

Revalorización de residuos celulósicos en la industria textil mediante la obtención enzimática de nanocelulosa

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

MEMORIA PRESENTADA POR:

Teresa Rutschi de Cea

TUTORES/AS:

María Ángeles Bonet Aracil

Lucía Capablanca Francés

Máster Universitario en *Ingeniería Textil*

Autorizo al acceso y difusión del TFM

Convocatoria de defensa: Alcoy, mayo 2022

RESUMEN

La revalorización de residuos es un tema que va ganando importancia cada día, ya que la concienciación sobre el medio ambiente y las leyes más restrictivas respecto a la gestión de residuos van en aumento. Por ello, en este trabajo se intenta realizar la revalorización de tres residuos en concreto, el alga *Poseidonia*, típica de las playas del mediterráneo, la paja de arroz, un residuo generado en la recolección del arroz y algodón reciclado. La revalorización se trata de la conversión de estos residuos en nanocelulosa, la cual también está tomando importancia debido a sus propiedades mecánicas, su biocompatibilidad y sostenibilidad, a través de un método más sostenible, el tratamiento enzimático utilizando celulasa. Además, ese tratamiento se realiza con celulasa suelta e inmovilizada en nanopartículas de hierro, lo cual permite su recuperación y reutilización, mejorando la eficiencia del proceso y reduciendo el alto coste de la enzima. Previamente al tratamiento enzimático se debe realizar un pretratamiento con NaOH y NaClO₂ al alga y a la paja de arroz para mejorar la eficacia de la hidrólisis enzimática, y al algodón únicamente se le realiza un descrudado. Para la caracterización de los materiales resultantes del tratamiento, se realizaron análisis de DLS, FTIR y FESEM. Los ensayos se realizaron sobre los materiales, tras el pretratamiento para determinar si el pretratamiento había sido eficaz, a los materiales tratados con dos concentraciones diferentes de enzima, con el objetivo de determinar si se había obtenido nanocelulosa y de que tamaño, y a las fases de la inmovilización con el fin de determinar si se había realizado correctamente. Los resultados obtenidos del FTIR y el FESEM permiten concluir que los pretratamientos cumplían su función, limpiando y disgregando los materiales, mejorando así la eficacia del tratamiento enzimático. La obtención de la nanocelulosa se consiguió cuando la cantidad de enzima era mayor. Es destacable que se obtuvieron nanopartículas de celulosa cuando la enzima estaba suelta y films de azúcares cuando la enzima estaba inmovilizada y a concentraciones elevadas, es decir, la presencia del hierro actúa como catalizador derivando en degradación excesiva. También se consiguió demostrar que la inmovilización de la enzima era correcta gracias al DLS. Sin embargo, no se consiguió obtener, con el procedimiento empleado rendimientos de nanocelulosa.

PALABRAS CLAVE

Electrohilatura; nanocelulosa; celulosa; celulasa; nanofibra; revalorización.

Alumna Teresa Rutschi de Cea

Alcoy, 05 del 2022

Tutoras María Ángeles Bonet Aracil y Lucía Capablanca Francés

SUMMARY

The reconversion of waste is an issue that is gaining importance every day, since awareness about the environment and the most restrictive laws regarding waste management are increasing. Therefore, this work attempts to revalue three specific wastes, *Poseidonia* algae, typical of Mediterranean beaches, rice straw, a waste generated while rice harvesting, and recycled cotton. Specifically, these residues are going to be converted into nanocellulose, which is also gaining importance due to its mechanical properties, biocompatibility, and sustainability, through a more sustainable method, an enzymatic treatment using cellulase. In addition, this treatment is carried out with cellulase alone and immobilized in iron nanoparticles, which allows its recovery and reuse, improving the efficiency of the process and reducing the high cost of the enzyme. Prior to the enzymatic treatment, a pretreatment with NaOH and NaClO₂ should be carried out on the algae and rice straw to improve the effectiveness of the enzymatic hydrolysis, and cotton is only going to be cleaned. For the treatment resulting materials characterization DLS, FTIR and FESEM analyses were performed. The essays were performed on the pre-treated materials to determine whether the pretreatment had been effective, on the materials treated with two different concentrations of enzyme, with the aim of determining whether nanocellulose had been obtained and its size, and on the immobilization phases in order to determine if it had been carried out correctly. The results obtained from the FTIR and the FESEM allow to conclude that pretreatments fulfilled their function, cleaning and disintegrating the materials, thus improving the efficiency of the enzymatic treatment. The nanocellulose obtention was achieved when the amount of enzyme was greater. It should be noted that cellulose nanoparticles were obtained when the enzyme was alone and sugar films when the enzyme was immobilized and in high concentrations, which means that iron presence acts as a catalyst producing excessive degradation. It was also possible to demonstrate that the immobilization of the enzyme was correct thanks to DLS. However, nanocellulose yields were not achieved with the followed procedure.

KEYWORDS

Electrospinning; nanocelullose; cellulose; cellulase; nanofiber; reconversion.

ÍNDICE

I. Introducción	1
a. Alga posidonia (Posidonia oceanica)	1
b. Paja de arroz.....	1
c. Algodón	2
d. Celulosa y nanocelulosa	3
e. Procesos de obtención	6
i. Métodos mecánicos	6
ii. Método de hidrólisis ácida	6
iii. Método del líquido iónico	6
iv. Método enzimático	7
f. Inmovilización	7
i. Retención física	8
ii. Unión química	8
g. Electrohilatura	9
II. Estado del arte	11
a. Fabricación de nanocelulosa con enzimas.....	11
b. Inmovilización de enzimas	13
c. Utilización de nanocelulosa en electrohilatura	17
III. Objetivos	19
IV. Material y métodos	20
a. Materiales	20
i. Pretratamiento	20
1. Alga y paja de arroz.....	20
2. Algodón.....	20
ii. Tratamiento enzimático.....	20
1. Enzima suelta.....	20
2. Enzima inmovilizada	21
b. Métodos.....	21

i.	Pretratamiento	21
1.	Alga y paja de arroz.....	21
2.	Algodón.....	23
ii.	Tratamiento enzimático.....	24
1.	Enzima suelta.....	25
2.	Enzima inmovilizada	27
iii.	Caracterización de muestras	30
V.	Resultados y discusión de los resultados.....	31
a.	Filtrado de la nanocelulosa	31
b.	DLS	31
i.	Nanopartículas de hierro	32
ii.	Nanopartículas de hierro con quitosano	32
iii.	Nanopartículas de hierro con quitosano y glutaraldehído	33
iv.	Nanopartículas de hierro con la enzima inmovilizada....	34
c.	FESEM	35
i.	Pretratamiento	35
1.	Alga	36
2.	Paja de arroz.....	37
3.	Algodón.....	37
ii.	Fases de la inmovilización de la enzima	38
iii.	Tratamiento enzimático.....	39
1.	Alga	39
41		
2.	Paja de arroz.....	41
3.	Algodón.....	43
45		
4.	Carboximetilcelulosa	45
d.	FTIR	47
i.	Pretratamiento	47
1.	Alga	47
2.	Paja de arroz.....	49

3.	Algodón	51
ii.	Tratamiento enzimático.....	52
1.	Alga	52
2.	Paja de arroz.....	53
3.	Algodón	53
VI.	Conclusiones.....	54
VII.	Acciones futuras	56
VIII.	Bibliografía	57
IX.	Anexos	60
a.	Fotografías de los reactivos puros.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura I: En la imagen A podemos observar la Posidonia en la playa evitando que el oleaje arrastre sedimento. En la imagen B podemos observar la eliminación de las playas de la Posidonia [3].</i>	1
<i>Figura II: En la imagen A podemos observar un cultivo de paja de arroz. En la imagen B observamos la quema de los residuos generados durante la recogida del arroz [4].</i>	2
<i>Figura III: Planta del algodón con las semillas [6].</i>	3
<i>Figura IV: Composición de la celulosa. [11]</i>	4
<i>Figura V: Tipos de nanocelulosa [11].</i>	5
<i>Figura VI: Aplicaciones de la nanocelulosa [9].</i>	5
<i>Figura VII: En la imagen A podemos observar un esquema de homogenización por presión. En la imagen B podemos observar un esquema de la molienda de bolas [11]</i>	6
<i>Figura VIII: Las diferentes enzimas que intervienen en la degradación de la celulosa [9].</i>	7
<i>Figura XIX: Los diferentes métodos de inmovilización [13].</i>	9
<i>Figura X: En la imagen A podemos observar un esquema del electrohilado vertical. En la imagen B podemos observar un esquema del electrohilado horizontal [14].</i>	11
<i>Figura XI: Esquema del mecanismo de preparación de nanocristales de celulosa [15].</i>	12
<i>Figura XII: Esquema del proceso de la producción enzimática de la nanocelulosa [17].</i>	13
<i>Figura XIII: Gráfico del número de publicaciones sobre inmovilización de enzimas del 1991 hasta el 2017 [18].</i>	14
<i>Figura XIV: En la imagen A podemos observar un esquema del proceso de inmovilización de las enzimas. La imagen B es un gráfico de la actividad de enzima mantenida durante los ciclos de reutilización [19].</i>	15
<i>Figura XV: Proceso de inmovilización de la lipasa [20].</i>	16

<i>Figura XVI: Proceso de inmovilización de la enzima [21].</i>	17
<i>Figura XVII: Esquema de electrohilatura [11].</i>	17
<i>Figura XVIII: Esquema de los métodos de electrohilatura utilizados, hilado simultáneo e hilado coaxial [22].</i>	18
<i>Figura XIX: Esquema del proceso de preparación de la preparación para la electrohilatura [23].</i>	19
<i>Figura XX: En todas estas imágenes observamos el proceso de pretratamiento del alga y la paja de arroz.</i>	23
<i>Figura XXI: En todas estas imágenes se observa el proceso de pretratamiento del algodón.</i>	24
<i>Figura XXII: En estas imágenes podemos observar los diferentes pasos del tratamiento enzimático sin inmovilizar.</i>	26
<i>Figura XXIII: En estas imágenes observamos el proceso de la preparación de la inmovilización de la enzima.</i>	29
<i>Figura XXIV: En esta imagen podemos observar los filtros de fibra de vidrio con el material obtenido del filtrado.</i>	31
<i>Figura XXV: Esta gráfica representa el porcentaje de nanopartículas de cada tamaño en nm.</i>	32
<i>Figura XXVI: Esta gráfica representa el porcentaje de nanopartículas de cada tamaño en nm.</i>	33
<i>Figura XXVII: Esta gráfica representa el porcentaje de nanopartículas de cada tamaño en nm.</i>	34
<i>Figura XXVIII: Esta gráfica representa el porcentaje de nanopartículas de cada tamaño en nm.</i>	35
<i>Figura XXIX: En la imagen A se muestra el alga sin tratar. En la imagen B se muestra el alga tratada solo con NaOH. En la imagen C se muestra el alga tratada tanto con NaOH como con NaClO₂.</i>	36
<i>Figura XXX: En la imagen A se muestra la paja de arroz sin tratar. En la imagen B se muestra la paja tratada únicamente con NaOH. En la imagen C se muestra la paja de arroz tratada tanto con NaOH como con NaClO₂.</i>	37
<i>Figura XXXI: En la imagen A se trata del algodón sin tratar. La imagen B se trata del algodón tratado con Kieralon. En la imagen C se muestra el tratamiento SECo (Tabla I).</i>	38
<i>Figura XXXII: En la imagen A se muestran las nanopartículas de hierro. En la imagen B se muestran nanopartículas de hierro con quitosano. En la imagen C se muestran nanopartículas de hierro con quitosano y glutaraldehído. En la imagen D se muestran las nanopartículas de hierro con quitosano, glutaraldehído y la enzima inmovilizada.</i>	39
<i>Figura XXXIII: En la imagen A se muestra el resultado del tratamiento SEAlga. En la imagen B se muestra el resultado del tratamiento EAlga. En la imagen C se muestra el resultado del tratamiento NPEAlga. En las imágenes D y E se muestra el resultado del tratamiento EAlga4. En la imagen F se muestra el resultado del tratamiento NPEAlga4.</i>	41
<i>Figura XXXIV: En la imagen A se muestra el resultado del tratamiento SEPaja. En la imagen B se muestra el resultado del tratamiento EPaja. En la imagen C se muestra el resultado del tratamiento NPEPaja. En la imagen D se muestra el resultado del tratamiento EPaja4. En la imagen E se muestra el resultado del tratamiento NPEPaja4.</i>	43

<i>Figura XXXV: En la imagen A se muestra el resultado del tratamiento SECo. En la imagen B se muestra el resultado del tratamiento ECo. En la imagen C se muestra el resultado del tratamiento NPECo. En las imágenes D y E se muestra el resultado del tratamiento ECo4. En la imagen F se muestra el resultado del tratamiento NPECo4.</i>	45
<i>Figura XXXVI: En la imagen A se muestra el resultado del tratamiento SECMC. En la imagen B se muestra el resultado del tratamiento ECMC. En la imagen C se muestra el resultado del tratamiento NPECMC. En las imágenes D y E se muestra el resultado del tratamiento ECMC. En la imagen F se muestra el resultado del tratamiento NPECMC.</i>	47
<i>Figura XXXVII: FTIR del alga sin tratar y tratada con NaOH y NaOH y NaClO2.</i>	49
<i>Figura XXXVIII: FTIR de la paja sin tratar y tratada con NaOH y NaOH y NaClO2.</i>	51
<i>Figura XXXIX: FTIR del algodón sin tratar y tratado con Kieralon.</i>	51
<i>Figura XL: FTIR obtenido del alga con tratamiento enzimático EAlga y NPEAlga.</i>	52
<i>Figura XLI: FTIR obtenido de la paja con tratamiento enzimático EPaja y NPEPaja.</i>	53
<i>Figura XLII: FTIR obtenido de la paja con tratamiento enzimático EPaja y NPEPaja.</i>	54
<i>Figura XLIII: Alga y paja de arroz originales.</i>	60
<i>Figura XLIV: Algodón original.</i>	60
<i>Figura XLV: NaOH al 97% de PanReac.</i>	60
<i>Figura XLVI: NaClO2 al 25% de PanReac.</i>	60
<i>Figura XLVII: Kieralon de ECO.</i>	60
<i>Figura XLVIII: Ácido cítrico puro de PanReac.</i>	60
<i>Figura XLIX: Citrato trisódico puro de Probus.</i>	61
<i>Figura L: FeCl₃ puro de PanReac.</i>	61
<i>Figura LI: FeSO₄ puro de PanReac.</i>	61
<i>Figura LII: NH₄OH al 25% de PanReac.</i>	61
<i>Figura LIII: Quitosano de Aldrich.</i>	61
<i>Figura LIV: Nanopartículas de hierro.</i>	61
<i>Figura LV: Ácido acético al 80% de Scharlau.</i>	62
<i>Figura LVI: Glutaraldehído al 25% de PanReac.</i>	62
<i>Figura LVII: Acetato sódico puro de Probus.</i>	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Tratamientos enzimáticos realizados.	24
Tabla II: Resultados del DLS del tamaño y el porcentaje de las nanopartículas de hierro.	32
Tabla III: Resultados del DLS del tamaño y el porcentaje de las nanopartículas de hierro con quitosano.	33
Tabla IV: Resultados del DLS del tamaño y el porcentaje de las nanopartículas de hierro con quitosano y glutaraldehído.	34
Tabla V: Resultados del DLS del tamaño y el porcentaje de las nanopartículas de hierro inmovilizadas.	35

I. Introducción

a. Alga posidonia (*Posidonia oceanica*)

La *Posidonia oceánica* o comúnmente denominada Poseidonia no es un alga, sino una fanerógama, es decir, una planta vascular con flores y frutos. Pertenece al género *Posidonia* de la familia *Posidoniaceae*, en el cual se pueden diferenciar tres especies, *P. oceanica* presente en el Mar Mediterráneo y *P. australis* y *P. oftenfeldii*, las cuales se encuentran en el Océano Pacífico. *P. oceanica* es endémica del Mar Mediterráneo y crea praderas submarinas, las cuales constituyen al ecosistema marino de gran importancia ecológica, ya que en él se instala una gran variedad de flora y fauna [1] [2].

Posidonia oceánica pierde una gran cantidad de hojas en otoño, entre 10 y 20 t/Ha, lo cual coincide con el inicio de temporales. Una parte de estas hojas es arrastrada por el oleaje a las zonas más profundas, sin embargo, el 70%, se sitúa entre la pradera sumergida de posidonia y la playa. De esa zona, las hojas muertas son transportadas por el oleaje y acumuladas sobre la playa en forma de bermas. Esa acumulación beneficia a la playa, pues la protege frente a los temporales y aporta sedimentos y nutrientes (Figura I A). Sin embargo, los ayuntamientos eliminan esas bermas con el único fin de proporcionar "playas limpias" a los turistas (Figura I B), provocando la regresión de las playas por pérdida sedimentaria [3]. De hecho, Yepes y Medina realizaron un estudio en 2007 de la arena que se eliminaba y llevaba al vertedero debido a la limpieza de las playas en Valencia y se obtuvo como resultado que se eliminaban 500 m³/km/año [3]. Esta práctica no solo no es beneficiosa para las playas, sino que además genera una gran cantidad de residuos que se llevan al vertedero. Estos residuos podrían utilizarse en otros ámbitos, como por ejemplo fuente de celulosa en la industria. En este TFM nos centraremos en la revalorización de estos residuos en la producción de nanocelulosa.



Figura I: En la imagen A podemos observar la *Posidonia* en la playa evitando que el oleaje arrastre sedimento. En la imagen B podemos observar la eliminación de las playas de la *Posidonia* [3].

b. Paja de arroz

La paja de arroz es el residuo que se genera en la recogida de los cultivos de dicho cereal. La gestión tradicional de este residuo es la quema (Figura I B), pues favorece la destrucción de esporas de hongos, como la *Pyricularia oryzae*, así como de algunas bacterias y semillas de malas hierbas. Además, facilita la reincorporación al suelo de determinados nutrientes. Sin embargo, también presenta problemas ambientales, ya que genera emisiones a la atmósfera de dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxidos de nitrógeno (NO_x), óxidos de azufre (SO_x), hidrocarburos, dioxinas y partículas de distinta naturaleza. Esto empeora debido a la gran cantidad de residuos que se genera en un corto plazo de tiempo ya que todo el arroz se cosecha en unas pocas semanas. Por hectárea de arroz se producen alrededor de 5-6 t de paja, originándose unas 75.000 - 90.000 t de paja al año en l'Albufera de Valencia [4].

Como alternativas a la quema de la paja, existen principalmente dos opciones de gestión: el triturado e incorporación al suelo y la retirada del campo para su posterior aprovechamiento. En este TFM nos centraremos en el aprovechamiento de la paja de arroz para la obtención de nanocelulosa [4].



Figura II: En la imagen A podemos observar un cultivo de paja de arroz. En la imagen B observamos la quema de los residuos generados durante la recogida del arroz [4]

c. Algodón

El algodón es una fibra textil vegetal que crece alrededor de las semillas de un arbusto del género *Gossypium*, de la familia de las malváceas. Es originaria de las regiones tropicales y subtropicales distribuyéndose por América, África e India. Cada una presenta su especie autóctona, *Gossypium arboreum* de India y Pakistán, *Gossypium barbadense* de América del Sur, *Gossypium herbaceum* de África y península de Arabia y *Gossypium hirsutum* de América Central, México, el Caribe y Florida. Los cinco principales exportadores de algodón en 2020 fueron China, India, Estados Unidos, Brasil y Paquistán [5].



Figura III: Planta del algodón con las semillas [6].

El algodón es la fibra natural más popular, representa el 90% de todas las fibras naturales, y una de las más utilizadas en indumentaria y textil hogar. Las fibras de algodón se dividen en tres grupos: fibra larga, la más cara, fibra media, la más utilizada en textil y fibra corta, utilizada en otros productos. Esta fibra como todas las fibras vegetales está principalmente compuesta por celulosa, en un 95%, sin embargo, es la más utilizada en textil debido a su precio y propiedades [5].

Aunque el algodón se considere una fibra vegetal natural, por tanto, biodegradable, no es sostenible. Esto es debido al uso de gran cantidad de agua y pesticidas en su cultivo, además de que, al producirse en su gran mayoría en países en vías de desarrollo, también presenta problemas sociales, ya que los trabajadores no tienen condiciones dignas, cobrando muy poco dinero por un trabajo muy duro y que puede producir problemas de salud [7]. Pero, no solo presenta problemas ambientales en su producción sino también al final de su uso como textil. En 2017 el consumo mundial de algodón fue de 115 millones de pacas, excediendo la producción y generando una gran cantidad de residuos. El 75% de los residuos pre-consumo se reciclan, sin embargo, el 95% de los residuos post-consumo se llevan al vertedero o a incinerar [8]. Generando una problemática enorme y, por ello, urge la necesidad de aprovechar todo ese residuo de algodón. Máxima, si se considera que en 2025 quedará prohibido el vertido de elementos textiles al vertedero. En este TFM se estudiará la posibilidad de su revalorización como fuente de nanocelulosa.

d. Celulosa y nanocelulosa

La celulosa es el polisacárido más abundante de la naturaleza [9] [10], el cual se encuentra en las paredes celulares de las células vegetales [10]. Se trata de una cadena de β -D-glucopiranosas unidas por enlaces β -1-4, la cual presenta hidróxidos como cadenas laterales que permiten la unión por puentes de hidrógeno entre diferentes cadenas. Esto permite su polimerización y que forme una complicada red que creará tejidos de plantas y otros organismos. Las propiedades físicas y mecánicas que presenta la celulosa son debidas tanto a los grupos hidróxido, como a la presencia de zonas cristalinas, es decir, zonas ordenadas y zonas amorfas en la macromolécula (Figura IV). Dependiendo de la cantidad de zonas amorfas o cristalinas que presente la celulosa, tendrá diferentes propiedades [9] [10]. La celulosa está formada por la unión de microfibrillas, que a su vez están formadas por 36 protofibrillas, las cuales están formadas por 36 moléculas de celulosa (Figura IV) [9].

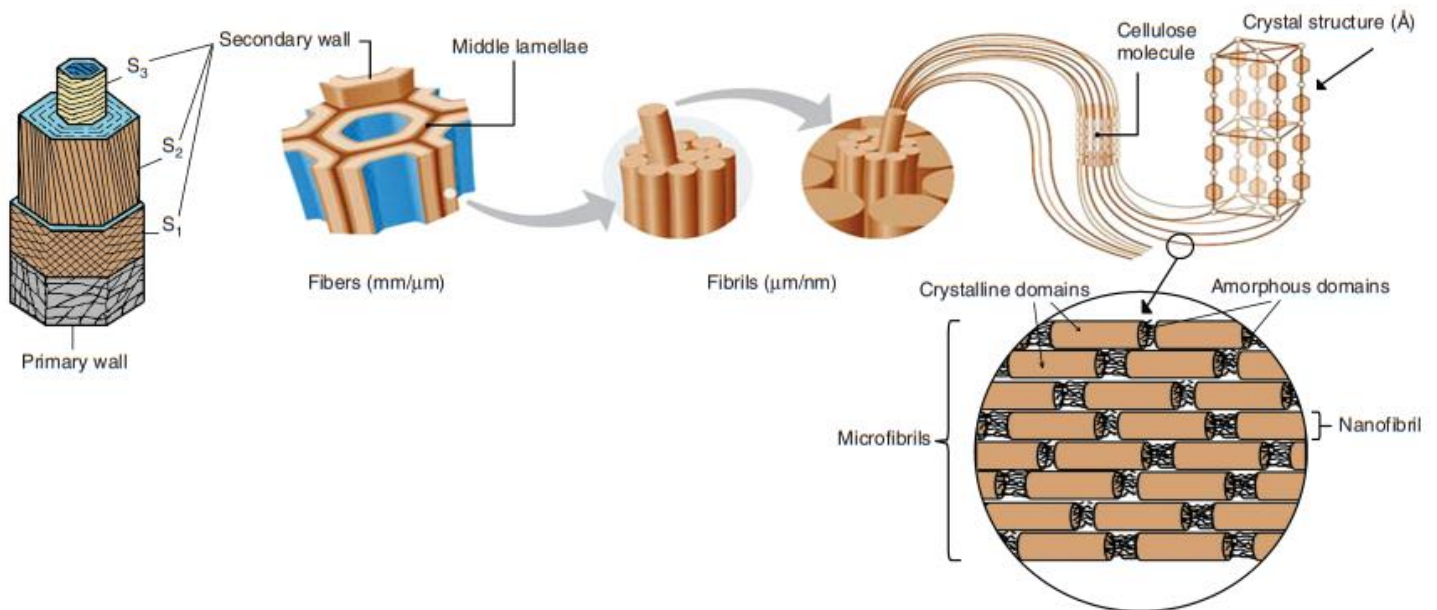


Figura IV: Composición de la celulosa. [11]

La celulosa además presenta diferentes alomorfos y polimorfos como la celulosa I, II, III_I, III_{II}, IV_I y IV_{II}. Siendo la más común la de tipo I, que presenta 2 alomorfos, la I_α y la I_β [10].

