



CYTAL-ALACCTA 2019
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

EFEECTO DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA Y ULTRASONIDO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y MICROESTRUCTURALES DE POLVOS DE NANOCELULOSA BACTERIANA

M. L. Balquinta¹, S. C. Andrés¹, P. Cerrutti², A. N. Califano¹, G. Lorenzo^{1,3}

1 Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET La Plata-CICPBA-UNLP), 47 y 116, La Plata (1900). Argentina.

2 Instituto de Tecnología en Polímeros y Nanotecnología (ITPN-UBA-CONICET), Facultad de Ingeniería, UBA.

3 Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNLP.

E-mail: balquintamlaura@gmail.com

RESUMEN

La nanocelulosa bacteriana (NCB) es producida como hidrogel (manta) por microorganismos específicos (*Acetobacter* sp.) como metabolito primario a partir de subproductos de diversas industrias alimentarias. Debido al elevado contenido de agua de la manta obtenida es necesario un procesamiento y secado para su posterior comercialización sin que se alteren sus propiedades tecno-funcionales.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de distintas condiciones de tratamiento sobre las propiedades estructurales de polvos de NCB obtenidos por liofilización. Se partió de manta de NCB obtenida por *Komagataeibacter xylinus*, y se realizaron distintos tratamientos: procesado con homogenizador de alta velocidad (NCB control, C), procesado y sonicado (CUS), procesado e hidrolizado con HCl a 70°C (T) y procesado, hidrolizado y sonicado (TUS). Todas las suspensiones obtenidas (1%) fueron liofilizadas durante 48 h y sobre los polvos se realizaron estudios de: difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) y adsorción-desorción de N₂.

La estructura cristalina de la nanocelulosa puede ser definida como celulosa I_α con celda unitaria triclinica o I_β con celda unitaria monoclinica. En general las muestras de NCB poseen una relación de ~70% I_α y ~30% I_β. En el espectro FTIR, todas las muestras presentaron bandas de estiramiento en 750 cm⁻¹ y 710 cm⁻¹, que confirmaron la presencia de celulosas I_α y I_β alomorfos, respectivamente. Además, en T y TUS se observó la desaparición del pico a 1636 cm⁻¹ (ausente en muestras de alta cristalinidad). Mediante DRX se observaron los 5 picos característicos de la celulosa, pudiendo reconocerse la indexación triclinica de celulosa I, y el mayor índice de cristalinidad de los polvos hidrolizados (superior al 85% para T y TUS vs. 70% para C y CUS). Las micrografías obtenidas por SEM estuvieron en concordancia con las diferencias observadas, las muestras C y CUS presentaron una matriz más abierta, con una estructura esponjosa que favorecería la penetración de agua en los poros, mientras que T y TUS mostraron una estructura más densa y compacta, lo cual puede vincularse con la mayor cristalinidad de las mismas.

Asimismo, mediante adsorción-desorción de N₂, se observó para C y CUS, una isoterma de adsorción tipo III con histéresis H3, usualmente observada en muestras con aglomerados de poros de placas paralelas que dan lugar a capilares en forma de hendidura abierta con paredes paralelas. Contrariamente, T y TUS exhibieron una combinación de histéresis tipo H2 y H4, las cuales sugieren capilares estrechos. El tamaño promedio de poros de las muestras control (C= 20.5 nm; CUS= 21.4 nm) resultó mayor que el de las hidrolizadas (T= 13.9 nm; TUS=16.5 nm).

Los estudios realizados mostraron que el tratamiento con HCl condujo a un aumento en la cristalinidad de los polvos de NCB, observado mediante DRX, FTIR y SEM, y por otro lado, las condiciones de ultrasonido aplicadas produjeron una unión de las nanofibras. Estos cambios estructurales podrían conferir diferente capacidad de retención de agua y distintas propiedades mecánicas al ser aplicados en matrices alimentarias.

