

EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE PROCESAMIENTO SOBRE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS Y ESTRUCTURALES DE NANOCELULOSA BACTERIANA LIOFILIZADA.

M. Laura Balquinta ⁽¹⁾, Silvina C. Andrés ⁽¹⁾, Patricia Cerrutti ⁽²⁾, Gabriel Lorenzo ^(1,3), Alicia N. Califano ⁽¹⁾

⁽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

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, 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.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una manta de NCB obtenida como el producto extracelular de *Gluconacetobacter xylinus* utilizando macerado de maíz + glicerol como medio nutriente [1]. 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 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 se ajustaron para alcanzar el 1% de NCB antes de realizar cualquier determinación. Todas las suspensiones obtenidas fueron sometidas a un proceso de liofilización durante 48 h (LA-B4-C, Rificor Argentina) para obtener 4 muestras en polvo diferentes: Cp, CUSp, Tp y TUSp.

Los grupos funcionales presentes en los polvos de NCB obtenidos luego de los diferentes tratamientos fueron determinados por espectroscopía infrarroja 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_{lr}) [2] y el tamaño del cristal (D) mediante las siguientes ecuaciones

$$C_{lr} = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} * 100$$

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

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) [3].

La microestructura y morfología superficial de los polvos de NCB fueron examinadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Complementariamente, las muestras fueron rehidratadas hasta una concentración de 1% NCB (Cr, CUSr, Tr y TUSr) y se compararon sus características reológicas con las suspensiones originales. Se realizaron barridos de esfuerzo y frecuencias para determinar la evolución de los módulos elástico (G') y viscoso (G'').

La estabilidad de las suspensiones fue evaluada mediante medidas de dispersión de luz con un analizador óptico vertical (QuickScan), que permite hacer un barrido de la muestra a lo largo del tubo de medida en diferentes instantes, obteniéndose una serie de perfiles del % de luz refractada (backscattering, % BS) y transmitancia (%T) en función del tiempo. Además, se determinó la distribución de tamaño de partículas (DTP) de las muestras por difracción de luz.

El tamaño de las partículas fue calculado usando el diámetro medio ponderado por volumen $D_{4,3}$.

$$D_{4,3} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i^4 n_i}{\sum_{i=1}^n d_i^3 n_i}$$

donde d_i es el diámetro efectivo de la partícula (μm) y n_i el número de partículas de diámetro d_i (μm). Asimismo, se determinó la polidispersidad del tamaño de partícula (Span). Un intervalo pequeño indica una distribución de tamaño de partícula estrecha; a medida que disminuye el intervalo la polidispersidad disminuye y la distribución tiende a ser uniforme [4]

$$Span = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)}$$

donde $d(0.1)$, $d(0.5)$ y $d(0.9)$ representan 10%, 50% y 90% del volumen total medido de partículas, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros infrarrojos para polvos NCB con diferentes pretratamientos se muestran en la Figura 1a. 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 $\text{CH}_2\text{-OH}$ en la celulosa [5] y grupos OH que

corresponden a los enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares presentes en la celulosa y el agua absorbida [6].

Los picos alrededor de 2900 cm^{-1} se debieron a la vibración de estiramiento C-H y CH_2 tanto en celulosa II como en celulosa amorfa, mientras que los picos ubicados a 1636 cm^{-1} se atribuyeron a grupos OH vibraciones de flexión.

Las únicas diferencias notables entre los pretratamientos fueron los picos a 1560 cm^{-1} y 1636 cm^{-1} , presentes en Cp y CUSp y ausentes en las muestras tratadas con ácido (Tp y TUSp). Los picos en el rango de $1500\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$ generalmente se asocian a proteínas [5]. 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 Tp y TUSp 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, el pico observado a 1636 cm^{-1} ha sido atribuido por varios autores al agua adsorbida. Cabe destacar que cuanto más débil es esta banda, mayor es la cristalinidad de la muestra.