La nanocelulosa es celulosa de tamaño nanométrico, la cual presenta propiedades interesantes como bajo peso y densidad, buena biocompatibilidad, hidrofiliidad y buenas propiedades mecánicas. Dependiendo del origen, el método de extracción, morfología, tamaño de la partícula, propiedades y cristalinidad se encuentran diferentes tipos de nanocelulosa. Según estándares ISO se puede dividir en nanobjetos de celulosa y en celulosa nanoestructurada. En el primer caso se distinguen nanocristales de celulosa y nanofibras de celulosa y en el segundo caso se distinguen microcristales de celulosa, celulosa microcristalina, microfibras de celulosa, celulosa microfibrilada y celulosa bacteriana (Figura V) [9].

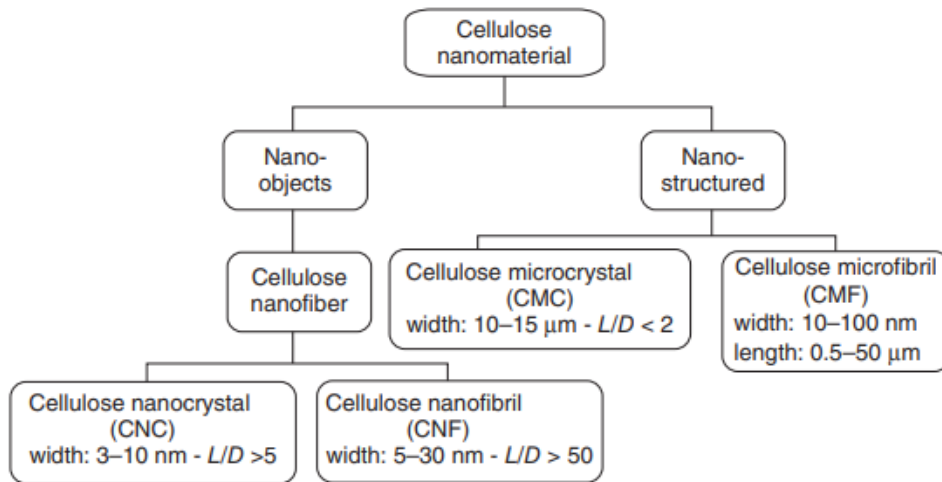


Figura V: Tipos de nanocelulosa [11].

Las dimensiones nano, la alta relación superficie/volumen y el excelente potencial de refuerzo de la nanocelulosa han aumentado la demanda de ésta para su aplicación en nanocomposites. Se espera que el mercado de nanocelulosa crezca de 297 millones de dólares en 2020 a 783 millones de dólares en 2025, a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 21,3%. Pero, la nanocelulosa no solo se utiliza en los nanocomposites, sino que tiene muchos campos de aplicación, entre ellos encontramos la industria del papel, del embalaje, de alimentación, médica y farmacéutica, del medio ambiente, electrónica y de sensores, de la construcción y de la automoción (Figura VI) [9].

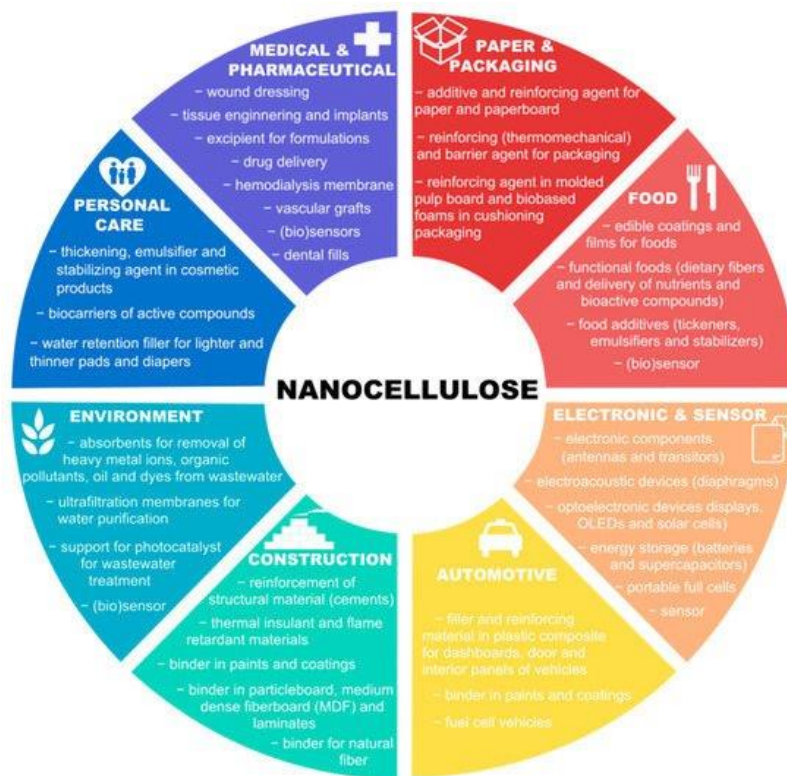


Figura VI: Aplicaciones de la nanocelulosa [9].

e. Procesos de obtención

i. Métodos mecánicos

Los métodos mecánicos se basan en aplicar grandes fuerzas de cizallamiento. Los más utilizados son la homogenización por presión, ultrasonidos, molienda de bolas o la molienda criogénica. Se utilizan principalmente como pretratamientos, ya que no consiguen tamaños a escala nano por sí solos. Como pretratamientos consiguen mejorar la eficiencia de otros métodos de obtención como la hidrólisis ácida. Una gran desventaja de estos métodos es que afectan a la morfología de la celulosa reduciendo su grado de cristalinidad y obteniendo baja repetibilidad de partículas [9].

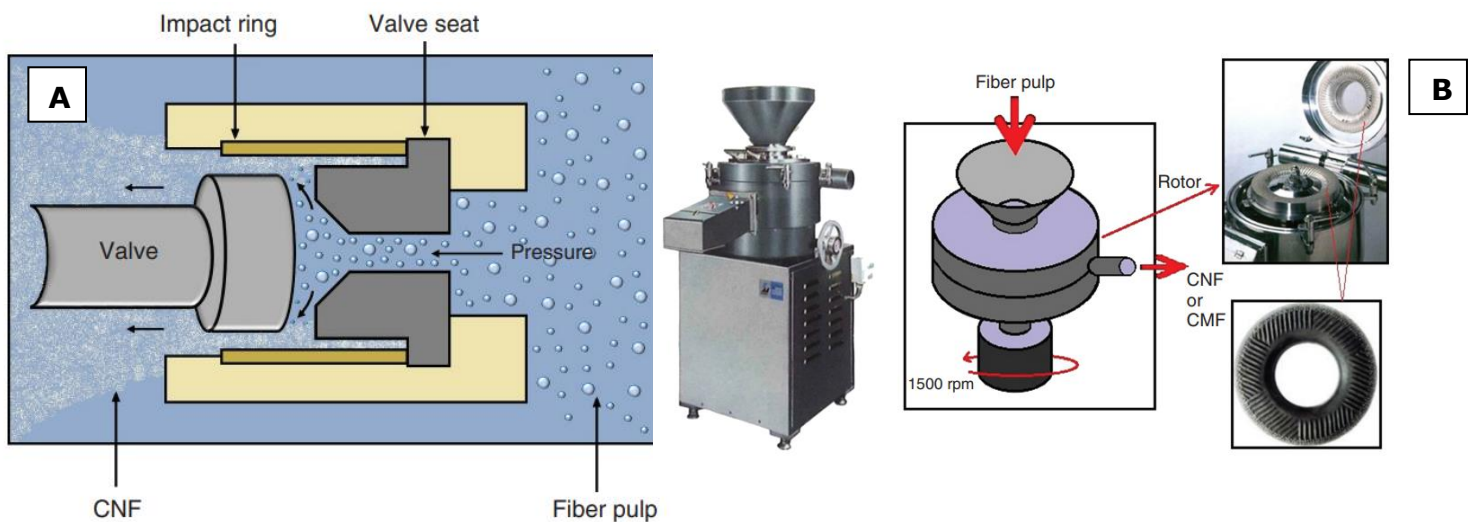


Figura VII: En la imagen A podemos observar un esquema de homogenización por presión. En la imagen B podemos observar un esquema de la molienda de bolas [11]

ii. Método de hidrólisis ácida

Es el método tradicional de obtención de celulosa, se basa en procesos de hidrólisis donde las fracciones cristalinas de celulosa permanecen intactas y las partes amorfas se descomponen. La mayor desventaja de este proceso es la reducción de la estabilidad térmica de la nanocelulosa, que está relacionada con la presencia de grupos sulfona en la superficie de los nanocristales. Además, la separación del ácido concentrado de las nanoestructuras requiere mucho tiempo y requiere el uso de reactores especiales [9].

iii. Método del líquido iónico

Otro método para obtener celulosa nanocristalina es la técnica del líquido iónico, la cual se basa en solubilizar la celulosa en líquidos iónicos. Sin embargo, presenta varias desventajas como dependencia en la cristalinidad del material celulósico, dificultad para purificar compuestos, alta viscosidad de líquidos iónicos o degradación de la cadena de celulosa [9].

iv. Método enzimático

Este método es relativamente novedoso y se caracteriza por una alta efectividad, selectividad, menor gasto energético y elimina el uso de reactivos dañinos. En este método se necesitan varios tipos de enzimas, ya que la celulosa presenta una gran cantidad de enlaces de puentes de hidrógeno. Además, la efectividad de este proceso está influenciada por las condiciones de la reacción de hidrólisis, siendo fáciles de conseguir ya que son condiciones neutras, del tipo o grado de polimerización de la celulosa utilizada, su cristalinidad y porosidad y por las propiedades morfológicas de dispersión y polimorfismo del material de celulosa [9].

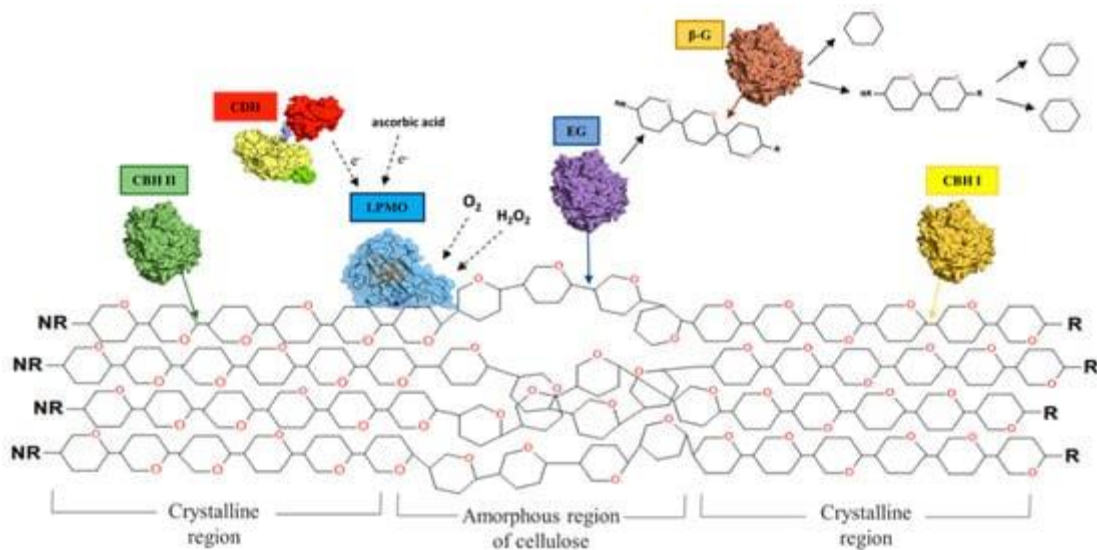


Figura VIII: Las diferentes enzimas que intervienen en la degradación de la celulosa [9].

f. Inmovilización

Proceso en el que se localiza una enzima a una región del espacio, esto da lugar a formas insolubles de la enzima que retienen su actividad y que permitan que se pueda reutilizar. No solo se utiliza con enzimas, sino que también se ha utilizado con células, orgánulos, etc. [12]

Entre las ventajas de este proceso encontramos la mejora de la estabilidad de la enzima, las condiciones de trabajo le afectan en menor medida, la posibilidad de reutilización reduciendo los costes del proceso y la posibilidad de diseñar reactores enzimáticos fáciles de controlar. Los principales inconvenientes son la alteración de la conformación de la enzima, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte, pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con diferente número de uniones al soporte, pérdida de actividad durante la inmovilización y el biocatalizador es más caro que la enzima nativa [12].

Los métodos de inmovilización se clasifican en: retención física y química [12].

i. Retención física

Existen dos métodos principales, el atrapamiento y la inclusión en membranas, la cual a su vez se divide en microencapsulación y reactores de membrana.

En el primer caso se retiene físicamente en las cavidades de una matriz sólida porosa, se suele realizar con polímeros. El proceso de inmovilización se basa en la suspensión de la enzima en una solución de monómeros y se inicia la polimerización, puede ser en fibras o en geles. Es un método sencillo en el que la enzima no sufre alteración en la estructura y se necesita poca cantidad para que sea activo, como inconvenientes tiene control riguroso de polimerización y comprobación de que la naturaleza química del proceso no altere los grupos reactivos de la enzima.

En el segundo método se distingue la microencapsulación, enzimas rodeadas de membranas semipermeables que permiten solo el paso de sustrato y producto, y reactores de membrana, adsorción de la enzima a la membrana del reactor [12].

ii. Unión química

Existen dos métodos principales, la unión a soportes y el reticulado.

El primer método es el más utilizado y se basa en anclar la enzima a un soporte de diferente naturaleza, este anclaje se puede realizar mediante adsorción o por unión covalente. En el primer caso se une la enzima al soporte mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. El segundo caso se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reacciones con la enzima

El segundo método se basa en la utilización de reactivos que crean uniones entre las moléculas de enzima. En este método podemos incluir el co-reticulado el cual permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática

debidas a efectos difusionales mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina [12].

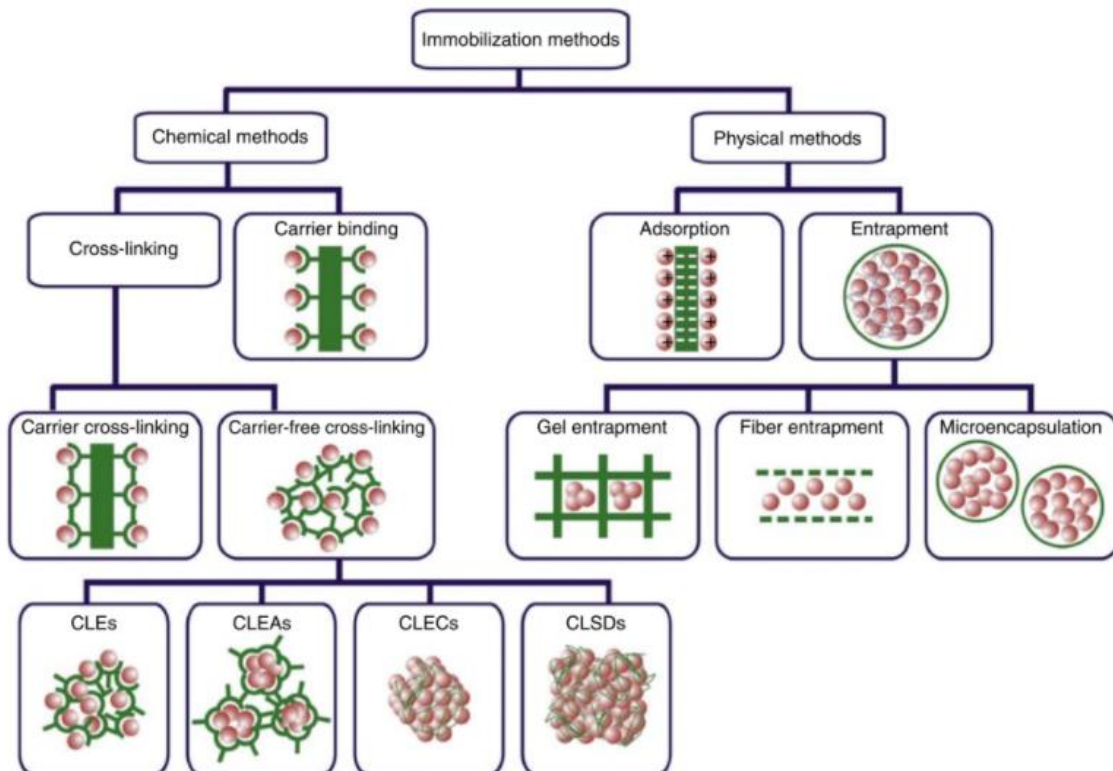


Figura IX: Los diferentes métodos de inmovilización [13].

g. Electrohilatura

La electrohilatura es una técnica en la que se utilizan fuerzas electrostáticas con el fin de obtener hilos compuestos por polímeros sintéticos y naturales con diámetros de entre 2 nm a varios μm . La principal ventaja de esta técnica se trata de su capacidad de producir hilos muy finos de tamaño nano y con estructura de poro controlable, esto es muy interesante en algunas áreas de aplicación como en nanocatálisis, ingeniería de tejidos, tejidos de protección, filtración, biomedicina, farmacia, electrónica, biotecnología, ingeniería medio ambiental, etc. Además de ser muy versátil es una técnica de producción de nanofibras muy sencilla y robusta. Las principales ventajas de las nanofibras son el alto ratio superficie/volumen, la capacidad de ajustar la porosidad, versatilidad respecto a tamaño y forma del hilo y la habilidad de controlar la composición de la fibra dependiendo de las propiedades y funcionalidad que buscamos. Sin embargo, también encontramos desventajas y problemas, el principal cuello de botella en la producción de nanohilos con electrospinning es su rendimiento, ya que es muy bajo. Se han investigado varias soluciones para aumentar la tasa de producción como, por ejemplo, el sistema de electrohilado de dos capas, la capa inferior es una suspensión ferromagnética y la capa superior una solución de polímero, múltiples hileras o sistemas de boquillas dispuestos en una línea / círculo / matriz, y un nuevo electrohilado

de chorro de gas de abajo hacia arriba (electrohilado de burbujas). Sin embargo, la producción de nanofibras a través de un solo chorro no es muy factible ya que para diversas aplicaciones se necesitan grandes cantidades de fibras. Por tanto, se han investigado soluciones como tubos huecos porosos para obtener múltiples chorros y, en este caso, la tasa de producción se puede mejorar aumentando la longitud del tubo y el número de agujeros. Otra desventaja del electrohilado se encuentra en la ingeniería de tejidos, ya que la distribución celular no es uniforme y hay falta de migración celular en andamios nanohilados [14].

La técnica de electrohilado fue observada por primera vez en 1897 por Rayleigh y, posteriormente, fue estudiada en detalle por Zeleny en 1914 y patentada por Formhals en 1934. Pero, fue Taylor en 1969 el que asentó las bases del electrohilado. El electrohilado se lleva utilizando 60 años en la industria textil para producir no tejidos, pero en los últimos años se ha aumentado el interés en esta técnica por la producción de nanohilos [14].

El proceso del electrohilado consiste en utilizar las fuerzas electrostáticas para producir fibras finas a partir de soluciones de polímeros como se ha comentado anteriormente. En el proceso es necesario un voltaje de corriente continua en el rango de varias decenas de kV y se basa en que las fuerzas repulsivas eléctricas superan las fuerzas de tensión superficial en el líquido polimérico cargado gracias a la corriente que le hemos suministrado. Actualmente existen dos configuraciones, vertical y horizontal y se componen de tres componentes: fuente de alimentación de alto voltaje, hilera y placa colectora conectada a tierra (Figura X). La fuente de alto voltaje inyecta carga de una cierta polaridad al polímero que luego se acelera hacia un colector de polaridad opuesta. En primer lugar, se deben disolver los polímeros por completo y se introducen en la hilera. La solución polimérica se encuentra sostenida al final de la hilera por su tensión superficial y ahí es cuando se somete a un campo magnético que carga el polímero. Cuando el campo magnético llega a un valor crítico las fuerzas repulsivas superan las fuerzas de tensión superficial y un chorro cargado de polímero es expulsado hacia el colector, ya que presenta carga contraria. Ese chorro es muy inestable e induce a la evaporación del disolvente, dejando el polímero detrás. Por último, se va depositando el hilo de polímero sin disolvente sobre el colector, para ello la hilera se va moviendo de un lado a otro y así forma como un velo [14].

El electrohilado presenta múltiples parámetros que se agrupan en tres clases, los parámetros de solución, donde encontramos aquellas variables pertenecientes al polímero, como la viscosidad, conductividad, peso molecular, tensión superficial, etc. Luego encontramos los parámetros de proceso, todas aquellas variables del proceso, como campo magnético aplicado, distancia de la punta al colector y caudal. Por último, tenemos los parámetros ambientales, como la temperatura, presión, humedad, etc. Todos estos parámetros van a variar la morfología y tamaño de las fibras, sin embargo, los dos primeros parámetros pueden ser controlados por nosotros

y el último grupo de parámetros es difícil de controlar y muchas veces no dependen de nosotros [14].

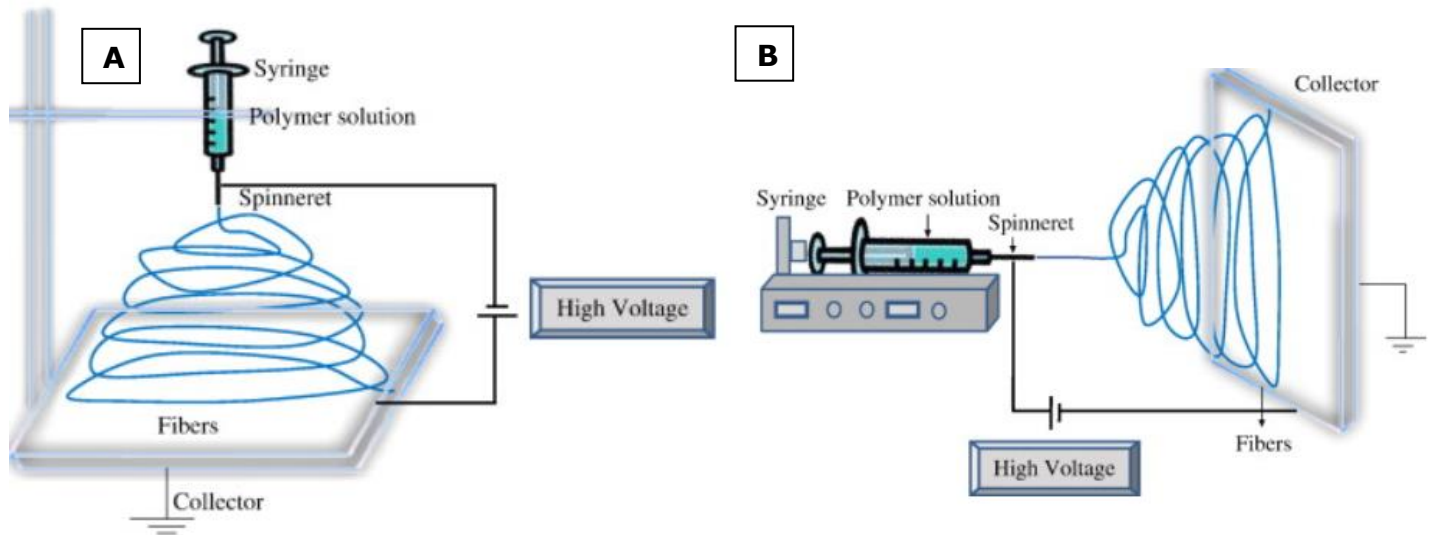


Figura X: En la imagen A podemos observar un esquema del electrohilado vertical. En la imagen B podemos observar un esquema del electrohilado horizontal [14].

II. Estado del arte

a. Fabricación de nanocelulosa con enzimas.

El aumento de la concienciación por la sostenibilidad ha provocado un aumento en la investigación de materiales renovables y de origen natural para su uso en la industria [9]. Entre ellos podemos encontrar a la nanocelulosa, la cual es un material novedoso que está empezando llamar la atención debido a su naturaleza no-tóxica, biocompatibilidad y biodegradabilidad, además de sus propiedades mecánicas y aquellas propiedades asociadas por su tamaño nano, las cuales se han mencionado en apartados anteriores [9]. Se puede fabricar de diferentes maneras, sin embargo, su producción mediante enzimas está siendo de gran interés debido a factores medio ambientales. Los diferentes trabajos que estudian la síntesis enzimática de nanocelulosa difieren en el material celulósico utilizado, donde podemos encontrar una gran variedad de residuos vegetales, pulpas de papel, algodón o celulosa pura o carboximetilcelulosa (CMC), en los pretratamientos, donde diferenciamos los químicos, como los tratamientos alcalinos, y mecánicos como la sonicación, en el tiempo de incubación, ya que depende del resultado que se quiera obtener, y en la enzima utilizada, cada enzima presenta diferente actividad. Las condiciones ambientales en las que trabaja la enzima suelen ser similares, ya que la celulasa trabaja a unas condiciones de entre 45-55°C y a pH de entre 4,5 y 5 [9]. Dependiendo de todo lo anteriormente mencionado se puede obtener diferentes tipos de nanocelulosa, nanofibras o nanocristales, con diferentes formas y tamaños [9].