Palabras claves: nanocelulosa bacteriana, reología, microestructura, FTIR, DRX

1. Introducción

La nanocelulosa es un biopolímero compuesto de fibrillas de celulosa de tamaño nanométrico con alta relación de aspecto. Las dimensiones típicas de las nanofibras de celulosa son 5–50 nm de diámetro y hasta 2 µm de largo. Es un polímero no ramificado, compuesto por enlaces (1→4) β-glucosídicos de unidades de glucosa. Estas cadenas de glucano lineales forman enlaces de hidrógeno intra e inter moleculares altamente regulares. En los últimos años se han desarrollado métodos de obtención de nanocelulosa bacteriana (NCB) por medio de microorganismos específicos (*Acetobacter* sp.) que sintetizan celulosa como metabolito primario, usando como fuente subproductos de diversas industrias alimentarias. Además los microorganismos la producen en forma pura y no requiere drásticos tratamientos químicos de aislación y purificación.

Entre las propiedades más destacadas de la NCB se encuentran su fuerza mecánica y su gran capacidad de retención de agua. En alimentos se observó que puede aumentar su estabilidad en un amplio rango de pH y temperaturas. Debido al elevado contenido de agua con el que se produce la NCB (un hidrogel con más del 95% de agua), es necesaria una etapa de secado para su posterior comercialización, sin que ésta altere sus propiedades tecno-funcionales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que tienen las distintas condiciones de pretratamiento sobre las propiedades mecánicas y estructurales de los polvos de nanocelulosa bacteriana obtenidos por liofilización.

2. Materiales y métodos

Se utilizó una manta de NCB obtenida como el producto extracelular de *Komagataeibacter xylinus* utilizando macerado de maíz + glicerol como medio nutriente (Foresti, Cerrutti y Vazquez, 2015). En primer lugar la manta fue procesada en un homogeneizador de alta velocidad durante 10 min (NCB control, C). Una fracción fue hidrolizada con HCl 37% en baño termostático (70 °C) durante 2 h, se neutralizó con NaOH diluido y luego se lavó varias veces con agua destilada y deionizada para eliminar el exceso de NaCl (NCB tratada, T). Posteriormente, fracciones de NCB original (C) y tratada con HCl (T) fueron sometidas a ultrasonido (Sonics Vibra Cell VX750, USA) a una frecuencia de 20 kHz, durante 15 minutos y a una potencia de 640 W, obteniendo así NCB CUS y TUS, respectivamente.

Las cuatro suspensiones de NCB fueron sometidas a un proceso de liofilización durante 48 h (LA-B4-C, Rificor Argentina).

Los grupos funcionales presentes en los polvos de NCB obtenidos luego de los diferentes tratamientos fueron determinados por espectroscopía infrarroja (Thermo Scientific, MA, USA) por transformada de Fourier (FTIR) con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR).

El grado de cristalinidad del polímero se determinó mediante el análisis de la intensidad de la radiación de rayos X dispersada por la muestra.

Se obtuvo el índice de cristalinidad (C_{Ir}) (Segal y col., 1959) y el tamaño del cristal (D) mediante las siguientes ecuaciones:

$$C_{Ir} = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} * 100 \quad (1)$$

$$D(nm) = \frac{K\lambda}{FWHM \cos(\theta)} \quad (2)$$

donde I_{200} , I_{am} representan los valores de la intensidad de la celulosa cristalina y amorfa respectivamente, K es un factor adimensional que depende del método para calcular la amplitud (K=0.94), λ es la longitud de onda incidente ($\lambda = 0.154$ nm), FWHM es el ancho del pico de difracción en la altura media (en radianes), y θ es el ángulo del pico de difracción de la fase cristalina (ángulo de Bragg) (Vasconcelos y col., 2017).

Se evaluó la microestructura y morfología superficial de los polvos de NCB mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, FEI Quanta 200, USA). Además, las áreas de superficie y el tamaño promedio de poros se midieron por adsorción-desorción de N₂, utilizando un analizador de área de superficie y porosidad (ASAP 2020, Micromeritics, USA).

3. Resultados y discusión

Los espectros infrarrojos para polvos NCB con diferentes pretratamientos se muestran en la Figura 1. La mayoría de los picos observados fueron similares entre las muestras y corresponden a los característicos de las fibras de celulosa. Una banda ancha en la región de 3342 cm⁻¹, observada para todas las muestras, indica la vibración de estiramiento libre de OH de la estructura de CH₂-OH en la celulosa (Xiang y col., 2016) y grupos OH que corresponden a los enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares presentes en la celulosa y el agua absorbida (Sheltami y col., 2012).

