materiales con un reducido tamaño, comúnmente clasificado entre los 1 y 100 nm. La escala nanométrica les confiere a las partículas propiedades fisicoquímicas especiales, dado que estas presentan una razón superficie-volumen mucho más elevada que el material común, lo cual se traduce en una reactividad superficial aumentada [9]. Por otro lado, su reducido tamaño les permite interactuar con una mayor cantidad de estructuras biológicas. Estas características han provocado que el uso de nanopartículas en procesos biológicos haya aumentado enormemente en los últimos años, utilizándose en variados productos como sensores, implantes, pinturas, además de como *carriers* de fármacos y en cosméticos, entre otros [9-11]. Una de las características particulares de interés que centran la atención en las nanopartículas, es su capacidad de funcionar como agentes biocidas en concentraciones moderadas. Nanopartículas derivadas de metales han sido utilizadas en procesos industriales para reducir la carga microbiana que puede alterar el correcto funcionamiento de sus equipos involucrados. En particular, se han utilizado nanopartículas metálicas para modificar membranas compuestas de capa fina para osmosis reversa (OR-TFC), lo cual ha permitido mejorar su resistencia a los microorganismos, al modificar las características de su superficie, evitando la adhesión de bacterias, como también induciendo un efecto tóxico en los microorganismos en el medio circundante [12-17].

Los mecanismos mediante los cuales las nanopartículas inducen un efecto biocida dependen de una serie de factores asociados tanto a su morfología y tipo, como a las características del medio en el que ocurre su interacción con los microorganismos. Dentro de los factores más preponderantes asociados a la nanopartícula como tal se encuentran su tipo (orgánica, metálica), forma, tamaño, solubilidad y carga iónica [10, 18-21]. Estos factores se ven afectados por variables como la temperatura, pH y composición del medio [18].

Por otro lado, las vías mediante las cuales nanopartículas metálicas y sus derivados atacan

a los microorganismos están separadas en 2 efectos principales: liberación de iones y contacto directo con un microorganismo [18]. La primera de estas rutas corresponde a la disolución de las nanopartículas en el tiempo, las cuales empiezan a liberar iones metálicos. Dada la alta área superficial de las NPs, se tiene que estas se disuelven más rápido que la especie en bulto (*bulk*) [18, 22]. Los iones liberados desde las nanopartículas entran a las células mediante canales iónicos y transporte activo. Una vez dentro, pueden inhibir una serie de funciones del metabolismo y dañar estructuras celulares a nivel de membrana, proteínas citoplasmáticas y ADN [18, 23, 24]. La principal consecuencia de estas interacciones es el aumento en especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales llevan a un estrés oxidativo y muerte celular [18, 23, 25, 26]. El otro mecanismo corresponde al contacto directo, donde la escala nanométrica de las NPs les permite anclarse a la membrana celular y penetrarla, causando la formación de un “hueco” en la superficie celular, lo cual conlleva un aumento en la permeabilidad de la célula y la muerte del microorganismo [23, 27]. La nanopartícula dentro de la célula también interactúa con estructuras celulares como la mitocondria, gatillando la generación de ROS y daño en proteínas [28].

Actualmente uno de los desafíos es el de mejorar la capacidad anti-*biofouling* de las membranas modificadas de osmosis reversa, buscando los parámetros de diseño óptimos para las nanopartículas utilizadas. En orden para realizar esto, se requiere conocer los mecanismos involucrados en la capacidad biocida de las NPs en la membrana, para luego modelar el sistema y encontrar parámetros de ajuste. La modelación matemática permite analizar y predecir el comportamiento del sistema, a fin de encontrar estos parámetros de diseño de las NPs y la membrana de OR [29, 30].

Uno de los posibles caminos para abordar este problema consiste en crear un modelo en base a fenomenologías similares previas descritas, como lo es la disolución de partículas metálicas, que incluyan los componentes y cinéticas más relevantes involucrados en los mecanismos biocidas mencionados mediante ecuaciones diferenciales, para luego contrastar dichos modelos con datos experimentales e integrarlos en un nuevo modelo que describa la capacidad anti-bioincrustante de las membranas de osmosis reversa modificadas.

## 1.2. Descripción del proyecto

El grupo de investigación en aguas del Centro Avanzado de Tecnologías para la Minería de la Universidad de Chile (AMTC) ha desarrollado membranas compuestas de capa fina modificadas con nanopartículas inorgánicas utilizadas para procesos de osmosis reversa en desalinización de agua. Las membranas modificadas poseen un mejorado desempeño ante el *biofouling*, dado que la incorporación de las nanopartículas les confiere características biocidas y antiadhesivas (cambiar), todo esto sin perder su rendimiento como membrana desalinizadora [12, 13].

Si bien se sabe que la incorporación de las nanopartículas le confiere características biocidas a la membrana, no se tiene mayor conocimiento sobre los mecanismos por los cuales estos materiales provocan efectos adversos en los microorganismos, ni cuales de estos son preponderantes cuando la nanopartícula se encuentra en la membrana modificada. La generación de un modelo matemático que describa los mecanismos antimicrobianos de las nanopartículas en membrana permitiría encontrar cuales son las características y parámetros de diseño, tanto

de la nanopartícula como de la membrana que permitan mejorar su desempeño, de miras a generar una membrana comercial en procesos de desalinización de agua de mar mediante osmosis reversa con membranas modificadas funcionales y de vida útil extendida.

Para esto se propone un estudio en membranas TFC-OR modificadas con 3 tipos de nanopartículas de cobre (nanopartícula de cobre elemental (Cu-NP), nanopartícula de óxido de cobre (CuO-NP) y un oligómero de cobre formado a partir de una sal de cobre *in situ*). Estas 3 nanopartículas han sido probadas con anterioridad en las membranas modificadas de osmosis reversa, donde se les ha comprobado su capacidad biocida según los protocolos publicados [12-14].

La primera parte del proyecto considera la búsqueda bibliográfica para recabar información asociada a los mecanismos biocidas preponderantes de estas nanopartículas, además de posibles modelos existentes que describan estos efectos. Posterior a esto se preparan montajes experimentales donde se midan parámetros clave asociados al mecanismo de liberación de iones y muerte por contacto, que sean capaces de separar estos efectos y cuantificar su preponderancia en la capacidad anti-bioincrustante de las membranas.

Finalmente, se busca plantear un modelo que describa los fenómenos involucrados en la capacidad biocida de las nanopartículas en base a sus parámetros de diseño y los de operación del sistema de purificación.

### 1.3. Motivación del proyecto

La desalinización de agua de mar mediante osmosis reversa es una tecnología con el potencial para ser la solución a la problemática actual de escasez hídrica que existe a nivel mundial [31]. En particular para el caso de Chile, la escasez de agua dulce se identifica como un aspecto prominente entre las causas que limitan el desarrollo del país. Dicho esto, se hace de suma importancia la búsqueda de optimizaciones para el proceso de desalinización de agua que permitan hacerlo una solución factible a dichas problemáticas.

Por otro lado, la búsqueda de nuevas tecnologías en el uso del cobre ha tomado relevancia en los últimos años. Dado que Chile es el mayor productor de cobre a nivel mundial, se plantea el interés en nuevas aplicaciones para este metal en distintos rubros asociados a salud e ingeniería. Sumado a esto, el estudio y aplicaciones de las nanopartículas también ha crecido enormemente en los últimos años. El análisis y caracterización de las mismas abre la posibilidad a ampliar aún más sus usos y optimizar los actuales. Este proyecto es capaz de cubrir ambas necesidades descritas, ampliando las tecnologías asociadas al cobre y a las nanopartículas.

Finalmente, desde un punto de vista asociado a la Ingeniería Civil en Biotecnología, el proyecto es particularmente motivador dado que combina un fenómeno biológico que será estudiado experimentalmente, junto a la descripción de un modelo que sea capaz de asociar las características de las NPs con la muerte celular de un microorganismo. Bajo este contexto, la capacidad de generar un modelo matemático que contenga las características de diseño de las nanopartículas y de las membranas de osmosis reversa modificadas contribuyen a visualizar optimizaciones y posibles nuevas variables que permitan mejorar la comprensión

del problema y sus aplicaciones.

# Capítulo 2

## Objetivos y Limitaciones

### 2.1. Objetivos

#### 2.1.1. Objetivo general

Identificar, estudiar y modelar los mecanismos anti-*biofouling* de las nanopartículas de cobre en membranas modificadas de Osmosis Reversa, utilizando como modelo experimental *E. coli*.

#### 2.1.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este proyecto son:

- Identificar los mecanismos más relevantes de las nanopartículas de cobre en su capacidad anti-bioincrustante sobre un sistema vivo.
- Estudiar experimentalmente la influencia de los distintos tipos de nanopartículas de cobre en los mecanismos tóxicos de mayor impacto encontrados.
- Estudiar experimentalmente un set de membranas de osmosis reversa modificadas aisladas y en conjunto con microorganismos para determinar la influencia del tipo de cobre en su capacidad anti-bioincrustante.
- Proponer de un modelo matemático que integre los elementos encontrados y análisis de sus características en contraste con las observaciones experimentales.

### 2.2. Limitaciones

Entre las limitaciones presentes en el trabajo se encuentran:

Las nanopartículas de cobre utilizadas en el proyecto son de origen comercial y no existe capacidad de modificar sus características que pueden influir en los modelos descritos e implementados. Dicho esto, para este proyecto se limitará a comparar el tipo de cobre utilizado en las membranas y no otros de los parámetros que se mencionan influyen en su toxicidad, tales como el tamaño o la forma de la nanopartícula. En etapas más avanzadas de trabajo

se deben considerar las tecnologías y recursos para obtener distintos tipos de nanopartículas con parámetros de diseño comparables.

Los efectos biocidas y anti-adhesión de microorganismos de las nanopartículas serán medidos y comparados usando *E. coli* como sistema vivo de prueba, esto debido a su facilidad de manejo y cultivo, además de la gran cantidad de información existente sobre su metabolismo con metales. Dado que este microorganismo no es representativo de la flora marina, se deben considerar variaciones en los modelos estudiados cuando se trabaje con otra bacteria u organismo en general.

Algunas de las pruebas experimentales no es posible realizarlas en duplicado debido a los altos costos asociados a las mediciones involucradas. En un futuro se debe realizar las repeticiones que se estimen pertinentes para confirmar las tendencias encontradas y/o descartar posibles errores de medición.

Las pruebas, tanto con nanopartículas en suspensión como con las membranas modificadas, se realizan en medio acuoso experimental y no con agua real de mar, esto con el fin de no afectar los mecanismos con perturbaciones asociadas al medio. Para pruebas futuras en donde se busque acercar el estudio a condiciones reales de operación, se deben considerar los efectos del agua marina sobre los mecanismos descritos.

Los modelos generados no considera los impactos que tiene el escalamiento del proceso de desalinización en los parámetros de diseño de nanopartículas, como tampoco la fluidodinámica involucrada en los procesos de desalinización de agua. Estos efectos deben ser evaluados posteriormente para que el modelo sea aplicable a escala industrial.

Bajo esta misma línea, las pruebas serán realizadas en régimen *batch*, por lo cual existen variables extras u omitidas en comparación a un sistema continuo. Por lo tanto, los rangos de validez de modelo y conclusiones obtenidas estarán acotados por los dominios de estas variables mencionadas.

# Capítulo 3

## Marco Teórico

### 3.1. Bio-incrustación

Como ya se mencionó en secciones anteriores, el *fouling* biológico corresponde a la acumulación y crecimiento indeseado de microorganismos en la membrana. El mecanismo de generación del *biofouling* consta de 3 pasos generales: adición inicial, formación de la biopelícula y, finalmente, aumento en la caída de presión, flujo permeado y deterioro del producto [1]. La adición inicial ocurre cuando bacterias u otros organismos en conjunto con nutrientes presentes en la solución de alimentación se acercan a la membrana. La formación del *biofilm* es la segunda etapa del proceso. Según la IUPAC, una biopelícula se define como “un agregado de microorganismos en el cual las células están frecuentemente embebidas dentro de una matriz polimérica extracelular, denominada exo-polisacáridos (EPS), creada por las propias células, la cual esta adherida a otra o a una superficie” [32]. Esta etapa es la más crítica dado que este *biofilm* lleva a la resistencia biocida y hace que el *biofouling* perdure en el tiempo. En la Figura 3.1 se muestra en detalle esta etapa [1, 33].

La producción de la matriz extracelular estabiliza al consorcio o comunidad bacteriana, generando una matriz tridimensional que lleva a una adhesión irreversible. En esta fase, las células adheridas expresan fenotipos clásicos para generar proteínas de superficie, de expresión y para la matriz extracelular, las cuales se activan en respuesta a la densidad de población (expresado por el nivel de señalización entre las células), estrés o limitantes de nutrientes [1, 6]. La matriz extracelular puede variar en sus propiedades físicas y químicas, pero esta compuesta principalmente de polisacáridos, glicoproteínas, lipoproteínas y otras macromoléculas de origen microbiológico [33]. Dentro de los microorganismos más comunes que producen el *biofouling* se encuentran las *Pseudomonas*, *Mycobacterium* y *Flavobacterium*. Mientras que la EPS define las características físicas de la biopelícula, el tipo de microorganismo le da las características fisiológicas a la misma, definiendo su interacción con otros elementos en el agua de alimentación del sistema de purificación y la forma en que el consorcio se mantiene en un ambiente oligotrófico [1, 33, 34].

Finalmente, ya en etapas avanzadas del *biofouling*, existen desprendimiento de ciertas áreas de la matriz, lo cual opera como una forma activa de dispersión de las células, provocando que colonias se adhieran en nuevas zonas y extiendan la incrustación biológica. Se ha descrito

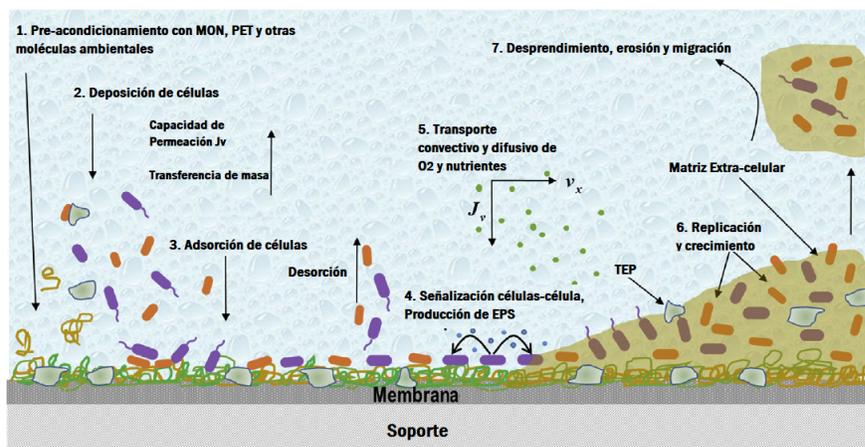


Figura 3.1: Etapas de formación de la bio-película. Materia orgánica natural (MON) y partículas transparentes exopoliméricas (PETs) condicionan la membrana (1). Posterior a esto, las células se depositan de manera reversible, influenciadas por el flux permeado (2), lo cual lleva a adhesión (3) y posterior crecimiento de la bio-película con la generación de EPS (4). El *biofilm* se mantiene gracias al transporte de nutrientes por transporte convectivo y difusivo (5,6) y puede desprenderse con el pasar del tiempo o durante la limpieza (7) [1].

que el exceso de nutrientes y una baja en el pH propician el desprendimiento y búsqueda de nuevas zonas para formar biopelículas [35].

Los impactos del *biofouling* en los procesos de desalinización de agua de mar con membranas de osmosis reversa incluyen aumento en la presión del sistema y en la presión transmembrana, junto a una disminución en el rechazo de sales, lo cual genera aumentos en costos operacionales y energéticos para los sistemas de purificación. Existen variadas estrategias para la prevención y control de la incrustación biológica en sistemas de osmosis reversa. Una de ellas corresponde a la remoción física de las bacterias del agua de alimentación mediante sistemas de pretratamiento, compuestos normalmente por membranas de microfiltración (MF) o ultrafiltración (UF) estándar, acompañado de un proceso previo de coagulación/floculación y flotación de aire disuelto, que tienen por objetivo retener la mayor cantidad de componentes posibles para que no lleguen a las membranas de OR [6, 33, 34].

Otra estrategia convencionalmente utilizada para el control del *biofouling*, que puede ser usada en conjunto con el pretratamiento, corresponde a la aplicación de biocidas. Dentro de los biocidas más comunes se encuentran la clorina, el ozono y radiación con UV [33]. Estos compuestos son añadidos constante o periódicamente para suprimir o controlar el crecimiento indeseado de los microorganismos. Sin embargo, a gran escala implican un gasto económico elevado debido a los altos volúmenes de biocida que se requieren, además de que suelen dañar las membranas en el proceso [34].

Finalmente, una última estrategia que ha empezado a masificarse recientemente corresponde a la modificación de la superficie de la membrana del sistema de purificación. Estas modificaciones apuntan a evitar o retardar los pasos críticos asociados a la bio-incrustación, como su pre-acondicionamiento y formación del *biofilm*. Se ha demostrado que la adhesión de bacterias disminuye al hacer la superficie de la membrana más hidrofílica, con carga ne-

gativa y/o lisa [17]. Por otro lado, las modificaciones de las membranas con nanomateriales con características microbianas también han sido altamente utilizadas [36]. Modificaciones con nanopartículas de titanio, cobre y plata han sido probadas últimamente debido al gran crecimiento en el uso de estos materiales a nanoescala [8, 20, 24, 37].

## 3.2. Nanopartículas como agentes biocidas

### 3.2.1. Factores clave

Dentro de los parámetros de diseño para las nanopartículas (NPs), existen algunos factores claves que se ha demostrado tienen incidencia directa en su capacidad biocida. Dentro de estos, en el caso de nanopartículas metálicas, los factores que mayor impacto tienen en la toxicidad son las características de la superficie, el tamaño, la solubilidad y las rutas de exposición (ver Figura 3.2)[18]. Sin embargo, como las rutas de exposición sólo es importante analizarlas cuando se quiere utilizar nanopartículas para usos médicos, en este trabajo se tratan en detalle los primeros 3 factores mencionados.

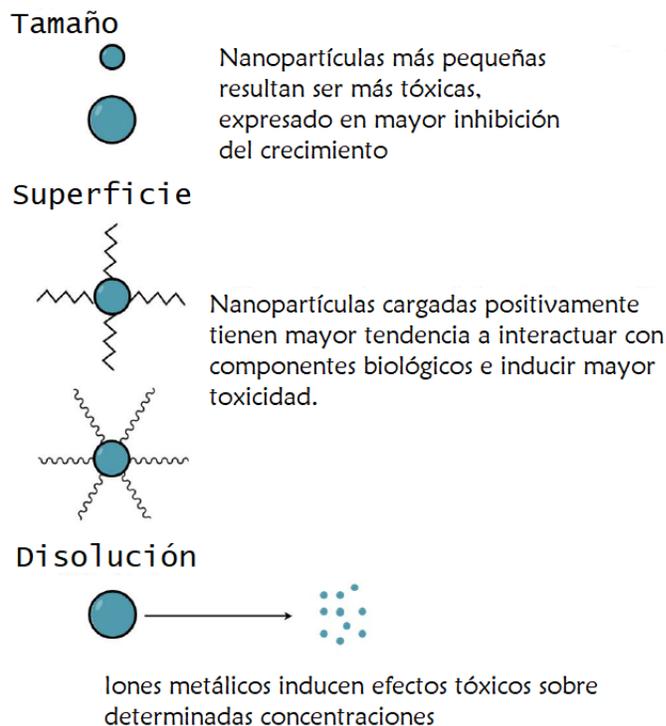


Figura 3.2: Factores clave involucrados en la capacidad biocida de nanopartículas. Adaptado de [18]

### Características de la superficie

Además de las características intrínsecas asociadas a un tipo de nanopartícula (orgánica, metálica u óxido metálica, etc.), las características de la superficie, tales como la forma y la carga iónica superficial, son un factor clave en la toxicidad de las nanopartículas metálicas. Ha sido ampliamente reportado en la literatura que la mayoría de las proteínas y estructuras

celulares de la superficie de los seres vivos poseen una carga negativa en rangos de pH similares a los encontrados en ambientes marinos [19]. De lo anterior, se deduce que nanopartículas con carga positiva son más fácilmente absorbidas por proteínas cargadas negativamente, aumentando su toxicidad. Sin embargo, partículas con carga negativa igualmente pueden ser absorbidas al mediar con cationes naturales como el calcio ( $Ca^{2+}$ ), aunque en una menor proporción [11, 18, 38].

La forma de las nanopartículas también juega un papel clave en su interacción con componentes celulares. Reportes previos arrojan que nanopartículas esféricas son endocitadas por microorganismos hasta un 500 % más que nanopartículas cilíndricas de tamaño similar [38]. Esto se explica debido a que la membrana de los microorganismos suele envasar las nanopartículas, lo cual toma más tiempo para nanopartículas con forma alargada.

En adición, la composición química de las nanopartículas también juega un rol clave. Existen estudios reportados donde se compara cito-toxicidad de nanopartículas de  $ZnO$  y  $TiO_2$  del mismo tamaño, encontrando que tenían efectos distintos sobre la viabilidad de una microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*) [19, 39]. Esto se explica por el hecho de que nanopartículas con distinta composición química interactúan con distintas biomoléculas y a distintos niveles, como también cambios en su actividad fotocatalítica, lo cual puede conllevar en algunos casos a una toxicidad aumentada.

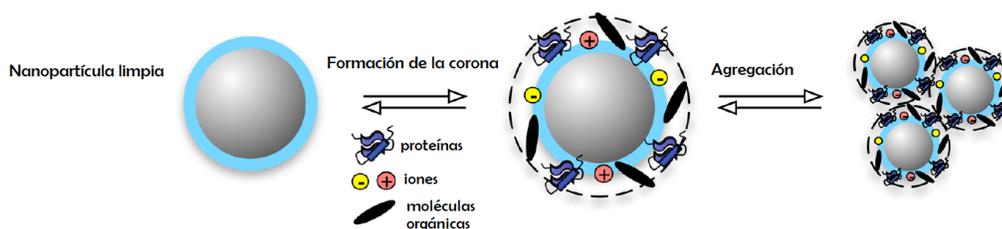


Figura 3.3: Formación de corona y agregación de NPs. Adaptado de [40]

Finalmente, otra característica importante de las NP asociada a su superficie corresponde a su hidrofobicidad. Las nanopartículas “limpias” interactúan con partículas del medio como proteínas, iones y moléculas orgánicas. Esto conlleva la formación de una “corona” en las nanopartículas que altera su superficie química y estado de agregación, haciendo que se aglomeren (ver Figura 3.3). Esto provoca que se reduzca la adhesión con la membrana citoplasmática de las células, interacción fundamental para iniciar sus efectos tóxicos. La adición de revestimientos hidrofóbicos a las nanopartículas puede maximizar sus interacciones con la membrana, al disminuir el efecto de aglomeración, de manera de concretar la penetración celular de manera más efectiva [40].

## Tamaño

Como ya se mencionó anteriormente, el tamaño es lo que confiere a las nanopartículas sus propiedades novedosas. Estudios previos han demostrado que las partículas de tamaño nanométrico tienen mayor toxicidad que la especie bruta, entendida como el aglomerado de partículas cuya escala de tamaño es hasta 4 órdenes de magnitud más grande [18, 21]. Dentro de esto, investigaciones con bacterias y algas expuestas a distintos tamaños de un mismo tipo

de nanopartícula metálicas, mostraron que las de menor tamaño inhibían el crecimiento de los microorganismos a una mayor tasa [39].

La mayor diferencia que provoca el tamaño de la nanopartícula va asociado a la interacción con las biomoléculas de los microorganismos. Un menor tamaño del nanomaterial conlleva un aumento en el área específica, y con ello a su solubilidad, lo cual permite una mayor acumulación e interacción con las biomoléculas de los microorganismos [18, 41]. El primer nivel de interacción es con la membrana citoplásmica de los microorganismos, la cuál se puede dar por interacciones electrostáticas no específicas. Existen reportes previos donde se estudian los efectos asociados a un mismo tipo de NP de distinto tamaño. Zhang, et al. (2012) encontró que nanopartículas de pequeño tamaño (18 nm) incrementan la densidad del empaquetamiento de lípidos, lo cual provoca una disminución de la movilidad lateral, generando una membrana rígida con una alta tensión lateral (lo cual se observa y describe como un efecto “congelante” sobre la membrana). Esta tensión eventualmente se libera por fracturas en la membrana, generando microporos que pueden cerrarse pero hacen que la nanopartículas difunda hacia el interior, generando que estas interactuen a niveles de proteínas conformacionales y ADN. Por otro lado, nanopartículas de gran tamaño (>100nm) promueven la endocitosis de las NPs, lo cual incrementa la movilidad lateral de los lípidos y lleva al colapso de la membrana celular [42].

De manera similar, Roiter, et al. (2008), encontró que nanopartículas en un rango entre los 1.2nm y 22nm son capaces de deformar significativamente la membrana lipídica, generando poros. Por sobre este tamaño, la bicapa ya no era afectada por las NPs, dado que la membrana celular era capaz de endocitar las moléculas dentro de la célula [21, 43]. Estas dependencias de tamaño en las interacciones membrana-NP se atribuyen a una competencia entre la adhesión y la energía elástica existente en la interfaz nanobiológica, en donde la nanopartícula al acercarse a la célula ofrece un nivel de energía mas bajo a los lípidos próximos que conforman la membrana celular, lo cual lleva a la disrupción de la misma, con la consecuente acumulación de las nanopartículas intracelularmente y la formación de un poro [40]. Esta diferencia en niveles energéticos se acentúa con la disminución del tamaño de la nanopartícula, dado que una menor cantidad de lípidos necesita ser desplazados desde la membrana. Esto también explica la razón de que nanopartículas de forma esférica sean endocitadas de manera más rápida, debido a que configuraciones esféricas presentan menores niveles de energía frente a otras [40, 43, 44].

## Solubilidad

La disolución de iones metálicos es otro aspecto clave en la toxicidad de nanopartículas. La solubilidad de estas es más veloz que la de las especies en bruto y existen estudios donde se verifica que los iones son absorbidos por los microorganismos en mayor tasa que las NPs [18, 45]. Si bien los iones metálicos son necesarios para algunos procesos metabólicos de las células, en concentraciones por sobre un determinado umbral son tóxicos. La toxicidad de los iones tiene variados niveles de acción, principalmente asociados al desplazamiento de los metales esenciales de sus sitios nativos o mediante interacción por ligandos [46]. En general, los metales no esenciales interactúan con mayor afinidad por grupos que contengan tioles (*RSH*) y oxígeno, que los metales esenciales. Esto provoca alteraciones en la estructura conformacional de las proteínas y ácidos nucleicos, además de alterar el balance osmótico y

la fosforilación oxidativa.

