

Trabajo Final de Grado

**Grado en Ingeniería Química**

**Síntesis y caracterización de nanocelulosas  
de orígenes diversos**

**MEMORIA**

**Autor:** Borja Muñoz Bartolomé

**Director:** Jordi Bou Serra

**Convocatoria:** Febrero 2018



Escuela Técnica Superior de Ingeniería  
Industrial de Barcelona



## Resumen

El objetivo general de este proyecto es la síntesis y caracterización de nanocelulosas de orígenes diversos: biotecnológica, natural y, por último, química.

Para lograr este objetivo, ha sido necesaria una introducción teórica previa de los conceptos relacionados con la celulosa y nanocelulosa. En el caso de la celulosa, se ha tratado su estructura química, el polimorfismo que tiene y sus propiedades. En el caso de la nanocelulosa, se han estudiado en profundidad los tipos de la misma, las diferentes aplicaciones y metodología para obtener la nanocelulosa a partir de diferentes materias primas, tiempos de reacción y procedimiento experimental.

Gracias a una búsqueda bibliográfica, se explican con detalle las síntesis que se llevarán a cabo durante este proyecto con sus reactivos, métodos de purificación y procesos adicionales como sería la sonicación.

Los rendimientos obtenidos para la síntesis biotecnológica, natural y química son 4,33g/L, 0,57% y un 10%, respectivamente. Es importante recalcar que en la síntesis natural no se ha podido realizar el pesado en seco de la materia primera, por este motivo tiene un rendimiento tan bajo. Gracias a análisis espectroscópicos de las muestras sintetizadas en laboratorio, como las muestras aportadas por Cellulose Lab y Borregaard, se observaron los picos y en todos los casos se asemejan enormemente.

En el caso del XRD y SEM, los resultados confirman que hay muestras que contienen nanocelulosa como sería la nata de coco y la síntesis química donde se obtienen CNF y CNC, respectivamente. Se han realizado histogramas diámetros de las fibras en las muestras que son fibras de los para estudiar con mayor profundidad cual es el tamaño de las mismas y como varían en las imágenes del SEM.

Se ha realizado también un estudio económico y un estudio sobre el impacto ambiental que provoca la realización de este proyecto.

Finalmente, el trabajo concluye que se han alcanzado tanto el objetivo general como los particulares de este trabajo sintetizando y analizando las diferentes muestras de nanocelulosas de diferentes orígenes.

## Abstract

The main aim of this Project is the synthesis and characterization of nanocelluloses from different sources: biotechnological, natural, and finally, chemical.

To achieve this objective, it was necessary a previous theoretical introduction explaining the concepts related with cellulose and nanocellulose. In case of cellulose, it has been studied the chemical structure, the polymorphism and properties. In case of nanocellulose, it has been deeply studied its types, its different applications and the methodology to obtain nanocellulose from raw materials, reaction times and experimental procedure.

With the aid of a bibliographic search, it is explained in a detailed way all the synthesis that were carried out in this project with its reagents, purification methods and additional processes such as sonication.

The yield obtained in the biotechnological synthesis, the natural and finally the chemical synthesis was 4,33 g/L, 0,57% and 10%, respectively. It is important to stand out that, in the natural synthesis, it was not possible to carry out a measure of the dried raw material that is the reason why it has low yield. Thanks to spectroscopic analysis of the synthesized samples from laboratory, and the samples provided by Cellulose Lab and Borregaard, the nanocelluloses were compared and the peaks from IR in all cases were quite similar.

In the case of XRD and SEM, the results confirm that there are samples that contain nanocellulose such as nata de coco and the chemical synthesis, obtaining CNF and CNC, respectively. Histograms were made from samples which were fibrous, to deeply study the size and how SEM pictures vary depending on samples.

It was realized an economic study and an environmental impact study that causes the realization of this project.

Finally, this project concludes both general and particular objectives were achieved by synthesizing and analyzing different samples of nanocellulose of different origins.

# Índice

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>3</b>
<b>1. GLOSARIO</b>	<b>7</b>
<b>2. PREFACIO</b>	<b>8</b>
2.1. Origen y motivación del proyecto .....	8
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
3.1. Objetivos del proyecto .....	9
3.2. Alcance del proyecto .....	9
<b>4. INTRODUCCIÓN A LOS BIOPLÁSTICOS</b>	<b>10</b>
<b>5. CELULOSA</b>	<b>11</b>
5.1. Estructura de la celulosa .....	13
5.2. Polimorfismo de la celulosa.....	16
5.2.1. Celulosa I .....	17
5.2.2. Celulosa II .....	18
5.2.3. Celulosa III .....	19
5.2.4. Celulosa IV.....	19
5.3. Propiedades de la celulosa .....	20
<b>6. NANOCELULOSA</b>	<b>21</b>
6.1. Introducción a los materiales nanocompuestos .....	21
6.2. Introducción a la nanocelulosa .....	23
6.3. Microfibrillas de celulosa (CMF) .....	24
6.4. Nanofibrillas de celulosa (CNF).....	25
6.4.1. Tratamiento mecánico de las fibras de celulosa .....	26
6.5. Nanocristales de celulosa (CNC) .....	27
6.5.1. Tratamiento ácido de la celulosa.....	28
6.6. Celulosa Bacteriana (BC) .....	29
6.7. Propiedades de la nanocelulosa .....	30
6.7.1. Propiedades mecánicas.....	30
6.7.2. Propiedades térmicas .....	31
6.7.3. Cristalinidad .....	31



6.7.4. Otras propiedades .....	31
<b>7. OBTENCIÓN DE LA NANOCELULOSA .....</b>	<b>32</b>
7.1. Vía biotecnológica.....	32
7.1.1. Biosíntesis de la Celulosa Bacteriana .....	33
7.1.2. Condiciones de crecimiento de la celulosa bacteriana.....	34
7.1.2.1. Fuente de carbono .....	34
7.1.2.2. Fuente de nitrógeno .....	34
7.1.2.3. pH .....	34
7.1.2.4. Temperatura.....	34
7.1.2.5. Disponibilidad de oxígeno .....	35
7.1.3. Producción de la celulosa bacteriana.....	35
7.1.3.1. Fermentación en cultivo estático .....	36
7.1.3.2. Fermentación en cultivo agitado.....	37
7.2. Vía natural.....	40
7.2.1. ¿Qué es la nata de coco? .....	40
7.2.2. Proceso de producción de la nata de coco .....	42
7.3. Vía química .....	43
<b>8. APLICACIONES DE LA NANOCELULOSA .....</b>	<b>44</b>
8.1. Aplicaciones biomédicas y biotecnológicas .....	45
8.1.1. Curación de heridas.....	46
8.1.2. Implantes basados en NC.....	47
8.1.3. Tissue scaffolds .....	49
8.2. Aplicaciones como material de refuerzo .....	50
8.3. Aplicaciones para la industria del papel.....	51
8.4. Aplicaciones en el campo de la electrónica .....	52
<b>9. ESTADO DEL ARTE DE LA NANOCELULOSA .....</b>	<b>53</b>
<b>10. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>55</b>
10.1. Introducción a la Síntesis y Caracterización de la Nanocelulosa .....	55
10.2. Material de laboratorio .....	56
10.2.1. Ultracentrífuga SIGMA K10.....	56
10.2.2. Agitador Magnético IKA C-MAG HS7 .....	56
10.2.3. Colorímetro ZUZI 4200A, X=660nm .....	57
10.2.4. Estufa JP Selecta Conterm.....	57
10.2.5. Liofilizador.....	58
10.2.6. Sonicator Selecta.....	58
10.2.7. Espectrómetro de infrarrojo.....	59
10.3. Síntesis de nanocelulosa por vía biotecnológica .....	60

10.3.1. Composición del medio de cultivo.....	60
10.3.2. Procedimiento experimental.....	61
10.3.3. Separación y purificación de la celulosa bacteriana.....	65
10.3.4. Procedimiento experimental de la réplica.....	69
10.4. Obtención de nanocelulosa por vía natural.....	71
10.4.1. Procedimiento experimental.....	71
10.5. Síntesis de nanocelulosa por vía química.....	76
10.5.1. Procedimiento experimental.....	76
<b>11. ANÁLISIS DE DIFRACCIÓN DE R-X (XRD) _____</b>	<b>80</b>
11.1. Fundamento teórico y condiciones experimentales .....	80
11.2. Resultados experimentales .....	81
<b>12. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA _____</b>	<b>85</b>
12.1. Fundamento teórico y condiciones experimentales .....	85
12.2. Resultados experimentales .....	86
12.2.1. MCC.....	86
12.2.2. CNF .....	87
12.2.3. CNC .....	88
12.2.4. Exilva .....	89
12.2.5. Síntesis biotecnológica .....	90
12.2.6. Nata de coco con NaOH y ácido.....	91
12.2.7. Síntesis química sonicada y no-sonicada .....	92
<b>13. COMPARATIVA DE RESULTADOS DE IR, XRD Y SEM _____</b>	<b>93</b>
<b>14. PLANIFICACIÓN _____</b>	<b>99</b>
<b>15. ESTUDIO ECONÓMICO _____</b>	<b>100</b>
<b>16. IMPACTO AMBIENTAL _____</b>	<b>103</b>
16.1. Generación de residuos .....	103
16.2. Gasto de agua.....	104
16.3. Generación de CO <sub>2</sub> .....	104
<b>17. CONCLUSIONES _____</b>	<b>105</b>
<b>18. AGRADECIMIENTOS _____</b>	<b>108</b>
<b>19. BIBLIOGRAFÍA _____</b>	<b>109</b>



## 1. Glosario

<b>AGU</b>	Anhidroglucopiranososa	<b>P</b>	Primaria
<b>BC</b>	Celulosa Bacteriana	<b>PCS</b>	<i>Plastic Composite Support</i> <i>Soporte compuesto de plastico</i>
<b>CECT</b>	Colección Española de Cultivos Tipo	<b>PET</b>	Polietilentereftalato
<b>CMF</b>	Microfibras de celulosa	<b>PHB</b>	Polihidroxitirato
<b>CMC</b>	Microcristales de celulosa	<b>PIB</b>	Producto Interior Bruto
<b>CNF</b>	Nanofibras de celulosa	<b>PLA</b>	Ácido poliláctico
<b>CNC</b>	Nanocristales de celulosa	<b>PP</b>	Polipropileno
<b>DO</b>	Oxígeno Disuelto	<b>ppm</b>	partes por millón
<b>DP</b>	Grado de Polimerización	<b>RH</b>	Humedad Relativa
<b>EDA</b>	Etilendiamina	<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>EPSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>	<b>SEM</b>	<i>Scanning Electron Microscopy</i> <i>Microscopio electrónico de barrido</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drugs Administration</i>	<b>TAPPI</b>	<i>Technical Association of Pulp and Paper Industry</i>
<b>GFPR</b>	<i>Glass Fiber Reinforced Polymers</i> Polímero reforzado de fibra de vidrio	<b>Tg</b>	Temperatura de transición vítrea
<b>HE</b>	Hestrin & Schramm	<b>UDPG</b>	Uridin Difosfato Glucosa
<b>MCC</b>	Microcelulosa	<b>XRD</b>	<i>X-Ray Diffraction</i> <i>Difracción de rayos X</i>
<b>MMC</b>	<i>Metal Matrix Composites</i> Compuestos de matriz metálica	<b>%wt</b>	Porcentaje en peso
<b>ML</b>	<i>Middle Lamela</i> Lamela intermedia	<b>M\$</b>	Millones de dólares
<b>NC</b>	Nanocelulosa		

## 2. Prefacio

### 2.1. Origen y motivación del proyecto

Actualmente, la contaminación y la preocupación por el medio ambiente son una prioridad para la sociedad, en especial, por la acción de los plásticos ya que éstos tardan decenas o centenares de años en degradarse permaneciendo en mares, océanos o vertederos durante todo este tiempo con la posibilidad de reducir biodiversidad marina o contaminar acuíferos, entre otras muchas afectaciones. Con el objetivo de tratar de cuantificar la contaminación, por residuos plásticos, presente en mares u océanos se presenta a continuación un ejemplo de ello: existe una región dentro del océano Pacífico que se conoce como el *mar de plástico*, que es un área de más de un millón de kilómetros cuadrados que crece año tras año, la cual está compuesta de residuos plásticos de diferentes materiales, tamaños, formas y colores.

Con el objeto de minimizar la contaminación asociada de los plásticos, la sociedad debe de empezar a buscar soluciones antes de que esta situación acabe convirtiéndose en un problema de una mayor envergadura. Recientemente, la Universidad de Kioto encontró una bacteria (*Ideonella sakaiensis* 201-F6) que era capaz de degradar el PET (polietilentereftalato) mediante la producción de ciertas enzimas como sería la PETasa y MHETasa (Yoshida et al, 2006). Investigadores de diferentes grupos de todo el mundo están analizando las distintas aplicaciones de esta bacteria y su utilización para la minimización de residuos plásticos. También esto conlleva un importante efecto indeseado a tener en cuenta ya que existen piezas sensibles como serían rodamientos que han sido fabricadas mediante plásticos y que estos microorganismos pueden degradar completamente conllevando graves problemas asociados.

Otra manera de reducir la contaminación de plásticos es la utilización de polímeros biodegradables, es decir, utilizar materiales que se descomponen en un relativo corto periodo de tiempo gracias a la acción de microorganismos que los transforman en subproducto no nocivo para el medio ambiente e incluso se pueden convertir nutrientes para diferentes seres vivos. Un gran ejemplo de un polímero biodegradable sería la celulosa, la cual es el objeto de estudio de este proyecto. La celulosa se descompone en un breve plazo de tiempo tanto en vertederos como en mares u océanos convirtiéndose en su descomposición en sustancias aprovechables por organismos unicelulares como serían bacterias, entre otros. Durante la realización del mismo se estudiará la celulosa, y en particular, la nanocelulosa tratando en detalle sus respectivas síntesis y aplicaciones más importantes en diferentes campos.

## 3. Introducción

### 3.1. Objetivos del proyecto

El principal objetivo de este trabajo es preparar y caracterizar nanocelulosa. Este biopolímero se obtendrá por vías naturales: a partir de una biosíntesis mediante fermentación de la bacteria *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans* o mediante un postre llamado nata de coco. Por último, se obtendrá nanocelulosa por un procedimiento químico por tratamiento de la celulosa con ácido sulfúrico.

También se han propuesto otros objetivos más específicos a través de los cuales se alcanzará el objetivo principal del trabajo:

- Preparar nanocelulosa por fermentación de la bacteria *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*, de acuerdo a los procedimientos estandarizados en los laboratorios de investigación de la ETSEIB
- Extraer nanocelulosa natural por procedimientos descritos a partir de “nata de coco”, que es un postre en forma de gel acuoso
- Preparar nanocelulosa por vía química por tratamiento de celulosa microcristalina comercial con ácido sulfúrico al 64,8 %
- Purificar las nanocelulosas obtenidas según métodos descritos
- Caracterizar por técnicas espectroscópicas las nanocelulosas preparadas
- Caracterizar morfológicamente las nanocelulosas obtenidas mediante Difracción de Rayos X (XRD) y Microscopía Electrónica (SEM)
- Calcular el porcentaje de cristalinidad y realizar un histograma con los diámetros de las diferentes muestras
- Comparar las propiedades de las distintas celulosas obtenidas

### 3.2. Alcance del proyecto

El alcance principal de este proyecto es la síntesis y caracterización de nanocelulosas de origen diverso. En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de celulosa bacteriana, la extracción de la nanocelulosa natural y, por último, la síntesis química. Gracias a la caracterización de las muestras mediante IR, XRD y SEM se realizará una caracterización morfológica del resultado de las síntesis comparado con unas muestras de nanocelulosa proporcionadas por las empresas Cellulose Lab y Borregaard.

## 4. Introducción a los bioplásticos

En la actualidad, existe un creciente interés por la utilización de materiales provenientes de fuentes renovables como podría ser la madera, no únicamente como materia primera para la producción del papel o para construcción, sino como un avanzado material con excelentes propiedades.

La gran mayoría de materiales poliméricos que se utilizan actualmente provienen del petróleo y poseen un gran inconveniente al final de su vida útil cuando permanecen durante años en vertederos sin degradarse; todo ello sin olvidarse del contaminante proceso de fabricación para la obtención de los mismos. El rápido agotamiento del consumo de petróleo, aproximadamente unas 100.000 veces más rápido de lo que la naturaleza tarda en reemplazarlo, genera una situación altamente insostenible (Netravali y Chabba, 2003).

El reemplazo de plásticos convencionales por polímeros biodegradables, en especial para aplicaciones de corta vida útil como serían el *packaging*, catering y en cirugía, debería de empezarse a ver como una gran evolución en el campo de la sostenibilidad. El potencial de los polímeros biodegradables, y específicamente polímeros que derivan de fuentes agrícolas, como los polisacáridos, se están investigando activamente, muestra de ello serían el gran número de publicaciones al respecto que se han efectuado en la última década.

La celulosa, o más genéricamente se podría hablar de polisacáridos, dispone de conocidas ventajas como serían su bajo coste y peso, que provienen además de una fuente renovable. Ésta se encuentra disponible en gran variedad de formas alrededor del mundo. Además, destaca también por su alta resistencia, superficie reactiva y finalmente, posibilidad de producir energía gracias a su incineración al final de su vida útil. Al final de la vida útil también es posible la degradación de la celulosa, mediante la utilización de hongos o bacterias. Este subproducto acabará utilizándose para una gran cantidad de usos, en los que destacaría el uso agrícola como medio para el crecimiento de nuevas plantas, de las cuales se podrá obtener alimentos u utilizarse como fuente de celulosa.

## 5. Celulosa

La celulosa es el biopolímero más abundante en la tierra. Se produce diariamente principalmente tanto en plantas, tunicados, algas y bacterias. Las plantas son los organismos que producen mayores cantidades de celulosa. Se estima que la producción de celulosa diaria de un árbol adulto es aproximadamente de 10 g. Según diversos autores, se ha estimado la producción anual de celulosa en  $1,3 \cdot 10^{10}$  toneladas según Sandermann (1973) o posteriormente,  $1,5 \cdot 10^{12}$  toneladas según Klemm et al. (2005).

Existen también otros organismos que producen celulosa como sería el caso de los tunicados. En la actualidad, se conoce que existen más de 3000 subespecies dentro del género *Tunicata*. Los tunicados son invertebrados marinos los cuales se encuentran especialmente sujetos a superficies duras, como por ejemplo rocas del suelo oceánico. Como se observa en la figura 1-C, la túnica es una cubierta gruesa que está constituida por celulosa, la cual es generalmente opaca y protege sus cuerpos en forma de barril de los depredadores. En la figura 1-A y 1-B se observan dos ejemplos de tunicados de diferentes especies.

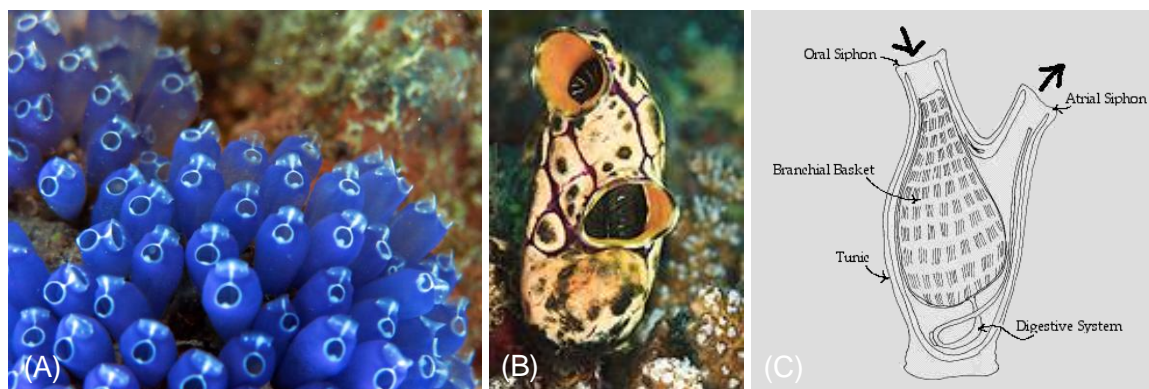


Figura 1. (A y B): Representación de tunicados de diferentes especies; (C): Representación esquemática de las partes de un tunicado. Fuente: St. John's Marine Fife (2018)

Las otras dos fuentes de celulosa son, por un lado, las algas y por otro, las bacterias. Existen diferentes especies de algas que son fuentes de celulosa como por ejemplo: *Valonia*, *Micrasterias denticulate*, *Micrasterias rotata*, *Coldophora*, *Boerogesenia*, entre otras. En el caso de las bacterias, la celulosa bacteriana es un producto metabólico primario de ciertos tipos de bacteria, entre ellos destaca *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*, que es la que se utilizará para la síntesis biotecnológica de la nanocelulosa.



A pesar de que la celulosa se ha estado utilizando durante muchos siglos en gran cantidad de aplicaciones, su composición química, estructura y morfología permanecieron desconocidas hasta que se realizaron avances en técnicas de caracterización como sería la difracción de rayos X (XRD), espectroscopia RMN o microscopía electrónica, entre otros.

En 1838, Anselme Payen (Payen, 1838) fue la primera persona que estableció la celulosa como un componente fibroso el cual se encontraba, como única estructura química, en todas las células de plantas. Descubrió que cuando el tejido de la planta, como podrían ser fibras de algodón o las raíces de los árboles, se purificaba con un tratamiento ácido-amoniaco seguido de una extracción en agua, se formaba un material fibroso, la celulosa. Se precisó prácticamente un siglo hasta que científicos alemanes cuyos nombres fueron Willstatter y Zechmeister establecieron la fórmula básica de la celulosa con la que actualmente se le conoce (Willstatter y Zechmeister, 1913).

En la actualidad, la celulosa es el polímero orgánico más común y una fuente muy importante de materia prima para la creciente demanda de materiales biocompatibles, renovables y ecológicos. Las pastas derivadas de la madera siguen siendo la principal fuente de celulosa.

Como se observa en la figura siguiente, su uso es principalmente para cuatro propósitos: (1) en forma de madera como material para mobiliario o construcción; (2) para la producción de energía; (3) en forma de pasta de papel; (4) para la industria. La gran mayoría de las pulpas producidas se utilizan en la fabricación de papel y cartón. Aproximadamente el 2,5% restante de esta pulpa de celulosa se utiliza en las industrias químicas para la obtención de celulosa regenerada, así como síntesis de ésteres y éteres de celulosa. Estos últimos se utilizan actualmente en revestimientos, películas, membranas de nuevos materiales para la construcción, productos farmacéuticos y alimentarios. (Wüstenberg, 2014).

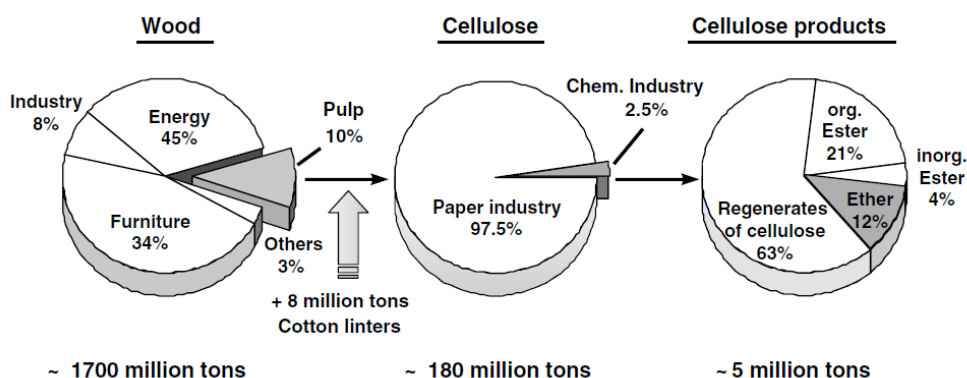


Figura 2. Diagrama del uso de global de la madera y celulosa en el año 2005. Fuente: European Coating Journal (2005)

## 5.1. Estructura de la celulosa

La celulosa ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> es un polímero natural que consiste en una larga cadena de carbohidratos unidos covalentemente. El valor de n se encuentra comprendido entre 10.000 y 15.000. En la figura 3, se puede observar la estructura química de la celulosa.

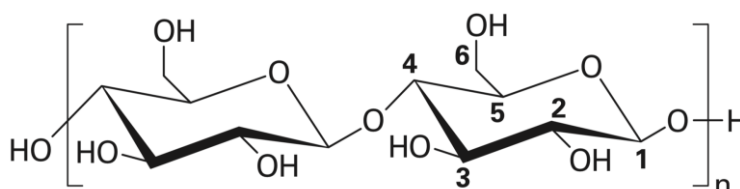


Figura 3. Celulosa (poli (4-(β-D-glucosil)-D-glucosa))

El polímero de celulosa es de tipo lineal homo-polisacárido formado por unidades de D-anhidroglucopiranosas (AGU) unidas mediante los carbonos 1 y 4 con enlaces tipo beta (β-1,4-glicosídico) (Tort-Agell, 2016). El motivo por el que la celulosa sea insoluble en agua es porque los puentes de hidrógeno entre las cadenas de polímero son tan fuertes que el agua no puede romperlos. La celulosa en las plantas tiene una función estructural, es decir, se encuentra recubriendo la pared celular hecho le confieren una importante rigidez estructural a la célula. La celulosa es digerible por algunos rumiantes gracias a ciertas bacterias que contienen en el estómago, en cambio, el ser humano no es capaz de digerirla por el tracto intestinal. A pesar de este hecho, la celulosa se utiliza en la industria alimentaria como aditivo, más concretamente como emulsionante, fibra vegetal o como agente gelificante conocido como E460. Fue aprobado tanto por la Food and Drugs Administration (FDA) como por su homólogo europeo, European Food Safety Authority (EFSA). Algunos ejemplos de productos donde se utiliza con celulosa añadida es en quesos rallados o helados de bajas calorías para mantener la untuosidad reduciendo las grasas, entre otros muchos ejemplos.

El grado de polimerización es la medida del número de unidades de AGU que forman el polímero. Al ser el polímero no homogéneo en longitud, la distribución de pesos moleculares tendrá una influencia en las propiedades como por ejemplo densidades, viscosidades, entre otras propiedades. El DP de la celulosa nativa depende de la fuente de la cual se obtenga. Cuando la celulosa proviene de la madera tiene un DP de 10.000 AGU, en cambio, cuando proviene del algodón tiene un DP de 15.000 AGU (Sjoström, 1981).

En los párrafos anteriores se ha descrito brevemente la estructura de la celulosa a nivel molecular. De igual manera se puede describir en nivel supramolecular donde las cadenas de polímero están ordenadas en regiones cristalinas y no-cristalinas. El tercer y último nivel de estudio es el nivel morfológico que es el que tratarán a continuación.

La figura 4 muestra los diferentes niveles de la estructura de la celulosa donde los polímeros de celulosa (i) se agregan formando microfibrillas (ii) las cuales son largos fardos de moléculas de celulosa estabilizadas mediante puentes de hidrógeno. La dureza y rigidez de la fibra natural provienen de la formación de microfibrillas (ii). Éstas tienen un amplio rango de 2 a 30 nanómetros de anchura y una longitud de varias micras ya que dependen de la fuente de celulosa. La unión de microfibrillas forma una macrofibrilla (iii), las cuales están orientadas en varios estratos de la pared celular (iv) y estas capas difieren tanto en dirección de fibras, como en densidad y textura (Börjesson y Westman, 2015).

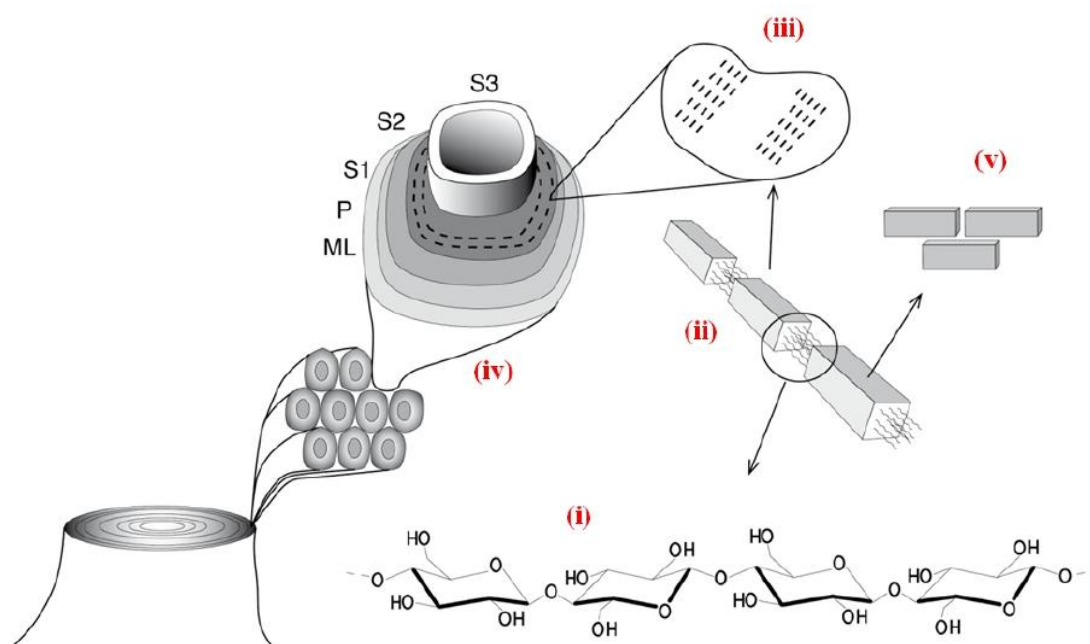


Figura 4. Niveles en la estructura celular de la celulosa. Fuente: Börjesson y Westman (2015)

Existen cuatro tipos de capas en la pared celular las cuales se llaman: P (primaria), S1, S2, y S3 (secundarias) y cada capa está compuestas principalmente de tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. El espesor de la capa P es de unas 100-200 nm. Las capas S1 y S3 son de tamaño nanométrico, mientras que la capa S2 tiene un tamaño de 2 a 5 micras (Kargarzadeh et al., 2017).

Como se observa en la tabla 1, cada fibra proveniente de una fuente diferente de celulosa tiene un porcentaje diferente de celulosa, hemicelulosa, lignina y cera.

**Tabla 1.** Comparativa de celulosa, hemicelulosa, lignina y cera en distintas fibras vegetales.

Fuente: Valadez-Gonzalez et al. (1999), Hattallia et al. (2002), Hoareau et al. (2004)

Fibra	Celulosa (%w)	Hemicelulosa (%w)	Lignina (%w)	Cera (%w)
Bambú	26-43	30	21-31	-
Banana	63-64	19	5	-
Algodón	85-90	5,7	-	0,3
Esparto	45,4	28,5	14,9	2
Bagazo	55,2	16,8	25,3	-
Palma de aceite	65	-	29	-
Piña	81	-	12,7	-
Cáñamo	68	15	10	0,8
Lino	71	18,6-20,6	2,2	1,5

En la capa S2 de la pared celular de plantas superiores, como sería el caso de la madera, es donde hay la mayor cantidad de celulosa (ver figura 5). También es la que aporta un 80% del grosor de total de la fibra (Rong et al., 2001). Entre las células existe una lamela intermedia (ML) la cual tiene como componente la pectina, un polisacárido que enlaza las células uniéndolas proporcionando estabilidad en las fibras. En la figura anterior, los números (ii) y (v) representan nanocelulosa. Más concretamente, el número (ii) representa microfibrillas (CMF) y la (v) representa fibras de nanocelulosa (CNF). Estos dos últimos se estudiarán más en profundidad en el apartado 6. *Nanocelulosa*.

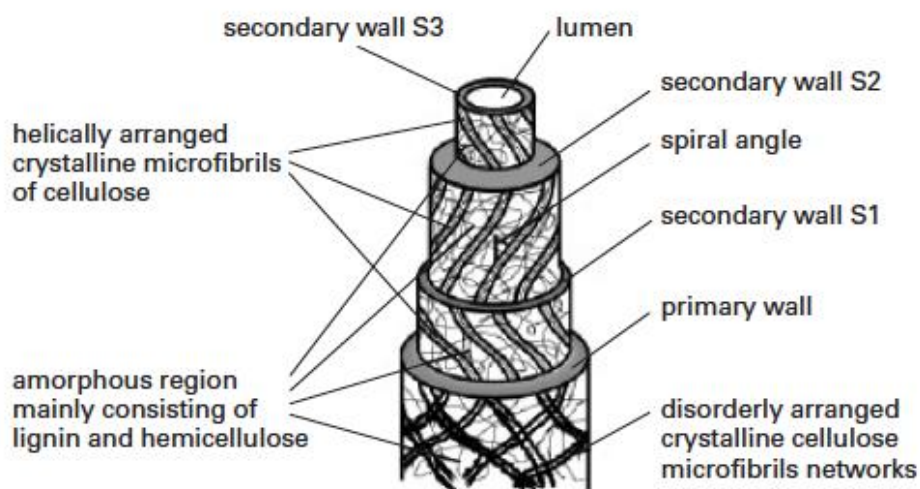


Figura 5. Representación de las partes de la fibra de celulosa. Fuente: Rong et al., (2001)

## 5.2. Polimorfismo de la celulosa

Como se puede observar en la figura 6, la celulosa tiene polimorfismo. Se denomina polimorfismo a la capacidad de una sustancia a tener más de una estructura cristalina en moléculas que contienen puentes de hidrogeno (Bernstein, 2002). Las estructuras polimórficas difieren en propiedades físicas y químicas como la solubilidad, densidad, temperatura de fusión, además de propiedades ópticas o eléctricas, entre otras. La unidad repetitiva de la celulosa, o celobiosa, incluye seis grupos hidroxilo y tres átomos de oxígeno. Debido a las diferentes disposiciones mutuas de los anillos de glucopiranosos y la posibilidad de cambios conformacionales de los grupos hidroximetilo, las cadenas de celulosa pueden exhibir diferentes empaquetamientos cristalinos (Kovalenko, 2010). Como resultado, la celulosa existe en varias modificaciones cristalinas, que difieren en las dimensiones de la celda unidad y, posiblemente, en la polaridad de la cadena. Las posibles transiciones entre los diferentes polimorfos de celulosa se presentan esquemáticamente en la Figura 6.

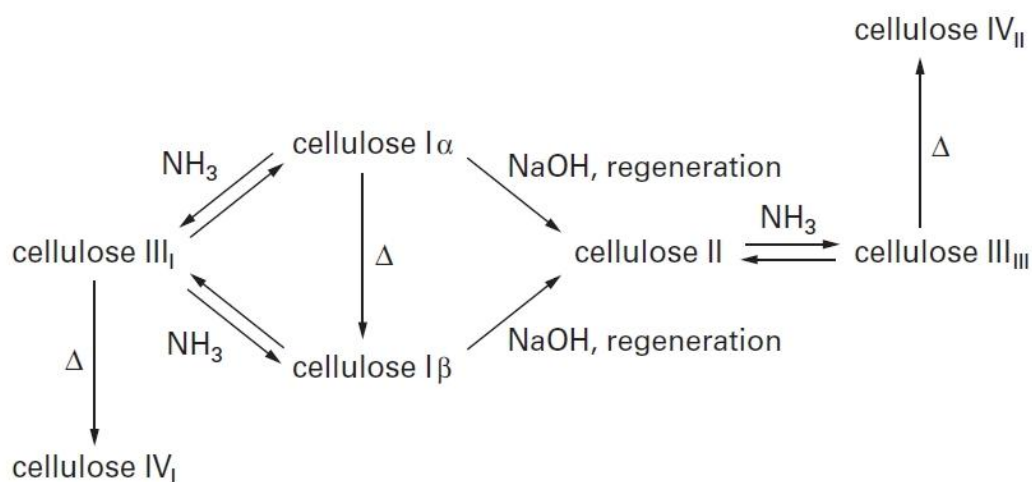


Figura 6. Interconversiones de la celulosa. Fuente: Klemm, D. et al (2005)

En la figura anterior se presentan las diferentes interconversiones que se pueden llevar a cabo en las estructuras de la celulosa. En los sucesivos apartados, se explicarán brevemente las principales características de las 6 formas de los 4 tipos de celulosa.

### 5.2.1. Celulosa I

En la naturaleza, la celulosa se encuentra en la forma cristalina celulosa I, también llamada celulosa nativa. Como primera aproximación, la estructura de la celulosa nativa fue determinada a través de difracción de rayos X y fue descrita como una celda monoclinica que contiene dos cadenas de celulosa (Gardner y Blackwell, 1974).

En el año 1984, Atalla y Vander-Hart mostraron a través de espectroscopía RMN que la celulosa nativa estaba compuesta por más de una estructura cristalina (Atalla y Vander-Hart, 1984). Concretamente, consistía en dos estructuras polimórficas llamadas:  $I_\alpha$  y  $I_\beta$  las cuales se pueden observar en la figura 7. Las diferencias se reportaron en las resonancias de los carbonos  $C_1$  donde apareció un singulete y un doblete alrededor de 106 ppm para la celulosa  $I_\alpha$  y  $I_\beta$  respectivamente. Ambas estructuras tienen la misma conformación del esqueleto de la cadena, aunque difieren en los patrones en los enlaces de hidrógeno. La fase  $I_\alpha$  representa la fase triclinica con celda de una cadena de celulosa por celda unitaria, mientras que la forma  $I_\beta$  representa una fase monoclinica con celda de dos cadenas de celulosa por celda unitaria.

La proporción de las dos estructuras alotrópicas  $I_\alpha$  y  $I_\beta$  difieren enormemente en función de la especie en cuestión. La fase  $I_\alpha$  se encuentra principalmente en organismos primarios, como serían las algas o bacterias. La celulosa bacteriana, por ejemplo, proveniente de *Acetobacter xylinum*, tiene un porcentaje del 70% del polimorfismo  $\alpha$ . Mientras que la celulosa  $I_\beta$  se encuentra mayormente en plantas superiores (algodón, madera, entre otros) las cuales disponen de un 64% del polimorfismo  $\beta$  y en la túnica de animales marinos como sería en *Halocynthia roretzi* (Belton et al., 1989).

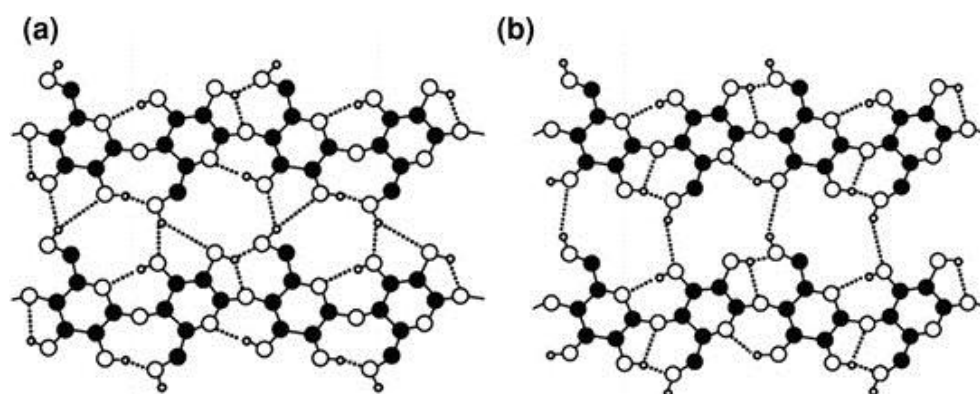


Figura 7. (A): Representación de la celulosa  $I_\alpha$  y (B) la celulosa  $I_\beta$ . Fuente: American Chemical Society (2006)

El contenido de celulosa  $I_\alpha$  y  $I_\beta$  puede ser modificado mediante acciones externas. El polimorfismo  $\alpha$  se puede convertir, en parte, a una fase  $\beta$  mediante el proceso de recocido (*annealing*) entre 260 a 280°C en diversos medios, como disolventes orgánicos o helio (Debzi et al., 1991) o mediante el paso intermedio por la celulosa III.





### 5.2.3. *Celulosa III*

La celulosa III se obtiene mediante el tratamiento de amonio o de ciertas aminas como por ejemplo la etilendiamina (EDA) con la celulosa I, seguido de un lavado con alcohol. Si la materia prima es la celulosa I, conduce a la forma de la celulosa III<sub>I</sub>. En cambio, si la materia prima es la celulosa II, se obtiene la celulosa III<sub>II</sub>. La polaridad de la celulosa resultante de este proceso se asemeja al material inicial. Las dimensiones de la celulosa III<sub>I</sub> y la celulosa III<sub>II</sub> son muy similares.