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 1b). Los resultados obtenidos para el tamaño de cristal D de las diferentes muestras no presentaron diferencias significativas, determinándose un tamaño promedio de $5,87\text{ nm}$ ($\pm 0,12\text{ nm}$). Contrariamente, el índice de cristalinidad mostró una marcada diferencia entre el control (Cp y CUSp) con un valor promedio de 71% ($\pm 5,7\%$) y las muestras hidrolizadas (Tp y TUSp) 89% ($\pm 6,1\%$). Este aumento de la cristalinidad en muestras hidrolizadas concuerda con las diferencias encontradas en los espectros FTIR. Además, los patrones Tp y TUSp exhibieron dos picos adicionales alrededor de $27,5^\circ$ y 32° , los cuales podrían atribuirse a los planos 111 y 200 del cristal de NaCl presentes en la muestra después de la neutralización.

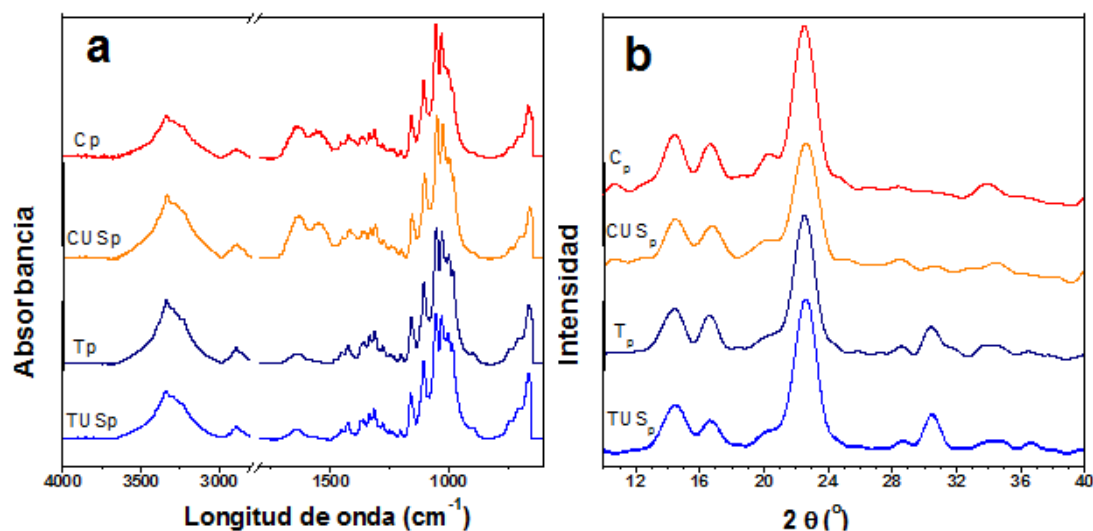


Figura 1. a) Espectros FTIR-ATR y b) difractogramas de rayos X obtenidos para los diferentes polvos de NCB.

Se compararon las propiedades reológicas de las suspensiones originales y las obtenidas por rehidratación de los polvos. En la Figura 2a se observa que todas las suspensiones mostraron cualitativamente el mismo comportamiento reológico; el módulo de almacenamiento (G') siempre fue mayor que el módulo de pérdida (G'') dentro del LVR, lo que indica que dicho comportamiento está dominado por características elásticas. Esto refleja un comportamiento típico de sistemas tipo "gel fuerte" con valores $G' \gg G''$, G' independientes de la frecuencia de oscilación, y un mínimo en el módulo viscoso G'' . En sistemas poliméricos, la presencia de una región

de "plateau" para G' o de un mínimo en G'' se atribuye a la formación de una estructura tridimensional similar a un gel causada por enlaces físicos entre las cadenas de polímeros. En el caso de las suspensiones previas al proceso de liofilización, las características elásticas aumentaron cuando se aplicó el tratamiento ácido (T) lo cual fue aún más notorio cuando además se sonicaron (TUS).

