

Preparación y caracterización de nanofibrillas de celulosa oxidadas a partir de papel

Autor:

José Antonio Casanovas Rodríguez

Directoras:

Filomena Almeida e Silva

Raquel Becerril Uriol

Ponente:

Esther Asensio Casas

Universidad de Zaragoza

Departamento de Química Analítica

• Índice

1. Resumen	pág. 2
1.1 Abstract	pág. 2
2. Introducción	pág. 3
2.1 Celulosa	pág. 3
2.2 Nanofibras de celulosa	pág. 4
2.3 Pretratamientos y métodos de obtención de nanofibrillas de celulosa	pág. 4
3. Objetivos	pág. 7
4. Métodos y materiales	pág. 7
4.1 Preparación de la pulpa	pág. 7
4.2 Molienda con molino de bolas planetario	pág. 8
4.2.1 Tipo de molienda: seca y húmeda	pág. 8
4.2.2 Tamaño de bolas	pág. 8
4.2.3 Relación muestra:bolas	pág. 9
4.2.4 Tiempo de molienda	pág. 9
4.2.5 Velocidad de molienda	pág. 9
4.3 Pretratamientos de la pasta de papel	pág. 10
4.3.1 Tratamiento alcalino	pág. 10
4.3.2 Hidrólisis ácida	pág. 10
4.3.3 Oxidación con catalizador TEMPO	pág. 10
4.4 Caracterización de las muestras	pág. 10
4.4.1 SEM	pág. 11
4.4.2 TEM	pág. 11
4.4.3 Estudio de la resistencia a la ruptura por punción de los films reforzados con NFCs	pág. 11
4.5 Determinación del peso seco de las muestras de CNFs	pág. 12
4.6 Preparación de los films con NFCs por “casting”	pág. 12
4.6.1 Films de NFCs	pág. 12
4.6.2 Films de NFCs con CMC	pág. 13
5. Resultados y discusión	pág.13
5.1 Optimización de la molienda en molino de bolas planetario	pág. 13
5.1.1 Tipo de molienda: seca y húmeda	pág. 13
5.1.2 Tamaño bolas	pág. 14
5.1.3 Relación muestra:bolas	pág. 15
5.1.4 Tiempo de molienda	pág. 16
5.1.5 Velocidad de molienda	pág. 16
5.2 Pretratamientos pasta de papel	pág. 17
5.2.1 Pretratamientos ácido y alcalino	pág. 17
5.2.2 Oxidación con catalizador TEMPO	pág. 18
5.3 Preparación de los films con NFCs por “casting”	pág. 21
6. Conclusiones	pág.23
7. Referencias	pág.24

• **1. Resumen**

El principal objetivo de este trabajo fue optimizar el proceso de obtención de nanofibrillas de celulosa (NFCs) a partir de papel de filtro utilizando un molino de bolas planetario. Para ello, se estudió la influencia de las siguientes variables: tipo de molienda (seca y húmeda), tamaño de las bolas, relación muestra:bolas, tiempo de molienda y velocidad a la que se produce. Además, se evaluó la influencia de distintos pretratamientos de la pasta de celulosa, como el pretratamiento ácido, básico o de oxidación por 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il oxil (TEMPO), en la obtención de un mayor rendimiento en la producción de nanofibrillas de celulosa. Para comprobar el efecto de las diferentes variables en el diámetro y homogeneidad de las nanofibras obtenidas, éstas se analizaron a nivel macroscópico y microscópico recurriendo a la microscopía de escaneo electrónico (SEM) y a la microscopía de transmisión electrónica (TEM). Finalmente, se prepararon films de carboximetil celulosa con las NFCs obtenidas como aditivo, y se evaluó su efecto en la resistencia mecánica de los films. Los resultados que se obtuvieron indican que la combinación de parámetros más adecuada para el proceso de molienda fueron: molienda húmeda, bolas de 3 mm, relación muestra:bolas de 1:70, 3 h y 300 rpm. De la misma forma, se vio que el pretratamiento más eficaz para separar las fibras fue la oxidación por TEMPO. Finalmente, se determinó que la adición de nanofibras de celulosa a los films de CMC disminuía la resistencia comparada con la de los films de control, pero que, sin embargo, dicha resistencia aumentaba a concentraciones de NFCs elevadas.

1.1 Abstract

The main objective of this project was to optimize the attainment of cellulose nanofibrils using filter paper as raw material, with a planetary ball mill. For that, the influence of the following variables: type of milling (dry or wet), ball size, ratio sample:balls, milling time and speed were studied. We also evaluated the influence of different pretreatments of the cellulose pulp, such as acid and basic pretreatments or the oxidation with 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl oxyl (TEMPO), in final cellulose nanofibrils yield. The effect of the different variables in the obtained nanofiber's diameter and homogeneity was analyzed at a macroscopic and microscopic level, using the Scanning Electron Microscope (SEM) and the Transmission Electron Microscope (TEM). Finally, we prepared carboxymethyl cellulose films with the obtained CNFs as additive, evaluating their effect in the film's mechanical resistance. The obtained results showed that the most efficient parameters for CNFs obtention was the combination of wet milling, 3 mm balls, 1:70 relation sample:balls, 3 h and 300 rpm. We also observed that the most effective pretreatment for cellulose fibre separation, was the TEMPO-mediated oxidation. Finally, we determined that the addition of cellulose nanofibers to CMC films diminished the resistance compared with the control films, but this resistance increased at high CNFs concentration.

• 2. Introducción

2.1 Celulosa

La celulosa es la cadena polimérica natural más abundante en nuestro entorno [1]. Es un hidrato de carbono, y el componente fundamental de la pared de las células vegetales en la naturaleza, como en madera, plantas y fibras naturales. La paja, por ejemplo, tiene un 30% de celulosa y la madera hasta un 60% [2]. Su estructura es la de un homopolímero lineal compuesto por unidades de D-glucosa conectadas entre sí por enlaces covalentes específicos, denominados enlaces glucosídicos, como se puede observar en la figura 1.

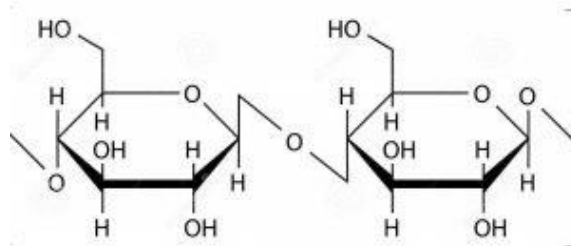


Figura 1: Estructura molecular de la celulosa.

Estas cadenas de celulosa se unen entre ellas mediante puentes de hidrógeno y forman largas microfibrillas, con regiones cristalinas más ordenadas y regiones amorfas más desordenadas (figura 2). Según la anchura y largura de dichas fibras, es posible obtener materiales con distintas propiedades de resistencia, permeabilidad o textura [1]. Las regiones cristalinas dan celulosas con una robustez mecánica perfecta y alta estabilidad termal, mientras que las regiones amorfas llevan a materiales de celulosa con alta flexibilidad y resistencia [1].

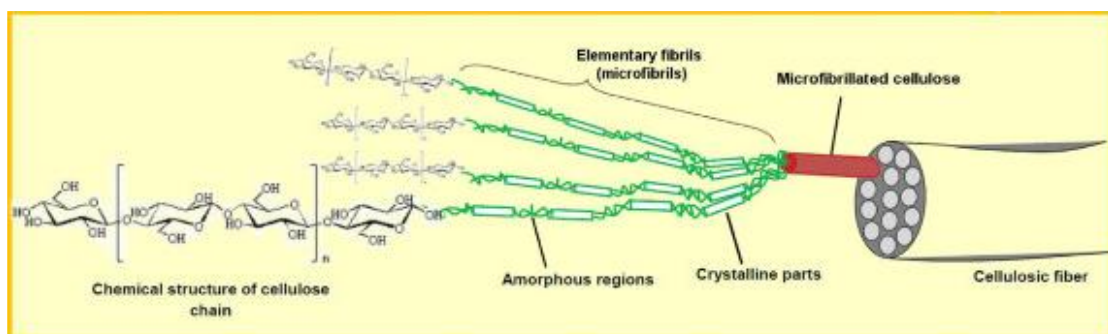


Figura 2: Descripción esquemática de la estructura de las fibras de celulosa [3].

El principal consumo de celulosa se encuentra en la industria del papel y el cartón [4], donde la principal materia prima es la madera. Ésta contiene principalmente celulosa, lignina, que es un polímero que proporciona dureza y protección, y hemicelulosas. Las hemicelulosas son un conjunto de polisacáridos que forman cadenas lineales ramificadas y cuya función es actuar como agente de unión de las fibras. En el caso del

papel, las fibras de celulosa forman una red, con las fibras adheridas unas a otras por enlaces de hidrógeno. Si las fibras que se utilizan son más largas, se obtendrá un material más resistente, mientras que usando fibras más cortas se puede dar suavidad o relleno [5]. En este contexto, el uso de fibras de celulosa de diámetro nanométrico (nanofibrillas) ha despertado gran interés debido a su variedad de propiedades y aplicaciones [6].

2.2 Nanofibras de celulosa.

Las nanofibras de celulosa (NFC) son fibras de escala nanométrica (diámetro de entre 10 y 20 nanómetros), que tienen una gran superficie específica y una alta resistencia mecánica. Las NFCs comparten propiedades con la celulosa, como la baja densidad, su biodegradabilidad, un coeficiente de expansión termal muy bajo y una buena capacidad como barrera contra gases [7]. La utilización de estas fibras nos permite obtener materiales más ligeros que el acero y varias veces más resistentes, con un coste relativamente bajo, pero todavía demasiado elevado para ser sostenible a nivel industrial [8, 9]. Combinándolas con otros componentes como gomas o resinas, se obtienen materiales muy versátiles, que podrían llegar a sustituir partes de las carrocerías de coches y aviones, como ya se está investigando [9]. Por otra parte, debido a su pequeño diámetro, las fibras pueden dejar pasar la luz visible, por lo que permite la elaboración de materiales transparentes, como vidrios muy resistentes a la deformación por calor. Además, la adición de estas nanofibras a materiales de envases alimentarios, ha demostrado que mejora las propiedades barrera frente al oxígeno u otros gases, haciendo que estos materiales sean más efectivos a la hora de mantener la frescura de los alimentos [10]. Debido a su gran superficie específica, también se pueden utilizar para retener sustancias en el envase activo y controlar su liberación [1].