Los picos alrededor de 2900 cm⁻¹ se asociaron con la vibración de estiramiento C-H y CH₂ tanto en celulosa II como en celulosa amorfa, mientras que los picos ubicados a 1636 cm⁻¹ se atribuyeron a vibraciones de flexión de grupos OH.

Las únicas diferencias notables entre los pretratamientos fueron los picos a 1560 cm⁻¹ y 1636 cm⁻¹, presentes en C y CUS y ausentes en las muestras tratadas con ácido (T y TUS). Los picos en el rango de 1500–1660 cm⁻¹ generalmente se asocian a proteínas (Xiang y col., 2016). La existencia de compuestos nitrogenados en las películas de NCB se puede atribuir a los residuos de medios nutrientes que permanecen en las muestras. La ausencia de esta banda en T y TUS podría estar relacionada con su hidrólisis por el tratamiento ácido así como al proceso de lavado para la eliminación del NaCl restante luego de la neutralización de las muestras. Por otro lado, todas las muestras presentaron bandas de estiramiento en 750 cm⁻¹ y 710 cm⁻¹, que confirmaron la presencia de celulosa I α y I β alomorfos, respectivamente. Algunos autores proponen que la relación entre la intensidad de estos picos resulta proporcional a la fracción másica relativa entre I α y I β (Gu y Catchmark, 2012).

El porcentaje de celulosa I α alomorfa de las muestras de NCB se determinó cuantitativamente y se obtuvo un valor medio del 76% (\pm 5,64%). Las condiciones de procesamiento no afectaron significativamente esta relación ($P > 0,05$). Este valor está de acuerdo con la proporción típica (\sim 70% I α y \sim 30% I β) informada para nanocelulosa bacteriana cultivada estáticamente (Yamamoto, Horii y Hirai, 1996).

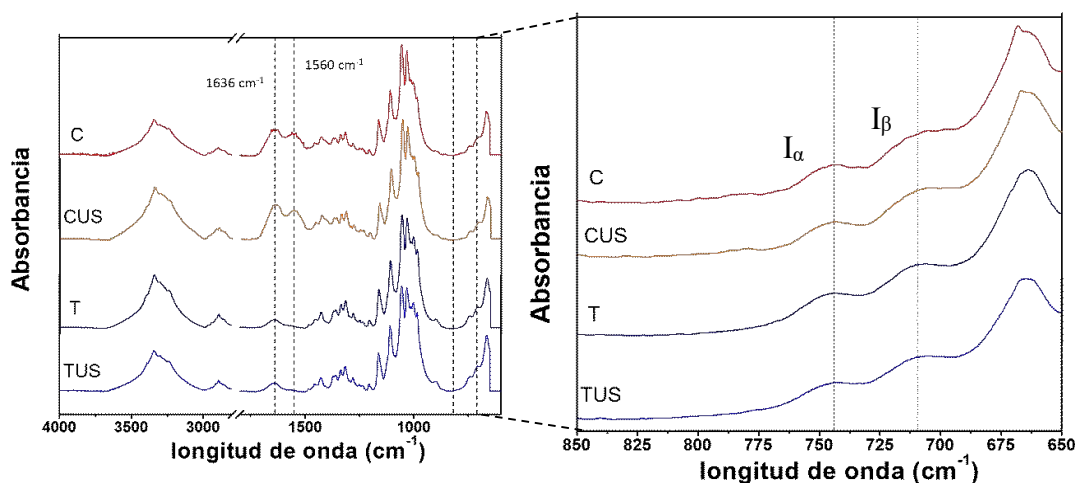


Figura 1. Espectros FTIR-ATR de polvos de nanocelulosa bacteriana sometida a diferentes tratamientos (C: control, T: tratada con ácido, CUS: control sonicada y TUS: tratada con ácido y sonicada).