Como se puede observar en la figura 6, las transformaciones anteriormente mencionadas son reversibles, lo que sugieren es que la orientación de la cadena resultante es análoga al de forma anterior. En cambio, a nivel cristalino, se produce una gran decristalización y fragmentación de los cristales de celulosa durante la conversión de celulosa I a celulosa III. Durante la transición inversa, es decir, el paso de celulosa III a celulosa I, tiene lugar una recristalización parcial por el hecho que la fragmentación y distorsión de los cristales producida anteriormente es irreversible.

### 5.2.4. *Celulosa IV*

Al tratar la celulosa III a altas temperaturas en glicerol, esta se transforma a celulosa IV. De la misma manera que se ha tratado en el apartado anterior con la celulosa III, en función de la materia prima en forma de celulosa de la cual se parte se obtienen unas celulosas diferentes. Si se parte de celulosa III<sub>I</sub> se obtiene celulosa IV<sub>I</sub>. Equivalentemente sucede con la celulosa III<sub>II</sub>. En la figura 6 se puede ver más claramente el esquema general de las interconversiones.



### 5.3. Propiedades de la celulosa

La celulosa es un producto renovable, degradable y reciclable que puede ser denominada *eco-friendly*. Tiene una serie de características que la caracterizan como podrían ser por un lado la insolubilidad en agua (aunque es una sustancia higroscópica puede absorber entre un 8 a un 14% de agua), también reacciona con ácidos fuertes y es una sustancia combustible.

A continuación, se detallarán algunas de las propiedades físicas más importantes de la celulosa. Es importante recalcar en este apartado que muchas de estas propiedades pueden variar enormemente en función de la fuente de la celulosa de la cual proviene, así como, del tamaño de las fibras de la misma.

- La densidad estará comprendida entre 1,27 y 1,61 g/cm<sup>3</sup>
- No presenta punto de fusión ya que al calentarse no funde, sino que se degrada a temperaturas elevadas
- El valor de la temperatura de transición vítrea se encuentra alrededor de los 230 °C en seco, ya que este valor disminuye a medida que aumenta el agua contenida.
- Calor de combustión: 17,3 kJ/g en función si se analiza el algodón o la pulpa de madera (Jessup y Prosen, 1950)

Como se ha visto anteriormente con la variación en las propiedades, lo mismo sucede con el grado de polimerización. En la tabla siguiente, se ejemplifican el DP en función de fuentes de obtención.

**Tabla 2.** Grado de polimerización en función del origen de celulosa. Fuente: Wüstenberg (2014)

Fuente de obtención	Grado de polimerización
Madera de diferentes especies	6.000-10.000
Lino textil	8.000-9.000
Hierba china	6.500
Pulpa de madera	500-3.500
Algodón	10.000-15.000
Celulosa bacteriana	2.500-6.000
Celulosa bacteriana ( <i>Glucacetobacter xilynus</i> )	600
Rayón (seda artificial)	300-500
Celofán	300
Alga Valonia	25.000

## 6. Nanocelulosa

### 6.1. Introducción a los materiales nanocompuestos

Desde la antigüedad ha habido una necesidad de búsqueda de nuevos materiales. La obtención de los mismos ha tenido un gran impacto en la economía global y en la mejora de la calidad de vida. Para ejemplificar la afirmación anterior, brevemente se detallará una escala de tiempo de la historia con el descubrimiento de nuevos materiales que se encuentra en la figura 9: sobre del año 10.000 a.C se empezó a utilizar la piedra y la madera como materiales constructivos, hecho que ayudó a la humanidad a resguardarse del frío gracias a la construcción de refugios y a utilizar la madera como fuente de calor y para la cocción de alimentos. Sobre el año 1000 a.C se empezó a utilizar el hierro el cual fue utilizado para todo tipo de herramientas y fue de gran utilidad para la industria del armamento de la época al poder realizar, por ejemplo, espadas y flechas.

No fue hasta el siglo XX cuando se empezó a utilizar en multitud de ámbitos el cemento, el acero, además de polímeros y *composites*. Se define como un *composite* a un material cuya combinación macroscópica de dos o más materiales diferentes los cuales disponen de una interfaz entre ellos reconocida. Esta combinación proporciona a los materiales propiedades mejoradas que por sí solos no las tendrían. En la figura siguiente se puede observar la importancia relativa que han tenido los metales, polímeros, *composites* y materiales cerámicos a lo largo de la historia (Palucka y Bensaude-Vincent, 2004).

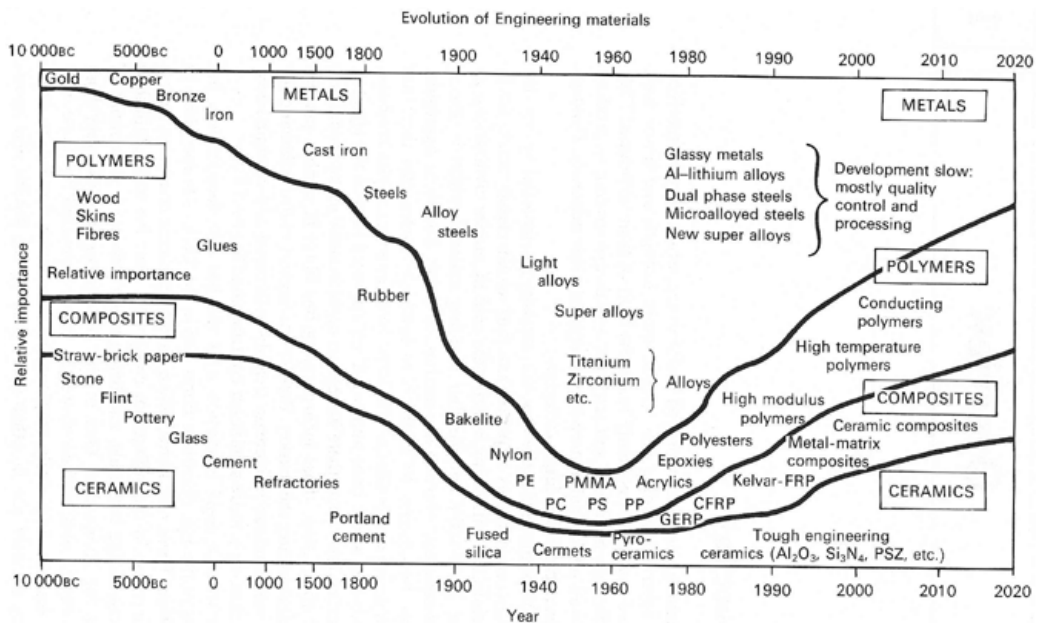


Figura 9. Diagrama que ejemplifica la importancia relativa de diferentes materiales a lo largo de la historia.

Fuente: Palucka y Bensaude-Vincent (2002)

Como se puede observar en la figura 9, los *composites* en las últimas décadas han ganado en importancia. Generalmente, se habla de 4 generaciones de *composites* que empiezan en la década de los 30 del siglo pasado hasta la actualidad.

La primera generación empezó con la producción de la fibra de vidrio en 1932 por Owens Industries en Estados Unidos. Años más tarde, Saint-Gobain a empezó a producir en Europa la fibra de vidrio gracias al traspaso de derechos de producción de Balzaretti Modigliani. La principal aplicación de la fibra de vidrio era como refuerzo en polímeros, también llamado polímeros reforzados con fibra de vidrio (GFPR), la cual aportaba una mayor solidez y rigidez al producto final ya que las fibras detenían la propagación de las grietas dentro de la matriz de polímero. Una de las primeras aplicaciones del GFPR fue en la industria marítima, más concretamente en el desembarco de Normandía, donde los barcos aliados estaban reforzados con fibra de vidrio. Con posterioridad, también fue utilizada en la industria aeronáutica para aviones de combate.

En la segunda generación, que comprendía los años 60 del siglo pasado, se investigaron *composites* de alto rendimiento que se utilizaron para la era espacial como serían los materiales compuestos de matriz metálica (MMC). Estaban compuestos por un metal y por fibras cerámicas que le aportaban resistencia a la temperatura en metales ligeros, una reducción del coeficiente de expansión térmica, además de, conferirle una mayor fuerza y rigidez. En esta etapa también se desarrollaron la fibra de carbono y el kevlar los cuales eran utilizados principalmente para la industria bélica.

La tercera generación, que comprendía los años 70 a 80 del siglo pasado, se fundamentó en la búsqueda de nuevos mercados para los productos inventados en la generación anterior. Nuevos mercados se abrieron principalmente en aplicaciones civiles y para el sector deportivo para estos materiales que fueron de la era espacial y militar. Por ejemplo, en el caso de la fibra de carbono se utilizó para raquetas de tenis y palos de golf. Estos avances supusieron un cambio en ambos deportes por la mayor velocidad de la pelota en el primero y la mayor distancia que cubría la bola de golf en la segunda (Palucka y Bensaude-Vincent, 2004). La utilización de los mismos conllevó un incremento progresivo de los costes del equipamiento deportivo.

Por último, la cuarta generación de materiales se fundamentó, por un lado, en los materiales híbridos y, por otro lado, en los nanocompuestos como sería el material de estudio de este proyecto, la nanocelulosa. En la actualidad se siguen investigando nuevos nanomateriales y nuevas aplicaciones de los descubiertos previamente.

## 6.2. Introducción a la nanocelulosa

Se denomina nanocelulosa (NC) al cristal o fibra de celulosa que tienen al menos una dimensión dentro del rango de tamaño del nanómetro. La nanocelulosa puede tomar forma de nanofibras o nanocristales.

Existen diversos tipos de nanocelulosa que pueden ser clasificados en diferentes subcategorías en función de la forma, dimensión, función, método de fabricación, entre otros. Diferentes terminologías se han ido utilizando a lo largo del tiempo para los diferentes tipos de NC, pero en el año 2011 la Asociación Técnica de la Pulpa y de la Industria del Papel (TAPPI) propuso unos términos estándares y sus respectivas definiciones para celulosa nanométrica. Se puede observar la clasificación efectuada por la TAPPI en la figura 10.

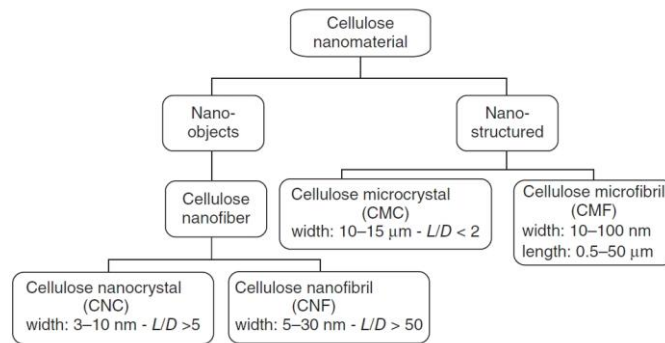


Figura 10. Clasificación de nanomateriales de celulosa. Fuente: Mariano et al. (2014)

En la figura 11 se observan diversas fibras y microfibras de celulosa con sus respectivas regiones cristalinas y no-cristalinas. Mediante la adición de ácido, se elimina la región no cristalina y únicamente permanece la región cristalina, la cual se acaba convirtiendo en nanocristales de celulosa (CNC). En cambio, gracias al tratamiento mecánico se produce una rotura de los enlaces entre fibrillas y se forman formando nanofibras de celulosa (CNF) manteniendo la región cristalina y no-cristalina.

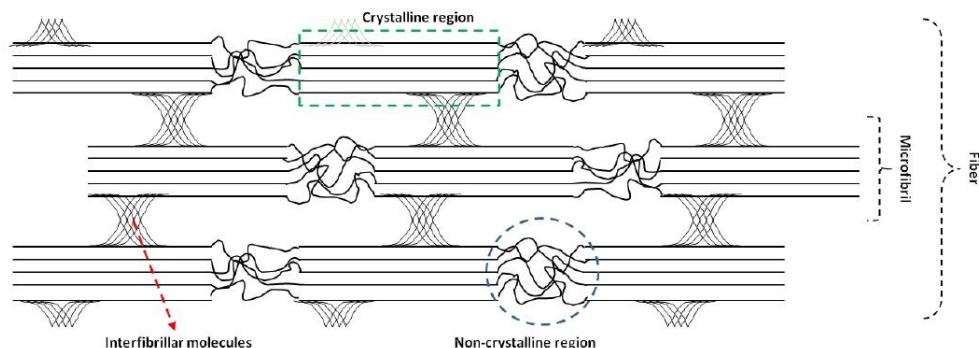


Figura 11. Representación de la región cristalina y no-cristalina de una fibra de celulosa.

Fuente: Börjesson y Westman. (2015)

En figura 12, se observan (a) MCC de hierba, (b) CMF de remolacha, (c) CNF de piel de banana, (d) CNC de ramio:

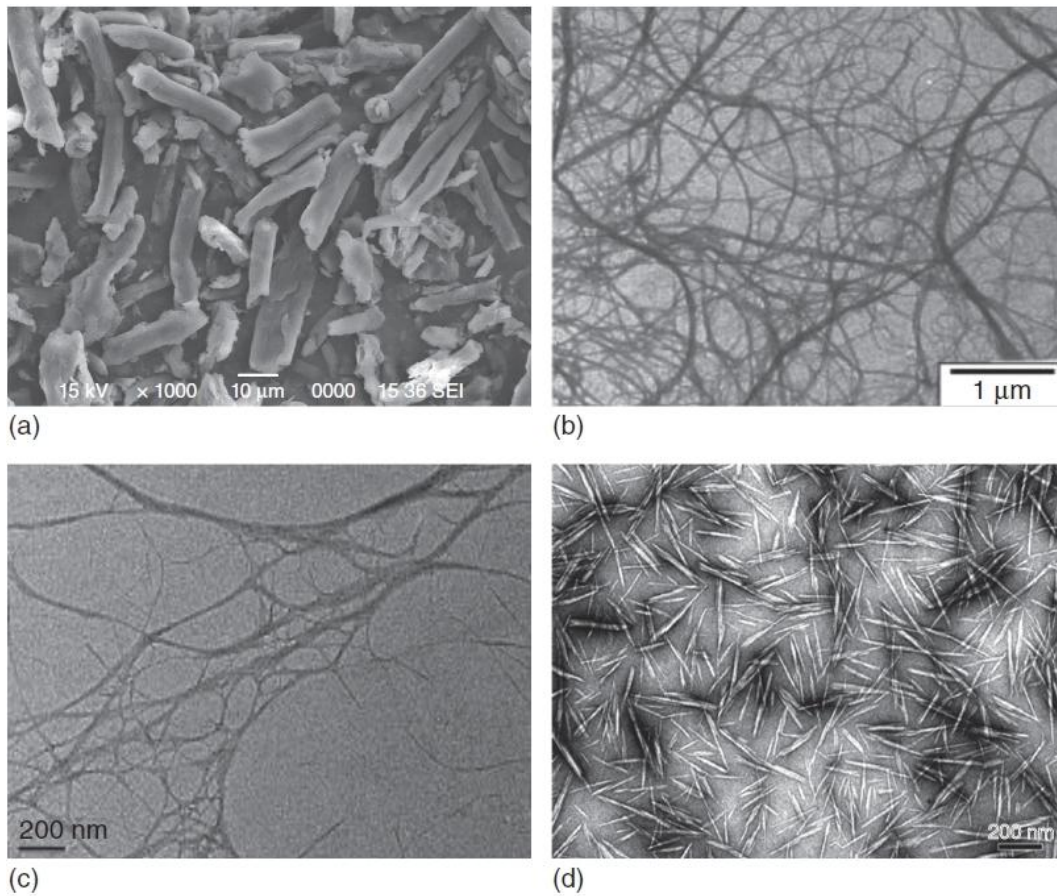


Figura 12. Formas de celulosa mediante microscopio electrónico. Fuente: (a) Kalita *et al.* (2013); (b) Dufresne *et al.* (1997); (c) Pelissari *et al.* (2014); (d) Habibi *et al.* (2008)

### 6.3. Microfibrillas de celulosa (CMF)

Las microfibrillas de celulosa (CMF) pueden ser producidas por vía intensiva mecánicamente refinando celulosa purificada. CMF tienen una anchura de 20-100 nm y la longitud varía entre 500 a 2000 nm. En la figura 13 se visualiza una muestra de MCC.



Figura 13. Muestra de MCC. Fuente: Travel Press Club (2007)



## 6.4. Nanofibrillas de celulosa (CNF)

En ocasiones, la terminología CNF y CMF se intercambia en literatura científica. Las nanofibrillas de celulosa (CNF) tienen un diámetro comprendido entre 20–50 nanómetros y una longitud que varía entre los 500 a 2000 nanómetros (Kargarzadeh et al., 2017).

Las nanofibras, a diferencia de los CNC, son producidas mediante un tratamiento mecánico preservando la región no-cristalina en las microfibrillas, así como, las longitudes de las mismas. Las microfibrillas son haces largos y filiformes de moléculas de celulosa que se estabilizan mediante enlaces de hidrógeno principalmente por los grupos hidroxilo del polímero de celulosa. Durante el tratamiento mecánico, las fuerzas pelarán las fibras y los enlaces interfibrilares entre las moléculas de celulosa se romperán dando lugar a nanofibrillas con un diámetro de dimensiones nanométricas y longitud de fibra de comprendida entre micras y nanómetros. La empresa RISI realizó un estudio de mercado de la CNF y lo mostró en la Conferencia TAPPI de Nanomateriales en 2014. En ese año tuvo un mercado de unos 28,2 M\$ y la previsión es que llegue a los 158,3 M\$ en 2019.

Las nanofibras de celulosa pueden ser producidas mediante diferentes fuentes de celulosa. Bhatnagar y Sain en 2005 estudiaron la posibilidad de obtener CNF a partir de celulosa de plantas debido a su abundancia y bajo coste. Una de las principales aplicaciones de la CNF sería como refuerzo de la matriz polimérica por la longitud y flexibilidad de sus fibras (Bhatnagar y Sain, 2005). En la figura 14 se puede observar CNF a través de microscopio electrónico.

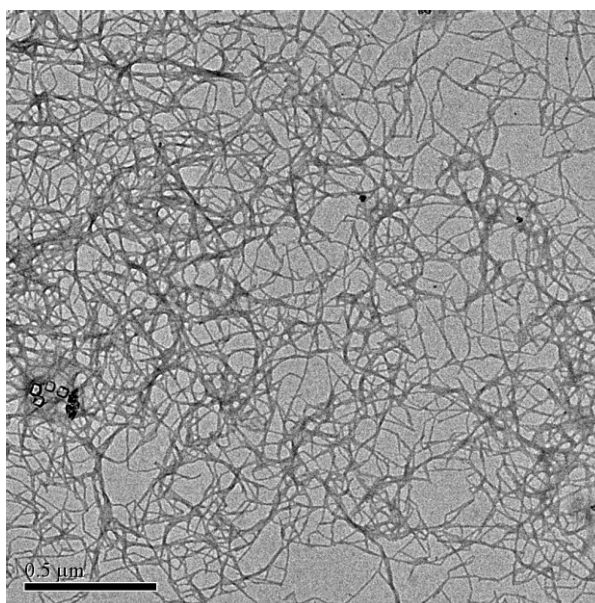


Figura 14. CNF mediante microscopio electrónico. Fuente: CelluloseLab (2018)

#### 6.4.1. *Tratamiento mecánico de las fibras de celulosa*

El tratamiento mecánico de las fibras consiste, en primer lugar, en un proceso de refinado o *cryochrusching* de la pulpa seguida un proceso de la homogenización a alta presión para obtener nanofibras individuales de celulosa. El proceso de refinado de las fibras tiene como objeto la reducción de la cantidad de lignina, hemicelulosa y pectina (Kamel, 2007).

Durante el proceso de refinado, una suspensión de celulosa al 1-2 wt% es tratada a presión en un *blender* donde las fibras se someten a ciclos de estrés los cuales producen cambios en la morfología y longitud de las mismas. Este proceso se lleva a cabo previamente a la individualización de las fibras de celulosa ya que el refinado provoca la descamación de las capas externas de la pared celular como serían la capa P y S1. De esta manera, queda expuesta la capa S2, que es la capa que contiene una mayor cantidad de celulosa. Finalmente, este proceso provoca fibrilación interna liberando la pared de la fibra lo que es adecuado para el proceso de homogenización. En la figura 15 se observa la materia prima que se utiliza en el refinado para obtener MCC.



Figura 15. Bagazo que se transforma en MCC para hacer posteriormente un proceso de homogenización. Fuente: Godavari Biorefineries Ltd. (2018)

En el segundo método para extraer fibras de celulosa, el *cryochrusching*, se utiliza pulpa congelada mediante nitrógeno líquido. La pulpa es mecánicamente triturada y gracias a los cristales de hielo que se forman dentro de la pared celular ayudan a extraer fragmentos de pared celular. Posteriormente, estos pequeños cristales son disueltos en agua para su homogenización.

La individualización de las fibras se lleva a cabo en el homogeneizador. En este proceso tanto para las suspensiones refinadas y como para las suspensiones diluidas de fibras de celulosa son bombeadas a altas presiones haciendo que pasen a través de unas válvulas de resorte. Estas válvulas se abren y cierran con enorme rapidez creando grandes caídas de presión que producen un efecto de cizallamiento y este efecto unido a las fuerzas de impacto aportan un alto grado de microfibrilación que dan como resultado una solución de CNF. El número de veces que se repite el ciclo dentro del homogeneizador depende de la materia prima inicial.

## 6.5. Nanocristales de celulosa (CNC)

Los nanocristales de celulosa o CNC tienen unas dimensiones y cristalinidad que pueden variar dependiendo de la materia prima de la cual se parta y del procesamiento que se lleve a cabo. Se ha observado que las partículas de nanocelulosa obtenidas mediante tunicados son más largas comparadas con las obtenidas de la madera o algodón (Peng et al., 2011). El diámetro está comprendido entre los 5 y 50 nanómetros y la longitud tiene un rango de 100 a 500 nanómetros.

En la tabla 3 se pueden observar características geométricas de nanocristales provenientes de diferentes orígenes. Al comparar los distintos orígenes, se observa que en el caso de la madera tanto el diámetro y longitud suelen ser menores que los CNF obtenidos mediante por el algodón.

**Tabla 3.** Características geométricas de cristales de celulosa de diferentes orígenes. Fuente: Beck-Candanedo et al. (2005), Dufresne (2006); Araki et al. (1998); Strømme et al. (2002)

Origen de celulosa	Longitud (nm)	Diámetro (nm)	Ratio axial (L/D)
Madera	100-300	3-5	30-70
Algodón	100-400	7-15	10-20
Alga Valonia	100 nm a $\mu\text{m}$	10-20	-
Tunicate cellulose	100 nm a $\mu\text{m}$	10-20	-
Paja de trigo	220	5	45

Los nanocristales de celulosa tienen unas características tanto de resistencia a la tracción como de módulo de elasticidad que son muy superiores a otros materiales como serían el caso del kevlar o el cable de acero, pero inferiores si se comparan con los nanotubos de carbono. En la tabla 4 se realiza una comparativa de resistencia a la tracción y módulo elástico de diversos materiales:

**Tabla 4.** Cuadro comparativo de resistencia a la tracción y módulo elástico diferentes materiales. Fuente: Börjesson y Westman (2015)

Material	Resistencia a la tracción (GPa)	Módulo elástico (GPa)
CNC	7,5–7,7	110-220
Kevlar	3,5	124-130
Cable de acero	4,1	210
Fibra de carbono	1,5-5,5	150-500
Nanotubos de carbono	11-63	270-950



Los cristales de nanocelulosa son formados durante la hidrólisis ácida de las fibras de celulosa donde se rompen las moléculas interfibrilares que unen las diferentes microfibrillas y se separa la región no-cristalina (ver figura 16). En el primer estadio de la hidrólisis el ácido se difunde en las zonas no cristalinas de la celulosa e hidroliza los grupos glucosídicos. Posteriormente, estos grupos son hidrolizados y la hidrólisis finaliza cuando se reduce el último grupo de la superficie del nanocristal se reduce.

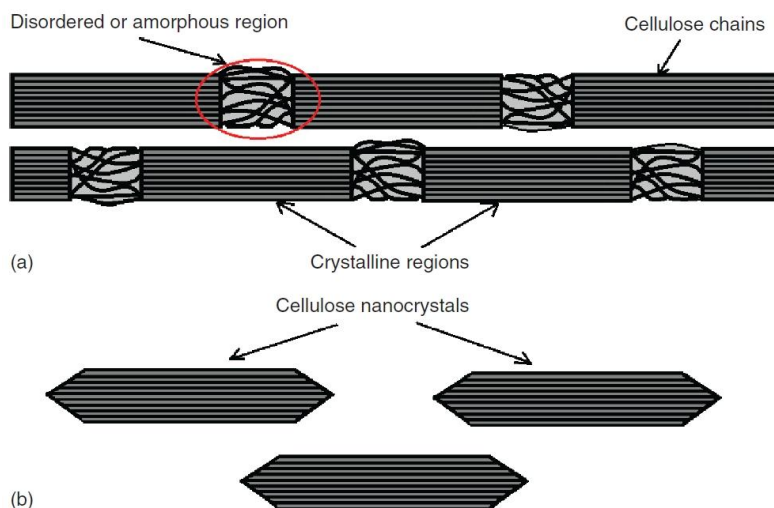


Figura 16. (a) Posible estructura de unión entre en dominio amorfo y cristalino en nanofibras de celulosa (CNF); (b) nanocristales de celulosa aislados (CNC). Fuente: Royal Society of Chemistry

La empresa RISI realizó un estudio de mercado de la CNC y lo mostró en la Conferencia TAPPI de Nanomateriales en 2014. En ese año tuvo un mercado de aproximadamente unos 18 M\$ y la previsión es que llegue a los 116,6 M\$ en 2019. Como se puede observar, en 5 años de diferencia las ventas prácticamente 7 veces superior que respecto el año 2014, hecho que posiblemente se deba a las nuevas aplicaciones del producto.

### 6.5.1. Tratamiento ácido de la celulosa

Cuando la pulpa de la celulosa se trata con ácido, ésta empieza a degradarse por su parte más accesible de la fibra, la parte exterior. Los factores más importantes que controlan la hidrólisis ácida de la pulpa de papel son: la concentración de ácido, el tiempo de reacción, y la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción, entre otros muchos factores. Un tiempo de reacción demasiado largo hidrolizará completamente los cristales de celulosa, en cambio, uno demasiado corto aportará un grado de polimerización elevado (DP) debido a las grandes fibras no dispersas (Beck-Candanedo et al, 2005). La temperatura y tiempo de reacción están correlacionados, cuanta mayor es la temperatura menor es el tiempo de reacción. La concentración del ácido y el ratio de pulpa afectan también como los anteriores factores a las propiedades de la nanocelulosa. En el apartado 7.3. *Vía Química* se tratará más en profundidad la parte experimental del tratamiento ácido de la celulosa.

## 6.6. Celulosa Bacteriana (BC)

El último tipo de celulosa que se explicará en este apartado es la celulosa bacteriana (BC). La celulosa bacteriana es un polímero extracelular sintetizado a partir de la fermentación de microorganismos, principalmente por bacterias del género *Acetobacter*. Estas bacterias tienen una amplia presencia en la naturaleza donde llevan a cabo fermentación de azúcares, gracias a la cual producen la conversión de etanol a ácido acético. Estas bacterias han sido utilizadas durante años en la industria para la obtención de ácido acético. La BC fue descrita en 1886 por Adrian J. Brown (Brown, 1886) como “una membrana gelatinosa traslúcida que crece en la superficie del medio de cultivo”. Posteriormente, fue descrita por Pasteur como “una especie de piel húmeda, hinchada, gelatinosa y resbaladiza” (Ring, 1982). En la tabla siguiente se podrán observar otras bacterias que son capaces que producir BC y la estructura de la celulosa posterior:

**Tabla 5.** Productores de celulosa bacteriana. Fuente: Jonas y Farah (1998)

Genéro de bacterias	Estructura de la celulosa
<i>Acetobacter</i>	Película extracelular compuesta de <i>ribbons</i>
<i>Achromobacter</i>	Fibrillas
<i>Aerobacter</i>	Fibrillas
<i>Agrobacterium</i>	Pequeñas fibrillas
<i>Alcaligenes</i>	Fibrillas
<i>Pseudomonas</i>	No se distinguen fibrillas
<i>Rhizoium</i>	Pequeñas fibrillas
<i>Sarcina</i>	Celulosa amorfa

La razón por la cual los microorganismos producen celulosa ha sido discutida en diversos reportes (Iguchi et. al., 2000). La primera teoría se basa en que las bacterias aeróbicas producen una película para mantener su posición cerca de la interfase aire-medio de cultivo. La segunda asume que las bacterias generan celulosa para protegerse de los rayos ultravioletas, y la tercera teoría propone que los microorganismos producen una “jaula” para protegerse de enemigos e iones de metales pesados mientras que los nutrientes pueden ser suministrados fácilmente por difusión.

Una de las principales características de la celulosa bacteriana que las diferencian de la celulosa proveniente de las plantas es, por un lado, su pureza química y, por otro lado, la ausencia de hemicelulosa y lignina. También es importante recalcar que esta celulosa de origen bacteriano es idéntica en composición química a la celulosa vegetal, aunque presenta diferencias significativas respecto a su conformación estructural. La estructura de la celulosa bacteriana se encuentra formando cristales de celulosa I<sub>α</sub> y I<sub>β</sub>. En el apartado 7.1. *Vía biotecnológica* se tratará en profundidad el procedimiento para llevar a cabo este tipo de celulosa.

## 6.7. Propiedades de la nanocelulosa

### 6.7.1. Propiedades mecánicas

Debido a su cristalinidad y estructura nanométrica, la nanocelulosa tiene excelentes propiedades mecánicas, la cual la convierte en un material adecuado para resistir esfuerzos elevados. Los estudios se han centrado en el caso de láminas secas de entre 20-200  $\mu\text{m}$ . Los valores de módulo de elasticidad dependiendo si el método de secado es solo con aire o con un prensado en caliente pueden variar entre 16 y 18 GPa de manera isotrópica, es decir, sin depender de la dirección en que son analizadas. Asimismo, el esfuerzo a la tracción y la deformación de las láminas secas alcanzan 260 MPa y 2.1%, respectivamente (Yamanaka et. al., 1989). En la tabla 6 se puede observar una comparativa del módulo de elasticidad, esfuerzo a tracción y porcentaje de elongación de diferentes materiales. Se observa que la nanocelulosa tiene un módulo de elasticidad de más de 15 veces el del polipropileno y aproximadamente unas 10 veces el esfuerzo de tracción. En cambio, la NC tiene un porcentaje de elongación mucho menor que en los casos de la tabla siguiente.

**Tabla 6.** Propiedades mecánicas de materiales orgánicos. Fuente: Svagan et al. (2007), Henriksson et al. (2007)

Material	Módulo de Elasticidad [GPa]	Esfuerzo a la tracción [MPa]	Elongación [%]
Nanocelulosa	15 - 35	200 - 300	1,5 – 2,5
Polipropileno (PP)	1 - 1,5	30 - 40	100 - 600
Polietileno Tereftalato (PET)	3-4	50 - 70	50 - 300
Celofán	2-3	20 - 100	15 - 40

Las condiciones experimentales de temperatura y humedad también afectan a las mediciones. A una humedad relativa (RH) del 0%, la elongación y el módulo de Young decrecieron desde el 2,1% y 18 GPa (Svagan et al., 2007) a un 8,9% y 14,7 GPa respectivamente a un 50% de RH (Henriksson et al., 2007). En estudios posteriores se observó que cuando se incrementa la RH del 5 al 90% el módulo se reduce de 30 a 18,9 GPa (Aulin et al., 2010). Este hecho se explica porque el agua presente en la parte amorfa actúa como un plastificante reduciendo las interacciones moleculares entre las fibrillas de material reduciendo de esta manera la rigidez del material.

### **6.7.2. Propiedades térmicas**

Se ha determinado que la degradación de la nanocelulosa en estado puro y sin tratamiento inicia entre los 290 y 298 °C. Esta celulosa no funde y la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) oscila entre 220 y 250 °C (Back y Salmén, 1982) (Kalaschnik et al., 1991).

### **6.7.3. Cristalinidad**

La estructura cristalina es una de las características más prometedoras de NC, induciendo mejores propiedades mecánicas e interfaciales que en la celulosa vegetal. Se compone de celulosa tipo  $I_\alpha$  y  $I_\beta$ , que corresponden respectivamente a celdas unitarias triclinicas y monoclinicas. La proporción de cada uno varía debido a diferentes condiciones de cultivo, por lo que puede modificarse si se cambia el medio nutritivo, el tipo de reactor, el pH o la cepa bacteriana.

### **6.7.4. Otras propiedades**

Como se observará en el apartado 8. *Aplicaciones de la nanocelulosa*, existen otras propiedades importantes que no han estado mencionadas anteriormente, como sería la biocompatibilidad que se podría definir como la ausencia de reacciones alérgicas o inmunitarias con el contacto entre los tejidos del organismo y el material. Esta propiedad, unida a la alta resistencia a la tracción, confiere a la nanocelulosa la posibilidad de utilizarse en aplicaciones biomédicas tales como apósitos para curación de heridas, implantes y *tissue scaffolds*.

Recientemente se realizaron estudios para conocer la compatibilidad sanguínea con la nanocelulosa y fueron favorables, por lo que se puede decir que la nanocelulosa es hemocompatible. Esta propiedad hace que la NC se pueda utilizar como injerto venoso.

## 7. Obtención de la nanocelulosa

### 7.1. Vía biotecnológica

La nanocelulosa producida por vía biotecnológica, también llamada celulosa bacteriana (BC), es sintetizada por la fermentación de bacteria del género *Gluconacetobacter*. Dentro del género *Gluconacetobacter*, la bacteria que produce la celulosa de manera más eficiente es la bacteria gram-negativa del género *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans* (Dary et al., 2012). Su morfología es de tipo bacilo con forma de bastón y de una longitud de entre 2 a 10 micras y una anchura de 0,5 a 1 micra. Su fórmula molecular es  $\text{CH}_2\text{O}_{0,52}\text{N}_{0,23}$  y es de tipo aeróbica (Mohammad et al., 2014). En la figura 17, se puede observar una figura de la bacteria productora de la BC con los agregados extracelulares de celulosa.

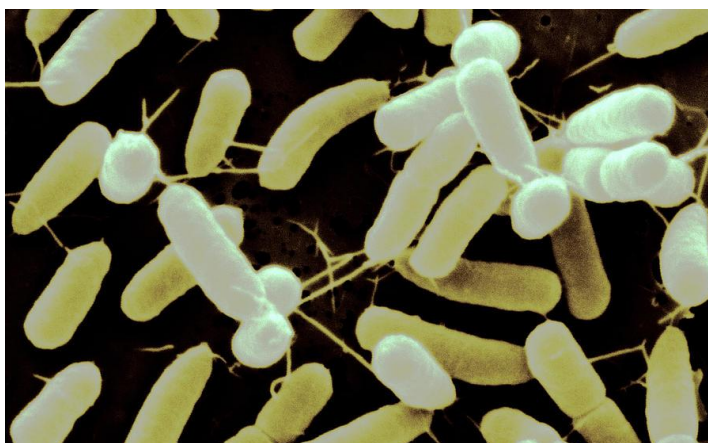


Figura 17. Representación de la bacteria *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans* mediante microscopio. Fuente: Alchetron (2018)

La celulosa bacteriana puede ser producida mediante fuentes de carbono diversas como podrían ser la glucosa, sacarosa, manitol o arabitol, entre otros polisacáridos. En el apartado 7.1.2 se tratarán más en profundidad las condiciones óptimas para la producción de BC.

La función fisiológica que lleva a cabo la celulosa en la bacteria, la cual es el motivo por el cual se encuentra en forma de agregados extracelulares, es conferir protección mecánica, química y biológica, además de mantener a la población bacteriana en la interfase aire-medio de cultivo facilitando el acceso al oxígeno.

Estas bacterias, también conocidas como bacterias del vinagre, son capaces de formar ácido acético a partir de glucosa. Sin embargo, su característica más importante es la capacidad de formación de celulosa a partir de fuentes de glucosa a través de un solo proceso de síntesis. Este hecho que se expondrá en el siguiente apartado 7.1.1.

### 7.1.1. Biosíntesis de la Celulosa Bacteriana

La biosíntesis de la BC consta de dos etapas principalmente: la primera es la conversión de la fuente de carbono en uridin difosfato glucosa (UDP-glucosa) y la segunda es la formación de la celulosa y secreción al medio.

En la primera etapa, se inicia con la difusión de la glucosa en el microorganismo y su conversión a glucosa-6-fostato por la enzima glucoquinasa. Posteriormente, la glucosa-6-fostato pasa a glucosa-1-fostato gracias a la acción de la enzima fosfoglucomutasa. El siguiente paso es la conversión de la glucosa-1-fostato a UDP-glucosa por la enzima UDPG-pirofosforilasa.

En la segunda etapa, gracias a la acción de la enzima celulosa sintasa se forma la celulosa. La excreción de la celulosa del microorganismo se efectúa por unos poros alojados en la pared de la membrana celular de un diámetro de 3,5 nm. La celulosa es secretada al medio de cultivo como una subfibrilla elemental de 1,5 nm de diámetro; al juntar estas subfibrillas se forma una microfibrilla y el empaquetamiento de microfibrillas produce las fibras y las cintas de celulosa.

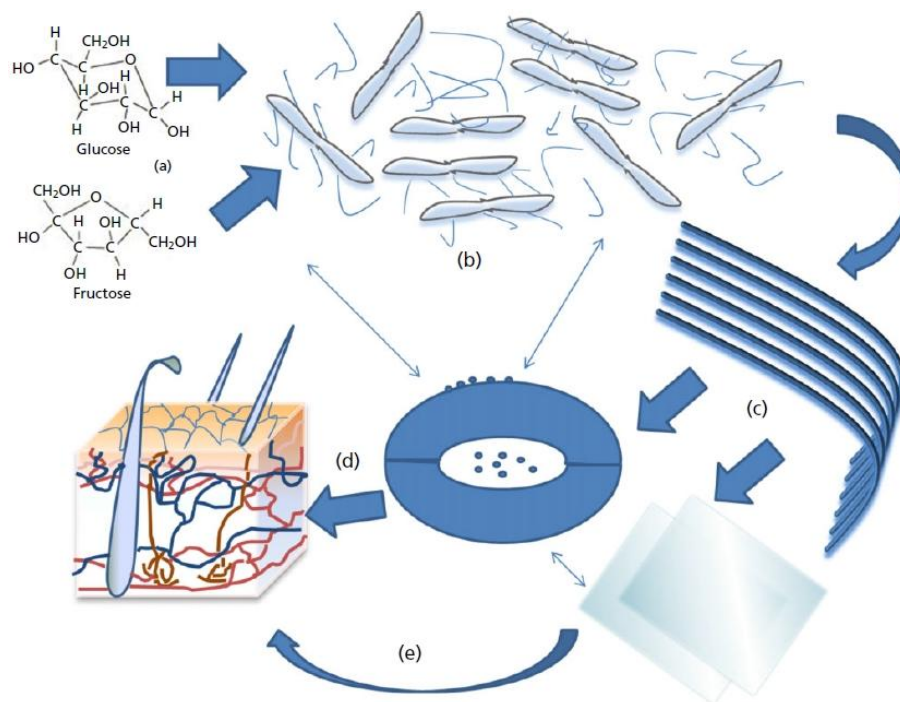


Figura 18. Representación del proceso de formación de celulosa bacteriana a su respectiva aplicación. (a) las moléculas de glucosa y fructosa representan las fuentes de carbono para el crecimiento de *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*; (b) biosíntesis de celulosa bacteriana mostrada como fibras azules; (c) CNF en forma de lámina; (d & e) los dos caminos determinan el uso de la NC en productos cutáneos. Fuente: Mustafa et al. (2014)



### **7.1.2. Condiciones de crecimiento de la celulosa bacteriana**

A continuación, se detallarán brevemente las condiciones de crecimiento que tienen que tenerse en cuenta para un correcto crecimiento de la celulosa bacteriana:

#### **7.1.2.1. Fuente de carbono**

Para la producción de celulosa, es necesaria una fuente de carbono como precursora de la síntesis de glucosa por la vía de la gluconeogénesis (Ver esquema página anterior). Existen multitud de carbohidratos que pueden ser utilizados como fuentes de carbono, entre los más estudiados destacan la glucosa y el manitol. En el caso de la glucosa, en un estudio de Heo se obtuvo el mayor rendimiento para la producción de celulosa bacteriana (Heo y Son, 2002). Sin embargo, una alta cantidad de concentración de glucosa puede inhibir tanto el crecimiento bacteriano como la producción de celulosa debido a la acumulación de ácidos ceto-glucónicos que provocan a una disminución del pH del medio (Vandamme et al., 1998).