2.3 Pretratamientos y métodos de obtención de nanofibrillas de celulosa.

Toda esta variedad de propiedades y aplicaciones, hace que la investigación sobre las nanofibras sea constante. Uno de esos campos de investigación es la optimización de sus métodos de obtención. En la actualidad, existen varios procedimientos para extraerlas, como son los pretratamientos de hidrólisis enzimática y ácida/básica, o la oxidación, seguidos de métodos mecánicos de obtención, como la homogenización o la sonicación [10].

El pretratamiento más utilizado es la hidrólisis ácida [11], que consiste en tratar la celulosa con diferentes tipos de ácidos (ácido sulfúrico, ácido fórmico, ácido acético entre otros) para hidrolizar las regiones amorfas, que tienen mayor contenido de hemicelulosa, que actúa de agente de unión de las fibras. Esto deja las regiones más ordenadas como producto, facilitando la separación de las fibras durante el posterior tratamiento mecánico. Este método de pretratamiento tiene tres variables principales; tiempo, proporción de ácido y temperatura, que determinarán el comportamiento, propiedades y rendimiento de las nanocelulosas obtenidas después del tratamiento

físico. Si se utiliza un ácido demasiado fuerte, a alta temperatura y se mantiene durante mucho tiempo el pretratamiento, se obtiene una rápida hidrólisis de las fibras de celulosa, pero con bajos rendimientos en NFCs ya que puede llegar a acortar las fibras. De la misma forma, usar un ácido más suave, a menor temperatura, lleva a una hidrólisis insuficiente y a bajos rendimientos. Esto indica que, para obtener los mejores resultados, hay que realizar el pretratamiento en condiciones controladas y seguir con un tratamiento mecánico adecuado, como homogeneización o sonicación [10, 12].

Otro pretratamiento utilizado es la hidrólisis enzimática, que consiste en provocar la hidrólisis de hemicelulosas con varias enzimas (endoglucanasa, celobiohidrolasa o celulasa) para obtener a continuación las NFC con un tratamiento mecánico, a la par que monosacáridos que pueden utilizarse para la preparación de bioetanol. Aunque este procedimiento requiere bastante más tiempo que la hidrólisis ácida, permite obtener una mayor cristalinidad y dispersión de las fibras [10, 13].

La oxidación de las fibras de celulosa como pretratamiento es uno de los métodos más eficaces [7]. En el año 2006 [14], un grupo de investigación japonés descubrió que las nanofibras se pueden separar mediante oxidación previa usando un catalizador denominado 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il oxil (TEMPO) [14]. Dicho catalizador cataliza una reacción de oxidación de los grupos hidroxilo primarios a grupos carboxilo, disminuyendo la adhesión entre las microfibrillas, y facilitando su separación posterior durante el tratamiento mecánico. El mecanismo de reacción se muestra en la figura 3.

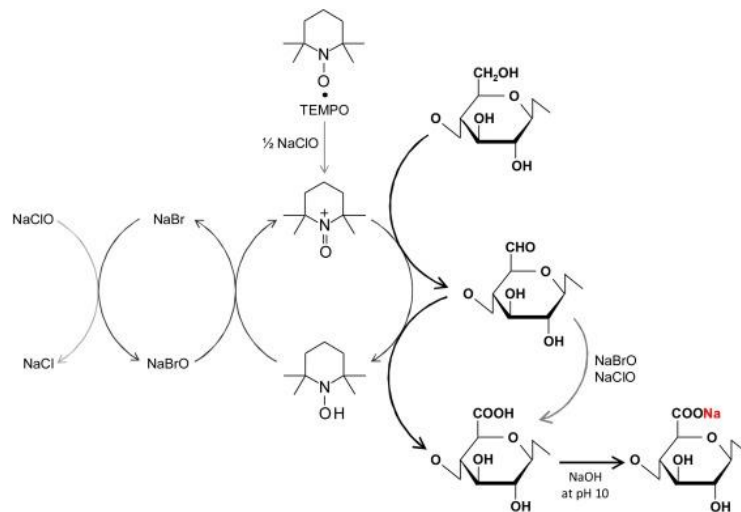


Figura 3: Mecanismo de la oxidación catalítica de los grupos C6-OH de la celulosa con TEMPO/NaBr/NaClO en agua a pH 10 [15].

Además, ya existe un método para reciclar el catalizador TEMPO y reutilizarlo en posteriores reacciones [16]. Esto nos permite obtener las nanofibras con un consumo energético varias veces inferior al que se obtendría con los métodos convencionales como los pretratamientos ácidos o básicos [8]. Además, modificando parámetros de

este proceso de oxidación, como el tiempo de reacción o la concentración de reactivos, podemos conseguir variaciones de los materiales resultantes de dichas fibras en propiedades como la ductilidad de las fibras, las capacidades de absorción de sustancias o como barrera ante los gases [15].

Existen varios métodos mecánicos de obtención de las NFCs, como la sonicación de alta intensidad, la homogeneización, la microfluidización o la molienda con molino de bolas planetario [17, 18]. La sonicación, por ejemplo, utiliza vibraciones de alta intensidad que generan ondas de ultrasonido, que, a su vez, generan vibraciones en el material a estudiar. Esto genera millones de burbujas microscópicas en muestras líquidas, las cuales sufren procesos de expansión y colapso muy rápidos (cavitación), transmitiendo esa energía al material, lo que provoca una mayor separación de las fibras y una mayor homogeneidad [19]. La homogeneización, por otra parte, usa diversos mecanismos físicos, como la cizalladura producida por líquidos y sólidos o la cavitación causadas por el rotor del homogeneizador [17]. Los continuos choques contra las paredes o contra las aspas del rotor, y el efecto de la cizalladura o la cavitación provocan la separación de las fibras y la homogeneidad de la muestra. La microfluidización lleva la muestra líquida por un circuito de tubos metálicos de tamaño micrométrico, sometiéndola a unas presiones y velocidades muy elevadas (hasta 30000 psi y 500 m/s), y a constantes choques con las paredes de los tubos y con ella misma [20]. Esto provoca que la muestra se vea bajo el efecto de 3 tipos de fuerza; corte, impacto y disipación de energía, lo que crea unas nanoemulsiones muy homogéneas y con las fibras bien separadas. Estos métodos se usan en combinación con los pretratamientos descritos anteriormente, siendo que primero se realiza el pretratamiento y después los métodos físicos de tratamiento y obtención de las NFCs.

El molino de bolas planetario produce fricciones y colisiones entre las bolas y las fibras de celulosa, provocando la trituración y separación entre ellas y, por lo que también ya se ha descrito para la obtención de NFCs [21]. Además, permite aplicar la mecanoquímica, usando recipientes herméticos y sin disolventes agresivos, para controlar de forma muy precisa las condiciones de reacción y suministrar diferentes tipos de energía a la misma [12]. Uno de los materiales más usados para la manufactura de los recipientes de molienda es el Óxido de Circonio, debido a ser un material bastante inerte con una dureza elevada (> 9 Mohs), donde se añade la muestra a moler junto a una proporción de bolas del mismo material [22] del recipiente. Este recipiente se somete a una doble rotación (alrededor del eje central y sobre sí mismo) a velocidades muy altas, de forma a que las bolas impacten contra la muestra de un modo continuo y uniforme. Este método nos permite pulverizar la muestra hasta obtener un tamaño de partículas muy bajo, hasta la escala nanométrica. Las bolas suelen ser del mismo material del recipiente y su tamaño y proporción en relación a la muestra a moler son muy importantes, dado que, si son demasiado grandes, pueden tener un número reducido de colisiones y por tanto menor capacidad de trituración; pero si son muy

pequeñas, la energía generada puede ser demasiado baja y aglomerarse el material [21]. Aunque este proceso físico ya se haya aplicado a la producción de NFCs a partir de papel virgen [18], el estudio detallado del proceso aún es necesario.

• **3. Objetivos**

El objetivo de este trabajo es desarrollar y optimizar un método de obtención de nanofibras de celulosa a partir de papel de filtro utilizando un molino de bolas planetario. Para el efecto, se han definido varios objetivos específicos:

- Evaluar el tipo de molienda más adecuado (seca o húmeda) para la obtención de nanofibrillas de celulosa.
- Evaluar la influencia de varios parámetros como el tiempo o velocidad de molienda, diámetro de bola, proporción de muestra:bolas, y cantidad de agua en molienda húmeda en la obtención de NFCs.
- Evaluar la influencia de distintos pretratamientos (hidrólisis ácida o básica y oxidación por TEMPO) en la calidad de las NFCs obtenidas.

• **4. Métodos y materiales**

4.1 Preparación de la pulpa

Para preparar la pulpa de papel de filtro, se introdujeron 15 gramos de papel en 250 mL de agua destilada y se dejaron hidratar durante 24 horas. Se vertió la mezcla en una batidora de vaso y se trituró durante 5 minutos a velocidad máxima. La pulpa resultante se dejó secar a 70 °C durante 24 horas y una vez seca, se volvió a triturar en las mismas condiciones (Figura 4).



Figura 4: Pulpa de papel de filtro después de la segunda trituración.

4.2 Molienda con molino de bolas planetario

Una vez obtenida la pulpa seca y uniforme, se sometió a un proceso de molienda con un molino de bolas planetario Retsch PM100. Para dicho proceso, se añadió una cantidad de muestra de pulpa de papel seca y triturada a un recipiente de óxido de circonio de 50 mL. A continuación, se añadieron las bolas del mismo material cerámico. Para optimizar el tipo de molienda, se modificaron diferentes variables que afectan al proceso de molienda, como el tamaño de bolas, relación muestra:bolas, velocidad, contenido de agua o tiempo de molienda. Tras la molienda, las muestras fueron separadas de las bolas y lavadas con agua destilada. Una vez centrifugadas, se guardaron en nevera hasta su análisis. Según necesario, se añadió un paso de sonicación, filtrado y centrifugación adicional de las muestras, para mejorar su homogeneidad. Estos pasos se detallarán a continuación para cada uno de los parámetros estudiados.

4.2.1 Tipo de molienda: seca y húmeda

Para comparar la efectividad de la molienda en seco y húmedo, se realizaron moliendas con bolas de 10 y 3 mm de diámetro, en ausencia de agua y añadiendo 20 mL de agua milli-Q al recipiente de molienda. En la tabla 1, se muestran los parámetros utilizados en los experimentos realizados:

Tabla 1: Condiciones experimentales utilizadas en las moliendas seca y húmeda.