Un ejemplo de obtención de nanocristales de celulosa es el caso de los autores Chen et al [15]. En este experimento se obtuvieron nanocristales de celulosa a partir de pulpa de algodón. En primer lugar, se realizó un pretratamiento químico de hinchazón de las fibras por adición de glicerina. A continuación, se llevó a cabo la hidrólisis ácida con celulasa obtenida de *Aspergillus Niger*, a 50°C y pH 4,5 de 5-11 horas. Se prepararon diferentes activades de enzima con el fin de determinar la forma y el tamaño de las nanopartículas. Cuando los nanocristales estuvieron preparados se caracterizaron vía SEM, FTIR, XRD y DLS. Se obtuvo nanocristales de celulosa con forma de cinta, longitud de 250–900 nm y ancho de 30–45 nm a partir de fibras de pulpa de algodón, a la concentración de celulasa más baja. Cuando la concentración de celulasa aumentaba hasta los 100 U / mL, apareció nanocelulosa granular, y a 300 U / mL toda la nanocelulosa era granular. Además, los análisis FTIR y XRD demostraron que los nanocristales de celulosa en forma de cinta tenían el mismo estilo de cristal y estructura química que las fibras originales de pulpa de algodón, pero su cristalinidad se debilitó ligeramente.

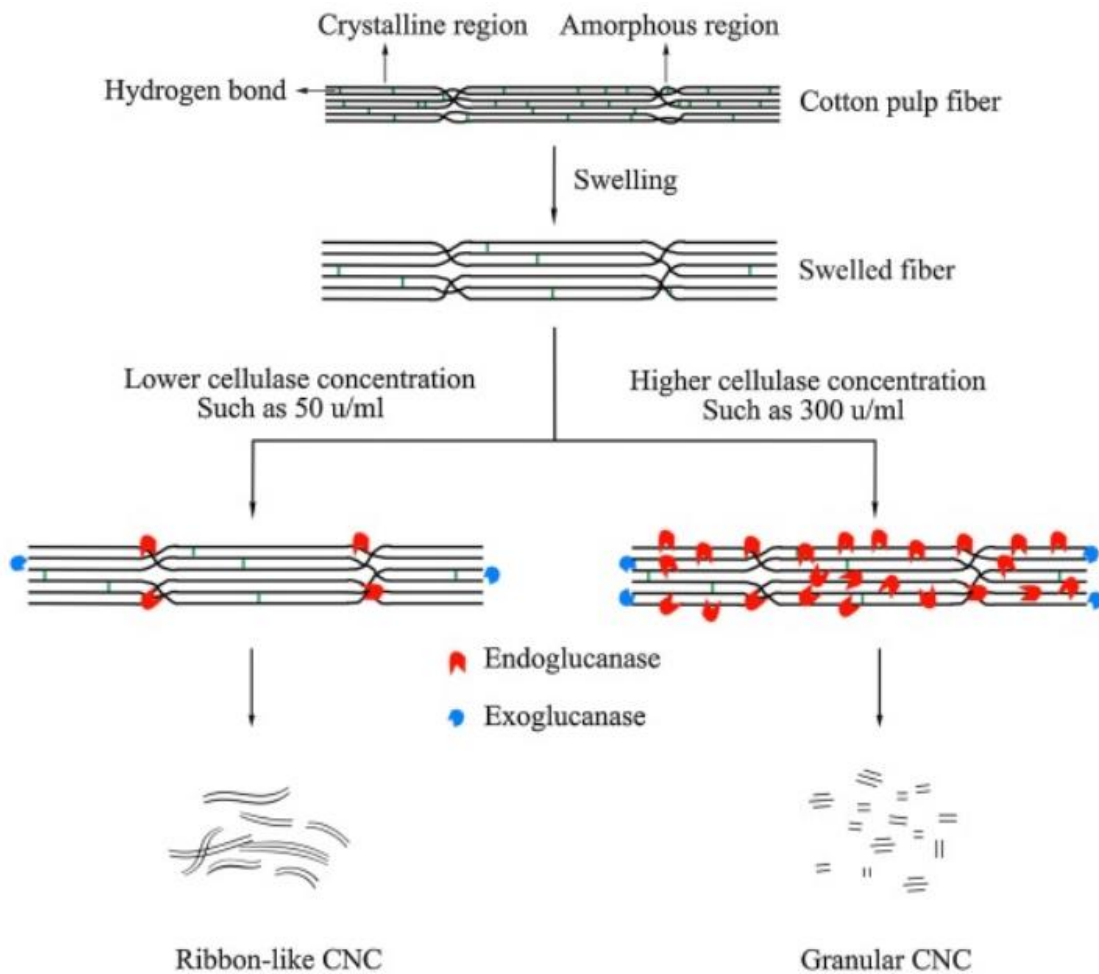


Figura XI: Esquema del mecanismo de preparación de nanocristales de celulosa [15].

El siguiente ejemplo de producción enzimática de nanocelulosa se trata del trabajo de los autores Martelli-Tosi et al [16]. En este caso fabrican nanofibras a partir de paja de soja con un tratamiento enzimático y con un tratamiento ácido, posteriormente comparan las nanocelulosas obtenidas por ambos

tratamientos. En primer lugar, se realizó un pretratamiento básico con NaOH y posteriormente se obtuvieron las nanofibras con tratamiento enzimático, en el caso del tratamiento ácido se obtienen nanocristales. El tratamiento enzimático se realizó con 93 μL del cóctel enzimático Optimash™ VR por cada g de soja, lo cual equivale a 134 U por cada g de soja. Se obtuvieron nanofibras con diámetros de 9,4 nm y con longitudes no uniformes dispuestas en nanofibras aglomeradas, además, obtuvieron rendimientos de $13,3 \pm 0,9\%$, muy similares a los de hidrólisis ácida, y presentaban menor cristalinidad que la nanocelulosa obtenida por hidrólisis ácida.

Un último ejemplo de producción enzimática de nanocelulosa es el llevado a cabo por los autores Squinca et al. [17]. En este caso obtienen nanocristales de celulosa con la utilización de pulpa Kraft de eucalipto como fuente de celulosa, preparándola con un fresado de bolas para su posterior tratamiento enzimático y sonicación. En este experimento se estudia la posibilidad de extraer nanocelulosa y las mejores condiciones para ello. Concretamente estudian tres variables: el tiempo de fresado, tiempo de hidrólisis y el tiempo de sonicación. La enzima utilizada se produce in situ a partir del hongo *Aspergillus niger*, presentando una actividad de 17,09 UI / mg de proteína, la cantidad de enzima fue de 20 mg de enzima / g de pulpa y se realizó un tratamiento a 50°C de 48 y 96 horas. Como resultado se concluyó que era posible la utilización de enzimas producidas in situ para la extracción de nanocelulosa y las condiciones óptimas del tratamiento eran 90 min de pretratamiento de fresado de bolas, la hidrólisis de 96 h y 5 min de sonicación.

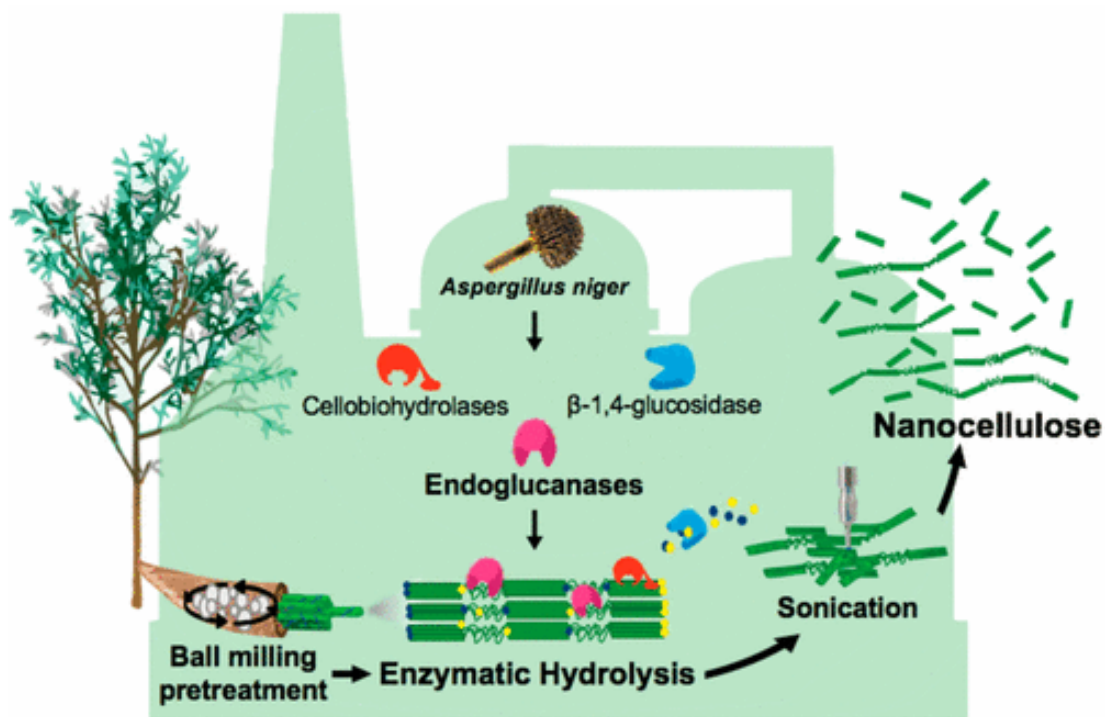


Figura XII: Esquema del proceso de la producción enzimática de la nanocelulosa [17]

b. Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas supone un aumento en la rentabilidad económica de los procesos enzimáticos industriales [12]. Esto ha provocado un gran aumento en el estudio de inmovilización de enzimas. De hecho, en 1991 hubo 202 publicaciones y en 2017 se triplicaron hasta llegar a 649 publicaciones [18]. Los artículos científicos de inmovilización de enzimas son muy variados, pero, las principales variables son: la enzima a inmovilizar y el método de inmovilización. Cualquier tipo de enzima puede ser inmovilizada y los métodos son muy variados, lo cuales dependen de la aplicación o enzima que queramos inmovilizar.

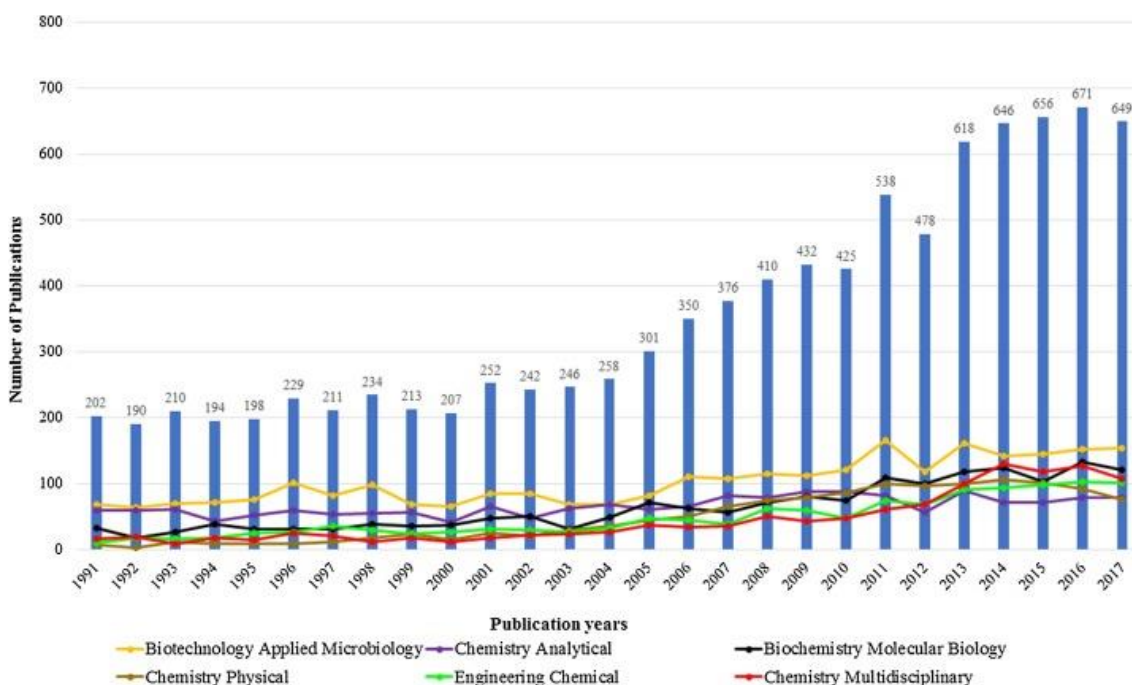


Figura XIII: Gráfico del número de publicaciones sobre inmovilización de enzimas del 1991 hasta el 2017 [18].

Como ya se comentó en el apartado 1.f., existen muchos tipos de inmovilización, uno de tantos lo realizaron los autores Wang et al. [19]. Estos autores realizaron una coinmovilización química conjunta de β -glucosidasa y celulasa en un film. Este film era de polietileno de baja densidad compuesto por varias capas y utilizaron la técnica de polimerización de injerto controlado inducida por luz visible para fabricarlo. En un primer lugar adhesionaron químicamente isopropil tioantona-semipinacol con la superficie de polietileno de baja densidad a través de un mecanismo de acoplamiento de hidrógeno. Posteriormente, la β -glucosidasa se encapsuló en una fina capa de polietilenglicol reticulado durante su polimerización de injerto bajo irradiación de luz visible a partir de la película de polietileno de baja densidad. Después se realizó la polimerización del injerto de acrilato de sodio también bajo irradiación de luz visible, y, en él se inmoviliza la celulasa mediante el método de unión covalente. Las ventajas de este diseño son: el aumento de carga enzimática de la β -glucosidasa sin modificación de su estructura o actividad sin que su sustrato, la celobiosa, presente problemas de difusión, ya que esta es soluble en agua. Aumento de la movilidad y garantía de contacto entre enzima y sustrato debido a la inmovilización de la celulasa al

cepillo de poliacrilato de sodio. Disminución del coste energético y del riesgo de efectos adversos debido al uso de luz visible en vez de luz UV. Por último, el material de soporte presenta buena resistencia química y bajo costo. La inmovilización no alteró el pH ni la temperatura óptimos de trabajo de las enzimas, las condiciones de utilización elegidas fueron pH 5 y 50°C. Como resultados obtuvieron que, en comparación con la actividad original de la celulasa libre y las enzimas inmovilizadas por separado, el sistema de doble enzima exhibió un aumento del 82% y del 20% en la actividad catalítica, respectivamente. Además, presentó una excelente reutilización, ya que mantuvo en un 93% la actividad de la sal sódica de carboximetilcelulosa (CMC) después de repetir 10 ciclos de hidrólisis y en un 89% la actividad del papel de filtro después de 6 ciclos en relación con la actividad original.

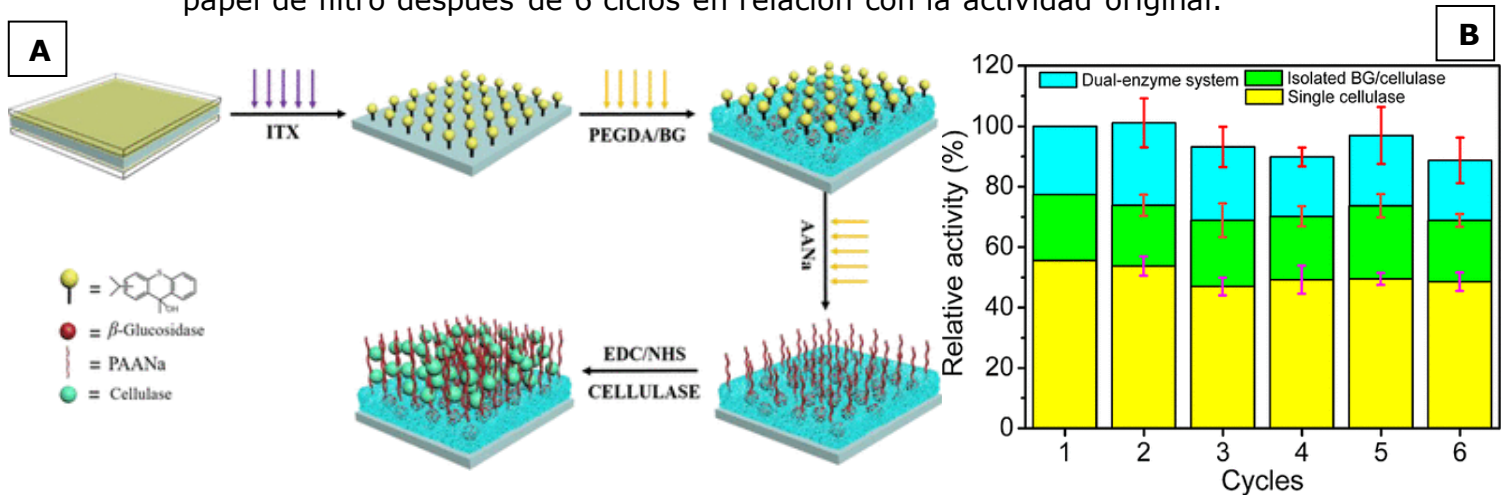


Figura XIV: En la imagen A podemos observar un esquema del proceso de inmovilización de las enzimas. La imagen B es un gráfico de la actividad de enzima mantenida durante los ciclos de reutilización [19].

Otro ejemplo es el experimento realizado por Cai et al. [20] Estos autores inmovilizaron químicamente una lipasa a microesferas magnéticas de Fe_3O_4 recubiertas de SiO_2 , quitosano y hialuronano. En primer lugar, realizaron las microesferas de Fe_3O_4 por reacción hidrotermal y, posteriormente, produjeron las microesferas de $\text{Fe}_3\text{O}_4 + \text{SiO}_2$ por el método sol-gel. Por último, se recubrieron capa por capa con quitosano y hialuronano. Debido a los abundantes grupos carboxilo en el hialuronano, la lipasa se unió covalentemente a la superficie del soporte magnético mediante la utilización de 1-etil-3-(dimetilamino)-propil) carbodiimida y de N-hidroxisuccinimida. Las condiciones de trabajo de la enzima utilizadas fueron: ph 8, 60°C y 48h. En comparación con la lipasa libre, la inmovilizada magnéticamente exhibió una buena estabilidad térmica a largo plazo, ya que mantuvo el 53,9% de la actividad después del tratamiento, mayor que la de la enzima libre. Además, la lipasa inmovilizada presentaba una reutilización favorable, ya que mantenía el 85% de su actividad inicial después de nueve ciclos consecutivos.

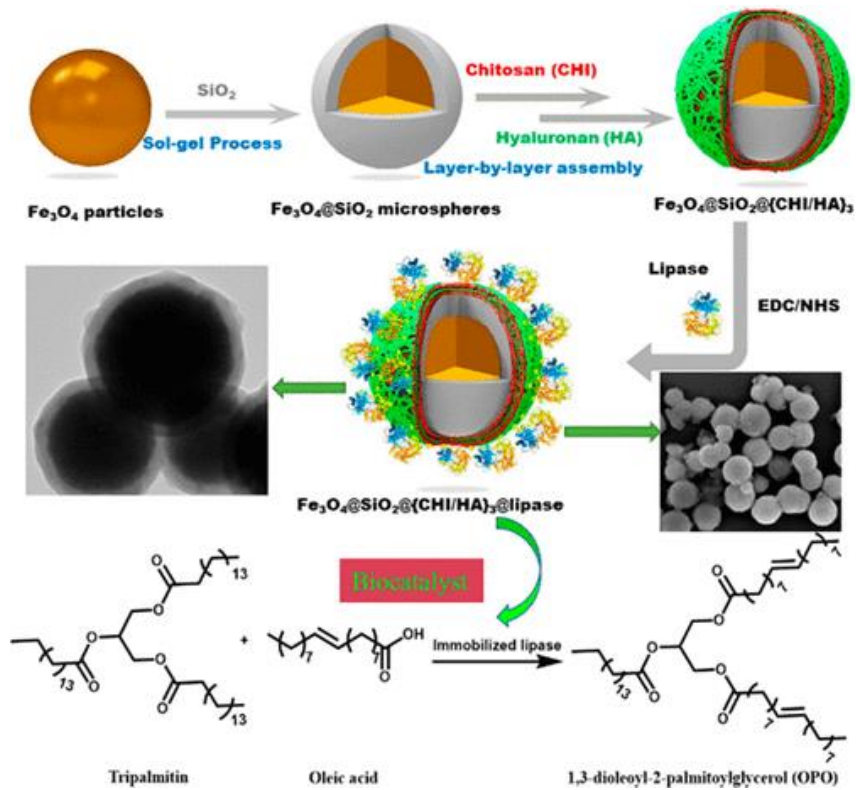


Figura XV: Proceso de inmovilización de la lipasa [20].

Por último, hablaremos del trabajo de los autores Hassan et al. [21] Dónde inmovilizaron de manera covalente la celulasa a través de grupos epoxi a un nanocompuesto magnético. Para fabricar el soporte magnético en primer lugar se crearon por coprecipitación las nanopartículas de Fe_3O_4 y se recubrieron de sílice. Por último, se creó por atrapamiento de nanopartículas de Fe_3O_4 el soporte magnético de polímero iónico reticulado de tipo líquido/epoxi, el cual se realizó con el método de destilación-precipitación-polimerización. La principal ventaja de este soporte es que su superficie iónica mejoró la adsorción de la enzima, cargándose una gran cantidad de enzima al soporte. Estos autores realizaron los experimentos con diferentes condiciones de trabajo con el fin de determinar las condiciones óptimas y observaron que la enzima inmovilizada trabajaba mejor a pH y temperaturas mayores que la libre, al final trabajaron a pH 5 y 60°C . Llegaron a la conclusión de que la superficie iónica y la unión covalente de la enzima del soporte mejoraron la actividad, la estabilidad térmica y la reutilización de la celulasa en comparación con la, ya que retuvo el 60% de su actividad inicial después de 6 ciclos.

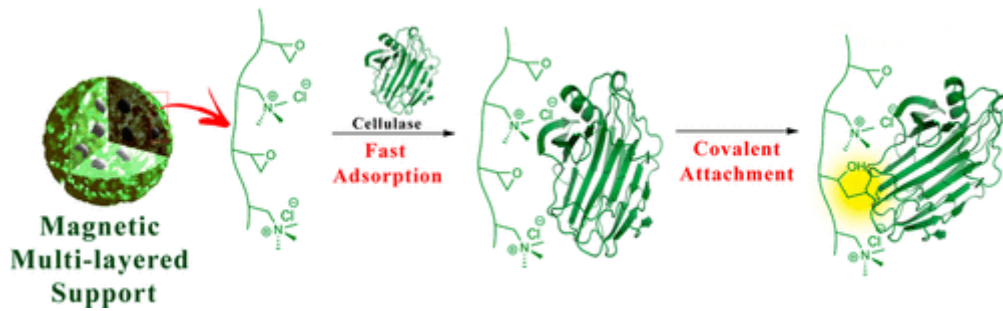


Figura XVI: Proceso de inmovilización de la enzima [21].

c. Utilización de nanocelulosa en electrohilatura

La electrohilatura es una técnica la cual permite crear fácilmente hilos muy finos, incluido nanohilos [14]. Las principales ventajas de los nanohilos son su tamaño y su alta relación superficie/volumen, las cuales los hacen muy adecuados para determinadas aplicaciones, como, por ejemplo, en la industria médica como apósitos o suturas, o en medio ambiente como filtros de aire o agua [14]. Sin embargo, para poder electrohilar un polímero debemos disolverlo completamente con un disolvente que posteriormente se evaporará [14], y la celulosa no es un polímero que resulte fácil de disolver [22]. Esto es debido a que se compone de largas cadenas muy cristalinas y rígidas que se conectan por fuertes enlaces de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares [22]. Por ello, la nanocelulosa es una mejor opción para electrohilatura que la celulosa común. Existen múltiples disolventes para disolver la nanocelulosa como N,N-dimetilacetamida (DMAc)/LiCl, sulfóxido de dimetilo (DMSO)/trietilamina/SO₂, N-metilmorfolina-N-óxido (NMMO) y NaOH/urea solución acuosa [electrospinning].