En cuanto a la solubilidad de las NPs, las condiciones de operación del proceso que las involucre, tales como pH, temperatura y cantidad de oxígeno disponible en el medio, tienen incidencia directa sobre la cantidad de iones liberados [18]. En el caso de nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs), Palmer y Bénézeth (2004) reportaron que la curva de solubilidad de CuO en agua como función del pH a una determinada temperatura seguía un perfil con forma de “V”, donde valores de pH entre 9 y 11 mostraron la más baja toxicidad. Algo similar ocurre con la temperatura, donde la mayor concentración de ión cuprico ( $Cu^{2+}$ ) se obtiene a los 270°C aproximadamente [18, 47].

Las propiedades redox de los metales también tienen influencia en la toxicidad. En el caso particular del cobre, el ciclo redox entre  $Cu^{2+}$  y  $Cu^+$  cataliza la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales alteran el metabolismo completo de la célula, generando daño en lípidos, proteínas, ADN y otras biomoléculas [41, 46].

Por último, la aglomeración es un factor importante asociado a la solubilidad. Las nanopartícula en solución se acondicionan con elementos del medio en que se ven inmersas (proteínas, iones o materia orgánica), lo cual forma una corona que altera su superficie química. Las nanopartículas con corona tienden a interactuar y formar aglomerados. Cuando estos forman un cuello entre 2 o más nanopartículas, se crea una curvatura negativa lo cual puede llevar a una fusión de los aglomerados de NPs y una reducción del área superficial total de partículas, lo cual conlleva una baja en la liberación de iones [18].

### 3.2.2. Mecanismos de toxicidad de NPs

Junto al estudio de los factores clave que influyen en la toxicidad de las nanopartículas, es de vital importancia conocer las vías mediante las cuales inducen efectos nocivos en los microorganismos. Si bien los mecanismos precisos mediante los cuales las nanopartículas inducen efectos biológicos negativos siguen en investigación, existen algunas luces que explican cuales son las vías más típicas de toxicidad. Comúnmente, en nanopartículas metálicas, se han reportado 2 formas principales de ataque: la interacción directa entre la nanopartícula y las biomoléculas (muerte por contacto) o la disolución de la nanopartícula en iones que inducen efectos tóxicos mediante las vías ya descritas anteriormente [48]. Los mecanismos tóxicos ocurren a nivel de membrana celular, seguido por el daño en proteínas y ADN mediado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como también efectos no homeostáticos [46]. Si bien algunas de las discusiones realizadas aquí se basan mayoritariamente en estudios llevados en células eucariontes, los niveles de ataque mencionados no cambian cuando se trata con bacterias.

El primer efecto de toxicidad de las NPs es debido a interacciones con la membrana celular de los microorganismos. Dependiendo del tamaño y forma de las nanopartículas, estas pueden inducir efectos distintos en la permeabilidad e integridad de la membrana. Como ya se mencionó en secciones previas, NPs de tamaño bajo (<22 nm) son capaces de deformar significativamente la bicapa fosfolipídica de las células al crear poros, lo cual conlleva la posterior muerte del microorganismo [21, 42]. En contraste, nanopartículas por sobre este rango de tamaño son comúnmente endocitadas, lo cual provoca, en ocasiones, que la densidad del empaque de lípidos en la capa aumente, resultando en una membrana rígida

con alta tensión lateral, generando un efecto “congelante” en la membrana. Este puede llevar a la formación de un microporo o no tener mayor efectos en la membrana [42, 48].

Una vez dentro de la célula, las nanopartículas pueden interactuar directamente con organelos oxidativos y proteínas redox que estimulan la producción de ROS y aumento del estrés oxidativo en las células, configurando el mayor mecanismo toxicológico de las NPs (ver Figura 3.4). A la ya mencionada elevada área específica que poseen, nanopartículas derivadas de metales poseen una muy alta actividad reactiva y densidad electrónica, con lo cual existe una alta probabilidad de generar reacciones químicas con biomoléculas que conllevan un aumento en los radicales superóxido ( $O^{2-}$ ), radicales hidroxilo ( $OH$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La producción de ROS mediada por NPs conlleva respuestas biológicas que dependen de la abundancia relativa de estas moléculas y el tipo de célula involucrada, pero en general provoca alteraciones a nivel de membrana, daño en proteínas y daño en ADN. Esta última puede causar un aumento en la expresión de genes de muerte programada o provocando mutaciones puntuales que terminan induciendo apoptosis [49, 50].

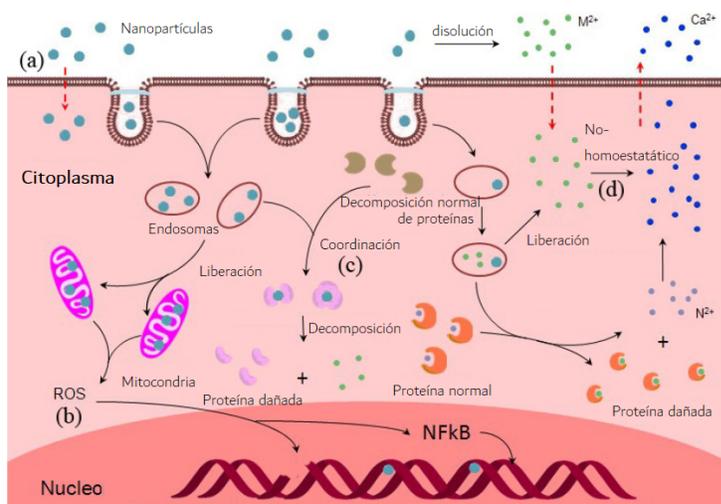


Figura 3.4: Esquema de los distintos mecanismos de toxicidad de nanopartículas metálicas y de óxido-metales [18].

Por otro lado, los iones liberados por las nanopartículas pueden entrar a las células por canales iónicos regulados por voltaje. Inclusive, existen estudios que demuestran la existencia de un mecanismo denominado como “Caballo de Troya”, en donde la nanopartícula ingresa a la célula y una vez dentro empieza a liberar iones en altas cantidades [42, 51]. Dentro de los mecanismos más importantes mediante los cuales estos iones generan toxicidad corresponden a los efectos de coordinación. Una larga lista de biomoléculas contienen átomos de coordinación (principalmente de oxígeno y nitrógeno), que pueden formar quelatos con iones como el cúprico, lo cual conlleva la inactivación de estas moléculas, alterando el metabolismo natural de la célula [18]. Además, los iones pueden atacar a nivel de ácidos nucleicos, al interactuar con las proteínas estabilizadoras del mRNA, degradándolo [48].

Finalmente, los iones tienen un último mecanismo de toxicidad mediante efectos no-homeostáticos. La liberación de iones por parte de las nanopartículas puede interrumpir la homeostasis celular mediada por cationes metálicos. En particular, el aumento del estrés

oxidativo mediado por NPs puede estimular el aumento de la concentración intracelular de ion calcio  $Ca^{2+}$ , el cual tiene un rol fundamental en el control de una larga variedad de procesos celulares [18, 52].

Si bien tanto la vía de contacto directo de NPs con la célula, como la disolución de las nanopartículas en iones pueden llevar a los niveles de toxicidad letales en células de manera independiente, estudios sugieren que el efecto óptimo biocida comprende ambos mecanismos: contacto directo y liberación de iones [25, 48].

### 3.3. Membranas de osmosis reversa modificadas

#### 3.3.1. Confección de membranas compuestas de capa fina modificadas con cobre

Las membranas utilizadas en este proyecto corresponden al tipo de membranas compuestas de capa fina para osmosis reversa (TFC-RO), las cuales son las más utilizadas hoy en día en sistemas de purificación, dado que presentan un mejor flux y rechazo de sales, además de mayores rango de temperatura, pH y presiones para operar, en comparación a las membranas de acetato de celulosa mencionadas en secciones anteriores [8]. Estas membranas TFC típicamente se fabrican en 2 pasos: La preparación del soporte, típicamente de polisulfona (PS), por método de inversión de fases, formados con pellets de polisulfona en una mezcla de Dimetilformamida con N-Metil-2-pirrolidona. Este método permite la formación de macro poros transversales en el soporte de polisulfona [2, 8].

El segundo paso consiste en la síntesis de la membrana de poliamida, la cual, en su método estándar, se prepara mediante polimerización interfacial, método rápido generado a través de la reacción de condensación entre los grupos aminos de MPD (2,6-Fenilendiamina) y carbonilos de tricloruro de mesoilo (TMC) [2, 8, 15]. La preparación de la capa de poliamida de la membrana se divide en varios pasos: el primero es la inmersión del soporte de polisulfona inicial en la solución acuosa de MPD al 2% m/m. Luego se pasa a la inmersión en la solución orgánica de TMC al 0.1% m/m. Tras esto, hay un curado de la membrana a temperaturas que van entre los 50 y 90°C por tiempos entre 1 y 5 min. Finalmente, las membranas son almacenadas en agua desionizada quedando listas para su uso como membrana de osmosis reversa [2, 12, 13].

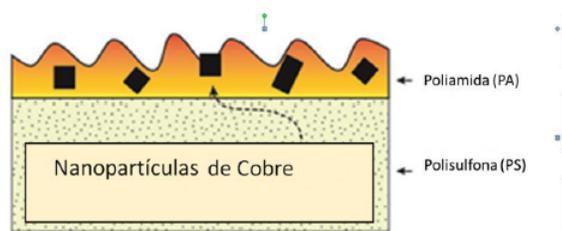


Figura 3.5: Representación esquemática de la membrana TFC poliamida modificada con nanopartículas de cobre. Adaptado de [2]

Es a nivel de la capa densa de poliamida (PA) donde se realizan las modificaciones de la

membrana para la incorporación del cobre (ver Figura 3.5). Específicamente, en los protocolos utilizados por la AMTC, el cobre se añade a la solución de MPD previo a la inmersión del soporte de polisulfona [12]. Las modificaciones con cobre que ha realizado la AMTC y en las que se centra este trabajo corresponden a 3 tipos: Una con nanopartícula de cobre elemental (Cu-NP), otra con nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NP) y una última modificación con oligómeros de cobre formado *in situ* mediante la adición de una sal de cobre ( $CuCl_2$ ). Todas las membranas modificadas han sido probadas, mostrando tener un alto rechazo de sales, comparable con las membranas sin modificar, además de una capacidad biocida superior al 99 % en las primeras 4h de incubación con microorganismos y capacidad anti-adherente mejorada respecto a una membrana de osmosis reversa comercial [12, 13].

En caso de las NPs utilizadas, para lograr una correcta dispersión en la solución de MPD se utiliza un equipo de vibración por ultrasonido sobre el recipiente que contiene la solución. La carga de cobre en la solución MPD estudiada por García, et al. fueron de 0.25 %, 0.5 % y 1.0 % m/m [2]. Dentro de esto, en el caso del óxido de cobre, la dosis máxima estudiada de 1 % m/m obtuvo el mejor desempeño, con un efecto anti-adhesión de bacterias en superficie del 88 % respecto a la membrana blanco control. Sin embargo, el efecto biocida llegó únicamente hasta el 50 % de muertes de bacterias en medio acuoso, lo cual sugiere que la incorporación de las CuO-NPs favorece en mayor medida la anti-adhesión de bacterias en la membrana que la capacidad biocida al medio acuoso, en contraste con otras modificaciones que lograron una mayor tasa de muerte [2, 12].

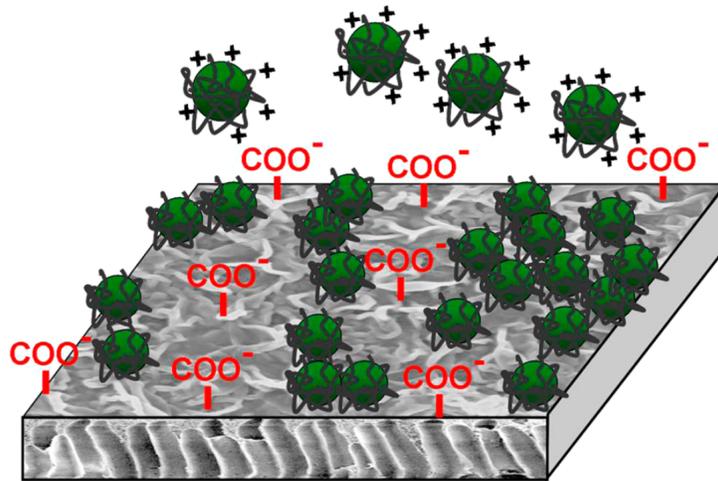


Figura 3.6: Representación esquemática de la unión entre NPs con carga positiva y la membrana de osmosis reversa. Extraído de [53]

En el caso de las nanopartículas estudiadas (Cu-NP y CuO-NP), el método de unión de las NP con la membrana viene dado por interacciones electrostáticas con grupos superficiales oxigenados en la capa de poliamida, como grupos carboxilos (COOH) (ver Figura 3.6). Estas interacciones permiten una unión fuerte de las NPs en membrana, las cuales quedan embebidas en la capa densa de poliamida [12, 53]. En el caso de la modificación con la sal de cobre, lo que se forma es una red oligomérica entre el cobre y la diamina que forma el MPD (Cu-MPD), lo cual deja el cobre de una manera más homogénea distribuida a lo largo de la membrana de OR (ver Figura 3.7).

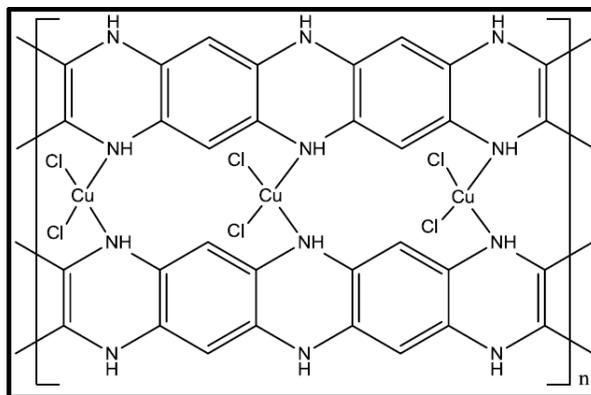


Figura 3.7: Estructura propuesta para el oligomero de cobre (Cu-MPD) luego de la reacción redox entre la sal de cobre y la diamina. Extraído de [2]

### 3.3.2. Parámetros de diseño relevantes en membrana

Si bien existen ciertas características asociadas a las nanopartículas que son deseables al momento de seleccionar un material a nanoescala que presente una alta capacidad biocida, algunos de estos factores pueden mermar el rendimiento de la membrana de osmosis reversa, haciendo que empeore su rendimiento, ya sea en el flujo permeado, el rechazo de sales o su comportamiento respecto a agentes incrustantes, ya sean o no biológicos.

Uno de estos factores corresponde a la carga superficial de la membrana. Como se mencionó anteriormente, las nanopartículas con carga positiva son más tóxicas al interactuar con las estructuras proteicas de carga negativa de los microorganismos [18]. Sin embargo, estudios realizados con potencial zeta sobre membranas de osmosis reversa sugieren que es preferible una carga negativa sobre la membrana, que permita repeler los compuestos de la misma carga presentes en el agua de alimentación y evitando así la formación de incrustaciones [54, 55].

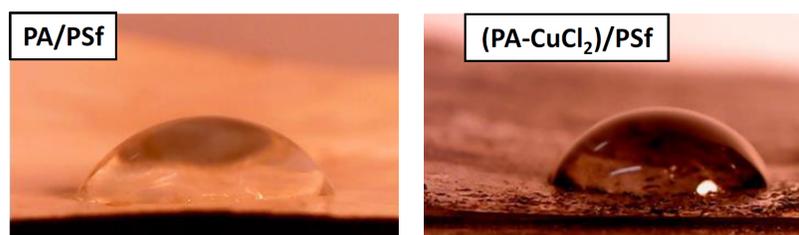


Figura 3.8: Medición del ángulo de contacto en membrana compuesta de capa fina sin modificar (PA/PSf) y en una membrana modificada con sal de cobre (PA-CuCl<sub>2</sub>/PSf). Extraído de [14]

Otro parámetro que afecta el desempeño de las membranas corresponde a la hidrofiliidad. Nanopartículas con revestimientos hidrofóbicos disminuye el efecto de aglomeración y permite aumentar la capacidad de interacción con membrana celular de los microorganismos [40]. Sin embargo, modificaciones con nanopartículas hidrofílicas han demostrado mejorar el rendimiento de las membranas al aumentar el flujo permeado dado que permiten un mejor traspasso del agua a través de ella, rechazando los iones de la sal [56].

Una última característica deseada de las membranas corresponde a su rugosidad. Membranas más rugosas son altamente sensibles a la incrustación, dado que los agentes incrustantes se acumulan en las hendiduras o “valles” existentes en la superficie de la misma, lo cual favorece la etapa de adición inicial de la incrustación biológica [57]. Modificaciones con nanopartículas pueden incrementar la formación de estos valles en las membranas, por lo cual el método de síntesis e incorporación de las nanopartículas se vuelve fundamental para generar una membrana con menor rugosidad [12].

### 3.4. Modelos y parámetros de estudio

A fin de generar un modelo matemático que describa los mecanismos biocidas de las nanopartículas en la membrana modificada, es necesario revisar los modelos existentes que pueden describir los mecanismos presentados en secciones anteriores. Por un lado, han existido estudios que modelan la liberación de iones por parte de las nanopartículas. En particular, se ha modificado un modelo empírico al incluir la reacción química de primer orden para la solubilización de nanopartículas de plata (AgNPs), que relaciona la concentración y tamaño de NPs, junto con variables de operación tales como el pH, temperatura y oxígeno disuelto (DO), que permiten representar la cinética de liberación de iones  $Ag^+$  en el tiempo [41, 58, 59]. Este modelo está basado en la ecuación de Arrhenius y su fórmula principal corresponde a:

$$[Ag^+] = [Ag]_{inicial}[1 - \exp(-a \cdot t)] \quad (3.1)$$

Donde  $[Ag^+]$  corresponde a la concentración de iones plata liberados desde las nanopartículas,  $[Ag]_{inicial}$  la concentración inicial de nanopartículas,  $t$  el tiempo y  $a$  una constante que depende de los factores ya mencionados. Este modelo presentó una buena correlación con los datos experimentales de disolución estudiados y es capaz de predecir el efecto de aumento en la liberación de iones al disminuir el tamaño de las NPs [41].

En el caso del cobre, los primeros estudios de disolución de cobre metálico fueron llevados a cabo por Benjamin Lu en 1954, quien propuso un modelo de liberación de iones cúprico desde cobre metálico basado también en la ecuación de Arrhenius donde se estudia la dependencia de la concentración de cobre e hidrógeno, la temperatura y la presión de oxígeno, entre otros [60]. Su ecuación principal del modelo se presenta en la ecuación 3.2 donde  $[Cu^{++}]$  corresponde a la concentración de ión cúprico,  $T$  la temperatura de reacción,  $R$  la constante universal de los gases,  $p_{O_2}$  la presión de oxígeno y  $K$  una constante que depende de factores como el área de transferencia desde el cobre metálico y el volumen de solución. Este modelo tiene la desventaja que solo está validado en un rango de tiempo corto de 30 horas.

$$\frac{d[Cu^{++}]}{dt} = K \cdot \exp(-14,1/RT)[Cu^{++}]^{\frac{1}{2}}(p_{O_2})^{\frac{1}{2}} \quad (3.2)$$

Para nanopartículas de cobre, existen varios estudios que evalúan la tasa de disolución de ión cúprico por parte de las nanopartículas. Cioffi et al. realizó estudios de cobre elemental estabilizados con distintos compuestos poliméricos, donde encontró que la disolución sigue

una cinética de primer orden, la cual incrementa el nivel de ión cúprico en solución a medida que se aumenta la concentración de cobre en la matriz polimérica [20]. Demir et al. trabajó en la determinación de un modelo semi-empírico para describir la disolución de partículas de cobre en solución con ácido nítrico ( $HNO_3$ ). Su modelo propuesto consiste en una reacción heterogénea controlada por la reacción química entre el cobre y el ácido, donde entre los parámetros efectivos que influyen en la tasa de disolución se encuentran el área efectiva inicial, la temperatura de reacción, la velocidad de agitación de la solución y la concentración de ácido nítrico [61]. Todos estos parámetros se encuentran dentro de la constante de reacción ( $k$ ) del proceso expresados bajo la siguiente ecuación:

$$1 - (1 - X)^{\frac{1}{3}} = k \quad (3.3)$$

Donde  $X$  corresponde al grado de conversión de la nanopartícula. Finalmente, Kent et al. propuso un modelo de disolución y persistencia de nanopartículas basadas en cobre en soluciones de baja saturación respecto a las fases sólidas de cobre. En este modelo, se asume que la reacción es proporcional al área efectiva de cobre en la superficie y se relaciona la constante de disolución con el radio de la nanopartícula, el cual va disminuyendo en el tiempo a medida que esta se agota liberando iones [62]. Dentro de sus resultados, se encuentra una estimación del tiempo de vida de la nanopartícula dependiente de parámetros como el tipo de cobre usado, el pH y la temperatura que, al igual que en los otros reportes mencionados, influyen en la tasa de disolución del cobre. La ecuación para determinar la concentración de iones de cobre en el medio  $[Cu^{z+}]$  corresponde a:

$$[Cu^{z+}] = [Cu^{z+}]_0 \cdot \left[ 1 - \left( 1 - \frac{t}{\tau_L} \right)^3 \right] \quad (3.4)$$

Donde  $[Cu^{z+}]_0$  es la masa inicial de metal expresada en concentración equivalente,  $t$  el tiempo y  $\tau_L$  el tiempo de vida de la nanopartícula el cual se puede calcular como:

$$\tau_L = \frac{d_0}{2k} \quad (3.5)$$

Siendo  $d_0$  el diámetro inicial de la nanopartícula y  $k$  la constante de disolución asociada a la reacción de liberación de iones.

Además del efecto biocida inducido por la liberación de iones, se busca estudiar y modelar la muerte por contacto. Para esto, es interesante estudiar y modelar las características de la membrana celular, entendiéndola como el primer paso de interacción directa de las NPs con los microorganismos. Dentro de las herramientas existentes que permiten describir estas interacciones, los modelos de membrana celular han sido extensamente utilizados para examinar el efecto de contaminantes tales como surfactantes, materia orgánica e iones metálicos [40]. Los modelos de membrana pueden ser formados a través de monocapas o bicapas de lípidos biológicamente relevantes, los cuales son usados para analizar como interactúan con componentes exógenos desde un punto de vista mecánico, termodinámico y cinético, siendo

posible evaluar los mecanismos en que causan disrupción de la membrana [40, 63, 64]. Estos modelos pueden ser extrapolados a nanopartículas para determinar como el tipo, tamaño, forma y características de la superficie de las NPs influyen sus interacciones.

Los modelos de membrana son generalmente preparados en geometrías esféricas o planas. Las geometrías esféricas consisten en una vesícula bi-lipídica que puede o no estar soportada, mientras que las planas consisten en la capa extendida sobre un soporte plano. El modelo de membrana a utilizar dependerá de las características a estudiar y del modelo vivo sobre el cual se está evaluando. Sin embargo, la evaluación de los mecanismos se realizan con pruebas estándar. En primer lugar, la unión u absorción de las nanopartículas a la membrana celular se puede medir mediante microscopia de fuerza atómica (AFM), mientras que la disrupción del modelo de membrana se puede estudiar mediante un ensayo de fuga de tintes (*dye-leakage assay*), el cual involucra una vesícula de lípidos la cual encapsule un tinte fluorescente en conjunto con las NPs que se están evaluando [11, 40, 63]. Finalmente, la visualización de las interacciones NP-modelo de membrana se pueden hacer mediante microscopia electrónica criogénica (*cryo-TEM*), donde se puede evaluar interacciones a nivel de cambios en morfología de membrana provocados por las nanopartículas. Hasta la fecha, no se han reportado modelos que sean capaces de describir los mecanismos biocidas mencionados en conjunto.

Por último, a fin de determinar un valor para el efecto biocida en microorganismos y unirlo con los parámetros del modelo asociados a los mecanismos biocidas, es que se buscan parámetros que permitan cuantificar el efecto de un compuesto en la viabilidad de un grupo celular. Como ya se comentó anteriormente, uno de los parámetros de estudio más simples asociados a la capacidad biocida de las NPs es su concentración. Dentro de esto, existen valores reportados de la mínima concentración bactericida (MBC) hacia *E. coli*, definida como la concentración mínima de un compuesto requerida para matar a una determinada (cantidad?) bacteria [65]. En la Tabla 3.1 se presentan las MBC de varios tipos de nanopartículas metálicas y de óxido metales hacia una cepa de *E. coli*. Al igual que la MBC, otro parámetro muy común para medir el efecto de una droga o compuesto corresponde a la mitad de la concentración efectiva máxima ( $EC_{50}$ ), que es la concentración a la cual un compuesto alcanza la mitad de su máximo efecto observable [59, 66]. Ambos parámetros tienen relación directa con la concentración del compuesto en estudio sobre un microorganismo en particular.

Tabla 3.1: Concentraciones mínimas bactericidas de nanopartículas en *E. coli* NCTC 9001 [48]

Nanopartícula	Ag	ZnO	CuO <sub>2</sub>	CuO	Cu
MBC (mg/L)	100	>5000	500	250	250

Además de comparar con la MBC, existen otros indicadores que sirven para medir la disminución en la viabilidad y crecimiento de un microorganismos expuesto a un compuesto biocida al contrastarlo con un caso control. Uno de estos corresponde a la tasa de muerte de bacterias (BKR), la cual se calcula como el porcentaje correspondiente a la diferencia entre el recuento de células en el control y el de la muestra con el biocida en un instante dado. Esto expresado como ecuación corresponde a:

$$BKR(\%) = \frac{N_c - N_b}{N_c} \cdot 100 \quad (3.6)$$

Donde  $N_c$  y  $N_b$  son el recuento de células en el control y en la muestra con biocida, respectivamente, expresado en unidades formadoras de colonia por mililitro (CFU/mL). Este indicador tiene la desventaja de sólo entregar el porcentaje de inhibición en un tiempo dado y no permite obtener datos de la cinética inhibitoria del compuesto biocida. Para evaluar el efecto en la cinética de crecimiento se puede utilizar otro indicador el cual, al igual que el BKR, mide el porcentaje de la diferencia de desarrollo respecto al control pero utilizando la tasa máxima de crecimiento  $\mu$  de ambos experimentos:

$$I(\%) = \frac{\mu_c - \mu_b}{\mu_c} \cdot 100 \quad (3.7)$$

Donde  $I$  corresponde al porcentaje de inhibición en el crecimiento respecto al control y  $\mu_c$  y  $\mu_b$  a la tasa máxima de crecimiento del control y del inóculo con biocida, respectivamente, calculado como la pendiente de la curva de crecimiento bacteriano cuando se alcanza la fase exponencial del mismo y que es expresado en unidades de concentración de células por tiempo (CFU/mL·s). Este indicador permite medir el efecto inhibitorio de la fase exponencial de crecimiento de un microorganismo frente a un biocida en particular, entregando información sobre su efecto tóxico en el tiempo [36, 67].