Experimento	Material de partida	Peso de muestra	Tamaño de bolas	Cantidad de bolas	Tiempo de molienda	Velocidad	Agua añadida
EXP 2	Pulpa seca y triturada	778 mg	10 mm	10 bolas	2 h	300 rpm	-
EXP 3	Pulpa seca y triturada	778 mg	3 mm	110 g	2 h	300 rpm	-
EXP 5	Pulpa seca y triturada	778 mg	3 mm	110 g	2 h	300 rpm	20 mL
EXP 6	Pulpa seca y triturada	778 mg	10 mm	10 bolas	2 h	300 rpm	20 mL

4.2.2 Tamaño de bolas

Una vez seleccionado el tipo de molienda, se estudió la influencia del tamaño de las bolas en la molienda húmeda. Para ello, se comparó la eficacia de la molienda con bolas de 3 y 10 mm de diámetro durante 2 o 3 horas. En la tabla 2 se muestran las condiciones de los experimentos realizados.

Tabla 2: Condiciones experimentales utilizadas para determinar el mejor diámetro de bolas.

Experimento	Material de partida	Peso de muestra	Tamaño de bolas	Cantidad de bolas	Tiempo de molienda	Velocidad
EXP 4	Pulpa seca y triturada	778 mg	10 mm	10 bolas	3 h	300 rpm
EXP 5	Pulpa seca y triturada	778 mg	3 mm	110 g	2 h	300 rpm
EXP 6	Pulpa seca y triturada	778 mg	10 mm	10 bolas	2 h	300 rpm
EXP 7	Pulpa seca y triturada	778 mg	3 mm	110 g	3 h	300 rpm

4.2.3 Relación muestra:bolas

Puesto que la relación de masa entre las bolas y la muestra es determinante para el resultado de la molienda [21], se estudió el efecto del uso de diferentes relaciones muestra:bolas (1:60, 1:80 y 1:140) en la obtención de las nanofibras. En la tabla 3 se muestran los experimentos realizados.

Tabla 3: Condiciones experimentales para determinar la relación muestra:bolas óptima.

Experimento	Material de partida	Peso de muestra	Tamaño de bolas	Cantidad de bolas	Relación	Tiempo de molienda	Velocidad
EXP 7	Pulpa seca y triturada	778 mg	3 mm	110 g	1:140	3 h	300 rpm
EXP 9	Pulpa seca y triturada	778 mg	3 mm	48 g	1:60	3 h	300 rpm
EXP 10	Pulpa seca y triturada	778 mg	3 mm	68 g	1:80	3 h	300 rpm

4.2.4 Tiempo de molienda

Puesto que el tiempo que se mantiene la molienda puede afectar de forma considerable al material obtenido [21], se realizaron variaciones con tiempos de molienda de 2, 3 y 4 horas. En la tabla 4 se muestran los diferentes experimentos.

Tabla 4: Condiciones experimentales para determinar el tiempo de molienda.

Experimento	Material de partida	Peso de muestra	Tamaño de bolas	Cantidad de bolas	Tiempo de molienda	Velocidad
EXP 5	Pulpa seca y triturada	778 mg	3 mm	110 g	2 h	300 rpm
EXP 7	Pulpa seca y triturada	778 mg	3 mm	110 g	3 h	300 rpm
EXP 8	Pulpa seca y triturada	778 mg	3 mm	110 g	4 h	300 rpm

4.2.5 Velocidad de molienda

Por último, se realizó la comparación de varios experimentos para determinar que velocidad de molienda permitía la obtención de mejores resultados. En concreto se estudiaron velocidades de 300, 400 y 500 revoluciones por minuto. En la tabla 5 se muestran los experimentos realizados.

Tabla 5: Condiciones experimentales para determinar la velocidad de molienda.

Experimento	Material de partida	Peso de muestra	Tamaño de bolas	Cantidad de bolas	Tiempo de molienda	Velocidad
EXP 22	Pulpa seca y triturada	1556 mg	3 mm	110 g	3 h	300 rpm
EXP 23	Pulpa seca y triturada	1556 mg	3 mm	110 g	3 h	400 rpm
EXP 24	Pulpa seca y triturada	1556 mg	3 mm	110 g	3 h	500 rpm

4.3 Pretratamientos de la pasta de papel

Para intentar mejorar el rendimiento de las nanofibras de celulosa, se sometió la pulpa de celulosa seca y triturada a varios pretratamientos. Se llevaron a cabo una hidrólisis ácida, una hidrólisis alcalina y una oxidación con el catalizador TEMPO.

4.3.1 Tratamiento alcalino

Para el pretratamiento alcalino, se utilizó una disolución de Na_2CO_3 para tratar la muestra. Se prepararon 200 mL de una disolución de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ al 1,6% (p/v). Se añadió a dicha disolución la muestra de celulosa (778 mg) y se agitó a 600 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la muestra de celulosa se filtró a vacío y se lavó con agua destilada hasta obtención de pH neutro. Finalmente se trituró en batidora hasta obtener una muestra más homogénea, y después se secó a 25°C durante 24 horas.

4.3.2 Hidrólisis ácida

En el caso de la hidrólisis ácida, se añadieron 6,84 mL de H_2SO_4 al 47% (v/v) a la muestra (778 mg) y se agitó a 600 rpm, a 45 °C durante 30 minutos. Una vez completada la reacción, se centrifugó la muestra a 4300 rpm durante 30 minutos. A continuación, se lavó la muestra con agua destilada y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, repitiendo este proceso hasta que se obtuvo pH neutro. Una vez se consiguió, la muestra se secó a 25°C durante 24 h. Después del proceso de secado, la muestra estuvo lista para el proceso de molienda en el molino de bolas.

4.3.3 Oxidación con catalizador TEMPO

Finalmente, para la oxidación con el catalizador TEMPO, se siguió el siguiente protocolo [23]. Se añadieron 2 gramos de celulosa en 150 mL de agua destilada. En la mezcla anterior, se disolvieron 0,025 g del reactivo TEMPO y 0,25 g de bromuro de sodio, tomando la disolución un tono amarillo. La reacción se inició tras la adición de NaClO al 9% (v/v) (2,51 mL de NaClO al 14% (v/v) en Cl_2) a la mezcla, a temperatura ambiente y agitación leve. El pH se mantuvo a 10,5 usando NaOH 0,5 M hasta observar que el pH se mantenía estable. La mezcla se neutralizó a pH 7,0 con HCl 0,5 M. La pulpa oxidada resultante se filtró y se lavó varias veces con agua destilada para eliminar cualquier resto de los reactivos añadidos. Finalmente, se secó la muestra a 25°C durante 24 h.

4.4 Caracterización de las muestras

Para analizar la estructura y la morfología de las nanofibras obtenidas, se utilizaron dos métodos de microscopía distintos, la microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy, TEM).

4.4.1 SEM

El SEM nos proporciona imágenes de gran calidad de la superficie de una muestra. Para ello, hace un barrido de ésta con un haz de electrones y luego mide las partículas reemitidas por dicha superficie. En nuestro caso, se utilizó el microscopio de barrido electrónico InspectF50A, que, trabajando con fuerte vacío, permitió observar con buena resolución (hasta una ampliación de x50000) las muestras de celulosa obtenidas tras la molienda.

Para la preparación de las muestras para el SEM, los protocolos a seguir dependieron del tipo de muestra. En el caso de muestras sólidas, estas se depositaron directamente sobre un soporte metálico recubierto con cinta adhesiva de carbono de doble cara. En el caso de las muestras en suspensión, después de hacer una dilución apropiada de dicha muestra, se depositó una gota de la dilución sobre un portaobjetos de 1cm de diámetro. A continuación, se dejó secar la muestra, y el portaobjetos se colocó en el soporte recubierto con cinta adhesiva de carbono. Finalmente, los soportes así preparados se sometieron a un recubrimiento con platino.

4.4.2 TEM

El TEM utiliza un haz de electrones para visualizar muestras muy finas, analizando los electrones que atraviesan dicha muestra. Nos permite obtener imágenes de gran definición y con una ampliación de hasta un millón de veces la muestra original. En este trabajo se utilizó el equipo Tecnai T20 de ThermoFisher, que nos permitió trabajar con voltajes de hasta 200 kV y alcanzar resoluciones de hasta unas décimas de nanómetro.

Para su visualización por TEM, las suspensiones de nanofibras obtenidas tras la molienda se diluyeron en agua (de 1:20 a 1:60), y se añadieron a una rejilla con recubrimiento de carbono. A continuación, se añadió una gota de acetato de uranilo al 2% (p/v), como contraste negativo para la observación microscópica. A continuación, se dejó secar la muestra a temperatura ambiente y se procedió a su análisis.

4.4.3 Estudio de la resistencia a la ruptura por punción de los films reforzados con NFCs

La resistencia a fuerzas externas de los films se estudió utilizando un texturómetro de alimentos TA.XT2i Texture Analyser, de Stable Micro Systems, con el software Texture Expert, y usando la sonda de punción TA-8 (1/4'' con punta esférica) (Figura 5).



Figura 5: Texturómetro TA.XT2i (A) y sonda de punción TA-8 (B).

4.5 Determinación del peso seco de las muestras de NFCs

El peso seco de varias de las suspensiones de NFCs obtenidas tras el proceso de molienda y lavado se determinó por un método de pesada. Concretamente tres alícuotas de las suspensiones obtenidas en los experimentos 23 (sin pretratamiento, 400 rpm, bolas 3 mm, 3 h), 25 (oxidación con TEMPO, 300 rpm, bolas de 3 mm, 3 h) y 26 (oxidación con TEMPO, 400 rpm, bolas de 3 mm, 3 h) se pesaron antes y después de secarlas totalmente. Para ello, se añadieron 200 microlitros de las diferentes muestras, en microtubos de 1,5 mL y se procedió a su pesada. Se mantuvieron 4 de estos microtubos vacíos como control para evaluar la pérdida de agua del plástico. Los microtubos se pusieron a secar a 80 °C durante 24 horas y después se dejaron en un desecador hasta la obtención de peso constante. De esta forma, se determinó el peso seco de las muestras de NFCs en suspensión.

4.6 Preparación de los films con NFCs por “casting”

Para comprobar las propiedades estructurales de los materiales formados o reforzados con las muestras de NFCs sintetizadas, se prepararon films con las suspensiones obtenidas tras la molienda. En concreto, se prepararon films utilizando únicamente las suspensiones de NFCs y films usando las NFCs sintetizadas como aditivo en films de carboximetil celulosa (CMC).