Se han realizado multitud de estudios, entre ellos destacan Bielecki et al. (2002) y Panesar et al. (2009), donde concluyen que el manitol es la fuente de carbono más eficiente para generar UDP-glucosa, es decir, para obtener una mayor productividad de celulosa (Bielecki et al., 2002) (Panesar et al., 2009).

#### **7.1.2.2. Fuente de nitrógeno**

El nitrógeno es el principal componente de las proteínas necesarias en el metabolismo celular y comprende 8-14% de la masa de células secas de las bacterias. Las posibles fuentes de nitrógeno que se pueden utilizar en la producción de celulosa bacteriana son extracto de levadura, peptona, sulfato de amonio, polipeptona y caseína hidrolizada o la combinación de las anteriores (Ramana et al., 2000).

#### **7.1.2.3. pH**

El rango de pH óptimo para la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* es 4-7.

#### **7.1.2.4. Temperatura**

En relación con la temperatura, algunos autores han observado que la máxima producción de celulosa utilizando glucosa como fuente de carbono, se logra a los 30°C. A 25°C y 35°C las producciones son similares en sí, pero son menores que a 30°C, mientras que a 40°C no existe crecimiento del microorganismo ya que las bacterias no sobreviven. En definitiva, el rango de temperatura óptimo es de 28-30°C.

### 7.1.2.5. Disponibilidad de oxígeno

La formación de celulosa se produce en la interfase de la película aire-celulosa y no en la interfase medio-celulosa. El oxígeno es un factor importante para la producción de celulosa. Yamanaka descubrió que la concentración de oxígeno afectó tanto a la producción de celulosa como al rendimiento de la membrana formada. Una correlación negativa entre la producción de celulosa sugirió que la celulosa cultivada bajo una menor concentración de oxígeno tenía menos ramificaciones que la celulosa cultivada bajo una concentración de oxígeno más alta (Yamanaka et al., 1989).

### 7.1.3. Producción de la celulosa bacteriana

Los métodos de producción de celulosa bacteriana estudiados hasta el momento son principalmente de tipo *batch* y a través de fermentaciones en cultivo estático (figura 19), en cultivo agitado y en biorreactores de tipo película. En sucesivos apartados se tratarán las principales características de los mismos. Las perspectivas de futuro para la producción de la celulosa bacteriana tratan de resolver la baja productividad alcanzada hasta el momento a través de la optimización de los reactores de tipo *batch*, además de la implantación de modelos de producción en continuo.



Figura 19. Muestra de celulosa bacteriana en cultivo estático. Fuente: Imperial College London (2016)



### 7.1.3.1. Fermentación en cultivo estático

En este tipo de fermentación, la celulosa bacteriana se obtiene en forma de gel o película, la cual se encuentra en la parte superior del medio de cultivo. Se puede observar en la figura 20 una película de BC. Según estudios realizados por diversos autores, estos muestran que los microorganismos incrementan su población y producción de celulosa al principio de la fermentación debido a la alta presencia de oxígeno disuelto en el medio. Pero, a medida que este disminuye, también lo hace la actividad de las bacterias. Una vez se forma esta película de celulosa, únicamente las bacterias situadas en la parte superior de ésta tienen acceso al oxígeno y por ello mantienen su actividad bacteriana. En cambio, las bacterias situadas en regiones inferiores ven su actividad bacteriana reducida debido a la falta de oxígeno en el medio. A medida que transcurre el tiempo de fermentación, el espesor de la película se va incrementando por la generación de nuevas capas suspendidas en el medio de cultivo, hecho que se puede observar en la figura siguiente (Borzani y Souza, 1995).

Los principales inconvenientes para las fermentaciones mediante esta técnica son, por un parte, los largos periodos de fermentación que requieren para obtener una cierta cantidad de celulosa. Esto provoca que aumenten enormemente las posibilidades de una contaminación bacteriana indeseada. Por otra parte, otro importante inconveniente de esta metodología es la gran área superficial que requiere este tipo de fermentadores con tal de aumentar la interfase aire-líquido.

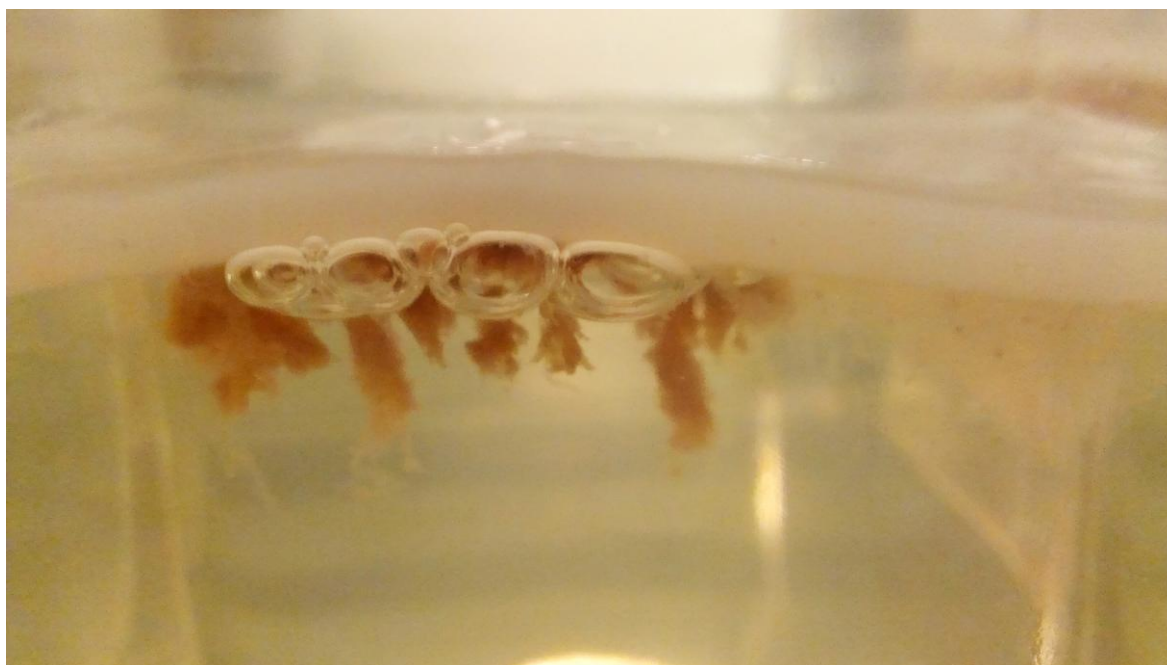


Figura 20. Vista lateral de un cultivo estático de BC donde se observa la película de BC y en la capa inferior unas colonias de levadura entre burbujas de CO<sub>2</sub>. Fuente: Drexel (2013)

### 7.1.3.2. Fermentación en cultivo agitado

Debido a la gran necesidad que tienen las bacterias de oxígeno, la mejor opción a la hora de producir celulosa bacteriana es a través de biorreactores que aumenten el contacto de las bacterias con el oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Para lograr aumentar la superficie de interfase aire-líquido se utilizan biorreactores aireados. Este tipo de reactor tiene también inconvenientes como, por ejemplo: la oxidación de la fuente de carbono.

Se tratará brevemente dentro de los fermentadores de cultivo agitado, por un lado, el fermentador de tanque agitado y, por otro lado, el fermentador air-lift. El primero de todos consiste en un biorreactor que dispone de unos agitadores en forma de palas a diferentes alturas que mueven el contenido del reactor. Además, disponen de una entrada de aire que aumenta la concentración del mismo dentro del medio de cultivo. En la figura 21-A se puede observar una representación del mismo. Este tipo de biorreactor tiene diversos inconvenientes como serían el suministro insuficiente de oxígeno, la forma irregular de la BC producida y la acumulación simultánea de mutantes no productores de BC en el cultivo de agitación. Por otra parte, la insolubilidad del producto de celulosa plantea obstáculos para la transferencia de nutrientes dando como resultado la no homogeneidad del conjunto.

Por otra parte, los biorreactores *air-lift* son mezclados gracias a una corriente de gas, normalmente aire u oxígeno para ayudar al crecimiento bacteriano. En la figura 21-B se observa un diagrama de funcionamiento del mismo y en la 21-C como es una representación de un biorreactor *air-lift* de 250L. La primera vez que fue usado un biorreactor *air-lift* para la producción de la celulosa bacteriana fue en el año 2000 (Chao et al., 2000). La ventaja que presenta este tipo de reactores en comparación con el reactor agitado es la disminución de los costes de energía para la agitación de la mezcla.

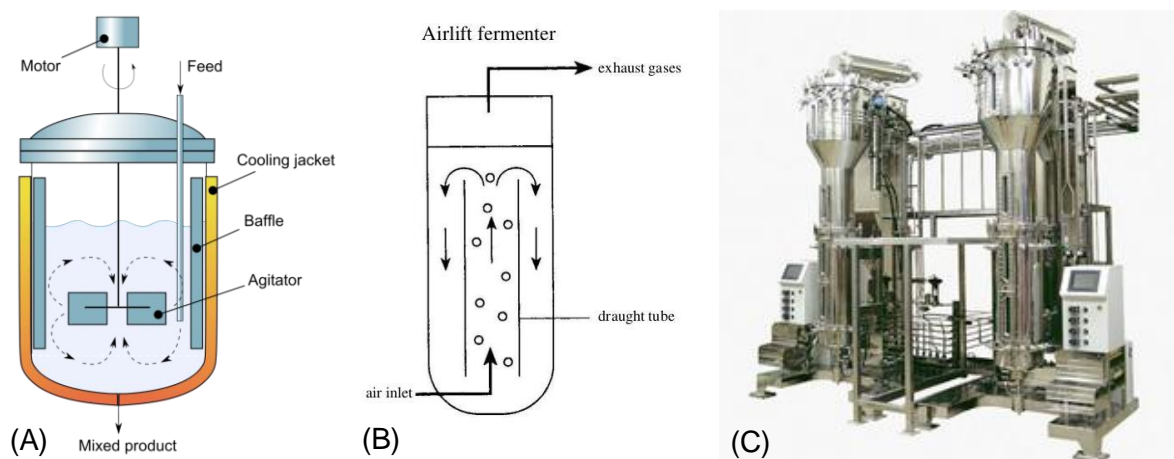


Figura 21. (A) Representación de tanque agitado. Fuente: Essential Chemical (2017); (B): Diagrama de funcionamiento de Reactor air-lift; (C): Reactor air-lift de 250L. Fuente: Biotech Sience (2016)

A continuación, se introducirán los reactores de película. Éstos tienen la finalidad de aumentar el área superficial de la masa bacteriana depositando las bacterias en forma de película. De esta manera se aumenta la densidad celular, y a consecuencia de esto, se aumenta el contacto del medio de cultivo con el oxígeno lo cual genera un aumento en la producción de celulosa bacteriana. Un ejemplo de este tipo de biorreactores es el biorreactor rotatorio y los biorreactores de células inmovilizadas, estos últimos también llamados biofilms.

El bioreactor de tipo rotatorio consta en una entrada de inóculo (flecha marrón de la figura 22) y de varios discos circulares montados en un eje central giratorio. El biorreactor de discos giratorios ha sido diseñado de tal modo que la mitad de la superficie de sus discos quedan sumergidos en el medio y la otra mitad quedan expuestos a la atmósfera. Con la rotación continua a unas 4-5 rpm, la superficie de los discos se alterna entre el medio de cultivo y atmósfera.



Figura 22. Representación de Biorreactor de disco rotatorio. Fuente: Reactors (2013)

Los reactores de biofilm muestran varias ventajas sobre los reactores de células suspendidas, principalmente en proporcionar alta densidad de bacterias y alto rendimiento de producción. Chen et al. (2017) mejoró con éxito la producción de CB mediante el uso de un reactor de biofilm con soportes plásticos o PCS (*Plastic Composite Support*). Los PCS mejoran en gran medida la producción por el aumento de superficie que generan.

En la siguiente figura se observa en primer lugar la representación un biorreactor biofilm de la marca BioSurface modelo 1320LS y en la figura 23-B y 23-C se observan ejemplos de soportes plásticos que serán introducidos en el biorreactor para aumentar la superficie de contacto:

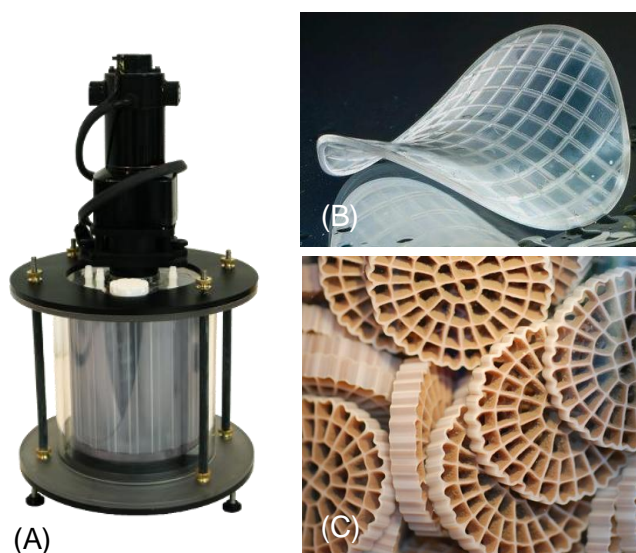


Figura 23. (A): Representación de un biorreactor de biofilm Modelo 1320LS. Fuente: BioSurface Technologies (2018); (B & C): Soportes plásticos para crecimiento biológico. Fuente: Veolia Water Technologies

En la tabla siguiente se observa la concentración de celulosa obtenida mediante diferentes reactores. El reactor de mezcla perfecta es con el que se obtiene una mayor concentración de celulosa, pero, en cambio, tiene inconvenientes como serían el alto coste energético, además de los esfuerzos de cizallamiento a los que estarían sometidas las bacterias que podrían provocar la muerte de las mismas y consecuentemente, una disminución de la productividad.

**Tabla 7.** Comparación de la productividad de celulosa en función del tipo de reactor. Fuente: Krystynowicz et al. (2002), Cheng et al. (2002), Hofinger et al. (2011), Song et al. (2009)

Tipo de reactor	Ventaja	Inconveniente	Productividad [g/l·h]	Concentración [g/l]
<b>Agitado</b>	Alta productividad y fácil escalado	Elevado consumo energético y esfuerzo de cizallamiento de las células	0,058 – 0,23	4,57 - 13
<b>Air-lift</b>	Alta productividad y bajo esfuerzo cortante	Elevado consumo energético	0,056 – 0,116	3,8 – 8,7
<b>Discos rotatorios</b>	Adecuado para cepas aeróbicas. Alta concentración celular	Gran riesgo de contaminación	0,015	5,35
<b>Biofilm</b>	Alta concentración celular y productividad; Fácil separación del producto	Difícil escalado	0,08	5,8

## 7.2. Vía natural

La vía natural se basa en la extracción y purificación de la nanocelulosa proveniente de la nata de coco. A continuación, se explicará que es y cómo se obtiene la nata de coco.

### 7.2.1. ¿Qué es la nata de coco?

Nata de coco fue uno de los primeros productos disponibles en el mercado en contener celulosa bacteriana. Nata de coco es un producto blanco con una textura gelatinosa, gomosa e incluso chiclosa, el cual se utiliza para la producción de golosinas o postres, entre otras muchas aplicaciones alimentarias. Se produce a través de la fermentación de *Acetobacter xylinum* en un medio de cultivo formado por leche de coco o el agua de coco, además de agua y sulfato de amonio:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Nata de coco, es originaria de las Filipinas, se desarrolló gracias a sustancias gelatinosas flotantes que aparecieron después de unos días en los desechos del zumo de piña (Lapuz et al., 1969). El crecimiento de la película de nata de coco, que se produce gracias a la bacteria *Gluconacetobacter xylinus*, fue descrito por primera vez por en 1880 por Brown, el cual identificó la nata de coco como un producto químicamente equivalente a la celulosa (Budhiono et al., 1999). Actualmente la nata de coco se utiliza, como se ha mencionado anteriormente en postres y dulces, pero también en ensaladas, helados, zumos, salsas y en bebidas dietética tanto por su bajo contenido calórico como de colesterol. Además, si se reduce el contenido en agua del producto, puede ser utilizado también como sustituto de la goma xantana o como espesante alimentario (Okiyama et al., 1993). En la figura 24 se observa una ampliación de la nata de coco con su respectivo envase.



Figura 24. (A) Envase y (B) ampliación de Nata de Coco. Fuente: Amazon (2018)



En la actualidad la nata de coco tiene un amplio mercado a nivel mundial y se encuentra con facilidad en una gran cantidad de países. A continuación, en la tabla 8 se pueden observar los países donde se produce mayor cantidad de coco a nivel mundial:

**Tabla 8.** Ranking de producción de cocos a nivel mundial en el año 2014.

Fuente: Coconut Development Board. Government of India (2014)

Orden	Países	Superficie plantada (x1000 Ha)	Producción (millones de kg)
1	Indonesia	3610	16354
2	Filipinas	3502	14696
3	India	2141	21665
4	Sri Lanka	440	2870
5	Brasil	251	2919
6	Papúa Nueva Guinea	221	1483
7	Tailandia	206	1001
8	México	169	1118
9	Vietnam	159	1245
10	Tanzania	128	545,8

Una parte de la producción de cocos de estos países se destina a la producción de la nata de coco ya que este producto tiene un gran valor añadido si es comparado con la leche o el agua de coco. Principalmente se fabrica en Filipinas e Indonesia que son los países con una mayor producción de cocos. En Filipinas, la primera fábrica se construyó en Laguna en 1987 y tenía una facturación de 4960\$ anuales y se ha ido incrementando desde entonces hasta llegar a los 2,1 M\$ en 1992 y 20,81M\$ en 1994. En 2010, las ventas de este producto alcanzaron los 6050 M\$ en este país, es decir, corresponde a un 3% del PIB de Filipinas ese año según datos del Banco Mundial.

Indonesia es el primer productor mundial de coco según se puede observar en la tabla 8. Tiene empresas industriales tanto de tamaño pequeño, mediano y grande que son capaces de producir grandes cantidades de nata de coco. Por ejemplo, una de las empresas más grandes de Indonesia llamada PT Keong Nusantara Abadi. Mensualmente obtiene de aproximadamente 96.000 cocos, unos 32.000 litros de leche de coco que acaban produciendo unas 20 toneladas de Nata de Coco. En origen y gracias a un análisis del Banco Central de Indonesia, se conoce que la Nata de Coco tiene un precio de 460€/t (en peso seco) (Andrade et al., 2010).

### 7.2.2. *Proceso de producción de la nata de coco*

La bacteria más común para la producción de CB es la gram-negativa *Acetobacter xylinum*. Existen unos factores que afectan a la producción: la concentración apropiada del medio de cultivo, pH, temperatura y oxígeno disuelto (DO). Durante la primera etapa de la fermentación, tanto el proceso de la formación de celulosa como el consumo de glucosa están controlados por la concentración de oxígeno, en cambio, en las últimas etapas los azúcares se devienen en factor limitante (Budhiono et al., 1999)

El pH óptimo para fermentación se encuentra entre 4-7 y el medio de cultivo se compone de agua de coco o leche de coco con suplementos de sacarosa y sulfato de amonio, entre otros (Masaoka et al., 1993). Finalmente, la temperatura óptima para la obtención de nata de coco se sitúa entre los 25 a 35°C.

El medio de cultivo con una altura de unos 2 a 4 cm se coloca en unas bandejas de plástico cubiertas de una lámina de papel para evitar contaminaciones por agentes externos indeseados. En un plazo de entre 7 a 14 días, teniendo controladas las condiciones experimentales, se obtienen unas láminas de una nata de coco de entre 1-2 cm con una textura suave y gomosa (ver figura 25). Para cosechar las láminas del producto, se elimina el medio de cultivo y se dejan con agua. Para su comercialización, se corta la Nata de Coco en cubos de 1,5 cm de lado (ver figura 24) y se le añade un almíbar en el recipiente para aportar dulzura al producto final.



Figura 25. Láminas de Nata de Coco en bandejas. Fuente: NataCorp (2018)



### 7.3. Vía química

Como se ha tratado previamente en el apartado 6.5.1. *Tratamiento ácido de la celulosa*, la nanocelulosa también se puede obtener por la vía química mediante la adición de ciertos ácidos.

En experimentos consultados de diversos autores utilizan, por una parte, una gran variedad de fuentes de celulosa y, por otra parte, diferentes ácidos y proporciones de los mismos. Además, fluctúan enormemente el tiempo, temperatura de reacción y procesos posteriores como serían la diálisis y sonicación en diferentes autores y experimentos.

Como fuentes de celulosa, Bondeson et al. (2006) emplea MCC proveniente de Picea de Noruega (*Picea abies*), en cambio, tanto Dong et al. (1998) y Beltramino et al. (2016) llevaron a cabo nanocelulosa mediante celulosa pulverizada en un 98% de la misma. Por último, Filson y Dawson-Andoh. (2009) utilizaron pulpa de papel reciclada con un 1% de lignina proporcionada por la empresa American Fiber Resources.

En cuanto a los ácidos utilizados no existe tanta discrepancia como con las fuentes de celulosa, tanto Bondeson et al. (2006), Dong et al. (1998) y Beltramino et al. (2016) realizaron los estudios mediante al ácido sulfúrico a una concentración entre 64-68% en peso. Mientras que, Filson y Dawson-Andoh (2009) lo llevó a cabo mediante ácido maleico entre 50-100 mM. Filson utilizaba cantidades muy pequeñas de celulosa cercanas a los 0,2 gramos, lo cual, además de su bajo rendimiento obtenido en sus experimentos, lo hacía poco factible para llevarlo a cabo a escala de laboratorio.

Para llevar a cabo la síntesis química de la nanocelulosa se decidió llevarla a cabo mediante el procedimiento explicado por Bondeson y su equipo ya que utilizaba unas condiciones menos energéticas que el resto de estudios analizados. Ejemplo de ello sería, por un lado, la utilización del hielo para realizar la mezcla de ácido sulfúrico al 68,4% en peso y, por otro lado, una temperatura de 40 °C para la mezcla de MCC y ácido sulfúrico durante dos horas. Otro motivo para seguir la metodología empleada por Bondeson fue el alto rendimiento de aproximadamente un 18% y la longitud de tamaño nanométrico de las fibras obtenidas cercanas a unos 180 nanómetros y además de birrefringencia de flujo. Se definiría la birrefringencia de flujo como un efecto que tienen ciertos líquidos que muestran distintos grados de reflexión de la luz polarizada según la dirección del flujo.

## 8. Aplicaciones de la nanocelulosa

La nanocelulosa combina excelentes propiedades que confieren a su estructura las características únicas de los materiales a escala nanométrica. Debido a sus propiedades estructurales y mecánicas únicas como sería la alta pureza, grado de cristalinidad, densidad y gran capacidad de unión con agua, en comparación con la celulosa de plantas, se espera que la NC se convierta en un material básico en gran cantidad de campos.

La NC tiene una gran área superficial. Esta calidad, combinada con su naturaleza altamente hidrofílica, da como resultado una capacidad de carga de líquido muy alta. Además, su biocompatibilidad, transparencia, conformabilidad y no toxicidad la convierten en un candidato ideal para una amplia gama de aplicaciones en diversos campos, especialmente aquellos relacionados con aplicaciones biomédicas y biotecnológicas (Dahman et al., 2010).

Todas estas propiedades permiten a la nanocelulosa ser apta para una gran cantidad de aplicaciones. En la tabla siguiente se observarán algunas de las aplicaciones que se están investigando y utilizando en la actualidad. Algunas de ellas se explicarán más en profundidad en apartados siguientes.

**Tabla 9.** Áreas y aplicaciones de la nanocelulosa. Fuente: Ougiya et al. (1997), Czaja et al. (2006), Lee et al. (2012)

Área	Aplicación
Medicina/biomedicina	Piel artificial para quemaduras o úlceras, entrega de medicamentos, apósito para heridas antimicrobiano...
Cosmética	Estabilizador de emulsiones como por ejemplo: cremas, tónicos...
Industria alimentaria	Celulosa comestible (nata de coco)
Industria del papel	Aumentar flexibilidad y durabilidad del papel
Construcción/polímeros	Como material de refuerzo
Electrónica	Elementos opto-electrónicos

## 8.1. Aplicaciones biomédicas y biotecnológicas

La nanocelulosa desde que fue reconocida como un hidrogel altamente biocompatible, ha sido sujeto de una extensa investigación para explotar sus propiedades en el ámbito biomédico. Diversos científicos consideran que la NC es una excelente alternativa al polímero sintético ya que dispone de una alta biocompatibilidad. El polímero sintético en aplicaciones a largo plazo no cumple adecuadamente con sus funciones y es la causa una respuesta inmune excesiva.

La nanocelulosa es un polímero natural de excelente pureza que tiene la oportunidad de convertirse en un producto muy competitivo en el campo médico en diversas aplicaciones por sus características estructurales como serían: (1) estructura reticular ultrafina lo cual es un efecto de la alta cristalinidad y de la uniaxialidad en la orientación de las subfibrillas de celulosa; (2) insolubilidad; (3) gran elasticidad y transparencia, después de la purificación, debido al espesor nanométrico de las fibras; (4) hidrofiliicidad debido a la gran cantidad de microporos en su estructura; (5) al formarse el hidrogel con un 95% de agua, al presionar suavemente puede permitir la salida de ésta; (6) carencia de hemicelulosa, lignina y pectina las cuales están asociadas con la celulosa proveniente de plantas; (7) biocompatibilidad como resultado de la gran pureza del material y de la falta de efectos tóxicos en tejidos; (8) alta resistencia a la tracción debida a la estructura reticular ultrafina la cual está relacionada con los altos valores del módulo de Young; (9) posibilidad de modificaciones químicas y físicas durante la cultivación (Bielecki et al. 2002) (Bielecki et al. 2012). En la figura 26 se ejemplifican algunas de las posibles aplicaciones en el camp biomédico de la NC.

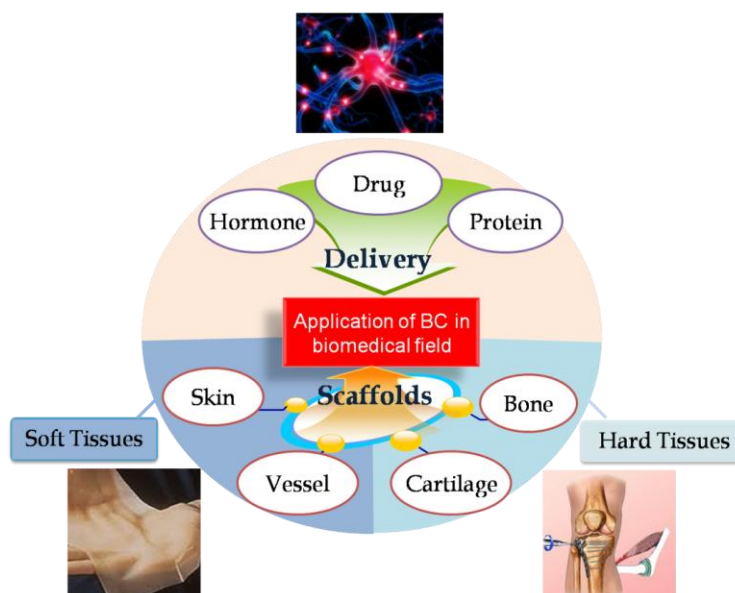


Figura 26. Algunas aplicaciones biomédicas de la nanocelulosa. Fuente: Lina y Yue (2011)

### 8.1.1. Curación de heridas

La primera aplicación para la que se utilizó la NC fue como un sistema para la curación de heridas. En los años 90 del siglo pasado, diferentes grupos científicos y empresariales, principalmente de Estados Unidos y Brasil, realizaron diversos estudios para producir hidrogel de NC por sus propiedades hidrofílicas. Sin embargo, el primer estudio publicado fue en 2006 por la Universidad Tecnológica de Lodz publicó un análisis sobre la aplicación de hidrogel de nanocelulosa para la curación de quemaduras de segundo y tercer grado.

Según los autores, el apósito se compone de una membrana de nanocelulosa que se mantiene húmeda durante un gran lapso de tiempo. Se caracteriza por facilitar el proceso de recuperación de los enfermos debido a: (1) gran conformabilidad y grado de adherencia aun siendo partes del cuerpo que tengan movimiento; (2) mantener entorno donde haya la humedad apropiada unido a propiedades que enfrían la piel; (3) absorber los exudados de la herida debido a su estructura de nanoporos; (4) transparencia la cual permite estudiar el avance de las heridas; (5) permeabilidad del oxígeno el cual ayuda a una regeneración de la piel con mayor rapidez (Czaja et al., 2006).

El estudio realizado por la Universidad de Polonia mostró que la membrana de NC mejoró significativamente el proceso de cicatrización gracias a la eliminación de restos necróticos y una mejora de la granulación de tejidos. De esta manera, aceleró el proceso de reepitelialización comparado con métodos tradicionales. También se tiene que recalcar que esta membrana redujo enormemente el tiempo diario necesario para las curas y el dolor y molestias de los pacientes (Czaja et al., 2006).

El método de producción patentado por la universidad de Lodz fue comprado por la empresa BOWIL Biotech Ltd. la cual empezó a producir apósitos para heridas y máscaras faciales bajo el nombre CELMAT®. Existen diferentes empresas que comercializan apósitos de celulosa en diferentes partes del mundo como sería en Brasil la empresa Fibrocel Productos Biotecnológicos Ltd. (anteriormente llamada BioFill Industries) o en los Estados Unidos la Xylos Corporation® lleva años produciendo NC.



Figura 27. Apósito de nanocelulosa CELMAT®. Fuente: CELMAT (2018)

Esta primera generación de apósitos tuvo excelentes resultados en pacientes con quemaduras graves, como serían las de segundo o tercer grado. Con el paso del tiempo se han abierto líneas de investigación para ofrecer una mayor calidad de vida a estos pacientes, los cuales no sólo necesitan un tratamiento eficaz para la rápida curación de la herida, sino que además, precisan de un apósito que sea capaz de proteger contra infecciones y deshidratación. Las líneas de investigación se han centrado, por una parte, en mejorar las propiedades antibacterianas por medio de la adición de plata en forma nanométrica u óxido de zinc. Por otro lado, se han estudiado la adición de medicamentos en la celulosa, como serían analgésicos o antibióticos, los cuales son liberados gradualmente para obtener una reducción del dolor o acelerar el proceso de curación.



Figura 28. Nanocelulosa obtenida por la Universidad Técnica de Lodz. (A): Película de celulosa bacteriana; (B): Apósito producido mediante una membrana de celulosa purificada; (C): Aplicación *in vivo* de hidrogel de celulosa en la unidad de quemados de un hospital. Fuente: Bowil Biotech Ltd. (2011)

### 8.1.2. **Implantes basados en NC**

Los investigadores buscaban un biomaterial que curase las heridas de manera efectiva y que restaurase las funciones de los tejidos u órganos dañados. El objetivo era encontrar un material que cumpliera unas ciertas cualidades, no únicamente que imite la matriz extracelular, sino que inicie el proceso de formación de tejido y pudiese modificar sus propiedades superficiales, porosidad y forma. A pesar de lo anterior, el criterio clave para la elección de la NC fue la biocompatibilidad. La biocompatibilidad de la nanocelulosa ha sido investigada en un gran número de ocasiones con resultados satisfactorios en todos los casos. Estudios *in vivo* no han mostrado prácticamente ninguna reacción atípica al cuerpo, tampoco fueron detectadas cápsulas fibróticas ni células gigantes por microscopio. En implantes en a corto y a largo plazo no hubo ningún tipo de inflamación en tejidos (Pértile et al., 2011).

Recientemente, se realizaron análisis *in vitro* de la compatibilidad sanguínea con la nanocelulosa y como resultado se obtuvo que NC también es un material hemocompatible, por ello también se utiliza para producción de injertos venosos. En 2009 Xylos Corporation® recibió la aprobación de la Food and Drugs Administration (FDA) para el uso de la NC bajo el nombre de Xylos Vessel Guard®, entre otros productos.

Para la obtención de injertos venosos, la NC crece con la estructura en forma de tubo. Además, se están desarrollando membranas con otras formas para multitud de aplicaciones. El proceso está brevemente ejemplificado en la figura 29 donde se observa en este caso un implante de duramadre, que es la meninge más externa que protege el cerebro. El mismo proceso se llevaría a cabo para una reconstrucción de cartilago, nasal septum y una reconstrucción de menisco.

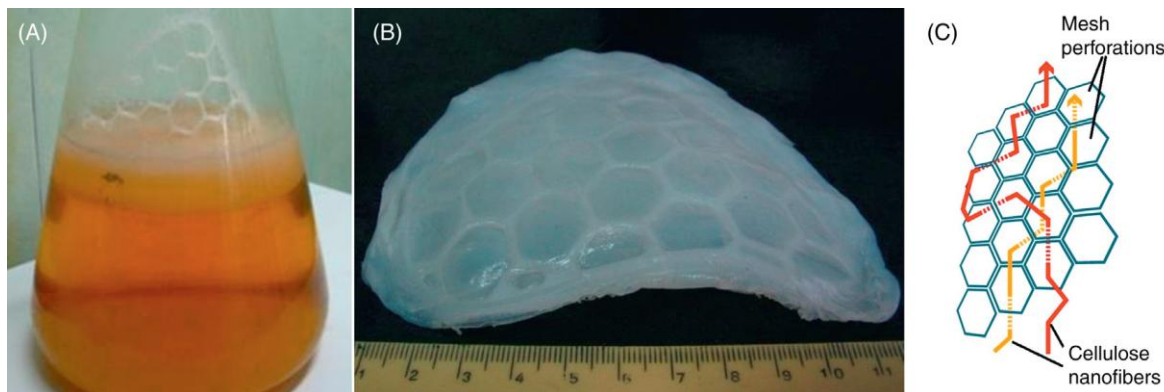


Figura 29. Compuesto obtenido de BNC y un polímero perforado por vía estática. (A): Biosíntesis de la celulosa con un material polimérico en un biorreactor; (B): Producto final de la cultivación; (C): Representación esquemática de las fibras creciendo entre las perforaciones. Fuente: University of Lodz (2009)

En la figura 30 se puede observar diferentes implantes realizados mediante nanocelulosa utilizados para reconstrucción y regeneración de tejidos

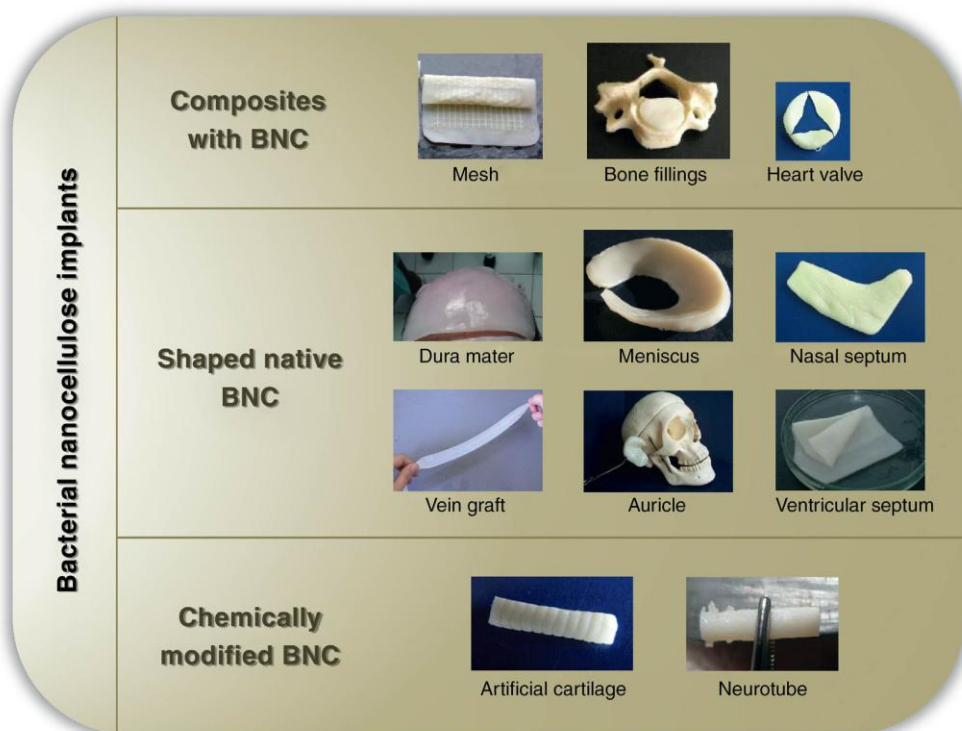


Figura 30. Overview de implantes hechos de NC. Fuente: University of Lodz (2016)



### 8.1.3. *Tissue scaffolds*

Otra aplicación de la nanocelulosa en el campo biomédico son los *tissue scaffolds* o “andamios” que son estructuras temporales que facilitan la regeneración de los tejidos dañados del cuerpo humano mediante la suptación y el anclaje a unas estructuras tridimensionales fabricadas con nanocelulosa que reduzcan el posible estrés que puedan sufrir estos tejidos. Des del punto de vista celular precisan tener una arquitectura interna apropiada con una red interna de canales y poros interconectados para soportar el crecimiento celular y permitir el flujo de nutrientes. Debido a estas estructuras el tejido dañado puedes ser regenerado ayudando a las células a llegar a la forma final del tejido.

Desde un punto de vista más técnico, la construcción de los *tissue scaffolds* debe ser optimizada mediante una serie de parámetros como sería el tamaño y forma del poro, nivel de interconectividad y porosidad. En la práctica, cuanto mayor es el grado de crecimiento y proliferación celular, mayores son valores de porosidad. Por lo general suele tener la NC unos diámetros comprendidos  $32,08 \pm 10,85$  nanómetros y los poros  $254.16 \pm 76.65$  nm (Pértile et al., 2011). En la figura 31 se puede observar los microporos y las fibras de nanocelulosa.

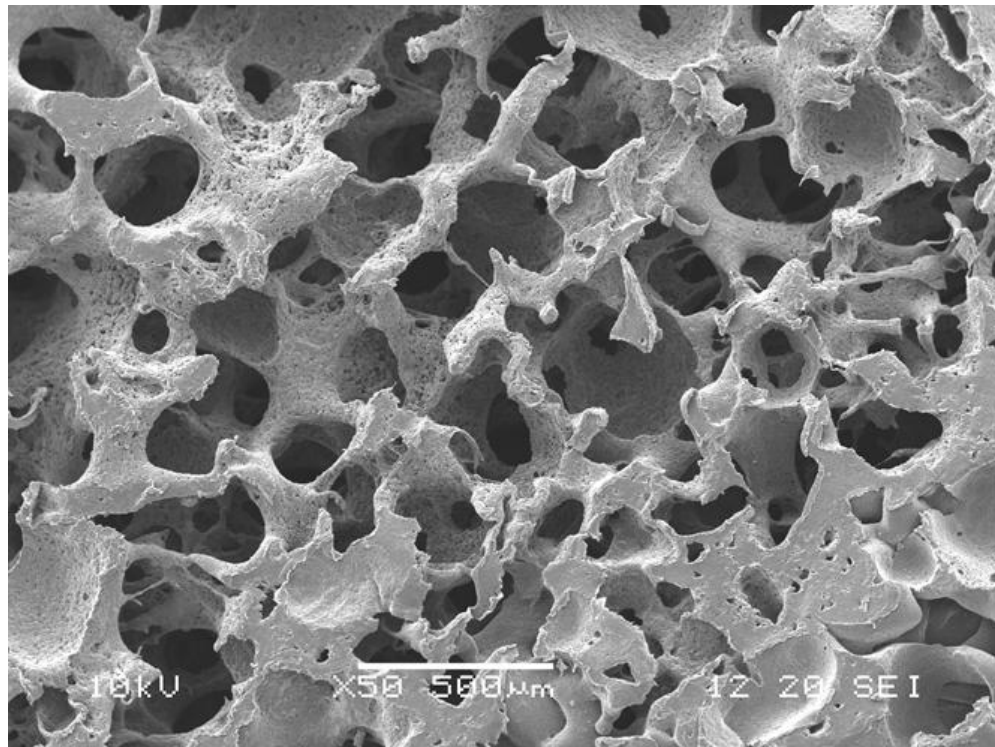


Figura 31. Representación mediante microscopía electrónica de nanofibras de celulosa y microporos.