# Capítulo 4

## Metodología

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Reactivos y equipos utilizados

Para la confección de las membranas se utilizó por un lado Dimetilformamida (DMF), N-Metil-2-pirrolidona (NMP) y polisulfona (PS) para la confección de los soportes mientras que para la capa de poliamida (PA), se utiliza 2,6-Fenilendiamina (MPD), carbonilos de tricloruro de mesoilo (TMC), hidróxido de sodio (NaOH), hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) y agua destilada. En el Anexo 7.1 se encuentra el protocolo de confección de las membranas de osmosis reversa modificadas utilizado. Además de estos materiales, se utilizaron nanopartículas de cobre elemental (Cu-NP) y nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NP) comerciales compradas a Merck, y sal de cobre (CuCl<sub>2</sub>) para la modificación de las membranas y las pruebas de liberación de iones. Los equipos involucrados en esto incluyen campana de flujo aminor horizontal, equipo *casting knife* para la confección de los soportes de polisulfona y horno para el curado de las membranas.

Para las pruebas de liberación de iones se utilizó un agitador-incubadora de laboratorio y una centrifuga para tratar las muestras. La cantidad de cobre se midió mediante un espectómetro de absorción atómica de la Universidad de Santiago. Además de esto, se utilizaron filtros y solución de ácido clorhídrico (HCl). El protocolo de las pruebas de liberación de iones se encuentra en el Anexo 7.2

Finalmente, para las pruebas con microorganismos se utilizaron inóculos de *E. coli*, placas petri desechables, incubadora, medio LB, espectofotómetro, solución salina de fosfatos (PBS), micropipetas y rastrillos de vidrio. El protocolo de las pruebas biocidas se presenta en el Anexo 7.3

#### 4.1.2. Software

**Matlab.-** fue el software principal utilizado en este trabajo, donde se simularon todos los modelos obtenidos y se procesaron los principales resultados del proyecto.

**R.-** se utilizó para la confección de los gráficos de cinética de liberación de iones y para la cinética de crecimiento de *E. coli*.

**Excel.-** fue empleado para visualización y cálculos asociados a los resultados experimentales del proyecto y la determinación de la carga de cobre en las membranas modificadas utilizadas en las pruebas.

## 4.2. Procedimiento

### 4.2.1. Búsqueda de mecanismos y modelos

La primera etapa del trabajo considera la búsqueda en bibliografía de los parámetros de diseño y operación que influyen de mayor manera en la capacidad biocida de las nanopartículas. En esta etapa también se realiza el estudio de distintos mecanismos existentes que estén asociados a las características encontradas, como así también la búsqueda de posibles modelos ya propuestos que describan algunos de estos mecanismos.

Las características más relevantes identificadas incluyen el tamaño de nanopartícula, sus características químicas y de superficie y la solubilidad. Debido a que con los recursos actuales no es posible realizar pruebas con distintos tamaños de nanopartículas, se decide para la confección de este modelo trabajar con las características químicas al estudiar los 3 tipos de nanopartículas derivadas de cobre mencionadas (Cu-NP, CuO-NP y oligómeros de Cu formados *in situ*), caracterizando su capacidad de liberación de iones en solución en contraste con la incorporación en membranas de osmosis reversa modificadas con las NPs.

Dentro de los mecanismos estudiados, se obtuvieron varios modelos de cinética de disolución de metales, tanto en estado bruto como para nanopartículas, los cuales están basados principalmente en mecanismos de cinética heterogénea y lixiviación. Además de esto, se encontraron varios indicadores que permiten medir la capacidad biocida frente a un microorganismo dado, lo cual permite generar una conexión entre los parámetros que regulan el mecanismo biocida de liberación de iones y su capacidad de inhibir el crecimiento.

### 4.2.2. Estudio experimental de nanopartículas en membranas de OR modificadas

Concorde a la expuesto en en el punto anterior, los estudios experimentales contemplan la evaluación de la cinética de liberación de iones por parte de las distintas NPs en estudio en suspensión y en su incorporación a las membranas modificadas en contraste con el estudio de la cinética biocida cuando se cultivan las distintas membranas modificadas en conjunto con un microorganismo, midiendo el efecto inhibitorio respecto a un control sin NPs.

#### Pruebas de liberación de iones

El estudio de la cinética de liberación de iones por parte de los 3 tipos de nanopartículas contempla 2 casos: La liberación de iones por parte de las nanopartículas en suspensión y, en contraste, la liberación de iones de las nanopartículas ya inmersas en las membranas de osmosis reversa modificadas. En todos los casos se utilizaron 3 membranas modificadas a las

cuales se les estimó la masa inicial de cobre mediante el calculo de la diferencia de masa existente entre la membrana previo y posterior a su modificación con el cobre (ver Anexo 7.4). Esta misma masa de NPs o sal de cobre fue medida para realizar el contraste con los iones de cobre liberados desde las membranas modificadas. Las membranas utilizadas en las pruebas tienen una carga del 0.25 % m/m de cobre en la solución de MPD y para referirse a cada una se utiliza la siguiente nomenclatura:

- Membranas modificadas con nanopartículas de cobre elemental: (PA+0.25 %Cu-NPs)/PS
- Membranas modificadas con nanopartículas de óxido de cobre: (PA+0.25 %CuO-NPs)/PS
- Membranas modificadas con sal de cobre: (PA+0.25 %Cu-MPD)/PS

En todos los casos, los experimentos son llevados de la siguiente manera: Se rellenan 2 botellas Schott con 1L de agua desionizada. En una se añaden las membranas modificadas de un tipo de cobre, mientras que en la otra se añade el equivalente en masa del cobre en suspensión. Las botellas se mantienen agitadas a 200RPM y 30°C en un *shaker*. En periodos de tiempo determinados previamente, se toma un muestra de 30mL desde el matraz, la cual es centrifugada a 6000RPM por 10 min y luego filtrada para separar las NPs de la solución. A la muestra final se le mide la cantidad de cobre total presente mediante espectrometría por absorción atómica de flama, como también el pH de la solución. En total se obtienen 12 puntos de cada experimento por un tiempo total de 240 horas para obtener la cinética de liberación de iones desde las membranas modificadas y contrastarla con los iones liberados desde las nanopartículas libres.

## Pruebas de efecto biocida de nanopartículas

Una vez se tenga la cinética de liberación de iones para cada modificación de cobre en estudio, se realizan pruebas para comprobar la capacidad de toxicidad de las NPs de cobre en las membranas modificadas. Para esto, se realizó una prueba bajo las mismas condiciones que la anterior, tomando 3 membranas de cada una de las modificaciones de cobre (elemental, óxido de cobre y sal de cobre), de manera de que la cantidad de cobre presente fuera comparable con la prueba de liberación de iones. En cada botella se añadió un cultivo de *E. coli* Top10 previamente descongelada y crecida. El pre-inóculo de *E. coli* fue generado descongelando un vial de bacterias para luego inocularlo en un tubo de ensayo con 5mL de medio LB, el cual es dejado incubando en *shaker* a 250RPM y 30°C durante la noche. Se decidió utilizar medio LB debido a la facilidad de acceso al insumo y dado que es un medio clásico que asegura el crecimiento normal de la *E. coli* [67].

La toma de muestras para realizar el CFU y el seguimiento del crecimiento se realizó en los mismos puntos que en la prueba de liberación de iones por las primeras 48 horas, tiempo estimado en que se pudiera apreciar la inhibición por cobre sin existir muerte natural de la *E. coli* por falta de nutrientes [68]. La prueba se realizó en simultáneo con todas las botellas en un mismo shaker y se inóculo una cantidad de bacterias igual a cada botella con una concentración inicial de  $1 \cdot 10^7$  cel/mL, la cual fue calculado a partir de la medición de densidad óptica (OD) a 600nm [69].

Las membranas utilizadas en la prueba fueron esterilizadas dejándolas en luz UV por 30 minutos previo al inicio del experimento, de manera de no incluir contaminación con otros microorganismos que pudiera afectar el experimento. Las botellas se mantienen agitadas a

200RPM y 30°C. En los tiempos expuestos, se toma una muestra de 1mL desde el Schott para medir viabilidad de las bacterias. Para ello, las soluciones bacterianas extraídas son diluidas serialmente con PBS hasta una dilución del orden de  $10^{-4}$  o  $10^{-7}$ , según corresponda. De la mayor dilución, se extraen 50  $\mu\text{L}$  y se dispersan en placas de agar con medio LB, las cuales se dejan incubando *overnight* a 37°C y luego son observados por desarrollo de las unidades formadoras de colonias (CFU) para estimar el número de *E. coli* viable restante en la suspensión. En la prueba se tiene dos blancos sumados a los experimentos con las 3 modificaciones de cobre: Un control positivo con *E. coli* en un Schott de 1L con medio LB y otro Schott de 1L con el microorganismo, más una membrana blanco sin nanopartículas (PA/PS).

Las placas en cada punto y para cada muestra se realizan en triplicado. Luego, la concentración de bacterias es calculada a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Células vivas en tiempo } t [CFU/mL] = \text{promedio}(N^\circ \text{ de colonias}) \cdot \frac{1}{\text{dilución}} \cdot \frac{1}{\text{inóculo}} \quad (4.1)$$

Con estos resultados se obtuvieron la *BKR* en cada tiempo y el porcentaje de inhibición *I* con respecto al control de membrana blanco (PA/PS), este último calculando la tasa máxima de crecimiento de las pruebas como la pendiente del CFU en el tiempo entre las 4 y 12 horas del experimento.

### 4.2.3. Confección del modelo

Finalmente, a partir de los datos experimentales obtenidos y los mecanismos estudiados, se proponen 2 modelos para describir la liberación de iones de cobre desde las membranas modificadas. El primero de ellos esta basado en una reacción de lixiviación por disolución y apunta a describir el proceso de liberación de iones cúprico desde las membranas modificadas con la sal de cobre (PA+0.25 %Cu-MPD)/PS. El segundo modelo corresponde a una adaptación del modelo de núcleo sin reaccionar existente en la literatura, el cual es capaz de describir la reacción de disolución de partículas esféricas en el tiempo controlada ya sea por reacción química o por difusión. Este modelo es utilizado para medir la liberación de ión cúprico desde las membranas modificadas con nanopartículas, (PA+0.25 %Cu-NPs)/PS y (PA+0.25 %CuO-NPs)/PS, como también la cinética de liberación de iones desde las nanopartículas libres en suspensión.

Ambos modelos consideran las condiciones de operación que afectan la cinética de disolución, así como también parte de los parámetros de diseño y características asociadas a las nanopartículas mencionados en las secciones anteriores. Al modelo se le realiza un ajuste de parámetros con los datos experimentales obtenidos, mediante el método de minimización del error cuadrático medio con los datos experimentales, además de la validación de los mismos.

Por otro lado, desde las pruebas biocidas se obtienen indicadores de viabilidad tales como la *BKR* y el porcentaje de inhibición en la velocidad de crecimiento (*I*), a fin de determinar cual de los 3 tipos de cobre evaluados presenta el mayor efecto biocida. Finalmente, se propone un modelo simple que vincule los parámetros encontrados en el modelo de disolución con los

indicadores de viabilidad para cada modificación evaluada, a fin de relacionar parámetros de operación y diseño con la capacidad biocida de las especies de cobre en estudio.

# Capítulo 5

## Resultados y Discusiones

A partir de la recopilación bibliográfica realizada en este proyecto se determinó que el mecanismo biocida preponderante a estudiar en este proyecto corresponde a la liberación de iones de cobre desde las membranas modificadas [19]. Dicho esto, en los resultados de este trabajo se muestran inicialmente las pruebas de seguimiento de la cinética de cobre disuelto realizadas a los distintos cobres en estudio (Cu-NPs, CuO-NPs y CuCl<sub>2</sub>), en contraste con las cinéticas existentes cuando estos se encuentran en la membrana modificada de osmosis reversa ((PA+0.25 %Cu-NPs)/PS, (PA+0.25 %CuO-NPs)/PS y (PA+0.25 %Cu-MPD)/PS). Luego de esto, se muestran los resultados obtenidos desde las pruebas biocidas, correspondientes a la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* en presencia de las membranas modificadas con cobre ya mencionadas, contrastadas con un control sin cobre. De estas curvas se extraen indicadores biocidas que permiten cuantificar el nivel de toxicidad inducido por los distintos cobres en estudio.

Luego de esto, se detallan los 2 modelos de liberación de iones utilizados para describir la cinética de liberación de iones en función de los parámetros de diseño de las NPs, junto con las condiciones del medio que afectan la cinética. Estos modelos son ajustados en base a los datos experimentales obtenidos desde el seguimiento de la disolución del cobre en membrana. Posteriormente, se realiza una conexión entre ambos modelos, de manera de encontrar un parámetro en común que permita comparar las distintas modificaciones de cobre en membrana.

Finalmente, en base a los modelos estudiados y los parámetros biocidas obtenidos, se da una propuesta de un modelo anti-*biofouling* que sea capaz de relacionar los parámetros que describen el mecanismo biocida de liberación de iones con su capacidad tóxica. En este modelo se discuten como integrar a futuro otros efectos como la muerte por contacto de manera de completar y validar el modelo.

### 5.1. Pruebas de liberación de iones

Las pruebas de liberación de iones busca estudiar la cinética de disolución de los tipos de cobre en estudio (elemental, óxido de cobre y sal de cobre), entendido como el mecanismos

biocida clave de las nanopartículas en membrana. Para ello, se midió la cantidad de cobre disuelto liberado desde las membranas modificadas, el cual se busca contrastar con el cobre disuelto liberado desde las nanopartículas de cobre libres.

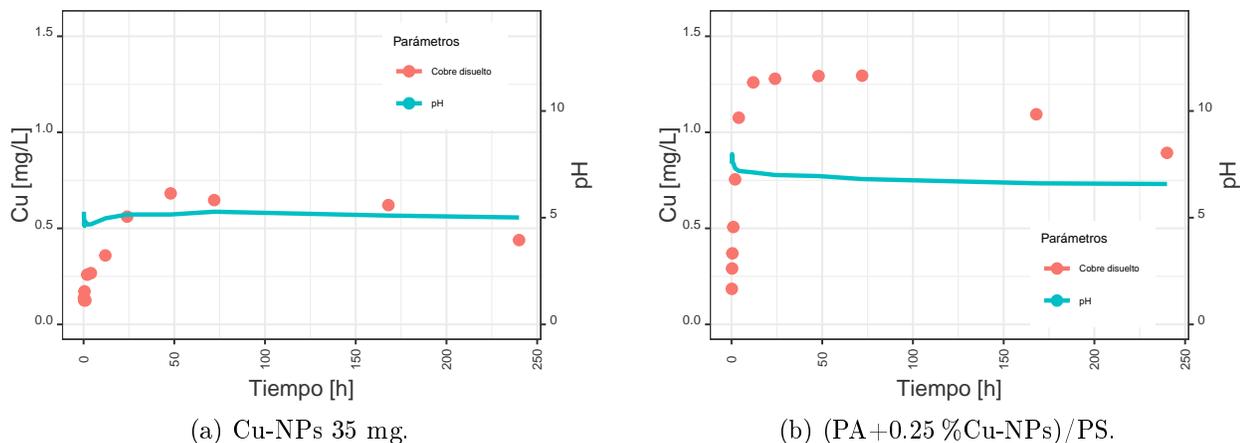


Figura 5.1: Cinética de liberación de iones y pH para nanopartículas de cobre elemental (Cu-NPs) en suspensión (a) y en membrana (b). Los puntos muestran las mediciones de cobre disuelto en solución en los distintos tiempos de muestra, mientras que la línea indica el cambio en el pH a lo largo del experimento.

En la Figura 5.1 se presentan los resultados de la medición del cobre disuelto mediante absorción atómica, junto con la medición de pH de las muestras para las nanopartículas de cobre elemental (Cu-NPs) tanto en suspensión (Figura 5.1a) como en membrana (Figura 5.1b). Se observa que la liberación iones de cobre proveniente desde la disolución del metal presenta una cinética de primer orden, tanto en las membranas (PA+0.25 %Cu-NPs)/PS como desde las nanopartículas libres, por las primeras 72h, donde la concentración de cobre disuelto aumenta en forma logarítmica hasta alcanzar un máximo. Este comportamiento es acorde con los mecanismos reportados en la bibliografía, donde en tanto para casos de nanopartículas de cobre como de plata existe una cinética de primer orden [20, 41, 58]. Sin embargo, los puntos posteriores a las 72 horas presentan una caída en la concentración. Hasta la fecha, no se han encontrado reportes de cinética de disolución para nanopartículas de cobre que superen las 50 horas de estudio. Por tanto, el efecto de caída en la concentración de cobre tras las 72 horas no se ha sido reportado previamente. Una posible explicación para esto viene de revisar el diagrama de equilibrio de fases acuosas Eh-pH para el cobre en agua (ver Anexo 7.5) [70].

En primer lugar, un aumento brusco en el pH por sobre 6 de la solución puede llevar a la oxidación y precipitación del cobre. Esto se puede observar en el caso del cobre elemental en membrana, donde el pH de la solución se estabiliza en 7 luego de 48 horas, no así en el cobre elemental en suspensión, que se estabiliza en un pH cercano a 5. Sin embargo, no existe un cambio brusco en el pH en el tiempo comprendido entre las 48 y 240 horas para el caso de las membranas (PA+0.25 %Cu-NPs)/PS, lo cual sugiere que un equilibrio con una posible oxidación del cobre fue alcanzado previo a los tiempos que presentan la caída en concentración de cobre disuelto. La otra causa puede estar asociada al potencial eléctrico de

la solución (Eh), el cual si presenta una caída brusca puede hacer precipitar el cobre disuelto. Mediciones de Eh fueron llevadas a cabo con la prueba realizada a las membranas de óxido de cobre (PA+0.25 %CuO-NPs)/PS, el cual no mostró una variación significativa luego de las 48 horas de iniciado el experimento. Ante esto, para la modelación de la disolución de cobre elemental se simularon las primeras 72 horas de experimento que consideran la cinética de primer orden, de manera de no incluir efectos asociados a una posible precipitación.

Comparando las curvas de cobre disuelto entre Cu-NPs y (PA+0.25 %Cu-NPs)/PS, se puede notar que la concentración de cobre disuelto en el caso de estar en membrana es ligeramente mayor tras 72h que en el caso del cobre en suspensión. Una posible explicación de la mayor liberación de iones en membrana que en nanopartículas en suspensión corresponde a que estas últimas tienden a aglomerarse en cúmulos de NPs que disminuyen su área efectiva disponible para solubilizarse, mientras que en la membrana presentan una distribución más homogénea en la capa de poliamida la cual presenta una menor difusividad que la presentada por la aglomeración de las NPs [12, 13, 18, 38].

Otra razón para explicar el aumento de iones en el caso con membrana corresponde a la forma de agitación utilizada en el experimento. Las botellas de 1L presentan una agitación deficiente respecto a material con volúmenes más bajos. Este efecto pudo observarse visualmente dado que las nanopartículas, tanto de cobre elemental como de óxido de cobre, tendían a precipitar al fondo de la botella durante el transcurso del experimento, mientras que las membranas se mantenían en mayor movimiento en zonas centrales de la botella.

Para el caso del óxido de cobre, en los resultados de las mediciones de cobre disuelto (ver Figura 5.2) se puede apreciar también una cinética de primer orden tanto en las nanopartículas en suspensión CuO-NPs (Figura 5.2a), como en las membranas (PA+0.25 %CuO-NPs)/PS (Figura 5.2b). Sin embargo, se observa que durante las primeras 24 horas del experimento existen fluctuaciones en las mediciones de cobre disuelto. Esto se debe principalmente a que el óxido de cobre es altamente sensible a la concentración de oxígeno en el medio. Durante la primeras 24 horas de experimento existe un monitoreo mayor a las botellas, dado que éstas son críticas para observar la cinética de liberación de iones, lo que provoca una mayor exposición al oxígeno, lo cual conlleva un cambio en la cantidad de cobre disuelto [71]. Fuera de este rango de tiempo, se puede observar que el estado estacionario de iones cobre en solución es similar para ambos casos del CuO (alrededor de los 0.25-0.3 mg/L), pero el cual es notoriamente más bajo que alcanzado por las nanopartículas de cobre elemental. Esto sugiere una menor capacidad del óxido de cobre para liberar iones en comparación al cobre elemental. Una posible explicación corresponde a la diferencia de tamaño entre las NPs de cobre elemental y óxido de cobre utilizadas, donde estas últimas son del doble de tamaño que las de cobre elemental (50 nm. vs 25 nm.). Como ya fue presentado en secciones anteriores, un menor tamaño de nanopartícula conlleva una solubilidad menor [18, 41, 47]. Debido a que se utilizaron nanopartículas comerciales no existió la posibilidad de usarlas con un tamaño similar. Actualmente AMTC esta desarrollando sus propias nanopartículas, lo que permitiría en un futuro replicar las pruebas con NPs de tamaño comparable.

En el caso de la sal de cobre (Figura 5.3a) utilizada en suspensión, se tiene que esta se disuelve rápidamente alcanzando una concentración por sobre los 40mg/L en los primeros 10 minutos, concentración que se mantiene estable durante las 240 horas del experimento. La

masa de cobre disponible en 100mg de  $\text{CuCl}_2$  es de aproximadamente 49 mg, sumado a que la solubilidad del cloruro de cobre en agua es de 73 g por cada 100mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , sugieren que la sal se disolvió completamente y las diferencias de concentración vienen dadas por errores en la medición de la carga inicial de la sal agregada, agitación no completamente homogénea de la botella al sacar la muestra o por la sensibilidad de la medición en el equipo de absorción atómica utilizado para la medición de las muestras.

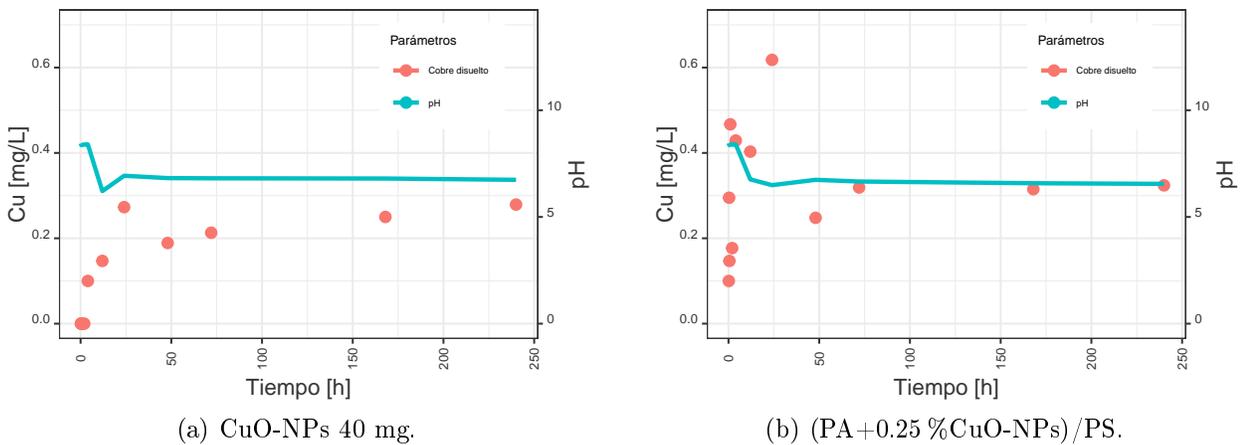


Figura 5.2: Cinética de liberación de iones y pH para nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs) en suspensión (a) y en membrana (b). Los puntos muestran las mediciones de cobre disuelto en solución en los distintos tiempos de muestra, mientras que la línea indica el cambio en el pH a lo largo del experimento.

En contraste, la liberación de iones desde la membrana con el oligómero de cobre (Figura 5.3b) presentó una cinética de primer orden al igual que en el caso de las NPs, con un estado estacionario que se alcanza alrededor de las 50h y que en magnitud es mucho menor al caso de la sal disuelta. Este resultado sugiere que la capa de poliamida en la que se encuentra estructurado el cobre que forma el oligómero impone un control difusional para la liberación de iones, el cual es lixiviado hacia el medio como ion cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ), mientras que la sal en suspensión se disuelve rápidamente en solución acuosa, lo cual es consistente con los reportes existentes sobre el equilibrio de fases de sales de cobre en agua [72].