4.6.1 Films de NFCs

Para la preparación de los films exclusivamente hechos con NFCs, se han depositado en placas Petri de 90 mm, 30 mL de las suspensiones resultantes de los experimentos 23 (sin pretratamiento, 400 rpm, bolas 3 mm, 3 h), 24 (sin pretratamiento, 500 rpm, bolas de 3 mm, 3 h) y 25 (oxidación con TEMPO, 300 rpm, bolas de 3 mm, 3 h). Las suspensiones se secaron a 50 °C hasta la obtención de un film.

4.6.2 Films de NFCs con CMC

Por otro lado, se prepararon films de carboximetil celulosa reforzados con nanofibras de celulosa. Para ello, se utilizó una disolución de CMC al 3% (p/v) en agua y distintas proporciones de NFCs (p NFCs/p CMC). De dicha disolución, se utilizó el volumen necesario para tener los 20 mL de mezcla con un contenido final de CMC del 2%. Por último, se añadieron la muestra y agua destilada hasta obtener 4 placas de cada cantidad (1%, 5% y 10% en peso respecto a la CMC) con un volumen final de 20 mL. Además, se prepararon 3 placas de films sin NFCs, sólo con CMC.

Una vez tuvimos las placas listas, las dejamos secar durante 72 horas a 30°C y 12 horas a 50°C hasta la obtención de los films.

• 5. Resultados y discusión

5.1 Optimización de la molienda en molino de bolas planetario

Como se ha comentado anteriormente, el proceso de molienda tiene muchos parámetros ajustables que influyen en el resultado de la molienda. A continuación, se exponen los parámetros que han sido optimizados y los resultados obtenidos, de forma que se pudieran seleccionar los parámetros más adecuados para la obtención de mayor calidad y cantidad de NFCs.

5.1.1 Tipo de molienda: seca y húmeda

Lo primero que se determinó era si la molienda se realizaba en seco o en húmedo (en suspensión coloidal), es decir, añadiendo una cantidad determinada de agua destilada. Cuando se realizó la molienda en seco, se obtuvo un polvo poco homogéneo con trozos poco triturados (Figura 6 A y B). Por otro lado, la adición de agua durante la molienda, resultó en la obtención de un material más homogéneo y mejor triturado (Figura 6 C), como se puede observar en el análisis macroscópico. Esto se debe al hecho de que las fibras de celulosa se hinchan con el agua y los enlaces de hidrógeno entre ellas se debilitan, lo que ayuda a su separación y a la obtención de NFCs [21]. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se ha elegido la molienda húmeda en detrimento de la molienda seca. El siguiente paso del estudio ha sido la optimización de los parámetros de la molienda húmeda, así como la adición o no de un paso de pretratamiento antes de la molienda.

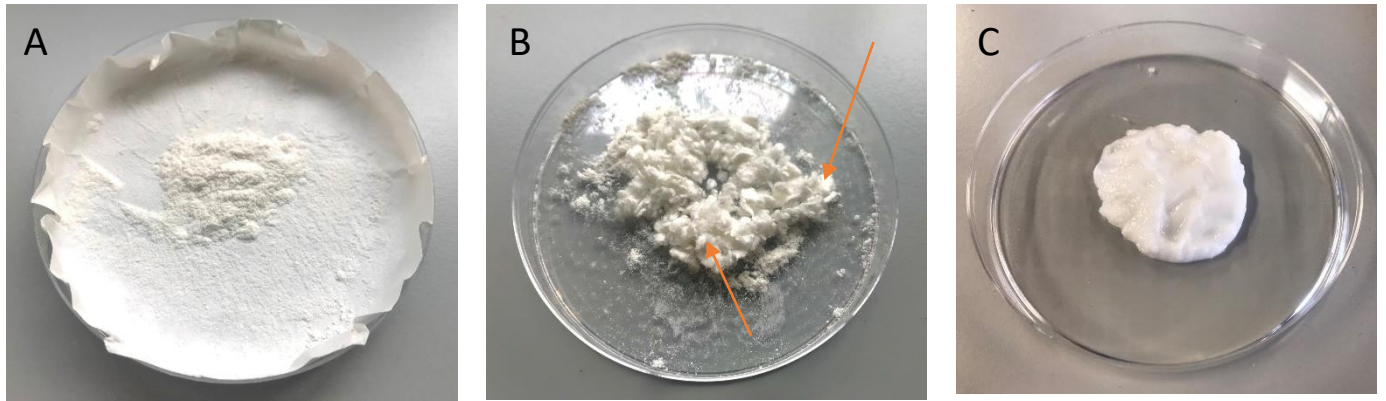
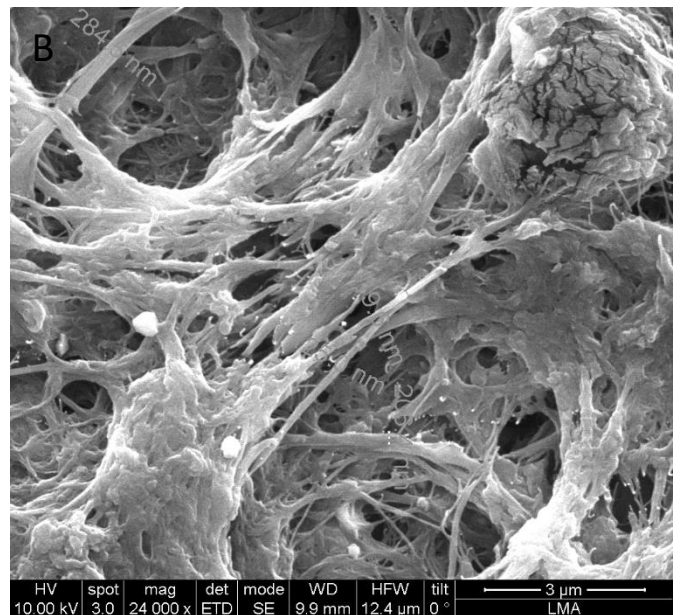
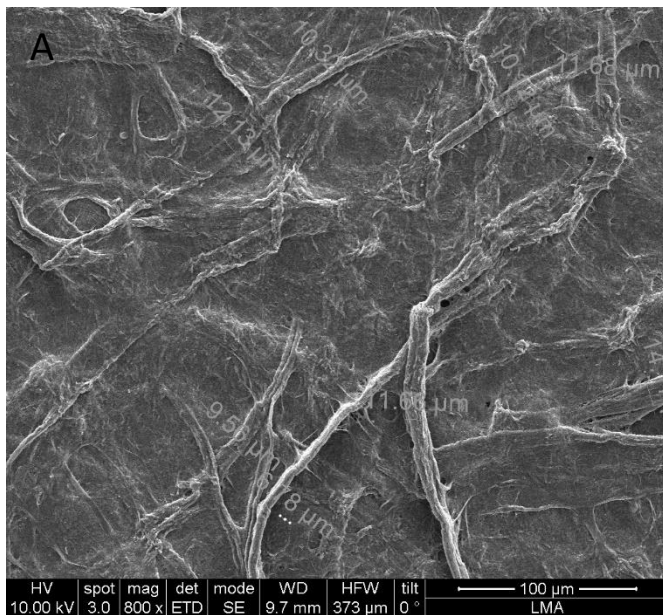


Figura 6: Resultados de las moliendas en seco de los experimentos 2 (A) y 3 (B); y de la molienda húmeda del experimento 5 (C). Las flechas señalan las zonas menos trituradas.

5.1.2 Tamaño de bolas

El siguiente paso era determinar que tamaño de bolas era el más adecuado para la molienda húmeda. Con las bolas grandes, macroscópicamente no se obtuvo un material homogéneo y bien molido, ya que se observaron muchos agregados sin triturar. Al observar las muestras en el SEM, se observó que las fibras obtenidas eran demasiado grandes (1-10 micrómetros) (Figura 7 A y C). Sin embargo, las muestras molidas con bolas de 3 mm resultaron en fibras de menor tamaño (100-300 nanómetros) (Figura 7 B y D).



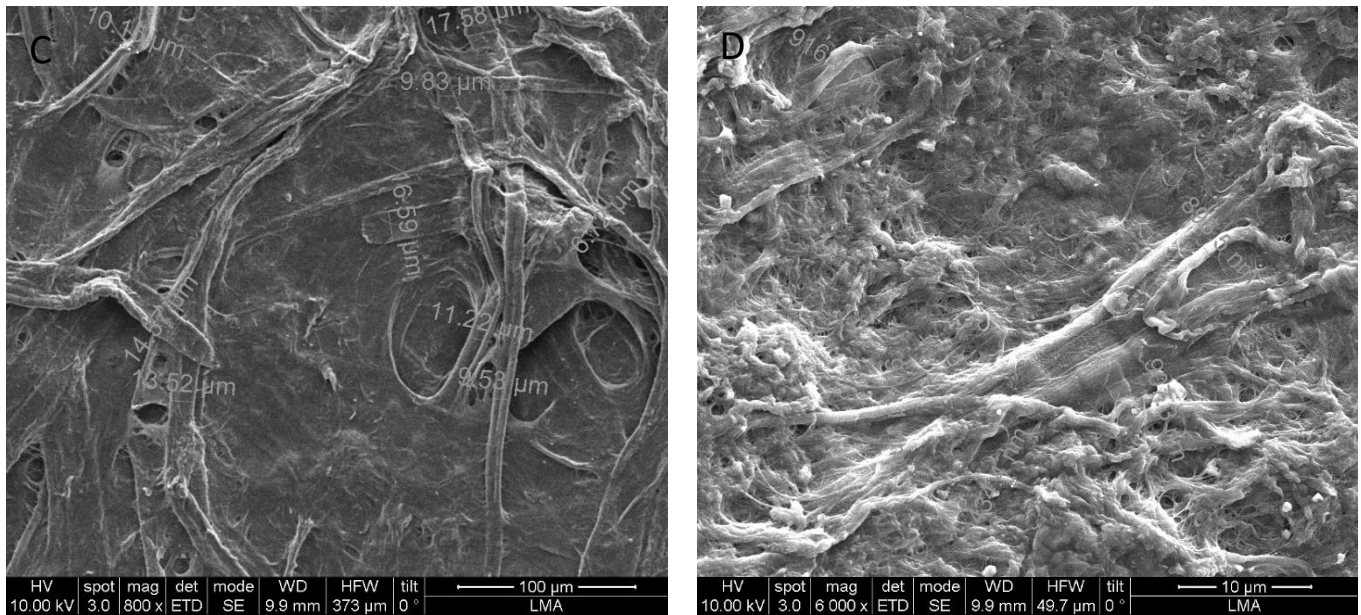


Figura 7: Molienda con bolas de 10 mm, 3 h (A), molienda con bolas de 3 mm, 3 h (B), molienda con bolas de 10 mm, 2 h (C), molienda con bolas de 3 mm, 2 h (D).