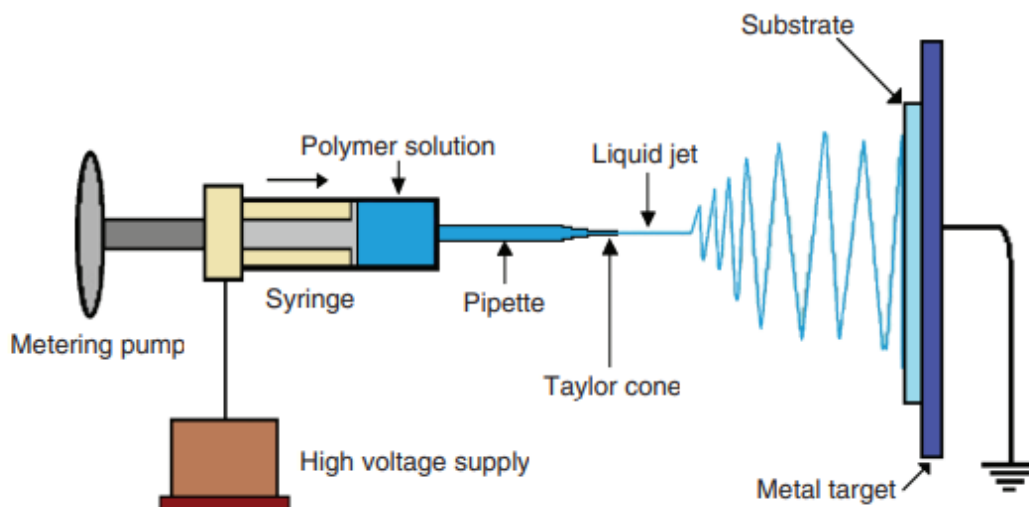


Figura XVII: Esquema de electrohilatura [11].

Se han publicado una gran cantidad de artículos sobre electrohilar nanocelulosa, en los que difieren no solo el disolvente a utilizar sino también la tensión aplicada, la distancia con el colector, las condiciones de trabajo y

el caudal entre otros. Entre todos esos trabajos vamos a comentar el realizado por los autores Ardila et al. [22]. En este trabajo co-electrohilan con diferentes métodos quitosano y nanocelulosa para la posible aplicación en apósitos. Los métodos utilizados son hilado simultáneo con dos jeringas separadas hacia el mismo objetivo e hilado coaxial, donde ambos polímeros se electrohilan simultáneamente mediante una hilandera con dos agujas concéntricas, produciendo hilos de núcleo-cáscara. No se mezclaron ambos polímeros ya que sus disolventes eran incompatibles, el quitosano se disuelve con ácido acético y la nanocelulosa con N,N-dimetilacetamida (DMAc)/cloruro de litio. Además, los autores probaron diferentes condiciones de trabajo, temperatura a 22 o a 60°C, intensidades de campo eléctrico de entre 1–5 kV/cm, voltajes de entre 15–35 kV y distancias entre la aguja y el colector de entre 5–15 cm y diferentes caudales de entre 0,1–1,5 mL/h. Las condiciones de humedad y presión siempre fueron las mismas, 20-30% de humedad y presión atmosférica. El método más exitoso fue el coaxial y se obtuvieron fibras de 85 nm de diámetro.

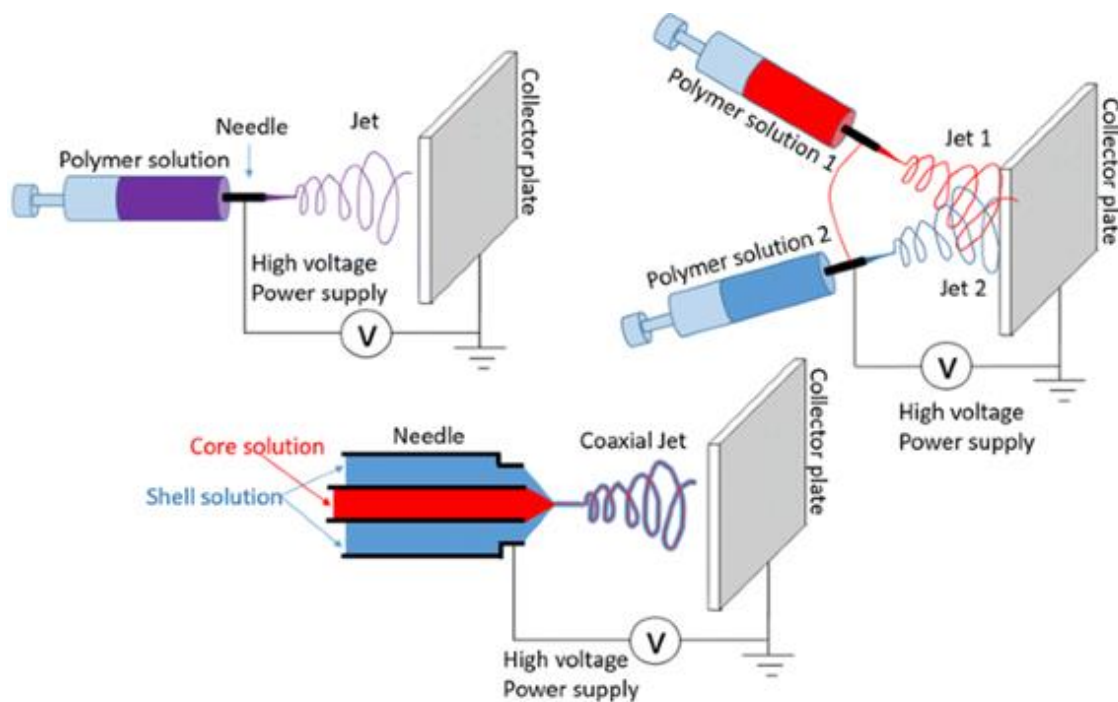


Figura XVIII: Esquema de los métodos de electrohilatura utilizados, hilado simultáneo e hilado coaxial [22].

Otro trabajo interesante es el que realizaron los autores Brande et al [23]. Electrohilan quitosano y nanocelulosa fosforilada para la producción de un filtro de agua que eliminara iones cadmio. La fosforilación de la nanocelulosa le confiere una gran capacidad de adsorción de metales. En primer lugar, prepararon la solución de quitosano/polióxido de etileno. Luego se añadió la nanocelulosa fosforilada dispersada en ácido acético y por último se electrohiló a temperatura ambiente con tensiones de 19 kV, distancia con el colector de 22 cm y un caudal de 0,5 mL/h. Después obtuvieron que la capacidad de sorción alcanzaba los 62,3 mg/g a pH 5,5 y 25 °C, de hecho la adsorción de Cd(II) ocurrió rápidamente y llegó al equilibrio en 120 min.

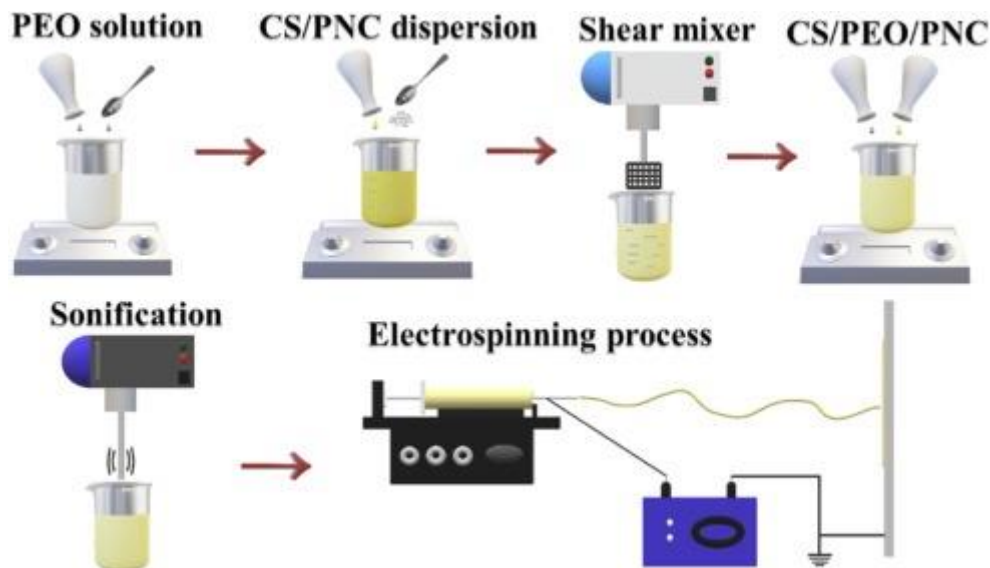


Figura XIX: Esquema del proceso de preparación de la preparación para la electrohilatura [23].

Por último, otro experimento a destacar es el realizado por los autores Wang et al. [24]. En este trabajo los autores co-electrohilaron almidón catiónico con nanocelulosa y quitosano con el objetivo de obtener nanocomposites con mejores resistencias mecánicas. El fundamento teórico era que mejoraba la resistencia mecánica debido al enlace entre el almidón catiónico y la nanocelulosa, la cual presenta cargas negativas. Se utilizó sulfóxido de dimetilo como disolvente de la nanocelulosa, del almidón y del quitosano. Electrohicieron esos tres componentes con caudales de entre 6–12 mL/h, distancias de entre 5–8 cm y voltajes de entre 6–10 kV. Como conclusión, obtuvieron que el composite compuesto por un polímero de matriz (almidón catiónico), un compatibilizador (quitosano) y un agente de refuerzo (nanocelulosa) podría aumentar significativamente la resistencia a la tracción de las fibras, sin embargo, en este caso no obtuvieron suficiente mejora como para alterar dramáticamente su utilidad.

III. Objetivos

El objetivo principal de este TFM es obtener nanocelulosa a partir de residuos vegetales. De este modo se consigue la revalorización de dichos residuos, en concreto algodón, paja de arroz y alga Posidonia.

Dentro de ese objetivo principal tenemos objetivos parciales:

- Utilizar la enzima celulasa en la obtención de la nanocelulosa. Es decir, obtención de la nanocelulosa a través de un proceso más sostenible.
- Optimizar el proceso de la obtención enzimática de nanocelulosa a partir de residuos vegetales, sobre todo respecto a las concentraciones de enzima y material utilizados.
- Caracterizar la nanocelulosa obtenida.

- Generar nanopartículas de hierro que nos permitan inmovilizar la enzima.
- Conseguir la inmovilización y reutilización de la enzima en nanopartículas de hierro. Reduciendo así el coste de la utilización de enzimas.

IV. Material y métodos

a. Materiales

i. Pretratamiento

1. Alga y paja de arroz

El pretratamiento del alga y la paja de arroz fue realizado en base al trabajo de los autores Kumari et al. (2019) [25]. Por tanto, se utilizan los siguientes materiales:

- 25 g de alga *Posidonia oceánica* triturada (Figura XLIII).
- 25 g de paja de arroz (Figura XLIII).
- NaOH al 97% de PanReac. (Figura XLV).
- NaClO₂ al 25% de PanReac. (Figura XLVI).
- Agua destilada.

2. Algodón

- 25 g de algodón (Figura XLIV).
- 1 g de Kieralon DE ECO (Figura XLVII).
- 1 L de Agua destilada.

ii. Tratamiento enzimático

1. Enzima suelta

El tratamiento enzimático sin inmovilizar fue realizado en base al trabajo de los autores Kumari et al. (2019) [25]. Por tanto, se utilizan los siguientes materiales:

- 14 mL de tampón citrato de sodio 50 mM.
- Ácido cítrico puro de PanReac (Figura XLVIII).
- Citrato trisódico puro de Probus (Figura XLIX).
- Cantidad de material (algodón, alga, paja de arroz y CMC) dada por Tabla I.
- Cantidad de celulasa dada por Tabla I suministrada por MedChemExpress con actividad específica: 500 U/g.

La cantidad de celulasa se eligió en base a la enzima añadida en el artículo de Tang et al [26]. La actividad de su enzima era de 700 EGU/g y se trabaja de forma que 1g de corrugado tratado por cada mL de celulasa, con 84U. Haciendo la conversión, se llega a la conclusión de que se precisan 0,0168 g de celulasa, por cada 0,1 g de residuo vegetal a tratar.

2. Enzima inmovilizada

El tratamiento enzimático inmovilizado se realizó en base al trabajo realizado por los autores Zhang et al. (2014) [27]. Por tanto, se utilizan los siguientes materiales:

NP de Fe

- FeCl₃ puro de PanReac (Figura L).
- FeSO₄ puro de PanReac (Figura LI).
- Agua destilada.
- NH₄OH al 25% de PanReac (Figura LII).

NP de Fe + Quitosano

- 0.25 g quitosano Aldrich (Figura LIII).
- 2.0 g NP de Fe (Figura LIV).
- Ácido acético de Scharlau al 80% (Figura LV).
- NaOH al 97% de PanReac (Figura XLV).
- Agua destilada.

NP de Fe + Quitosano + Glutaraldehído + Celulasa

- 2.0 g NP de Fe con Quitosano.
- Glutaraldehído de PanReac al 25% (Figura LVI).
- 50 mL de celulasa 6mg/ml MedChemExpress.
- 50 mL de tampón acetato 0,1 M.
- Acetato sódico puro de Probus (Figura LVII).
- Ácido acético de Scharlau al 80% (Figura LV).
- Agua destilada.

Se van a realizar diferentes tratamientos con la enzima, los cuales están especificados en el apartado b.ii.

b. Métodos

i. Pretratamiento

1. Alga y paja de arroz

En primer lugar, se debe realizar un pretratamiento con NaOH y NaClO₂ debido a dos razones, la primera es con el fin de eliminar ceras, ligninas, suciedad etc las cuales disminuyen la eficiencia de la hidrólisis, y la segunda razón se debe a la estructura compacta y rígida de la celulosa, la cual dificulta la actuación de las enzimas, sobre todo si hablamos de materiales como el algodón [28]. Los tratamientos alcalinos como los realizados por los autores Kumari et al. (2019) [25] eliminan las sustancias anteriormente mencionadas y rompen enlaces inter e intramoleculares de la celulosa disminuyendo el grado de cristalinidad y mejorando la eficacia de la hidrólisis enzimática. El

procedimiento realizado en este trabajo de fin de máster se basa en el trabajo realizado por los autores Kumari et al. (2019) [25], el cual consta de los siguientes pasos:

- Preparar 1L de NaOH al 2%:
2 g NaOH al 97% por cada 100 mL
Para preparar 1000 mL se necesitan 20 g de NaOH por cada L de agua. Además, considerando que partimos de NaOH con pureza del 97 % hay que añadir el 3% para que sea NaOH al 100%:
g NaOH que nos faltan= $(20 * 3) / 100 = 0,6$
g NaOH que debemos añadir por cada L de agua= $20 + 0,6 = 20,6$
Se deben pesar 20,6 g de NaOH y medir 1 L de agua destilada y mezclarlos.
- Preparar 0,5L NaClO₂ al 1%:
El NaClO₂ inicial es de 25%
 $V_0 = (1\% * 500 \text{ mL}) / 25\%$
 $V_0 = 20 \text{ mL}$
Se deben medir 20 mL de NaClO₂ y añadir 480 mL de agua.
- Pesar y preparar en un vaso de precipitado 25 g de cada material (Figura XX A).
- Cortar con tijeras cada material.
- Lavar cada material con agua del grifo y destilada.
- Añadir 10 mL de NaOH por cada g de material, como se han preparado 25 g de cada material se añaden 250 mL de NaOH en un vaso tintorero con el material.
- Colocar en la plancha de calor durante 3 horas a ebullición, se debe ir rellenando de NaOH cada cierto tiempo (Figura XX B).
- Realizar lavados sucesivos con agua destilada hasta conseguir pH 7. Se dejaron los materiales durante toda la noche en una bandeja con agua destilada (Figura XX C, D y E).
- Al día siguiente se cambia varias veces el agua de la bandeja hasta que el pH resulta 7 (Figura XX E).
- Dejar secar.
- Añadir 15 mL de NaClO₂ por cada g de material, como se han obtenido 10,31 g de alga y 5,7 g de paja de arroz tratados con NaOH, se añaden 85,5 mL a la paja de arroz y 154,65 mL al alga en vasos tintoreros.
- Colocar en un baño durante 3 horas a 70°C, se debe ir rellenando de NaClO₂ cada cierto tiempo (Figura XX B).
- Realizar lavados sucesivos con agua destilada hasta conseguir pH 7 (Figura XX C y D).



Figura XX: En todas estas imágenes observamos el proceso de pretratamiento del alga y la paja de arroz.

2. Algodón

En este caso el algodón únicamente se lavó con un detergente con el fin de eliminar la suciedad y restos de ensimajes:

- Preparar 1 L de disolución 1g/L de Kieralon:
Pesar 1 g de Kieralon y medir 1 L de agua y mezclarlos.
- Pesar 25 g de algodón (Figura XXI A).

- Dividir el algodón en dos vasos tintoreros y añadir 400 mL de disolución 1g/L de Kieralon a cada vaso.
- Colocar los vasos en la plancha de calor (Figura XXI B).
- Mantener durante 1 h en ebullición.
- Lavar con agua destilada.
- Dejar secar (Figura XXI C).

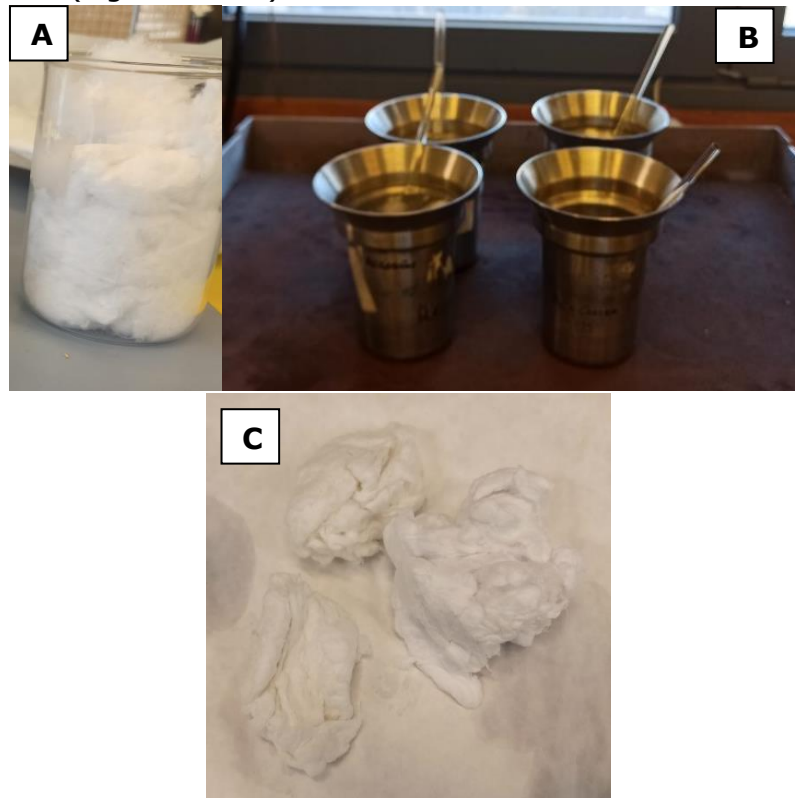


Figura XXI: En todas estas imágenes se observa el proceso de pretratamiento del algodón.

ii. Tratamiento enzimático

La tabla I muestra la relación de tratamientos enzimáticos realizados, así como las referencias asignadas a cada uno de ellos. Cabe destacar que el tratamiento enzimático se ha realizado sobre el algodón, la paja y el alga, pero también sobre carboximetilcelulosa, con el objetivo de evidenciar la eficacia del tratamiento sobre celulosa y contrastar con los residuos a analizar en este proyecto.

Tabla I: Tratamientos enzimáticos realizados.

Referencia	Cantidad Celulosa (g)	Inmovilizada /Suelta	Sustrato	Cantidad de sustrato (g)
SECMC	0	N/A	CMC	0,1
SEAlga	0	N/A	Alga	0,1
SEPaja	0	N/A	Paja de arroz	0,1

SECo	0	N/A	Algodón	0,1
ECMC	0,017	Suelta	CMC	0,1
EAlga	0,017	Suelta	Alga	0,1
EPaja	0,017	Suelta	Paja de arroz	0,1
ECo	0,017	Suelta	Algodón	0,1
NPECMC	0,03	Inmovilizada	CMC	0,1
NPEAlga	0,03	Inmovilizada	Alga	0,1
NPEPaja	0,03	Inmovilizada	Paja de arroz	0,1
NPECo	0,03	Inmovilizada	Algodón	0,1
ECMC4	0,068	Suelta	CMC	0,025
EAlga4	0,068	Suelta	Alga	0,025
EPaja4	0,068	Suelta	Paja de arroz	0,025
ECo4	0,068	Suelta	Algodón	0,025
NPECMC4	0,12	Inmovilizada	CMC	0,025
NPEAlga4	0,12	Inmovilizada	Alga	0,025
NPEPaja4	0,12	Inmovilizada	Paja de arroz	0,025
NPECo4	0,12	Inmovilizada	Algodón	0,025

1. Enzima suelta

El tratamiento enzimático realizado se basó en el trabajo de Kumari et al (2019) [25], donde producen nanocelulosa a partir de hierba de limón a través de un tratamiento enzimático con celulasa. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Preparar 500 mL de tampón citrato 50 mM:
Se mezclan 100 mL de ácido cítrico 0,1 M y 150 mL de citrato sódico 0,1 M, después se ajusta el pH a 4,8 si es necesario.
Para preparar 250 mL de ácido cítrico a 0,1 M se han pesado 5,25 g de ácido cítrico y se ha añadido agua hasta los 250 mL.
Para preparar 250 mL de citrato sódico 0,1 M se han pesado 7,35 g de citrato sódico y se ha añadido agua destilada hasta 250 mL).
- Pesar la cantidad de cada material dependiendo del tratamiento (Tabla I), y cortar lo más finamente posible.

- Añadir 14 mL de tampón citrato a pH 4.8 al material.
- Mezclar durante 1 hora con agitador magnético (Figura XXII A).
- Añadir la cantidad de enzima dependiendo del tratamiento (Tabla I) y mantener durante 24 h a 50°C (Figura XXII B).
- Desactivar la enzima hirviéndola 10 min a 100°C (Figura XXII C).
- Para la separación de la nanocelulosa filtrar con un filtro de 700 nm (Figura XXII D).
- Mantener los filtros en la estufa a 60°C y pesarlos para determinar la cantidad de nanocelulosa obtenida (Figura XXII E).
- Limpiar nanocelulosa con tampón de pH 7.4
- Dejar secar la nanocelulosa en el filtro para su posterior caracterización (Figura XXII F).

La separación de la enzima por filtrado se realiza con el objetivo de determinar los rendimientos de producción de nanocelulosa. Para su caracterización y la electrohilatura no se realiza la separación.

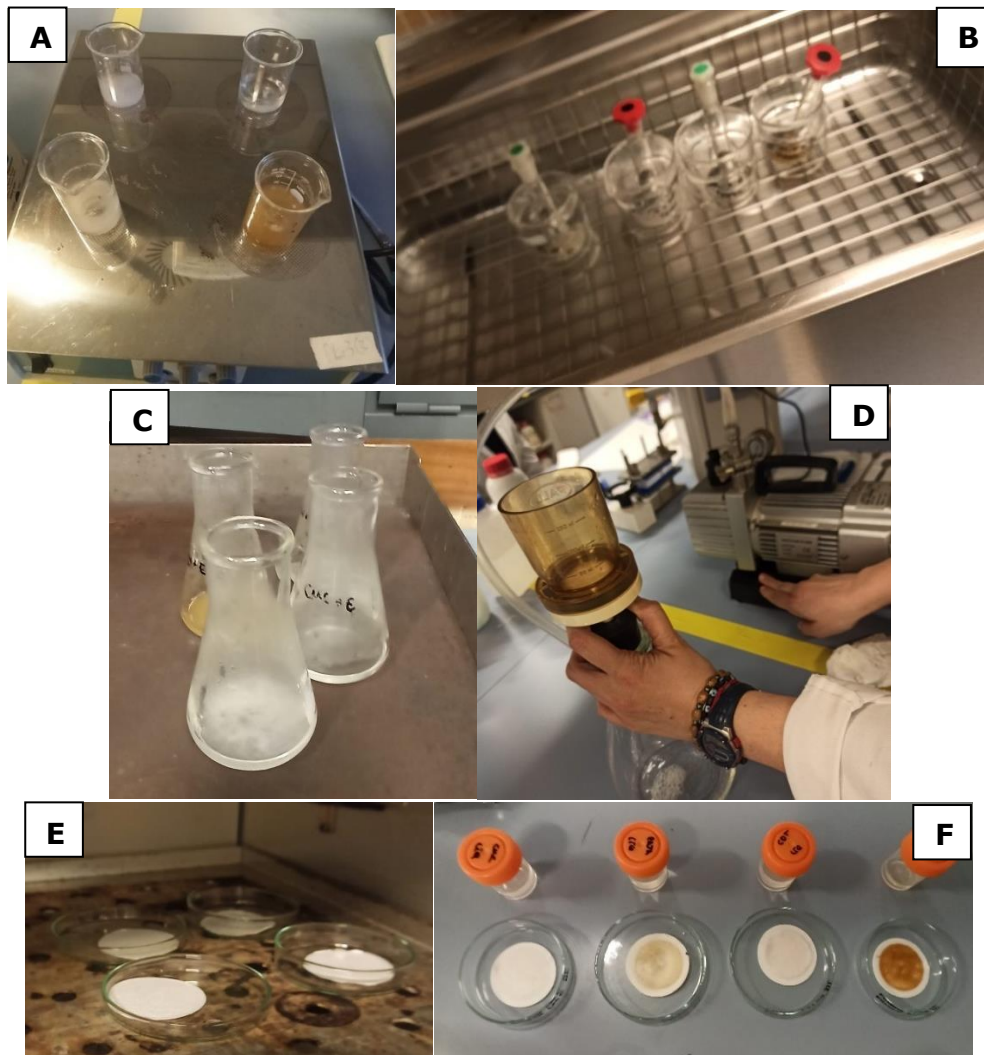


Figura XXII: En estas imágenes podemos observar los diferentes pasos del tratamiento enzimático sin inmovilizar.