Mediante el análisis de la difracción de rayos X se obtuvieron difractogramas de los diferentes polvos de NCB que revelan la existencia de una parte cristalina y de otra amorfa, con los picos característicos encontrados en bibliografía para la celulosa (Figura 2). Los resultados obtenidos para el tamaño de cristal D de las diferentes muestras no presentaron diferencias significativas, determinándose un tamaño promedio de 5,87 nm ($\pm 0,12$ nm). Contrariamente, el índice de cristalinidad mostró una marcada diferencia entre los controles (C y CUS) con un valor promedio de 71% ($\pm 5.7\%$) y las muestras hidrolizadas (T y TUS) cuyo promedio fue de 89% ($\pm 6.1\%$). Este aumento de la cristalinidad en muestras hidrolizadas concuerda con las diferencias encontradas en los espectros FTIR. Además, los difractogramas T y TUS exhibieron dos picos adicionales alrededor de 27.5° y 32° , los cuales podrían atribuirse a los planos 111 y 200 del cristal de NaCl presentes en la muestra después de la neutralización.

De manera complementaria a los resultados obtenidos se evaluó la morfología de los polvos de NCB mediante SEM (Figura 3). Se observaron marcadas diferencias entre las muestras control (C y CUS) y las hidrolizadas (T y TUS). Las primeras mostraron una matriz más abierta con interconexiones de nanofibras entre escamas de NCB. Esta estructura ligera y esponjosa permite la penetración del agua en los poros con baja

resistencia, lo cual permite una fácil rehidratación de los polvos y la obtención de suspensiones con mayor estabilidad. Por otro lado, las muestras tratadas presentaron una estructura más densa, resultado que puede vincularse con la mayor cristalinidad de partículas. La estructura compacta de las muestras hidrolizadas incrementa la resistencia a la difusión de agua, provocando una baja capacidad de rehidratación y una fuerte tendencia de las partículas a precipitar rápidamente. Además, en concordancia con los difractogramas obtenidos por difracción de rayos X, se observaron cristales de NaCl.

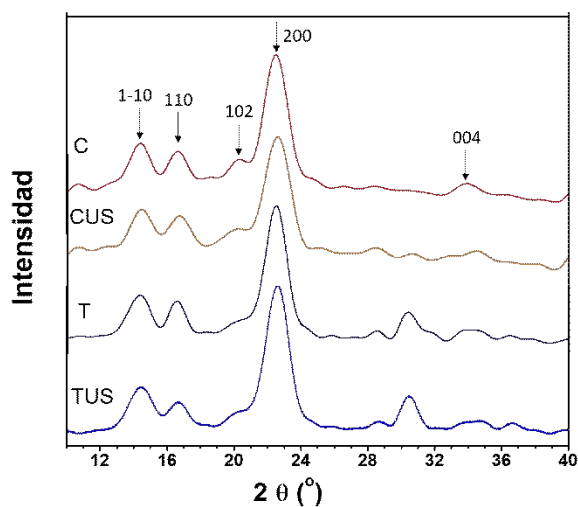


Figura 2. Difractogramas de rayos X obtenidos para los diferentes polvos de nanocelulosa bacteriana (C: control, T: tratada con ácido, CUS: control sonicada y TUS: tratada con ácido y sonicada).