Se pudo observar que las fibras del experimento con bolas de 3 mm son más finas y están mejor separadas entre ellas que en el experimento que utilizaba las bolas de 10 mm. Esto se debe a que cuanto mayores son las bolas, mayor energía de impacto producen, pero hay un número muy inferior de colisiones, que es lo que necesitamos para separar mejor las fibras de celulosa y así obtener mayor cantidad de NFCs. Por lo tanto, se decidió continuar la optimización utilizando las bolas de 3 mm de diámetro. Estos resultados coinciden con los de otros estudios, donde utilizan tamaños de bolas incluso más pequeños (0,3 a 1 mm) para obtener fibras más finas [21, 24]. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, si se reduce mucho el tamaño de las bolas, la cantidad de nanofibras producida es muy bajo; y si se aumenta el tamaño, las bolas pueden tener la energía cinética suficiente para romper las fibras a escala nanométrica más eficientemente que las bolas más pequeñas pero, por otro lado, aumenta la probabilidad de dañar las fibras [21].

5.1.3 Relación muestra:bolas

Una vez seleccionado el tamaño de bolas, se estudió cuál era la relación en masa entre bolas y muestra más adecuada para el proceso de molienda. Se ha probado con relaciones de muestra:bolas de 1:60, 1:70, 1:80 y 1:140. Macroscópicamente se observó que la relación que nos daba una muestra más homogénea y una mejor molienda, era la proporción 1:70. Era importante evaluar cual era la mejor relación muestra:bolas ya que hay que mantener un equilibrio entre las cantidades de bolas y muestra para que la molienda sea más eficiente. Si hay demasiadas bolas habrá demasiadas colisiones entre bolas y se perderá energía mecánica; sin embargo, si hay demasiada muestra, las bolas

no podrán aportar las colisiones suficientes y la molienda no será lo efectiva que debería [21]. Por lo tanto, se pasó a mantener esa proporción para los siguientes experimentos.

5.1.4 Tiempo de molienda

A la hora de evaluar la influencia del tiempo de molienda en la producción de NFCs, se han realizado moliendas a la misma velocidad de rotación, pero a distintos tiempos; 2, 3 y 4 horas. De acuerdo con las imágenes obtenidas por SEM (Figura 8), se observó que 2 horas de molienda no eran suficientes, ya que todavía quedaba material sin triturar (Figura 8 A). En el caso de 3 horas, se observaron diámetros de fibras más pequeños, pero también la aparición de algunas partículas pequeñas que podrían ser celulosa triturada (Figura 8 B). Puesto que las muestras tratadas durante 3 h ya mostraban signos de rotura, las tratadas durante 4 h se descartaron y no fueron analizadas por SEM.

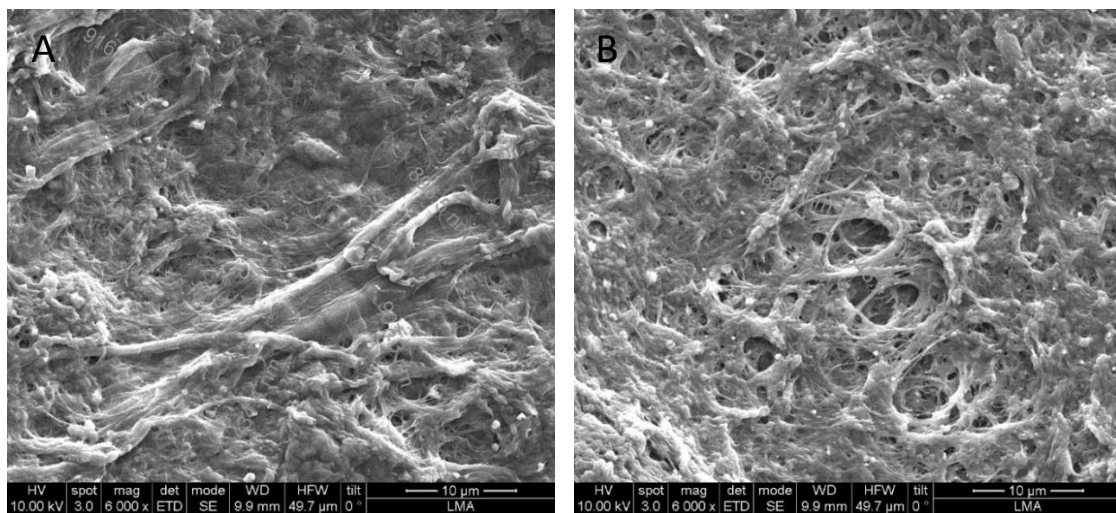


Figura 8: Fotografía del SEM de la molienda en 2 horas (A) y fotografía del SEM de la molienda con 3 horas (B).

Por lo tanto, se decidió que el tiempo de molienda que conllevaba a la obtención de NFCs de menor tamaño y más separadas eran las 3 horas. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los resultados de otros autores que han demostrado que demasiado tiempo de molienda provoca daños en la muestra, triturándola demasiado, y poco tiempo nos lleva a una trituración insuficiente [21, 24].

5.1.5 Velocidad de molienda

Otro de los parámetros que se estudió, fue la velocidad de molienda. En concreto se probaron moliendas húmedas a 300 revoluciones por minuto (rpm), 400 rpm y 500 rpm. 300 rpm había sido la velocidad que habíamos estado usando hasta este punto, por lo que se ha observado su efecto en la molienda en los pasados experimentos. Cuando aumentamos la velocidad del proceso de molienda, aumentamos el número de colisiones en un mismo tiempo, provocando una mayor ruptura de fibras. Las fibras pasaron a triturarse demasiado con 500 rpm, no se aprecian fibras de más de un par de

micras de largo (Figura 9 C). Las moliendas a las velocidades de 300 rpm y 400 rpm nos dieron resultados similares, con buena homogeneidad y tamaño de fibras (anchuras de 200 a 500 nm y larguras de varias micras) (Figura 9 A). Esto nos llevó a descartar velocidades superiores a 400 rpm.

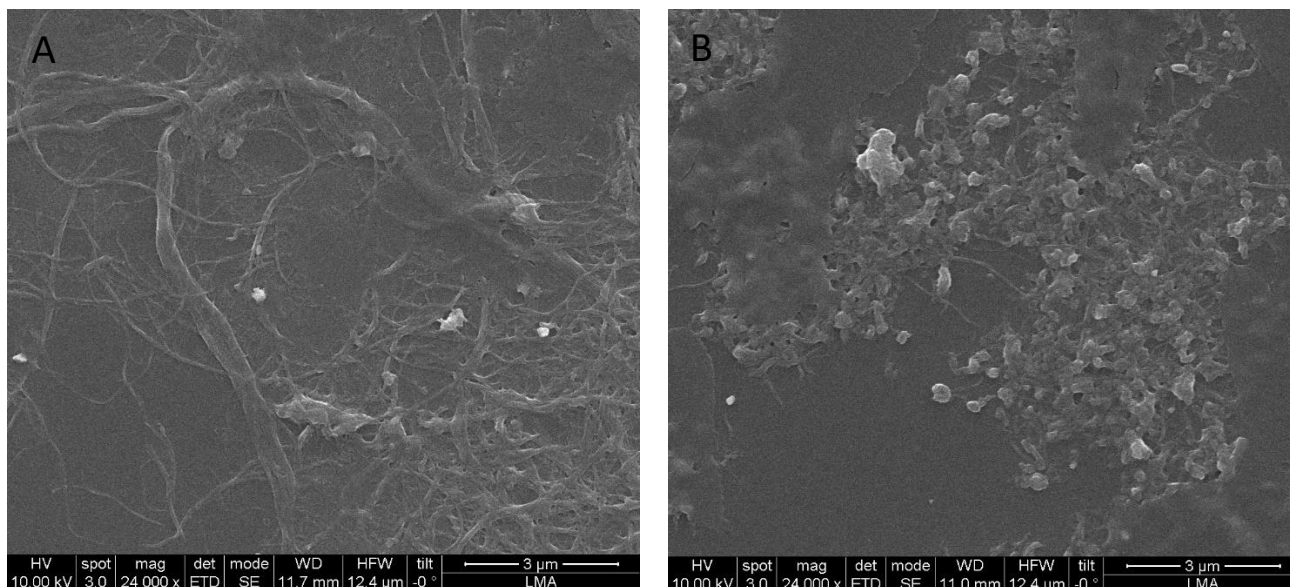


Figura 9: Fotografía del SEM de la molienda a 400 rpm (A) y fotografía del SEM de la molienda a 500 rpm (B).

Para mantener la molienda en las condiciones más suaves posibles y dado que se obtuvieron resultados muy similares a 300 rpm y a 400 rpm, se decidió mantener 300 rpm como la velocidad más adecuada para las moliendas, de forma a tener un proceso con menor consumo de energía.

5.2 Pretratamiento de la pasta de papel

Como ya hemos visto, se sometieron las muestras a tres tratamientos diferentes, hidrólisis alcalina con Na_2CO_3 , hidrólisis ácida con H_2SO_4 , y oxidación con el catalizador TEMPO.

5.2.1 Pretratamientos ácido y alcalino

Ambos pretratamientos fueron seguidos del mismo proceso de molienda, con bolas de 3 mm, a 300 rpm y durante 2 horas. En este caso se ha reducido el tiempo de molienda a 2 horas, partiendo de la hipótesis de que el pretratamiento ayuda a la separación de las fibras de celulosa y que los resultados obtenidos anteriormente se pudieran obtener con menor consumo de energía. Las imágenes obtenidas por SEM indicaron que las muestras con pretratamiento ácido mostraban una baja homogeneidad, con fibras de diámetro nanométrico, entre los 30 y los 120 nm de espesor (Figura 10 A). Esto indicaba que el pretratamiento ácido ayudó a la separación de las fibras, pero no era suficiente, se buscaba menor diámetro y mayor homogeneidad. Con el tratamiento básico pasó

algo similar, se obtuvo una homogeneidad algo mejor que con el tratamiento ácido, y un tamaño de fibras similar (40 a 100 nm) (Figura 10 B), pero seguía sin ser suficiente, dado que las NFCs deberían de tener un diámetro mucho más reducido (1 a 20 nanómetros), manteniendo la largura y una buena homogeneidad.