2. Enzima inmovilizada

La inmovilización de la enzima se ha basado en el trabajo realizado por Zhang et al. (2014) [27]. Se trata de una inmovilización química covalente. La inmovilización debería permitirnos reutilizar la enzima y así aumentar su rendimiento, para ello se realizan nanopartículas de hierro rodeadas de quitosano y glutaraldehído y posteriormente se inmoviliza la celulasa. En primer lugar, se deben producir las nanopartículas y después se añade el quitosano, el cual se une a las nanopartículas gracias a su carga positiva, ya que las nanopartículas de hierro presentan cargas negativas. Después se somete a medio básico con la adición de NaOH y precipita sobre las nanopartículas. Posteriormente se añade glutaraldehído ya que el grupo amino del quitosano se convierte en aldehído, quedándose así fijado el glutaraldehído. Por último, la enzima se inmoviliza covalentemente gracias a los grupos aldehídos presentes en el glutaraldehído que forman enlaces covalentes de tipo Schiff con la enzima. Todo este proceso se realiza con nanopartículas de hierro con la finalidad de separar fácilmente la enzima de la nanocelulosa con un imán. El procedimiento seguido fue el siguiente:

Inmovilización

- Preparar 50 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1M (Figura XXIII A):
 $1\text{M} = 1 \text{ mol/L} * 0,05 \text{ L} = 0,05 \text{ mol}$
P.M= 270,32 g/mol
Cantidad de $\text{FeCl}_3 = 270,32 \text{ g/mol} * 0,05 \text{ mol} = 13,516 \text{ g}$ en 50 mL de agua destilada.
Se preparó 250 mL, por tanto, $13,516 \text{ g} * 5 = 67,58 \text{ g}$ en 250 mL de agua destilada.
- Preparar 50 mL de FeSO_4 2M (Figura XXIII A):
 $2\text{M} = 2 \text{ mol/L} * 0,05 \text{ L} = 0,1 \text{ mol}$
P.M= 278,02 g/mol
Cantidad de $\text{FeSO}_4 = 278,02 \text{ g/mol} * 0,1 \text{ mol} = 27,802 \text{ g}$ en 50 mL de agua destilada.
Se preparó 250 mL, por tanto, $27,802 \text{ g} * 5 = 139,01 \text{ g}$ en 250 mL de agua destilada.
- Preparar 500 mL de NH_4OH 1M (Figura XXIII A).
 $1\text{M} = 1 \text{ mol/L} * 0,5 \text{ L} = 0,5 \text{ mol}$
P.M= 17,03 g/mol
Cantidad de $\text{NH}_4\text{OH} = 17,03 \text{ g/mol} * 0,5 \text{ mol} = 8,515 \text{ g}$
Volumen= $8,515 \text{ g} / 1,1 \text{ g/mL} = 7,74 \text{ mL}$
Como partimos de NH_4OH al 25%
 $7,74 \text{ mL} / 0,25 = 30,96 \text{ mL}$ de NH_4OH al 100% en 1L.
Se preparó 500 ml, por tanto, $(30,96 \text{ mL} * 500 \text{ mL}) / 1000 \text{ mL} = 15,48 \text{ mL}$ en 500 mL de agua destilada
- Se mezclan 50 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 M y 50 mL de FeSO_4 2M con agitación fuerte.
- Añadir con una bureta gota a gota y con agitación fuerte NH_4OH 1M hasta que el pH llegue a 10, más o menos 350 ml. La disolución cambia de color de marrón a negro (Figura XXIII B y C).

- Dejar que precipiten y filtrar las NP con papel de filtro (Figura XXIII D).
- Lavar NP con agua destilada hasta que el pH sea 7 (Figura XXIII E).
- Dejar secar en estufa y pesar la cantidad de NP obtenidas (Figura XXIII F).
- Preparar 50 ml ácido acético 1% v/v:
El ácido acético inicial es del 80%
 $V_0 = (1\% * 50 \text{ mL}) / 80\%$
 $V_0 = 0,625 \text{ mL}$
Se preparó 250 mL, por tanto, $0,625 \text{ mL} * 5 = 3,125 \text{ mL}$
Medir 3,125 mL de ácido acético y añadir 246,875 mL de agua.
- Disolver 0.25 g de quitosano en 50 ml de ácido acético 1% v/v.
- Pesar y añadir 2.0 g de NP al quitosano disuelto en ácido acético (Figura XXIII G).
- Homogenizar las NP durante 30 min con agitación vigorosa (Figura XXIII G).
- Preparar NaOH 1M:
 $1M = 1 \text{ mol/L} * 0,05 \text{ L} = 0,05 \text{ mol}$
P.M= 40 g/mol con una riqueza del 98%
 $(40 \text{ g/mol} * 100) / 98 = 40,82 \text{ g/mol}$
Cantidad de NaOH= $40,82 \text{ g/mol} * 0,05 \text{ mol} = 2,04 \text{ g}$ en 50 mL de agua destilada.
Se preparó 250 mL, por tanto, $2,04 \text{ g} * 5 = 10,2 \text{ g}$ en 250 mL de agua destilada.
- Añadir 50 ml de NaOH 1M.
- Lavar las NP con agua destilada hasta que el pH llegue a 7. Las nanopartículas con quitosano se pueden mantener en la nevera a 8°C (Figura XXIII H).
- Reaccionar 1.0 g de NP por cada 30 ml de glutaraldehído al 25% con agitación a 25 °C durante 2 h.
- Lavar 3 veces con agua destilada.
- Preparar 250 mL de tampón acetato 0,1 M:
Necesitamos mezclar 1,443 g de acetato de sodio 0,07 M con 0,41 mL de ácido acético 0,03 M.
Preparar 200 mL de acetato de sodio a 0,07 M a partir de acetato de sodio puro.
 $0,07M = 0,07 \text{ mol en } 1 \text{ L}$. Si el peso molecular es 136,08 g/mol
 $0,07 \text{ mol} * 136,08 \text{ g/mol} = 9,52 \text{ g en } 1 \text{ L}$
Para preparar 200 mL, $9,52 / 5 = 1,9 \text{ g}$ de acetato de sodio al que se le añade 200 mL de agua destilada.
Preparar 10 mL de ácido acético a 0,03 M a partir de ácido acético al 80%.
La molaridad del ácido acético inicial se calculó calculando la masa y moles en 1L.
Si su densidad es de 1,07g/ml su masa es de:
 $M = 1,07 * 1000 = 1070 \text{ g}$
Si su peso molecular es de 60,05 g/mol, los moles son:
 $1070 \text{ g} / 60,05 \text{ g/mol} = 17,81 \text{ mol}$.
La molaridad sería $17,81 \text{ mol} / 1 \text{ L} = 17,81 \text{ M}$.

Sin embargo, al encontrarse al 80% se calcula la molaridad al 100%,
(17,81 M * 100%) /80%= 22,27 M

El volumen necesario es:

$(0,03M * 10 \text{ mL}) /22,27 \text{ M} = 0,013 \text{ ml}$ de ácido acético y 9,987 ml de agua destilada.

- Preparar 50 mL de celulosa 6 mg/mL:
 $6 \text{ mg/mL} * 50 \text{ mL} = 300 \text{ mg}$ de enzima
Pesar 300 mg de enzima y añadirla a 50 mL de tampón acetato 0,1M.
- Mezclar con 50 ml de celulosa 6 mg/mL, agitación suave a 25 °C durante 2 h (Figura XXIII I).
- Separar la celulosa inmovilizada filtrando y se lava con tampón acetato 0,1M. El líquido sobrante se mantiene para determinar la eficiencia de carga de la inmovilización (Figura XXIII J).
- Dejar secar las nanopartículas inmovilizadas y posteriormente mantener en la nevera.

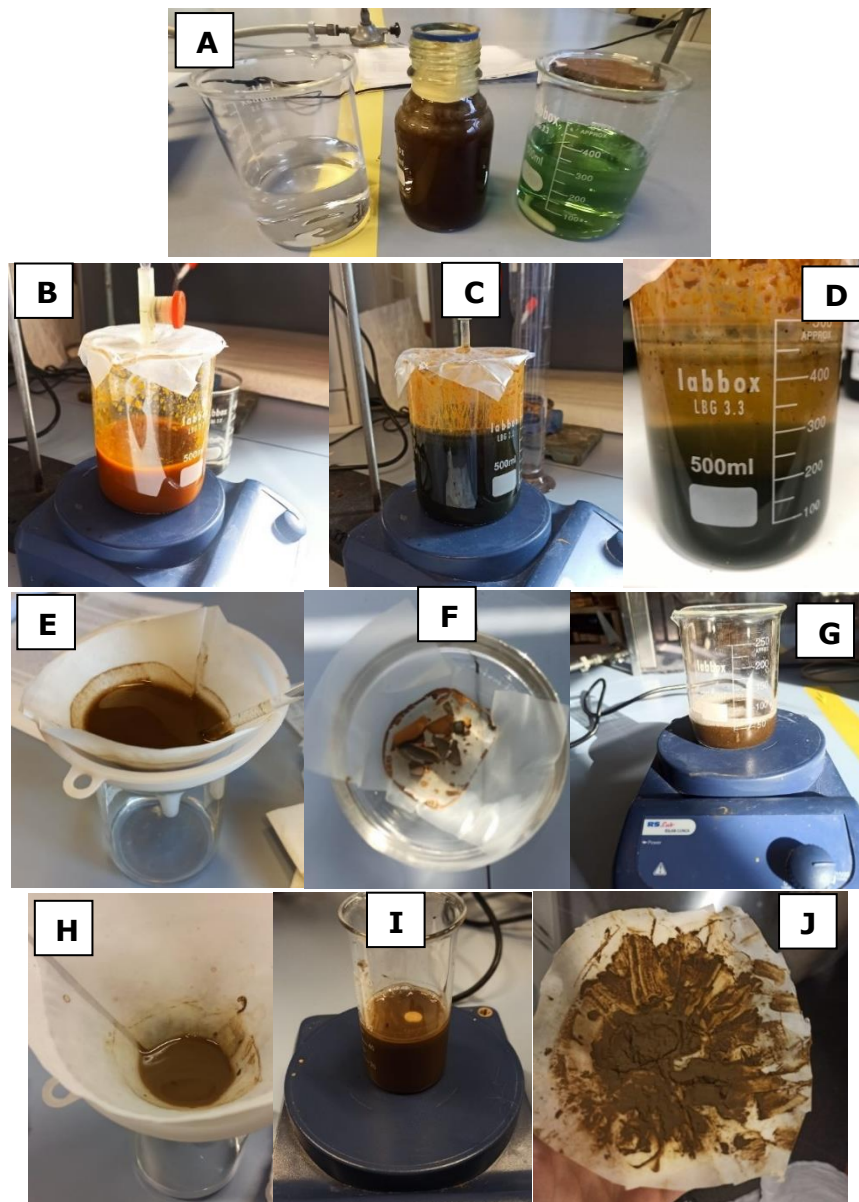


Figura XXIII: En estas imágenes observamos el proceso de la preparación de la inmovilización de la enzima.

Para el tratamiento con la enzima inmovilizada seguiremos el mismo procedimiento que con la enzima sin inmovilizar basado en los autores Kumari et al (2019) [25], sin embargo, no hará falta desnaturalizar la enzima, ya que se separa anteriormente con un imán. Respecto a la cantidad de enzima inmovilizada añadida nos basamos en los autores Zhang et al. (2014) [27]. El procedimiento seguido fue el siguiente:

Tratamiento

- Pesar la cantidad de cada material dependiendo del tratamiento (Tabla I) y cortar lo más finamente posible.
- Añadir 14 mL de tampón citrato a pH 4.8 al material.
- Mezclar durante 1 hora con agitador magnético.
- Añadir la cantidad de enzima dependiendo del tratamiento (Tabla I) y mantener durante 24 h a 50°C.
- Separar la enzima con un imán.
- Filtrar con un filtro de 700 nm. Mantener los filtros en la estufa a 60°C y pesarlos para determinar la cantidad de nanocelulosa obtenida.
- Limpiar nanocelulosa con tampón de pH 7.4
- Dejar secar la nanocelulosa en el filtro para su posterior caracterización.

El filtrado se realiza con el objetivo de determinar los rendimientos de producción de nanocelulosa. Para su caracterización y la electrohilatura no se realiza el filtrado.

iii. Caracterización de muestras

- FESEM: Para la caracterización morfológica, se ha utilizado la microscopía electrónica de barrido (SEM) Phenom Microscope (FEI Company, Hillsboro, OR, USA). Cada muestra se coloca en una superficie y se recubre con una capa de oro y paladio con la finalidad de transformarlas en conductoras utilizando el Sputter Coater EMITECH mod. SC7620 (Quorum Technologies Ltd., East Sussex, UK) y el ULTRA 55 (ZEISS, Oberkochen, Alemania). Se han analizado las muestras con los aumentos convenientes y con una tensión de aceleración de 10 kV y 2 kV, respectivamente. Además, el análisis de imagen se ha realizado con un sistema de medición a través del software image j.
- FT-IR: FT/IR-4700 tipo A de JASCO con el accesorio ATR, sobre cada muestra se realizan 16 espectros. Se midió el espectro de la CMC (carboximetilcelulosa), lignina, de la celulosa, de los materiales tratados con NaOH y NaClO₂ y sin tratar y de la nanocelulosa obtenida de cada material con la enzima suelta e inmovilizada. Se pueden analizar los cambios de la estructura química durante el pretratamiento y el proceso de hidrólisis enzimática. Es decir, que enlaces se rompen o se crean.

- DLS: La Dispersión de Luz Dinámica (DLS) o Dispersión de Luz cuasi Elástica (QUELS) es una de las técnicas más utilizadas en la medición del tamaño y distribución de partícula, en este caso se medirá de nanopartículas de hierro, nanopartículas de hierro con quitosano, nanopartículas de hierro con quitosano y glutaraldehído y nanopartículas de hierro con quitosano, glutaraldehído y la enzima inmovilizada. Los análisis fueron realizados en el Zetasizer Nano ZS de la casa comercial Malvern.

V. Resultados y discusión de los resultados

a. Filtrado de la nanocelulosa

En la separación de la nanocelulosa con filtros de fibra de vidrio con tamaño de poro máximo de $0,7 \mu\text{m}$ obtuvimos una mezcla de fibras de tamaño micrométrico y de fibras nanométrico, como se puede observar en la Figura XXIV y como se observará en las imágenes de microscopía electrónica de FESEM.

El método de filtrado no ha sido un método óptimo para la realización de cálculos de rendimiento de nanocelulosa, ya que, en el tratamiento enzimáticos también obtenemos fibras que no son nanométricas las cuales quedan retenidas en el filtro.

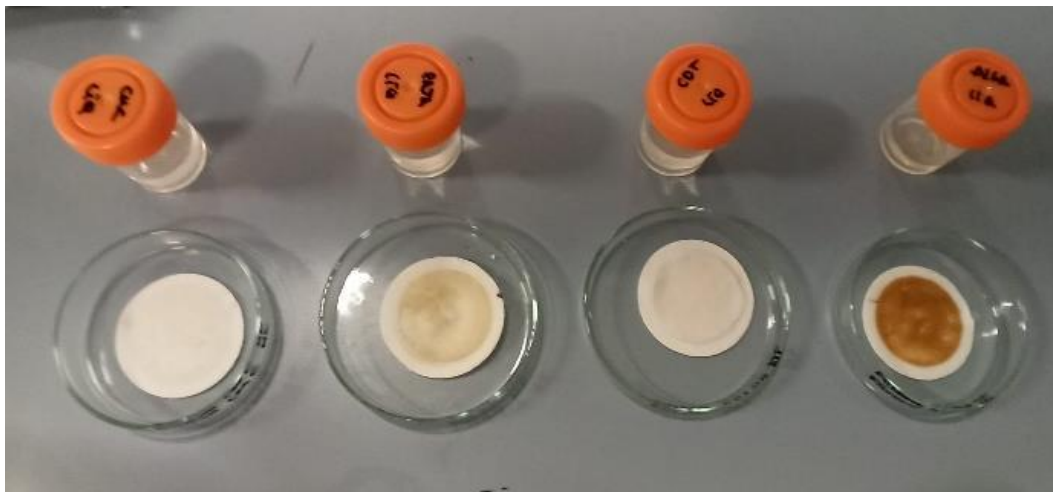


Figura XXIV: En esta imagen podemos observar los filtros de fibra de vidrio con el material obtenido del filtrado.

b. DLS

El tratamiento enzimático se realizó de dos maneras, con la enzima sin inmovilizar y con la enzima inmovilizada en nanopartículas de hierro. La inmovilización de la enzima es un proceso complejo que consta de varias fases, por tanto, para determinar si se realizó correctamente, se estudia si existen diferencias de tamaño entre las nanopartículas obtenidas en cada fase

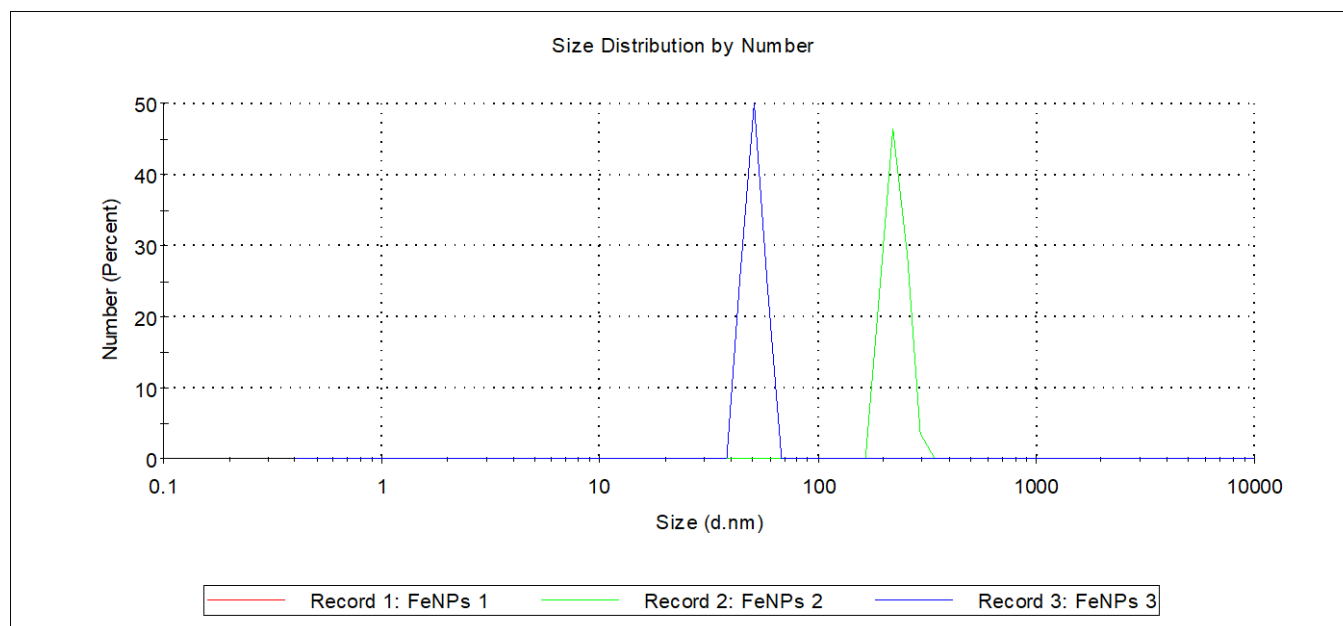
con el DLS. La hipótesis inicial es que, al añadir una capa en cada fase, debería haber un aumento en el tamaño de la nanopartícula.

i. Nanopartículas de hierro

Gracias al DLS llevado a cabo podemos observar dos tamaños de nanopartículas de hierro (Figura XXV y Tabla II), aquellas con tamaños de entre 40 y 60 nm y aquellas con tamaños de entre 190 y 295 nm. En el primer caso presentan mayor porcentaje en el tamaño de 50 nm y en el segundo caso en el tamaño de 220 nm (Tabla II), es decir, el tamaño predominante es el de 50 nm y 220 nm.

Tabla II: Resultados del DLS del tamaño y el porcentaje de las nanopartículas de hierro.

Tamaño (nm)	% en segunda medida	% en tercera medida
43,8	25	-
50,7	50	-
58,8	25	-
190	-	21,5
220	-	46,5
255	-	28,5
295	-	3,52



FiguraXXV: Esta gráfica representa el porcentaje de nanopartículas de cada tamaño en nm.

ii. Nanopartículas de hierro con quitosano

La hipótesis inicial es que al adicionar el quitosano debería haber un aumento en el tamaño de las nanopartículas. El DLS llevado a cabo en las nanopartículas de hierro con quitosano nos muestra que, respecto al caso anterior en el apartado 5.b.i., únicamente observamos un rango de tamaños,

de 140 a 220 nm (Figura XXVI y Tabla III), significando una menor distribución dimensional. Además, dentro de este rango encontramos que el tamaño predominante es de 190 nm con un 45,3% y después el tamaño de 164 nm con un porcentaje del 29,7%. Por lo tanto, según la hipótesis inicial podemos concluir que las nanopartículas grandes desaparecen y las pequeñas aumentan el tamaño entre 80-180 nm. La desaparición de las nanopartículas más grandes se puede deber a que durante la realización del tratamiento con quitosano se molieran más finamente.

Tabla III: Resultados del DLS del tamaño y el porcentaje de las nanopartículas de hierro con quitosano.

Tamaño (nm)	% en tercera medida
142	4,71
164	29,7
190	45,3
220	20,3

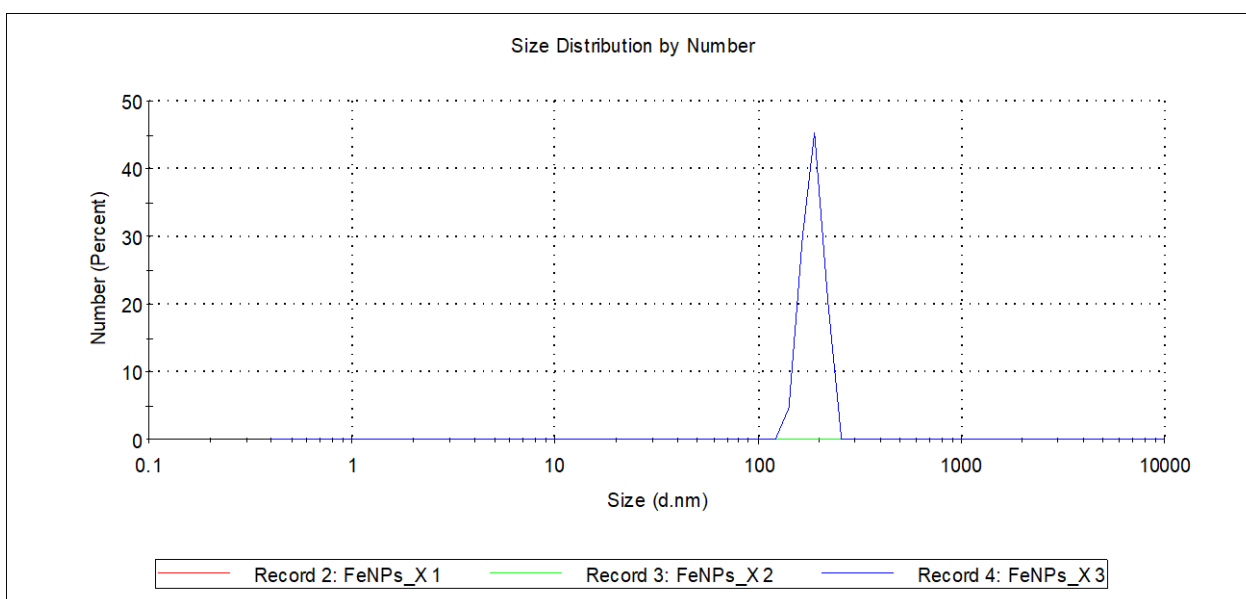


Figura XXVI: Esta gráfica representa el porcentaje de nanopartículas de cada tamaño en nm.

iii. Nanopartículas de hierro con quitosano y glutaraldehído

En este caso la hipótesis inicial es la misma que en el caso anterior, al adicionar glutaraldehído las nanopartículas deberían aumentar de tamaño. En el caso de las nanopartículas de hierro con quitosano y glutaraldehído el DLS también nos muestra un único tamaño (Figura XXVII), sin embargo, respecto al caso del apartado 5.b.ii., se puede observar un descenso en el porcentaje del tamaño de 190 nm, el cual ha disminuido a la mitad, y de 220 nm, en el que apenas hay porcentaje (Tabla IV). Además, encontramos un aumento en los tamaños de 164 nm, siendo en este caso el predominante, y el de 142 nm, el cual es el tercero más predominante y el que mayor aumento presenta, ya que ha aumentado 6 veces respecto al caso anterior (Tabla IV). Parece que no se ha cumplido nuestra hipótesis inicial ya que no solo no ha aumentado el tamaño, sino que parece que ha habido una disminución en el

tamaño de las nanopartículas de 190 nm a 164 nm, sin embargo, esto puede ser debido a que han aumentado de tamaño más cantidad de nanopartículas que antes medían 142 nm, a que las nanopartículas de 164 nm no han aumentado de tamaño y/o que las nanopartículas se hayan molido más finamente que en el caso anterior. También podemos ver que el tamaño de 220 nm ha disminuido 100 veces la cantidad de nanopartículas, esto puede ser debido a lo que se ha expuesto anteriormente de la molienda o a errores del equipo. Respecto al tamaño de 142 nm, ha habido un gran aumento, este resultado puede llegar a tener sentido si pensamos que las nanopartículas anteriores se han molido más finamente y que al adicionar el glutaraldehído ha habido un aumento del tamaño.