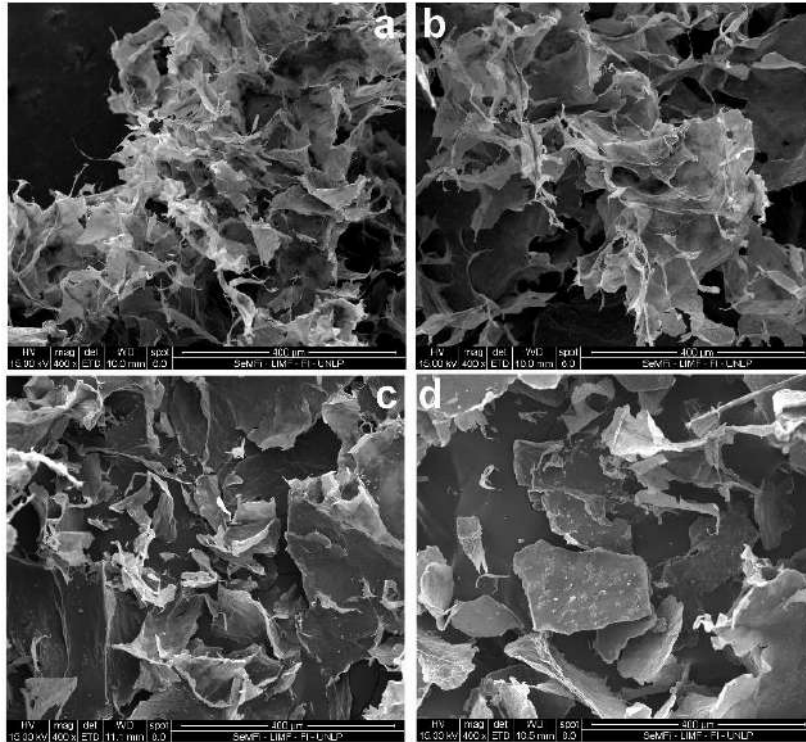


Figura 3. Imágenes obtenidas por SEM de los polvos de nanocelulosa bacteriana después de los diferentes tratamientos. a) C, control; b) CUS, control sonicada; c) T, tratada con ácido; d) TUS, tratada con ácido y sonicada.

Asimismo, mediante la técnica de adsorción-desorción de N_2 , de acuerdo con la clasificación establecida por la IUPAC (Thommes y col., 2015), se observó para C y CUS isothermas de adsorción tipo III con histéresis H3, usualmente observadas en muestras con aglomerados de poros de placas paralelas que dan lugar a capilares en forma de hendidura abierta con paredes paralelas. Contrariamente, T y TUS exhibieron una combinación de histéresis tipo H2 y H4, las cuales sugieren capilares estrechos (Figura 4). El tamaño promedio de poros de las muestras control (C= 20.5 nm; CUS= 21.4 nm) resultó mayor que el de las hidrolizadas (T= 13.9 nm; TUS=16.5 nm). Las distribuciones de tamaño de poro correspondientes se calcularon utilizando el método BJH, se observó en la NCB tratada con ácido una gran población de mesoporos en el rango de 2.5-4 nm, mientras que en la NCB control el rango fue entre 10-20 nm.