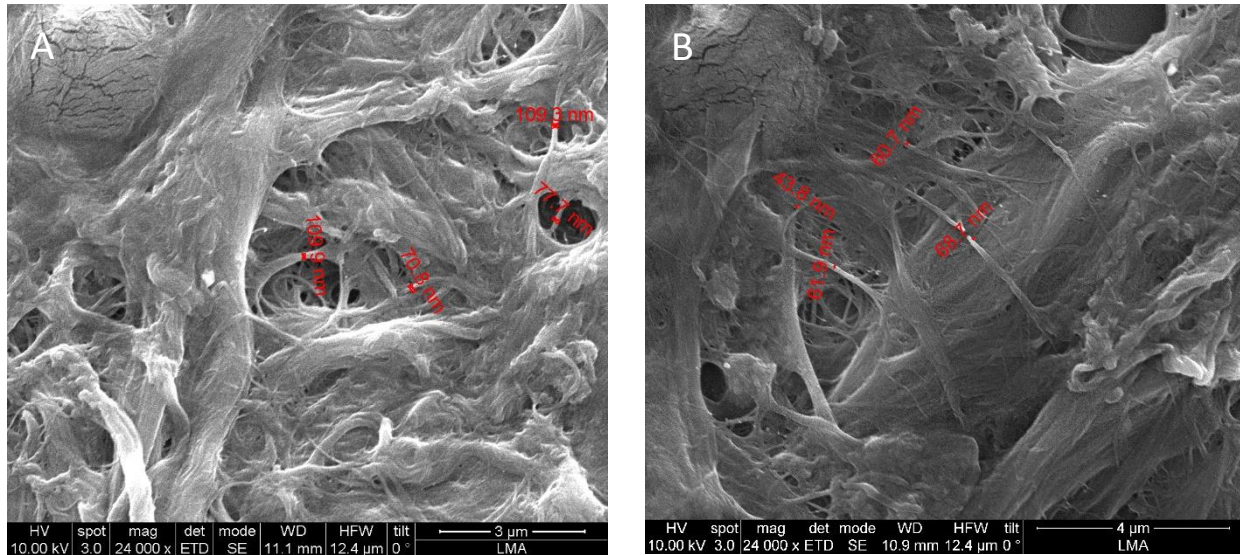


Figura 10: Hidrólisis ácida (A) e hidrólisis alcalina (B).

5.2.2 Oxidación con catalizador TEMPO

Tras la oxidación con TEMPO, molienda a 300 rpm, con bolas de 3 mm, durante 3 horas, y haber aplicado posteriormente sonicación durante 2 horas, se obtuvo una muestra de aspecto diferente al obtenido con el resto de tratamientos. Como se puede ver en la figura 11, se obtuvo un hidrogel blanco y translúcido, que es ligeramente más opaco de lo descrito en la literatura [15, 23].

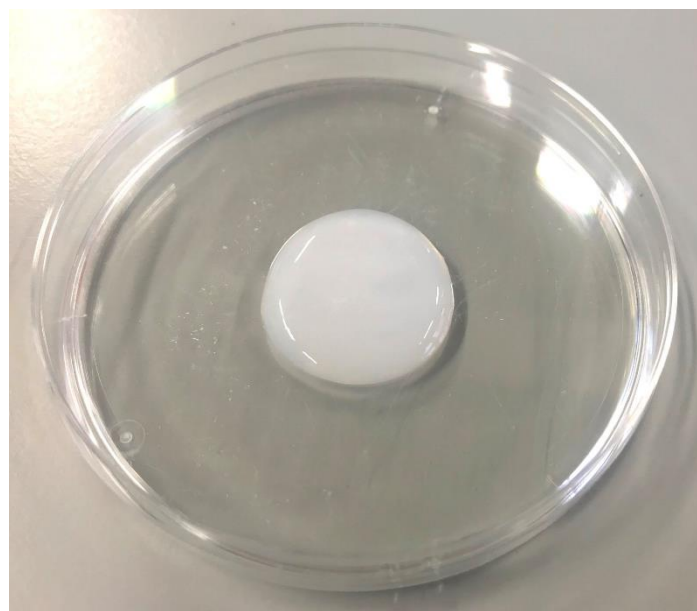


Figura 11: Muestra final de la molienda con oxidación previa mediante TEMPO.

En la figura 12 vemos el análisis por SEM de esta muestra.

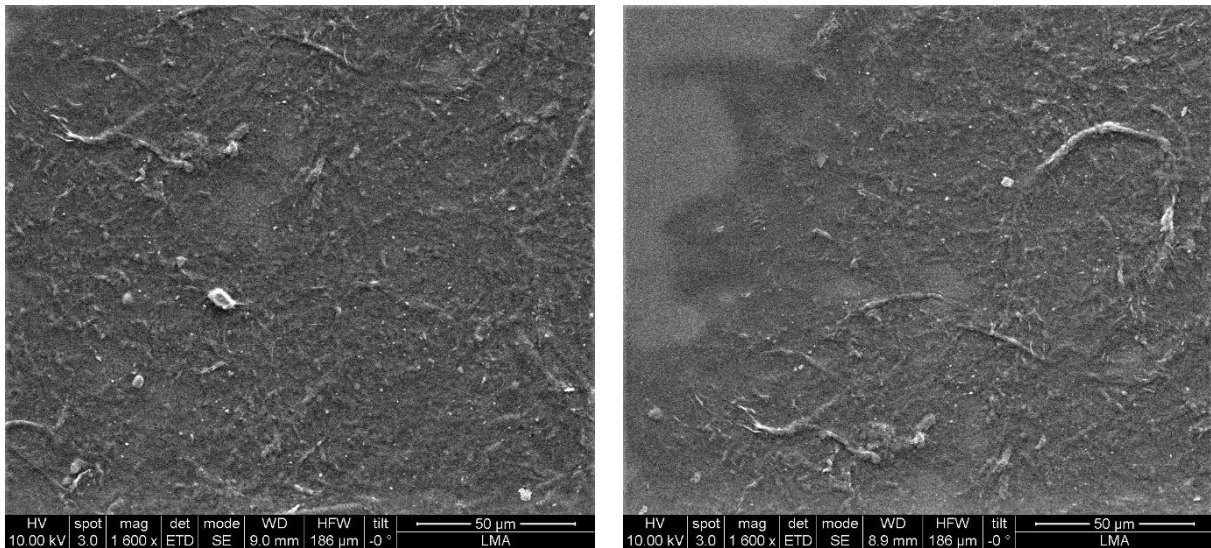


Figura 12: Fotografías del SEM de diferentes regiones del experimento 25.

Para mejorar la observación de las NFCs por SEM, las muestras de la suspensión del experimento con TEMPO se diluyeron a 1:20 y 1:30. En este caso, se apreciaron mejor las fibras, viéndose tamaños desde 30 a 150 nm, pero no fue posible la observación de fibras individualizadas (Figura 13).

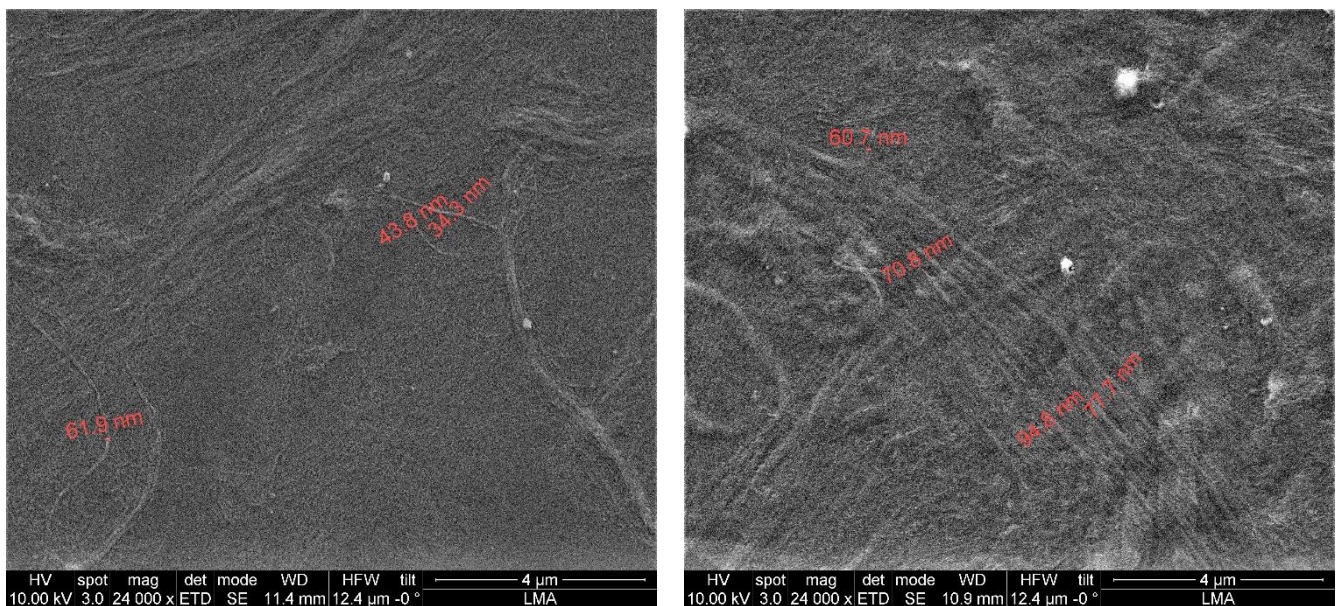


Figura 13: Fotografías del SEM de diferentes regiones del experimento 25.

De forma a obtener una mejor visualización de esas muestras, se realizó una coloración negativa y las muestras se observaron por TEM. Como se puede apreciar en la figura 14, las imágenes obtenidas por TEM permitieron visualizar mejor la distribución de las fibras. Los tamaños de fibra son algo inferiores a las muestras anteriores no tratadas con

la oxidación con TEMPO, teniendo anchuras de unos pocos nanómetros (de 1 a 20 nanómetros) y manteniendo una largura apropiada (Figura 14). Por otro lado, se observó una distribución de fibras poco homogénea en tamaño, y la formación de redes de nanofibras. Estos resultados indicaron que el tratamiento previo con el catalizador TEMPO mejoró el proceso de obtención de las nanofibras. Si comparamos nuestras imágenes del TEM con las obtenidas por otros autores en el estudio de la producción de NFCs con pretratamiento por TEMPO pero usando el homogeneizador para la producción de NFCs, se vio que obtenemos unos tamaños de fibra bastante similares con una homogeneidad inferior [25].