Tabla IV: Resultados del DLS del tamaño y el porcentaje de las nanopartículas de hierro con quitosano y glutaraldehído.

Tamaño (nm)	% en segunda medida
142	24,8
164	49,8
190	25,2
220	0,19

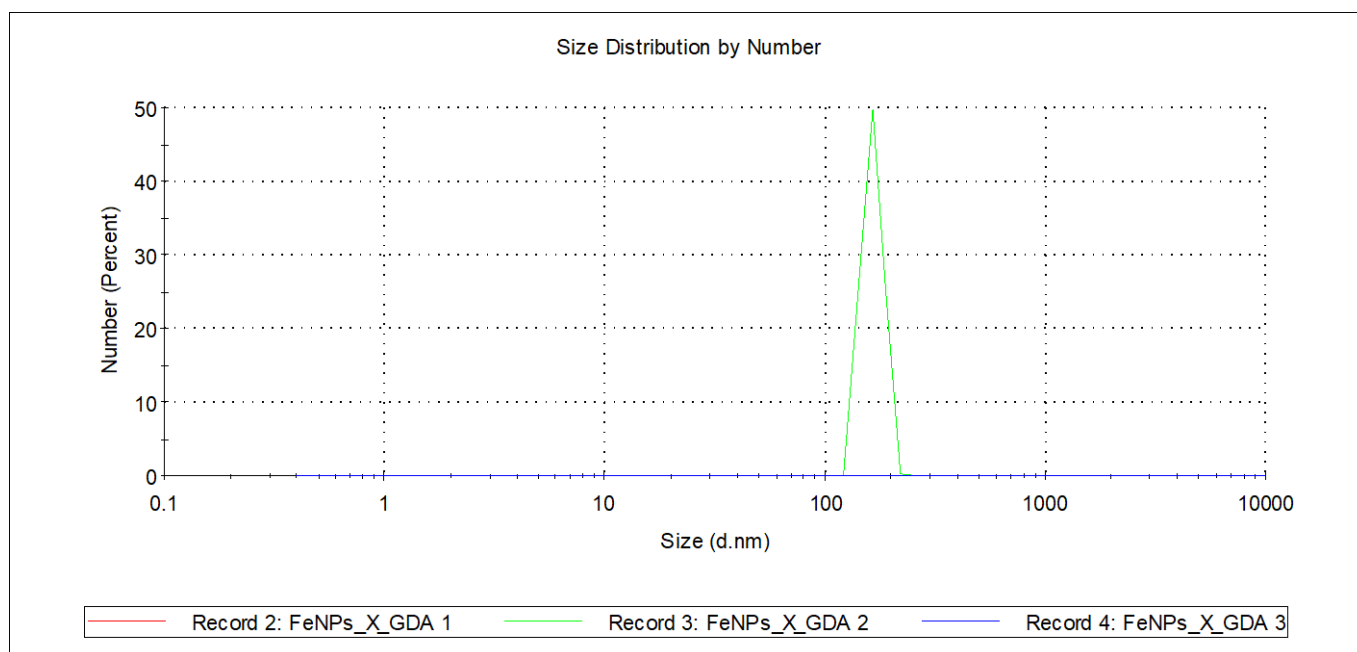


Figura XXVII: Esta gráfica representa el porcentaje de nanopartículas de cada tamaño en nm.

iv. Nanopartículas de hierro con la enzima inmovilizada

Las nanopartículas de hierro inmovilizadas también deberían presentar un aumento en el tamaño. En este caso parece que, si se ha cumplido la hipótesis inicial, al menos respecto al apartado 5.b.iii., ya que ha habido un pequeño aumento en el tamaño de las nanopartículas. El DLS muestra una distribución dimensional parecida a los dos casos anteriores (Figura XXVIII) y siguen predominando las nanopartículas del tamaño 164 nm, sin embargo, ha habido una disminución del 2% de ese tamaño y del de 142 nm y un aumento en un

2% en los tamaños de 190 nm y de 220 nm (Tabla V), por tanto, no ha habido un gran aumento, pero sí es existente.

Tabla V: Resultados del DLS del tamaño y el porcentaje de las nanopartículas de hierro inmovilizadas.

Tamaño (nm)	% en la tercera medida
142	22,7
164	47,7
190	27,3
220	2,34

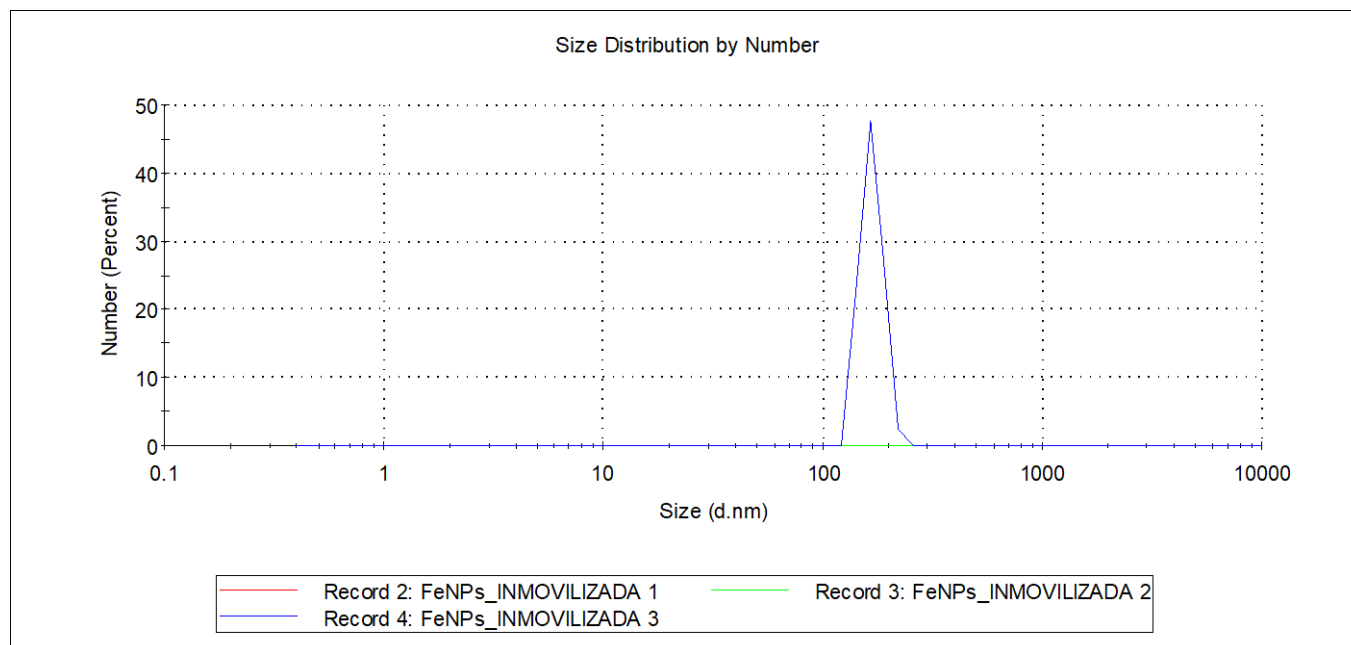


Figura XXVIII: Esta gráfica representa el porcentaje de nanopartículas de cada tamaño en nm.

c. FESEM

i. Pretratamiento

En primer lugar, como se ha comentado anteriormente, se ha realizado un pretratamiento a los residuos vegetales con el fin de eliminar ceras, suciedad, lignina etc. y disminuir la cristalinidad de la celulosa, mejorando así la eficiencia de la hidrólisis enzimática. Al alga y a la paja de arroz se les ha realizado un pretratamiento de NaOH y NaClO₂, y al algodón únicamente se le ha realizado una limpieza con Kieralon, un tensioactivo. Además, como control negativo, se llevó a cabo el procedimiento de la hidrólisis enzimática sin la enzima, con el fin de demostrar que la hidrólisis únicamente se debe a la presencia de la enzima y no a las condiciones del tratamiento.

Para demostrar lo anteriormente comentado en este mismo apartado se han realizado diferentes estudios, entre ellos la microscopía electrónica. Por tanto, se han observado bajo el microscopio electrónico los materiales sin tratar y los materiales tratados con NaOH, NaOH y NaClO₂ con el procedimiento de la hidrólisis sin enzima y Kieralon.

1. Alga

En el caso del alga se ha observado bajo el microscopio electrónico las fibras sin tratar, Figura XXIX A, y tratadas con NaOH, Figura XXIX B, a 100 aumentos, y tratadas con NaOH, NaClO₂ y con el procedimiento de la hidrólisis sin enzima, Figura XXIX C, a 196 aumentos. En primer lugar, la microscopía electrónica nos muestra que las fibras no tratadas, es decir, Figura XXIX A, se encuentran en agregados con tamaños de unos 103 μm, con partículas de suciedad y recubiertas de alguna sustancia indefinida. Sin embargo, las fibras tratadas, Figura XXIX B y Figura XXIX C, se presentan totalmente disgregadas en fibras con tamaños de entre 8 y 130 μm, sin partículas de suciedad y sin la sustancia que las recubría. Respecto a las fibras tratadas con ambos tratamientos y con el procedimiento de la hidrólisis sin enzima, Figura XXIX C, no se observan cambios morfológicos notables respecto a las fibras tratadas únicamente con NaOH. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos podemos concluir que gracias a la microscopía electrónica demostramos la eficacia del pretratamiento y que la hidrólisis no se debe a las condiciones en las que se realiza el tratamiento enzimático.

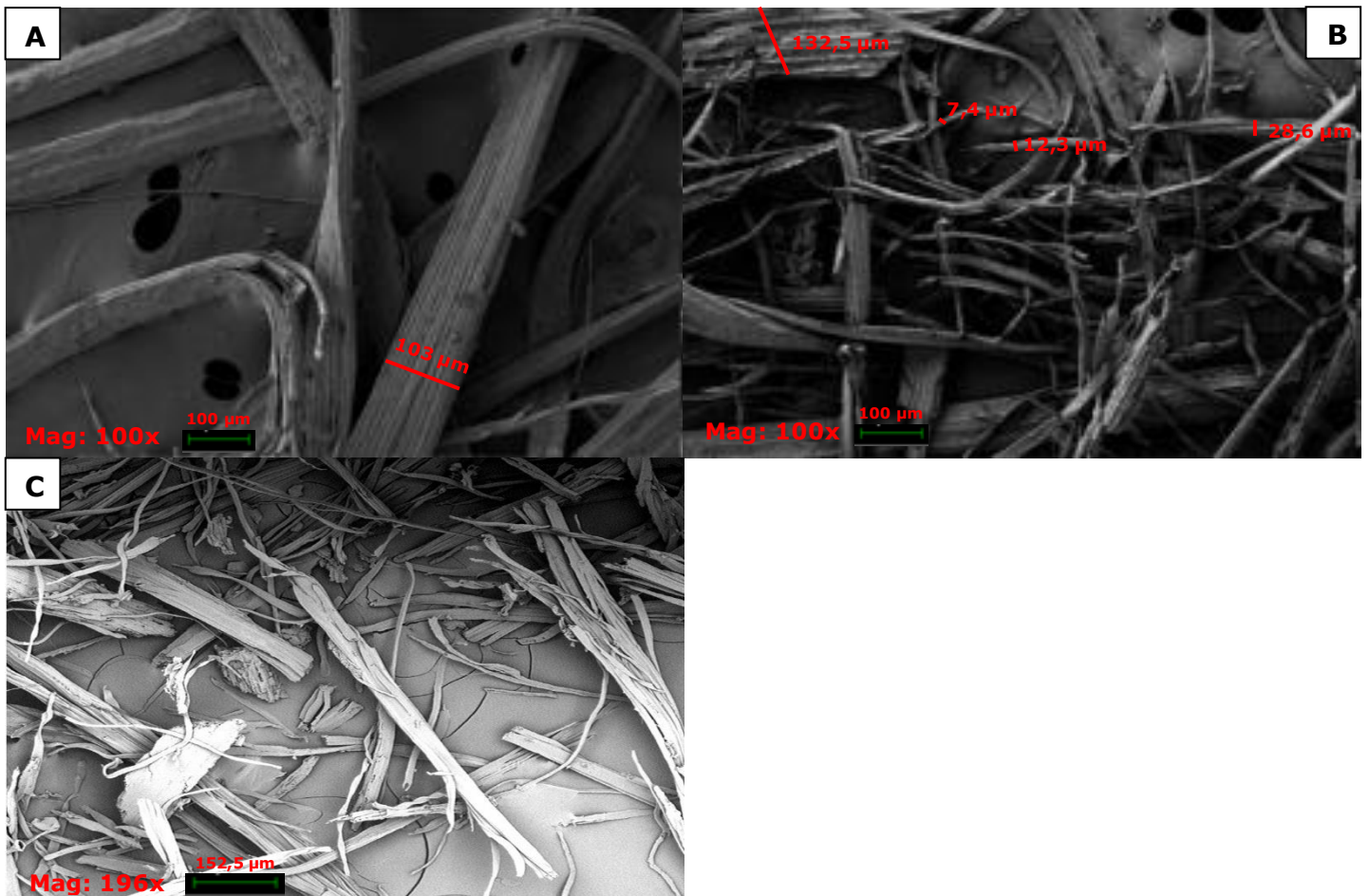


Figura XXIX: En la imagen A se muestra el alga sin tratar. En la imagen B se muestra el alga tratada solo con NaOH. En la imagen C se muestra el alga tratada tanto con NaOH como con NaClO₂.

2. Paja de arroz

En el caso de la paja de arroz se ha observado bajo el microscopio electrónico el material sin tratar, Figura XXX A, tratado con NaOH, Figura XXX B, y tratado con NaOH, NaClO₂ y con el procedimiento de la hidrólisis sin enzima, Figura XXX C, a 100 aumentos. La microscopía electrónica nos muestra en el caso de la paja sin tratar las fibras formando agregados de tamaños de más de 92,5 µm y en el caso de la paja tratada las fibras totalmente disgregadas y enmarañadas con tamaños de entre 4 y 25 µm. Respecto a las fibras tratadas con ambos tratamientos y con el procedimiento de la hidrólisis sin enzima no se puede percibir cambios morfológicos notables respecto a la tratada únicamente con NaOH, como en el caso anterior. Gracias a estos resultados podemos concluir que gracias a la microscopía electrónica demostramos eficacia del pretratamiento y qué la hidrólisis no se debe a las condiciones en las que se realiza el tratamiento enzimático.

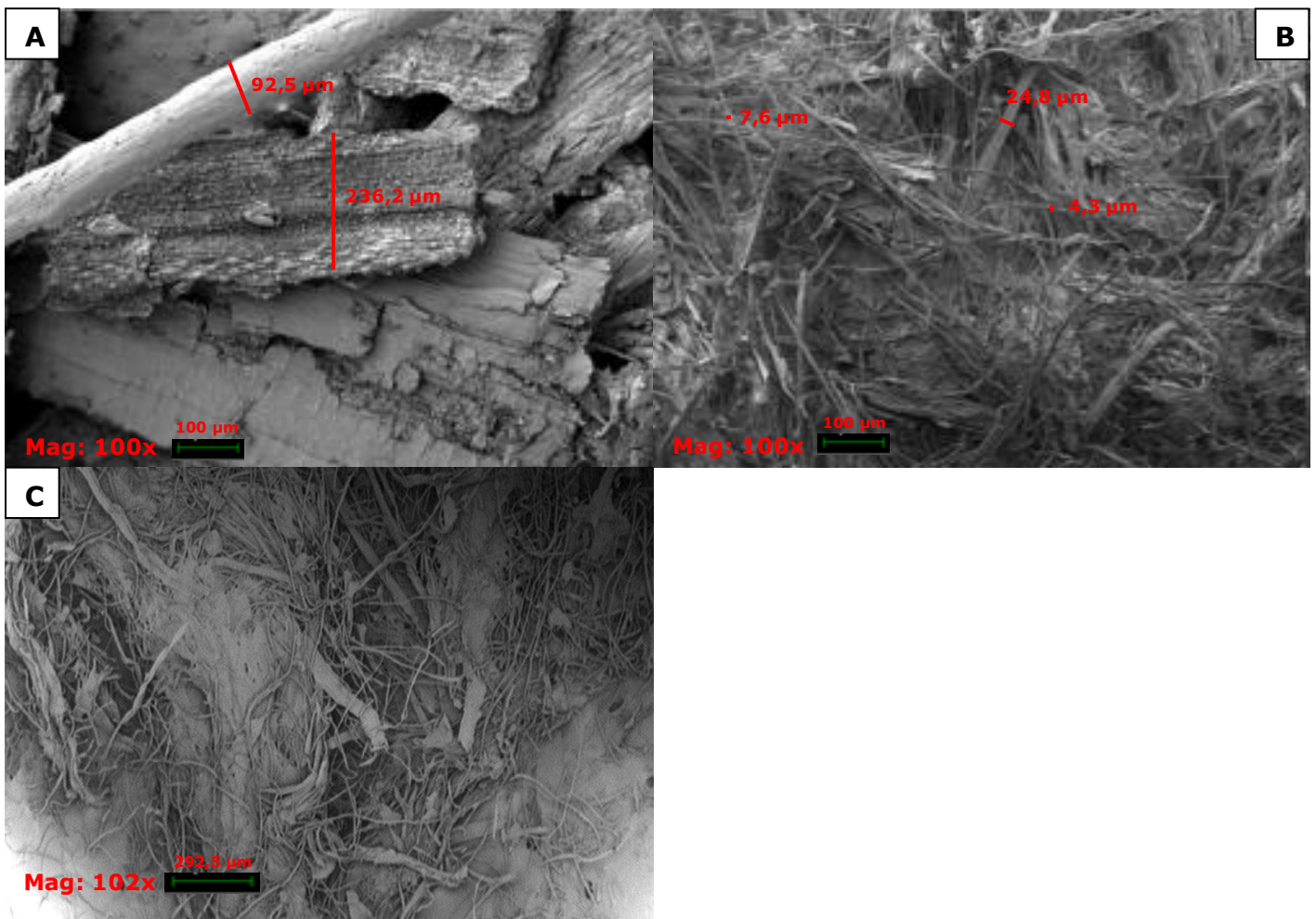


Figura XXX: En la imagen A se muestra la paja de arroz sin tratar. En la imagen B se muestra la paja tratada únicamente con NaOH. En la imagen C se muestra la paja de arroz tratada tanto con NaOH como con NaClO₂.

3. Algodón

En el caso del algodón se ha observado bajo el microscopio electrónico el material sin tratar, Figura XXXI A, y tratado con Kieralon, Figura XXXI B, a 5000 aumentos. En este caso la microscopía electrónica nos muestra que el algodón sin tratar presenta suciedad, las partículas que se observan claramente en la Figura XXXI A, y, sin embargo, el algodón tratado no la presenta, por tanto, el tratamiento ha cumplido su función. Además. También observamos que en el tratamiento SECo, Figura XXXI C, no se ha hidrolizado el algodón, por tanto las condiciones en las que se realiza el tratamiento enzimático no hidrolizan al algodón.

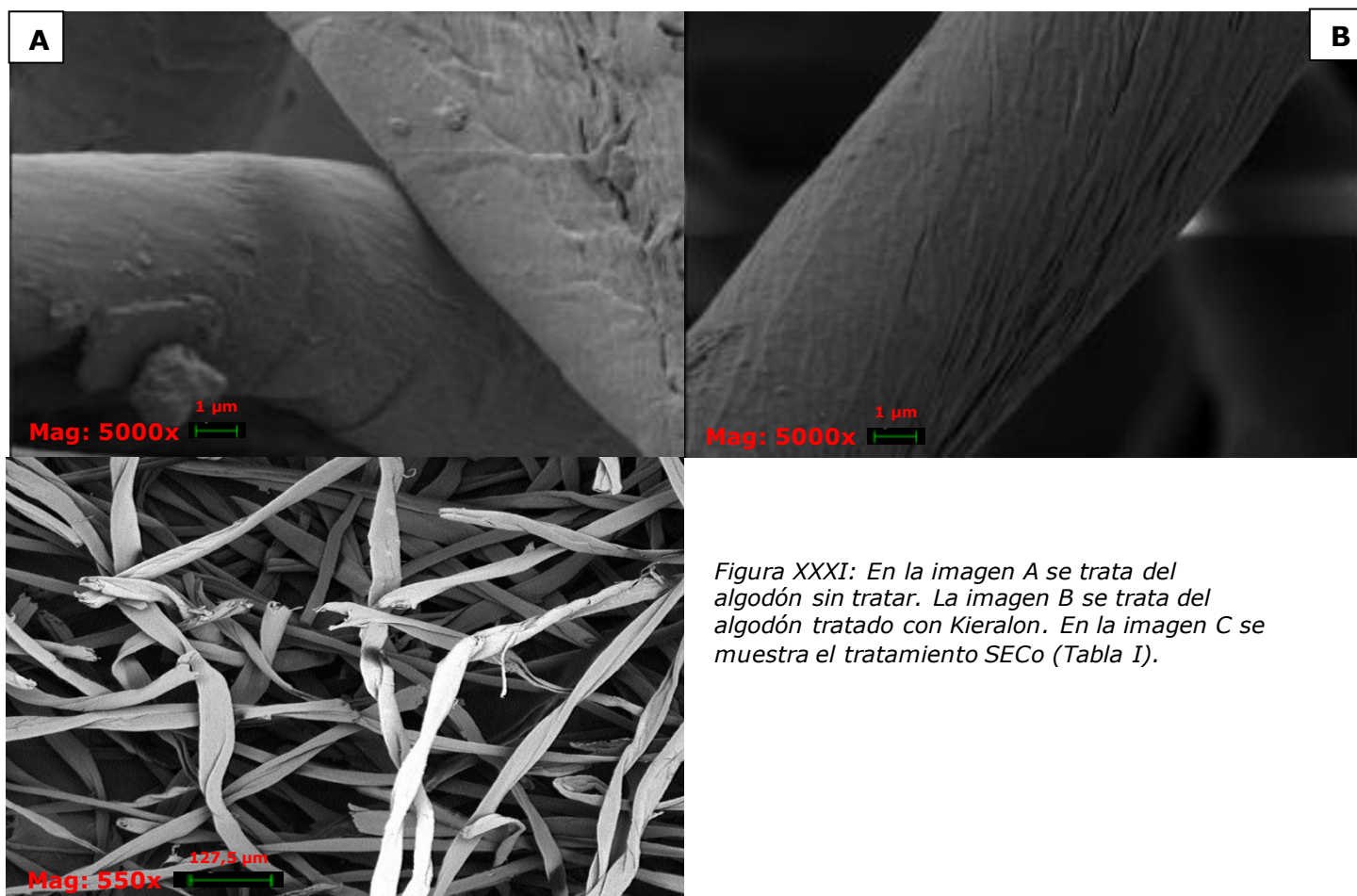


Figura XXXI: En la imagen A se trata del algodón sin tratar. La imagen B se trata del algodón tratado con Kieralon. En la imagen C se muestra el tratamiento SECo (Tabla I).

ii. Fases de la inmovilización de la enzima

El tratamiento enzimático se realizó de dos maneras, con la enzima sin inmovilizar y con la enzima inmovilizada en nanopartículas de hierro. La inmovilización de la enzima es un proceso complejo que consta de varias fases, por tanto, para determinar si existen diferencias morfológicas entre ellas se observó bajo el microscopio electrónico las diferentes fases de la inmovilización, y así, determinar si se ha realizado correctamente.