En el caso de las muestras rehidratadas, se detectó una disminución en ambos módulos, independientemente del tratamiento previo aplicado y en contraste con lo observado para las soluciones originales, en este caso la hidrólisis y aplicación de ultrasonido disminuyeron las características elásticas.

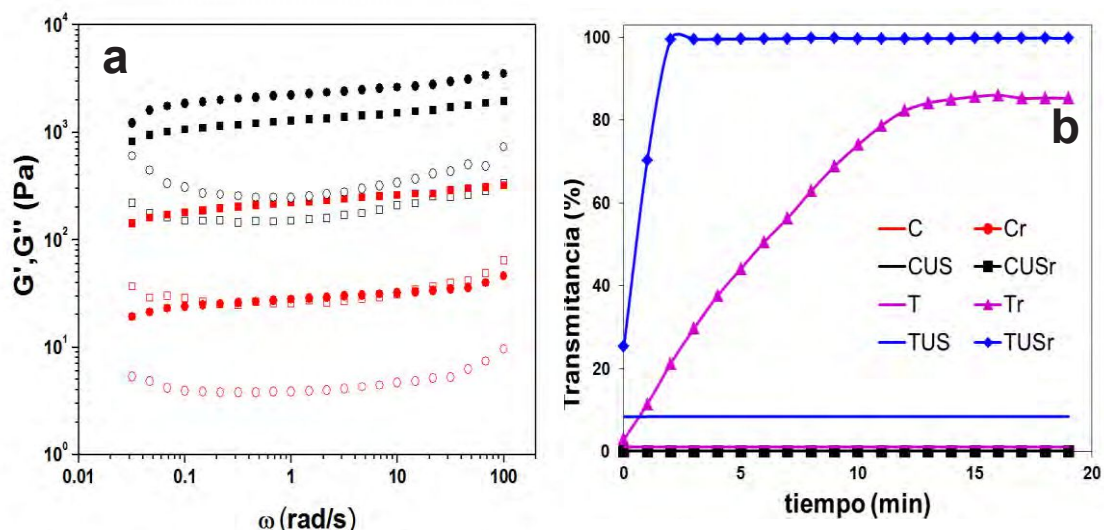


Figura 2. a) Barrido de frecuencia de las suspensiones de NCB antes del proceso de liofilización (símbolos negros) y después de la rehidratación (símbolos rojos). Símbolos llenos: G' , símbolos vacíos: G'' . C (■□), Cr (■□), T (●○), Tr (●○). b) Cambios en la luz transmitida por las suspensiones de NCB antes de la liofilización y después de la rehidratación.

Los resultados obtenidos de la estabilidad de las suspensiones se observan en la Figura 2b, que representa los valores medios de transmisión en la parte superior de cada tubo durante el primer período de tiempo de almacenamiento. Todas las muestras se almacenaron durante 15 días y no se observaron cambios significativos antes de la liofilización. Luego de la rehidratación, se observó que las suspensiones hidrolizadas (Tr y TUSr) se desestabilizaron rápidamente, lo cual indica una baja capacidad de rehidratación debido a la resistencia de la estructura compacta a la difusión de agua. Estos resultados pueden relacionarse con la caída abrupta de las características viscoelásticas de sus respectivas suspensiones.

En cuanto a la distribución de tamaño de partículas (DTP) de las suspensiones se observó para todas las muestras de NCB previas al secado una distribución bimodal con dos picos superpuestos. Contrariamente, los polvos rehidratados mostraron diámetros medios mayores con una distribución estrecha, lo cual se refleja en bajos valores de span: $2.4 < \text{span} < 3.5$ y $1.6 < \text{span} < 1.9$, antes y después de la liofilización, respectivamente.

Los resultados obtenidos para los diámetros medios $D_{4,3}$, reportados en la Tabla 1, sugieren que los tratamientos tuvieron un efecto significativo en sus valores.

El efecto principal del ultrasonido fue desplazar la DTP a tamaños más grandes, lo que dio valores de $D_{4,3}$ significativamente mayores ($P < 0.05$). Contrariamente a los resultados esperados, la aplicación de ultrasonido parece conducir a la formación de aglomerados de NCB.