Fuente: University of Lodz (2009)

## 8.2. Aplicaciones como material de refuerzo

Otra importante aplicación donde se utiliza la nanocelulosa es como material de nano-refuerzo en polímeros renovables ya que si se compara el rendimiento mecánico de éstos suelen ser inferior comparado con los polímeros provenientes del petróleo (Blaker et al, 2011). Un ejemplo de polímero renovable sería, por un lado, el ácido poliláctico (PLA) o el polihidroxibutirato (PHB). Ambos materiales tienen una gran fragilidad, un porcentaje de elongación de entre el 1 y 2 % y ambos poseen una baja temperatura de distorsión cercana a los 60°C (Barham y Keller., 1986) (Lee et al., 2012) (Markarian., 2008).

A grandes rasgos, combinar una matriz polimérica con un material de refuerzo hace que se cree un material resultante con mejores propiedades que las que disponían los materiales inicialmente. Ahora bien, si se tienen en cuenta las matrices anteriormente, como sería el caso del PLA o PHB, y se añade la nanocelulosa como material de refuerzo, el conjunto acaba teniendo propiedades mecánicas similares a los polímeros provenientes del petróleo. Tanto las nanofibras de celulosa como la nanocelulosa bacteriana pueden ser consideradas fuentes ideales de material de refuerzo por su baja densidad - alrededor de  $1,5 \text{ g/cm}^3$  - y que son materiales renovables, biodegradables y de baja toxicidad.

En la tabla siguiente se observan diferentes materiales poliméricos con respectivos valores de resistencia a la tracción tanto de la matriz polimérica como del material compuesto con nanocelulosa y el factor de aumento o disminución del mismo. Si se realiza una comparativa de las propiedades antes y después de la adición de nanocelulosa se observa un incremento muy significativo del módulo de elasticidad del PLA ya que aumenta entre un 20% a un 70% con respecto el valor inicial de la matriz polimérica.

**Tabla 10.** Propiedades de tracción de los compuestos de polímero reforzado con NC. Fuente: Zhijiang y Guang (2011) Gu et al. (2010), Li et al. (2010), Lee et al. (2009)

Polímero de la matriz	% w	$E_{composite}$ (GPa)	$\sigma_{Composite}$ (MPa)	$E_{matriz}$ (GPa)	$\sigma_{Matriz}$ (MPa)	$\frac{E_{composite}}{E_{matriz}}$	$\frac{\sigma_{Composite}}{\sigma_{Matriz}}$
PLA	2	$1.75 \pm 0.05$	$57.7 \pm 1.4$	$1.34 \pm 0.04$	$60.7 \pm 0.8$	1,3	1
	5	$1.89 \pm 0.02$	$60.9 \pm 0.5$	$1.34 \pm 0.04$	$60.7 \pm 0.8$	1,4	1
	11,5	$1.153 \pm 0.4$	$18.72 \pm 1.45$	$0.687 \pm 0.10$	$16 \pm 1.1$	1,7	1,2
PHB	50	$2.6 \pm 0.5$	$42.4 \pm 3,6$	$2.1 \pm 0.4$	$28.0 \pm 2.8$	1,2	1,5
LDPE	1	$0.962 \pm 0.068$	$20.6 \pm 1.3$	$0.771 \pm 0.09$	$25.4 \pm 1.9$	1,2	0,8

### 8.3. Aplicaciones para la industria del papel

El papel es uno de los productos más utilizados diariamente. La industria de la pulpa y el papel produce enormes cantidades de materiales celulósicos, los cuales son producidos a partir de una amplia variedad de fuentes. La producción anual a nivel mundial del año 2014 es aproximadamente de 407,6 millones de toneladas. Se cree que la producción anual crecerá enormemente, en primer lugar, por la irrupción del comercio electrónico el cual precisa embalajes de cartón para la distribución de sus productos y, en segundo lugar, por el crecimiento demográfico en las ciudades, que hará aumentar la cantidad de productos con una base de celulosa.

Se ha estudiado la adición de nanocelulosa como aglutinante a la pasta de papel debido a que mejora la resistencia, durabilidad, además de aumentar el brillo del papel y reducir su gramaje (Hioki et al., 1995).

Actualmente, Ajinomoto Co. en colaboración con Mitsubishi Paper Mills en Japón están desarrollando nanocelulosa, más concretamente celulosa bacteriana, para productos de papel (Ougiya et al., 1997). Se analizó que sucedía cuando celulosa bacteriana producida tanto en régimen agitado como estático se añadía a la pasta de papel y en ambos casos la resistencia a la tracción como la *filler retention* aumentaban. Se denomina *filler retention* en la industria papelera a sustancias que mejoren la retención de partículas finas durante la formación del papel. La utilización de los mismos reduce los costes de productos químicos al disminuir los restos de papel en el agua de la instalación. En especial, la celulosa bacteriana obtenida mediante medio de cultivo agitado tenía mayores efectos *filler retention* que la estática.

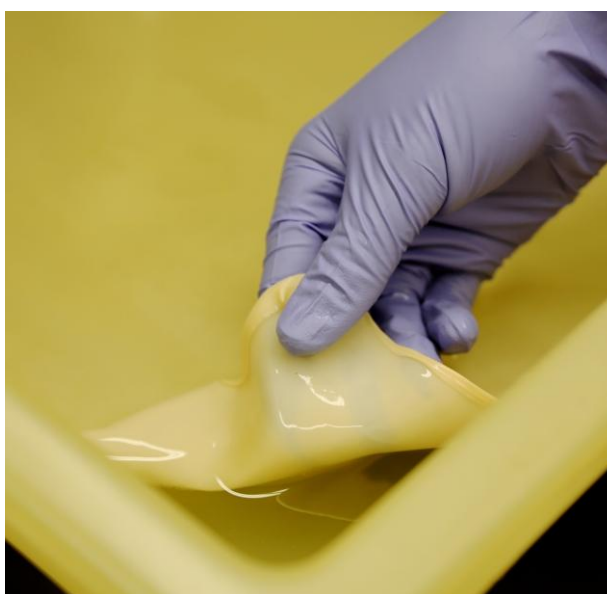


Figura 32. Papel realizado mediante NC. Fuente: IGEM (2014)

## 8.4. Aplicaciones en el campo de la electrónica

Otro campo de utilización de la nanocelulosa es en el campo de la electrónica. Se ha empezado a desarrollar en esta área por el hecho que la celulosa es un material biodegradable y podría llegar a ser un buen sustituto de muchos materiales utilizados en aparatos electrónicos que permanecen en vertederos durante centenares de años sin descomponerse. El profesor Ma de la Universidad de Wisconsin consiguió en 2015 fabricar chips de arseniuro de galio que, en vez de utilizar obleas de silicio, emplean un material con una base de nanocelulosa para que sea biodegradable y no se empleen metales raros que puedan provenir de países con conflictos internos o que sean minerales de sangre. Tanto en la figura 33 y 34 se observa una aplicación del chip.

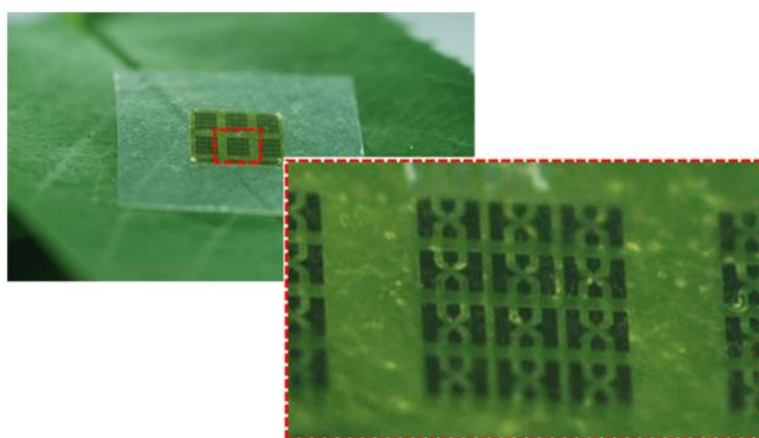


Figura 33. Ampliación del chip de nanocelulosa. Fuente: MIT (2015)

El profesor Ma y su equipo observaron que se podía reducir en 5000 veces el material semiconductor utilizado para el chip. Además, analizaron el comportamiento respecto de un chip de iguales características, pero realizado mediante silicio y observaron que tenía las mismas propiedades en ambos casos.

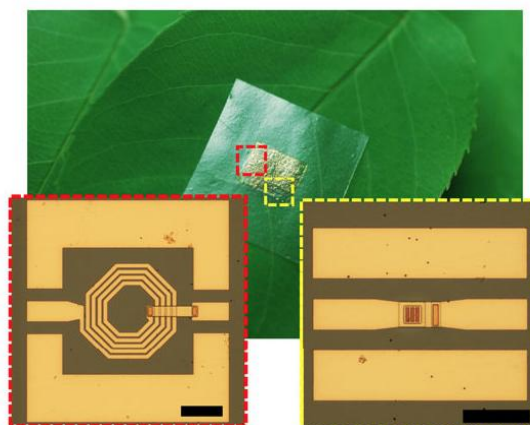


Figura 34. Ampliación del chip de nanocelulosa. Fuente: MIT (2015)

## 9. Estado del arte de la nanocelulosa

En este apartado se estudiarán trabajos de otros autores para conocer diferentes procesos de síntesis de las 3 vías utilizadas en este proyecto: la vía biotecnológica, la vía natural y la química. Además, se analizarán resultados experimentales mediante las mismas técnicas que se utilizarán: espectroscopía infrarroja, difracción de rayos-X y microscopía electrónica.

La vía biotecnológica ha sido estudiada durante bastantes años con resultados diversos. En 1962, Ohad et al. ya habían estudiado la bacteria *Glucoacetobacter xylinus* para la obtención de celulosa bacteriana (Ohad et al., 1962). En este experimento obtuvieron nanocelulosa en una pequeña proporción y la caracterización de la misma fue llevada a cabo mediante un microscopio electrónico, pero la calidad de las imágenes obtenidas es baja en comparación con las obtenidas mediante los SEM actuales.

En el año 2009, McKenna et al. realizaron un experimento con el medio llamado: Hestrin & Schramm (HS) el cual contenía: 5 g/L de peptona, 5 g/L extracto de levadura, 2,7 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,15 g/L ácido cítrico y un 2% (w/v) glucosa (McKenna et al., 2009). En este experimento se analizó, en diferentes tiempos, la idoneidad del uso de NaOH 0,1M hirviendo con la BC durante 30 minutos. Se observó mediante SEM que el tratamiento con NaOH no afecta a las fibras. También se realizó un estudio de propiedades mecánicas de la CB mediante NaOH y CB sin tratar y los resultados no diferían en gran medida.

Chen y su equipo en 2017 realizaron un estudio de las propiedades mecánicas de BC obtenida mediante diferentes cepas del género *Acetobacter* llevadas a cabo mediante el medio HS (Chen et al., 2017). Los rendimientos obtenidos en algunos casos llegaban a superar los 2 g/L. Los autores realizaron un conjunto de análisis como sería RMN, SEM y finalmente un estudio filogenético para conocer el porcentaje de las diferentes cepas que habían utilizado.

Como se observa en los ejemplos anteriores, la celulosa bacteriana está siendo ampliamente estudiada desde hace años y en especial en la última década para conseguir CB con un proceso de altos rendimientos y para analizar propiedades mecánicas de la misma para comprobar que esta sustancia puede ser utilizado en un amplio campo de aplicaciones como se ha visto en el apartado 8.

En cuanto a la nanocelulosa obtenida mediante de forma natural a partir de la nata de coco también ha sido estudiada por diversos autores. A continuación, se expondrán algunos de los últimos experimentos.

La obtención de nanocelulosa a partir de nata de coco también ha sido realizada por múltiples autores. En 2012, Johari et al. realizaron un estudio para comparar las propiedades en celulosa micro y nanocrystalina de la nata de coco (Johari et al., 2012). Ésta fue lavada hasta que el pH se mantuvo neutro y se secó a 60 grados obteniéndose un polvo blanco. Para obtener NC se añadió al polvo anterior ácido sulfúrico al 65% en peso a 45 grados durante 45 minutos. Posteriormente se aumentó el pH mediante la adición de agua destilada, se centrifugó y finalmente se liofilizó. Johari y su equipo concluyeron que la NC nanométrica disponía de mejores propiedades que la microcelulosa ya que al disminuir el tamaño de fibras, una mayor interacción sería posible. Además, este tipo de celulosa dispone de un mayor tamaño de poros y de una mayor capacidad aceptadora de agua.

En cambio, los resultados de Halib et al. (2012) difieren con el autor anterior con el tiempo con el que la Nata de Coco debía de ser sumergida en agua. En este caso se trataba de entre 1 a 2 semanas, se cree que este mayor lapso de tiempo es porque la nata de coco de este segundo caso provenía de proveedores locales malayos que estaba ya mezclada con almíbar para su venta y no provenía directamente de celulosa bacteriana obtenida de manera estática como en el primer caso.

Por último, la síntesis química ha sido comentada en el apartado 7.3. Vía química realizando una comparativa de diversos autores.



## 10. Parte Experimental

### 10.1. Introducción a la Síntesis y Caracterización de la Nanocelulosa

En este proyecto se llevará a cabo la síntesis y caracterización de la nanocelulosa de tres orígenes diferentes. La primero que se llevó a cabo fue la síntesis biotecnológica, en la cual se utilizó como base el Trabajo Final de Máster realizado por Alberto García el cual tenía el título siguiente: *Optimización de la Biosíntesis de Nanocelulosa Bacteriana por Fermentación* (García, 2017). Se precisó del reservorio de *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans* que permanecía congelado en *ependorfs* desde el 2017 por el mismo Alberto García como fuente de bacterias. En esta primera síntesis se realizará una fermentación en un biorreactor de 1,5 L y finalmente se purificará mediante NaOH para tratar de eliminar las proteínas bacterianas restantes en la mezcla.

En la segunda síntesis, la síntesis natural, se utilizó nata de coco obtenida de a una tienda especializada. Se realizó un proceso de purificado mediante NaOH (Sigma) con posterior ultracongelación mediante nitrógeno líquido y finalmente una adición de ácido para transformar la posible microcelulosa en nanocelulosa. En la extracción de la nanocelulosa a partir de la nata de coco se siguió el procedimiento llevado a cabo por Mohd Amin et al. (2013).

En la última síntesis se llevó a cabo, en cierta medida, mediante el procedimiento de Bondeson (2006) que precisaba de la adición de ácido sulfúrico al 64,8% a la MCC (Sigma). Se escogió este procedimiento ya que era el que disponía de unas condiciones experimentales donde se requería una menor temperatura durante la síntesis.

Finalmente, para comprobar si los resultados experimentales obtenidos son válidos se realizará la caracterización de los mismos mediante espectroscopía infrarroja, difracción de rayos X y microscopía electrónica. Estos dos últimos análisis se llevaron a cabo en Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería Multiescala de Barcelona. A modo de comparativa, la empresa Cellulose Lab (Canadá) cedió muestras de CNF y CNC. Además, la empresa Borregaard (Noruega) cedió una muestra de Exilva para realizar la comparativa con las muestras obtenidas en el laboratorio. En apartados siguientes se observan los resultados de los análisis de caracterización de las muestras.

## 10.2. Material de laboratorio

### 10.2.1. Ultracentrífuga SIGMA K10

Para realizar las separaciones de fases y posterior obtención de la nanocelulosa es necesaria una ultracentrífuga. La ultracentrífuga que se utiliza en el laboratorio es del modelo SIGMA K10 es un modelo para grandes volúmenes. Tiene una capacidad máxima de carga de 6 litros a dividir en 6 compartimentos. Esta centrifuga cuenta con un sistema de refrigeración que baja progresivamente la temperatura hasta unos 3-5 °C. Con el rotor disponible, la velocidad de giro máxima es de 8066 rpm.



Figura 35. Ultracentrífuga SIGMA K10

### 10.2.2. Agitador Magnético IKA C-MAG HS7

Para mejorar la agitación y mantener a cierta temperatura se precisa del agitador magnético calefactable IKA C-MAG HS7. Tiene una capacidad máxima de agitación de 10L y mantiene una temperatura constante entre 30 a 250 °C gracias a una capa calefactora de vitrocerámica la cual tiene una resistencia química muy elevada.



Figura 36. Agitador magnético IKA C-MAG HS 7

### 10.2.3. Colorímetro ZUZI 4200A, $\lambda=660\text{nm}$

Otro de los instrumentos que se utilizará en el laboratorio será el colorímetro Zuzi 4200A, un colorímetro es un instrumento capaz de medir absorción de luz de una disolución en una frecuencia de onda determinada, en este caso se medirá a 660 nm ya que como se verá en imágenes posteriores la mezcla se torna rojiza y a esta longitud de onda se analiza el color rojo. La absorbancia de la muestra nos dará una idea de la concentración de celulosa y bacterias que posee una muestra con lo que indicará una medida de avance de la biosíntesis

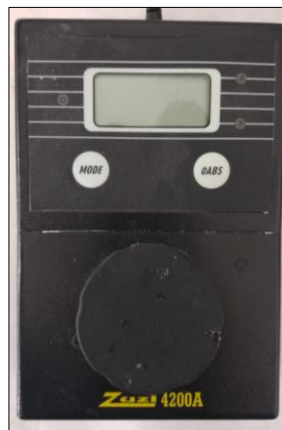


Figura 37. Colorímetro Zuzi 4200A

### 10.2.4. Estufa JP Selecta Conterm

Para realizar esterilizaciones en seco, es decir, con el objetivo de tener el material de laboratorio fuera de contaminación se ha utilizado la estufa Selecta a una temperatura de 200 °C. Este procedimiento consiste en introducir el material de laboratorio, previamente enjuagado con lejía, en la estufa de 200 °C durante 2 horas para la eliminación de microorganismos existentes.



Figura 38. Estufa JP Selecta Conterm

### 10.2.5. Liofilizador

El liofilizador de la marca Christ modelo Alpha 1-4 será utilizado durante el proceso de purificación de las muestras para extraer el agua de las mismas. Este modelo tiene una capacidad de 4 kg y alcanza los  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La liofilización trabaja congelando la muestra y luego reduciendo la presión, a prácticamente el vacío, para permitir que el agua congelada sublime directamente desde la fase sólida a la fase gaseosa, sin pasar por el estado líquido. En la figura 39-B se observa un manómetro que debe estar por debajo de los 0 bar cuando el liofilizador está en marcha para sublimar el agua del interior de las muestras. Para bajar la presión se precisa de una bomba de vacío de la marca Telstar que se intenta que esté el mayor tiempo posible para aumentar la velocidad de la liofilización.

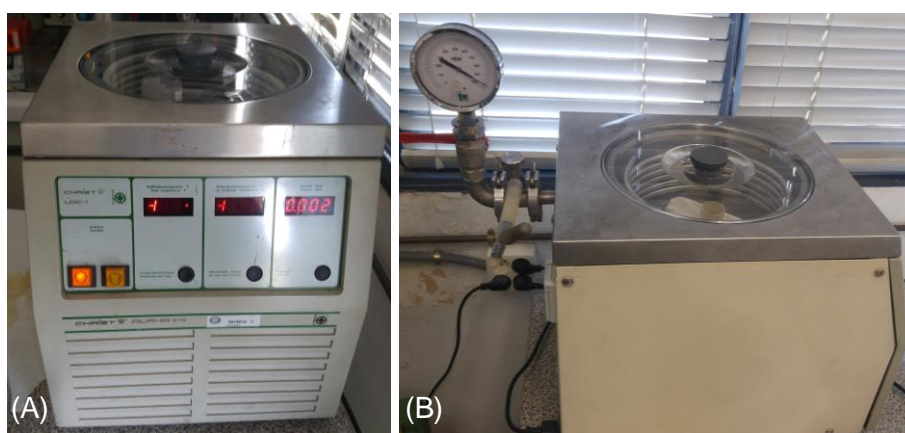


Figura 39. (A & B): Liofilizador Christ Alpha 1-4

### 10.2.6. Sonificador Selecta

Se utilizó un baño de ultrasónicos de la marca Selecta el cual tenía una capacidad de 9 litros con un temporizador de 15 minutos que se para automáticamente. Se utiliza el sonificador en la síntesis química para eliminar los grupos sulfato.



Figura 40. Sonificador Selecta de 9 litros

### 10.2.7. *Espectrómetro de infrarrojo*

El espectrómetro de infrarrojo utilizado es un FTIR Spectrum-Two de Pelkin Elmer. El funcionamiento de este aparato se basa en el haz de radiación infrarroja que se refleja penetrando unas micras en la superficie del material a analizar midiendo la absorción por parte de las moléculas. Es una técnica que sirve para determinar la estructura de compuestos orgánicos. En el caso de los experimentos concernientes al trabajo se utiliza para comparar la MCC, CNF y CNC con las muestras obtenidas mediante las diferentes síntesis.



*Figura 41. Espectrómetro de Infrarrojo*

## 10.3. Síntesis de nanocelulosa por vía biotecnológica

### 10.3.1. Composición del medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado en este proyecto es el resultante de la optimización llevada a cabo por Alberto García en su Trabajo Final de Máster en 2017 (García, 2017). En la siguiente tabla se detallarán los reactivos necesarios para la preparación de 500 mL de medio de cultivo que es la cantidad necesaria para el crecimiento de la primera fase del inóculo. Posteriormente, este inóculo se introducirá en un biorreactor de 1,5L el cual estará contenido en 1,5 litros de calcio de cultivo calculados según la proporción de la tabla 11.

**Tabla 11.** Composición del medio de cultivo. Fuente: García (2017)

Compuesto	Concentración [g/500 mL]	Cantidad [%]
Extracto de levadura	5	1,00%
Glucosa	50	10,00%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,35	0,27%
Ácido cítrico	0,575	0,12%
Agua destilada	443	88,60%
Fe(SO <sub>4</sub> ) 7H <sub>2</sub> O	0,045	0,01%
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,035	0,01%
Monohidrocloruro de L-Lisina	0,05	0,01%
Glicina	0,05	0,01%
L-Glutamina	0,05	0,01%

Cuando se han introducido todos los componentes para la preparación del medio de cultivo en un erlenmeyer de 1 L, se debe de dejar durante un mínimo de una hora a temperatura ambiente en el agitador magnético IKA para que se disuelvan correctamente todos los componentes anteriores.



### 10.3.2. Procedimiento experimental

Previamente a llevar a cabo el crecimiento del inóculo, se tiene que realizar una esterilización en seco. Para ello, primero hay que realizar un lavado del material con hipoclorito sódico para eliminar microorganismos indeseados presentes en los recipientes. Posteriormente, se procede a realizar lavados sucesivos con agua destilada para eliminar cualquier resto de hipoclorito sódico que impida el crecimiento de *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*. Finalmente, se expondrá el material que esté en contacto con las bacterias en el estufa a 200 °C durante 2h para llevar a cabo la esterilización en seco.

Antes de introducirse el medio de cultivo en los erlenmeyers, éste debe de ultrafiltrarse para eliminar cualquier traza de microorganismo indeseado que haya contaminado el medio de cultivo mientras se mezclaba. Para ello se precisa de una filtración al vacío con un filtro de 450 nanómetros, previamente todo el material necesario para la ultrafiltración también ha pasado por un proceso de esterilización en seco.



Figura 42. Muestra congelada de Bacterias *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans* proveniente del cultivo de Alberto García en 2017

Se divide en partes iguales el medio de cultivo, se mantiene a una temperatura de unos 30-35 °C y se introduce en erlenmeyers que previamente han sido esterilizados. Se le añade una punta de espátula de bacterias *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans*, figura 42, en cada uno de ellos provenientes de unas muestras de estas bacterias congeladas por García (2017).

Las condiciones de cultivo del crecimiento bacteriano serán de 30-35°C y pH 6-7. Para el óptimo crecimiento de las bacterias aeróbicas se incorpora una agitación elevada con un agitador magnético IKA con la finalidad de proporcionar el oxígeno necesario por medio de la turbulencia. Se mantendrán dichas condiciones durante las 48 horas que dura la fermentación.

En la figura 43-A se observan los erlenmeyers previos al llenado con el medio de cultivo con un imán para la agitación. En la figura 43-B se ejemplifica cuando se acaban de llenar con medio de cultivo y después de la incorporación punta de espátula de *Gluconacetobacter xylinus sucrofermentans* al medio. Para intentar reducir las posibilidades de contaminación de microorganismos se tapa con un papel el cual permite la correcta aireación, pero evita, en cierta medida, la contaminación.

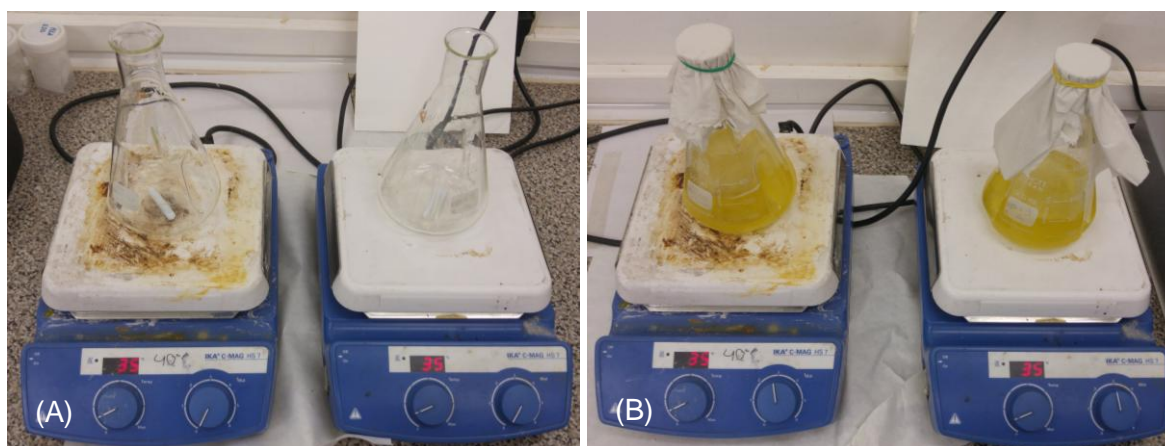


Figura 43. Representación previa (A) y posterior (B) al llenado del medio de cultivo y la bacteria.

En la figura 44 se observa el antes y después de las 48h de la fermentación. Se puede contemplar en la figura 44-B que después de 48h de fermentación la mezcla se ha oscurecido y ha espesado.

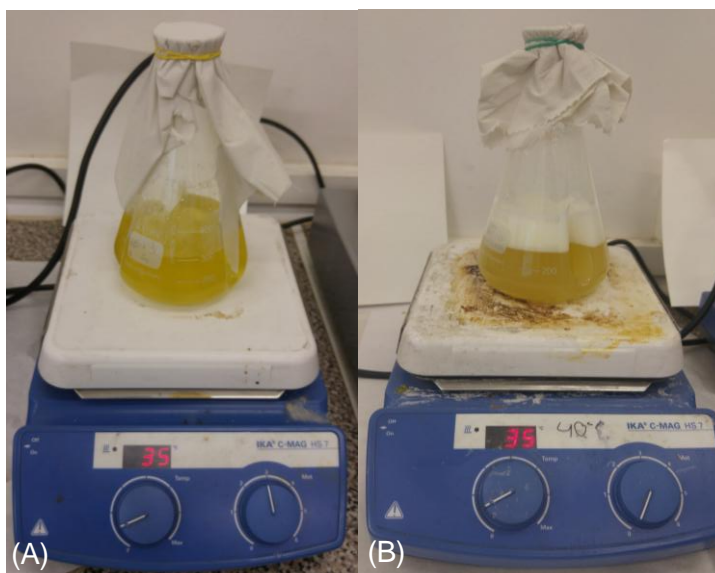
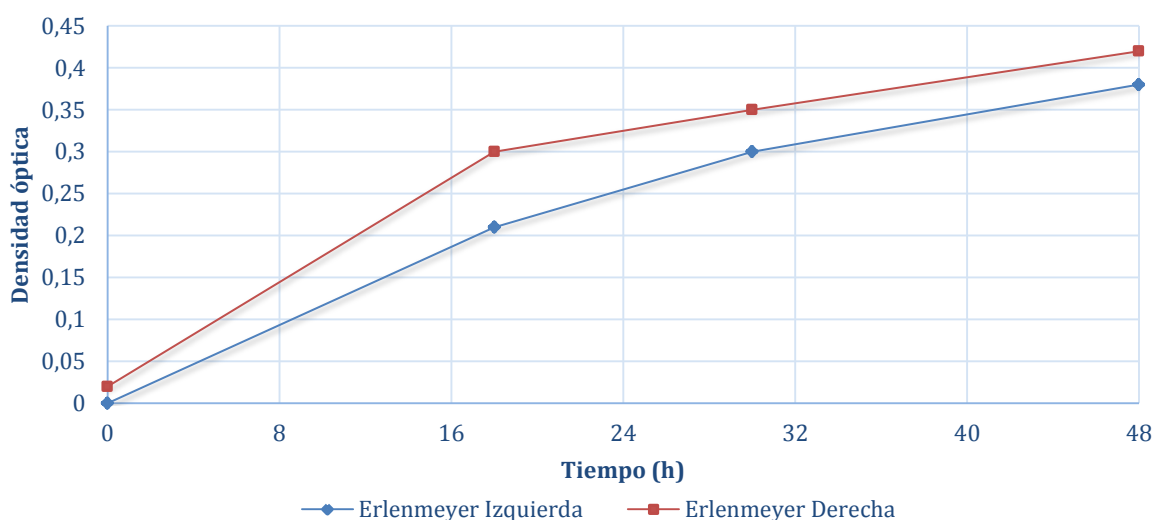


Figura 44. Cultivo inicial (A) y pasadas 48h (B)

Se analizó la densidad óptica de ambos erlenmeyers mediante el colorímetro ZUZI 4200A midiendo a 660 nm. Para ello se midió en el primer momento su densidad óptica, ésta medía 0,6 por lo que se decidió llevar a cabo una dilución del 10% ya el valor máximo que mide este colorímetro es de 2 y lo sobrepasaría con creces después de 48h. Los valores de la actividad óptica para ambos erlenmeyers se observan en la siguiente gráfica:

**Gráfico 1.** Densidad óptica vs tiempo



Pasadas las 48h de inicio del experimento se debe de hacer una centrifugación para una correcta separación de la fase sólida y del medio de cultivo, por ello, debe de hacerse durante 20 minutos a 8066 rpm y entre 3-5 °C. En la siguiente figura se observa el precipitado de bacterias en la base del recipiente. Se elimina el sobrenadante del recipiente y se mantiene el concentrado de bacterias refrigerado hasta su uso. Se repite el mismo procedimiento explicado anteriormente tanto para la preparación de 1,5L de medio de cultivo como para la esterilización del biorreactor de 1,5L y del material que se utilizará posteriormente.

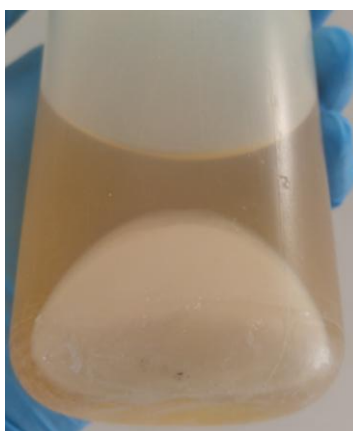


Figura 45. Sobrenadante y precipitado de bacterias

En la siguiente figura 46-A se observa el biorreactor recién llenado de medio de cultivo y bacterias obtenidas del proceso anterior. A diferencia de la síntesis anterior, en esta se añade una punta de espátula de silicona para evitar crear espuma y que rebose del reactor el concentrado de caldo de cultivo y bacterias. Se también observa en la imagen 46-A el agitador y el tubo con el que se conecta la bomba de aire que insufla aire a la mezcla. Además, se precisa de una camisa calefactora que mantenga el contenido a unos 30 grados durante la síntesis. En la imagen 46-B se observa el resultado de la reacción.

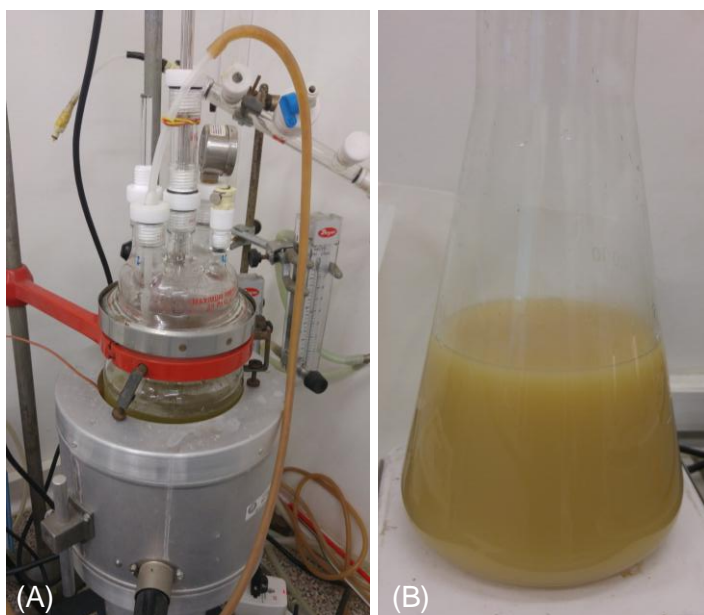
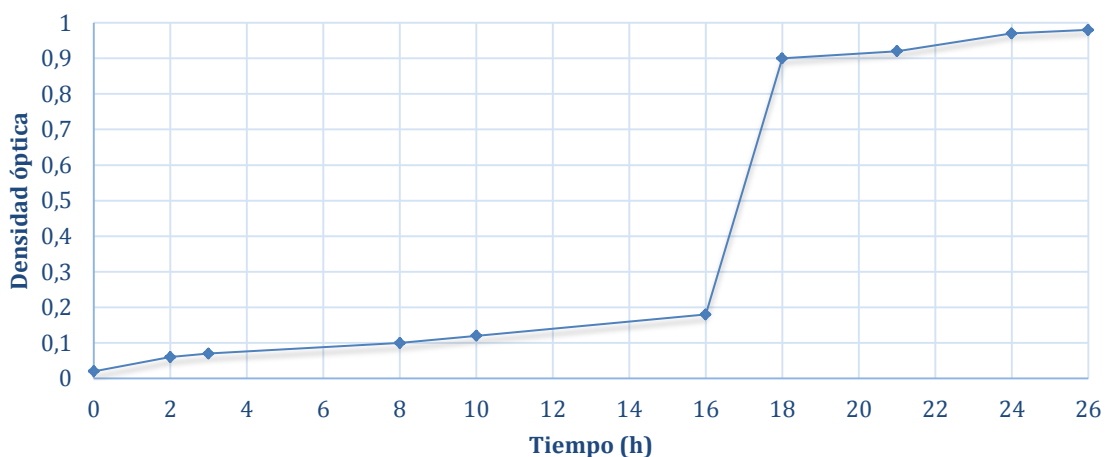


Figura 46. (A): Biorreactor lleno de medio de cultivo y precipitado de bacterias (B): resultado de la reacción

Para conocer el proceso de la reacción se ha analizado la actividad óptica de igual manera que en el anterior proceso. Cuando se ha completado la reacción, es decir, cuando no quedan más azúcares de los cuales las bacterias se alimentan, es cuando se mantiene constante la densidad óptica. Se puede vislumbrar este hecho en el gráfico siguiente:

**Gráfico 2.** Densidad óptica en biorreactor de 1,5L vs tiempo



Si se comprara el gráfico 1 y 2 anteriores, se observa que en el primero de ellos no ha habido el crecimiento exponencial que claramente se contempla en segundo. Se decidió detener la biosíntesis de celulosa para evitar contaminaciones en el primer caso ya que el erlenmeyer estaba tapado con papel y no cerrado como el biorreactor. Tanto en los erlenmeyers como en el biorreactor de 1,5 L se realizaron mediciones de pH cuando se extraían muestras de la mezcla medio de cultivo y bacterias para analizar la actividad óptica y en todos los casos el pH se encontraba en el intervalo 6-7.

### 10.3.3. Separación y purificación de la celulosa bacteriana

Para separar la celulosa bacteriana del medio de cultivo, primeramente, se precisa de una etapa en la ultracentrifugadora SIGMA K10 de 25 minutos a 8066 rpm y a una temperatura de entre 3-5 °C para poder separar el concentrado de bacterias, la celulosa y el líquido sobrenadante. Este procedimiento se lleva a cabo un total de 3 veces con una duración de 25 minutos cada una. Cada vez que se lleva a cabo una centrifugación, se intenta reducir el número de recipientes que contienen CB para tratar de reducir pérdidas operativas. Siempre que se lleva a cabo una centrifugación los 6 recipientes deben contener el mismo peso, ya que de otra manera la máquina se encontraría descentrada y se pararía automáticamente.

Para la separación de la celulosa bacteriana de las bacterias hay que realizar una destrucción o lisis de las bacterias. El método de lisis escogido es mediante el tratamiento con una solución básica de NaOH 2M durante 24 horas a temperatura ambiente y lavado con agua para eliminar el NaOH. En la siguiente figura se observa el inicio (47-A) y final de la adición de NaOH (47-B), así como como queda el precipitado después de la centrifugación (47-C).

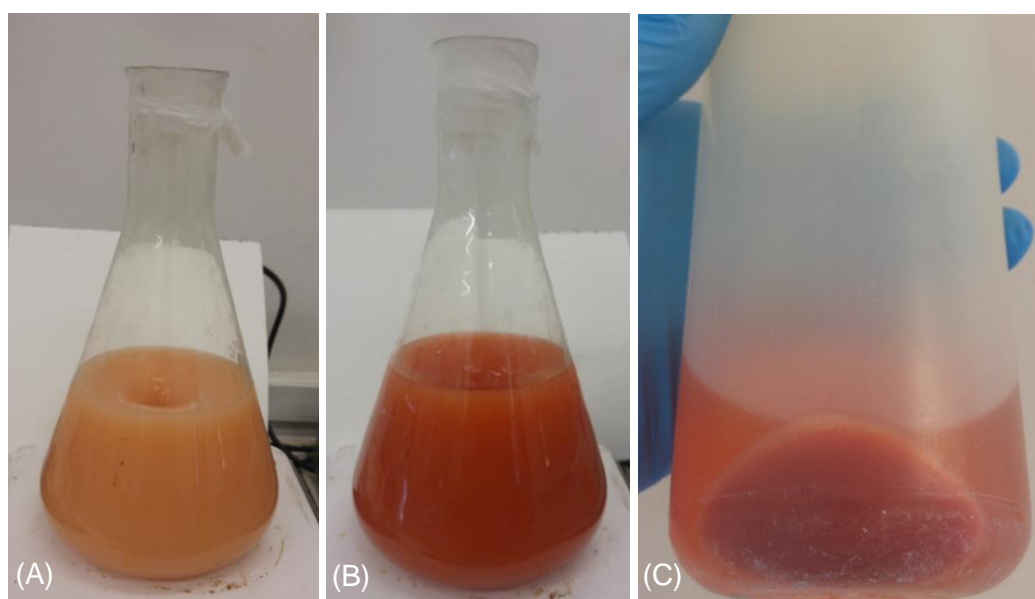


Figura 47. Inicio (A) y final (B) de la reacción con NaOH; (C) Concentrado de bacterias y celulosa bacteriana



Este proceso se lleva a cabo por segunda vez sin necesidad de liofilizar la BC y de realizar una espectroscopía IR ya que como observó García, A (2017) aún, como mínimo, debe de realizarse otra adición de NaOH para reducir la presencia de proteínas bacterianas. Se llevó a cabo otra adición de NaOH 2M durante 48 horas a temperatura ambiente. En la figura siguiente se observa el inicio (48-A), final del lavado de CB con NaOH (48-B) y el concentrado del mismo (48-C). Como en primer lavado con NaOH, el concentrado de bacterias se obtuvo mediante 6 centrifugaciones de 20 minutos cada una a 8066 rpm y 4 °C. Para reducir el pH del conjunto se fue añadiendo agua destilada en cada lavado. Por último, se siguió el mismo procedimiento de ir concentrando en el mínimo de recipientes el precipitado con el objetivo de minimizar pérdidas operativas.