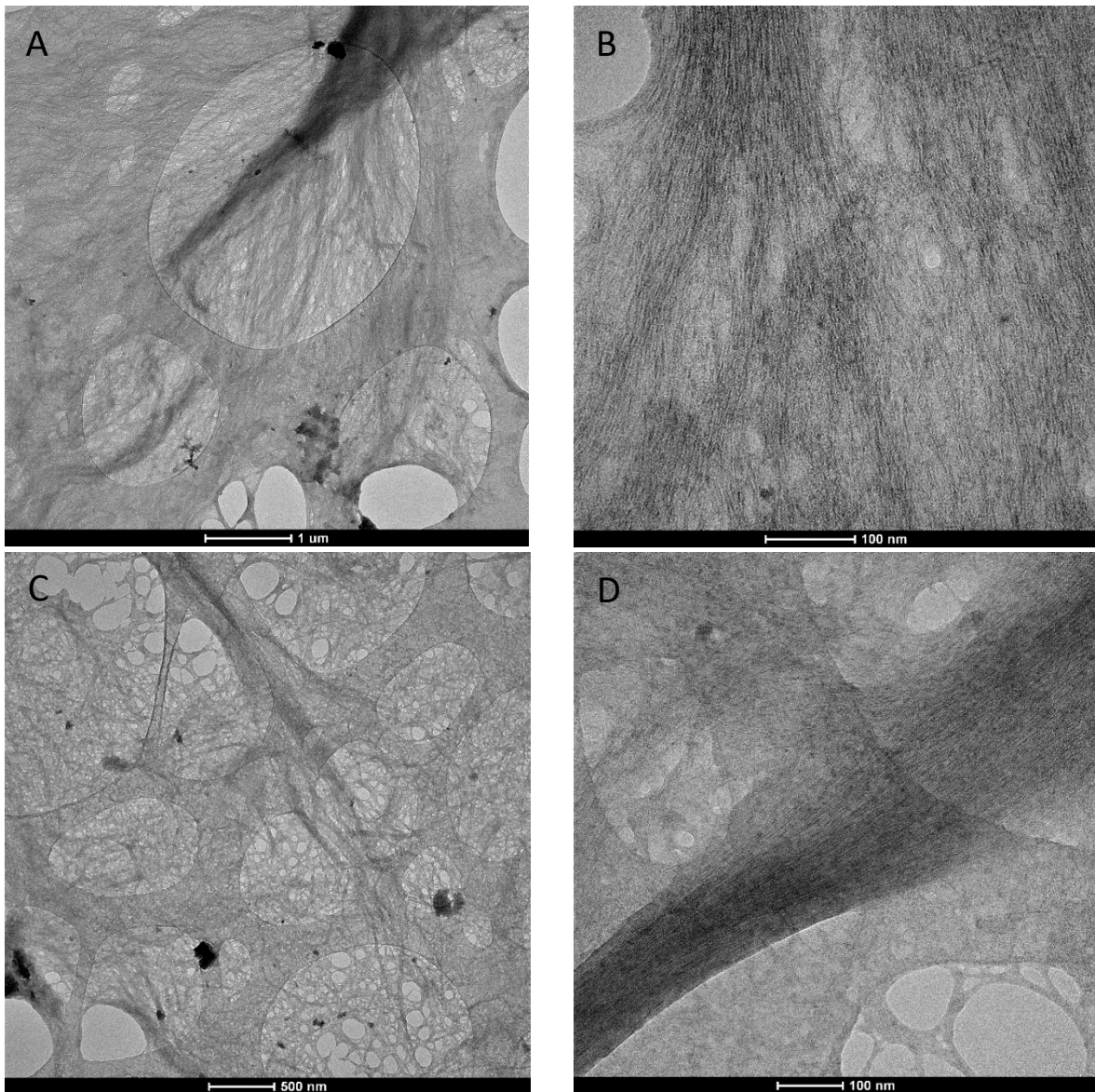


Figura 14: Fotografías del TEM del experimento 25 (A y B) y fotografías del TEM del experimento 26 (C y D).

5.3 Preparación de los films con NFCs por "casting"

Teniendo en cuenta la posible incorporación de las NFCs sintetizadas a través de molino de bolas planetario, se realizaron unos estudios preliminares sobre la capacidad de formación de films de algunas de las muestras de NFCs resultantes de la molienda (Figura 15). No se pudo comprobar la resistencia a la rotura mecánica de estos films, pero de forma manual se pudo apreciar cierta resistencia para un material tan fino, especialmente los films de los experimentos 23 (bolas 3 mm, 3 h, 400 rpm) y 24 (bolas 3mm, 3 h, 500 rpm), así como una total insolubilidad en agua.

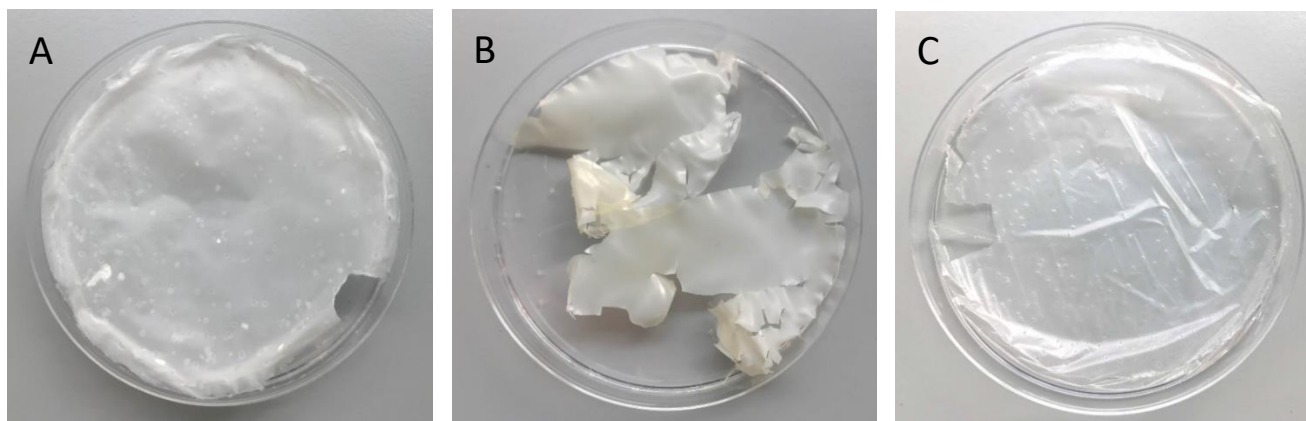


Figura 15: Films de NFCs sintetizadas con molino de bolas planetario.

Como se ha comentado en la introducción, las NFCs pueden utilizarse como aditivo para mejorar las propiedades de otros biomateriales. En este caso, se propuso utilizar las NFCs para reforzar films de CMC, un material de origen natural basado en celulosa, que se está usando para el desarrollo de nuevos envases alimentarios más sostenibles.

Debido a problemas con la homogeneidad de los films realizados con las muestras tratadas con TEMPO (Figura 16 D - F), solo se pudo comprobar en el texturómetro la resistencia a la punción de los films de CMC a los cuales se ha incorporado la muestra de NFCs resultante del experimento realizado a 400 rpm, con bolas de 3 mm durante 3 horas. Los agregados visibles en los films conteniendo NFCs oxidadas con TEMPO pueden resultar de la agregación de las NFCs, debido a su polaridad, durante las etapas de filtración para concentración de la muestra.

A simple vista, parecen unos films algo resistentes, nada elásticos y bastante translúcidos, como se puede observar en la Figura 16. A pesar de todo, tampoco son del todo homogéneos, esto puede deberse a una sonicación insuficiente después de haberse realizado la mezcla o a una aglomeración de las NFCs en el film de CMC.

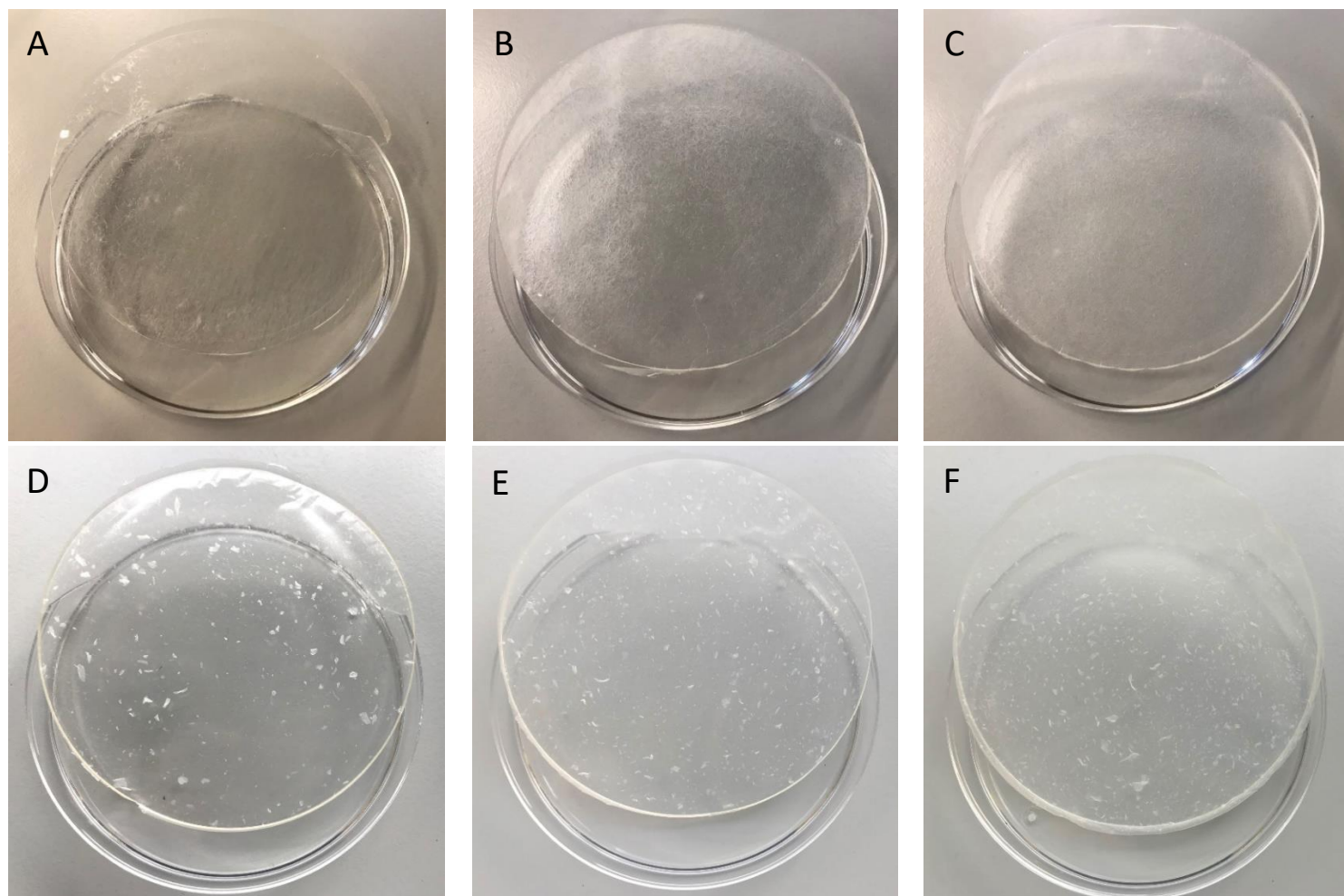


Figura 16: Films de CMC con NFCs de los experimentos 23 (400 rpm, bolas 3 mm, 3 h) (A, B y C) y 26 (400 rpm, bolas 3 mm, 3 h) con concentraciones de NFCs del 1% (A y D), 5% (B y E) y 10% (C y F).