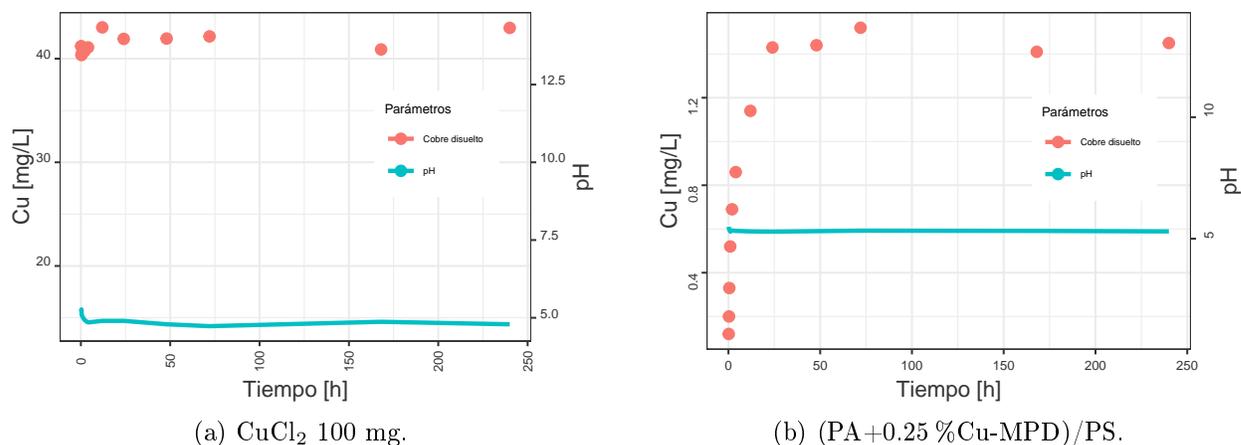


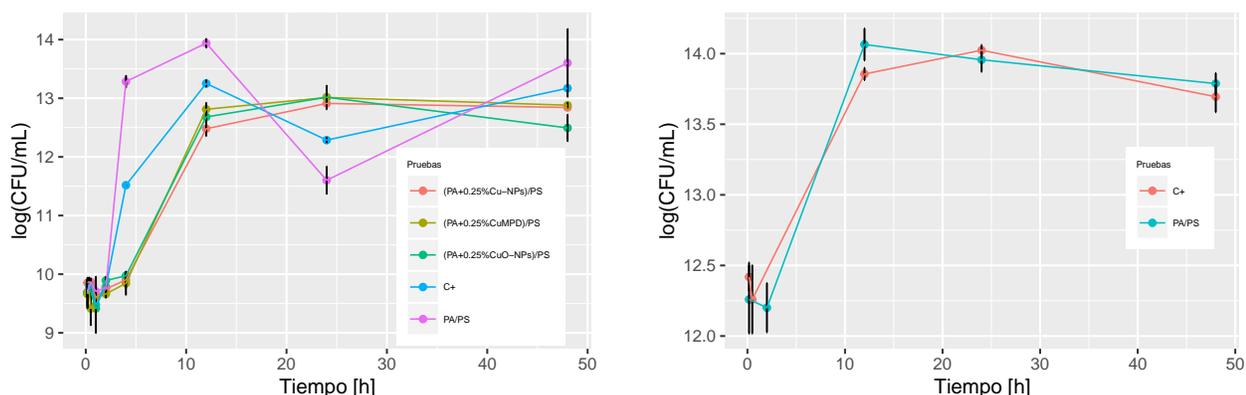
Figura 5.3: Cinética de liberación de iones y pH para sal de cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) y membrana con oligómeros de cobre (Cu-MPD). Los puntos muestran las mediciones de cobre disuelto en solución en los distintos tiempos de muestra, mientras que la línea indica el cambio en el pH a lo largo del experimento.

Otra implicancia de los resultados asociados al oligómero de cobre es la determinación de la cantidad efectiva de cobre. El método de determinación de carga de cobre en las membranas de OR esta basado en medir la masa de la misma previo a la confección de la capa modificada de poliamida, es decir, masar el soporte de polisulfona y repetirlo luego del secado de la membrana modificada. En estas mediciones se observó que la masa de la capa de poliamida sola, medida al realizar membranas blanco sin cobre (PA/PS), era despreciable (ver Anexo 7.4), por lo cual la diferencia de masa en la membrana correspondería a la carga de cobre en la membrana. Sin embargo, este método presenta una desviación estándar apreciable en las mediciones, por lo cual pueden existir diferencias entre la masa medida en la membrana, además de cambiar entre membranas del mismo tipo. Los resultados obtenidos para el oligómero de cobre sugieren que, o la carga en membrana es mucho más baja que la medida por el método de balanza, o que la masa disponible de cobre para liberación de iones es una fracción de la carga en membrana. Esto será discutido en detalle en los modelos de liberación de iones.

## 5.2. Pruebas biocidas e indicadores de viabilidad

Una vez terminadas las pruebas de liberación de iones, se realizaron las pruebas biocidas consistentes en cultivar *E. coli* en conjunto con las membranas modificadas. Para no alterar en gran medida la tasa de liberación de iones y hacer comparable los niveles de iones alcanzados en la prueba de liberación de iones con la capacidad biocida medida, se utilizan la misma cantidad de membranas y se mantienen las condiciones de temperatura y agitación de la prueba previa, junto con la utilización del mismo volumen de 1L en botellas. Sin embargo, para asegurar el crecimiento de los microorganismos, fue necesario el uso de medio de cultivo para desarrollar las pruebas. En estas pruebas se midió la viabilidad de la *E. coli* mediante el método de unidades formadoras de colonia (CFU) al crecer en conjunto con las membranas con las distintas modificaciones con cobre, contrastando las curvas obtenidas con la bacteria

creciendo en las mismas condiciones pero sin presencia de cobre.



(a) Cinética de crecimiento de *E. coli* prueba original.

(b) Repetición de prueba de cinética de crecimiento de *E. coli*

Figura 5.4: Curvas de crecimiento para seguimiento de viabilidad de *E. coli* mediante CFU. La primera prueba fue llevada a cabo probando todas las modificaciones de cobre junto a un membrana blanco y un control positivo sin membranas (a), mientras que la repetición sólo se le realizó a los controles PA/PS y C+ (b).

En la Figura 5.4a se muestran las curvas de crecimiento de las distintas pruebas. El control positivo (“C+”) corresponde a un cultivo de bacterias creciendo sin presencia de alguna membrana, mientras que “PA/PS” corresponde al cultivo de *E. coli* en conjunto con una membrana blanco sin cobre. Se logra observar rápidamente que las curvas de estos 2 experimentos logran un mayor crecimiento respecto a todos los casos con membranas modificadas. Tanto el control positivo como la membrana blanco entran en fase exponencial alrededor de las 4 horas de iniciado el experimento, tiempo al cual los microorganismos en presencia de las membranas con cobre aún siguen en una fase retardada, pudiendo entrar en fase exponencial de forma más tardía entre las 4 y las 12 horas.

La membrana blanco PA/PS no posee ningún elemento que sea capaz de reducir ni mejorar el crecimiento de las bacterias, por tanto, es esperable que tuviera una curva de crecimiento muy similar al caso del control positivo. Debido a que en la primera prueba existieron diferencias entre ambos casos y por la baja en viabilidad encontrada para estos 2 casos entre las 12 y 48 horas, se realizó una repetición de la prueba para los casos del C+ y la membrana blanco PA/PS. Los resultados de la repetición se muestran en la Figura 5.4b, en donde se puede apreciar que ambos experimentos presentaron un crecimiento similar entre sí. Si bien el crecimiento presentado no es idéntico al de la primera prueba, debido a que los pre-inóculos utilizados no son los mismos, los resultados permiten asegurar que la membrana blanco no altera el crecimiento de la *E. coli* en el experimento. En la prueba original, la baja de 24 horas se asocia a la fase de muerte de las bacterias luego de agotar los nutrientes disponibles. Ante lo mismo, el punto de 48 horas presenta un crecimiento anormal en la prueba original asociado a que la muestra fue plaqueada de manera tardía debido a la no disponibilidad inmediata de materiales al tomar la muestra. Esto provocó que hubiera un crecimiento asociado al tiempo de almacenamiento previo a la formación de las colonias en placa que sugiere el repunte en el recuento exhibido en este punto.

Para la obtención de los indicadores de viabilidad se comparó el crecimiento de las bacterias cultivadas en conjunto con las membranas con las distintas modificaciones de cobre en contraste con la membrana blanco, asumiendo que esta presenta el mismo comportamiento que el control positivo sin membranas y dado que permite ver el efecto directo del cobre en la membrana. La tasa de muertes de bacterias (BKR) se calculó para todos los tiempos de muestra del experimento. En la Figura 5.5 se presenta una gráfica con la BKR en todo el tiempo del experimento, mientras que en la Tabla 5.1 se presentan los resultados de la BKR para todos los casos en las 4 y 12 horas, tiempos donde se da la fase exponencial de crecimiento y permiten visualizar el efecto inhibitorio del cobre. En esta Tabla se puede observar que todas las modificaciones de cobre en las membranas son capaces de inhibir en más de un 99 % el crecimiento en las primeras 4 horas, resultados similares a los obtenidos en trabajos previos existentes con estas membranas [12-14]. Por otro lado, a las 12 horas, las membranas con nanopartículas de cobre elemental (Cu-NPs) fueron capaces de seguir inhibiendo el crecimiento en mas del 99 %, mientras que tanto las nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs) como el oligómero de cobre (Cu-MPD) presentaron una baja en la inhibición, la cual llegó al 93 %. Estos resultados no han sido reportados previamente con estas membranas, dado que las pruebas biocidas realizadas sólo se extendían por 4 horas.

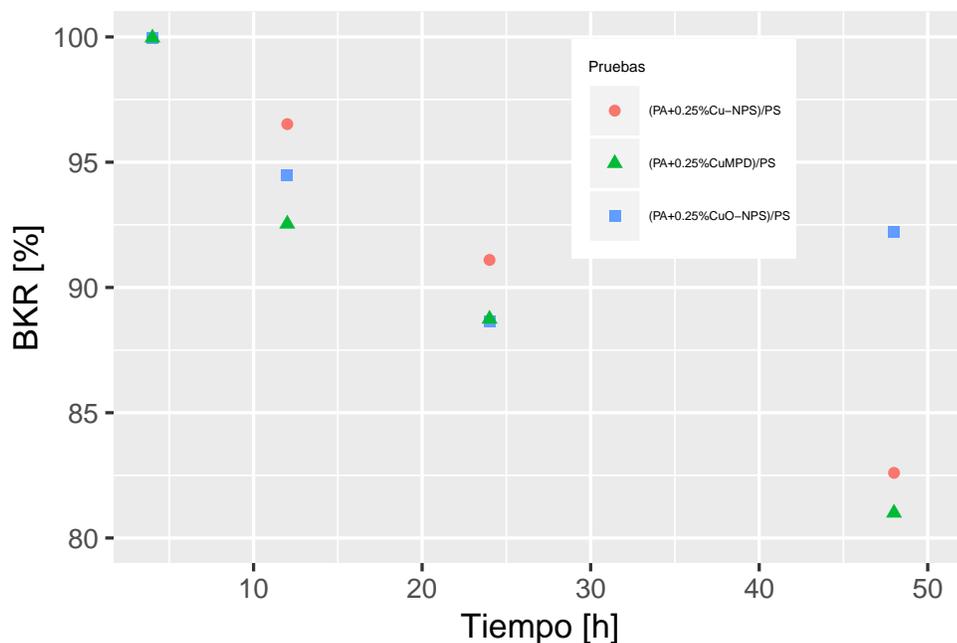


Figura 5.5: Gráfica del ratio de muertes de bacterias (BKR) para todo el espectro de tiempo del experimento

Tabla 5.1: Tasa de muerte de bacterias en membranas modificadas a diferente tiempos del experimento

Membrana	BKR [%]	
	4h	12h
PA/PS	0	0
(PA+0.25 %Cu-NPs)/PS	99,96	99,61
(PA+0.25 %CuO-NPs)/PS	99,94	93,09
(PA+0.25 %Cu-MPD)/PS	99,98	93,01

Para medir un efecto sobre la viabilidad más completo es que se utiliza el indicador de inhibición de crecimiento bacteriano ( $I$ ) el cual compara la diferencia entre las tasas máxima de crecimiento ( $\mu$ ) de los distintos experimentos en comparación a la membrana blanco. En la Tabla 5.2 se muestran los resultados de este indicador para todas las modificaciones de cobre con su respectiva intervalo de confianza. De estos resultados se destaca que ambas modificaciones con nanopartículas presentaron un porcentaje de inhibición levemente superior a la membrana de oligómero de cobre, siendo las nanopartículas de óxido de cobre ligeramente superiores al cobre elemental. Este indicador también refuerza un resultado obtenido en la prueba de liberación de iones que corresponde al hecho de que las nanopartículas presentan comportamientos diferentes al oligómero de cobre, lo cual se traduce en una toxicidad distinta hacia los microorganismos. En particular, como ya se discutió en secciones anteriores, la escala nanométrica le confiere características especiales a las NPs, aumentando su área efectiva y posibilidad de interacción con moléculas, lo cual se traduce típicamente en una mejorada capacidad biocida respecto a la especie bruta [10, 23, 38, 73].

Tabla 5.2: Inhibición del crecimiento bacteriano por parte de las distintas membranas modificadas

Membrana	$I$ [%]
PA/PS	0
(PA+0.25 %Cu-NPs)/PS	$56 \pm 4,84$
(PA+0.25 %CuO-NPs)/PS	$58 \pm 4,75$
(PA+0.25 %Cu-MPD)/PS	$54,1 \pm 0,83$

### 5.3. Modelo de liberación de iones

Tanto los resultados de liberación de iones como las pruebas biocidas sugieren que los comportamientos de las nanopartículas son diferentes a la de la membrana de oligómero de cobre. Por un lado, en el caso de la membrana de oligómero de cobre (PA+0.25 %Cu-MPD)/PS se observa que la coordinación de la sal de cobre con la poliamida indujo un control difusional sobre la liberación de cobre al medio, debido a que la sal de cobre es capaz de disolverse completamente al no estar coordinada con el polímero de la membrana de osmosis reversa. Por otro lado, en el caso de las nanopartículas, tanto de cobre elemental (Cu-NPs), como de óxido de cobre (CuO-NPs), se observa una cinética de primer orden tanto para las nanopartículas libres como en membrana, obteniendo en ambos casos que la cantidad

de cobre disuelto es mayor cuando las nanopartículas están en membrana, pero sin cambiar la cinética de reacción observada.

Debido a esto es que se decide plantear 2 modelos de liberación de iones independientes, uno para la membrana de oligómero de cobre y otro para las NPs en estudio, que permita recoger sus características asociadas a su toxicidad, para luego conectar sus parámetros de ajuste de manera de generar una comparativa de sus efectos biocidas de cara a desarrollar un modelo anti-biofouling. Para ambos casos se utilizan modelos de lixiviación, donde el cobre en la membrana es liberado hacia la solución acuosa en la que se realizaron las pruebas. Para el caso del oligómero de cobre se plantea un modelo de lixiviación controlado por disolución, mientras que en el caso de las NPs corresponde al modelo de cinética heterogénea de núcleo sin reaccionar. Ambos modelos serán presentados con su respectivo balance y ajuste con los datos experimentales, además de discutir sus alcances y limitaciones en las secciones posteriores.

### 5.3.1. Modelo para oligómero de cobre

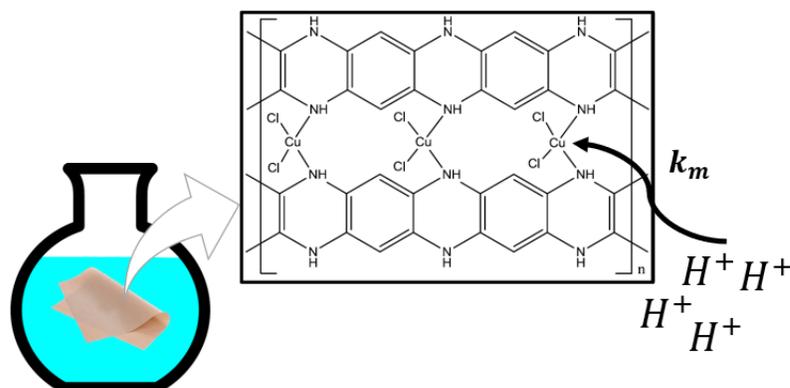


Figura 5.6: Esquema de cinética de liberación de iones desde las membranas de oligómero de cobre (Cu-MPD).

En la Figura 5.6 se muestra un esquema del proceso de liberación ocurrido en el experimento para las membranas de oligómero de cobre, en donde los iones hidrógeno presentes en el agua promueven la liberación de iones de cobre, en particular ion cúprico liberado desde la reacción sobre la sal de cobre presentada en la Figura 5.7 existente en la membrana [2]. Para plantear el balance de masa se consideran 2 volúmenes de control: La membrana y la botella (ver Figura 5.7). De esta manera, al realizar un balance de ión cúprico en la membrana, en donde existe un flujo de iones de cobre ( $[Cu^{2+}]$ ) el cual es liberado en su totalidad hacia la botella (no existe acumulación de iones en la membrana) y, por otro lado, se asume que la botella parte sin concentración de cobre en ella y que la única entrada de iones cobre corresponde al flujo de salida desde la membrana dado por la reacción de disolución. Con esto se obtienen las siguientes ecuaciones:

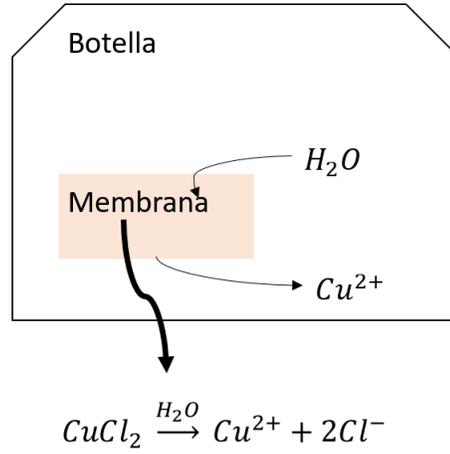


Figura 5.7: Esquema de balance de masa para membranas de oligómero de cobre (Cu-MPD)

$$r_{Cu}V = F_{out} \quad (5.1)$$

$$V \cdot \frac{d[Cu^{2+}]}{dt} = F_{in} \quad (5.2)$$

Donde  $V$  es el volumen de la botella y  $[Cu^{2+}]$  la concentración de ión cúprico.  $r_{Cu} \cdot V$  corresponde al flujo de liberación de ión cúprico dado por la reacción de lixiviación,  $F_{out}$  es el flujo másico de salida desde la membrana a la botella, mientras que  $F_{in}$  es el flujo másico de entrada de iones a la botella. Al asumir que la lixiviación esta controlada por la disolución dada por el agua sobre el cobre se tiene que [74]:

$$r_{Cu} \cdot V = S \cdot k_m ([Cu^{2+}]_s - [Cu^{2+}]) \quad (5.3)$$

La cual corresponde a la velocidad de transferencia de masa de cobre desde la membrana hacia el medio acuoso. En esta ecuación,  $S$  corresponde al área de la membrana,  $k_m$  es la constante de disolución asociada a la membrana de oligómero de cobre y  $[Cu^{2+}]_s$  es la masa de cobre restante en membrana expresado en concentración equivalente, que corresponde a la concentración existente de ión cúprico asumiendo que todo el cobre sólido en membrana es disuelto [62, 75]. Dado que todo el flujo liberado desde la membrana va a la botella se tiene que  $F_{in} = F_{out}$ . Usando 5.3 en 5.1 y la relación entre flujos planteada y reemplazando en 5.2, se obtiene:

$$V \cdot \frac{d[Cu^{2+}]}{dt} = S \cdot k_m ([Cu^{2+}]_s - [Cu^{2+}]) \quad (5.4)$$

Finalmente, se realiza un balance de los iones de cobre totales en la membrana con su concentración restante:

$$[Cu^{2+}]_0 = [Cu^{2+}]_s + Cu^{2+} \quad (5.5)$$

Donde  $[Cu^{2+}]_0$  es la masa inicial de cobre en la membrana, expresado en concentración equivalente de iones en solución, la cual se relaciona directamente con la concentración en solución dado que el volumen inicial de agua en el experimento es de 1L. Como ya se comentó previamente, los resultados de las pruebas de liberación de iones sugieren que la masa inicial de cobre disponible para liberar iones en la membrana es un porcentaje bajo de la masa total de la poliamida, lo cual explica la diferencia de concentraciones alcanzadas para las pruebas con la sal de cobre y las membranas de oligómero.

Para aproximar la masa inicial efectiva de cobre en membrana se utilizó un resultado previo obtenido por AMTC presentado en la patente de invención de las membranas [2]. Este corresponde a una análisis por fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDX) realizado a la capa de poliamida (PA) de una membrana de oligómero de cobre con carga de 1 % m/m. En este resultado se obtuvo que un 10.49 % de la masa de la membrana corresponde a cobre. Con este resultado y teniendo las masas de las PA de las membranas utilizadas en el experimento del oligómero de cobre se determinó que la masa inicial de cobre en el experimento era de 6.05 mg. Con este dato y la curva de disolución obtenida mediante absorción atómica se realizó un ajuste de parámetros a la ecuación 5.4 para encontrar la constante de disolución de la membrana a partir de la constante  $k$  en el ajuste definida como:

$$k = \frac{k_m \cdot S}{V} \quad (5.6)$$

Desde la cual luego se recupera la constante de disolución  $k_m$  al multiplicar por el volumen de solución y dividiendo por el área de las membranas, ambos datos conocidos. El ajuste se realiza mediante el método de mínimo cuadrados a la siguiente función objetivo:

$$e = ([Cu^{2+}]_{ajuste} - [Cu^{2+}]_{exp})' \cdot ([Cu^{2+}]_{exp} - [Cu^{2+}]_{ajuste}) \quad (5.7)$$

La cual corresponde al error cuadrático entre los vectores de concentración de cobre disuelto entregados por la resolución de la ecuación diferencial 5.4 y los datos experimentales obtenidos por absorción atómica. Además del ajuste que utiliza la masa inicial calculada a partir de los resultados de la EDX, se realizó un ajuste de parámetros donde se dejaron tanto la constante de disolución como la masa inicial  $[Cu^{2+}]_0$  libres. En la Figura 5.8 se presentan ambas curvas con los parámetros ajustados y en la Tabla 5.3 se muestran los valores de los parámetros arrojados por el ajuste.

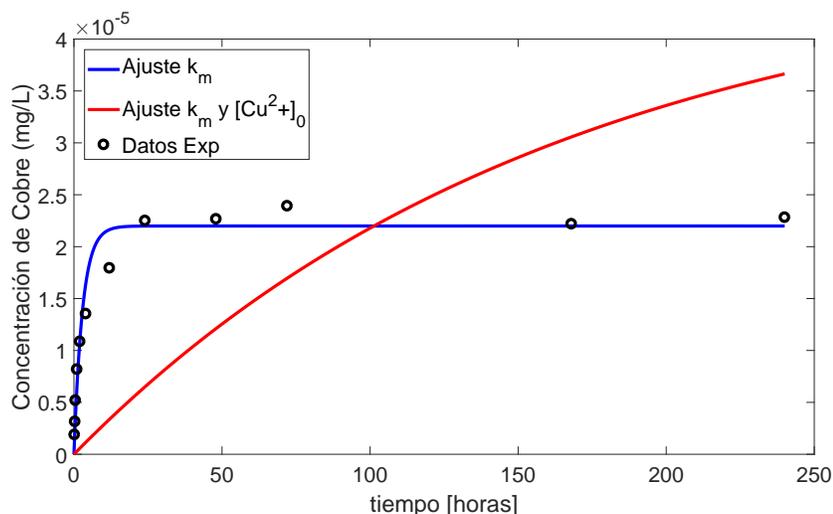


Figura 5.8: Ajuste de modelo de lixiviación con control de disolución para membranas de oligómero de cobre. La línea azul muestra el ajuste a los parámetros de la constante de disolución y la masa inicial mientras que la roja corresponde al ajuste utilizando la masa inicial calculada a partir de los datos de la patente de la membrana [2]

Tabla 5.3: Valores de parámetros ajuste para modelo de lixiviación por disolución

Ajuste	$k_m$ [m/s]	$[Cu^{2+}]_0$ [mg]
Sólo constante de disolución	$1,84 \cdot 10^{-4}$	6.05
Constante de disol. y masa inicial	$1,04 \cdot 10^{-2}$	2.79

El modelo recién descrito consta de 2 parámetros clave de ajuste que definen la forma de la curva y su comportamiento. El primero de ellos corresponde a la masa inicial de cobre disponible en membrana. Al revisar en detalle la ecuación 5.4 observamos que el flujo de iones hacia la botella será nulo cuando la concentración de iones iguale a la concentración de cobre restante en la membrana, el cual viene marcado por la masa inicial, la cual define por tanto el estado estacionario de iones que alcanza la curva. Este parámetro es clave dado que la concentración de iones tiene directa relación con la capacidad biocida de la membrana. Al revisar los parámetros arrojados por el ajuste del modelo de lixiviación para la constante de disolución y la masa, vemos que esta corresponde a alrededor del 50 % de la masa calculada a partir de los resultados de análisis EDX publicados en la patente. Esta diferencia en la masa se puede dar por varias razones. La primera de ella es que la técnica de EDX utilizada sobre la capa de poliamida en este caso corresponde a una técnica cualitativa y no cuantitativa, por lo cual los porcentajes obtenidos no son directamente aplicables a las membranas utilizadas [76].

Otra diferencia corresponde a que al análisis de la patente fue hecho a una membrana con solución de 1 % m/m de nanopartículas, mientras que las utilizadas en los experimentos

corresponden a membranas con carga de 0.25 % m/m, por lo cual es esperable que la carga de cobre sobre estas sea menor. Dentro de la bibliografía revisada en este proyecto, no se han hecho menciones al concepto de cobre efectivo en membrana, por lo cual en este proyecto es la primera vez que se hace mención de esto. Si bien se sabe que aumentar la concentración del compuesto induce un mayor efecto biocida [10, 18], actualmente no se han hechos estudios para determinar la carga efectiva de cobre en las membranas al cambiar la concentración del metal en la solución de MPD. Dentro de posibles maneras de hacer esto se encuentra el análisis elemental por combustión o la espectroscopía de masas por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), que pueden determinar la composición de polímeros y entregar datos cuantitativos sobre los elementos que lo componen [77].

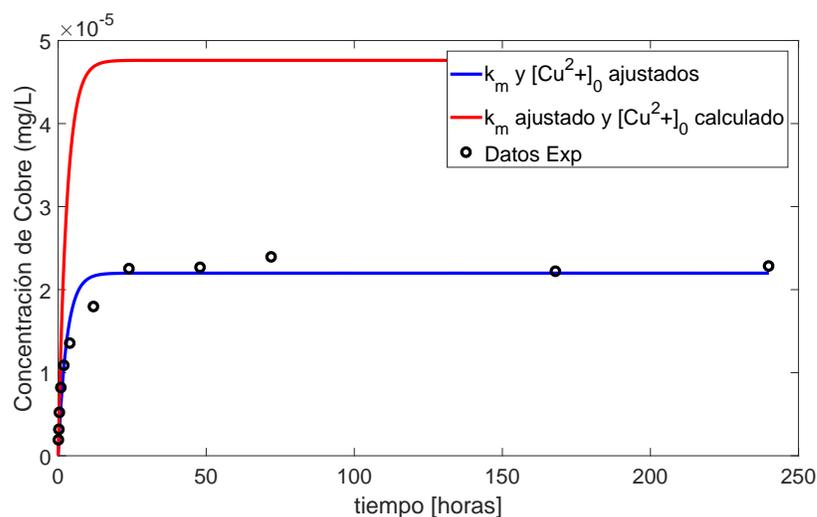


Figura 5.9: Ajuste de modelo de lixiviación con control de disolución para membranas de oligómero de cobre utilizando la constante de disolución ajustada y comparando el caso con masa calculada a partir de los datos de EDX (línea roja) y ajustada con el modelo (línea azul)

El otro parámetro ajustado del modelo corresponde a la constante de disolución asociada a la membrana. Este parámetro está asociado a la velocidad de reacción, indicando cuánto tiempo la curva tarda en alcanzar el estado estacionario. Esto quiere decir que mientras más pequeño sea este constante, más lento se liberarán iones de la membrana. Esto será discutido más adelante cuando se vea la relevancia de la vida útil del cobre en las membranas y se compare con el caso de las modificaciones con nanopartículas. Revisando los ajustes se puede observar que la constante ajustada al utilizar la masa inicial calculada a partir de los datos de EDX es mucho menor que en el caso de ajuste de ambos parámetros. Sin embargo, esto se debe al proceso de ajuste que busca minimizar el error cuadrático medio (ECM) entre la curva de ajuste y los datos experimentales mediante cambios en los parámetros libres. En el primer caso, al estar la masa inicial fija, la función sólo puede variar la constante de disolución  $k_m$  hasta encontrar un mínimo entre la diferencia entre datos experimentales y modelos. Debido

a que el estado estacionario de la curva depende de la masa inicial, el variar únicamente la constante de disolución no permite un ajuste correcto, por lo cual la  $k_m$  asociada a este no logra representar los datos experimentales encontrados. Esto se puede comprobar si usamos la constante obtenida del ajuste de los 2 parámetros ( $[Cu^{2+}]_0$  y  $k_m$ ) con la masa calculada (ver Figura 5.9), en donde se observa que la forma de la curva se ajusta mejor pero se alcanza un estado estacionario mucho mayor dado por el equilibrio entre iones y masa restante en membrana.