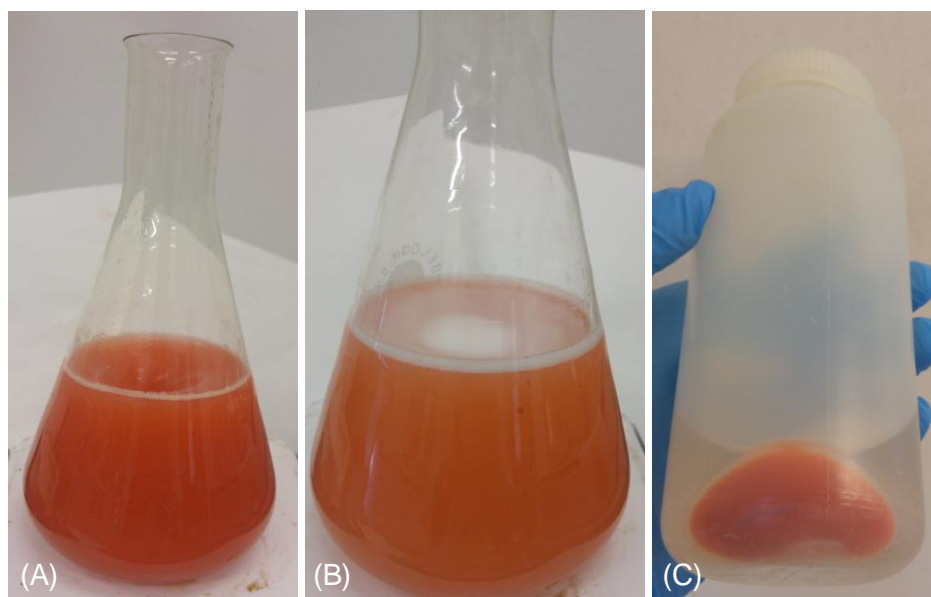


Figura 48. Inicio (A) y final (B) del segundo lavado con NaOH; (C): Concentrado de bacterias y celulosa bacteriana

El secado de la celulosa bacteriana se realiza mediante la liofilización. Para ello, previamente hay que congelar mediante nitrógeno líquido el concentrado de bacterias y celulosa bacteriana que se ha obtenido mediante centrifugación. Cuando la muestra ha estado congelada, ésta se introduce en el liofilizador que tiene una temperatura de -54 °C y en ese mismo instante se debe de realizar el vacío mediante una bomba de vacío de la marca Telstar para evitar que la humedad ambiental se congele en los tubos de refrigerante y reduzca el rendimiento del liofilizador. Se mantiene la muestra en el liofilizador hasta que se encuentra completamente seca. Esta muestra precisó de 5 días hasta su completo secado. Durante estos días se fue encendiendo la bomba de vacío a intervalos de 5 horas diarias para aumentar la velocidad del secado.



Se realizó un análisis mediante espectroscopía IR de la celulosa bacteriana obtenida mediante dos lavados de NaOH y posterior liofilización. Se observó en el gráfico 3 de la próxima página, en el segundo lavado con NaOH era aún muy predominante la zona las proteínas de las bacterias en la franja de  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Por este motivo, se decidió realizar otro tratamiento con NaOH 2M durante 48 horas, pero en este caso, también durante un periodo 2 horas se decidió llevar la mezcla a una temperatura 60 grados para intentar degradar en mayor medida proteínas bacterianas. En la figura 49-A se observa el inicio del tercer lavado con NaOH y en la figura 49-B se observa el final de la reacción.

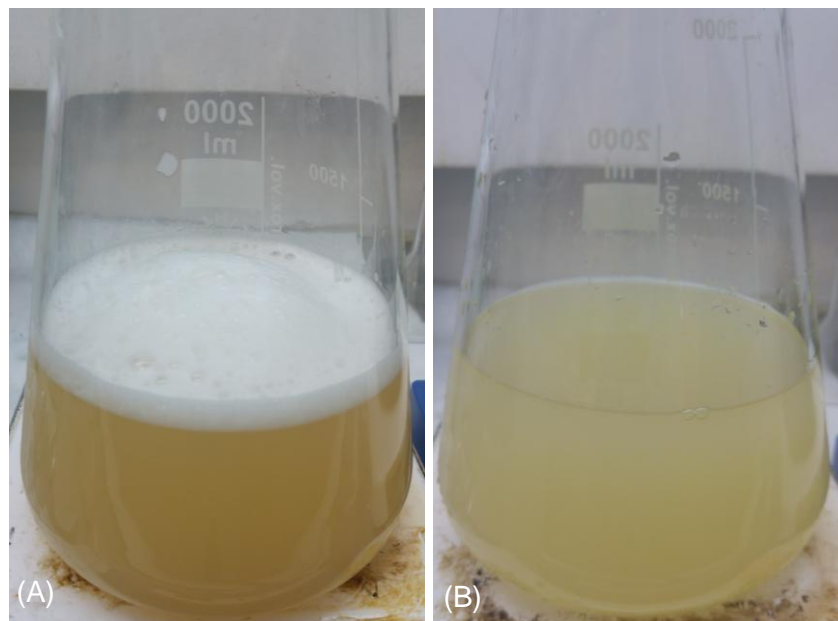


Figura 49. Inicio (A) y final (B) de la tercera reacción con NaOH

En la siguiente tabla se ejemplificará el peso húmedo y seco de la celulosa obtenida mediante 2 y 3 lavados con NaOH.

**Tabla 12.** Peso húmedo y seco de celulosa bacteriana del segundo y tercer lavado con NaOH

	Peso húmedo de CB (g)	Peso seco de CB (g)	Rendimiento (g/L)
Segundo lavado	14,33	2,37	1,58
Tercer lavado	15,5	1,56	1,04

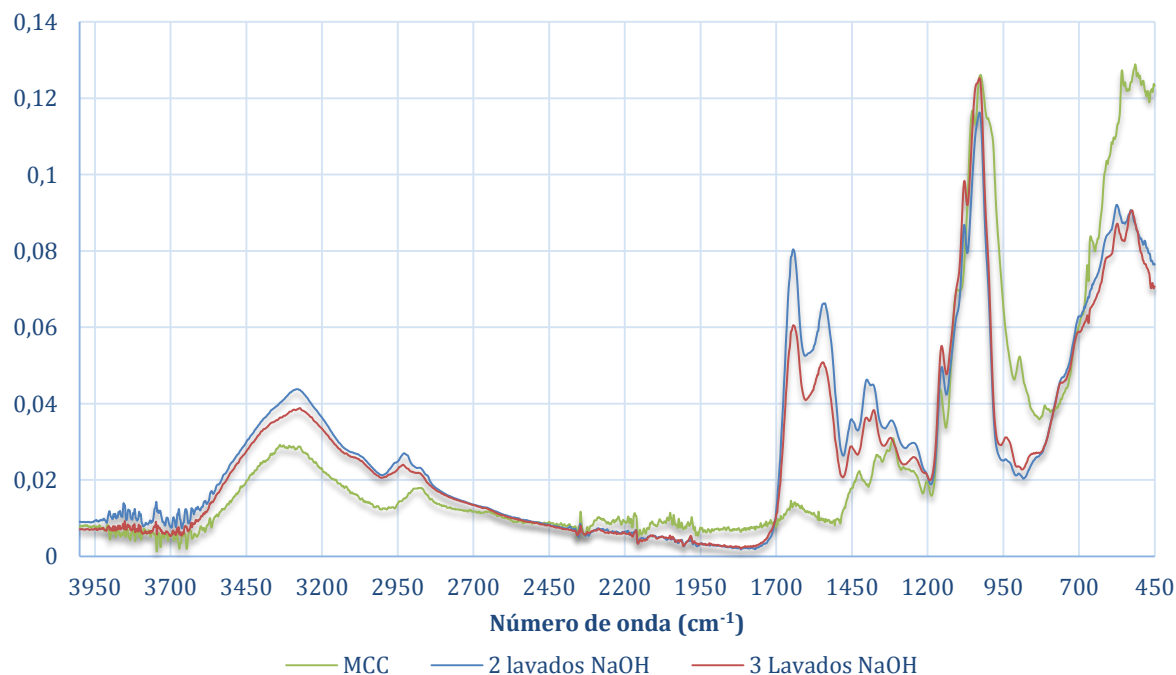
Como se observa en la tabla 12, el rendimiento de la síntesis biotecnológica baja con respecto del segundo al tercer lavado ya que hubo pérdidas operativas y hubo una lisis celular y rotura de enlaces por medio de la utilización de NaOH.

A continuación, se muestran las gráficas de espectroscopía IR de la MCC y la celulosa bacteriana obtenida en la primera réplica del experimento mediante el tratamiento con NaOH y posterior liofilización de la segunda y tercera reacción con NaOH,

A continuación, se va a realizar un análisis de los picos que aparecen en los próximos gráficos. Para ello, primero se empezará desde números de onda mayores a menores. Las 3 muestras del gráfico siguiente tienen dos picos a 3265 y 2915-2840  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a las vibraciones de grupos -OH y C-H respectivamente. En la siguiente franja, se observan unos picos a 1632-1638 y 1534  $\text{cm}^{-1}$  que son representativos de enlaces de amidas los cuales se encuentran asociados con proteínas bacterianas y biomasa residual. Esta biomasa residual puede ser originada por la bacteria o por compuestos del medio de cultivo que permanecieron junto a las fibras de celulosa después de los lavados con NaOH. Se observa que entre el segundo y tercer lavado con NaOH a 60 grados estos picos mencionados anteriormente se reducen en un 60%. El pico a 1429  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al enlace C-H.

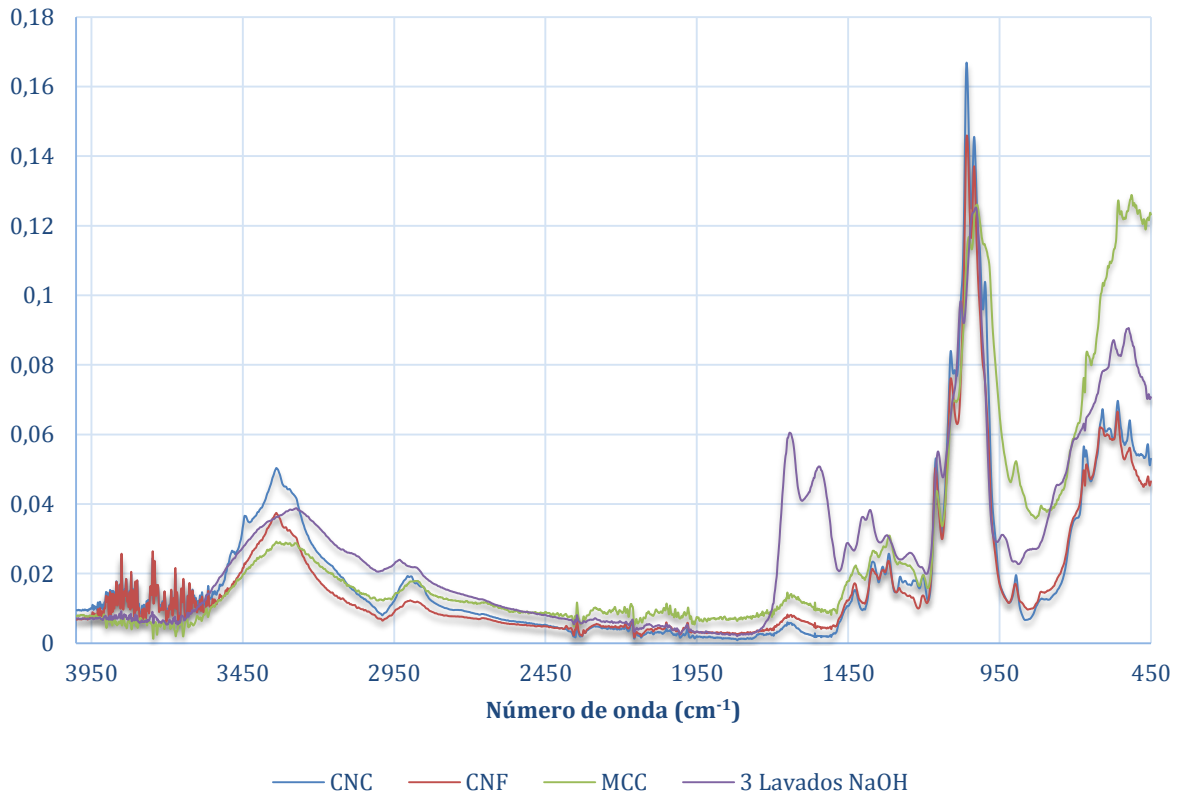
La siguiente franja a estudiar está comprendida entre los 1400 a 1000  $\text{cm}^{-1}$ . En esta franja se encuentran cuatro picos, el primero de ellos se encuentra a 1410-1420  $\text{cm}^{-1}$  y representa al enlace C-H, más concretamente el  $\text{CH}_2$  con una flexión simétrica. En el segundo y terceros se encuentran a 1110 y 1060  $\text{cm}^{-1}$  y corresponden a los enlaces C-OH y C-C-OH, respectivamente. Por último, existe un pico muy prominente a 1024  $\text{cm}^{-1}$  que representa el enlace C-O-C. (Chang y Chen, 2016)

**Gráfico 3.** IR de MCC, CB con 2 y tres lavados con NaOH



En el gráfico 4 están representados tanto la MCC, CNF, CNC y la celulosa bacteriana obtenida mediante 3 lavados con NaOH. Se observa que tanto la MCC, CNF, CNC y CB tienen aproximadamente los mismos picos que los mencionados en la página anterior para el gráfico 3.

**Gráfico 4.** IR de MCC, CNF, CNC y CB con 3 lavados de NaOH



#### 10.3.4. Procedimiento experimental de la réplica

Como se observará en apartado 13. *Microscopía electrónica* y en el apartado 14. *Comparativa de resultados de IR, XRD y microscopía electrónica* esta primera síntesis bacteriana no tuvo los resultados esperados. En IR sí que aparecieron los picos típicos de la nanocelulosa, pero en cambio en XRD ni el SEM apareció celulosa bacteriana.

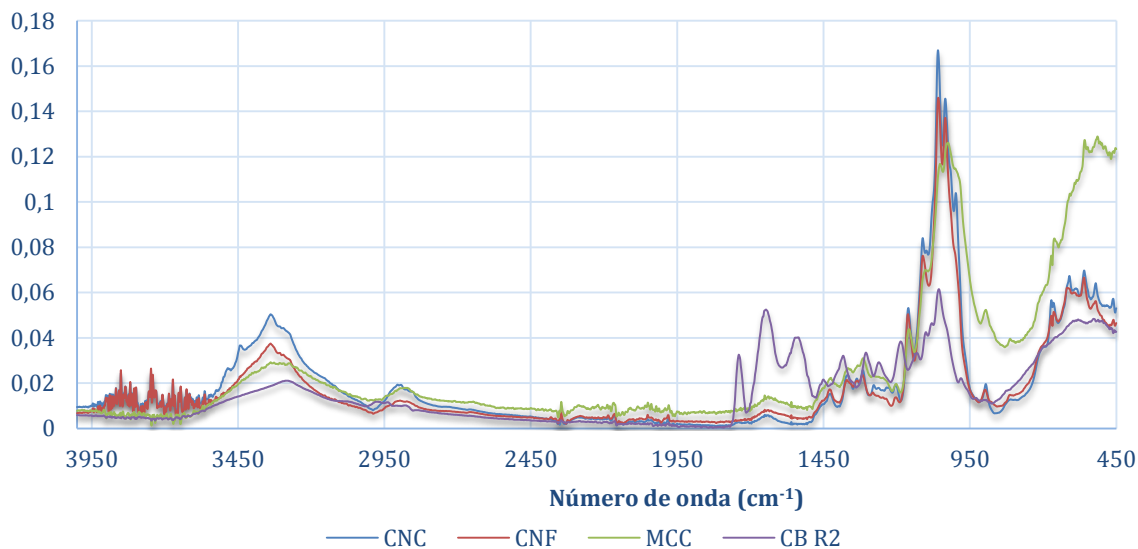
Por este motivo, se decide repetir el procedimiento experimental llevado a cabo en la primera réplica, pero con algunos cambios. El primero de ellos es que no se utilizó la muestra de BRP 2001, también llamada *Acetobacter xylinus*, proveniente del reactor de Alberto García. Sino que se optó por utilizar una muestra liofilizada de dichas bacterias proveniente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) que se compró en noviembre de 2016 y se realizó un primer cultivo con las condiciones que recomienda el vendedor que se encuentran en la tabla de la página siguiente.

**Tabla 13.** Medio de Cultivo recomendado por CECT para BPR 2001. Fuente: CECT

Medio de Cultivo	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	5
Peptona	2
Manitol	25
Agua	1000

Se añadieron 300 ml del caldo de cultivo anterior a un erlenmeyer que con agitación magnética y se mantuvo durante unas 48h a 30 grados para el óptimo crecimiento bacteriano. Cuando se han superado las 48 horas, se centrifuga el contenido y una parte se guarda congelado en *ependorfs* para posteriores futuros experimentos. El resto del contenido de las bacterias se introduce en el biorreactor de 1,5L con el caldo de cultivo en la misma proporción que la tabla 11. El procedimiento llevado a cabo para esterilizarlo es el mismo que en la primera réplica.

Pasadas 24h de inicio del experimento, se centrifuga a 8066 rpm y a 6 °C. El concentrado de bacterias se añade a una disolución de NaOH 0,1M a 80 grados durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifuga sucesivas veces (en las mismas condiciones anteriores) con agua destilada para reducir el pH de la mezcla. La CB obtenida se congela mediante nitrógeno líquido y se mantiene en el liofilizador durante 72h. La producción de nanocelulosa, después de liofilizar, fue de 4,33 g/L. La nomenclatura utilizada en el gráfico siguiente: CB R2 significa celulosa bacteriana de la segunda réplica.

**Gráfico 5.** IR de CNF, CNC, MCC y CB R2

Los picos representados en el gráfico anterior se encuentran explicados al final del apartado 10.3.3 Separación y purificación de la celulosa bacteriana.

## 10.4. Obtención de nanocelulosa por vía natural

### 10.4.1. Procedimiento experimental

El procedimiento experimental llevado a cabo en la obtención de nanocelulosa por vía natural se basa en el utilizado por Mohd Amin et al. (2013). Se empieza con el escurrido del almíbar con el que la nata de coco es acompañada en el recipiente. Se realizan múltiples lavados con agua destilada. Se escurre el líquido restante y, posteriormente, se realiza un lavado con abundante agua destilada y, por último, se vuelve a verter el contenido dentro de frasco de la nata de coco y más agua destilada. Se mantenían los frascos con refrigeración para que reducir las posibilidades de sufrir contaminación bacteriana. El proceso mencionado previamente se repitió cada día durante 3 días consecutivos para eliminar el almíbar diluir los azúcares presentes en el líquido que acompaña la nata de coco.

Después de repetir por tercera vez el proceso de limpieza del párrafo anterior, se elimina el agua destilada del último lavado y se mezcla mediante una batidora a 250 rpm durante 10 minutos. Se aparta una porción de la nata de coco batida para realizar un análisis de IR del antes y después de todos los procesos que se lleven a cabo. La nata de coco batida era extremadamente gelatinosa con un color blanquecino.

La nata de coco se añadió a 1,5 L de disolución de NaOH a 80 grados durante 1h para eliminar glúcidos y proteínas presentes en la mezcla inicial. En la figura 50-A se observa la mezcla a 80 °C inicialmente y en la figura 50-B se visualiza la mezcla al final de la hora de reacción.

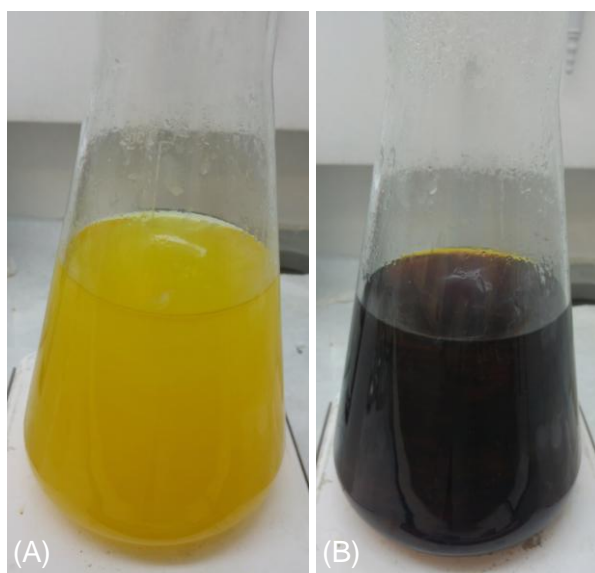


Figura 50. (A): nata de coco con NaOH 80 °C inicialmente;  
(B): mezcla de nata de coco y NaOH pasada 1h

El resultado de la reacción con NaOH se centrifuga sucesivas veces, en primer lugar, para eliminar el color negruzco observado en la figura 50 y, en segundo lugar, para reducir progresivamente el pH hasta llegar a un pH neutro mediante la adición de agua destilada en cada centrifugación de 20 minutos a una temperatura de 5 grados. Se precisaron un total de 5 centrifugaciones. En cada centrifugación, se intenta reducir el número de recipientes utilizados para reducir posteriores pérdidas operativas. Posteriormente, el precipitado de la centrifugación se debe de congelar mediante nitrógeno líquido para introducirse en el liofilizador, de esta manera se elimina toda el agua para posteriores procesos. En la imagen 51-A se observa a muestra de nata de coco centrifugada después del tratamiento con NaOH y en la 51-B se observa la nata de coco después de la liofilización.

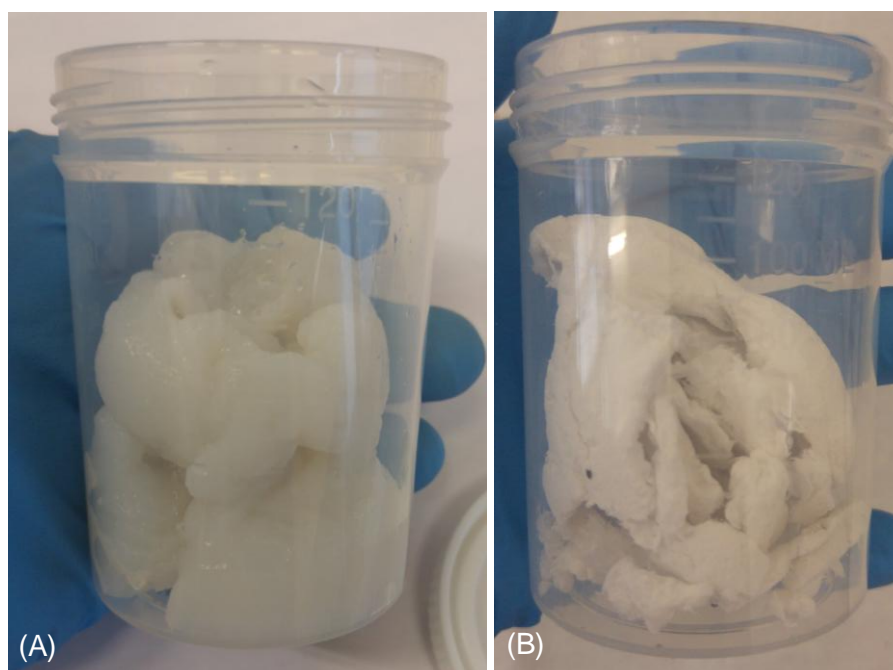


Figura 51. (A): Resultado del centrifugado de nata de coco después del tratamiento con NaOH;  
(B): Nata de coco después de liofilizar

Para que la muestra de la figura 51 estuviera seca tuvo que permanecer durante un mínimo de 72 horas, durante este lapso de tiempo se ha ido encendiendo la bomba de vacío un periodo de 5 horas diarias para intentar acelerar el proceso de secado. Previamente a seguir con el procedimiento experimental, se cogió una muestra para posteriores análisis mediante de espectroscopía IR.



Se preparó una disolución de 500 mL del 20% en volumen de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ). A continuación, se ejemplifican los cálculos realizados para conocer el volumen de ácido fosfórico. Se partía de ácido fosfórico (Sigma) al 85% en peso:

$$0,2 = \frac{0,85 \cdot V_{\text{fosfórico}}}{\text{Volumen total de disolución}} = \frac{0,85 \cdot V_{\text{fosfórico}} \text{ (mL)}}{500 \text{ mL}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$V_{\text{ácido fosfórico}} = 117,6 \text{ mL}$$

Se introdujo en la disolución anterior de ácido fosfórico al 20% la nata de coco seca obtenida mediante el tratamiento con hidróxido sódico que había permanecido 72h en el liofilizador. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 60 °C durante 2h. En la siguiente figura se visualiza el final de la reacción.



Figura 52. Final de reacción de Nata de Coco con ácido fosfórico

Al finalizar las 2h se añade 500 mL de agua y se sigue agitando durante 30 minutos adicionales manteniendo la temperatura de 60 °C. Para la etapa de purificación, se realizan un total de 4 lavados de 30 minutos de duración cada uno a 8066 rpm y 5 °C. Se analiza el pH en cada lavado para confirmar que ha llegado a pH neutro, y cuando es así, se elimina el sobrenadante y el precipitado se introduce en un recipiente que será congelado y puesto en el liofilizador durante otras 72h.

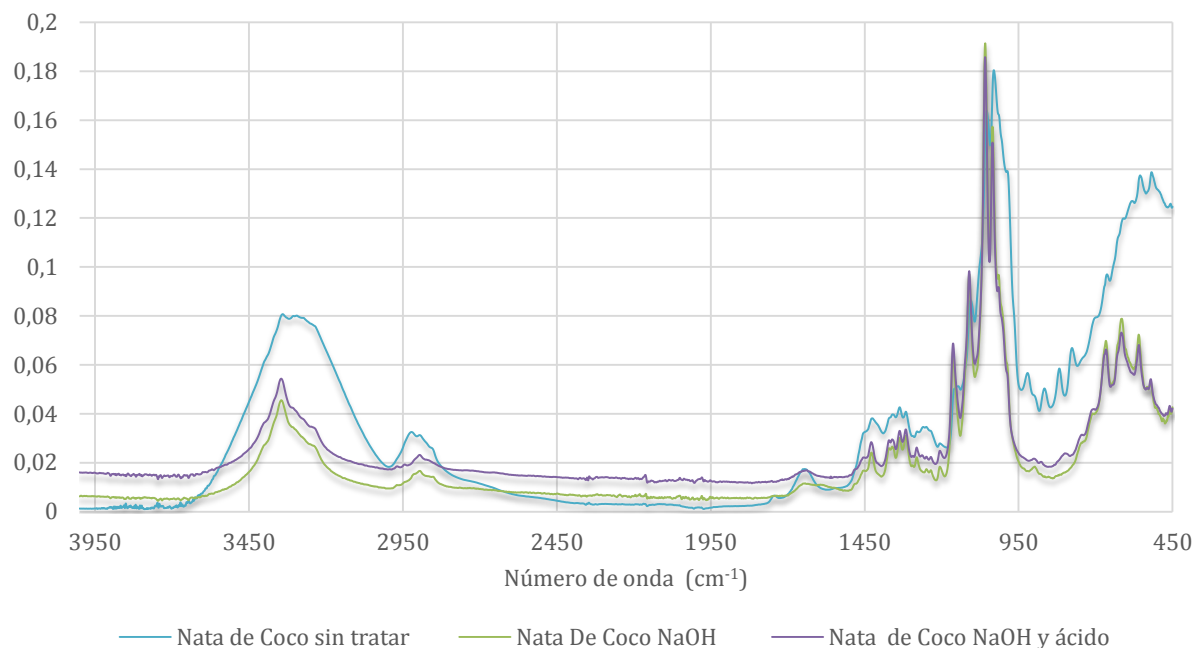
La masa obtenida después de los tratamientos con NaOH y ácido fosfórico fue de 11 gramos. Después de pasar por el tratamiento de liofilización, la masa final seca fue de 4,5 gramos.

Para calcular el rendimiento, primero de todo se pesó la masa de nata de coco inicial que se había partido. Ésta era de aproximadamente de 780 gramos (muestras con agua). El rendimiento se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\eta = \frac{\text{masa final}}{\text{masa inicial}} \cdot 100 = \frac{4,5}{780} \cdot 100 = 0,57\% \text{ (Ecuación 2)}$$

A continuación, se muestran las gráficas de la espectrometría infrarroja de la nata de coco sin tratar, de la nata de coco mediante el tratamiento con NaOH y finalmente, la nata de coco con NaOH y tratamiento ácido:

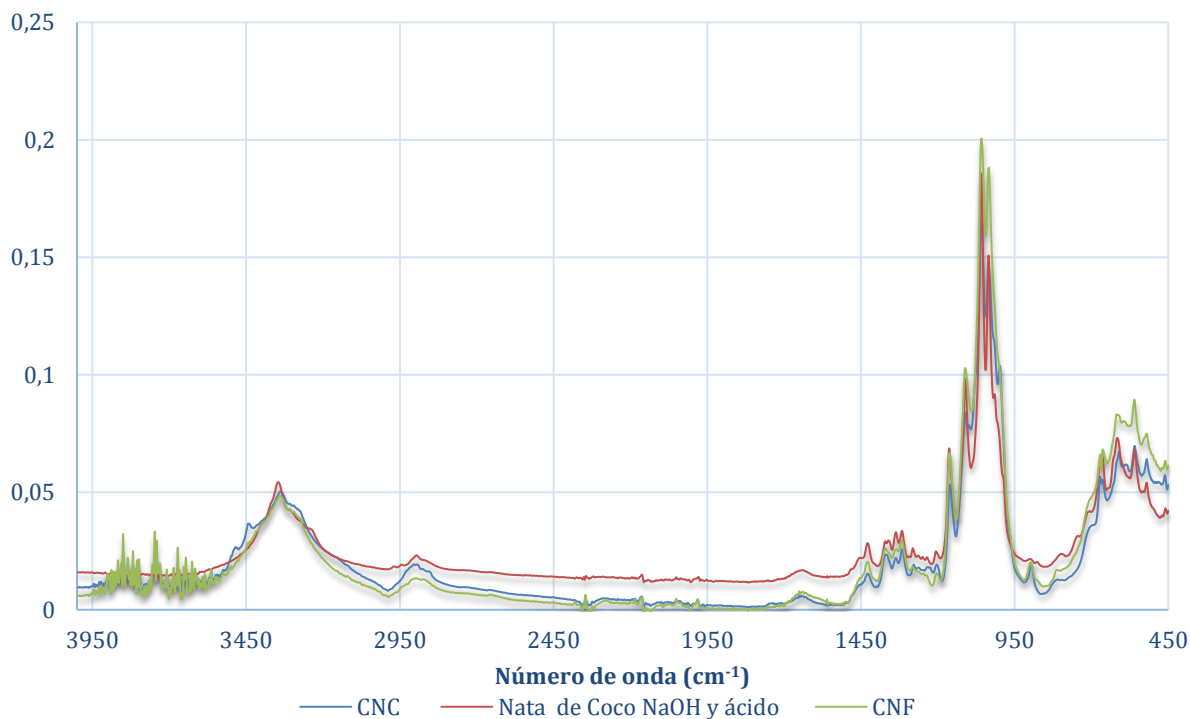
**Gráfico 6.** IR de nata de coco sin tratar y tratada



En el anterior gráfico se observa, a grandes rasgos, que el IR de los tres compuestos graficados es muy similar y no se observan cambios significativos. La nata de coco sin tratar se observa que tanto el pico a  $3280 \text{ cm}^{-1}$  y la zona de  $450\text{-}950 \text{ cm}^{-1}$  se encuentran en un nivel superior al resto de nata de coco que ha recibido algún tipo de tratamiento. En la siguiente página se detallarán los picos más importantes de la nata de coco NaOH y ácido.

Para visualizar de una mejor manera los gráficos de la nata de coco con NaOH y NaOH y ácido se decide graficarlos de manera separada a la nata de coco sin tratar. Se grafican además el IR de tanto nanocristales y nanofibras para compararlo con la nata de coco.

**Gráfico 7.** IR de la nata de coco tratada con NaOH y nata de coco con NaOH y ácido



A continuación, se ejemplifican los picos más importantes del espectro infrarrojo de la nata de coco con NaOH y ácido:

**Tabla 14.** Picos del espectro de nata de coco NaOH y ácido

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de enlace
3340	-OH
2905	-CH
1432	-CH
1400	-CH <sub>2</sub>
1110	-C-OH
1059	-C-C-OH
1024	-C-O-C

## 10.5. Síntesis de nanocelulosa por vía química

### 10.5.1. Procedimiento experimental

Como se ha tratado previamente en el apartado 7.3. *Vía química*, la metodología experimental llevada a cabo para la síntesis de la nanocelulosa por vía química se basa, en cierta medida, en el estudio de Bondeson et al. (2006). Se escogió dicho procedimiento experimental ya que, en comparación con demás estudios analizados, éste se llevaba a cabo con condiciones experimentales menos energéticas gracias a la utilización de hielo para reducir la temperatura de la mezcla. Se obtenían además unas longitudes de fibras cercanas a 180 nanómetros y un rendimiento experimental del 18%, hecho que lo diferenciaba de algunos de los estudios llevados a cabo por otros autores. Dicho estudio se explicará en profundidad, además de tratar los cambios llevados a cabo.

Las diferentes réplicas de dicho experimento se llevaron a cabo mediante los mismos reactivos, únicamente difieren en el orden de introducción de los mismos. En este experimento se utilizó ácido sulfúrico al 96% (Panreac), se precisó una dilución del mismo a la concentración al 64,8% en peso. Se decidió escoger una masa total de ácido de 150 gramos. A continuación, se ejemplifica el cálculo realizado para conocer la masa de agua necesaria para realizar la dilución de ácido del 96 al 64,8%:

$$\frac{150 \cdot 0,96}{150 \cdot 0,96 + 150 \cdot 0,4 + \text{masa agua}} = 0,648 \rightarrow \text{Masa agua} = 72,2 \text{ gramos (Ecuación 3)}$$

$$\text{Masa MCC} = \frac{15 \text{ g MCC}}{100 \text{ mL disolucion}} * (150 \text{ g H}_2\text{SO}_4 + 72,2 \text{ g H}_2\text{O}) = 33,33 \text{ g (Ecuación 4)}$$

En la primera réplica se siguió el experimento de Bondeson y su equipo. Se añadieron tanto 33,33 g de MCC (Sigma), calculado a partir de la ecuación 4, como 60 gramos de agua en un erlenmeyer de 1L. El conjunto se mantuvo en un baño de hielo durante 10 minutos hasta que la temperatura disminuyó hasta los cero grados. En la figura 53-A se observa la mezcla mencionada anteriormente, la cual tenía una textura de semisólida que no permitía ser agitada mediante un agitado magnético. Por este motivo, requirió un agitado manual mediante una varilla de vidrio para la completa dispersión de la microcelulosa en agua.

Se introdujeron progresivamente los 150 gramos de disolución de ácido sulfúrico de manera que no aumentase excesivamente la temperatura ya que se trata una reacción muy exotérmica. Por último, se enjuagó el vaso de precipitados que contenía ácido sulfúrico con 12,2 gramos de agua restantes para finalmente tener una disolución de un 64,8% en peso de ácido sulfúrico. A partir de este punto, se continúa con agitación manual ya que la mezcla continúa en el baño de hielo y la MCC continúa sin solubilizarse.

En la figura 53-A se observa la mezcla de MCC y agua, la figura 53-B ejemplifica el final de la adición de sulfúrico aún con el baño de hielo. Finalmente, en la figura 53-C se visualiza el final de la reacción después de 2h a 40 grados centígrados.

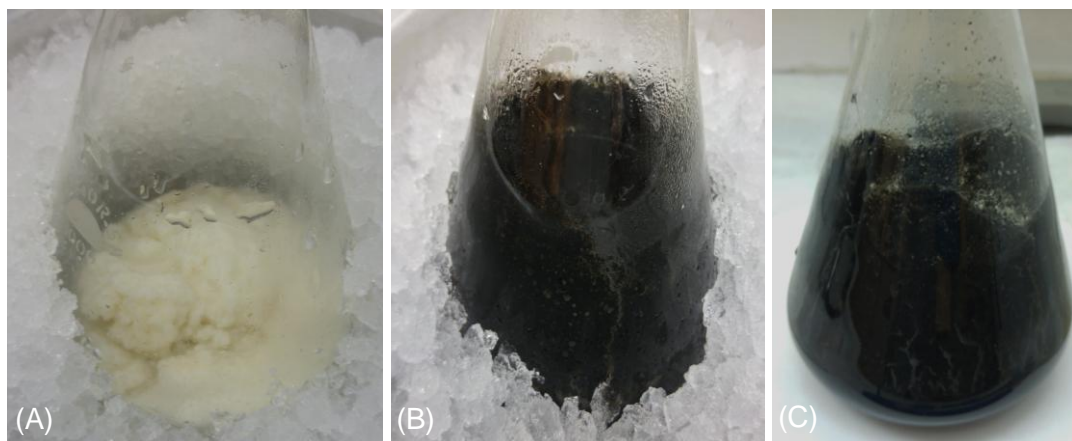


Figura 53. (A): Mezcla de MCC y agua en baño de hielo; (B): MCC, ácido sulfúrico en baño de hielo; (C): final de la reacción después de 2h a 40 grados

Cuando se ha enfriado suficientemente la mezcla de MCC, ácido sulfúrico y agua, se aparta el baño de hielo y se deja en el agitador magnético IKA a 40 °C. Al aumentar progresivamente la temperatura, la MCC se va solubilizando llegando a no precisarse un agitado manual. El tiempo total de reacción fue de 2 horas. La figura 53-C se observa el final de la reacción.

Después de finalizar las dos horas de reacción, se añaden unos 500 mL de agua al erlenmeyer y se mantiene la agitación durante otros 20 minutos adicionales, en primer lugar, para enfriar la mezcla y en segundo lugar para reducir la viscosidad del conjunto. Se centrifuga un total de 5 veces a 5 °C durante 15 minutos y 8066 rpm mediante la adición de agua destilada a la mezcla hasta que el pH haya aumentado hasta un pH cercano a pH neutro. En cada centrifugación se va concentrando el precipitado en un menor número de recipientes, es decir, inicialmente estaba dividido en 6 y finalmente únicamente en 2. De uno éstos se extrajo el precipitado y se guardó en un recipiente para su posterior congelación.

En el segundo, se realizó el proceso de sonicación mediante el sonicador Selecta. Finalmente, también se tuvo que realizar una última centrifugación en las mismas condiciones anteriores ya que para el proceso de sonicación el precipitado debía estar solubilizado dentro del recipiente. Ambas muestras obtenidas, tanto la sonicada como la no sonicada, fueron congeladas mediante nitrógeno líquido e introducidas en el liofilizador durante 48 horas hasta su completo secado.

Como se observa en las imágenes de la página anterior, la mezcla de MCC se tornó negra por lo que se cree que se carbonizó por la adición del ácido sulfúrico con agua. Para evitar que se volviese a oscurecer la nanocelulosa final, se decidió cambiar el orden de introducción de los reactivos.

Se precisaron un total de 4 réplicas hasta que las muestras no se tornaron negras y se obtuvo un rendimiento cercano al teórico de Bondeson. En las siguientes réplicas se añadieron los 60 gramos de agua en el erlenmeyer de 1L con un baño de hielo y se introdujeron muy lentamente los 150 gramos de disolución de ácido sulfúrico. Se esperó a que el conjunto tuviese una temperatura cercana a cero grados para evitar que se volviese a oscurecer la MCC.

Posteriormente, se introdujo la MCC paulatinamente en el erlenmeyer y se observó que no se solubilizaba por que el conjunto se encontraba a una temperatura muy baja por lo que precisó de agitación manual. Cuando se acabó de introducir los 150 gramos de MCC, se añadió el erlenmeyer con la mezcla anterior en el agitador IKA a 40 °C durante dos horas. Durante este tiempo se observa que se va solubilizando progresivamente más hasta que lo hace completamente. En la figura 54-A se observa el final de la reacción, posteriormente se han introducido 500 mL de agua para reducir la temperatura.