Al observar bajo el microscopio electrónico las diferentes fases de la inmovilización, Figura XXXII A, B, C y D, no encontramos diferencias.

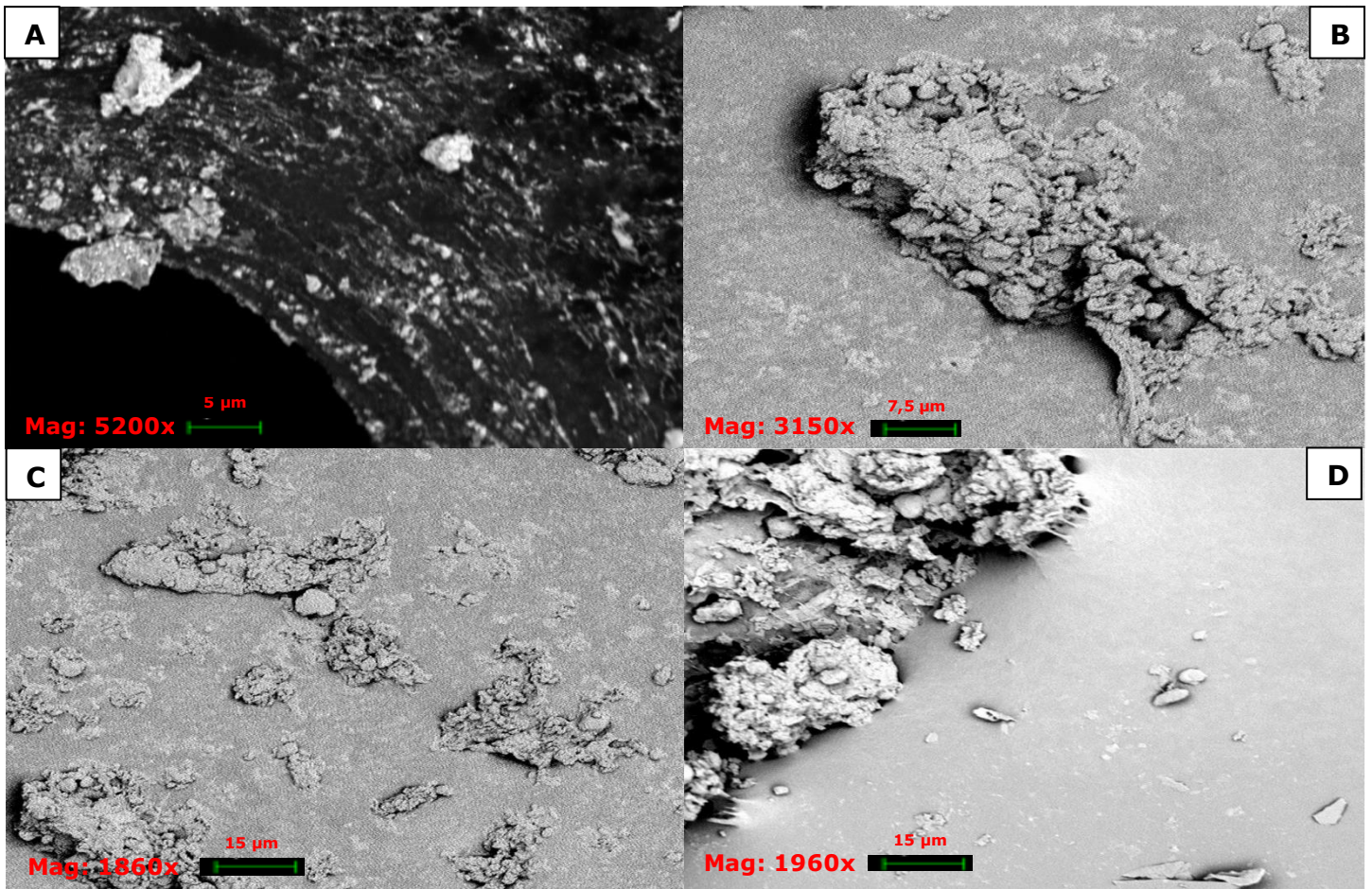


Figura XXXII: En la imagen A se muestran las nanopartículas de hierro. En la imagen B se muestran nanopartículas de hierro con quitosano. En la imagen C se muestran nanopartículas de hierro con quitosano y glutaraldehído. En la imagen D se muestran las nanopartículas de hierro con quitosano, glutaraldehído y la enzima inmovilizada.

iii. Tratamiento enzimático

Con el objetivo de revalorizar residuos vegetales obteniendo nanocelulosa, se realizó una hidrólisis enzimática. Ésta, se realizó con la enzima suelta e inmovilizada a diferentes concentraciones y se utilizaron 3 materiales, alga *Poseidonea*, algodón y paja de arroz. Además, se realizó un control + y un control -, el primero se trata de un tratamiento con carboximetilcelulosa ya que es celulosa pura la cual debería ser perfectamente hidrolizada por la celulasa, y el segundo se trata de llevar a cabo un procedimiento sin enzima, para demostrar que la hidrólisis se debe a la acción de la enzima y no a las condiciones del procedimiento.

Para demostrar la hidrólisis enzimática se han realizado varios estudios, entre ellos la microscopía electrónica, de cada material y tratamiento, especificados en la Tabla I.

1. Alga

Se observaron bajo el microscopio electrónico el resultado de los siguientes tratamientos (todos detallados en la Tabla I): SEAlga a 196 aumentos, EAlga a 130 aumentos, NPEAlga a 158 aumentos, EAlga4 a 200 aumentos y a 5000 aumentos y NPEAlga4 a 200 aumentos. En este caso la microscopía electrónica nos muestra qué en los tratamientos EAlga, Figura XXXIII B, y NPEAlga, Figura XXXIII C, existe una mezcla entre las fibras micrométricas de tamaño de 100 μm o más y las fibras nanométricas de 1800 nm más o menos siendo más abundantes las primeras, por tanto, no hemos llegado al objetivo de obtener nanocelulosa con estos tratamientos. Esto se debe a que se ha utilizado demasiado poca cantidad de celulasa suelta e inmovilizada para tratar demasiada cantidad de alga. Por ello, realizamos los tratamientos de EAlga4 y NPEAlga4, dónde aumentamos cuatro veces la cantidad de enzima y disminuimos cuatro veces la cantidad de alga a tratar.

La microscopía de los tratamientos EAlga4, Figura XXXIII D y Figura XXXIII E, y NPEAlga4, Figura XXXIII F, nos muestra que sí se ha producido una hidrólisis. En la Figura XXXIII D observamos una mezcla de fibras con tamaños de entre 6-12 μm y de nanopartículas de celulosa con tamaños de entre 200-300 nm, los cuales podemos medir gracias a la Figura XXXIII E. En la Figura XXXIII F, el tratamiento NPEAlga4, observamos un film de azúcares con algunos restos de nanofibras de tamaño 9,2 μm y alguna que otra nanopartícula de enzima inmovilizada. Por tanto, podemos afirmar que los tratamientos con cuatro veces más de celulasa y cuatro veces menos de alga son eficaces en la obtención de nanocelulosa. De hecho, en el tratamiento realizado con enzima inmovilizada en nanopartículas de hierro ha habido tanta degradación que ya ni siquiera obtenemos nanocristales o nanofibras sino directamente un film pegajoso de azúcares totalmente disueltos. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado también podemos concluir que, para la enzima inmovilizada, cuatro veces más de cantidad es excesivo, produciendo una degradación casi completa de la celulosa. Esto último se puede deber a que el hierro se considera un catalizador [29] y podría estar participando como tal en la reacción enzimática. Siguiendo el hilo de la conclusión anterior, podría preocuparnos que el hierro actúe por sí mismo hidrolizándola celulosa, sin embargo, el tratamiento NPEAlga, Figura XXXIII C, nos libera de dudas, a que en este tratamiento no había suficiente enzima en el medio y no obtenemos prácticamente hidrólisis.

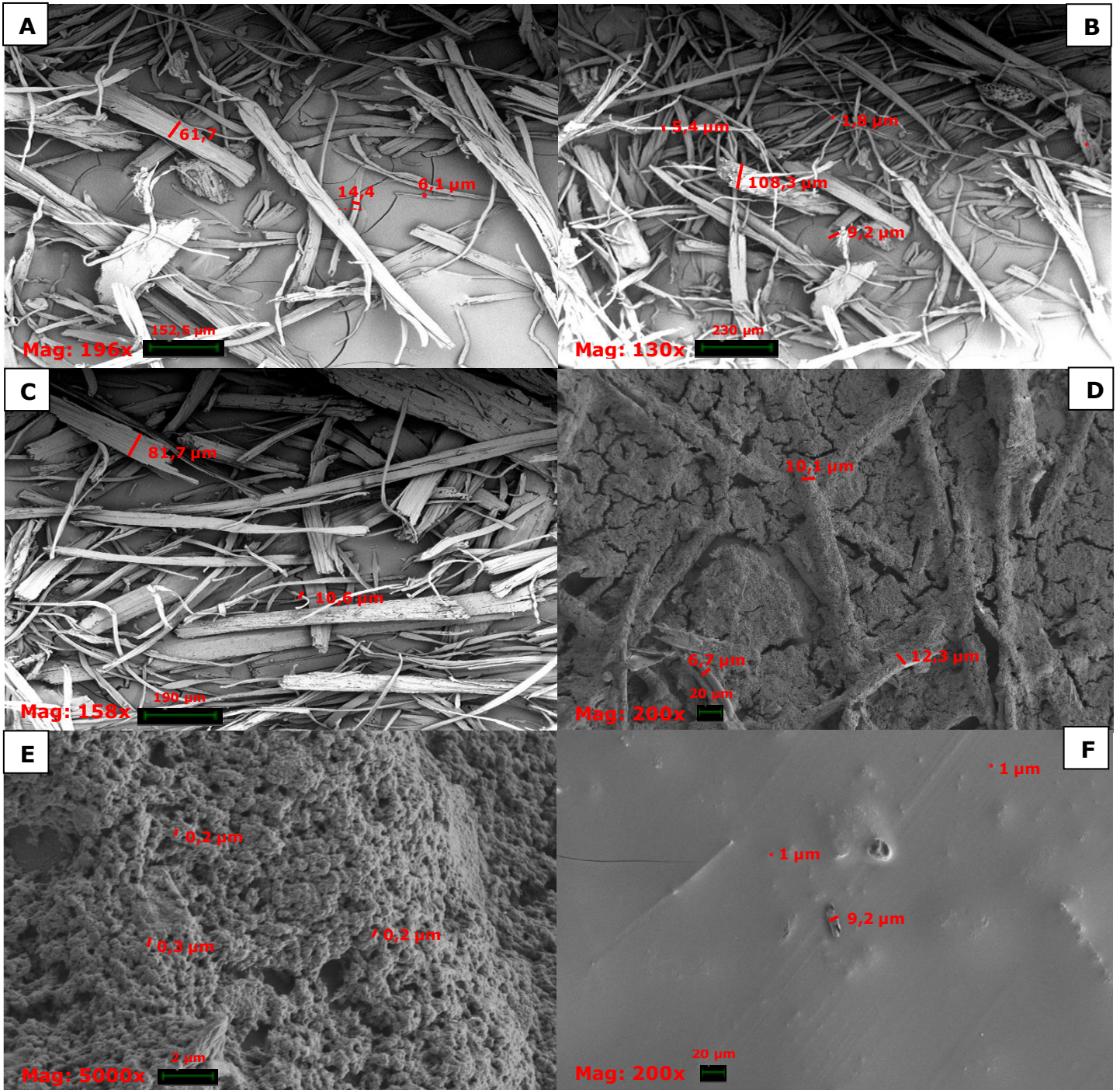


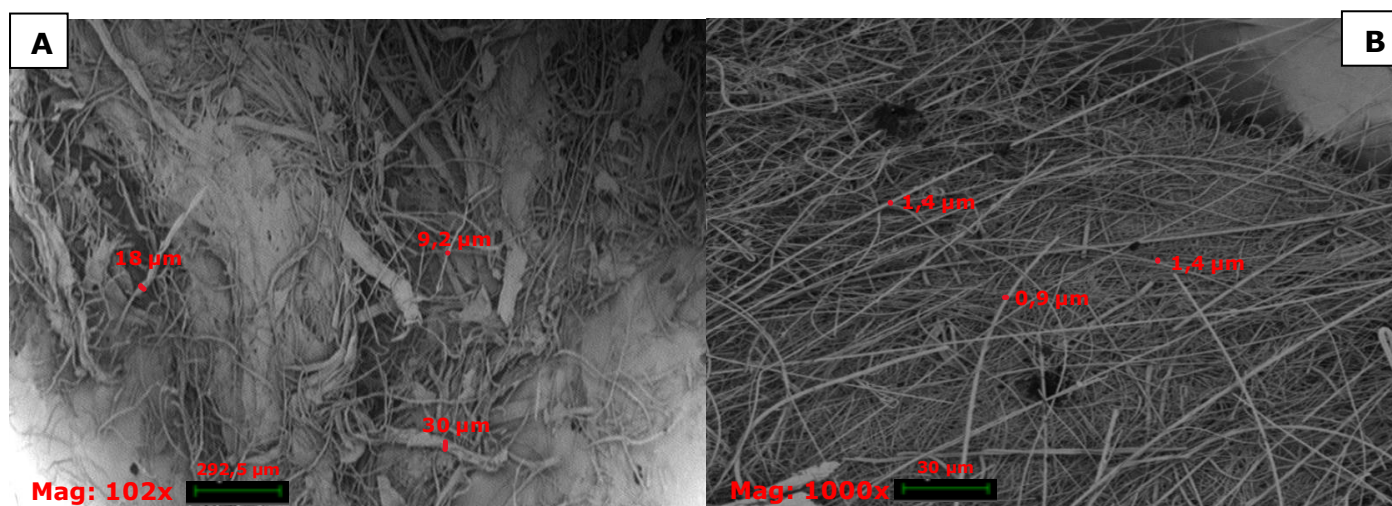
Figura XXXIII: En la imagen A se muestra el resultado del tratamiento SEAlga. En la imagen B se muestra el resultado del tratamiento EAlga. En la imagen C se muestra el resultado del tratamiento NPEAlga. En las imágenes D y E se muestra el resultado del tratamiento EAlga4. En la imagen F se muestra el resultado del tratamiento NPEAlga4.

2. Paja de arroz

Se observaron bajo el microscopio electrónico el resultado de los siguientes tratamientos (todos detallados en la Tabla I): SEPaja a 102 aumentos, EPaja a 1000 aumentos, NPEPaja a 960 aumentos, EPaja4 a 5000 aumentos y

NPEPaja4 a 200 aumentos. En este caso la microscopía electrónica nos muestra qué en los tratamientos EPaja, Figura XXXIV B, y NPEPaja, Figura XXXIV C, existe una mezcla entre las fibras micrométricas y las fibras nanométricas siendo más abundantes las primeras, por tanto, no hemos llegado al objetivo de obtener nanocelulosa con estos tratamientos, sobre todo en el tratamiento NPEPaja, ya que en el EPaja sí hemos conseguido fibras de menores tamaños, de entre 0,9 y 1 μm . Esto se debe a que se ha utilizado demasiado poca cantidad de celulasa suelta e inmovilizada para tratar demasiada cantidad de alga. Por ello, realizamos los tratamientos de EPaja4 y NPEPaja4, dónde aumentamos cuatro veces la cantidad de enzima y disminuimos cuatro veces la cantidad de alga a tratar.

La microscopía de los tratamientos EPaja4, Figura XXXIV D, y NPEPaja4, Figura XXXIV E, nos muestra que sí se ha producido una hidrólisis. En la Figura XXXIV D observamos una mezcla de fibras con tamaños de 6,2 μm y de nanopartículas de celulosa con tamaños de entre 100-300 nm. En la Figura XXXIV E, el tratamiento NPEPaja4, observamos un film de azúcares con algunos restos de nanopartícula de enzima inmovilizada. Por tanto, podemos afirmar que los tratamientos con cuatro veces más de celulasa y cuatro veces menos de alga son eficaces en la obtención de nanocelulosa. De hecho, en el tratamiento realizado con enzima inmovilizada en nanopartículas de hierro ha habido tanta degradación que ya ni siquiera obtenemos nanocristales o nanofibras sino directamente un film pegajoso de azúcares totalmente disueltos. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado también podemos concluir que, para la enzima inmovilizada, cuatro veces más de cantidad es excesivo, produciendo una degradación casi completa de la celulosa. Esto último se puede deber a que el hierro se considera un catalizador [29] y podría estar participando como tal en la reacción enzimática. Siguiendo el hilo de la conclusión anterior, podría preocuparnos que el hierro actúe por sí mismo hidrolizando la celulosa, sin embargo, el tratamiento NPEPaja, Figura XXXIV C, nos libera de dudas, ya que en este tratamiento no había suficiente enzima en el medio y no obtenemos prácticamente hidrólisis.



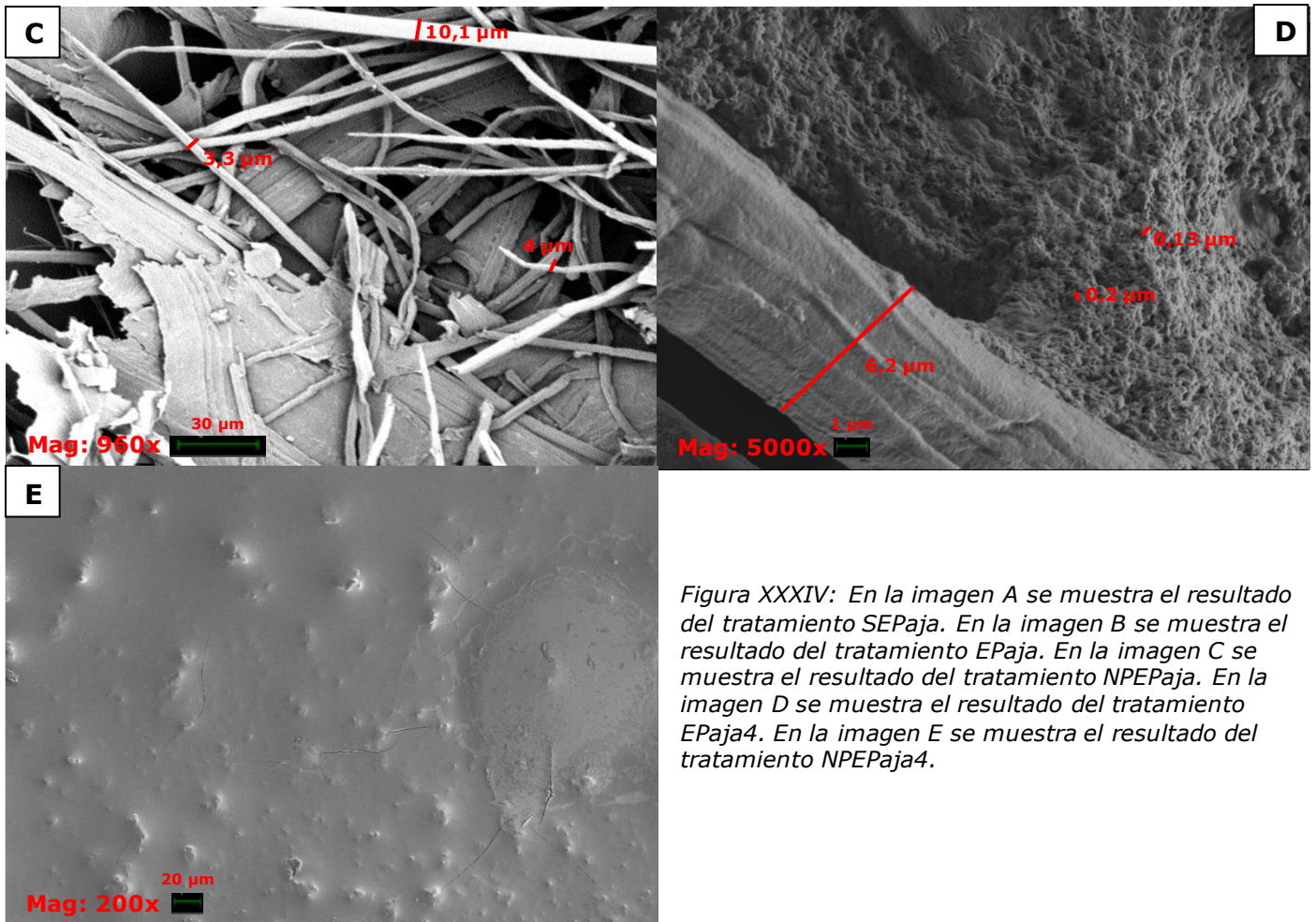


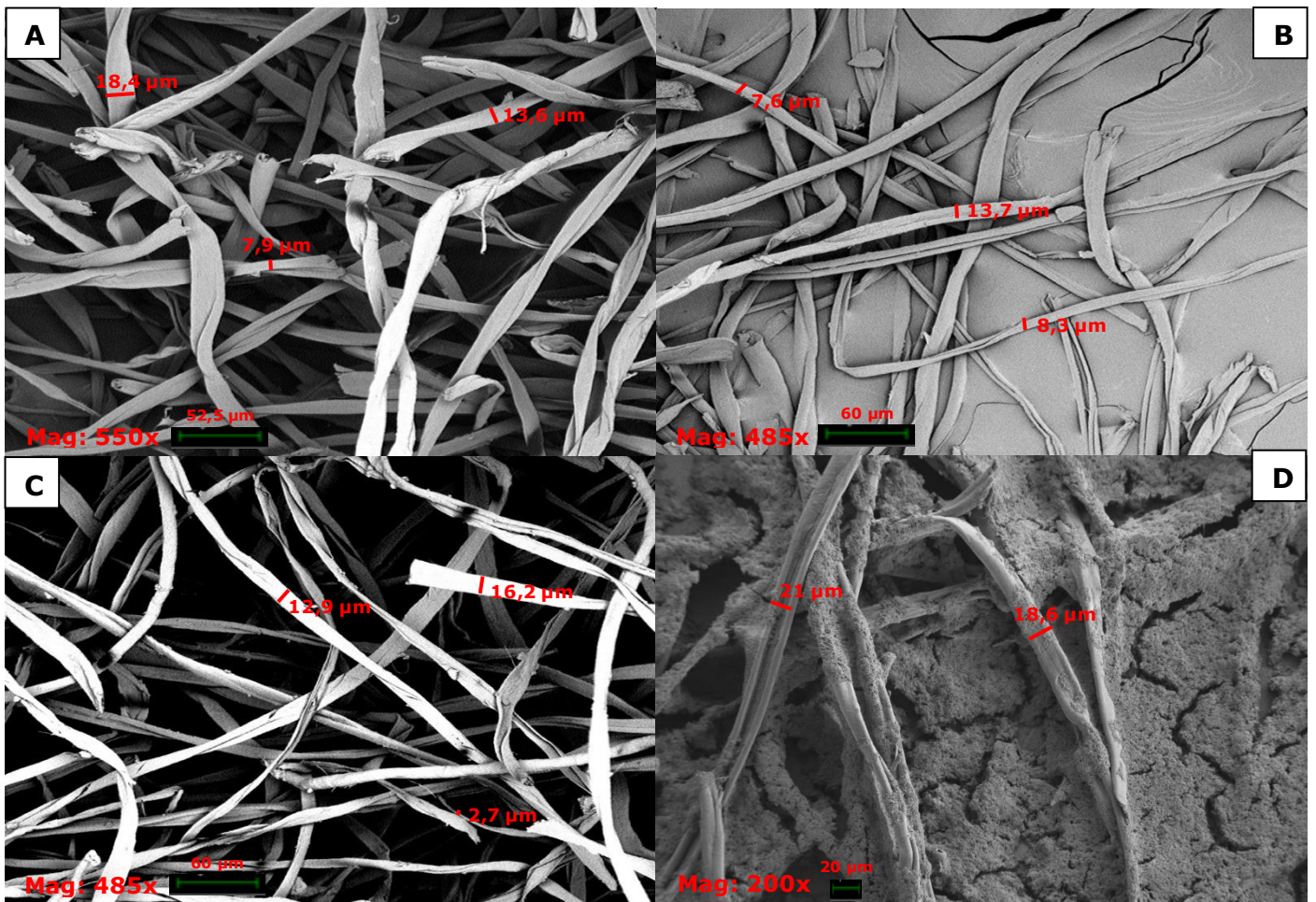
Figura XXXIV: En la imagen A se muestra el resultado del tratamiento SEPaja. En la imagen B se muestra el resultado del tratamiento EPaja. En la imagen C se muestra el resultado del tratamiento NPEPaja. En la imagen D se muestra el resultado del tratamiento EPaja4. En la imagen E se muestra el resultado del tratamiento NPEPaja4.