Debido a la relevancia vista de la masa de cobre efectivo en membrana, y debido a que no existían datos de la cantidad de nanopartículas en las otras membranas modificadas, el modelo de lixiviación por disolución fue utilizado para estimar la masa inicial de nanopartículas en las otras 2 membranas del experimento y fue utilizada para hacer el ajuste de parámetros al modelo de núcleo sin reaccionar que será presentado más adelante. Los valores de masa inicial obtenidos mediante el ajuste se presentan en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4: Masa inicial de cobre en experimentos con NPs ajustado mediante modelo de lixiviación por disolución

Membrana	$[Cu^{2+}]_0$ [mg]
(PA+0.25 %Cu-NPs)/PA	2.54
(PA+0.25 %CuO-NPs)/PA	4.20

En el Anexo 7.6 se muestran los ajustes realizados con el modelo de lixiviación por disolución para ambas nanopartículas a partir del cual se obtuvo la masa inicial de cobre.

### 5.3.2. Modelo para nanopartículas

Para el modelo de liberación de iones de nanopartículas se utiliza el modelo de núcleo sin reaccionar. Este es un modelo de cinética heterógena donde una partícula esférica inmersa en un fluido reacciona (ver Figura 5.10). Típicamente se tiene un medio acuoso (A) en que se ve inmersa la partícula sólida (B), donde la reacción que ocurre da dos productos, un fluido (C) y un sólido (D). Este último se le conoce también como “ceniza” y es poroso, el cual se va acumulando en la partícula a medida que esta se consume y el núcleo se hace más pequeño. Dependiendo de las características del proceso, esta capa de ceniza puede ir limitando la difusión del reactivo (A) al núcleo haciendo más lenta la disolución con el paso del tiempo, hasta agotar completamente la partícula [78, 79].

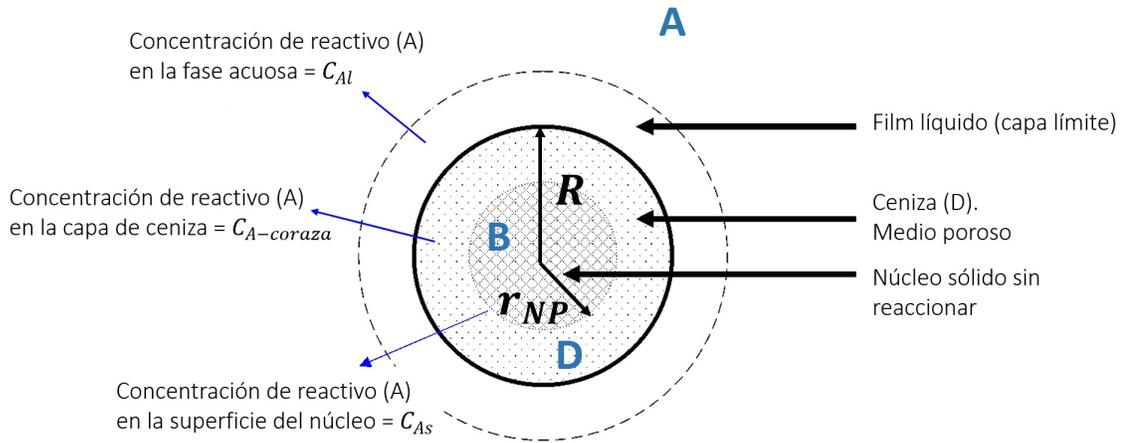


Figura 5.10: Esquema de modelo de núcleo sin reaccionar. El medio acuoso A reacciona con la nanopartícula de radio inicial  $R$ , cuyo núcleo (B) va disminuyendo de tamaño en el tiempo. En el proceso se forma una capa de ceniza (D) sobre la nanopartícula producto de la reacción. Adaptado de [78]

Para el caso de estudio, la partícula sólida corresponde a la nanopartícula correspondiente, el agente lixivante corresponde a los protones del agua  $H^+$  y el producto C liberado corresponde al ión cúprico  $Cu^{2+}$ . El producto sólido D puede asociarse a varios fenómenos, los cuales cambian al considerar las nanopartículas en solución o cuando se encuentran embebidas en la membrana de osmosis reversa. Una de las razones, asociadas en particular a las nanopartículas de cobre elemental, corresponde a la oxidación de las NPs. Las nanopartículas de cobre son altamente sensibles al oxígeno, por lo cual se oxidan con facilidad [22, 71, 80]. Típicamente se utilizan medios no-acuosos o en condiciones atmosféricas libres de oxígeno en la síntesis y uso de estas nanopartículas para evitar su oxidación. También se ha reportado que NPs de pequeño tamaño (5.1nm) confeccionadas con sales de amonio como ligando de superficie son capaces de mantenerse en medios acuosos estables por meses [22]. Sin embargo, las nanopartículas utilizadas en estos experimentos son de un tamaño superior (alrededor de 25nm para el caso de las Cu-NPs según proveedor) y no poseen agentes surfactantes o estabilizadores, por lo cual las Cu-NPs son propensas a oxidarse. Otro fenómeno asociado a la limitación de la liberación de iones por parte de las NPs en solución corresponde a la aglomeración. Como ya se discutió en secciones anteriores, las NPs tienden a formar agregados lo cual disminuye la superficie efectiva de contacto de las nanopartículas con el medio acuoso, lo cual explicaría la disminución en su capacidad de liberación de iones.

Por otro lado, cuando las nanopartículas se encuentran inmersas en la capa de poliamida existe una limitación en la liberación de iones asociada al control difusional existente en la capa densa de amidas que limita el traspaso de iones que permitan liberar iones desde las nanopartículas. Si bien no existe claridad respecto a la distribución de las nanopartículas en la membrana, se presume que estas quedan atrapadas en la capa de poliamida, pudiendo existir nanopartículas que se encuentren a un nivel más superficial sobre la membrana, las cuales reaccionan inicialmente liberando iones [12, 14, 81]. Posteriormente, nanopartículas que se encuentren a niveles más profundos en la capa de poliamida pueden reaccionar de forma más tardía y más lentamente, debido al control difusional impuesto por la capa de

poliamida [20, 28, 82].

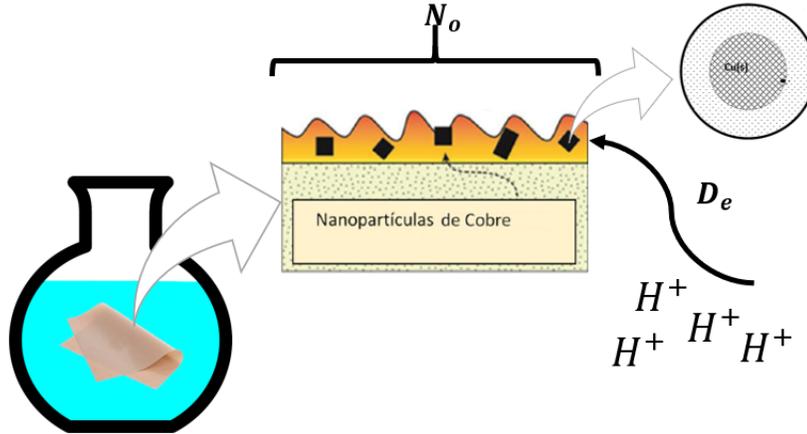


Figura 5.11: Esquema de cinética de liberación de iones en membranas con nanopartículas de cobre. En este caso existe una difusividad efectiva ( $D_e$ ) dada por la capa de poliamida junto con un número aparente de nanopartículas disponibles para liberar iones ( $N_o$ )

El modelo de núcleo sin reaccionar asume que la reacción que se lleva a cabo es elemental y consta de 5 etapas: 1. La difusión de A a través del líquido a la superficie de la coraza de la partícula, 2. La difusión de A desde la superficie porosa de la coraza hasta la superficie del núcleo de la NP, 3. La reacción química en la superficie del núcleo para formar el producto C y la ceniza (que genera la coraza), 4. Difusión del producto C desde la superficie del núcleo hacia la superficie de la capa de ceniza y, por último, 5. la difusión del producto C a través del film líquido hacia el medio en que se encuentra inmersa la NP [78, 83]. Dado que las etapas 2 y 4, al igual que 1 y 5 son similares, para determinar cual es la etapa limitante se analizan únicamente 3 casos: la difusión de A a través del film líquido, la difusión de A a través de la capa de ceniza y la reacción química de A en la superficie del núcleo. En condiciones pseudo-estacionarias, se cumple que estas 3 etapas presentan magnitudes de flujos similares, es decir:

$$k_l(C_{Al} - C_{A-coraza}) \cdot 4\pi R^2 = \frac{D_e}{\frac{1}{r_{NP}} - \frac{1}{R}} \cdot (C_{A-coraza} - C_{As}) \cdot 4\pi = k_s C_{As} \cdot 4\pi r_{NP}^2 \quad (5.8)$$

Donde  $C_{Al}$ ,  $C_{A-coraza}$  y  $C_{As}$  corresponden a la concentración del reactivo A en el líquido, en la superficie de la coraza y en la superficie del núcleo sólido, respectivamente [78, 84].  $k_l$  corresponde a la constante de difusividad en el líquido,  $D_e$  es la difusividad efectiva a través de la capa de ceniza y  $k_s$  es la constante de reacción de A en el núcleo sólido. Finalmente, se asume que la nanopartícula tiene un radio de núcleo sólido inicial R, mientras que  $r_{NP}$  corresponde al radio del núcleo en el tiempo (esto quiere decir que en  $t = 0$  se tiene que  $r_{NP} = R$ ). Como ya se mencionó, la capa de poliamida impone un control difusional sobre las nanopartículas en su capacidad de liberar iones, el cual además se ve influenciado por el

agotamiento de estas en el tiempo y por la posibilidad de tener nanopartículas a distintos niveles en la capa de poliamida, por lo cual se considera que esta es la etapa limitante de la reacción, equivalente a la capa de “ceniza” en el modelo de núcleo sin reaccionar. Para ello, se asume que la difusividad efectiva a través de la capa porosa es mucho menor que la constante de difusión en el líquido y que la constante de reacción ( $D_e \ll k_l, k_s$ ) [84]. Con esto, la cantidad de iones que difunden a la nanopartícula (por unidad de tiempo), es igual a la cantidad de iones reaccionando en la superficie del núcleo para cualquier radio restante de la nanopartícula (es decir, para cualquier  $r_{NP}$ ) [78, 85, 86]. Usando la Ley de Fick se tiene que:

$$\frac{-dN_{H^+}}{dt} = D_e \cdot \frac{\delta[H^+]}{\delta r} \cdot 4\pi r_{NP}^2 \quad (5.9)$$

Donde  $N_{H^+}$  y  $[H^+]$  corresponden al flujo molar y a la concentración de iones hidrógeno en la solución (el cual se obtiene conociendo el pH del medio), respectivamente. Reordenando e integrando se llega a la siguiente expresión:

$$\frac{-dN_{H^+}}{dt} = \frac{4\pi D_e \cdot ([H^+]_{PA} - [H^+]_s)}{\frac{1}{r_{NP}} - \frac{1}{R}} \quad (5.10)$$

Donde se ha reemplazado las concentraciones del reactivo A por la concentración de iones en la superficie de la capa de poliamida y en la superficie de la nanopartícula para el caso de estudio. Dado que a medida que la nanopartícula reacciona se hace más pequeña, la difusión de iones cambia con el tiempo. Además, ya que la difusión a través de la capa de poliamida se ha considerado como la etapa limitante, la concentración de iones en la superficie del sólido ( $[H^+]_s$ ) es despreciable y la concentración de iones en el líquido se puede asumir igual a la concentración en la capa de poliamida ( $[H^+]_l = [H^+]_{PA}$ ). Por tanto:

$$\frac{4\pi D_e \cdot ([H^+]_{PA} - [H^+]_s)}{\frac{1}{r_{NP}} - \frac{1}{R}} \simeq \frac{4\pi D_e [H^+]_l}{\frac{1}{r_{NP}} - \frac{1}{R}} \quad (5.11)$$

Para determinar la pérdida de masa desde las nanopartículas, es necesario obtener la tasa de reacción del núcleo sólido. Este se obtiene mediante un balance de masa a la nanopartícula:

$$\frac{dN_{NP}}{dt} = \frac{d(\rho_{NP} V_{NP})}{dt} = \frac{\rho_{NP} d(4/3\pi r_{NP}^3)}{dt} = \rho_{NP} \cdot 4\pi r_{NP}^2 \frac{dr_{NP}}{dt} \quad (5.12)$$

Donde se asume una nanopartícula esférica de densidad  $\rho_{NP}$  constante en el tiempo (si bien la nanopartícula se vuelve más pequeña, su núcleo no sufre cambios en la densidad). Finalmente, se tiene que la tasa de consumo de iones es igual a la tasa de consumo o desgaste de la nanopartícula ( $dN_H^+/dt = dN_{NP}/dt$ ). Combinando las ecuaciones 5.11 y 5.12 se obtiene:

$$\frac{dr_{NP}}{dt} = -\frac{D_e [H^+]}{\rho_{NP}} \cdot \frac{1}{r_{NP} - \frac{r_{NP}^2}{R}} \quad (5.13)$$

$$\frac{dN_{Cu}}{dt} = \rho_{NP} 4\pi r_{NP}^2 \frac{dr_{NP}}{dt} \cdot N_o \quad (5.14)$$

El modelo usado en este proyecto se centra en estas 2 últimas ecuaciones diferenciales. La ecuación 5.13 corresponde a la disminución del radio de la nanopartícula ( $r_{NP}$ ) en el tiempo. Este núcleo disminuye en tamaño a medida que iones se liberan y/o la nanopartícula queda más atrapada en la capa de poliamida de su alrededor (ver Figura 5.10).  $D_e$  corresponde a la constante de difusión de iones a través de esta capa porosa. Para simplificación del modelo, se considera como una única constante pese a la existente de varios medios que cumplen la función de capa porosa asociados a los fenómenos previamente planteados. Se observa que el radio de la nanopartícula disminuye más lentamente a medida que esta se hace más pequeña.

La ecuación 5.14 corresponde a la variación de masa desde la NP en el tiempo, entendido también como la cantidad de iones liberados hacia el medio desde las nanopartículas. Esta es proporcional al área de la esfera y a la variación del radio de la nanopartícula. Debido a que el control difusional provoca que el radio de la nanopartícula disminuya de manera más lenta en el tiempo, lo mismo ocurre con la liberación de iones, la cual aumenta de manera logarítmica hasta alcanzar un estado estacionario. Debido a que la ecuación de liberación de iones considera el efecto dado por una única nanopartícula, se agregó el término  $N_o$  correspondiente al número aparente de nanopartículas presentes en el experimento.

Para el ajuste del modelo se consideró la masa inicial calculada a partir del modelo de lixiviación utilizado en la sección anterior (ver Tabla 5.4) y se ajustaron la constante de difusión  $D_e$  y el número aparente de nanopartículas  $N_o$  para los experimentos con NPs de cobre elemental y óxido de cobre, tanto en suspensión como en membrana. Los datos experimentales ajustados corresponde a la disminución de masa en las nanopartículas comprendidas como la resta entre la masa inicial de cobre obtenida desde el modelo de lixiviación y la medición de cobre obtenida en por el equipo de absorción atómica en las pruebas experimentales.

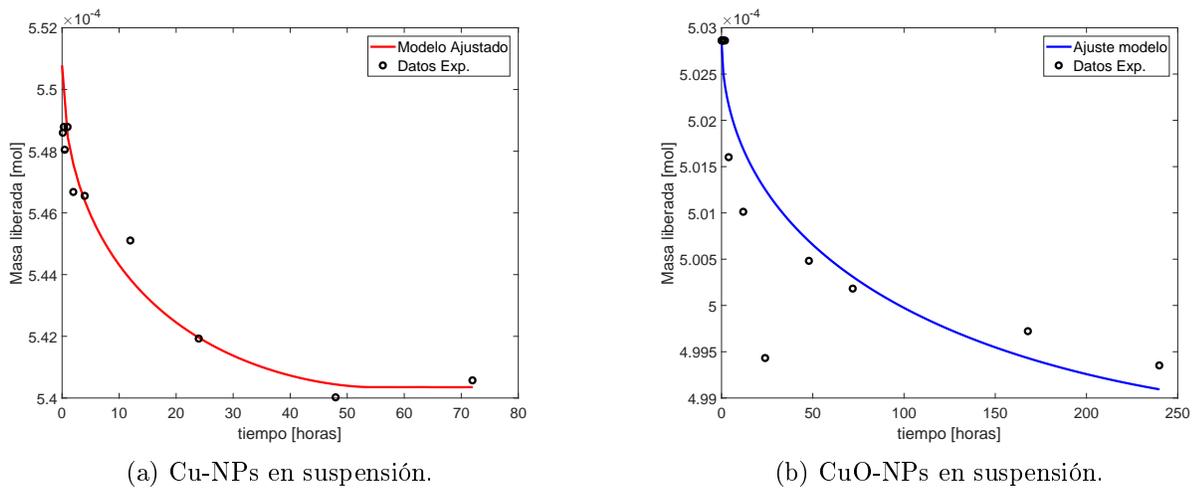
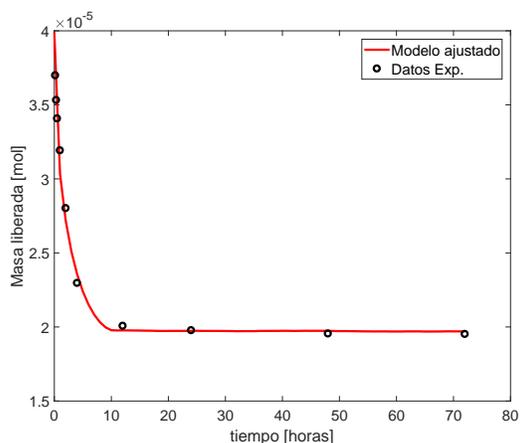
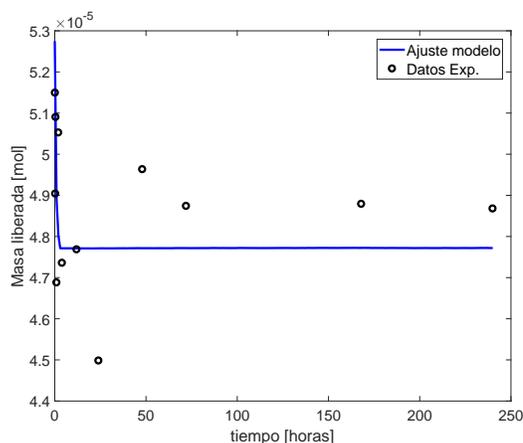


Figura 5.12: Ajuste de modelo de núcleo sin reaccionar para nanopartículas de cobre elemental (a) y óxido de cobre (b) en suspensión. El eje  $y$  de los gráficos corresponde a la pérdida de masa de cobre desde las NPs (en moles).



(a) Cu-NPs en membrana.



(b) CuO-NPs en membrana.

Figura 5.13: Ajuste de modelo de núcleo sin reaccionar para nanopartículas de cobre elemental (a) y óxido de cobre (b) en membrana.

Los parámetros del modelo ajustado se presentan en la Tabla 5.5. De estos se obtuvo que las nanopartículas en membranas presentan una menor constante de difusión ( $D_e$ ) que en el caso que se encuentran en suspensión. Esto refuerza el hecho de que las nanopartículas en membrana liberan iones a una mayor tasa que en suspensión (ver Figuras 5.12, 5.13). Para confirmar esto, se calculó la pendiente de la curva de pérdida de masa desde las NPs en las primeras 12 horas, la cual se muestra en la última columna de la tabla. Se ve que, tanto en el caso de las nanopartículas de cobre elemental como óxido de cobre, la tasa de liberación de iones es mayor cuando se encuentran en membrana que en suspensión. Una posible razón para explicar este fenómeno corresponde a que las nanopartículas en membrana se reparten de manera más homogénea a lo largo de la superficie de la membrana, reduciendo o eliminando así la aglomeración que ocurre cuando están en suspensión. Sin embargo, estudios por microcopia electrónica de barrido han mostrado que las NPs en membrana también tienden a aglomerarse en zonas de la membrana, por lo cual habría que determinar que tan grande es la aglomeración de las nanopartículas en suspensión en comparación a la que se tiene en membrana.

Otra posible explicación que explica la mayor liberación de iones en membrana corresponde a posibles cambios químicos que puede sufrir la nanopartícula debido a las interacciones con el polímero de la membrana de OR. La fuerza iónica, pequeñas variaciones en el pH asociadas a las membranas como las observadas en el caso de estudio del cobre elemental o posibles ligandos orgánicos pueden acelerar el proceso de disolución [53]. Este efecto supone que la capa densa de poliamida impone una menor resistencia a la difusión que la provocada por la aglomeración de las nanopartículas, las cuales además sufren modificaciones en su estructura química, explicando la mayor tasa de liberación en membrana.

Tabla 5.5: Parámetros modelo ajustado de núcleo sin reaccionar para experimentos con nanopartículas

Membrana	$D_e$	$N_o$	$\Delta\phi/\Delta t$
<b>Cu-NPs en solución</b>	$2.73 \cdot 10^{-11}$	$1.13 \cdot 10^{+12}$	$5.78 \cdot 10^{-7}$
<b>(PA+0.25 %Cu-NPs)/PS</b>	$1.43 \cdot 10^{-8}$	$2.19 \cdot 10^{+12}$	$4.43 \cdot 10^{-5}$
<b>CuO-NPs en solución</b>	$9.21 \cdot 10^{-10}$	$9.62 \cdot 10^{+10}$	$9.79 \cdot 10^{-8}$
<b>(PA+0.25 %CuO-NPs)/PS</b>	$1.09 \cdot 10^{-7}$	$1.21 \cdot 10^{+11}$	$4.20 \cdot 10^{-7}$

Un resultado interesante de analizar a partir del modelo corresponde al tiempo de vida de una nanopartícula. Con la obtención del parámetro  $D_e$ , la ecuación 5.13 es capaz de predecir el tiempo en que el radio de la nanopartícula se anula ( $r_{NP} = 0$ ), lo cual da una estimación del tiempo que duran las nanopartículas en solución, entendido como el agotamiento total de su núcleo capaz de generar reacción química. En la Figura 5.14 se presentan las simulaciones de los tiempos de vida de las NPs realizadas con los parámetros ajustados previamente a los datos experimentales, manteniendo el resto de condiciones utilizadas en las pruebas. Para el caso de las nanopartículas en suspensión (Figura 5.14a), se puede apreciar que las nanopartículas de cobre elemental tienen un tiempo de vida mucho más corto que las nanopartículas de óxido de cobre. Estudios previos en donde se midió el tiempo de vida de nanopartículas de cobre elemental bajo distintas condiciones arrojaron resultados similares a los obtenidos con la simulación aquí realizada [62]. Una posible explicación para la diferencia obtenida en los tiempos de vida corresponde al diferente radio de las NPs utilizadas (25 nm. las de cobre elemental y 50 nm. las de óxido de cobre). Esto conlleva que exista una mayor cantidad de cobre disponible en la nanopartícula de mayor tamaño, por lo cual se requiere más tiempo para que esta se agote completamente.

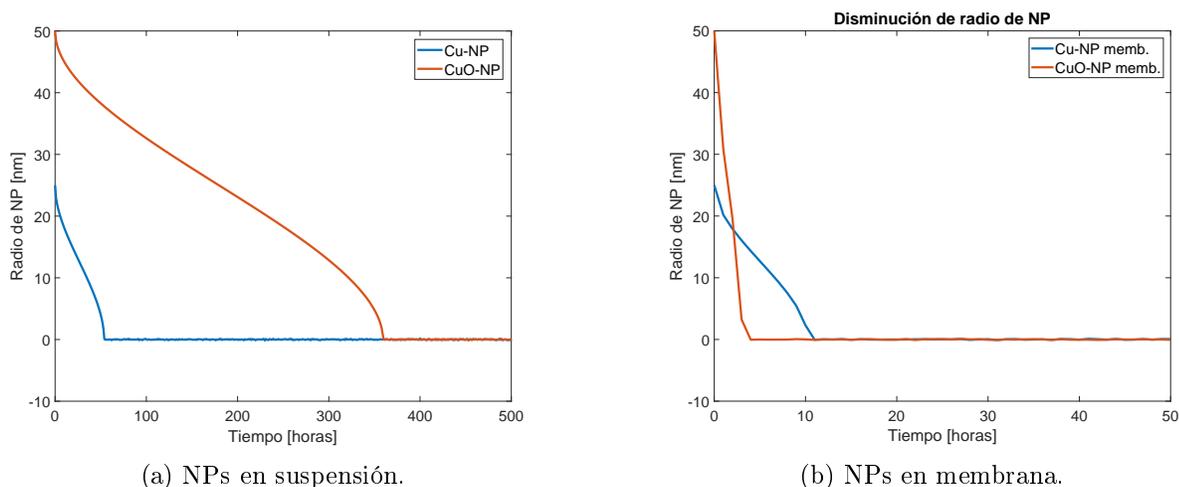


Figura 5.14: Tiempo de vida de las nanopartículas de cobre elemental y óxido de cobre en suspensión (a) y en membrana (b).