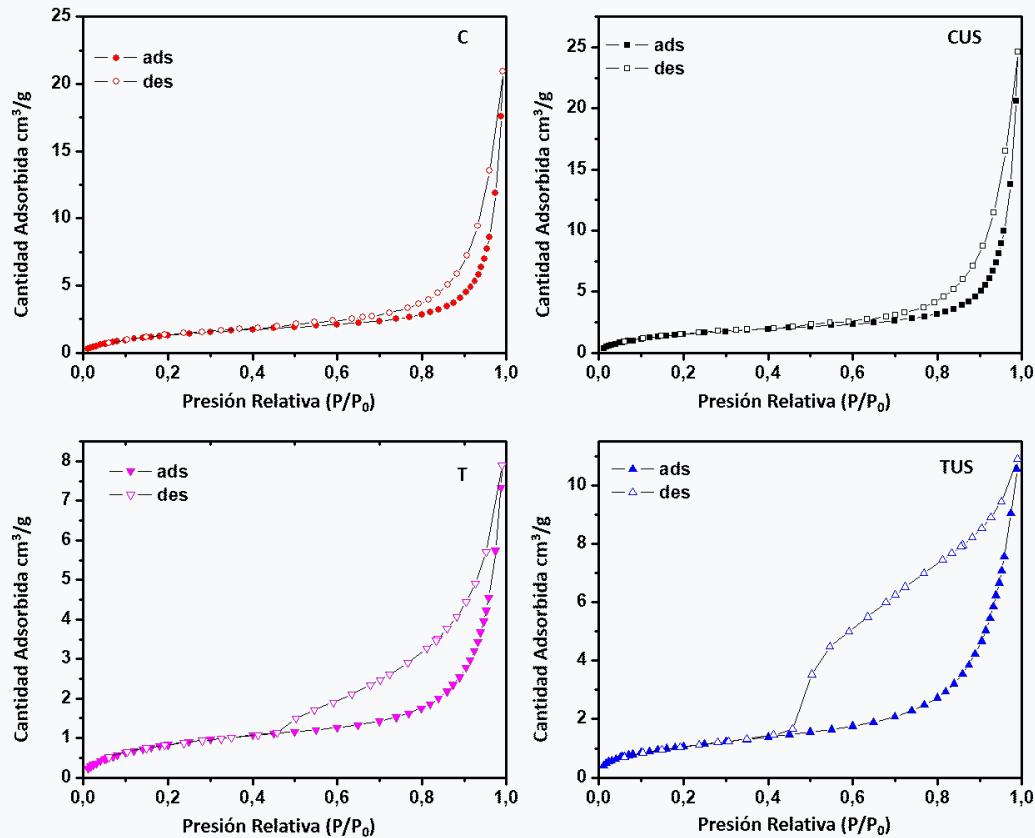


Figura 4. Isothermas de adsorción-desorción de N₂ de muestras de nanocelulosa bacteriana control (C), control sonicada (CUS), tratada con ácido (T) y tratada con ácido y sonicada (TUS).

4. Conclusiones

En el presente trabajo se analizó el efecto de diferentes tratamientos realizados sobre hidrogeles de nanocelulosa bacteriana (NCB) en las características estructurales de los polvos obtenidos luego de su liofilización. Los estudios realizados mostraron que la hidrólisis realizada con HCl condujo a un aumento en la cristalinidad de los polvos de NCB, lo cual fue convalidado mediante los ensayos de DRX, FTIR y SEM. Por otro lado, las condiciones de ultrasonido aplicadas incrementaron el aglomerado de las nanofibras sin alterar el grado de cristalinidad de los polvos. Estos cambios estructurales podrían conferir diferente capacidad de retención de agua y distintas propiedades mecánicas al ser aplicados en matrices alimentarias.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET, Argentina), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina), Universidad Nacional de La Plata, Omega Sur S.A., y Milkaut S.A. En memoria de la Dra Alicia N. Califano (1951-2019), investigadora (CIDCA-CONICET, Argentina) altamente respetada y compañera a quien extrañamos profundamente.

Referencias

- Foresti, M., Cerrutti, P., & Vazquez, A. (2015). Bacterial nanocellulose: synthesis, properties and applications. In *Polymer Nanocomposites Based on Inorganic and Organic Nanomaterials* (pp. 39-61). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Gu, J., & Catchmark, J. M. (2012). Impact of Hemicelluloses and Pectin on Sphere-Like Bacterial Cellulose Assembly. *Carbohydrate Polymers*, *88*(2), 547-557.
- Segal, L., Creely, J., Martin Jr, A., & Conrad, C. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the x-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, *29*(10), 786-794.
- Sheltami, R. M., Abdullah, I., Ahmad, I., Dufresne, A., & Kargarzadeh, H. (2012). Extraction of cellulose nanocrystals from mengkuang leaves (*pandanus tectorius*). *Carbohydrate Polymers*, *88*(2), 772-779.
- Thommes, M., Kaneko, K., Neimark, A. V., Olivier, J. P., Rodriguez-Reinoso, F., Rouquerol, J., & Sing, K. S. (2015). Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, *87*(9-10), 1051-1069.
- Vasconcelos, N. F., Feitosa, J. P. A., da Gama, F. M. P., Morais, J. P. S., Andrade, F. K., de Souza, M. d. S. M., & de Freitas Rosa, M. (2017). Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: properties and morphological features. *Carbohydrate Polymers*, *155*, 425-431.
- Xiang, Z., Gao, W., Chen, L., Lan, W., Zhu, J., & Runge, T. (2016). A comparison of cellulose nanofibrils produced from *Cladophora glomerata* algae and bleached eucalyptus pulp. *Cellulose*, *23*(1), 493-503.
- Yamamoto, H., Horii, F., & Hirai, A. (1996). In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I α and I β at the early stage of incubation. *Cellulose*, *3*(1), 229-242.