Se procede a un total de 6 centrifugaciones por réplica de una duración de 30 minutos cada una a 8066 rpm y a 4 °C. En la figura 54-B se observa el precipitado de un color amarronado que pertenece al precipitado de una de las primeras centrifugaciones. Mediante sucesivas centrifugaciones este color desaparece y se torna blanquecino. A partir de aquí, se sonica la mitad de la nanocelulosa obtenida y las dos muestras, tanto la sonicada como la no-sonicada, se congelan con nitrógeno líquido y se introducen en el liofilizador durante unas 72 horas. El resultado de la liofilización se visualiza en la figura 54-C.

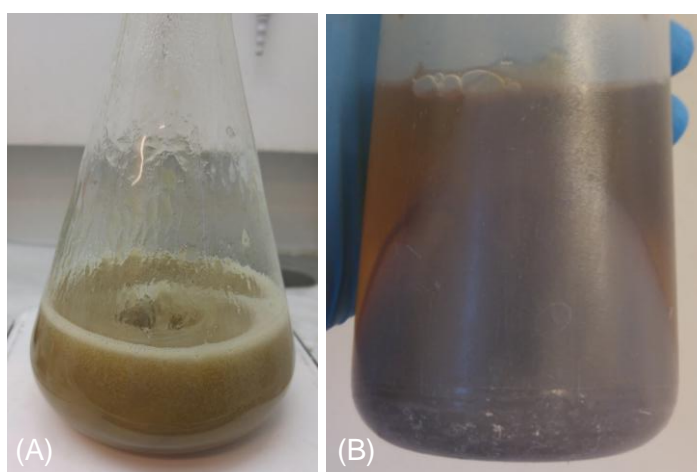
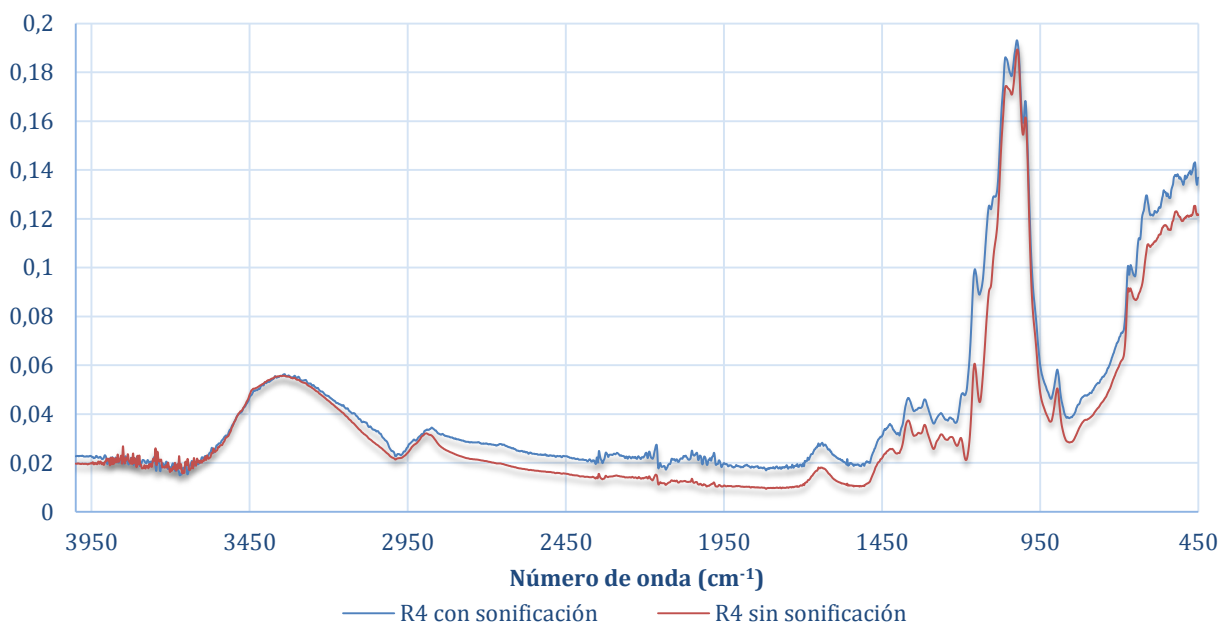


Figura 54. (A): Muestra después de las 2h de reacción; (B): Precipitado después de centrifugar durante 30 minutos

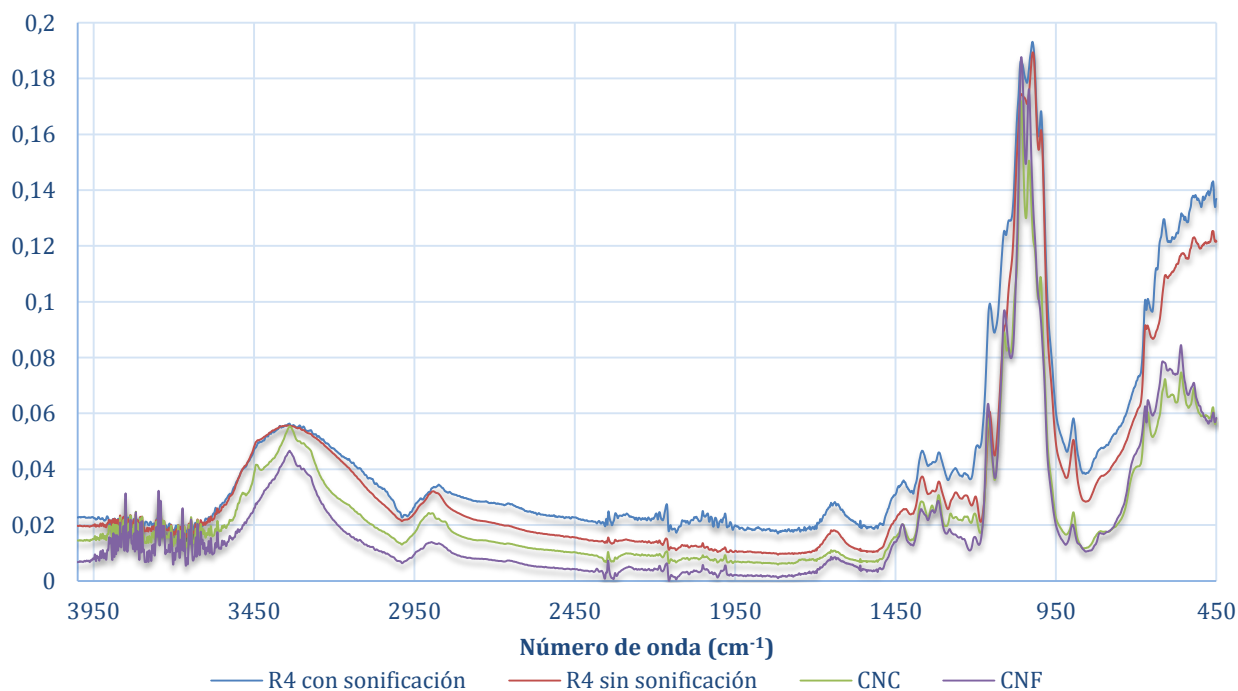


A continuación, se podrán visualizar los IR de la primera réplica tanto la muestra sonicada como la no-sonicada. Dichos picos se encuentran explicados en profundidad en el apartado 10.3.3 *Separación y purificación de la celulosa bacteriana*. En los gráficos siguientes la nomenclatura utilizada como R4 significa réplica 4. El rendimiento de esta síntesis se sitúa alrededor del 10%.

**Gráfico 8.** IR de muestra de la réplica a 4 con y sin sonicación



**Gráfico 9.** IR de réplica 4 de síntesis química con y sin sonicar con CNF y CNC



## 11. Análisis de difracción de R-X (XRD)

### 11.1. Fundamento teórico y condiciones experimentales

Este análisis se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Ciencia e Ingeniería Multiescala de Barcelona gracias a la ayuda de la técnica Michela Romanini que llevó a cabo los análisis. Para la realización de esta segunda técnica de caracterización se utilizó un difractómetro *D8 Advanced* de Bruker (Germany) que se puede observar una representación en la figura 55-A. En este modelo, la radiación es Cu-K $\alpha$  ( $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$ ) a 40KV y 40 mA. En esta máquina se mantiene constante la fuente, pero tanto el receptor como la muestra pueden variar sus ángulos.

El difractómetro se fundamenta en la ley de Bragg que se encuentra representada en la ecuación 5:

$$\lambda = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta) \text{ (Ecuación 5)}$$

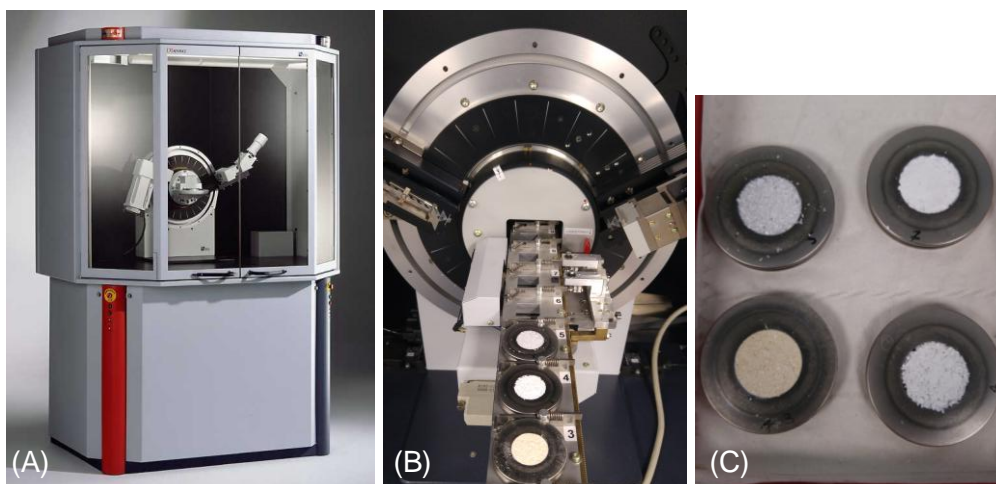


Figura 55. (A): Difractómetro D8 Advanced. Fuente Bruker; (B) Muestras analizándose mediante difractómetro; (C): Detalle de las muestras

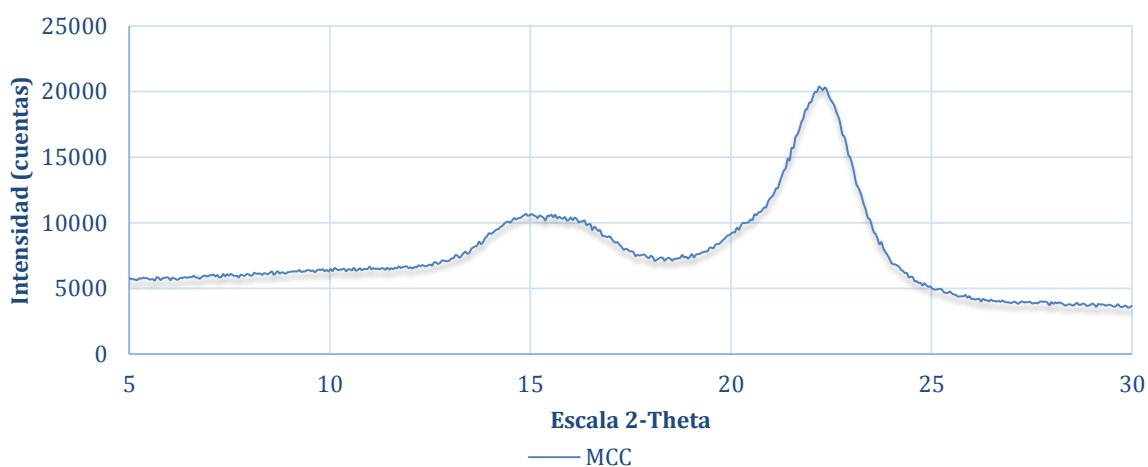
Las condiciones experimentales utilizadas en este experimento son, por un lado, el análisis del ángulo 2-theta de entre 5 a 30° cada 0,05°. Por otro lado, la velocidad de rastreo es de 5 segundos, es decir, se detiene 5 segundos por *step* para realizar el conteo durante este tiempo que es lo que posteriormente se grafica en el apartado 12.2 *Resultados Experimentales*. Para realizar el experimento, cada muestra estuvo un tiempo de 48 minutos. En el intervalo de 5-10 grados los rayos pueden incidir directamente de la fuente sobre el receptor dando cuentas erróneas y hay que controlar la temperatura ambiental que no supere los 30 °C para evitar daños en la electrónica del aparato por ello la sala del XRD se encuentra climatizada.

## 11.2. Resultados experimentales

A continuación, se mostrarán los gráficos de R-X obtenidos siguiendo las condiciones experimentales mencionadas en el apartado anterior. En el apartado 13. *Comparativa de resultados de IR, XRD y SEM* se comentarán dichos resultados.

En los primeros gráficos se encuentran representados los resultados tanto de la microcelulosa, como de las muestras donadas por Cellulose Lab y Borregaard: CNF, CNC y Exilva.

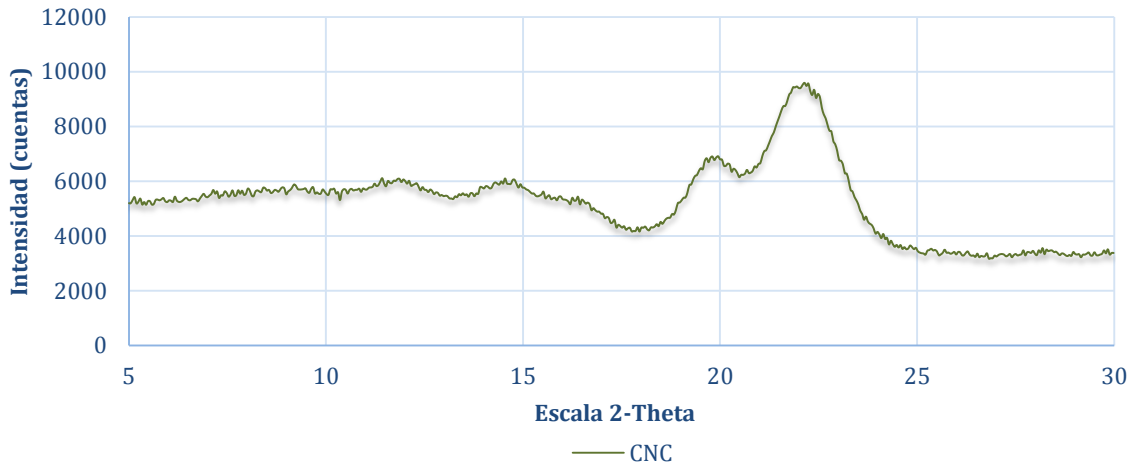
**Gráfico 10.** XRD de MCC



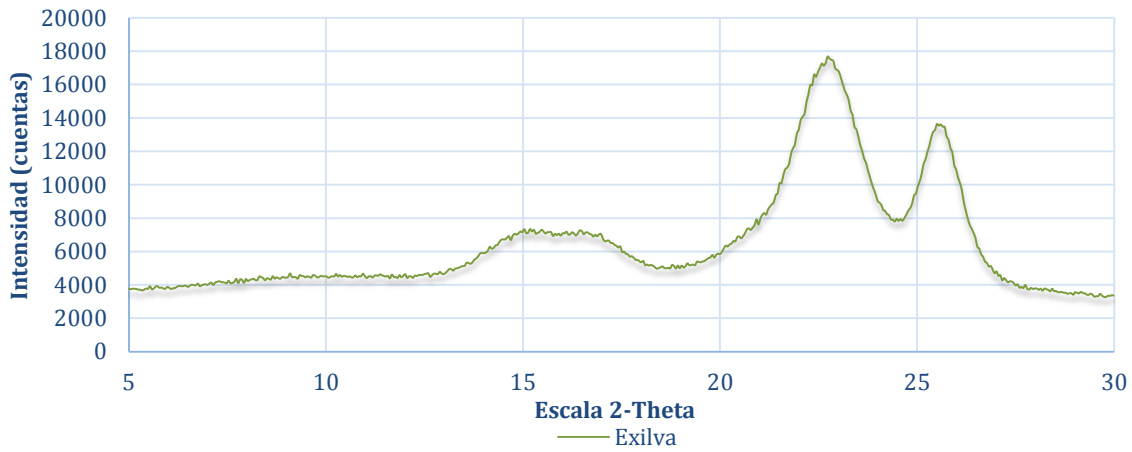
**Gráfico 11.** XRD de CNF



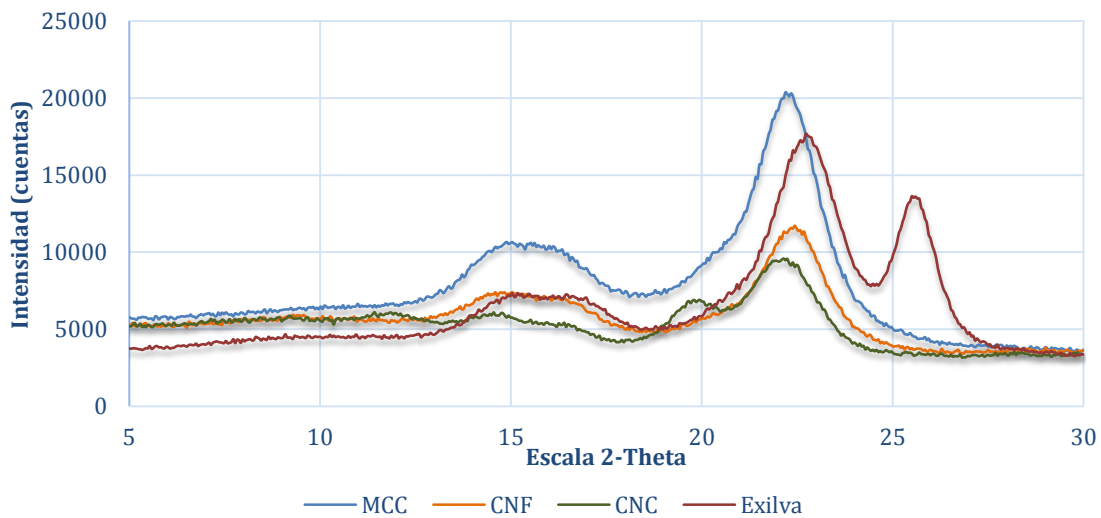
**Gráfico 12.** XRD de CNC



**Gráfico 13.** XRD de Exilva

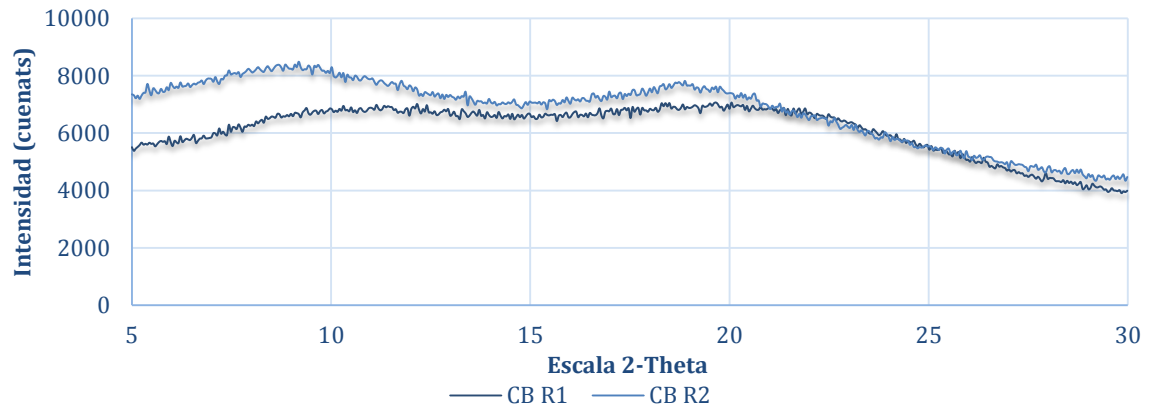


**Gráfico 14.** XRD de MCC, CNF, CNC y Exilva

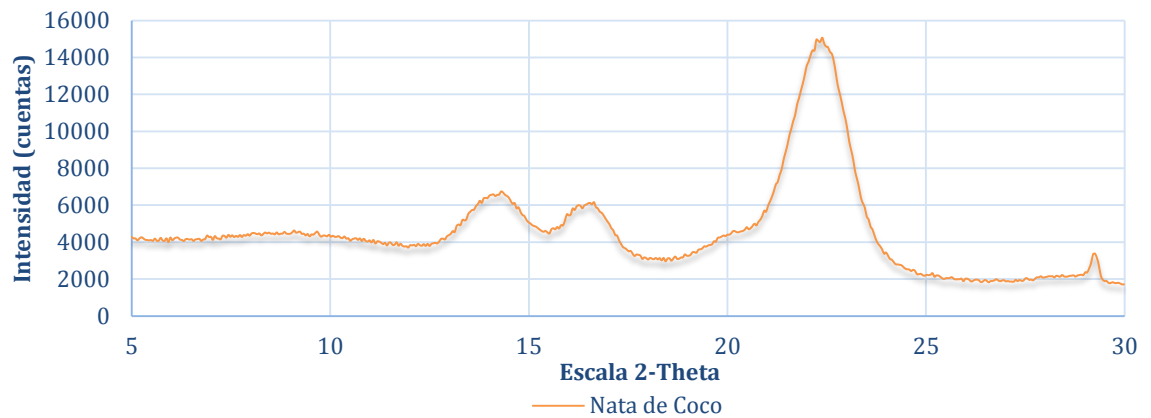


A continuación, en los gráficos del 15 al 18 se podrán observar los resultados de la difracción de rayos X de las muestras sintetizadas y en el gráfico 19 se observará un gráfico comparativo:

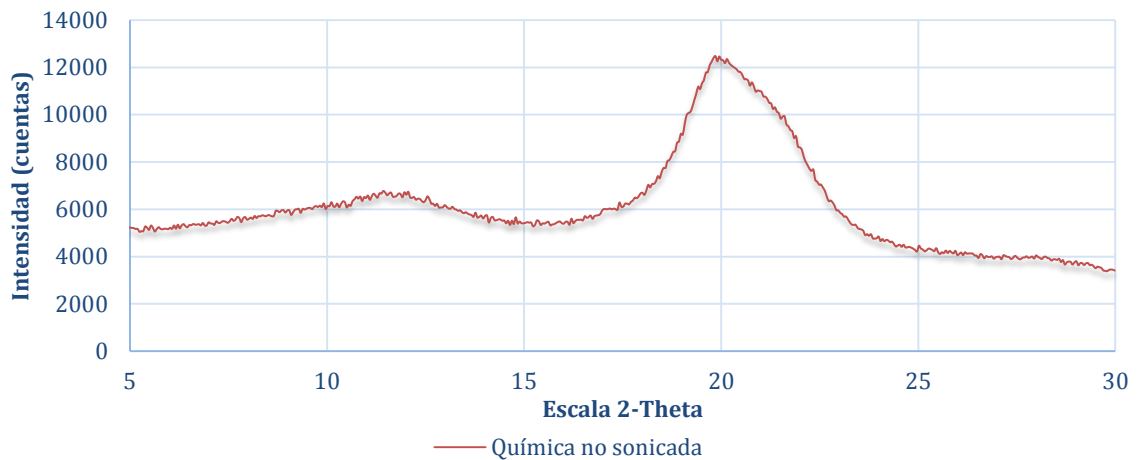
**Gráfico 15.** XRD de celulosa bacteriana R1 y R2



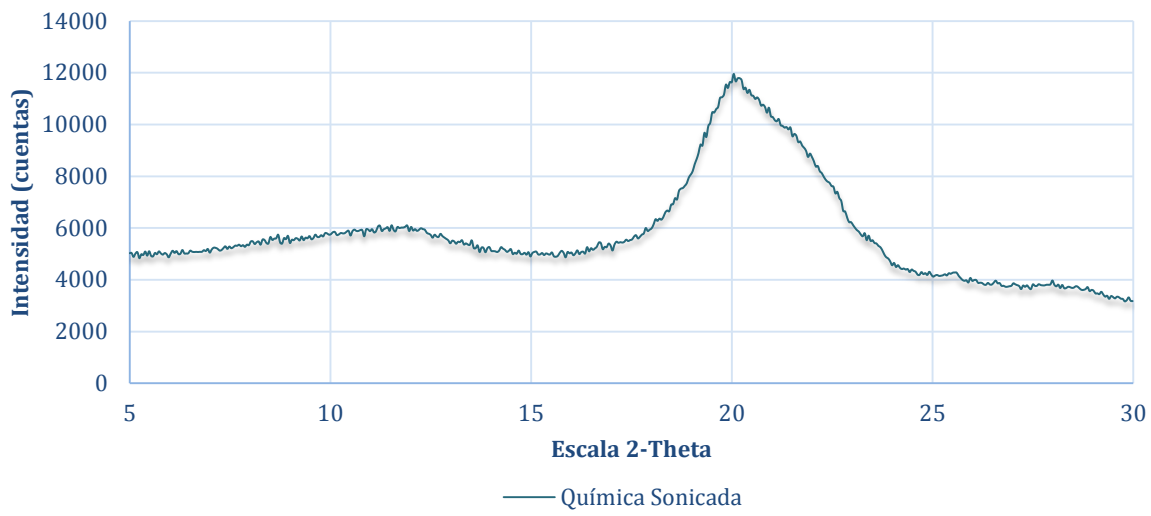
**Gráfico 16.** XRD nata de coco NaOH y ácido



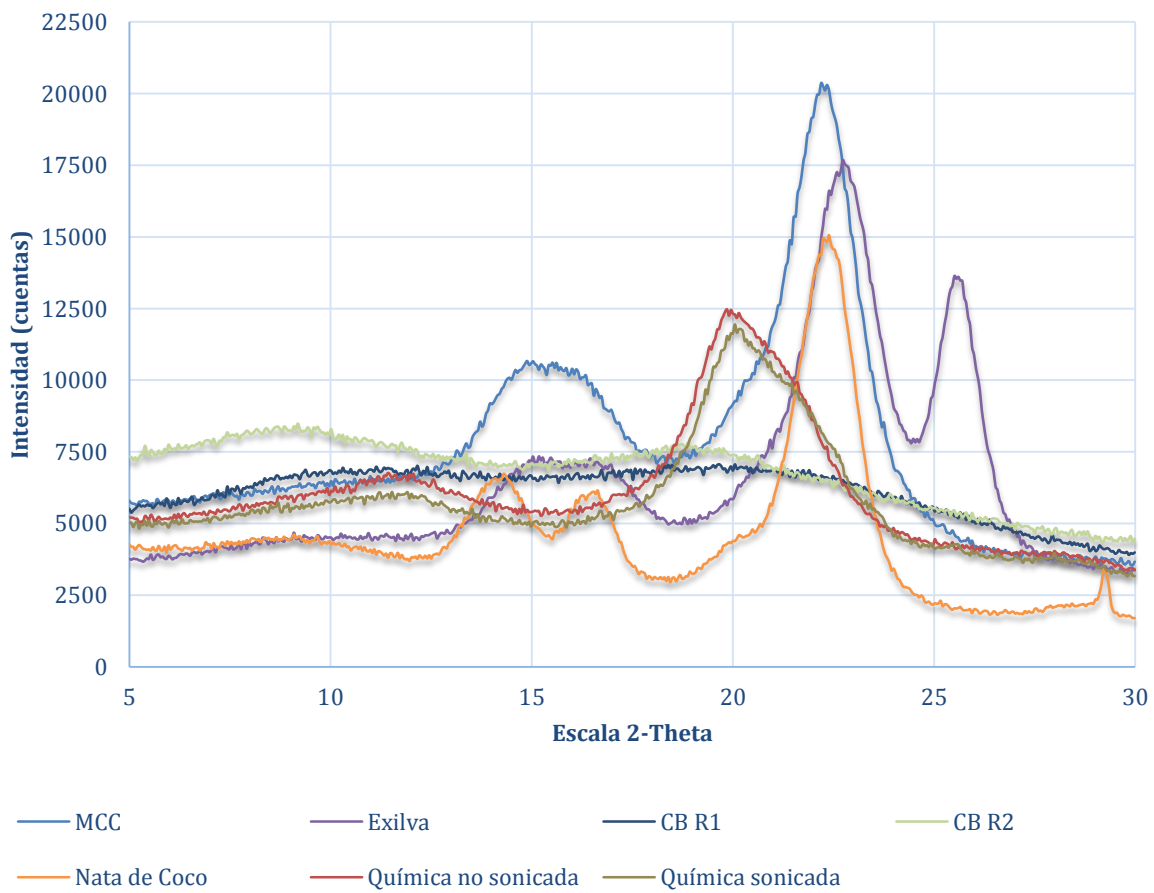
**Gráfico 17.** XRD síntesis química sin sonicar



**Gráfico 18.** XRD de síntesis química sonicada



**Gráfico 19.** Comparativa de XRD





## 12. Microscopía electrónica

### 12.1. Fundamento teórico y condiciones experimentales

El análisis mediante el SEM, también llamado microscopio electrónico de barrido, modelo Zeiss Neon 40 fue realizado en el Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería Multiescala de Barcelona con la ayuda del técnico Trifon Trifonov. Se realizaron múltiples instantáneas a 250, 1.000, 5.000, 30.000, 50.000 e incluso algunas imágenes se pudieron realizar a 70.000 aumentos. Sin embargo, previamente a introducir las muestras en el SEM, éstas deben seguir un proceso que se explicará a continuación.

En primer lugar, las muestras deben estar liofilizadas para ser introducidas dentro del SEM ya que este se encuentra en su interior a  $10^{-6}$  mbar, de lo contrario, si estuviesen húmedas herviría esta agua y ensuciaría las lentes del SEM. En segundo lugar, se debe de coger una pieza como las de la imagen 56-B, mediante unos guantes ya que el contacto con la piel puede dejar rastros que afecten al análisis. Se añade una cinta de doble cara de carbono a la cual se adherirá la muestra. Con la ayuda de una espátula se añade una ínfima parte de muestra sobre la superficie de la cinta de doble cara y se presiona para que se adhiera. Por último, se tiene que extraer mediante aire comprimido el exceso de la muestra que podría hacer que ensuciara las lentes del SEM.

Finalmente, las muestras deben de contener una capa de carbono para que los electrones puedan pasar a través de la muestra.

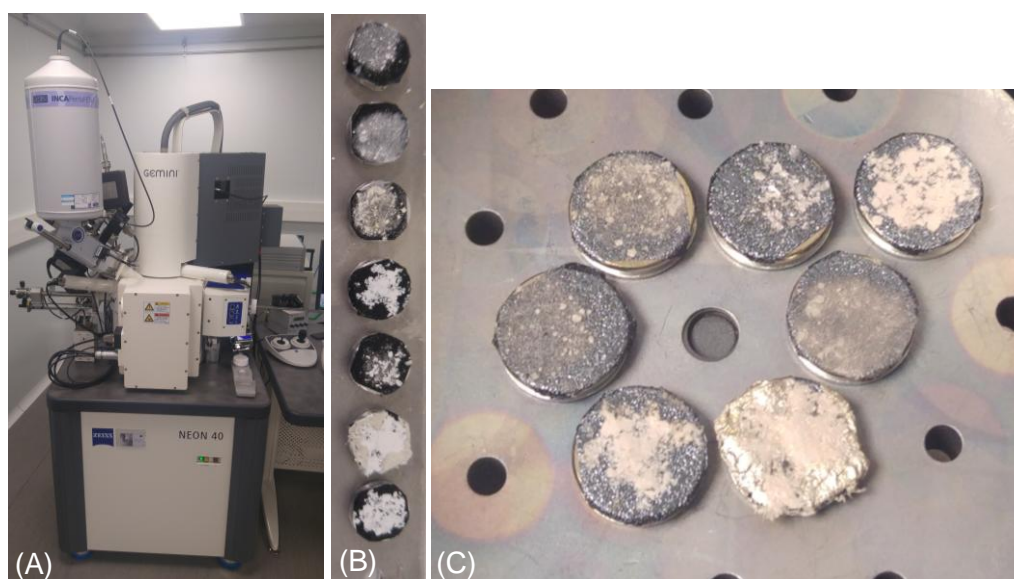


Figura 56. (A): SEM Zeiss Neon 40 (B): Muestras sin capa de carbono nombradas de inferior a superior: MCC, síntesis química, CB, CNF, CNC, nata de coco NaOH y ácido y Exilva; (C): Muestras recubiertas de carbono

## 12.2. Resultados experimentales

### 12.2.1. MCC

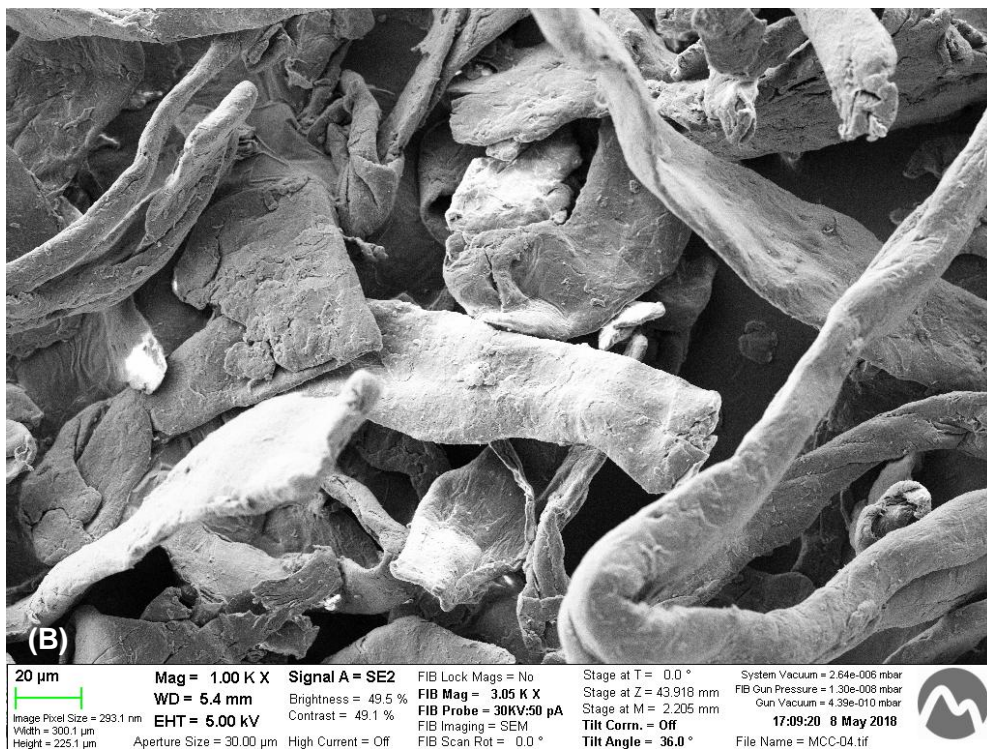
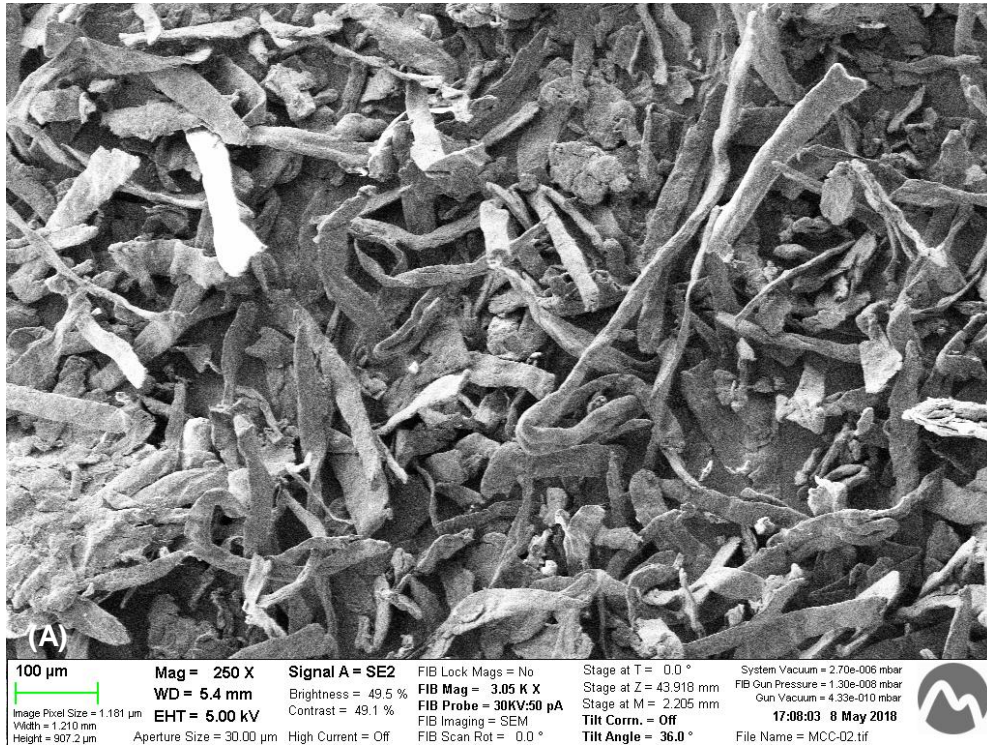


Figura 57. Representación mediante SEM de MCC (A) x250 (B) x1000



12.2.2. CNF

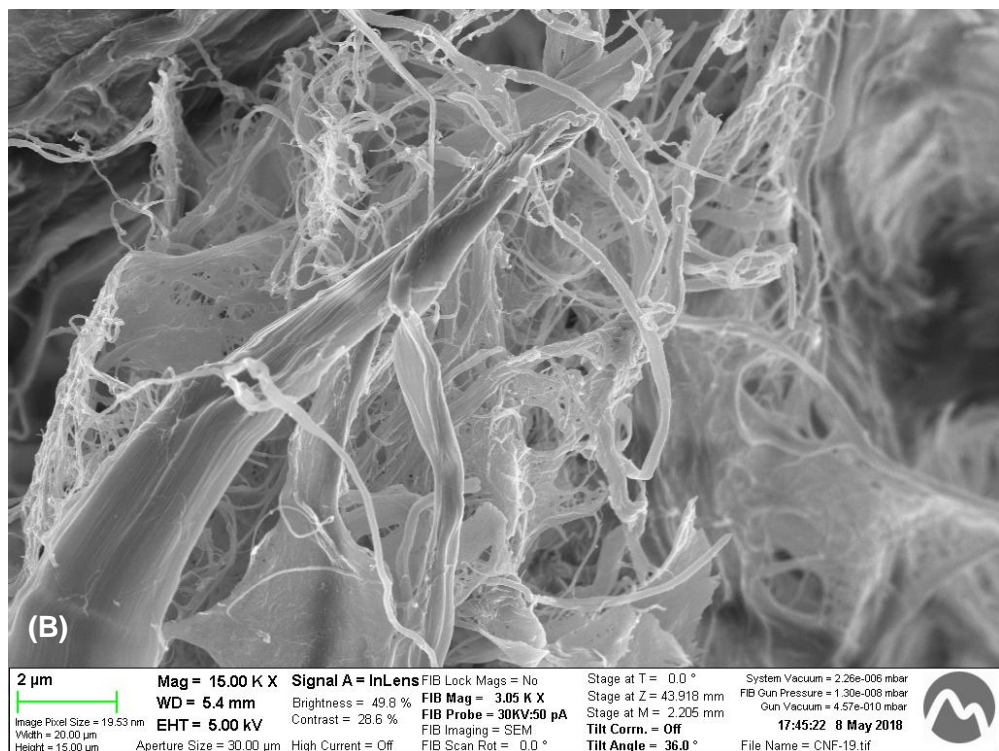
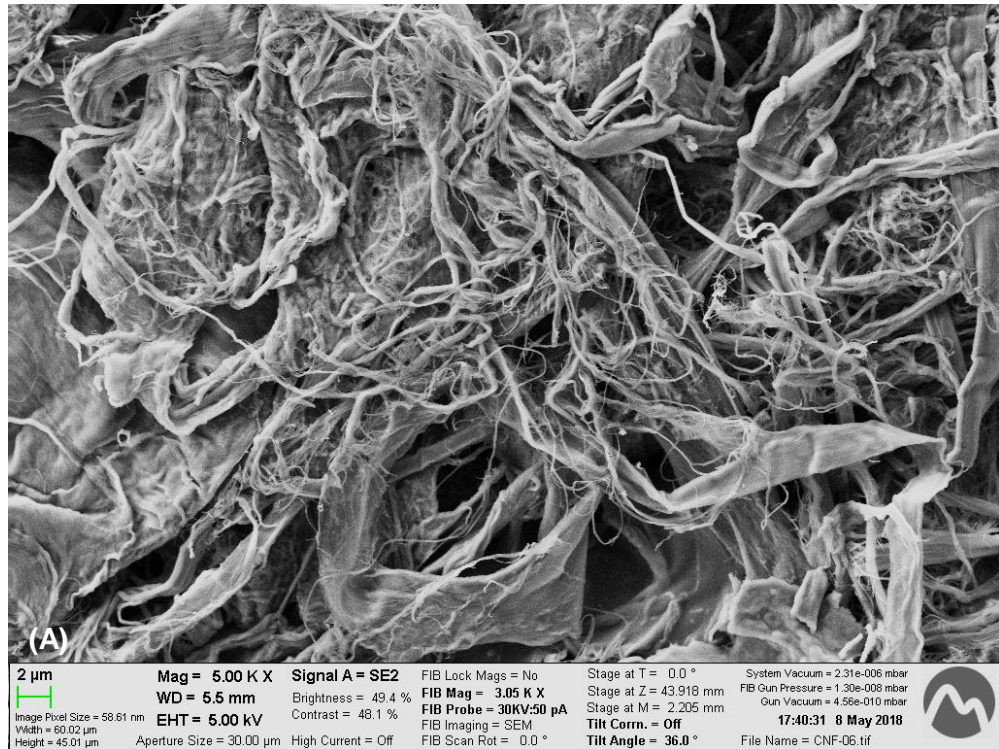