Las nanopartículas en membrana, en contraste, poseen un tiempo de vida mucho más bajo que en suspensión (Figura 5.14b). Esto puede estar asociada a varias razones. La primera corresponde a las ya mencionadas posibles modificaciones químicas que puede sufrir la nanopartícula en la membrana. Otra posible explicación corresponde al posible agotamiento del

cobre efectivo en la membrana, el cual se encuentra en la capa más superficial de la capa de poliamida, lo que provoca que se agote rápidamente, mientras que el resto de cobre presente en la membrana no está disponible para disolución. Es necesario evaluar como responde esta concentración de cobre en un sistema de osmosis reversa. Existen modelos que simulan la fluido-dinámica de los sistemas de osmosis reversa desarrollados en programas de simulación como COMSOL [87, 88]. A estas simulaciones se podrían añadir las cinéticas de liberación de iones en las membranas de manera de estimar el tiempo de vida útil del cobre en las membranas.

### 5.3.3. Conexión entre modelos

De manera de relacionar las modificaciones de cobre estudiadas entre sí con sus efectos biocidas mediados por liberación de iones y poder responder que membrana modificada presenta el mejor desempeño biocida respecto a su tasa de liberación de iones, es necesario conectar los modelos de lixiviación por disolución y el modelo de núcleo sin reaccionar, generando un parámetro que unifique sus respectivos ajustes y pueda hacer comparables sus efectos. Para esto, se analiza en detalle el balance de masa planteado para cada uno de los modelos (ver Anexo 7.7). Al realizar ambos balances en la tasa de liberación de iones se encontró la siguiente relación entre las constantes de ambos modelos:

$$k_m = \frac{D_e \cdot N_o \cdot R}{S} \quad (5.15)$$

Donde  $k_m$  corresponde a la constante de disolución del modelo de lixiviación,  $D_e$  y  $N_o$  corresponden a la difusividad efectiva y el número aparente de nanopartículas ajustados en el modelo de núcleo sin reaccionar.  $R$  corresponde al radio inicial de las nanopartículas obtenido a partir de las fichas técnicas de los mismos y  $S$  el área de las membranas utilizadas en el experimento [89, 90]. Los parámetros calculados a partir de la ecuación 5.15 se presentan en la Tabla 5.6. Como se puede observar, las membranas modificadas con nanopartículas presentan una constante de disolución mayor que el oligómero de cobre, lo que se conecta con una mayor tasa de liberación de iones y su rápida pérdida del cobre disponible disolverse en la membrana. Este resultado sugiere que las membranas modificadas con el oligómero de cobre tendrían una vida útil mayor que las membranas modificadas con nanopartículas.

Tabla 5.6: Parámetro de liberación de iones

Membrana	$k_m$ [m/s]
PA/PS	0
(PA+0.25 %Cu-NPs)/PS	$4.74 \cdot 10^{-2}$
(PA+0.25 %CuO-NPs)/PS	$4.01 \cdot 10^{-2}$
(PA+0.25 %Cu-MPD)/PS	$1.04 \cdot 10^{-2}$

## 5.4. Propuesta de modelo anti-biofouling

Luego de los resultados experimentales obtenidos y la discusión realizada en torno a los modelos de liberación de iones, se busca una forma de relacionar la capacidad biocida de

cada membrana, expresada en términos de los indicadores de viabilidad calculados, con los parámetros de liberación de iones. Esta relación utiliza los parámetros de la Tabla 5.7 donde se presenta el indicador de viabilidad de inhibición de crecimiento bacteriano junto al parámetro de disolución y la masa inicial de cobre disponible para cada membrana. Como ya se comentó previamente, en este proyecto se introdujo el concepto de masa disponible de cobre en membrana, el cual tiene directa relación con la capacidad de liberación de iones de la misma. Debido a que en membrana, la capacidad biocida de las NPs corresponde en gran medida a la liberación de iones, en este modelo se asume que la capacidad inhibitoria alcanzado corresponde únicamente a ese parámetro. Al desarrollar en mayor profundidad el modelo más adelante, será necesario separar los efectos de liberación de iones de las nanopartículas con su capacidad de muerte por contacto, de manera de también considerar estos efectos en el modelo anti-biofouling. Una manera corresponde a una metodología utilizada por Karkhanechi et al., el cual cultivó bacterias en conjunto con nanopartículas de plata. Paralelamente, desarrolló una experimento en que dejó que las NPs se disolvieran, para luego eliminar las nanopartículas y quedarse con la solución la cual fue agregada a un cultivo bacteriano idéntico al de su otras pruebas [15]. Finalmente, la diferencia de muerte entre ambos cultivos correspondía al porcentaje de muerte por contacto directo con las NPs.

El modelo aquí propuesto sigue una cinética michaeliana dependiente de la concentración de cobre en membrana, la cual se relaciona con la inhibición de crecimiento de bacterias (ver Ecuación 5.16).

Tabla 5.7: Parámetros biocidas y de liberación de iones para cada membrana

Membrana	I [%]	$k_m$ [m/s]	$m_i$ [g]
PA/PS	0	0	0
(PA+0.25 %Cu-NPs)/PS	$56 \pm 4.84$	$4.74 \cdot 10^{-2}$	2.54
(PA+0.25 %CuO-NPs)/PS	$58 \pm 4.75$	$4.01 \cdot 10^{-2}$	4.24
(PA+0.25 %Cu-MPD)/PS	$54.1 \pm 0.83$	$1.04 \cdot 10^{-2}$	2.79

$$I[\%] = \frac{[Cu]}{K^B(k_m) + [Cu]} \cdot 100 \quad (5.16)$$

Se puede observar que en el modelo, ante una concentración elevada de cobre, alcanza la capacidad máxima de inhibición del 100 %. Por otro lado, el factor  $K^B$  corresponde al valor de concentración de cobre necesario para lograr una inhibición del 50 %, el cual depende del tipo de modificación de cobre estudiado. Mientras más bajo sea el valor de esta constante, se requiere una menor concentración de cobre para alcanzar una inhibición elevada. Este parámetro depende de una serie de características de las membranas modificadas. Uno de ellos corresponde al término de disolución  $k_m$  calculado en la sección anterior. Al ser este un modelo preliminar, y al no contar con mayores datos experimentales que permitan separar el resto de mecanismos biocidas de las membranas, se considera en esta primera aproximación como el parámetro que define la constante biocida asociada al modelo anti-biofouling. Esto sugiere, en base al planteamiento del modelo y los parámetros presentados en la Tabla 5.7, que la membrana de oligómero de cobre corresponde a la que requiere una menor concentración de iones para lograr un efecto biocida elevado, en comparación a las nanopartículas.

$$K^B = A \cdot k_m + B \cdot k_c \quad (5.17)$$

Ahora bien, cuanto este modelo considere otros mecanismos, los cuales, al ser cuantificados mediante protocolos experimentales actualizados, esta constante puede sufrir modificaciones. En particular, los 2 mecanismos biocidas principales expuestos en este proyecto, la liberación de iones y la muerte por contacto directo con las NPs de cobre, expresados como una constante asociada a su influencia biocida ( $k_m$  y  $k_c$ , respectivamente), se considera influyen de manera lineal en esta constante (ver ecuación 5.17) como primera aproximación a su relación con la tasa de inhibición. Por otro lado, debido a que los reportes previos indican que la influencia de la liberación de iones es superior al mecanismos de contacto directo cuando las nanopartículas se encuentran en membrana, existe un peso asociado a cada una de las características, expresado como las constantes  $A$  y  $B$  en la ecuación [15, 19, 52]. De esta manera, se obtiene un modelo para expresar la capacidad anti-biofouling de membranas modificadas con nanopartículas. En caso de cambiar el tipo de nanopartículas, o el tipo de microorganismos a evaluar, el modelo mantendrá su validez, con sus respectivas constantes obtenidas en base a la línea experimental seguida.

# Capítulo 6

## Conclusiones

La bio-incrustación en membranas de osmosis reversa es una problemática grave en sistemas de desalinización de agua. En los últimos años se ha estudiado su mitigación mediante la modificación de las membranas con nanopartículas metálicas. En particular, este proyecto se enfocó en membranas modificadas con distintos tipos de cobre, una nanopartícula de cobre elemental, otra de óxido de cobre y una membrana modificada con una sal de cobre *in situ*, donde se identificaron y estudiaron sus mecanismos biocidas clásicos, para luego realizar pruebas experimentales que permitan ver sus efectos tóxicos sobre un microorganismo modelo, como lo fue en este caso la *Escherichia coli*. Se realizaron pruebas experimentales para medir la liberación de iones desde los distintos tipos de cobre, tanto en suspensión como en membrana. Además se hicieron pruebas en las mismas condiciones pero en conjunto con el microorganismo modelo de *E. Coli*, de manera de obtener indicadores sobre la capacidad biocida de las membranas en estudio. Se ajustaron 2 modelos para describir la cinética de liberación de iones de cobre desde las distintas las membranas, los cuales luego fueron conectados para hacer comparables los distintos tipos de cobre. Finalmente, se propuso un modelo anti-*biofouling* que conecta la capacidad de liberación de iones de cada membrana con su nivel biocida.

Ambos modelos de liberación de iones implementados lograron una buena correlación con los datos experimentales obtenidos, además de incluir los parámetros asociados a los factores claves dentro de la toxicidad de las NPs, como lo son la concentración, la solubilidad y el pH. Dentro de esto, cuando se esta considerando la membrana modificada, la carga efectiva de nanopartícula demostró ser un concepto clave para evaluar la capacidad biocida de las membranas. Si bien los resultados obtenidos no permiten dilucidar si la masa inicial de cobre estimada a partir del modelo de lixiviación corresponde a todo el cobre en membrana o al cobre disponible para liberar iones, este factor permite evaluar la vida útil de la membrana modificada, lo cual es un aspecto fundamental de cara a escalar el proceso y la tecnología en desarrollo para su uso comercial.

Por otro lado, el modelo de núcleo sin reaccionar permite, a partir de la caracterización de las nanopartículas utilizadas y del medio utilizado, predecir el comportamiento de disolución al cambiar condiciones tales como la carga y tipo de nanopartículas en membrana, o los efectos sufridos al cambiar el tipo de material con la que se trabajan en membrana, o las

condiciones de pH y temperatura del medio. Esto cumple con los objetivos planteados, dado que suple la necesidad de desarrollar un modelo matemático que describa el mecanismo biocida de liberación de iones desde las nanopartículas en la membrana de osmosis reversa, lo que permite evaluar y optimizar parámetros asociados a la misma.

En cuanto a las pruebas biocidas y los indicadores de viabilidad obtenidos, las membranas modificadas con nanopartículas alcanzaron niveles biocidas ligeramente superiores a las membranas modificadas con el oligómero de cobre. Sin embargo, estas diferencias no son suficientemente significativas para mostrar, por sí solas, una tendencia en la capacidad tóxica de las modificaciones en estudio. Ahora bien, el protocolo biocida llevado a cabo contempló un seguimiento de la viabilidad de las células por un tiempo mayor al utilizado en los protocolos previos de AMTC, lo cual permitió observar la incidencia de la capacidad tóxica de las distintas modificaciones con cobre en la cinética de crecimiento de *E. coli*. Este resultado es de suma importancia para, en desarrollos futuros, asociar la vida útil del cobre en membrana con la durabilidad de su capacidad biocida y optimizar así parámetros de diseño en las membranas modificadas.

Con respecto al modelo anti-*biofouling* propuesto, se planteó una posible relación entre la capacidad biocida de las membranas modificadas con su parámetro de liberación de iones, considerado el mecanismo biocida predominante de las nanopartículas en membranas. Este modelo sugiere que la modificación con el oligómero de cobre (Cu-MPD) entregarían el mayor poder biocida sin utilizar una alta parte de su carga efectiva de cobre, lo cual implica que cuentan con una vida útil superior a las membranas modificadas con nanopartículas (Cu-NPs y CuO-NPs). Sin embargo, se deben realizar más pruebas de manera de validar este modelo, además de separar otros posibles efectos biocidas faltantes (como la muerte por contacto), que pueden cambiar los valores obtenidos en este proyecto, antes de elegir una modificación preponderante. Por otro lado, esta metodología y modelo planteado puede ser utilizado a futuro para describir fenomenologías que busquen dar una relación entre el fenómeno química observado en la disolución de nanopartículas metálicas con el efecto biológico asociado, considerando el variado rango de aplicación de las nanopartículas en usos médicos e industriales, como por ejemplo su disolución en el organismo cuando actúan como *carriers* de proteínas.

Durante este proyecto se mencionaron los factores claves asociados a la capacidad tóxica de las nanopartículas. Sin embargo, no se llevaron pruebas a cabo que variaran otros parámetros que no fuera el tipo de cobre utilizado. Será necesario a futuro obtener datos experimentales que sean capaces de validar los fenómenos que pueden ser predecidos por el modelo descrito y acoplarlo a otros posibles modelos existentes que permitan describir la fluido-dinámica de un sistema de osmosis reversa, de manera de observar sus efectos en un régimen continuo y con presiones elevadas.

Es así como, siguiendo la línea de motivación del proyecto planteada al inicio, se ha logrado una primera aproximación a la modelación de la capacidad anti-*biofouling* de las membranas modificadas estudiadas. Se plantearon modelos que describen la cinética de liberación de iones y se conectaron con la capacidad biocida mostrada por las distintas modificaciones de cobre. Además, es posible extrapolar el modelo para evaluar nuevas condiciones o simular el comportamiento de las membranas modificadas de cara al escalamiento del proceso.

## 6.1. Recomendaciones

En base a la línea experimental llevada a cabo, y los modelos planteados en este proyecto, es posible plantear una serie de recomendaciones para el futuro desarrollo del proyecto y otros posibles estudios asociados a la evaluación de la capacidad biocida de las nanopartículas de cobre en membranas modificadas de osmosis reversa:

- Trabajar con menores volúmenes en los protocolos experimentales, tanto para caracterizar otros mecanismos de las membranas modificadas, como al ver su impacto sobre un microorganismos. Esto reducirá errores experimentales asociadas a variables tales como el control de agitación y temperatura, además de permitir un mejor manejo de las muestras previo a mediciones.
- Evaluar la carga efectiva de cobre en las membranas mediante algún análisis elemental como los comentados en secciones previas. De esta manera se podrá determinar si efectivamente existe parte del cobre en membrana que no esta disponible para liberar iones.
- Realizar una caracterización de las nanopartículas en membrana con técnicas de espectroscopia de manera de evaluar la posible modificación química de éstas cuando interactúan con la capa de poliamida en la membrana de osmosis reversa, de manera de evaluar posibles modificaciones como recubrimientos a las nanopartículas que permitan optimizar su utilidad y tiempo de vida útil en membrana.
- Desarrollo de protocolos para evaluar otros factores clave en la capacidad biocida de las nanopartículas (ej.: tamaño). Esto incluye el desarrollo futuro del proyecto que incluye la síntesis de nanopartículas propias, lo cual permitiría una evaluación más profunda para definir parámetros de diseño adecuados previo a escalar el proceso.
- Los protocolos biocidas para la evaluación de la toxicidad de membranas deben considerar tiempos de prueba más largos, de manera de poder diferenciar los posibles efectos biocidas a largo plazo en las modificaciones de membrana. Pruebas de mayor duración también permiten ver diferencias más marcadas entre las distintas modificaciones, de manera de facilitar el proceso de optimización en el diseño de las membranas modificadas.

# Bibliografía

- [1] R. Singh y N. Hankins. *Emerging membrane technology for sustainable water treatment*. Holanda. Elsevier, 2016.
- [2] B. Garcia A. Rodriguez y D. Ozturk. *Membrana compuesta de capa fina (TFC) para osmosis inversa que comprende un soporte de polisulfona y una poliamida, caracterizada porque dicha membrana posee oligomeros de cobre (Cu-PoliMPD) auto-ensamblados in situ en la capa de poliamida durante la polimerización interfacial*. Patente de Invención. Patente No. 201601310: INAPI, 2016.
- [3] Farhat y col. “Application of monochloramine for wastewater reuse: Effect on biostability duriu transport and biofouling in RO membranes”. En: vol. 551. Elsevier Science BV, Holanda, 2018, págs. 243-253.
- [4] Baikun Li y Bruce E Logan. “Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces”. En: vol. 36. 2. Elsevier, 2004, págs. 81-90.
- [5] Thang Nguyen, Felicity A Roddick y Linhua Fan. “Biofouling of water treatment membranes: a review of the underlying causes, monitoring techniques and control measures”. En: vol. 2. 4. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2012, págs. 804-840.
- [6] JS Baker y LY Dudley. “Biofouling in membrane systems—a review”. En: vol. 118. 1-3. Elsevier, 1998, págs. 81-89.
- [7] Harry Ridgway y col. “Biofouling of membranes: Membrane preparation, characterization, and analysis of bacterial adhesion”. En: *Methods in enzymology*. Vol. 310. Elsevier, 1999, págs. 463-494.
- [8] Guo-dong Kang y Yi-ming Cao. “Development of antifouling reverse osmosis membranes for water treatment: a review”. En: vol. 46. 3. Elsevier, 2012, págs. 584-600.
- [9] Estelle Rascol, Jean-Marie Devoisselle y Joël Chopineau. “The relevance of membrane models to understand nanoparticles–cell membrane interactions”. En: vol. 8. 9. Royal Society of Chemistry, 2016, págs. 4780-4798.
- [10] Valeria Matranga e Ilaria Corsi. “Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches”. En: vol. 76. Elsevier, 2012, págs. 32-40.
- [11] Eleonore Fröhlich. “The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles”. En: vol. 7. Dove Press, 2012, pág. 5577.
- [12] A García y col. “Incorporation of CuO nanoparticles into thin-film composite reverse osmosis membranes (TFC-RO) for antibiofouling properties”. En: Springer, 2017, págs. 1-17.
- [13] A García y col. “Influence of TiO<sub>2</sub> nanostructures on anti-adhesion and photoinduced bactericidal properties of thin film composite membranes”. En: vol. 6. 86. Royal Society of Chemistry, 2016, págs. 82941-82948.

- [14] B Rodríguez y col. “Antibiofouling thin-film composite membranes (TFC) by in situ formation of Cu-(m-phenylenediamine) oligomer complex”. En: vol. 53. 9. Springer, 2018, págs. 6325-6338.
- [15] Hamed Karkhanechi y col. “Improvement of antibiofouling performance of a reverse osmosis membrane through biocide release and adhesion resistance”. En: vol. 105. Elsevier, 2013, págs. 106-113.
- [16] Irina Blinova y col. “Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water”. En: vol. 158. 1. Elsevier, 2010, págs. 41-47.
- [17] VM. Kochkodan y col. “Effect of the surface modification of polymer membranes on their microbiological fouling”. En: vol. 68. 3. Springer, 2006, págs. 267-273.
- [18] Ya-Nan Chang y col. “The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles”. En: vol. 5. 12. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2012, págs. 2850-2871.
- [19] Villem Aruoja y col. “Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*”. En: vol. 407. 4. Elsevier, 2009, págs. 1461-1468.
- [20] Nicola Cioffi y col. “Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties”. En: vol. 17. 21. ACS Publications, 2005, págs. 5255-5262.
- [21] Charlotte M Beddoes, C Patrick Case y Wuge H Briscoe. “Understanding nanoparticle cellular entry: a physicochemical perspective”. En: vol. 218. Elsevier, 2015, págs. 48-68.
- [22] Szu-Han Wu y Dong-Hwang Chen. “Synthesis of high-concentration Cu nanoparticles in aqueous CTAB solutions”. En: vol. 273. 1. Elsevier, 2004, págs. 165-169.
- [23] Sukumaran Prabhu y Eldho K Poulouse. “Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects”. En: vol. 2. 1. Springer, 2012, pág. 32.
- [24] Ivan Sondi y Branka Salopek-Sondi. “Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria”. En: vol. 275. 1. Elsevier, 2004, págs. 177-182.
- [25] Corrine K Thai y col. “Identification and characterization of Cu<sub>2</sub>O- and ZnO-binding polypeptides by *Escherichia coli* cell surface display: toward an understanding of metal oxide binding”. En: vol. 87. 2. Wiley Online Library, 2004, págs. 129-137.
- [26] D Inbakandan y col. “Silver nanoparticles with anti microfouling effect: a study against marine biofilm forming bacteria”. En: vol. 111. Elsevier, 2013, págs. 636-643.
- [27] Rosella Coradeghini y col. “Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts”. En: vol. 217. 3. Elsevier, 2013, págs. 205-216.
- [28] Zhaoqing Yang y col. “Long-term antibacterial stable reduced graphene oxide nanocomposites loaded with cuprous oxide nanoparticles”. En: vol. 533. Elsevier, 2019, págs. 13-23.
- [29] Waldo Sebastián Aracena Pérez. *Modelamiento matemático de la homeostasis de cobre en bacterias*. Memoria (Ingeniería Civil en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2013.
- [30] William L Luyben. *Process modeling, simulation and control for chemical engineers*. McGraw-Hill Higher Education, 1989.
- [31] Alejandra Martins. *¿Puede la desalinización ser la solución para la crisis mundial del agua?* [en línea] BBC Mundo, 22 de Marzo de 2017. URL: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-39332148> (visitado 13-12-2018).
- [32] Michel Vert y col. “Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)”. En: vol. 84. 2. De Gruyter, 2012, págs. 377-410.

- [33] Asif Matin y col. "Biofouling in reverse osmosis membranes for seawater desalination: phenomena and prevention". En: vol. 281. Elsevier, 2011, págs. 1-16.
- [34] H-C Flemming. "Biofouling in water systems—cases, causes and countermeasures". En: vol. 59. 6. Springer, 2002, págs. 629-640.
- [35] Priya Uppuluri y col. "Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle". En: vol. 6. 3. Public Library of Science, 2010, e1000828.
- [36] F. Gladis y col. "Prevention of biofilm growth on man-made surfaces: evaluation of antialgal activity of two biocides and photocatalytic nanoparticles". En: vol. 26. 1. Taylor & Francis, 2010, págs. 89-101.
- [37] S. Meghana y col. "Understanding the pathway of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles". En: vol. 5. The Royal Society of Chemistry, 2015, págs. 12293-12299.
- [38] A. Verma y F. Stellacci. "Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions". En: vol. 6. 1. Wiley Online Library, 2010, págs. 12-21.
- [39] K. Hund-Rinke y M. Simon. "Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) on algae and daphnids (8 pp)". En: vol. 13. 4. Springer, 2006, págs. 225-232.
- [40] K. L. Chen y G. D. Bothun. "Nanoparticles meet cell membranes: probing nonspecific interactions using model membranes". En: vol. 48. 2014, págs. 873-880.
- [41] W. Zhang y col. "Modeling the primary size effects of citrate-coated silver nanoparticles on their ion release kinetics". En: vol. 45. 10. ACS Publications, 2011, págs. 4422-4428.
- [42] S. Zhang, A. Nelson y Paul A. Beales. "Freezing or wrapping: the role of particle size in the mechanism of nanoparticle–biomembrane interaction". En: vol. 28. 35. ACS Publications, 2012, págs. 12831-12837.
- [43] Yuri Roiter y col. "Interaction of nanoparticles with lipid membrane". En: vol. 8. 3. ACS Publications, 2008, págs. 941-944.
- [44] Álvaro Olivera Nappa. *Plegamiento de proteínas*. 2017.
- [45] M. Mortimer, K. Kasemets y A. Kahru. "Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*". En: vol. 269. 2-3. Elsevier, 2010, págs. 182-189.
- [46] G. Borkow y J. Gabbay. "Copper as a biocidal tool". En: vol. 12. 18. Bentham Science Publishers, 2005, págs. 2163-2175.
- [47] D. A. Palmer, P. Bénézeth y JM. Simonson. "Solubility of copper oxides in water and steam". En: *14th International Conference on the Properties of Water and Steam in Kyoto*. 2004, págs. 491-496.
- [48] G. Ren y col. "Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications". En: vol. 33. 6. Elsevier, 2009, págs. 587-590.
- [49] J. Liu y R. H. Hurt. "Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids". En: vol. 44. 6. ACS Publications, 2010, págs. 2169-2175.
- [50] J. S. Chapman. "Biocide resistance mechanisms". En: vol. 51. 2. Elsevier, 2003, págs. 133-138.
- [51] I. Hsiao y col. "Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra-and extracellular silver speciation analysis". En: vol. 49. 6. ACS Publications, 2015, págs. 3813-3821.
- [52] H. Yang y col. "Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition". En: vol. 29. 1. Wiley Online Library, 2009, págs. 69-78.
- [53] M. Ben-Sasson y col. "Surface functionalization of thin-film composite membranes with copper nanoparticles for antimicrobial surface properties". En: vol. 48. 1. ACS Publications, 2013, págs. 384-393.

- [54] X. Zhu y M. Elimelech. “Colloidal fouling of reverse osmosis membranes: measurements and fouling mechanisms”. En: vol. 31. 12. ACS Publications, 1997, págs. 3654-3662.
- [55] Q. Li, Z. Xu e I. Pinnau. “Fouling of reverse osmosis membranes by biopolymers in wastewater secondary effluent: Role of membrane surface properties and initial permeate flux”. En: vol. 290. 1-2. Elsevier, 2007, págs. 173-181.
- [56] M. Baghbanzadeh y col. “Effects of hydrophilic CuO nanoparticles on properties and performance of PVDF VMD membranes”. En: vol. 369. Elsevier, 2015, págs. 75-84.
- [57] E. M. Vrijenhoek, S. Hong y M. Elimelech. “Influence of membrane surface properties on initial rate of colloidal fouling of reverse osmosis and nanofiltration membranes”. En: vol. 188. 1. Elsevier, 2001, págs. 115-128.
- [58] S. Kittler y col. “Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions”. En: vol. 22. 16. ACS Publications, 2010, págs. 4548-4554.
- [59] Y. Lee y col. “Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles”. En: vol. 31. 1. Wiley Online Library, 2012, págs. 155-159.
- [60] B. Lu y WF. Graydon. “THE RATE OF DISSOLUTION OF COPPER”. En: vol. 32. 2. NRC Research Press, 1954, págs. 153-163.
- [61] H. Demir y col. “Determination of a semi empirical kinetic model for dissolution of metallic copper particles in HNO<sub>3</sub> solutions”. En: vol. 43. 8. Elsevier, 2004, págs. 1095-1100.
- [62] R. D. Kent y P. J. Vikesland. “Dissolution and persistence of copper-based nanomaterials in undersaturated solutions with respect to cupric solid phases”. En: vol. 50. 13. ACS Publications, 2016, págs. 6772-6781.
- [63] I. R. Cooke, K. Kremer y M. Deserno. “Tunable generic model for fluid bilayer membranes”. En: vol. 72. 1. APS, 2005, págs. 011506.
- [64] B. Li y B. E. Logan. “Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces”. En: vol. 36. 2. Elsevier, 2004, págs. 81-90.
- [65] D. Greenwood y col. *Antimicrobial chemotherapy*. OUP Oxford, 2007.
- [66] Christian Ritz. “Toward a unified approach to dose–response modeling in ecotoxicology”. En: vol. 29. 1. Wiley Online Library, 2010, págs. 220-229.
- [67] P. HA Sneath y col. *Bergey’s manual of systematic bacteriology. Volume 2*. Williams & Wilkins, 1986.
- [68] N. Parmar. *Bacteria*. [en línea] Nupedia, 2 de Septiembre de 2003. URL: <https://web.archive.org/web/20030902201723/http://www.nupedia.com/article/500/> (visitado 12-01-2019).
- [69] K. Stevenson, T. Pilizota e I. Clark. *General calibration of microbial growth in microplate readers: Data supporting*. University of Edinburgh. School of Biological Sciences, 2016.
- [70] B. Beverskog e I. Puigdomenech. *Revised Pourbaix diagrams for copper at 5-150 C*. Inf. téc. Swedish Nuclear Power Inspectorate, 1995.
- [71] P. Kanninen y col. “Influence of ligand structure on the stability and oxidation of copper nanoparticles”. En: vol. 318. 1. Elsevier, 2008, págs. 88-95.
- [72] F. Arjmand y A. Adriaens. “Influence of pH and chloride concentration on the corrosion behavior of unalloyed copper in NaCl solution: a comparative study between the micro and macro scales”. En: vol. 5. 12. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2012, págs. 2439-2464.
- [73] S. J. Klaine y col. “Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects”. En: vol. 27. 9. Wiley Online Library, 2008, págs. 1825-1851.