Por otro lado, el tratamiento ácido produjo suspensiones con diámetro medio menor que las suspensiones control, lo cual se detectó principalmente en las muestras previas al secado.

Tabla 1. Diámetro medio ponderado por volumen $D_{4,3}$ y polidispersidad de suspensiones de NCB.

Tratamiento	$D_{4,3}$ (μm)	Span
C	216.12 ^{ab} (0.02)	3.48 ^c (0.09)
CUS	245.61 ^b (10.56)	3.27 ^c (0.1)
T	158.76 ^a (25.20)	3.36 ^c (0.22)
TUS	163.06 ^a (1.37)	2.41 ^b (0.16)
Cr	384.03 ^c (7.49)	1.92 ^{ab} (0.04)
CUSr	401.11 ^{cd} (9.33)	1.81 ^{ab} (0.04)
Tr	394.69 ^{cd} (7.16)	1.82 ^{ab} (0.04)
TUSr	445.11 ^d (1.91)	1.60 ^a (0.01)

Medias con igual letra en la misma columna, no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$). El error estándar se presenta entre paréntesis.

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 (Cp y CUSp) y las hidrolizadas (T y TUSp). 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 permitió 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.

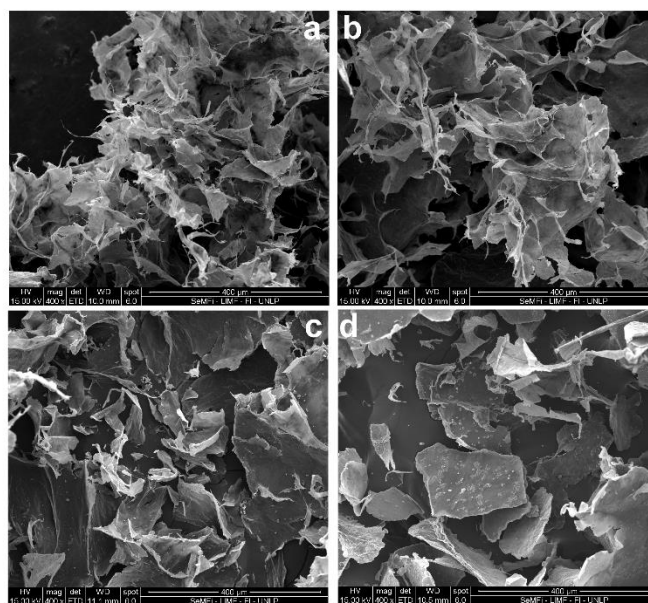


Figura 3. Imágenes obtenidas por SEM de los polvos de NCB después de los diferentes tratamientos. a) C_p, b) CUS_p, c) T_p, d) TUS_p.

CONCLUSIONES

Con el objetivo de evaluar los cambios mecánicos y estructurales producidos en los polvos de NCB y las suspensiones rehidratadas se aplicaron diferentes tratamientos a la manta de NCB. Desde un punto de vista reológico, la rehidratación condujo a una disminución general en la característica elástica de las suspensiones, manteniéndose las fuertes características del gel. El tratamiento con HCl condujo a un aumento en la cristalinidad de los polvos, que se observó en los patrones de difracción de rayos X, el espectro FTIR y la microscopía de barrido electrónico. La estructura más cristalina de las muestras hidrolizadas dificultó la migración del agua a la estructura porosa, lo cual también se reflejó en la rápida desestabilización de las muestras rehidratadas. Además, las condiciones de ultrasonido aplicadas produjeron una unión de las fibras de NCB, lo que aumentó el tamaño de partícula promedio y dificultó el acceso del agua a los flóculos.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Kumar, B., Sharma, V., & Pathak, K. (2013). Effect of melt sonocrystallization on pharmacotechnical properties of paracetamol, indomethacin and mefenamic acid characterized by dynamic laser scattering and its impact on solubility. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(5), 687-695.
5. 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.
6. 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.