Figura 58. Representación mediante SEM de CNF a (A) x5000 y (B) x15000

### 12.2.3. CNC

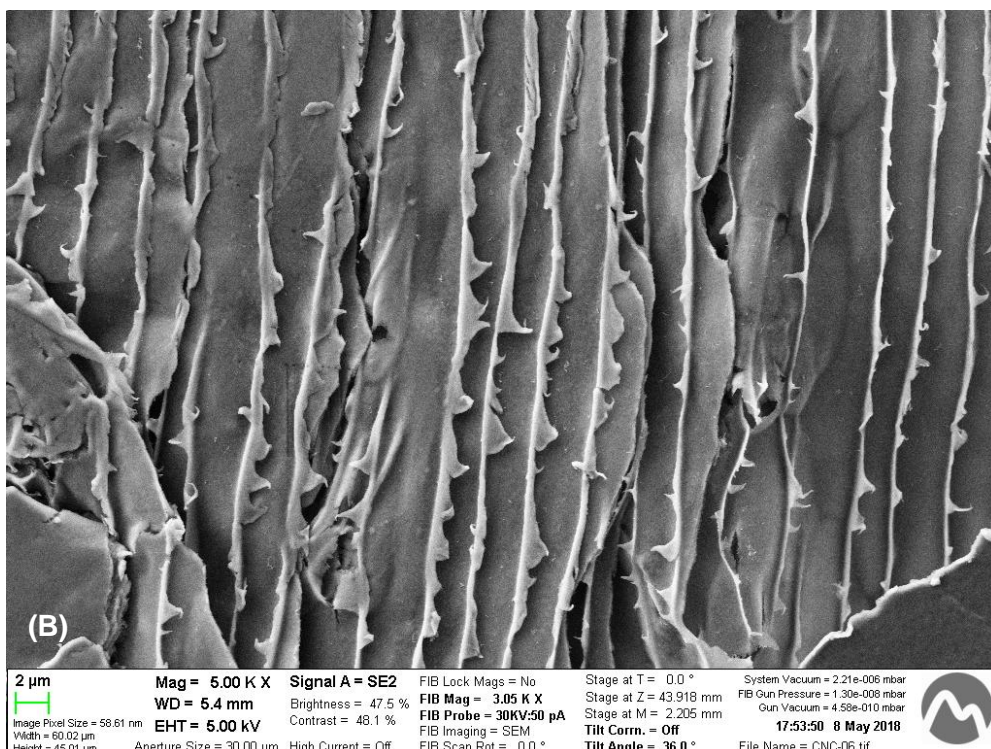
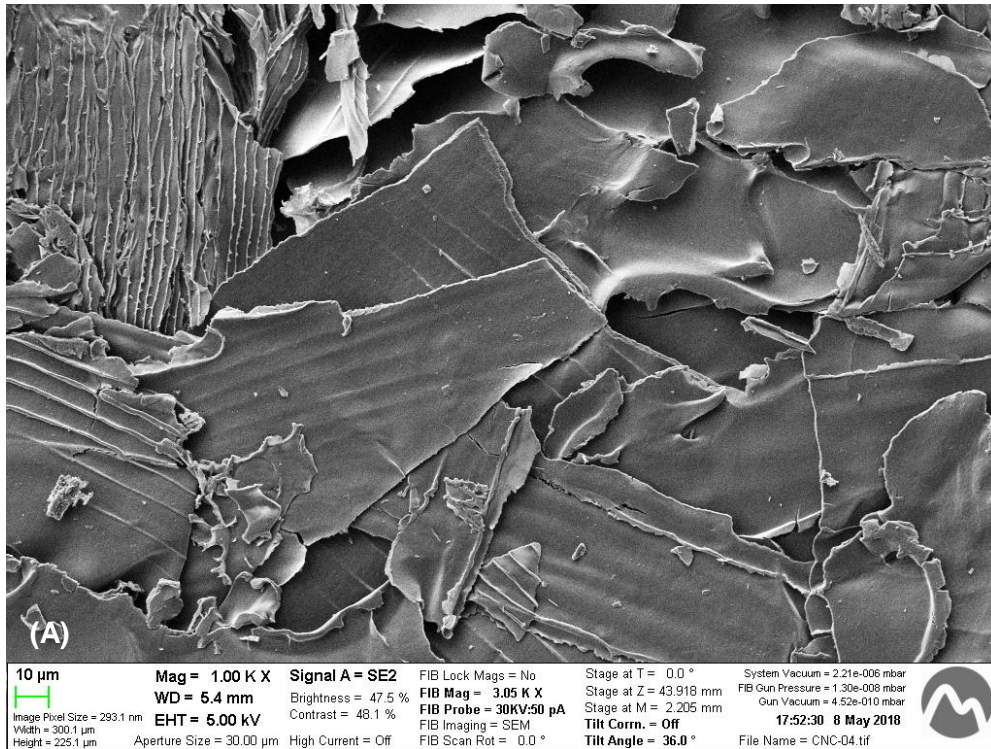


Figura 59. Representación mediante SEM de CNC (A) x1000 y (B) x5000



12.2.4. *Exilva*

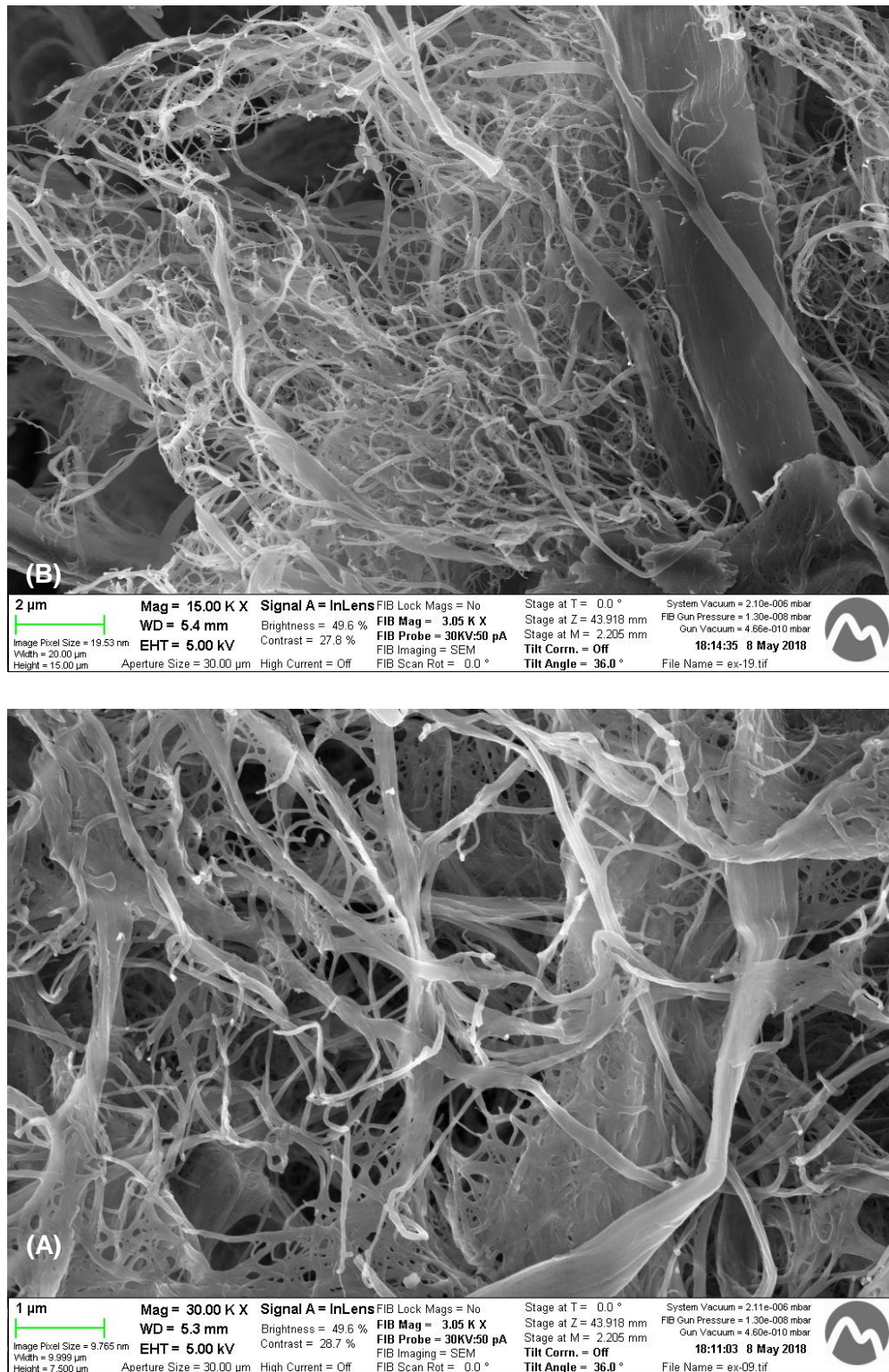


Figura 60. Representación mediante SEM de *Exilva* (A) x15000 y (B) x30000

### 12.2.5. Síntesis biotecnológica

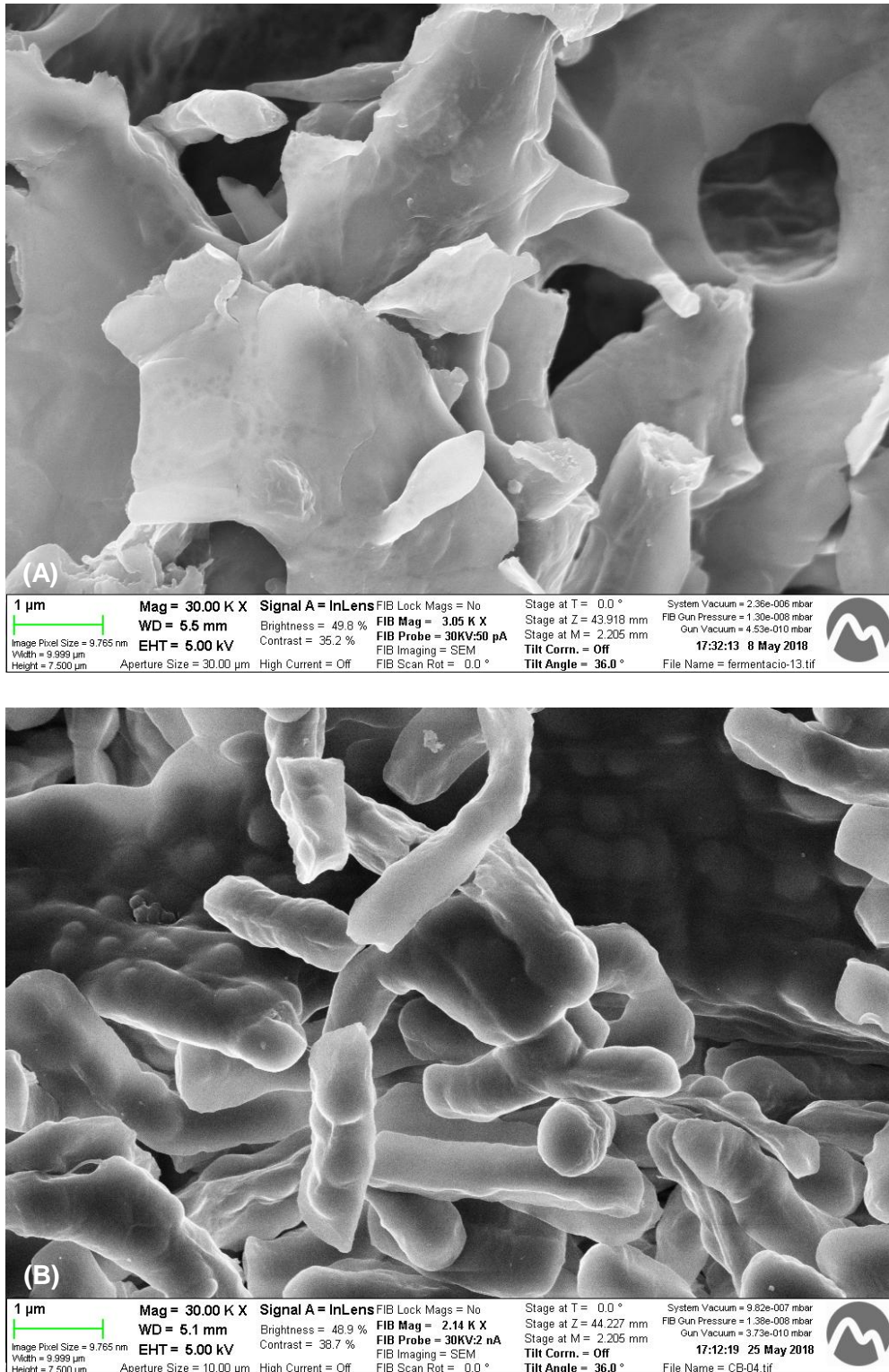


Figura 61. Representación mediante SEM de la síntesis biotecnológica (A) de la primera réplica x30000 y (B) de la segunda réplica x30000



12.2.6. Nata de coco con NaOH y ácido

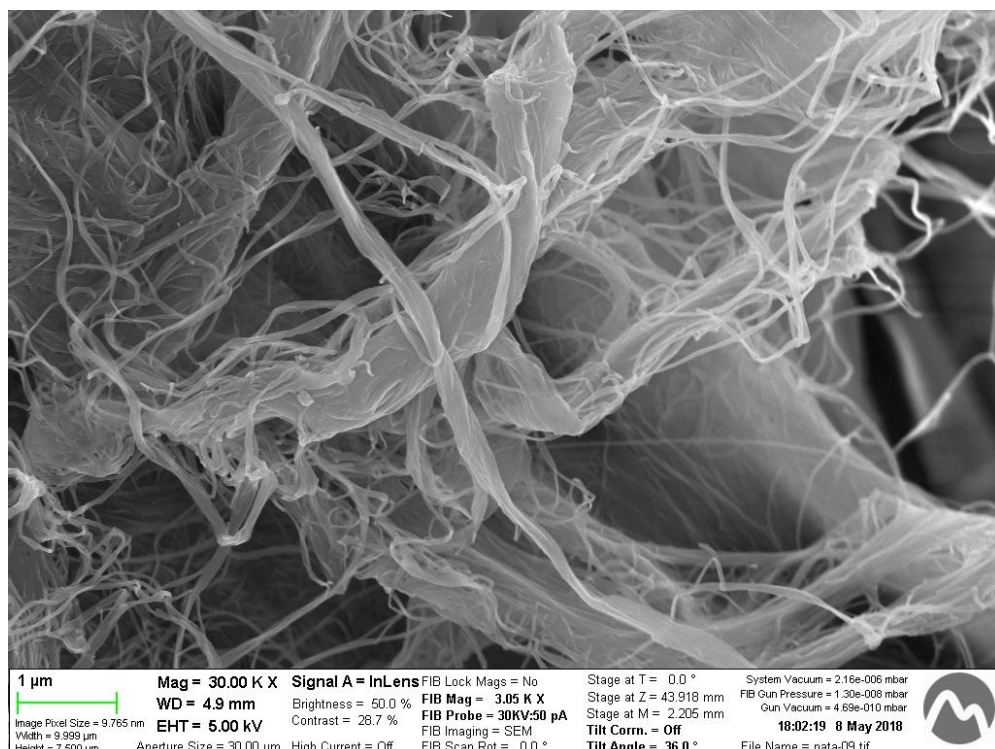
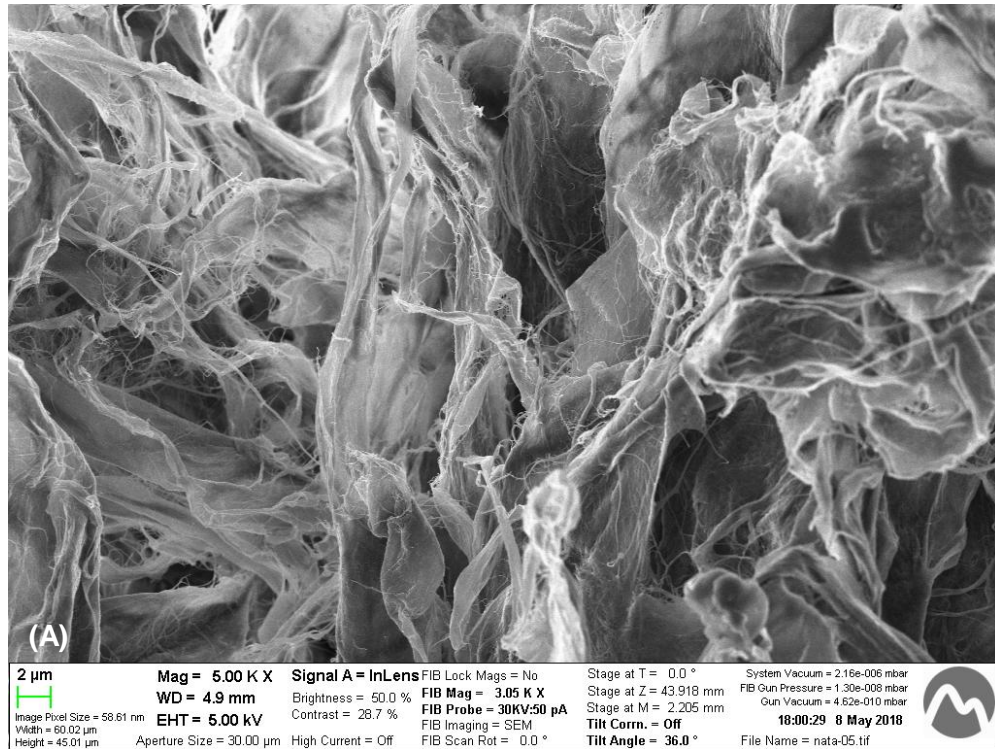


Figura 62. Representación mediante SEM de nata de coco después del tratamiento con NaOH y ácido (A) x5000 y (B) x30000

**12.2.7. Síntesis química sonicada y no-sonicada**

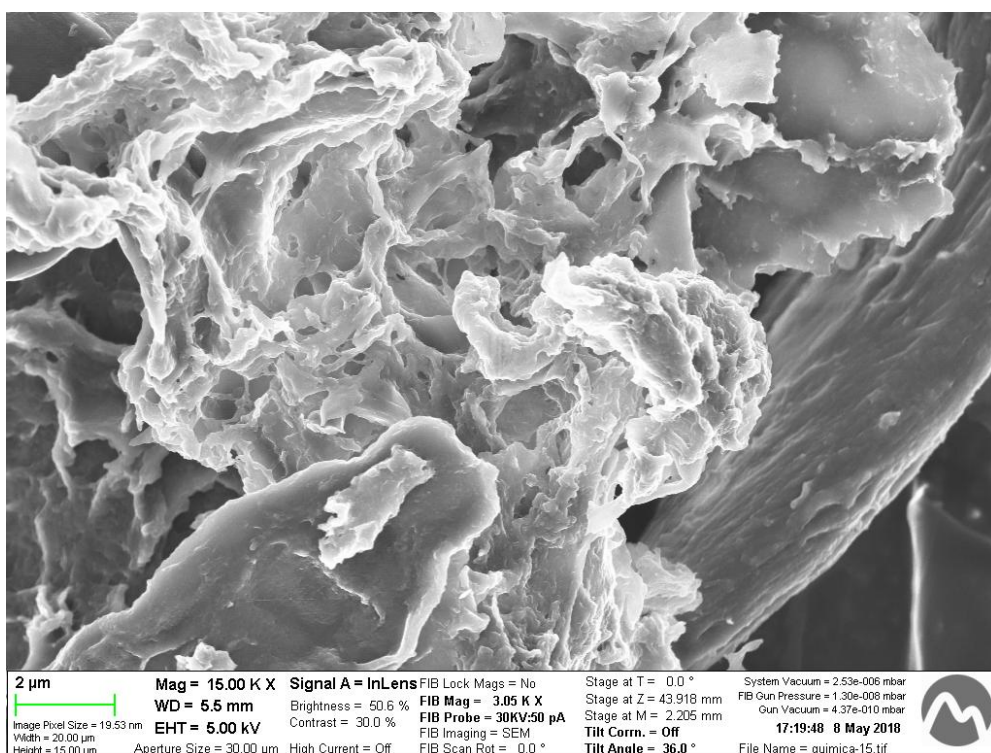
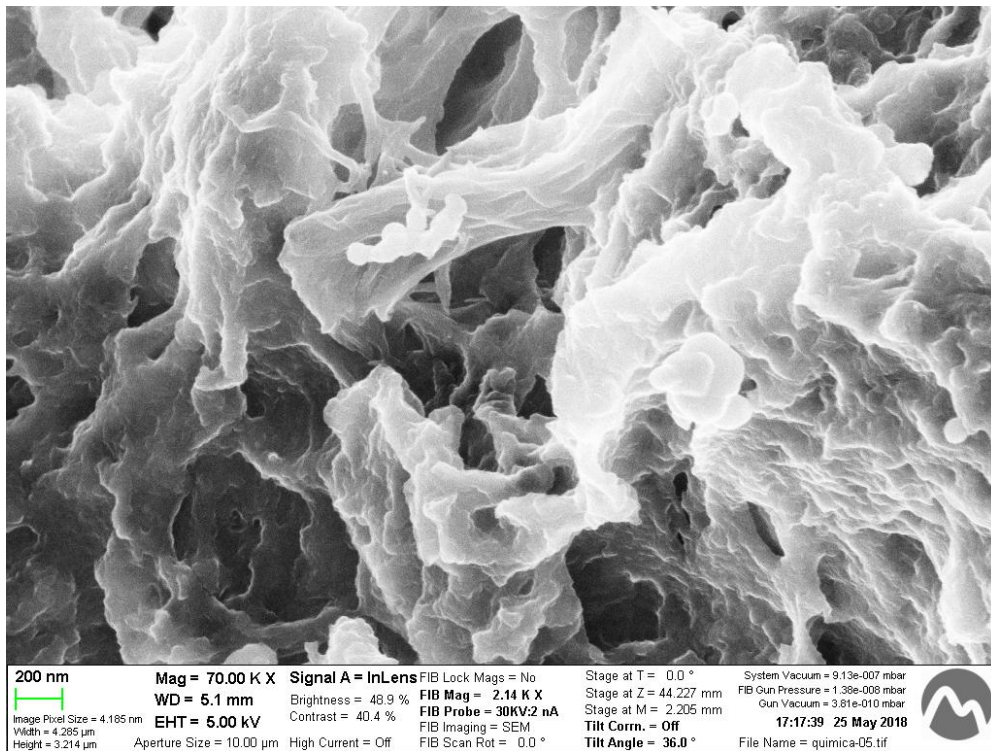


Figura 63. Representación mediante SEM de NC obtenida por síntesis Química sonicada (A) x70000 y (B) sin sonicar x15000

### 13. Comparativa de resultados de IR, XRD y SEM

Como se puede observar en los gráficos de espectroscopía IR anteriores en todos ellos se visualizan los picos que corresponden a los picos típicos de la nanocelulosa como podrían ser los siguientes ordenados por número de onda decreciente: 3265-3320 y 2910-2840  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a las vibraciones de grupos OH y C-H respectivamente. En la siguiente franja, únicamente las muestras de celulosa bacteriana, se observan unos picos a 1632-1638 y 1534  $\text{cm}^{-1}$  que son representativos de enlaces de amidas los cuales se asocian con proteínas bacterianas y biomasa residual. Esta biomasa residual puede ser originada por la bacteria o por compuestos del medio de cultivo que permanecieron junto a las fibras de celulosa después de los lavados con NaOH. Se observa que entre el segundo y tercer lavado con NaOH estos picos mencionados anteriormente se reducen de manera sustancial. De igual manera, en la segunda réplica de este experimento los picos se obtuvieron en esta franja fueron menos intensos que los de la réplica 1.

La última franja a estudiar está comprendida entre los 1400 a 1000  $\text{cm}^{-1}$ . En esta franja se encuentran dos picos, el primero de ellos se encuentra a 1390-1430  $\text{cm}^{-1}$  y representa al enlace C-H, más concretamente el  $\text{CH}_2$  con una flexión simétrica. En el segundo de ellos es un pico muy prominente a 1024  $\text{cm}^{-1}$  que representa el enlace C-O-C.

En cuanto al análisis de difracción en rayos X, se ha calculado el porcentaje de cristalinidad de la muestra como el cociente del área cristalina entre el área total siguiendo el procedimiento de Ruland (1961). El cálculo de las áreas por debajo de la curva se ha llevado a cabo mediante una función de Matlab que utilizaba el método de trapecios, la cual se puede observar en el anexo. Previamente a este paso, se ha tenido que eliminar el *background* de la muestra para no añadir área en exceso. De igual manera, para calcular el área cristalina se ha precisado del programa EVA para eliminar la zona amorfa. A continuación, se mostrará la tabla con los resultados:

**Tabla 15.** Área cristalina, área total y porcentaje de cristalinidad

	Área cristalina	Área total	% Cristalinidad
<b>MCC</b>	43696	75183	58
<b>CNF</b>	27027	36902	73
<b>CNC</b>	19729	27762	71
<b>Exilva</b>	52827	73816	71
<b>CB R1</b>	11461	35036	32
<b>CB R2</b>	12631	24271	52
<b>Nata de coco</b>	38251	41469	92
<b>Química sonicada</b>	31342	41170	76
<b>Química no sonicada</b>	31380	45577	69



Siguiendo con el análisis de la difracción de rayos X, según se observa en el gráfico 14 que a  $2\theta=15,4^\circ$  existe un pico para las 4 sustancias analizadas: MCC, CNF, Exilva y CNC. Este pico, es bastante ancho así que aporta información que es poco cristalino. En cambio, en un ángulo  $2\theta$  de aproximadamente  $22,3^\circ$  todas las sustancias anteriores muestran un pico relativamente cristalino y prácticamente se encuentran alineados. Un posible motivo para que no se encuentren alineados perfectamente es que el plano de referencia con el que se partió como origen, se encontraba levemente desplazado posiblemente por un desalineamiento del material en el interior del recipiente. En este gráfico, dos sustancias presentan picos diferentes a los anteriores, como es CNC a 20 grados y Exilva a 25,6 grados. A pesar de que parece que Exilva puede ser más cristalino que los CNC, el área total es muy superior el primer caso, pero en cambio el porcentaje de cristalinidad es muy parecido según se observa en la tabla 15.

En referencia al segundo gráfico comparativo, el gráfico 19 se observa que se podrían dividir en 3 subgrupos en función de la forma e intensidad de los picos. El primero de todos podría ser el de la celulosa bacteriana, tanto la de la primera y segunda réplica. Se observa que no tiene picos claramente diferenciados por lo que se cree que las muestras son más bien amorfas. Se contrasta esta hipótesis con el porcentaje de cristalinidad de la tabla 14 que es muy inferior a las demás muestras analizadas.

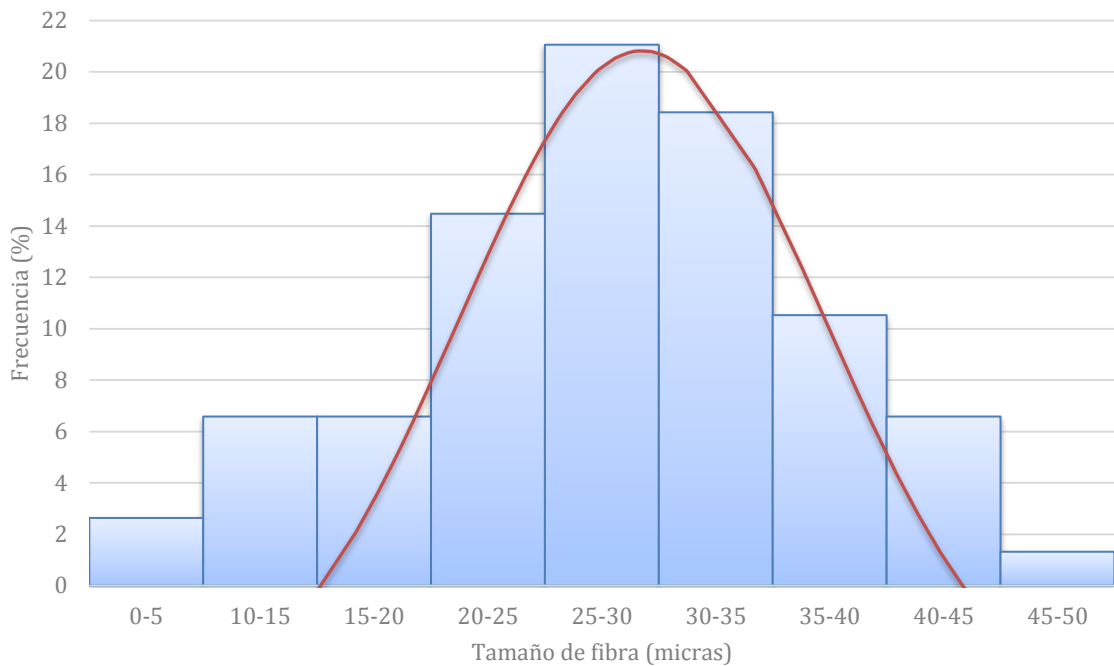
En el segundo subgrupo, podrían incluirse las muestras de la síntesis química, tanto sonicada como la muestra no sonicada. Los picos de los ángulos menores a 20 grados se muestran muy poco definidos en comparación con el pico de 20 grados. Este pico puede tener correlación con el pico encontrado, en el mismo ángulo  $2\theta$ , para la CNC. Según la bibliografía, mediante la adición de ácido a la MCC se crean nanocristales de celulosa, pero existen otros picos que las muestras sonicada y no sonicada no los tienen. No se muestran diferencias significativas en cuanto a la muestra sonicada y no sonicada.

El último subgrupo podría considerarse MCC, CNF, Exilva y nata de coco las cuales disponen de similares picos, a excepción del pico mencionado anteriormente por parte de Exilva y del doble pico de la nata de coco entre el ángulo  $2\theta$ :  $14,2$  y  $16,4^\circ$ . En estas 4 muestras, el porcentaje de cristalinidad es muy variable, el 58% de MCC, 71% de Exilva, 73% de CNF y un 92% de la nata de coco que es la más cristalina de todo el conjunto.

Según Borysiak y Garbacyk (2003) y Flauzino Neto et al. (2013), se verifica que el pico al ángulo  $2\theta = 15^\circ$  corresponde al plano cristalográfico (101), el ángulo  $2\theta = 16,5^\circ$  corresponde al plano (10 $\bar{1}$ ). El ángulo  $2\theta = 20^\circ$  correspondería al plano (021) y finalmente el ángulo  $2\theta = 22^\circ$  correspondería al plano (002) (Borysiak y Garbacyk , 2003) (Flauzino Neto et al., 2013).

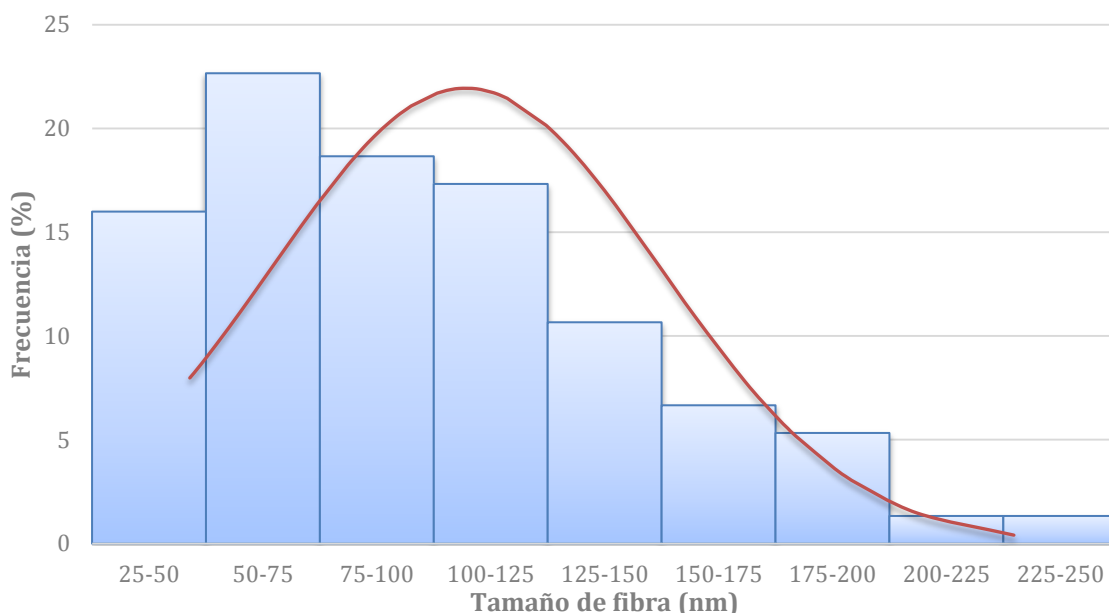
En cuanto a las imágenes del SEM, se observa que existe una gran diferenciación de tamaño y forma de las mismas. Primero de todo se analizarán las muestras compradas y posteriormente las muestras sintetizadas en el laboratorio con el fin de caracterizarlas según la forma y la medida de las mismas. Los histogramas a los que se hace referencia en diferentes ocasiones durante este apartado fueron realizados con la ayuda de un programa de Matlab que medía las distancias entre píxeles y realizaba una línea de unión entre los mismos para saber si se ha realizado correctamente la selección de ambos puntos. Previamente a ello, se tenía que seleccionar la escala de la imagen que eran los dos primeros puntos que había que señalar y posteriormente se medían cuantas fibras fueran necesarias. Este programa se puede consultar en el anexo. Primero se estudiará la MCC, como se observa en su respectivo histograma (gráfico 20) tiene una distribución de tamaños de una escala micrométrica. La media de longitudes de la MCC se encuentran en el valor de 30 micras y una desviación de 11 micras.

**Gráfico 20.** Histograma de diámetro de fibras de MCC en micras



En el caso de las CNF, se observa en la figura 59 el tamaño nanométrico de las mismas. Además, en el anexo tanto las figuras 4, 5 y 6 están representadas imágenes del SEM de diferentes aumentos, desde 1000 a 70000. En el gráfico 21 se podrá observar el histograma de las CNF. Este gráfico tiene una media de partículas de cerca de 100 nm, muy inferiores que las anteriores y tiene una desviación de 46 nm.

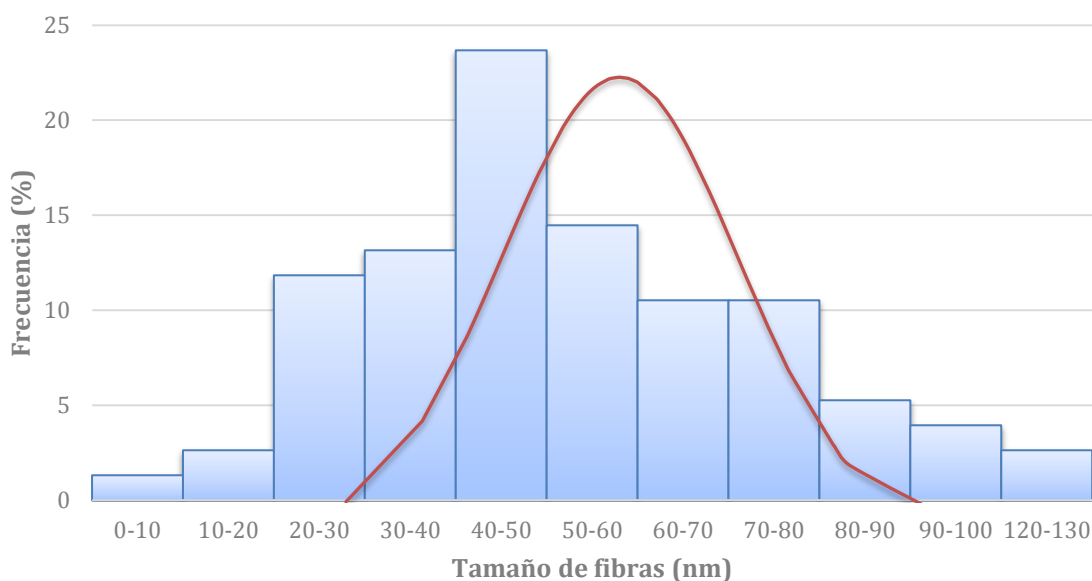
**Gráfico 21.** Histograma de diámetro de fibras de CNF



En el cuanto a los CNC, en las imágenes a diferentes aumentos se observan láminas de celulosa de diferentes tamaños y formas. Como no se conoce el inicio y final de las lascas de CNC, no se puede realizar un histograma como sucede con los dos casos anteriores.

En cuanto a la Exilva, hay una mayor variabilidad del diámetro de la fibra. Pero se observa en el histograma (gráfico 22) que el tamaño medio de las fibras analizadas está alrededor de los 55 nanómetros y una desviación de 23 nanómetros. En el anexo se pueden observar imágenes adicionales en diferentes aumentos.

**Gráfico 22.** Histograma de diámetro de fibras de Exilva

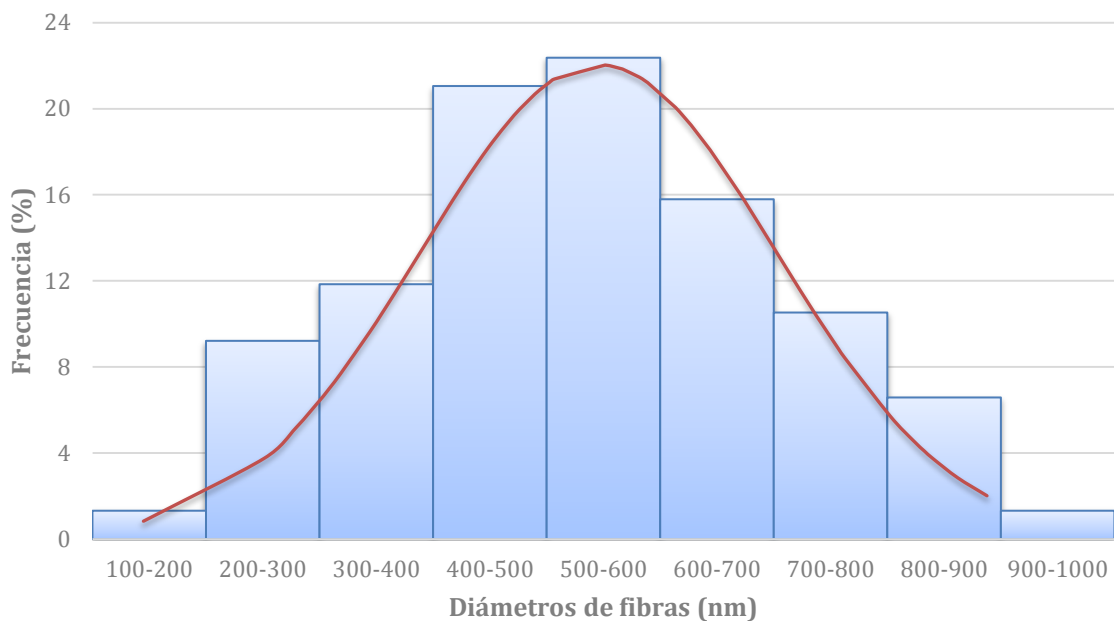




Las muestras de celulosa bacteriana varían enormemente en forma respecto a la primera y segunda síntesis. Gracias a la ayuda brindada por la Dra Deirdre Mikkelsen de la Universidad de Queensland en Australia en el análisis de los resultados del SEM de las muestras biotecnológicas, se concluye que las fibras en la primera réplica del experimento se han colapsado. Es decir, se han unido formando una lámina de fibras. Otra hipótesis que se obtuvo de esta primera réplica es que al reutilizar las bacterias del reactor de Alberto García en 2017, puede que hubiera una gran cantidad de bacterias mutantes no productoras de BC y esto unido a los lavados con NaOH a altas temperaturas podría haber degradado la celulosa obtenida.