- [74] Transferencia de Calor y Masa 2. *LIXIVIACIÓN LÍQUIDO - SÓLIDO*. [en línea] Facultad de Ingeniería. Universidad de la República. Uruguay. URL: [https://www.fing.edu.uy/iq/cursos/cm2/teorico/Lixiviaci%C3%B3n\\_l%C3%ADquido\\_s%C3%B3lido\\_2011.pdf](https://www.fing.edu.uy/iq/cursos/cm2/teorico/Lixiviaci%C3%B3n_l%C3%ADquido_s%C3%B3lido_2011.pdf) (visitado 22-12-2018).
- [75] Jonas Hedberg, Eva Blomberg e Inger Odnevall Wallinder. “In the search for nano-specific effects of dissolution of metallic nanoparticles at freshwater-like conditions—a critical review”. En: ACS Publications, 2019.
- [76] Markus Nuspl y col. “Qualitative and quantitative determination of micro-inclusions by automated SEM/EDX analysis”. En: vol. 379. 4. Springer, 2004, págs. 640-645.
- [77] D. Bozic. *Most Common Elemental Analysis Techniques*. [en línea] AZO Materials, 30 de Julio de 2018. URL: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=16423> (visitado 18-03-2019).
- [78] S. Ramanathan. *Shell and core model*. [en línea] Department of Chemical Engineering. Indian Institute of Technology Madras. URL: <http://www.che.iitm.ac.in/~srinivar/course/CRE/035.SCM.01.pdf> (visitado 02-12-2018).
- [79] Tomás Vargas. *Modelo cinético del núcleo sin reaccionar*. 2011.
- [80] A. Yanase y H. Komiyama. “In situ observation of oxidation and reduction of small supported copper particles using optical absorption and X-ray diffraction”. En: vol. 248. 1-2. Elsevier, 1991, págs. 11-19.
- [81] K. S. Soppimath y col. “Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices”. En: vol. 70. 1-2. Elsevier, 2001, págs. 1-20.
- [82] S. K. Misra y col. “The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies”. En: vol. 438. Elsevier, 2012, págs. 225-232.
- [83] R. E. Treybal y A. García Rodríguez. *Operaciones de transferencia de masa*. 2a Edición. McGraw-Hill, 1988.
- [84] J. H. Perry. *Chemical engineers' handbook*. ACS Publications, 1950.
- [85] R. C. Weast, M. J. Astle, W. H. Beyer y col. *CRC handbook of chemistry and physics*. Vol. 69. CRC press Boca Raton, 1988.
- [86] L. Svarovsky. *Solid-liquid separation*. Elsevier, 2000.
- [87] A. Santafé-Moros y J. M. Gozávez-Zafrilla. “Numerical Simulation of Concentration Polarization to Estimate Gypsum and Calcium Carbonate Scaling on Membrane Surfaces”. En: Chemical and Nuclear Eng. Department. Universitat Politècnica de Valencia. 2013.
- [88] Peng Xie. “Simulation of reverse osmosis and osmotically driven membrane processes”. En: All dissertations, 2016.
- [89] *Copper 774081*. [en línea] Sigma Aldrich. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/774081?lang=es%2C&Eion=CL> (visitado 18-03-2019).
- [90] *Copper(II) oxide 544868*. [en línea] Sigma Aldrich. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/544868?lang=es%2C&Eion=CL> (visitado 18-03-2019).
- [91] *LB Broth and LB Agar*. [en línea] Thermofisher. URL: <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/cell-culture/microbiological-culture/bacterial-growth-media/lb-broth-and-lb-agar.html> (visitado 26-04-2019).

# Capítulo 7

## Anexos

### 7.1. Protocolo de confección de membranas de OR modificadas

A continuación se presenta el protocolo utilizado por AMTC para la confección de las membranas de OR utilizadas en este proyecto. Este protocolo se divide en la confección del soporte de polisulfona (PS) y la capa de poliamida con la modificación de cobre (PA). El protocolo aquí presentado muestra las cantidades para la realización de una membrana modificada con nanopartículas de cobre elemental (Cu-NPs). Para la realización de más membranas se debe amplificar las cantidades de reactivos por la cantidad de membranas a realizar. Por otro lado, para la realización de la membrana blanco (PA/PS), basta con no agregar las nanopartículas en el protocolo de confección de la polamida.

#### 7.1.1. Confección de soportes de polisulfona (PS)

Para la realización de polisulfona se requieren los siguientes reactivos con sus cantidades presentadas en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1: Reactivos y cantidades necesarias para la preparación del soporte de polisulfona

Reactivo	Cantidad	Unidad
DMF	4.27	mL
NMP	1.07	mL
Polisulfona	1	g.

Previo al inicio de la preparación de la polisulfona, se deja calentando 1L de agua destilada en horno a 70°C. Luego, bajo campana, se añade DMF a un vaso precipitado el cual se mantiene agitado y con temperatura de 60°C. Pasado unos minutos, se agrega NMP y luego la polisulfona. La mezcla se deja agitar y con temperatura con el vaso precipitado tapado por 2 horas. Una vez pasado este período se debe apagar la agitación y dejar reposar la mezcla por 10 minutos.



Figura 7.1: Equipo de *casting knife* utilizado para la formación de los soportes de polisulfona (PS)

Pasado ese tiempo, se preparan baños de agua destilada a 26°C. En esta etapa se debe limpiar y preparar el equipo de *casting knife* con su soporte para generar el film de polisulfona (ver Figura 7.1). Con un tubo de vidrio rotulado y tibio se toma una cantidad de la mezcla de polisulfona la cual se reparte por la parte superior del cuchillo, el cual luego se hace correr a lo largo del soporte de vidrio con el que cuenta el equipo de manera de generar una lamina fina de polisulfona sobre este. Luego el vidrio se levanta y se sumerge en el baño por 1 minuto. Esta inmersión debe ser lo más homogénea posible para no dañar el soporte de polisulfona. Pasado el tiempo, se retira la membrana de vidrio y se vuelve a sumergir la polisulfona en el baño con ayuda de soportes en sus extremos. La capa de polisulfona se deja reposar en el baño por 24 horas. Luego es retirada, se deja secar a temperatura ambiente y se almacena.

### 7.1.2. Confección de capa de poliamida modificada

Para la confección de la capa de PA modificada con nanopartículas de cobre elemental se requieren los reactivos y cantidades presentados en la Tabla

Tabla 7.2: Reactivos y cantidades necesarias para la síntesis de la capa de poliamida modificada con Cu-NPs para una membrana de osmosis reversa

Reactivo	Cantidad	Unidad
H <sub>2</sub> O	100	mL
MPD	2	g
NaOH	0.05	g
Hexano	100	mL
TMC	0.066	g
Cu-NPs	0.25	g

Inicialmente se prepara la solución de MPD agregando el agua destilada, MPD y NaOH según las cantidades indicadas. En forma paralela, se prepara la solución de hexano a la que

se le añade el TMC según cantidad indicada en la tabla. Una vez listas ambas soluciones, se fija la capa de polisulfona preparada previamente sobre un soporte de vidrio.

Las nanopartículas son añadidas a la solución de MPD, la cual es sonicada por 1 minuto para lograr una buena dispersión. Luego, el soporte de polisulfona pasa por el siguiente protocolo:

1. Sumergir por 2 minutos en la solución de MPD+Cu-NPs.
2. Se retira exceso de solución que pueda quedar sobre la membrana o sobre el soporte de vidrio.
3. Sumergir por 1 minuto en solución de hexano+TMC.
4. La membrana se deja en el horno a 75°C por 8 minutos.
5. Dejar reposar a temperatura ambiente por 2 minutos.
6. Se lava la membrana con agua destilada por 1 minuto.

Finalmente, la membrana se deja reposar a temperatura ambiente por 24 horas.

## 7.2. Protocolo de prueba de liberación de iones

Para la realización de la prueba de liberación de iones se utilizan 2 botellas Schott de 1L, las cuales son rellenas con agua desionizada. Se utilizan 3 membranas modificadas con cobre previamente confeccionadas y masada la cantidad de cobre en ellas, las cuales son añadidas a una de las botellas, procurando que las membranas queden dispersas alrededor de la misma. En la otra botella se añade el equivalente en masa del tipo de nanopartícula de cobre en estudio. Ambas botellas son dejadas en un *shaker* a 30° y 200RPM. 12 muestras son tomadas a los tiempos mostrados en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3: Tiempos de toma de muestra en prueba de liberación de iones

Muestra	Tiempo [horas]
1	0.167
2	0.333
3	0.5
4	1
5	2
6	4
7	12
8	24
9	48
10	72
11	168
12	240

En cada uno de los tiempos, se toman 30mL de muestra con una jeringa directo desde la botella, los cuales son colocados en un tubo Falcon de 50mL limpio. Los tubos son centrifugados a 6000RPM por 10 min y luego el sobrenadante es filtrado con un filtro de membrana. El filtrado es pasado a un nuevo tubo Falcon de 50 o 15 mL. A cada muestra del filtrado se le mide el pH y se guarda en frío en espera de su transporte y posterior cuantificación del cobre disuelto por absorción atómica.

### 7.3. Protocolo de pruebas biocidas

Las pruebas biológicas inician con la preparación de 5 botellas Schott de 1L con medio LB, el cual se prepara añadiendo 15.5g de medio Luria-Bertani en 1L de agua destilada [91]. Las botellas son autoclavadas a 120°C por 30 min . En paralelo, se preparan los pre-inóculos de *Escherichia coli*. Para ello, se descongela una cepa previamente almacenada de la bacteria y se inoculan 100μL en un tubo de ensayo con 5mL de medio LB. Los tubos son dejados en un *shaker* a 250RPM y 37°C *overnight*.

Al día siguiente a la solución bacteriana se le mide la densidad óptica (OD) a 600nm en el espectrofotómetro para estimar la densidad de células. Luego de esto, se calcula el volumen necesario a agregar para que en el Schott de 1L exista una concentración de bacterias igual a 1·10<sup>7</sup> células/mL en todos los casos. La solución bacteriana extraída y las membranas modificadas son añadidas a las botellas Schott. 3 membranas de los distintos tipos de cobre son añadidas a 3 de las botellas. A otro Schott se le añade una membrana blanco PA/PS y la última se deja sólo con las bacterias, para control positivo. Las membranas utilizadas son dejadas en luz ultravioleta por 30 minutos antes de añadirlas a los Schott, con el fin de dejarlas estériles. Una vez inoculados, los Schott se dejan en agitación a 200RPM y 30°C.

Una muestra de 1mL para medir viabilidad se toma de cada botella en los tiempos especificados en la Tabla 7.4. Las muestras eran diluidas con PBS en dilución seriada hasta el nivel marcado en la tabla. De la dilución más baja, se tomaban 50μL de muestra los cuales son puestos en una placa petri con LB-Agar y son repartidos en las placas mediante el método de barrido. Las placas se hacen por triplicado y se dejan en incubadora sin agitación a 37°C durante 24 horas. Luego de pasado ese tiempo, se cuentan las colonias en la placa y se estima la concentración de células viables mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Células vivas [CFU/mL]} = \text{promedio}(N^\circ \text{ de colonias}) \cdot \frac{1}{\text{dilución}} \cdot \frac{1}{\text{inóculo}} \quad (7.1)$$

Tabla 7.4: Tiempos de muestra para medir viabilidad en pruebas biocidas

Muestra	Tiempo [horas]	Dilución utilizada
1	0.167	10 <sup>-4</sup>
2	0.333	10 <sup>-4</sup>
3	0.5	10 <sup>-4</sup>
4	1	10 <sup>-4</sup>
5	2	10 <sup>-4</sup>
6	4	10 <sup>-4</sup>
7	12	10 <sup>-7</sup>
8	24	10 <sup>-7</sup>
9	48	10 <sup>-7</sup>

## 7.4. Masa de nanopartículas en membranas modificadas

Membrana	Masa soporte (g)	Masa membrana modificada (g)	Masa NPs en membrana (mg)	Promedio masa NPs en membrana	Concentración final de la solución (%p/p)	Promedio concentración final de la solución (%p/p)
PA/PS (1)	0.1856	0.1790	-6.6		-	
PA/PS (2)	0.1515	0.1510	-0.5	-2.2	-	
PA/PS (3)	0.1610	0.1630	0.002		-	
(PA + 0.25% CuO)/PS (1)	0.1464	0.1834	37.0		0.213	
(PA + 0.25% CuO)/PS (2)	0.2122	0.2173	5.1	30.8	0.2449	0.2
(PA + 0.25% CuO)/PS (3)	0.1330	0.1832	50.2		0.1998	
(PA + 1% CuO)/PS (1)	0.1325	0.1705	38.0		0.962	
(PA + 1% CuO)/PS (2)	0.1893	0.2036	14.3	37.1	0.9857	1.0
(PA + 1% CuO)/PS (3)	0.1076	0.1666	59.0		0.941	
(PA + 0.25% Cu-MPD)/PS (1)	0.1229	0.1733	50.4		0.1996	
(PA + 0.25% Cu-MPD)/PS (2)	0.1888	0.1740	-14.8	19.9	0.2648	0.2
(PA + 0.25% Cu-MPD)/PS (3)	0.1540	0.1780	24.0		0.2648	
(PA + 0.25% Cu <sub>0</sub> )/PS (1)	0.154	0.169	15.0		0.8909	
(PA + 0.25% Cu <sub>0</sub> )/PS (2)	0.1840	0.1940	10.0	11.0	0.94	0.9
(PA + 0.25% Cu <sub>0</sub> )/PS (3)	0.1740	0.1820	8.0		0.94	

## 7.5. Diagrama de Pourbaix del cobre disuelto en agua

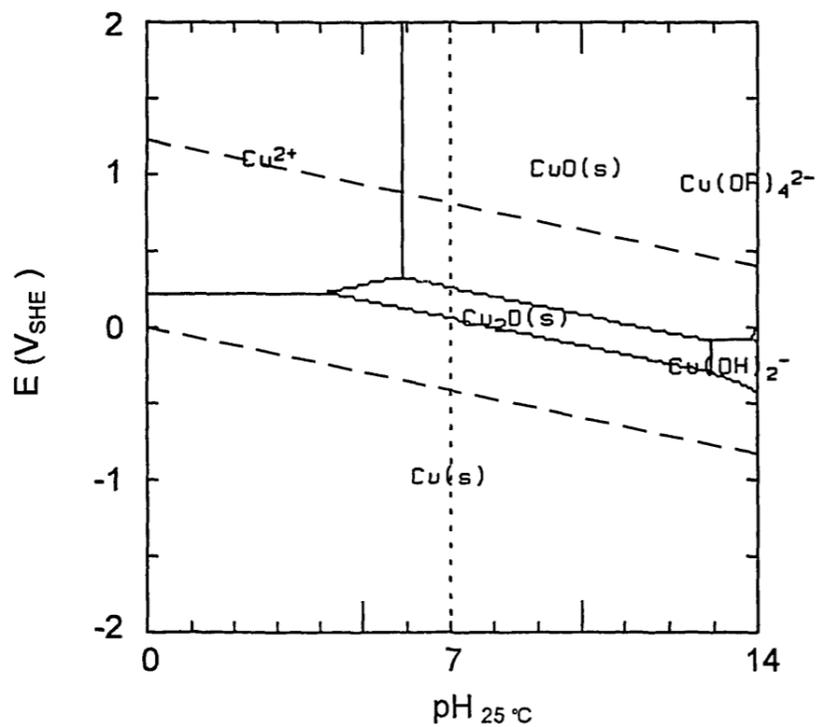


Figura 7.2: Diagrama de Pourbaix para cobre en agua a 25°C. Extraído de [70]

## 7.6. Estimación de masa inicial en membranas de NPs

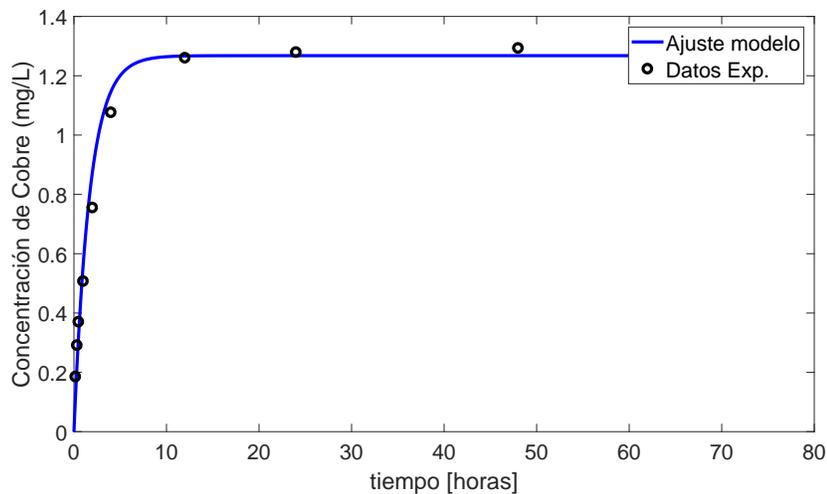


Figura 7.3: Ajuste de modelo de lixiviación con control de disolución para membranas con nanopartículas de cobre elemental (Cu-NPs)

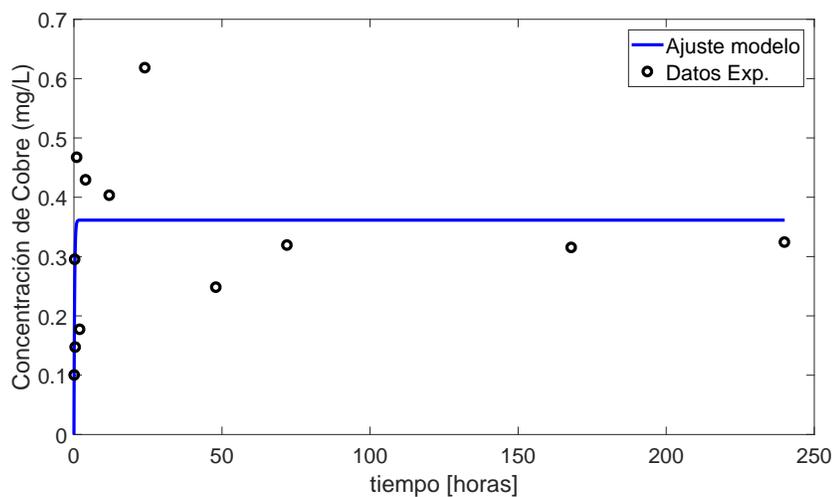


Figura 7.4: Ajuste de modelo de lixiviación con control de disolución para membranas con nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs)

## 7.7. Balance para conexión entre modelos de liberación de iones

Tomando los 2 balances de ión cúprico para cada modelo se tienen las siguientes ecuaciones que relacionar:

$$\frac{d[Cu^{2+}]}{dt} = \frac{S \cdot k_m}{V} ([Cu^{2+}]_s - [Cu^{2+}]) \quad (7.2)$$

$$\frac{dr_{NP}}{dt} = -\frac{D_e[H^+]}{\rho_{NP}} \cdot \frac{1}{r_{NP} - \frac{r_{NP}^2}{R}} \quad (7.3)$$

$$\frac{dN_{Cu}}{dt} = \rho_{NP} 4\pi r_{NP}^2 \frac{dr_{NP}}{dt} \cdot N_o \quad (7.4)$$

Donde la ecuación 7.2 corresponde al modelo de lixiviación por disolución, mientras que las ecuaciones 7.3 y 7.4 al modelo de núcleo sin reaccionar. Al combinar estas últimas 2 ecuaciones se obtiene que:

$$\frac{d[Cu^{2+}]}{dt} = \frac{\rho_{NP} 4\pi r_{NP}^2 D_e [H^+] N_o}{V} \cdot \frac{1}{r_{NP} - \frac{r_{NP}^2}{R}} \quad (7.5)$$

Donde se ha pasado desde masa a concentración considerando que el volumen no varía y se ha cambiado el signo de la ecuación para mostrar el cobre liberado, de manera de compararlo con la ecuación 7.2. Al aislar los términos asociados a concentración y dependientes del tiempo de manera de igualar las constantes se obtiene que:

$$\frac{S \cdot k_m}{V} = \frac{D_e \cdot N_o \cdot R}{V} \quad (7.6)$$

Al multiplicar a ambos lados por el volumen y despejar la constante de disolución se llega a:

$$k_m = \frac{D_e \cdot N_o \cdot R}{S} \quad (7.7)$$

## 7.8. Códigos

### 7.8.1. Ajuste de modelo de lixiviación a oligomero de cobre

```

1 clc
2 clear all
3 %% OLIGOMERO DE COBRE
4 % Consideramos la masa calculada a partir de los datos de masa en membrana
5

```

```

6 P.PM = 63.546; % Peso molecular Cu (gr/mol)
7 P.m = (6.0514/P.PM)*10^(-3); % Masa inicial (mol) [CALCULADA]
8 disp(P.m)
9 P.V = 0.001; % Volumen de la solucion (m^3)
10 P.A= (3*10*5.5)/(1e+4); % Area efectiva (m^2)
11 P.T=303; % Temperatura de operacion (K)
12 P.r = 25e-9; % Radio de las nanoparticulas (m)
13 P.rho = 8.94e+06; % Densidad de las nanoparticulas (g/m^3)
14 P.flag=2; % Modelo utilizado
15 P.k1=10;
16
17 P.t_exp=[1/6 1/3 1/2 1 2 4 12 24 48 72 168 240];
18 P.Cu_exp=[0.12 0.2 0.33 0.52 0.69 0.86 1.14 1.43 1.44 1.52 1.41 1.45];
19 P.Cu_exp=P.Cu_exp.*(1/P.PM).*10^(-3);
20 %% AJUSTE DE PARAMETROS
21
22 % Adivinanza inicial
23 theta0 = 1;
24
25 % Opciones y ajuste de parametros mediante fminsearch
26 options = optimset('TolFun',1e-10,'TolX',1e-10,'MaxFunEvals',1e+9,'Display','
iter');
27
28 [par,error] = fminsearch(@(theta) fcostos(theta,P), theta0,options);
29
30 P.k=par(1); % Cte de disolucion (1/s)
31 kl_1=(P.k*P.V)/P.A; % Cte de velocidad de disolucion (m/s)
32 %% RESOLUCION DE MODELO
33
34 % Tiempo de simulacion
35 x0=0;
36 tm = 0:0.01:240;
37 options = odeset('RelTol',1e-9,'AbsTol',1e-9);
38
39 [t,Cu] = ode45(@(t,x) ion_liberado(t,x,P), tm, x0, options);
40
41 % Salida grafica
42 figure(1)
43 plot(t,Cu,'r');
44 hold on
45 plot(P.t_exp,P.Cu_exp,'ro');
46 xlabel('tiempo [horas]');
47 ylabel('Concentracion de Cobre (mg/L)');
48 title('Iones liberados Cu-MPD');
49 legend('Modelo','Datos Exp.','Location','NorthWest');
50 %%
51 % Ahora, dejaremos libre la masa inicial y la cte de disolucion libre
52
53 P1.V = 0.001; % Volumen de la solucion (m^3)
54 P1.A= (3*10*5.5)/(1e+4); % Area efectiva (m^2)
55 P1.T=303; % Temperatura de operacion (K)
56 P1.r = 25e-9; % Radio de las nanoparticulas (m)
57 P1.rho = 8.94e+06; % Densidad de las nanoparticulas (g/m^3)
58 P1.flag=2; % Modelo utilizado
59 P1.k1=10;
60

```

```

61 P1.t_exp=[1/6 1/3 1/2 1 2 4 12 24 48 72 168 240];
62 P1.Cu_exp=[0.12 0.2 0.33 0.52 0.69 0.86 1.14 1.43 1.44 1.52 1.41 1.45];
63 P1.Cu_exp=P1.Cu_exp.*(1/P.PM).*10^(-3);
64 %% AJUSTE DE PARAMETROS
65
66 % Adivinanza inicial
67 theta1 = [1 2];
68
69 % Opciones y ajuste de parametros mediante fminsearch
70 options = optimset('TolFun',1e-9,'TolX',1e-9,'MaxFunEvals',1e+9,'Display','
    iter');
71
72 [par1,error1] = fminsearch(@(theta) fcostos_masa(theta,P1), theta1, options);
73
74 P1.k=par1(1);      P1.m=par1(2);
75 kl_2=(P1.k*P1.V)/P1.A;          % Cte de velocidad de disolucion (m/s)
76
77 %%
78 P2.m=P.m;
79 P2.k=P1.k;
80 P2.V = 0.001;          % Volumen de la solucion (m^3)
81 P2.A= (3*10*5.5)/(1e+4); % Area efectiva (m^2)
82 P2.T=303;             % Temperatura de operacion (K)
83 P2.r = 25e-9;         % Radio de las nanoparticulas (m)
84 P2.rho = 8.94e+06;    % Densidad de las nanoparticulas (g/m^3)
85 P2.flag=2;            % Modelo utilizado
86 P2.k1=10;
87
88 %% RESOLUCION DE MODELO
89
90 % Tiempo de simulacion
91 x0=0;
92 tm = 0:0.01:240;
93 options = odeset('RelTol',1e-9,'AbsTol',1e-9);
94
95 [t,Cu1] = ode45(@(t,x) ion_liberado(t,x,P1), tm, x0, options);
96
97 [t2,Cu2] = ode45(@(t,x) ion_liberado(t,x,P2), tm, x0, options);
98
99 figure(2)
100 plot(t,Cu1,'b','LineWidth',3);
101 hold on
102 plot(t,Cu,'r','LineWidth',3);
103 plot(P1.t_exp,P1.Cu_exp,'ko','MarkerSize',8,'LineWidth',3);
104 xlabel('tiempo [horas]');
105 ylabel('Concentracion de Cobre (mg/L)');
106 set(gca,'FontSize',20)
107 %title('Iones liberados Cu-MPD');
108 lgd = legend('Ajuste k_m','Ajuste k_m y m_i','Datos Exp','Location','NorthEast
    ');
109 lgd.FontSize = 20;
110
111 h=gcf;
112 set(h,'PaperPositionMode','auto');
113 set(h,'PaperOrientation','landscape');
114 set(h,'Position',[50 50 1200 800]);