Los resultados obtenidos (Figura 17) indicaron que la adición de nanofibras de celulosa al film de CMC disminuía la resistencia comparada con la de los films de control. Esto no coincide con resultados encontrados por otros autores, en los que la resistencia aumentaba al añadir las NFCs, y se incrementaba al aumentar su concentración [26], por lo que sería necesario seguir investigando la causa. Sin embargo, al subir la concentración de NFCs en la mezcla por encima del 5% en NFCs, la resistencia a la punción aumentó, posiblemente debido a que aumenta la red de nanofibras formada. Los films sólo con CMC (films control) resistieron de media 2451,24 g a la punción de la sonda. Con una concentración del 1% de NFCs en peso de muestra, el peso que resiste el film es de 995,08 g de media, que es similar a la obtenida para los films con 5% de NFCs (993,88 g), al paso que los films con 10% de NFCs soportan una resistencia a la punción más elevada (1324,44 g) (Figura 17).

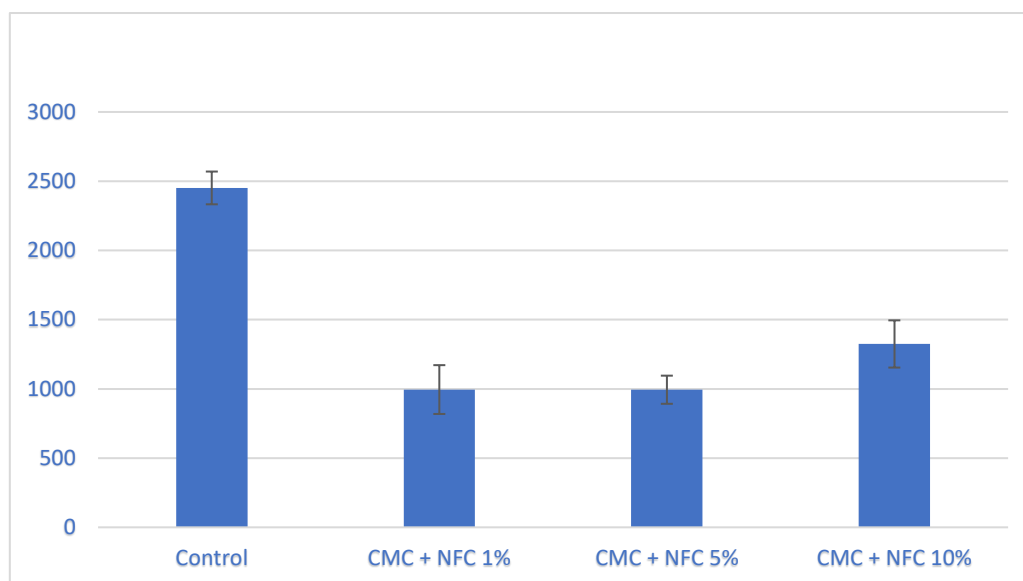


Figura 17: Gráfica de la resistencia a la punción soportada por los films frente a sus porcentajes en NFCs.

• 6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo, indican que el molino de bolas planetario puede utilizarse como tratamiento mecánico para obtener nanofibras de celulosa con un tamaño de entre 1 a 20 nanómetros. Los experimentos realizados, permitieron optimizar el método de obtención de las NFCs estableciendo las siguientes condiciones como las apropiadas: molienda húmeda, bolas de 3 mm en una proporción en peso de 70:1 respecto a la muestra, manteniendo la molienda durante 3 horas a una velocidad de 300 revoluciones por minuto. También se comprobó que el tratamiento previo que ha permitido la obtención de mejores resultados ha sido la oxidación mediante el catalizador TEMPO. Este pretratamiento tiene como ventaja que no se generan residuos tóxicos y reduce el consumo energético de la molienda, mejorando la sostenibilidad del proceso. Sin embargo, todavía se debe mejorar el proceso para optimizar la homogeneidad del tamaño de las fibras.

Otro interesante resultado que se obtuvo es que las nanofibras generadas pueden modificar la resistencia de los films de CMC, y aunque a pesar de que su adición disminuye la resistencia inicial, al aumentar la concentración en NFCs por encima del 5%, aumenta dicha resistencia.

• 7. Referencias

1. Wang, G., et al., *Developing cellulosic functional materials from multi-scale strategy and applications in flexible bioelectronic devices*. Carbohydr Polymers, 2022. **283**: p. 119160.
2. Novaes, E., et al., *Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees*. Plant Physiology, 2010. **154**(2): p. 555-61.
3. Zuppolini, S., et al., *Cellulose Amphiphilic Materials: Chemistry, Process and Applications*. Pharmaceutics, 2022. **14**(2).
4. Zhang, J., et al., *Research Progress on Chemical Modification and Application of Cellulose: A Review*. Materials Science, 2022. **28**(1): p. 60-67.
5. Delgado-Aguilar, M.G., Israel; Tarrés, Quim; Alcalá, Manel; Pèlach, M. Àngels; Mutjé, Pere, *Approaching a Low-cost Production of Cellulose Nanofibers for Papermaking Applications*. BioResources, 2015. 10(3).
6. Bao, Y., et al., *Functionalization and Antibacterial Applications of Cellulose-Based Composite Hydrogels*. Polymers (Basel), 2022. **14**(4).
7. Zhan, C.D.H.L.B.L.M.L.H., *Characteristics and Properties of Cellulose Nanofibers Prepared by TEMPO Oxidation of Corn Husk*. BioResources, 2016. 11(3).
8. Serra, A., et al., *Reducing the Amount of Catalyst in TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibers: Effect on Properties and Cost*. Polymers (Basel), 2017. **9**(11).
9. Mittal, N., et al., *Multiscale Control of Nanocellulose Assembly: Transferring Remarkable Nanoscale Fibril Mechanics to Macroscale Fibers*. ACS Nano, 2018. **12**(7): p. 6378-6388.
10. Perumal, A.B., et al., *Nanocellulose: Recent trends and applications in the food industry*. Food Hydrocolloids, 2022. **127**.
11. Li, Y., et al., *Preparation and characterization of cellulose nanofibers from partly mercerized cotton by mixed acid hydrolysis*. Cellulose, 2013. **21**(1): p. 301-309.
12. Phanthong, P., et al., *Effect of ball milling on the production of nanocellulose using mild acid hydrolysis method*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016. **60**: p. 617-622.
13. Sharma, R., G. Garnier, and V. Haritos, *A study of different actions of glucanases to modulate microfibrillated cellulose properties*. Cellulose, 2022. **29**(4): p. 2323-2332.
14. Isogai, T.S.Y.N.J.-L.P.M.V.A., *Homogeneous Suspensions of Individualized Microfibrils from TEMPO-Catalyzed Oxidation of Native Cellulose*. American Chemical Society, 2006. **7**(6): p. 5.
15. Isogai, A., et al., *Review: Catalytic oxidation of cellulose with nitroxyl radicals under aqueous conditions*. Progress in Polymer Science, 2018. **86**: p. 122-148.
16. Isogai, A., T. Saito, and H. Fukuzumi, *TEMPO-oxidized cellulose nanofibers*. Nanoscale, 2011. **3**(1): p. 71-85.
17. Moser, C., *Manufacturing and Characterization of Cellulose Nanofibers*. 2019.
18. Piras, C.C., S. Fernández-Prieto, and W.M. De Borggraeve, *Ball milling: a green technology for the preparation and functionalisation of nanocellulose derivatives*. Nanoscale Advances, 2019. **1**(3): p. 937-947.
19. Zhao, F., et al., *Effects of High-Intensity Ultrasound Pretreatment on Structure, Properties, and Enzymolysis of Walnut Protein Isolate*. Molecules, 2021. **27**(1).
20. iesmat. https://iesmat.com/catalogos/WC_MICROFIN/microfluidizer/. 2022.
21. Zhang, L., T. Tsuzuki, and X. Wang, *Preparation of cellulose nanofiber from softwood pulp by ball milling*. Cellulose, 2015. **22**(3): p. 1729-1741.
22. Zhang, L., et al., *Multiple Factor Analysis on Preparation of Cellulose Nanofiber by Ball Milling from Softwood Pulp*. BioResources, 2018. **13**(2).

23. Silva, F., et al., *Antimicrobial activity of biocomposite films containing cellulose nanofibrils and ethyl lauroyl arginate*. Journal of Materials Science, 2019. **54**(18): p. 12159-12170.
24. Huang, L., et al., *Mechanical activation and characterization of micronized cellulose particles from pulp fiber*. Industrial Crops and Products, 2019. **141**.
25. Chinga Carrasco, G.S., Kristin, *Cellulose nanofibrils - Production, characterization and applications*. Fine Structure of Papermaking Fibres - The Final Report of COST Action E54, 2011.
26. Oun, A.A. and J.W. Rhim, *Isolation of cellulose nanocrystals from grain straws and their use for the preparation of carboxymethyl cellulose-based nanocomposite films*. Carbohydr Polymers, 2016. **150**: p. 187-200.