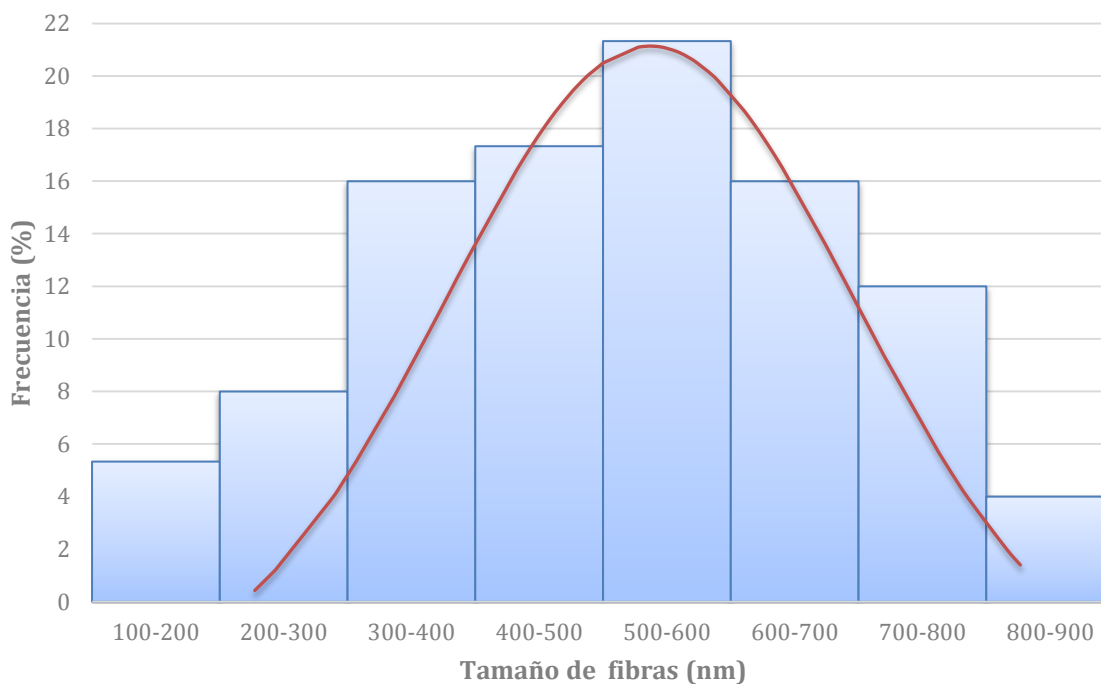
En cuanto a la segunda réplica de este experimento, se observa un tamaño de fibra de escala nanométrico y muy regular en longitud. La experiencia de la Dra Deirdre Mikkelsen en este campo aportó una hipótesis no contemplada hasta el momento, que las fibras que se observaban en las imágenes del SEM en realidad parecían bacterias. Después de comentar las condiciones en las que se llevó a cabo la purificación, que eran las mismas que su equipo de investigación las llevó a cabo en 2013, esta hipótesis podría llegar a descartarse pero la forma de las bacterias parece ser característica. A continuación, se muestra el histograma (gráfico 23) de la segunda réplica de la síntesis biotecnológica. La media y desviación de longitud de esta muestra es de 545 y 175 nanómetros respectivamente.

**Gráfico 23.** Histograma de diámetro de fibras de CB Réplica 2



En la extracción de nanocelulosa a partir de la nata de coco, se observa claramente una gran proporción de la imagen del SEM con fibras nanométricas. La muestra analizada tiene una media de 500 nanómetros y la desviación es de 180 nanómetros. Aunque también se observan fibras colapsadas con un mayor tamaño.

**Gráfico 24.** Histograma de diámetro de fibras de nata de coco NaOH y ácido



En las muestras producidas mediante el método químico, no se observan fibras, sino que se pueden observar láminas de nanocelulosa. La adición de ácido sulfúrico en grandes concentraciones es un método utilizado para a obtención de CNC por lo que parece ser que se ha conseguido, en cierta medida, este resultado. En algunas imágenes se observa que el ácido no ha conseguido degradar la MCC ya que las fibras de la misma aún están unidas. Se puede observar este fenómeno en la figura 21-B y 24-A del anexo. El resultado de la muestra sonicada como la no-sonicada no difieren enormemente una de la otra. En este caso, tampoco se ha podido realizar un histograma ya que no se observa claramente el inicio y final de las lascas.

## 14. Planificación

Este proyecto ha tenido una duración completa de unas 20 semanas, es decir, aproximadamente unos 5 meses.

Para la realización del mismo, se llevó a cabo una planificación inicial con el fin de conocer todas las tareas que requería el proyecto. A grandes rasgos, el proyecto se dividió en dos grandes grupos, por un lado, la búsqueda bibliográfica de información relacionada con la nanocelulosa, además de estudios realizados por estudiantes de ETSEIB. Y, por otro lado, todo el procedimiento experimental que se debía de llevar durante este trabajo.

En la primera parte del trabajo, en la búsqueda bibliográfica se subdividió en dos partes, la primera de ellas fue la búsqueda de información acerca de la nanocelulosa, una sustancia desconocida hasta el momento para mí. La segunda parte de la búsqueda se concentró en buscar y analizar experimentos realizados por prestigiosos investigadores. También se tuvo que realizar una criba de posibles experimentos ya que o, por un lado, el laboratorio no disponía del material necesario o, por otro lado, tenían unos rendimientos demasiado bajos.

La parte experimental del trabajo como se observa en la tabla 16 que representa el diagrama de Gantt de todo el proyecto es la más extensa en tiempo. Primero de todo se realizó la síntesis biotecnológica, la natural y finalmente la química de una duración variable cada una. A partir de aquí, se precisó caracterizar las muestras obtenidas en las síntesis anteriores. La caracterización constaba de 3 operaciones principalmente. En la primera se dedicaron 3 semanas para el estudio de IR de las muestras. La segunda y tercera se realizaron en el Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería Multiescala de Barcelona ya que la maquinaria se encontraba allí, en ambos casos se precisaron de 3 semanas.

**Tabla 16.** Diagrama de Gantt

		Semanas																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Tareas	Búsqueda de información	■	■	■																		
	Búsqueda de experimentos previos				■	■																
	Síntesis biotecnológica					■	■	■														
	Extracción natural						■	■	■													
	Síntesis química									■	■	■										
	Espectroscopía infrarroja y análisis										■	■	■								■	
	Rayos X y análisis														■	■	■					
	Microscopía electrónica y análisis																■	■	■			
	Redacción memoria										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

## 15. Estudio económico

Una vez finalizado este proyecto, se debe de cuantificar mediante un estudio económico los gastos. Los gastos se dividirán en cuatro categorías diferenciadas: coste de material de laboratorio, coste de maquinaria, coste de análisis externos y coste de personal.

En primer lugar, se detallarán los costes de material de laboratorio utilizado para la realización de este TFG. En la tabla se pormenorizan tanto cantidad utilizada de reactivos como coste por gramo del mismo y finalmente el coste total de cada reactivo.

**Tabla 17.** Costes totales de material de laboratorio

Producto	Cantidad (g)	Coste por gramo (€/g)	Coste total (€)
Extracto de levadura	36,5	0,202	7,37
Glucosa	500	0,078	39,25
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,5	0,237	2,25
Ácido cítrico	4,06	0,193	0,78
Fe(SO <sub>4</sub> )·7H <sub>2</sub> O	0,348	0,143	0,05
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,255	0,136	0,03
Monohidrocloruro de L-Lisina	0,35	0,800	0,28
Glicina	0,35	0,187	0,07
L-Glutamina	0,35	0,576	0,20
Ácido acético	600	0,027	15,95
Ácido fosfórico	221,088	0,100	22,11
Peptona	0,9	0,452	0,41
Manitol	7,5	0,124	0,93
NaOH	624	0,099	61,46
MCC	120	0,172	20,64
Nata de coco	800	0,010	8,00
Hipoclorito sódico	400	0,005	2,00
Nitrógeno líquido	5000	0,010	53,18
<b>SUBTOTAL</b>			<b>234,97</b>

Además de los reactivos utilizados, también es necesario cuantificar el gasto de material de laboratorio utilizado. En este caso, el gasto de guantes, pipetas Pasteur y demás material se cuantifica en unos 200 euros.

En segundo lugar, los gastos de maquinaria de laboratorio utilizada se desglosan en la tabla 18 en función del aparato en cuestión, del número de horas el cual ha estado en funcionamiento y finalmente el coste del mismo por hora y coste final de funcionamiento.

**Tabla 18.** Coste de funcionamiento de maquinaria

Aparato	Número de horas (h)	Coste por hora (€/hora)	Coste total (€)
Agitador Magnético IKA	206,2	3	618,6
Agitador Reactor	26	2	52
Bomba de aire	26	3	78
Bomba de vacío	350	5	1750
Colorímetro Zuzi	100	3	300
Estufa JP Selecta	4	10	40
Liofilizador	816	4	3264
Nevera	48	2	96
Sonicador	1,4	8	11,2
Ultracentrífuga	21	10	210,00
Espectrómetro de infrarrojo	100	10	1000
<b>SUBTOTAL</b>			<b>7419,80</b>

Para caracterizar las muestras obtenidas, se realizaron los experimentos de Rayos X y Microscopía Electrónica en el Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería Multiescala de Barcelona. Los costes asociados por experimento aparecen detallados en la tabla 19.

**Tabla 19.** Costes de técnicas de caracterización

Test	Número de análisis	Coste por análisis (€/análisis)	Coste total (€)
RX	10	50	500
Microscopía electrónica	8	35	280
<b>SUBTOTAL</b>			<b>780</b>

Finalmente, los costes de personal asociados a la realización de este proyecto se desglosan a continuación:

***Tabla 20. Costes de personal***

Personal	Precio (€/h)	Tiempo (h)	Coste Total (€)
Director	30	200	6000
Investigador	15	600	9000
SUBTOTAL			15000

El coste total de este proyecto será de 23634,88 € (sin IVA).



## 16. Impacto ambiental

Después de finalizar el proyecto, es importante realizar una evaluación del impacto ambiental para intentar cuantificar y reducir los efectos que puedan devengar después de la realización del mismo. Es decir, intentar utilizar la menor cantidad de reactivos que generen los mínimos residuos, tener un consumo eléctrico responsable evitando tener encendidos más aparatos de los necesarios para evitar generar grandes cantidades de CO<sub>2</sub>. Por último, también es primordial en el laboratorio utilizar la menor cantidad de agua ya que es un recurso escaso. A continuación, se detallará el impacto ambiental generado por los residuos, gasto de agua y generación de CO<sub>2</sub>.

### 16.1. Generación de residuos

Este apartado se desglosará en función de los residuos aportados por las tres síntesis realizadas. En la síntesis de la celulosa bacteriana, primero de todo se utilizó hipoclorito sódico para esterilizar el material, los residuos de los cuales fueron abocados por la pica acompañados de abundante agua. Lo mismo sucedió con los restos de caldo de cultivo de las bacterias que se vertió por la pica con abundante agua para diluir los residuos que puedan generar. En cuanto a los residuos de NaOH, que provinieron de la purificación de la celulosa bacteriana, se deben de neutralizar con ácido antes de ser eliminados por las tuberías.

En cuanto a la segunda síntesis, la referente a la síntesis de la nata de coco, se neutralizó el hidróxido sódico, que se utilizó primeramente para eliminar los restos de glúcidos y demás sustancias, mediante la adición de la adición de ácido fosfórico que se utilizó para trocear la celulosa de tamaño micrométrico. De esta manera no se generaban residuos adicionales a los necesarios para la síntesis.

En la tercera síntesis, al disponer de una disolución de ácido sulfúrico al 64,8% se precisó de una gran cantidad de base para neutralizarlo.

Finalmente, no únicamente se contabilizan los residuos como a las sustancias químicas utilizadas durante la realización del proyecto, sino también el material desechable que se ha utilizado como serían las pipetas Pasteur. Muchas de las mismas se utilizaron para medir la densidad óptica de la síntesis de celulosa bacteriana y no se podían reutilizar para evitar la contaminación dentro de los erlenmeyers o del reactor. Además de las pipetas Pasteur también los guantes utilizados deben desecharse de la manera correcta.

## 16.2. Gasto de agua

A continuación, se llevará a cabo el análisis del gasto de agua para realización de este proyecto. Primeramente, se analizará el gasto de agua asociado de la filtración al vacío y posteriormente el asociado a la limpieza del material y el utilización para las síntesis.

Para realizar la filtración al vacío se calcula, en primer lugar, el caudal de agua del grifo. Éste es de aproximadamente unos 7 litros por minuto. Para realizar las filtraciones al vacío del caldo de cultivo para las dos réplicas del experimento se precisaron 150 minutos. El gasto de agua es de:

$$7 \frac{L}{min} * 150 \text{ min} = 1050 L$$

Por otro lado, el agua necesaria para la limpieza y para la preparación de todas las diluciones se estima que fue de unos 1300 litros. En total, el consumo total de agua para este proyecto fue de unos 2350 litros.

## 16.3. Generación de CO<sub>2</sub>

Finalmente, se llevará a cabo el análisis de la generación de los kg de CO<sub>2</sub> generados por el encendido de aparatos eléctricos durante este proyecto.

Se supone que el consumo de todos los aparatos utilizados está representado en la siguiente tabla:

**Tabla 21.** Tipo de aparato y consumo

Tipo de aparato	Consumo (kWh)
Agitadores	355,5
Bomba de aire	10
Bomba de vacío	129,5
Colorímetro Zuzi	80
Estufa JP Selecta	150
Liofilizador	580
Nevera	260
Sonificador	15
Ultracentrífuga	500
Espectrómetro de infrarrojos	120

El consumo total del equipamiento de laboratorio durante este proyecto es de 2200 kWh. Según la Oficina Catalana de Cambio Climático, por cada kWh consumido se expulsan unos 0,392 kg CO<sub>2</sub> a la atmosfera. Calculando el total de kilogramos durante el proyecto es de 862,4 kg CO<sub>2</sub>.

## 17. Conclusiones

En la realización de este proyecto se ha llevado a cabo la síntesis biotecnológica, la extracción de nanocelulosa proveniente de la nata de coco y finalmente, la síntesis química mediante MCC y ácido sulfúrico.

Siguiendo con los objetivos específicos que se han llevado a cabo de este trabajo, se empezó con la síntesis biotecnológica. Se utilizaron los procedimientos estandarizados por los laboratorios de ETSEIB, es decir, se llevó a cabo el experimento con las mismas condiciones experimentales que Alberto García (2017) concluyó en su TFM. A pesar de que los análisis de espectroscopía IR si se aproximaban a los de la MCC, los demás análisis de XRD y SEM no fueron concluyentes con ya que no se obtuvieron fibras de tamaño micro o nanométrico. Los rendimientos de la celulosa obtenida variaron entre 1,04 y 4,33 g/L para la primera y segunda réplica respectivamente.

En el caso de la extracción de la nanocelulosa proveniente de nata de coco se llevó a cabo mediante un procedimiento que incluía una purificación con NaOH y posterior hidrólisis ácida con ácido fosfórico al 20%. En este caso se obtuvo un rendimiento del 0,57%, pero se tiene que tener en cuenta que no se partía de la nata de coco seca, sino de la sustancia húmeda. El producto final se encontraba liofilizado y a punto para caracterizar.

Para realizar correctamente la síntesis química mediante un tratamiento con  $H_2SO_4$  64,8% se precisaron de cuatro réplicas. En la primera de ellas, al añadir a ácido sulfúrico a la MCC ésta se carbonizó descartando esta muestra para análisis futuros. En las dos siguientes se obtuvieron muestras sin carbonizar, pero con un rendimiento cercano al 3%. Por este motivo, se decidió llevar a cabo una cuarta réplica en la que se obtuvo un rendimiento cercano al 10%. No se obtuvieron cambios significativos en cuanto a realizar el proceso de sonicación en las muestras o no hacerlo.

Todas las muestras obtenidas, así como las suministradas por empresas externas, presentan las absorciones de espectroscopía infrarroja típicas de la celulosa. Únicamente las celulosas bacterianas mostraron picos adicionales producto de la contaminación por proteínas del medio, que disminuyeron al ser tratadas con NaOH. Los picos correspondientes a la celulosa de la muestra de nata de coco están especialmente bien resueltos, lo que puede indicar un elevado grado de pureza, cristalinidad o nanometría.

Los análisis realizados en el Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería Multiescala de Barcelona fueron de gran utilidad para conocer la naturaleza de la nanocelulosa. En primer análisis realizado fue la difracción de rayos X, donde se puede concluir que las sustancias analizadas se podrían subdividir en 3 grupos diferenciados. El primero de ellos sería el formado por las celulosas bacterianas de la primera y segunda réplica en las cuales no apareció ningún pico significativo por lo que se cree que son muy amorfos. Hecho que se confirma al calcular el porcentaje de cristalinidad de ambas que es un 32 y 52% respectivamente.

En cuanto al segundo subgrupo, está formado por las muestras sintetizadas por la vía química, tanto la sonicada como la no-sonicada, y por la muestra de CNC ya que tiene un cierto parecido en cuanto a los picos en los respectivos ángulos. Este parecido está fundamentado por la búsqueda bibliográfica previa, ya que los CNC se producen a partir de la hidrólisis ácida de la celulosa. Su porcentaje de cristalinidad es de un 71, 76 y 69% para la CNC, química sonicada y química sin sonicar respectivamente.

El último subgrupo, es el formado por las MCC, CNF, nata de coco y Exilva y la mayoría de los picos tienen una gran semejanza, a excepción del doble pico a la nata de coco un ángulo  $2\theta$  de 14,2 y 16,4° y del pico de Exilva de 25,6°. Estas muestras muestran un alto grado de cristalinidad, destacando la nanocelulosa proveniente de la nata de coco que alcanza el 92 %.

El análisis realizado en el SEM aporta una importante información de cómo son morfológicamente las muestras analizadas. La primera réplica de la muestra biotecnológica no se observó ninguna fibra, posiblemente por un colapso de las mismas. En el caso de la segunda réplica, y gracias a la ayuda de la Dra. Deirdre Mikkelsen, se concluye que posiblemente no se haya hecho un tratamiento suficientemente energético o con suficiente medio básico para eliminar las bacterias ya que cabe la posibilidad que lo que parece en el SEM puede que sean bacterias *Acetobacter xylinus*.

En el caso de la nata de coco, el SEM mostró que estaba formada principalmente por nanocelulosa. Esta afirmación se fundamenta en las sucesivas imágenes del SEM y en el histograma realizado del diámetro de las fibras donde la longitud media se situaba en los 500 nanómetros y su desviación estaba sobre los 180 nanómetros.

Por último, en las muestras de la síntesis química, de igual manera que la muestra de CNC, no se pudo realizar un histograma por que no se conocía donde empezaba y donde acababa una lasca de nanocelulosa, ya que podían continuar debajo de otras y por ello no ser visibles a través de las imágenes del SEM.

Se realizó un histograma también a las muestras compradas, únicamente las que estaban formadas por fibras. Los resultados se presentarán de mayor a menor tamaño de fibras. El mayor tamaño fue MCC que tenía unas medidas micrométricas, más exactamente con una media 30 micras y una desviación de 11 micras. La siguiente sustancia por tamaño fueron los nanocristales de celulosa con un tamaño medio de 100 nm y una desviación de 45 nm. Por último, Exilva disponía de un tamaño de fibra menor, más concretamente de 55 nanómetros y una desviación de 23 nm.

A partir del estudio económico y evaluando los diferentes costes que supone la realización de este proyecto: coste de material de laboratorio, coste de maquinaria, coste de análisis externos y coste de personal. El coste total del proyecto asciende a 23634,88 € sin impuestos incluidos.

Finalmente, llevar a cabo esta investigación supone un impacto para el medio ambiente por los residuos generados, el consumo de agua y los kilogramos de CO<sub>2</sub> expulsados a la atmósfera. En este caso, los litros de agua consumida fueron de aproximadamente 2350 litros y una generación de 862,4 kg de CO<sub>2</sub>.

En conclusión, la nanocelulosa parece que va a estar muy presente en nuestras vidas en los próximos años ya que el gran interés por la misma y su consiguiente facturación crece año tras año a un ritmo exponencial. Con mayores inversiones en estos productos, se podrá investigar nuevas aplicaciones de las mismas y mayores rendimientos, tanto de las síntesis biotecnológicas o la síntesis química, que permita que se reduzcan los costes haciendo que sea más atractiva a las empresas para que la incorporen en nuevos productos.

## 18. Agradecimientos

En primer lugar, debo agradecer a mi tutor el Dr. Jordi Bou por ofrecerme la oportunidad de realizar el TFG con él y especialmente por su paciencia, grado de dedicación, y su gran disponibilidad para resolver cualquier duda durante estos cinco meses en los que se ha desarrollado este proyecto.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a mis padres y amigos más cercanos por haberme apoyado, no únicamente durante la realización de este proyecto, sino durante toda mi etapa educativa.

En tercer lugar, he de agradecer la ayuda prestada por parte de Toni Susín sin la cual no hubiera sido posible realizar un análisis de estas dimensiones para medir las longitudes de las fibras. Del mismo modo, Michela Romanini aportó su conocimiento sobre el XRD para ayudar en los análisis de la cristalinidad.

También querría agradecer a la Dra. Deirdre Mikkelsen de la Universidad de Queensland (Australia) los consejos y las explicaciones a los datos obtenidos en este trabajo. La conversación llevada a cabo mediante videoconferencia fue muy productiva y aclaradora.

Por último, he de agradecer las muestras ofrecidas por Cellulose Lab y Borregaard que han sido de una ayuda inestimable para la comprobación de los resultados de las síntesis realizadas durante este proyecto.



## 19. Bibliografía

- Andrade, F., Pertile, A., Dourado, F., Gama, F. 2010. *Bacterial cellulose properties, production and applications*. In: *Cellulose: Structure and Properties*, ed. A. Lejeune and T. Deprez, pp. 427–458. New York
- Araki, J., Wada, M., Kuga, S., Okano, T. 1998. *Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. vol. 142. pp. 75–82.
- Atalla, R., VanderHart, D. 1984. *Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms*. *Science*. vol.223, pp. 283–285.
- Aulin, C., Gällstedt, M., Lindström, T. 2010. *Oxygen and oil barrier properties of microfibrillated cellulose films and coatings*. *Cellulose*. vol. 17. pp. 559–574.
- Back, E.L. Salmén, N.L. 1982. *Glass transitions of wood components hold implications for molding and pulping processes*. *Tappi*. vol. 65. pp. 107–110.
- Barham, P.J. Keller, A. 1986. *The relationship between microstructure and mode of fracture in PHB*. *Journal of Polymer Science. Part B*. vol. 24. pp. 69–77.
- Beck-Candanedo, S., Roman, M., Gray, DG. 2005. *Effect of Reaction Conditions on the Properties and Behavior of Wood Cellulose Nanocrystal Suspensions*. *Biomacromolecules*. vol. 6. pp. 1048-1054.
- Belton, P., Tanner, S., Cartier, N., Chanzy, H. 1989. *High-resolution solid-state <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy of tunicin, an animal cellulose*. *Macromolecules*. vol. 22. pp. 1615–1617.
- Beltramino, F., Vidal, T., Torres, A., Valls, C. 2016. *Optimization of sulfuric acid hydrolysis conditions or preparation of nanocrystalline cellulose from enzymatically pretreated fibers*, *Cellulose*. vol. 23. pp.1777–1789
- Bernstein J. 2002. *Polymorphism in molecular crystals*, Clarendon Press, Oxford.
- Bhatnagar, A., Sain, M. 2005. *Processing of Cellulose Nanofiber-reinforced Composites*. *Journal of reinforced Plastics and Composite*. vol. 24. pp. 1259–1268
- Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Kalinowska, H. 2002. *Biopolymers*. vol. 5. pp. 37–90.
- Bielecki, S., Kalinowska, H., Krystynowicz, A., Kubiak, K., Kolodziejczyk, M., De Groeve, M. 2012. *Bacterial Nanocellulose: A Sophisticated Multifunctional Material*, CRC Press, pp. 157–174
- Blaker J.J., Lee, K.Y., Bismarck, A. 2011. *Journal of Biobased Materials. Bioenergy*. vol. 5. pp. 1–16.
- Bondeson, D. Mathew, A., Oksman, C. 2006. *Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis*. *Cellulose*. vol. 13. pp.171 –180

- Börjesson, M., Westman, G. 2015. *Crystalline Nanocellulose — Preparation, Modification and Properties*. *IntechOpen*. pp 159-192
- Borysiak, S., Garbarczyk, J. 2003. *Applying the WAXS method to estimate the super- molecular structure of cellulose fibres after mercerization*. *Fibres Text. East. Eur.* vol.11. pp. 104–106
- Borzani, W., Souza, S. 1995. *Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media*. *Biotechnology Letters*. vol. 17. n. 11. pp. 1271-1272.
- Budhiono, A., Rosidia, B., Tahera H., Iguchib, M. 1999. *Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system*. *Carbohydrate Polymers*. vol. 40. pp. 137–143.
- Brown, A.J. 1886. *On an acetic ferment which forms cellulose*. *Journal of Chemical Society*. vol. 49. pp. 432-439
- Chang, W., Chen, H. 2016. *Physical properties of bacterial cellulose composites for wound dressings*. *Food Hydrocolloids*. vol. 53. pp. 75–83.
- Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y., Shoda, M. 2000. *Bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum in a airlift reactor*. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 68, n. 3. pp. 345-352.
- Chen, S. Mikkelsen, D., Lopez-Sanchez, P., Wang, D., Martinez-Sanz, M., Gilbert, E., Flanagan, B., Gidley, M. 2017. *Characterisation of bacterial cellulose from diverse Komagataeibacter strains and their application to construct plant cell wall analogues*. *Cellulose*. n. 24. pp. 1211–1226
- Chen, HP., Wang, PM., Chen, JW., Wu, WT. 2002. *Cultivation of Acetobacter xylinum for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. vol. 35 (Pt 2). pp.125–132
- Coconut Development Board. 2014. Ministry of Agriculture & Farmers Welfare (Government of India). (Consultado el 15 de marzo de 2018) Disponible en: <http://coconutboard.nic.in/Statistics.aspx>
- Czaja, W., Krystynowicz A., Bielecki, S., Brown Jr., R. 2006. *Microbial cellulose—the natural power to heal wounds*. *Biomaterials*. vol. 27. pp 145–151.
- Dahman, Y., Jayasuriya, K.E., Kalis, M. 2010. *Potential of biocellulose nanofibers production from agricultural renewable resources: preliminary study*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. vol. 162. pp. 1647–1659.
- Dary, L., Caidedo Mesa, L.A., Martínez Riascos, C.A. 2012. *Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana*. *Scielo*. vol.8. n. 16. pp. 307-335

- Debzi, E., Chanzy, H., Sugiyama, J., Tekely, P. and Excoffier, G. 1991. *The  $\alpha \rightarrow \beta$  transformation of highly crystalline cellulose by annealing in various mediums*. *Macromolecules*. vol. 24. pp. 6816–6822.
- Dong, X., Revol, J-F., Gray, D. 1998. *Effect of microcrystalline preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose*. *Cellulose*. vol. 5. pp. 9-32
- Dufresne A. 2007 *Comparing the Mechanical Properties of High Performances Polymer Nanocomposites from Biological Sources*. *Nanoscience and Nanotechnology*. vol. 6. pp. 322–330
- Flauzino Neto, W.P., Silvério, H.A., Dantas, N.O., Pasquini, D. 2013. *Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue–soy hulls*. *Ind. Crops Prod.* vol. 42. pp. 480–488.
- Filson, P., Dawson-Andoh, B. 2009. *Sono-chemical preparation of cellulose nanocrystals from lignocellulose derived materials*. *Bioresource Technology*. pp. 2259–2264
- Filson, P., Dawson-Andoh, B. 2009. *Enzymatic-mediated production of cellulose nanocrystals from recycled pulp*. *Green Chemistry*, vol. 11. pp. 1808–1814
- Garcia, A. 2017. *Optimización de la biosíntesis de nanocelulosa bacteriana por fermentación*. UPCCommons
- Gardner, K. Blackwell, J. 1974. *The structure of native cellulose*. *Biopolymers*, vol. 13. pp. 1975–2001.
- Gu, R.J., Kokta, B.V., Frankenfeld, K., Schlutter, K. 2010. *Bacterial cellulose reinforced thermoplastic composites: Preliminary evaluation of fabrication and performance*. *BioResources*. vol. 5. pp. 2195–2207.
- Halib, N., Amin, M., Ahmad, I. 2012. *Physicochemical Properties and Characterization of Nata de Coco from Local Food Industries as a Source of Cellulose*. *Sains Malaysiana*. vol. 41. pp. 205-211
- Hattalia, S., Benaboura, A., Ham-Pichavant, F., Nourmamode, A., Castellan, A. 2002. *Adding value to alfa grass (Stipa tenacissima L.), soda lignin as phenolic resins. Lignin characterization*. *Polymer Degradation and Stability*. vol. 75. pp. 259–264.
- Henriksson, M., Henriksson, G., Berglund, L., Lindström, T. 2007. *An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers*. *European Polymer Journal*, vol. 43. pp. 3434–3441
- Heo, M., Son H. 2002. *Development of an optimized, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by Acetobacter sp A9 in shaking cultures*. *Biotechnology and Applied Science*. vol. 35, p.41-45

- Hioki, N., Hori, Y., Watanabe, K., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. 1995. *Bacterial cellulose; as a new material for papermaking. Kami-Gikyo-Shi.* vol. 49, p. 82-87.
- Hoareau, W., Trindada, W.G., Siegmund, B., Castellan, A., Frollini, E. 2004. *Sugar-cane bagasse and curaua lignins oxidatized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. Polymer Degradation and Stability.* vol. 86, p. 567–576.
- Hofinger, M., Bertholdt, G., Weuster-Botz, D. 2011. *Microbial production of homogeneously layered cellulose pellicles in a membrane bioreactor. Biotechnology and Bioengineering.* vol. 108 n. 9. pp. 2237–2240.
- Ilguchi, M., Yamanaka, S., Budhiono, A. 2000. *Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. Journal of Materials Science,* vol. 2. pp.261-270
- Jessup, R., Prosen, E. 1950. *Heats of combustion and formation of cellulose and nitrocellulose (cellulose nitrate). Journal of Research of the National Bureau of Standards.* vol 40. pp. 387-393
- Johari, N. S., Ahmad, I., Halib, N. 2012. *Comparison Study of Hydrogels Properties Synthesized with Micro- and Nano-Size Bacterial Cellulose Particles Extracted from Nata de coco. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly.* vol. 26. pp 399–404
- Jonas, R., Farah, L.F. 1998. *Production and Application of Microbial Cellulose. Polymer Degradation and Stability.* vol. 59. pp. 101-106.
- Kalashnik, A.T., Papkov, S.P., Rudinskaya, G.V. and Milkova, L.P. 1991. *Liquid crystal state of cellulose. Polymer Science USSR.* vol 33. pp. 107–112.
- Kamel S. 2007. *Nanotechnology and its applications in lignocellulosic composites, a mini review. Polymer Letters.* vol. 1. pp. 546–575.
- Kargarzadeh, H., Loelovich, M., Thomas, S., Dufresne, A. 2017. *Methods for Extraction of Nanocellulose from Various Sources.* John Wiley & Sons, Incorporated
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H-P., Bohn, A. 2005. *Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. Angewandte Chemie International Edition.* vol. 36, pp. 3358–3393
- Kolpak, F., Blackwell, J. 1976. *Determination of the structure of cellulose II. Macromolecule.* vol. 9, pp. 273–278
- Kolpak, F.J., Blackwell, J. 1976. *Determination of the structure of cellulose II. Macromolecules.* vol. 9. pp. 273–278
- Kovalenko, V. 2010. *Crystalline cellulose: structure and hydrogen bonds. Russian Chemical Reviews.* vol. 79. pp. 231–241

- Krystynowicz, A., Czaja W., Wiktorowska-Jeziarska, A., Goncalves-Miskiewicz, M., Turkiewicz, M., Bielecki, S. 2002. *Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. vol. 29. pp.189–195.
- Lapuz, M., Gallardo E., Palo M. 1969. *The nata organism—cultural requirements, characteristics, and identity*. *Philippine Journal of Science*. vol. 96. p. 91–109.
- Lee, K.-Y., Blaker, J.J., Bismarck, A. 2009. *Surface functionalisation of bacterial cellulose as the route to produce green polylactide nanocomposites with improved properties*. *Composites Science and Technology*. vol 69. pp. 2724–2733.
- Lee, K.-Y., Tang, M., Williams, C.K., Bismarck, A., 2012. *Composites Science and Tecnology*. n. 72. pp. 1646–1650.
- Li, Z.Q., Zhou, X.D., Pei, C.H. 2010. *Preparation and Characterization of Bacterial Cellulose/Polylactide Nanocomposites*. *Polymer Plastic Technology and Engineering*. vol. 49. pp. 141–146.
- Markarian, J. 2008. *Plastics, Additives and Compounding*. n.10. pp. 22–25.
- Masaoka, S., Ohe, T., Sakota, N. 1993. *Production of cellulose from glucose by Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. vol. 7. pp. 18–22.
- McKenna, B., Mikkelsen, D., Bernhard, J. Gidley, M., 2009. *Mechanical and structural properties of native and alkali-treated bacterial cellulose produced by Gluconacetobacter xylinus strain ATCC 53524*. *Cellulose*. vol. 16. pp. 1047–1055
- Mohammad. S., Rahman, N., Khalil, M., Sheikh, R. 2014. *An overview of biocellulose production using acetobacter xylinum culture*. *Advances in Biological Research*. vol. 8. n. 6, pp. 307-13.
- Mohd Amin, M.C., Abadi, A.G., Katas, H. 2013. *Purification, characterization and comparative studies of spray-dried bacterial cellulose microparticles*. *Carbohydrate polymers*. vol 99. pp. 180-189
- Netravali, A.N., Chabba, S. 2003. *Composites get greener*. *Materials Today*. vol. 6. pp. 22–29.
- Ohad, I., Danon, D., Hestrin, S. 1962. *Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum*. *Journal of Cell Biology*. vol 12. pp. 9-16
- Okiyama, A., M. Motoki, and S. Yamanaka. 1993. *Bacterial cellulose IV. Application to processed foods*. *Food Hydrocolloid*. vol. 6. pp. 503–511.
- Ougiya, H., Watanabe, K., Morinaga, Y., Yoshinaga, F. 1997. *Emulsion effect of bacterial cellulose*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. vol. 61, pp. 1541-1545.

- Palucka, T., Bensaude-Vincent, B. 2004. Composites overview. *History of Recent Science & Technology*
- Panesar, P.S., Chavan, Y.V., Bera, M.B., Chand, O., Kumar, H. 2009. *Evaluation of Acetobacter Strain for the Production of Microbial Cellulose. Asian Journal of Chemistry.* vol.11. n. 10. pp. 99-102
- Payen, A. 1838. *Mémoire sur la composition du tissu propre des plantes et du ligneux. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences.* vol 7. pp. 1052–1056.
- Peng, B., Dhar, N., Liu, H., Tam, K. 2011. Chemistry and applications of nanocrystalline cellulose and its derivatives: a nanotechnology perspective. *Canadian Journal of Chemical Engineering.* vol. 89 (5). pp. 1191–1206.
- Pértile, R.A.N, Moreira, S. da Costa, R.M.G., Correia, A., Guard. L., Gartner, F., Vilanova, M., Gama, M. *Bacterial cellulose: long-term biocompatibility studies. Journal of Biomaterials Science, Polimers Edition.*
- Ramana, K., Tomar, A., Singh, L. 2000. *Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by Acetobacter xylinum. World Journal of Microbiology & Biotechnology.* vol. 16. n. 3. pp. 245-248
- Ring, G.J.F. 1982. *Study of polymerization kinetics of bacterial cellulose through gel permeation chromatography. In: Cellulose and other natural polymer systems,* ed. Plenum, pp. 299–325
- Rong, M., Zhang, M., Liu, Y., Yang, G., Zeng, H. 2001. *The effect of fiber treatment on the mechanical properties of unidirectional sisal-reinforced epoxy composites. Composites Science Technology.* vol. 61. pp. 1437–1447.
- Ruland, W. 1961. *X-ray determination of crystallinity and diffuse disorder scattering. Acta cryst.* vol 14. pp. 1180-1185
- Sandermann, W. 1973. Die "wahren" Dimensionen im Makromolekularen Bereich. *Holz Roh-Werkst.*, vol. 11.
- Sisson, W. 1938. *The existence of mercerized cellulose and its orientation in Halicystis as indicated by x-ray diffraction analysis. Science.* vol. 87. pp. 350–351
- Sjoström, E. 1981. *Wood chemistry fundamentals and applications. Academic Press*
- Song, H-J., Li H, Seo, J-H., Kim, M-J., Kim, S-J. 2009. *Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes. Korean Journal of Chemical Engineering.* vol 26. n.1. pp. 141–146.
- Stipanovic, A.J., Sarko. A. 1976. *Packaging Analysis of Carbohydrates and Polysaccharides. 6 Molecular and Crystal Structure of Regenerated Cellulose II. Macromolecules.* vol. 9. n. 5. pp. 851-857



- Strømme, M., Mihranyan, A., Ek, R. 2002. What to do with all these algae? *Materials Letters*. vol. 57, pp. 569–572.
- Svagan, A.J., Azizi Samir, M.A.S., Berglund, L.A. 2007. *Biomimetic polysaccharide nanocomposites of high cellulose content and high toughness*. *Biomacromolecules*. vol.8. pp. 2556–2563.
- Tort-Agell, L. 2016. Disseny d'un bioreactor per a la producció de cel·lulosa bacteriana. UPCCommons
- Valadez-Gonzalez, A., Cervantes, J., Olayo, R., Herrera-Franco, P.J. 1999. *Effect of fibre surface treatment on the fibre-matrix bond strength of natural fiber reinforced composites*. vol. 30. pp. 309–320.
- Vandamme, E.J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K., De Wulf, P. 1998. *Improved production of bacterial cellulose and its application potential*. *Polymer Degradation and Stability*. vol 59. pp. 93-99
- Willstätter, R. and Zechmeister, L. (1913). *Zur Kenntnis der Hydrolyse von Cellulose I. Ber. Deutsch. Chem.. Ges.* vol. 46. pp. 2401–2412.
- Wüstenberg, T. 2014. *Cellulose and cellulose derivatives in the food industry: fundamentals and applications*. Wiley Ed.
- Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsunashi, S., Nishi, Y. Uryu, M. 1989. *The Structure and Mechanical-Properties of sheets prepared from Bacterial Cellulose*. *Journal of Materials Science*. vol. 24, n. 9. pp. 3141-3145
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., Oda, K. 2016. *A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)*. *Science*. vol. 351. pp. 1196-1199
- Zhijiang, C., Guang, Y. 2011. Bacterial cellulose/collagen composite: Characterization and first evaluation of cytocompatibility. *Journal of Applied Polymer Science*. vol. 120. pp. 2938–2944.