```

```

115 print(gcf, '-dpdf', 'Model-MPD.pdf')
116
117 %%SIGNIFICANCIA DE PARAMETROS
118
119 IC=[];
120 ICPorcentaje=[];
121 pvalue=[];
122
123 %Determinacion de la matriz J
124 x0=0;
125 N = length(P1.t_exp);
126 k = length(par1);
127 NC = 0.95;
128 alpha = 1-NC;
129
130 tstudent = tinv(1-alpha/2,N-k);
131 s = sqrt(error1/(N-k));
132
133 epsilon = par1*1e-6;
134
135 %simulamos el modelo sin mover ningun parametro
136 tspan = P1.t_exp;
137
138 options = odeset('RelTol',1e-9,'AbsTol',1e-9);
139 [t,Cu] = ode45(@(t,x) ion_liberado(t,x,P1), tspan, x0, options);
140
141 %movemos el parametro 1
142 P1.k = par1(1)+epsilon(1);
143 P1.m = par1(2);
144
145 [t_1,Cu_1] = ode45(@(t,x) ion_liberado(t,x,P1), tspan, x0, options);
146
147 %movemos el parametro 2
148 P1.k = par1(1);
149 P1.m = par1(2)+epsilon(2);
150
151 [t_2,Cu_2] = ode45(@(t,x) ion_liberado(t,x,P1), tspan, x0, options);
152
153 %Calculamos J y la matriz A
154 J = [(Cu_1 - Cu)/epsilon(1) (Cu_2 - Cu)/epsilon(2)];
155 A = inv(J'*J);
156
157 %Calculo de los intervalos de confianza
158 IC = [par1 - tstudent*s*sqrt(diag(A)) par1 + tstudent*s*sqrt(diag(A))];
159 ICPorcentaje = tstudent*s*sqrt(diag(A))*100./par1;
160
161 %Test de significancia
162 tv = par1./(s*sqrt(diag(A)));
163 pvalue = 2*(1-tcdf(tv,N-k));
164
165 %Coeficiente de correlacion
166 cc = corrcoef(P1.Cu_exp,Cu);
167 rho = cc(1,2);
168
169 %Coeficiente de determinacion y ajustado
170 R2 = 1-(P1.Cu_exp' - Cu)'*(P1.Cu_exp' - Cu)/((P1.Cu_exp' - mean(P1.Cu_exp))'*(P1

```

```

    .Cu_exp'-mean(P1.Cu_exp));
171 R2ajust = 1-(1-R2)*(N-1)/(N-k);
172
173 %% Resumen de resultados
174
175 fprintf( '\nRESUMEN DE LOS RESULTADOS COBRE ELEMENTAL\n\n');
176 fprintf( 'MSE                : %0.3f\n', error1/N);
177 fprintf( 'Coeficiente de correlacion  : %0.3f\n', rho);
178 fprintf( 'R2                  : %0.3f\n', R2);
179 fprintf( 'R2ajust             : %0.3f\n\n', R2ajust);
180
181 % Parametros
182 fprintf( '%8s      %8s \t %6s\n', 'Parametro', 'IC[%]', 'p-value');
183 for j=1:length(par1)
184     if pvalue(j)>alpha
185         msg = sprintf( 'Parametro NO significativo al %1.2f de nivel de
confianza', 0.95);
186     else
187         msg = sprintf( 'Parametro significativo al %1.2f de nivel de confianza'
,0.95);
188     end
189     fprintf( '%8.4e +- %8.1f \t %6.4e %s\n', par1(j), ICPorcentaje(j), pvalue(j),
msg);
190 end
191
192 fprintf( 'Cte de disolucion: \n Caso 1 = %f \n Caso 2 = %f \n', kl_1, kl_2);

```

Listing 7.1: Código de modelo de lixiviación

## 7.8.2. Ajuste de modelo de núcleo sin reaccionar para nanopartículas

```

1 %%
2 % Main
3 %%
4
5 clear all
6 clc
7
8 %% AJUSTE DE PARAMETROS MODELO DE NUCLEO SIN REACCIONAR
9
10 % Datos NPs Cobre Elemental en solucion
11 P.mi = 35e-3;
12 P.ph = 5;
13 P.rho = 8.94e+06;
14 P.R = 25e-09;
15 P.PM = 63.546;
16 P.t_exp = [1/6 1/3 1/2 1 2 4 12 24 48 72];
17 P.Cu_exp = [5.48592e-04 5.4878e-04 5.48041e-04 5.4878e-04 5.46672e-04 5.46546e
-04 5.45098e-04 5.4192e-04 5.40016e-04 5.40566e-04];
18 [TF1,L1,U1,C1]=isoutlier(P.Cu_exp, 'grubbs');
19
20 % Datos NPs Cobre Elemental en membrana
21 P1.mi = 2.5355e-03;
22 P1.ph = 7;
23 P1.rho = 8.94e+06;

```

```

24 P1.R = 25e-09;
25 P1.PM = 63.546;
26 P1.t_exp = [1/6 1/3 1/2 1 2 4 12 24 48 72];
27 P1.Cu_exp = [3.69866e-05 3.53186e-05 3.40755e-05 3.19197e-05 2.80173e-05
28 2.29662e-05 2.00708e-05 1.97718e-05 1.95515e-05 1.95201e-05];
29 [TF2,L2,U2,C2]=isoutlier(P1.Cu_exp,'grubbs');
30 %% AJUSTE DE PARAMETROS
31 % Adivinanza inicial
32 theta0 = [2.705e-11 1.13e+12];
33 theta1 = [3.921e-9 2.65e+12];
34
35 % Opciones y ajuste de parametros mediante fminsearch
36 options = optimset('TolFun',1e-7,'TolX',1e-7,'MaxFunEvals',150,'Display','iter
37 ');
38 options2 = optimset('TolFun',1e-7,'TolX',1e-7,'MaxFunEvals',200,'Display','
39 iter');
40 [par_n1,error_n1] = fminsearch(@(theta) fcostos_nucleo(theta,P), theta0,
41 options);
42 [par_n2,error_n2] = fminsearch(@(theta) fcostos_nucleo(theta,P1), theta1,
43 options2);
44
45 % Rescate de parametros
46 P.De=par_n1(1); P.No=par_n1(2); % NP en solucion
47 P1.De=par_n2(1); P1.No=par_n2(2); % NP en membrana
48
49 %% RESOLUCION DE MODELO
50
51 % Tiempo de simulacion
52 mi_Cu = 35e-03; % Masa inicial nanoparticulas en suspension (g)
53 mi_Cum = 2.5355e-03; % Masa inicial nanoparticulas en membrana (g)
54 Ni_Cu=mi_Cu/P.PM; % Moles iniciales de cobre (mol)
55 Ni_Cum = mi_Cum/P.PM;
56 x0=[Ni_Cu P.R];
57 x1=[Ni_Cum P1.R];
58
59 tm = 0:1:72;
60 options = odeset('RelTol',1e-9,'AbsTol',1e-9);
61
62 % Resolucion de la edo
63 [tq1,Nb1] = ode23s(@(t,x) ion_nucleo(t,x,P), tm, x0, options);
64 [tq2,Nb2] = ode23s(@(t,x) ion_nucleo(t,x,P1), tm, x1, options);
65
66 % Calculo de flujo de iones (pendiente primeras 12h)
67 idx1 = find(tq1==12);
68 idx2 = find(tq2==12);
69
70 delta1 = -(Nb1(idx1)-Nb1(1))/12;
71 delta2 = -(Nb2(idx2)-Nb1(1))/12;
72 %%
73 figure(1)
74 plot(tq1,Nb1(:,1),'r','LineWidth',3)
75 hold on
76 plot(P.t_exp,P.Cu_exp,'ko','LineWidth',3,'MarkerSize',8);
77 xlabel('tiempo [horas]');

```

```

75 ylabel('Masa liberada [mol]');
76 %title('Masa perdida por NPs de cobre elemental en solucion')
77 set(gca,'FontSize',20)
78 lgd = legend('Modelo Ajustado', 'Datos Exp. ');
79 lgd.FontSize = 20;
80
81 h=gcf;
82 set(h,'PaperOrientation','landscape');
83 set(h,'PaperUnits','normalized');
84 set(h,'PaperPosition',[0 0 1 1]);
85 print(gcf, '-dpdf', 'NSR-CuNPs.pdf')
86 hold off
87
88 figure(2)
89 plot(tq2,Nb2(:,1),'r','LineWidth',3)
90 hold on
91 plot(P1.t_exp,P1.Cu_exp,'ko','LineWidth',3,'MarkerSize',8);
92 xlabel('tiempo [horas]');
93 ylabel('Masa liberada [mol]');
94 %title('Masa perdida por NPs de cobre elemental en membrana')
95 set(gca,'FontSize',20)
96 lgd = legend('Modelo ajustado', 'Datos Exp. ');
97 lgd.FontSize = 20;
98
99 h=gcf;
100 set(h,'PaperOrientation','landscape');
101 set(h,'PaperUnits','normalized');
102 set(h,'PaperPosition',[0 0 1 1]);
103 print(gcf, '-dpdf', 'NSR-CuMemb.pdf')
104 hold off
105
106 % Salida grafica
107 figure(3)
108 plot(P.t_exp,P.Cu_exp,P.t_exp(TF1),P.Cu_exp(TF1),'x',P.t_exp,L1*ones(1,10),P.
    t_exp,U1*ones(1,10),P.t_exp,C1*ones(1,10))
109 legend('Original Data','Outlier','Lower Threshold','Upper Threshold','Center
    Value')
110
111 figure(4)
112 plot(P1.t_exp,P1.Cu_exp,P1.t_exp(TF2),P1.Cu_exp(TF2),'x',P.t_exp,L2*ones(1,10)
    ,P.t_exp,U2*ones(1,10),P.t_exp,C2*ones(1,10))
113 legend('Original Data','Outlier','Lower Threshold','Upper Threshold','Center
    Value')
114
115 %% OXIDO DE COBRE
116
117 % Datos NPs Oxido de Cobre en solucion
118 P2.mi=40e-3;
119 P2.ph=7;
120 P2.rho=6.31e+06;
121 P2.R=50e-09;
122 P2.PM=79.545;
123 P2.t_exp=[1/6 1/3 1/2 1 2 4 12 24 48 72 168 240];
124 P2.Cu_exp=[5.0286e-04 5.0286e-04 5.0286e-04 5.0286e-04 5.0286e-04 5.016e-04
    5.0101e-04 4.9943e-04 5.0048e-04 5.0018e-04 4.9972e-04 4.9935e-04];
125 [TF3,L3,U3,C3]=isoutlier(P2.Cu_exp,'grubbs');

```

```

126
127 % Alterado: sin punto de 24h
128 P2.t_exp=[1/6 1/3 1/2 1 2 4 12 48 72 168 240];
129 P2.Cu_exp=[5.0286e-04 5.0286e-04 5.0286e-04 5.0286e-04 5.0286e-04 5.016e-04
130           5.0101e-04 5.0048e-04 5.0018e-04 4.9972e-04 4.9935e-04];
131 % Datos NPs Cobre Elemental en membrana
132 P3.mi = 4.196e-03;
133 P3.ph=7;
134 P3.rho=6.31e+06;
135 P3.R=50e-09;
136 P3.PM=79.545;
137 P3.t_exp=[1/6 1/3 1/2 1 2 4 12 24 48 72 168 240];
138 P3.Cu_exp=[5.1493e-05 4.904e-05 5.0902e-05 4.6879e-05 5.0525e-05 4.73568e-05
139           4.76837e-05 4.4981e-05 4.96323e-05 4.873971e-05 4.878999e-05 4.867685e-05];
140 [TF4,L4,U4,C4]=isoutlier(P3.Cu_exp,'grubbs');
141 % Alterado: se borran puntos de 20 min, 1h y 24h
142 P3.t_exp=[1/6 1/2 2 4 12 48 72 168 240];
143 P3.Cu_exp=[5.1493e-05 5.0902e-05 5.0525e-05 4.73568e-05 4.76837e-05 4.96323e
144           -05 4.873971e-05 4.878999e-05 4.867685e-05];
145 %% AJUSTE DE PARAMETROS
146 % Adivinanza inicial
147 theta2 = [2.26e-11 4.95e+11];
148 theta3 = [4.71e-10 2.077e+11];
149
150 % Opciones y ajuste de parametros mediante fminsearch
151 options = optimset('TolFun',1e-6,'TolX',1e-6,'MaxFunEvals',100,'Display','iter
152 ');
153 options2 = optimset('TolFun',1e-6,'TolX',1e-6,'MaxFunEvals',50,'Display','iter
154 ');
155 [par_n3,error_n3] = fminsearch(@(theta) fcostos_nucleo(theta,P2), theta2,
156 options);
157 [par_n4,error_n4] = fminsearch(@(theta) fcostos_nucleo(theta,P3), theta3,
158 options2);
159
160 %% RESOLUCION DE MODELO
161
162 % Tiempo de simulacion
163 mi_CuO = 40e-03; % Masa inicial nanoparticulas en suspension (g)
164 mi_CuOm = 4.196e-03; % Masa inicial nanoparticulas en membrana (g)
165 Ni_CuO=mi_CuO/P2.PM; % Moles iniciales de cobre (mol)
166 Ni_CuOm = mi_CuOm/P3.PM;
167 x2=[Ni_CuO P2.R];
168 x3=[Ni_CuOm P3.R];
169
170 tm = 0:1:240;
171 options = odeset('RelTol',1e-9,'AbsTol',1e-9);
172
173 % Resolucion de la edo
174 [tq3,Nb3] = ode23s(@(t,x) ion_nucleo(t,x,P2), tm, x2, options);

```

```

175 [tq4,Nb4] = ode23s(@(t,x) ion_nucleo(t,x,P3), tm, x3, options);
176
177 % Calculo de flujo de iones (pendiente primeras 12h)
178 idx3 = find(tq3==12);
179 idx4 = find(tq4==12);
180
181 delta3 = -(Nb3(idx3)-Nb3(1))/12;
182 delta4 = -(Nb4(idx4)-Nb4(1))/12;
183
184 figure(5)
185 plot(tq3,Nb3(:,1),'b','LineWidth',3);
186 hold on
187 plot(P2.t_exp,P2.Cu_exp,'ko','LineWidth',3,'MarkerSize',8);
188 xlabel('tiempo [horas]');
189 ylabel('Masa liberada [mol]');
190 title('Masa perdida por NPs de oxido de cobre en solucion');
191 set(gca,'FontSize',20)
192 lgd = legend('Ajuste modelo', 'Datos Exp. ');
193 lgd.FontSize = 20;
194
195 h=gcf;
196 set(h,'PaperOrientation','landscape');
197 set(h,'PaperUnits','normalized');
198 set(h,'PaperPosition',[0 0 1 1]);
199 print(gcf, '-dpdf', 'NSR-CuONPs.pdf')
200 hold off
201
202 figure(6)
203 plot(tq4,Nb4(:,1),'b','LineWidth',3);
204 hold on
205 plot(P3.t_exp,P3.Cu_exp,'ko','LineWidth',3,'MarkerSize',8);
206 xlabel('tiempo [horas]');
207 ylabel('Masa liberada [mol]');
208 title('Masa perdida por NPs de oxido de cobre en membrana')
209 set(gca,'FontSize',20)
210 lgd = legend('Ajuste modelo', 'Datos Exp. ');
211 lgd.FontSize = 20;
212
213 h=gcf;
214 set(h,'PaperOrientation','landscape');
215 set(h,'PaperUnits','normalized');
216 set(h,'PaperPosition',[0 0 1 1]);
217 print(gcf, '-dpdf', 'NSR-CuOMemb.pdf')
218 hold off
219
220 % Salida grafica
221 figure(7)
222 plot(P2.t_exp,P2.Cu_exp,P2.t_exp(TF3),P2.Cu_exp(TF3),'x',P2.t_exp,L3*ones
      (1,12),P2.t_exp,U3*ones(1,12),P2.t_exp,C3*ones(1,12))
223 legend('Original Data','Outlier','Lower Threshold','Upper Threshold','Center
      Value')
224
225 figure(8)
226 plot(P3.t_exp,P3.Cu_exp,P3.t_exp(TF4),P3.Cu_exp(TF4),'x',P3.t_exp,L4*ones
      (1,12),P3.t_exp,U4*ones(1,12),P3.t_exp,C4*ones(1,12))
227 legend('Original Data','Outlier','Lower Threshold','Upper Threshold','Center

```

```

Value')
228 %%CALCULO DEL TIEMPO DE VIDA DE NPs
229
230 tspan=[0:1:500];
231 tspan2=[0:1:50];
232 options = odeset('RelTol',1e-10,'AbsTol',1e-10);
233 % en solucion
234 [tq5,Nb5] = ode23s(@(t,x) ion_nucleo(t,x,P), tspan, x0, options);
235 [tq6,Nb6] = ode23s(@(t,x) ion_nucleo(t,x,P2), tspan, x2, options);
236 % en membrana
237 [tq7,Nb7] = ode23s(@(t,x) ion_nucleo(t,x,P1), tspan2, x1, options);
238 [tq8,Nb8] = ode23s(@(t,x) ion_nucleo(t,x,P3), tspan2, x3, options);
239
240 % Ajustamos escala
241 Nb5(:,2)=Nb5(:,2)*1e+9;
242 Nb6(:,2)=Nb6(:,2)*1e+9;
243 Nb7(:,2)=Nb7(:,2)*1e+9;
244 Nb8(:,2)=Nb8(:,2)*1e+9;
245
246 % Salida grafica
247 figure(5)
248 plot(tq5,Nb5(:,2),'LineWidth',3);
249 hold on
250 plot(tq6,Nb6(:,2),'LineWidth',3);
251 xlabel('Tiempo [horas]');
252 ylabel('Radio de NP [nm]');
253 title('Disminucion de radio de NP');
254 lgd = legend('Cu-NP','CuO-NP');
255 set(gca,'FontSize',20)
256 lgd.FontSize = 20;
257
258 h=gcf;
259 set(h,'PaperOrientation','landscape');
260 set(h,'PaperUnits','normalized');
261 set(h,'PaperPosition',[0 0 1 1]);
262 print(gcf,'-dpdf','LifeTime.pdf')
263 hold off
264
265 figure(6)
266 plot(tq7,Nb7(:,2),'LineWidth',3);
267 hold on
268 plot(tq8,Nb8(:,2),'LineWidth',3);
269 xlabel('Tiempo [horas]');
270 ylabel('Radio de NP [nm]');
271 title('Disminucion de radio de NP');
272 lgd = legend('Cu-NP memb.','CuO-NP memb. ');
273 set(gca,'FontSize',20)
274 lgd.FontSize = 20;
275
276 h=gcf;
277 set(h,'PaperOrientation','landscape');
278 set(h,'PaperUnits','normalized');
279 set(h,'PaperPosition',[0 0 1 1]);
280 print(gcf,'-dpdf','MembraneUse.pdf')
281 hold off
282

```

```

283 %% Displeo de valores
284
285 A=(3*10*5.5)*10^(-4);           % Area de membranas (m^2);
286
287 % Constantes de disolucion
288 k_CuNP = (P.De*P.No*P.R)/A;
289 k_CuMemb = (P1.De*P1.No*P1.R)/A;
290 k_CuONP = (P2.De*P2.No*P2.R)/A;
291 k_CuOMemb = (P3.De*P3.No*P3.R)/A;
292
293 fprintf('Valor de los parametros:\n\n');
294 fprintf('Tipo de Cobre \t \t De \t \t \t \t No \t \t \t delta \t \t k \n');
295 fprintf('Cu-NP en solucion \t %e \t \t %e \t %e \t %e \n',P.De,P.No,delta1 ,
    k_CuNP);
296 fprintf('Cu-NP en membrana \t %e \t \t %e \t %e \t %e \n',P1.De,P1.No,delta2 ,
    k_CuMemb);
297 fprintf('CuO-NP en solucion \t %e \t \t %e \t %e \t %e \n',P2.De,P2.No,delta3 ,
    k_CuONP);
298 fprintf('CuO-NP en membrana \t %e \t \t %e \t %e \t %e \n',P3.De,P3.No,delta4 ,
    k_CuOMemb);

```

Listing 7.2: Código de ajuste de datos experimentales a modelo de núcleo sin reaccionar

### 7.8.3. Funciones de costos para minimización

```

1 function e = fcostos(theta,P)
2
3 % Parametros a ajustar
4 P.k = theta(1);
5
6 % Datos experimentales correspondientes
7 t_exp = P.t_exp;
8 Cu_exp = P.Cu_exp;
9
10 x0=0;
11
12 % Simulacion del modelo con los parametros propuestos por el optimizador
13 tspan = t_exp;
14 options = odeset('RelTol',1e-9,'AbsTol',1e-9);
15 [t_mod,Cu_mod] = ode45(@(t,y) ion_liberado(t,y,P), tspan, x0, options);
16
17 % Calculo del error cuadratico medio
18 e = (Cu_exp' - Cu_mod)'*(Cu_exp' - Cu_mod);
19
20 end

```

Listing 7.3: función de costos para modelo de lixiviación por disolución

```

1 function e = fcostos_nucleo(theta,P)
2
3 % Parametros a ajustar
4 P.De = theta(1);
5 P.No = theta(2);
6
7 % Datos experimentales correspondientes
8 t_exp = P.t_exp;
9 Cu_exp = P.Cu_exp;

```

```

10
11 mi=P.mi;
12 Ni=mi/P.PM;           % Moles iniciales de cobre (mol)
13 x0=[Ni P.R];
14
15 % Simulacion del modelo con los parametros propuestos por el optimizador
16 tspan = t_exp;
17 options = odeset('RelTol',1e-9,'AbsTol',1e-9);
18 [t_mod,Cu_mod] = ode23s(@(t,y) ion_nucleo(t,y,P), tspan, x0, options);
19
20
21 % Calculo del error cuadratico medio
22 e = (Cu_exp' - Cu_mod(:,1))'*(Cu_exp' - Cu_mod(:,1));
23
24 end

```

Listing 7.4: función de costos para modelo de núcleo sin reaccionar

#### 7.8.4. Ecuaciones diferenciales

```

1 %%
2 % Sistema de ecuaciones para describir la liberacion de iones desde
3 % nanoparticulas en suspension en un medio
4 % Autor: Rodrigo Quezada M.
5 %%
6 function dy = ion_liberado(t,x,P)
7
8 % Rescate de parametros
9
10 k=P.k;           % Coeficiente de transferencia de masa
11 k1=P.k1;        % Tasa de oxidacion de iones Ag+ a AgO
12 mi=P.m;         % Concentracion inicial de plata
13 V=P.V;         % Volumen
14 A=P.A;         % Area efectiva total
15 T=P.T;         % Temperatura
16 r=P.r;         % Radio de las nanoparticulas
17 rho=P.rho;     % Densidad
18
19 %% Constantes
20 R = 8.314;     % J /mol K
21 Po2 = 1;      % atm
22
23 %% Calculo de parametros del modelo
24
25 V_n = ((4/3)*pi*r^(3))*1000;           % Volumen de una
    nanoparticula
26 N = (mi*10^(-3))/(rho*(V_n/1000));    % Numero de
    nanoparticulas en la solucion
27 V_nt = V_n*N;                         % Volumen total de
    nanoparticulas
28 S = 4*pi*r^(2);                       % Superficie de la
    nanoparticula
29 S_t = S*N;
30 k = (S_t*k)*1000;
31
32 %% VARIABLES
33 y = x(1);           % Compuesto en disolucion

```

```

34
35
36 %%MODELO CINETICO DE LIBERACION DE IONES SIMPLE
37 if P.flag==1
38     %dAg = k*(Ag_in-Ag);
39     dy = (k/(V*V_nt))*mi-y*(k/(V_nt))*(1+(V_nt/V));
40 end
41
42 %%MODELO CINETICO DE LIBERACION DE IONES CON OXIDACION DE IONES
43
44 if P.flag==2
45     ys=mi-y;          % Concentracion restante en membrana
46     dy = k*(ys-y);   % Acumulacion de iones
47     yt=ys+y;
48     %fprintf('Masa inicial: %f \n Restante en membrana: %f \n Iones liberados:
49     %f \n Iones liberados + restante en membrana: %f \n',mi,ys,y,yt);
50 end
51 %%MODELO CINETICO LU1953
52
53 if P.flag==3
54
55     C = 4.92e+06;
56     dy = C*exp(-(14.1/(R*T)))*y*Po2*(A/V);
57 end

```

Listing 7.5: Modelo de lixiviación por disolución

```

1 function dX = ion_nucleo(t,x,P)
2
3 N=x(1);
4 r=x(2);
5
6 % Rescate de parametros
7
8 pH = P.pH;          % pH solucion
9 rho = P.rho*(1/P.PM); % Densidad de las nanoparticulas [mol/m^3]
10 De = P.De;         % Cte. de difusividad efectiva [m^2/s]
11 R = P.R;           % Radio inicial NP [m]
12 No = P.No;         % Numero aparente de NPs [-]
13
14 Cal = 10^(-pH)*1000; % Concentracion de iones [mol/m^3]
15 %disp(Cal)
16
17 dr=-((De*Cal)/rho)*(1/(r-(r^2)/R)); % Variacion radio NP [m/s]
18 dN=4*pi*rho*(r^2)*dr*No;          % Variacion de masa [mol/s]
19 dX = [dN dr]';
20 end

```

Listing 7.6: Modelo de núcleo sin reaccionar