3. Algodón

Se observaron bajo el microscopio electrónico el resultado de los siguientes tratamientos (todos detallados en la Tabla I): SECo a 550 aumentos, EACo a 485 aumentos, NPECo a 485 aumentos, ECo4 a 200 aumentos y a 5000 aumentos y NPECo4 a 200 aumentos. En este caso la microscopía electrónica nos muestra qué en los tratamientos ECo, Figura XXXV B, y NPECo, Figura XXXV C, existe una mezcla entre las fibras micrométricas y las fibras nanométricas siendo más abundantes las primeras, por tanto, no hemos llegado al objetivo de obtener nanocelulosa con estos tratamientos. Esto se debe a que se ha utilizado demasiada poca cantidad de celulasa suelta e inmovilizada para tratar demasiada cantidad de alga. Por ello, realizamos los tratamientos de ECo4 y NPECo4, dónde aumentamos cuatro veces la cantidad de enzima y disminuimos cuatro veces la cantidad de alga a tratar.

La microscopía de los tratamientos ECo4, Figura XXXV D y Figura XXXV E, y NPECo4, Figura XXXV F, nos muestra que sí se ha producido una hidrólisis. En la Figura XXXV D observamos una mezcla de fibras con tamaños de unos 20 μm y de nanopartículas de celulosa con tamaños de entre 0,4-0,5 μm, los cuales podemos medir gracias a la Figura XXXV E. En la Figura XXXV F, el tratamiento NPECo4, observamos un film de azúcares con algunos restos

de nanofibras de tamaño entre 1-4 μm . Por tanto, podemos afirmar que los tratamientos con cuatro veces más de celulasa y cuatro veces menos de alga son eficaces en la obtención de nanocelulosa. De hecho, en el tratamiento realizado con enzima inmovilizada en nanopartículas de hierro ha habido tanta degradación que ya ni siquiera obtenemos nanocristales o nanofibras sino directamente un film pegajoso de azúcares totalmente disueltos. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado también podemos concluir que, para la enzima inmovilizada, cuatro veces más de cantidad es excesivo, produciendo una degradación casi completa de la celulosa. Esto último se puede deber a que el hierro se considera un catalizador [29] y podría estar participando como tal en la reacción enzimática. Siguiendo el hilo de la conclusión anterior, podría preocuparnos que el hierro actúe por sí mismo hidrolizándola celulosa, sin embargo, el tratamiento NPECo, Figura XXXV C, nos libera de dudas, ya que en este tratamiento no había suficiente enzima en el medio y no obtenemos prácticamente hidrólisis.



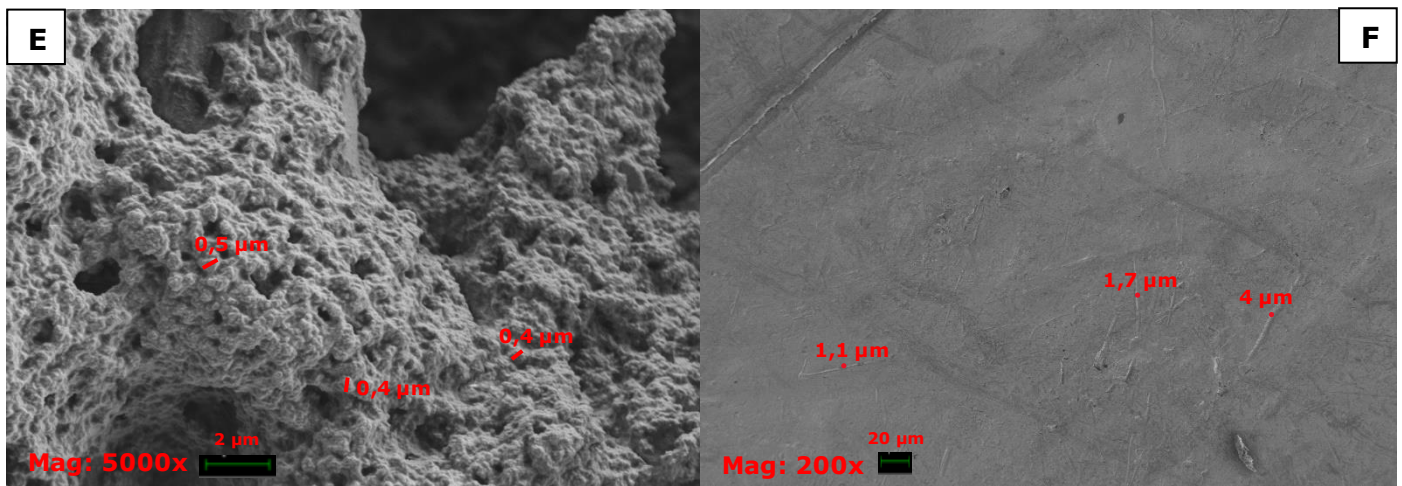


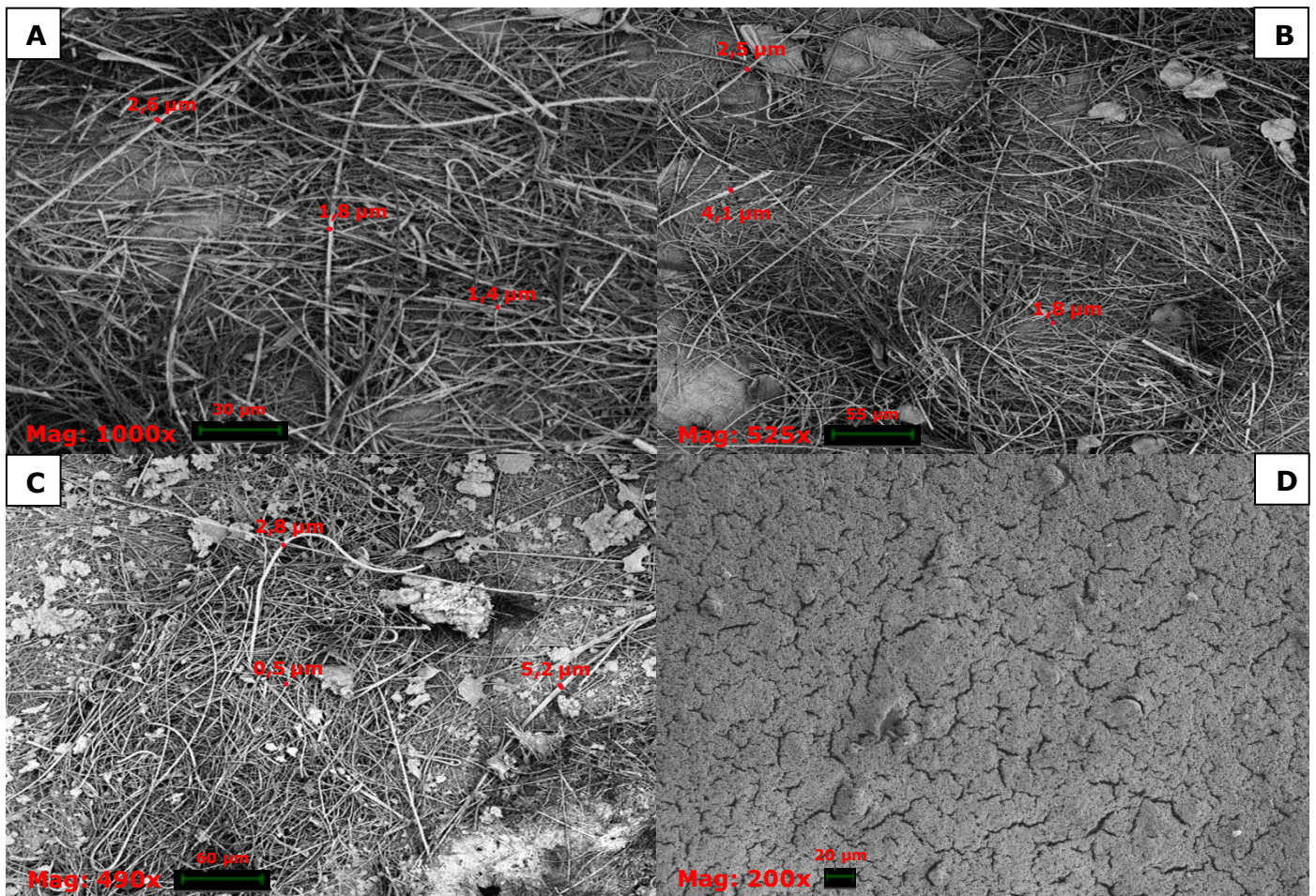
Figura XXXV: En la imagen A se muestra el resultado del tratamiento SECo. En la imagen B se muestra el resultado del tratamiento ECo. En la imagen C se muestra el resultado del tratamiento NPECo. En las imágenes D y E se muestra el resultado del tratamiento ECo4. En la imagen F se muestra el resultado del tratamiento NPECo4.

4. Carboximetilcelulosa

Se observaron bajo el microscopio electrónico el resultado de los siguientes tratamientos (todos detallados en la Tabla I): SECMC a 1000 aumentos, ECMC a 525 aumentos, NPECMC a 490 aumentos, ECMC4 a 200 aumentos y a 5000 aumentos y NPECMC4 a 2000 aumentos. En este caso la microscopía electrónica nos muestra qué en los tratamientos ECMC, Figura XXXVI B, y NPECMC, Figura XXXVI C, existe una mezcla entre las fibras micrométricas y las fibras nanométricas siendo más abundantes las primeras, por tanto, no hemos llegado al objetivo de obtener nanocelulosa con estos tratamientos. Esto se debe a que se ha utilizado demasiado poca cantidad de celulosa suelta e inmovilizada para tratar demasiada cantidad de alga. Por ello, realizamos los tratamientos de ECMC4 y NPECMC4, dónde aumentamos cuatro veces la cantidad de enzima y disminuimos cuatro veces la cantidad de alga a tratar.

La microscopía de los tratamientos ECMC4, Figura XXXVI D y Figura XXXVI E, y NPECMC4, Figura XXXVI F, nos muestra que sí se ha producido una hidrólisis. En la Figura XXXVI D observamos únicamente nanopartículas de celulosa con tamaños de entre 300-500 nm, los cuales podemos medir gracias a la Figura XXXVI E. En la Figura XXXVI F, el tratamiento NPECMC4, observamos un film de azúcares con algunos restos de nanopartícula de enzima inmovilizada. Por tanto, podemos afirmar que los tratamientos con cuatro veces más de celulosa y cuatro veces menos de alga son eficaces en la obtención de nanocelulosa. De hecho, en el tratamiento realizado con enzima inmovilizada en nanopartículas de hierro ha habido tanta degradación que ya ni siquiera obtenemos nanocristales o nanofibras sino directamente un film pegajoso de azúcares totalmente disueltos. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado también podemos concluir que, para la enzima inmovilizada, cuatro veces más de cantidad es excesivo, produciendo una degradación casi completa de la celulosa. Esto último se puede deber a que el hierro se considera un catalizador [29] y podría estar

participando como tal en la reacción enzimática. Siguiendo el hilo de la conclusión anterior, podría preocuparnos que el hierro actúe por sí mismo hidrolizándola celulosa, sin embargo, el tratamiento NPECMC, Figura XXXVI C, nos libera de dudas, ya que en este tratamiento no había suficiente enzima en el medio y no obtenemos prácticamente hidrólisis. Por último, ya que el tratamiento con CMC se realiza como control +, al ser celulosa pura debería degradarse sí o sí, podemos concluir que en los tratamientos ECMC y NPECMC pueden haber ocurrido dos cosas, o no ha habido suficiente celulosa para degradar la CMC o la enzima no ha funcionado. Sin embargo, en los tratamientos ECMC4 y NPECMC4 sí podríamos concluir que la enzima funcionaba correctamente, ya que ha degradado perfectamente la CMC.



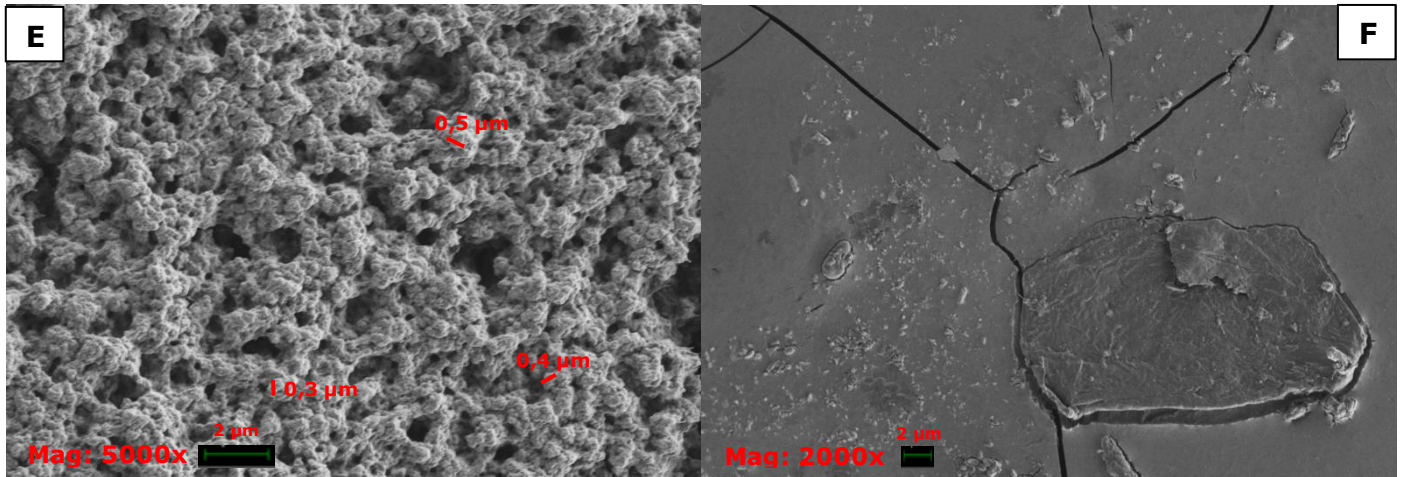


Figura XXXVI: En la imagen A se muestra el resultado del tratamiento SECMC. En la imagen B se muestra el resultado del tratamiento ECMC. En la imagen C se muestra el resultado del tratamiento NPECMC. En las imágenes D y E se muestra el resultado del tratamiento ECMC. En la imagen F se muestra el resultado del tratamiento NPFCMC.

d. FTIR

i. Pretratamiento

En primer lugar, como se ha comentado anteriormente, se ha realizado un pretratamiento a los residuos vegetales con el fin de eliminar ceras, suciedad, lignina etc. y disminuir la cristalinidad de la celulosa, mejorando así la eficiencia de la hidrólisis enzimática. Al alga y a la paja de arroz se les ha realizado un pretratamiento de NaOH y NaClO₂, y al algodón únicamente se le ha realizado una limpieza con Kieralon, un tensioactivo.

Para demostrar la eficacia de estos pretratamientos se han realizado diferentes estudios entre ellos la espectroscopia de infrarrojo. Por tanto, se han analizado los materiales sin tratar y los materiales tratados con NaOH, NaOH y NaClO₂ y Kieralon.

1. Alga

En el caso del alga se han analizado las fibras sin tratar, tratadas con NaOH y tratadas con NaOH y NaClO₂. Gracias al FTIR podemos comparar entre ellas y en la Figura XXXVII destacan los siguientes picos [25]:

- Pico 1040: este pico representa al enlace C-O-C de las glucosas que conforman la celulosa, su disminución significa que se está rompiendo y, por tanto, produciendo oxichelulosa. En la Figura XXXVII podemos observar un pico hacia abajo en el alga tratada, mientras que en el alga sin tratar no encontramos ningún pico. Si comparamos entre el alga tratada únicamente con NaOH y tratada con ambos tratamientos, encontramos el mismo pico hacia abajo en ambos casos.
- Pico 1098: este pico representa al enlace C-O, debería disminuir cuando se realiza el tratamiento enzimático, ya que significa despolimerización. En el pretratamiento se puede observar una

- bajada prácticamente imperceptible entre el alga tratada y el alga con tratamientos.
- Pico 1160: este pico representa al enlace C-O-C β -1,4 el cual une las diferentes glucosas que conforman la celulosa, por tanto, una disminución en este enlace representaría una despolimerización de la celulosa. En este caso podemos observar que no existen diferencias entre el alga sin tratar y el alga tratada, sin embargo, sí debería existir cuando se realice el tratamiento enzimático.
 - Pico 1428: este pico representa la cristalinidad de la celulosa, por tanto, si disminuye también lo hace la cristalinidad, lo cual debería suceder con el tratamiento enzimático. En este caso no podemos encontrar diferencias entre el alga sin tratar y tratada.
 - Pico 1781: este pico representa grupos aromáticos de la lignina, por tanto, si hay un aumento significa que también lo hace la cantidad de lignina. Ya que realizamos los pretratamientos con el objetivo de disminuir, entre otras cosas, la lignina, debería disminuir. Sin embargo, observamos que no existe ningún tipo de pico en el material, ni siquiera en el sin tratar.
 - Pico 2846: este pico representa el estiramiento del enlace C-H de ceras y ligninas. Por tanto, una disminución de este enlace significa también una disminución de estas, lo cual buscamos con los pretratamientos. De hecho, en la Figura XXXVII podemos observar una disminución en el pico del alga tratada, en ambos casos, respecto al alga sin tratar, lo cual significa que los tratamientos han sido eficaces.
 - Pico 2927: este pico representa enlaces C-H, en la Figura XXXVII observamos una clara disminución entre el pico del alga tratada, en ambos casos, respecto al alga sin tratar.
 - pico 3282: este pico representa los grupos O-H. Al romper los enlaces C-O-C de la celulosa se obtiene más grupos O-H, por tanto, al despolimerizar deberíamos obtener picos más pronunciados. Sin embargo, en el pretratamiento no encontramos cambios entre el alga sin tratar y el alga tratada en ambos casos.

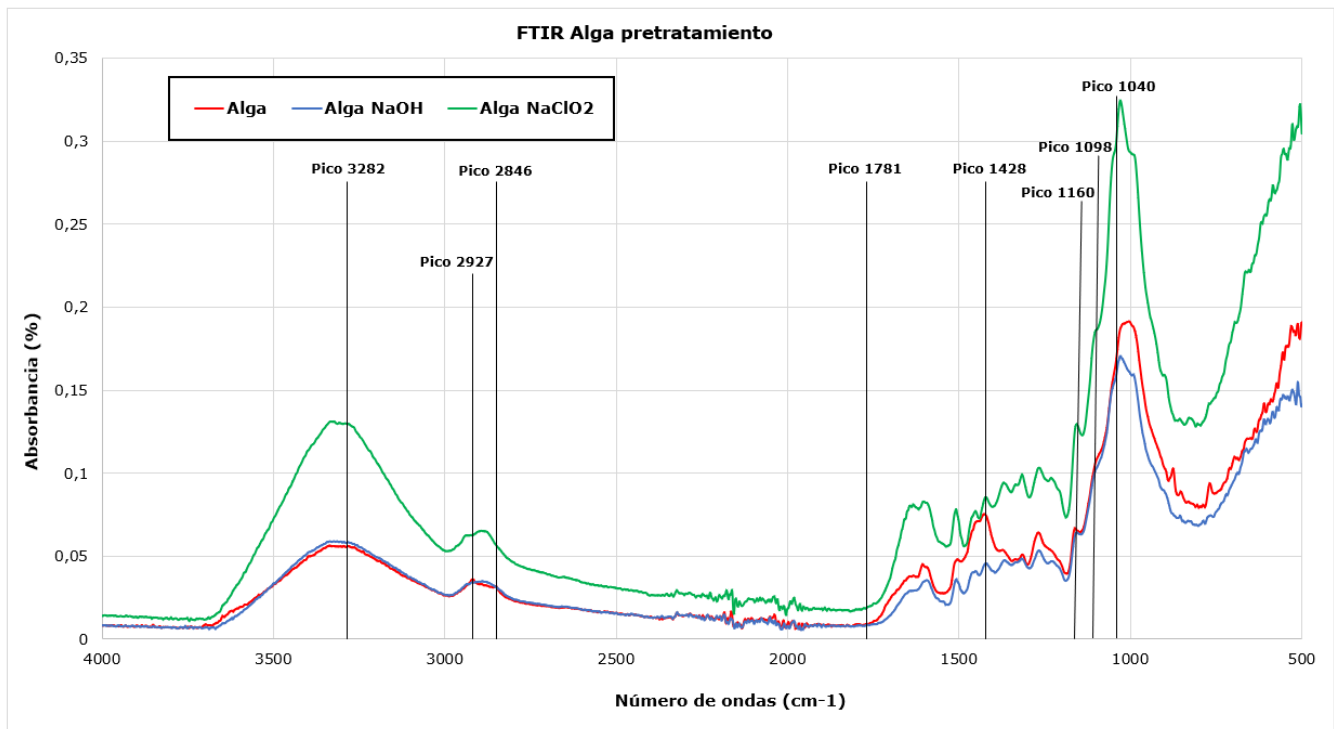


Figura XXXVII: FTIR del alga sin tratar y tratada con NaOH y NaOH y NaClO₂.

2. Paja de arroz

En el caso la paja de arroz se han analizado las fibras sin tratar, tratadas con NaOH y tratadas con NaOH y NaClO₂. Gracias al FTIR podemos comparar entre ellas y destacan los siguientes picos [25]:

- Pico 1036: este pico representa al enlace C-O-C de las glucosas que conforman la celulosa, su disminución significa que se está rompiendo y, por tanto, produciendo oxixelulosa. En la Figura XXXVIII podemos observar que en el alga sin tratar y tratada con NaOH encontramos un pico de igual pronunciación y, sin embargo, en el alga tratada con ambos tratamientos el pico desaparece significando la producción de oxixelulosa.
- Pico 1092: este pico representa al enlace C-O, debería disminuir cuando se realice el tratamiento enzimático, ya que significa despolimerización. En la Figura XXXVIII se puede observar un aumento en la paja tratada con NaOH y, sin embargo, desaparece en la paja tratada con ambos tratamientos. Esto significa que con el tratamiento de NaOH existe una polimerización y, sin embargo, cuando se trata la paja con NaClO₂ se produce una despolimerización. La razón de esto puede ser debido a un error del equipo midiendo la paja tratada con NaOH.
- Pico 1160: este pico representa al enlace C-O-C β-1,4 el cual une las diferentes glucosas que conforman la celulosa, por tanto, una

disminución en este enlace representaría una despolimerización de la celulosa. En este caso podemos observar que ocurre lo mismo que en el caso anterior, hay un aumento en la pronunciación del pico de la paja tratada con NaOH respecto a la paja sin tratar, y, sin embargo, en la paja tratada con NaClO₂ nos encontramos que el pico ha desaparecido. Como se ha mencionado anteriormente esto puede ser debido a un error del equipo en el análisis de la paja tratada con NaOH.

- Pico 1428: este pico representa la cristalinidad de la celulosa, por tanto, si disminuye también lo hace la cristalinidad, lo cual debería suceder con el tratamiento enzimático. En este caso en la Figura XXXVIII observamos que existe un pico muy parecido en la paja sin tratar y la paja tratada con NaOH y, sin embargo, en la paja tratada con ambos tratamientos desaparece el pico, significando una disminución de la cristalinidad.
- Pico 1778: este pico representa grupos aromáticos de la lignina, por tanto, si hay un aumento significa que también lo hace la cantidad de lignina. Ya que realizamos los pretratamientos con el objetivo de disminuir, entre otras cosas, la lignina, debería disminuir, sobre todo en el tratamiento de NaClO₂. De hecho, en la Figura XXXVIII observamos que en la paja sin tratar y tratada con NaOH existe un pico y en la paja tratada con ambos tratamientos desaparece por completo.
- Pico 2838: este pico representa el estiramiento del enlace C-H de ceras y ligninas. Por tanto, una disminución de este enlace significa también una disminución de estas, lo cual buscamos con los pretratamientos. De hecho, en la Figura XXXVIII podemos observar una disminución en el pico de la paja tratada con ambos tratamientos respecto a la paja sin tratar y tratada con NaOH, lo cual significa que la suma de los dos tratamientos ha sido eficaz.
- Pico 2920: este pico representa enlaces C-H, en la Figura XXXVIII observamos una clara disminución entre el pico de la paja tratada con ambos tratamientos respecto a la paja sin tratar y tratada con NaOH.
- pico 3270: este pico representa los grupos O-H. Al romper los enlaces C-O-C de la celulosa se obtiene más grupos O-H, por tanto, al despolimerizar deberíamos obtener picos más pronunciados. Sin embargo, en el pretratamiento no encontramos cambios entre el alga sin tratar y el alga tratada en ambos casos.

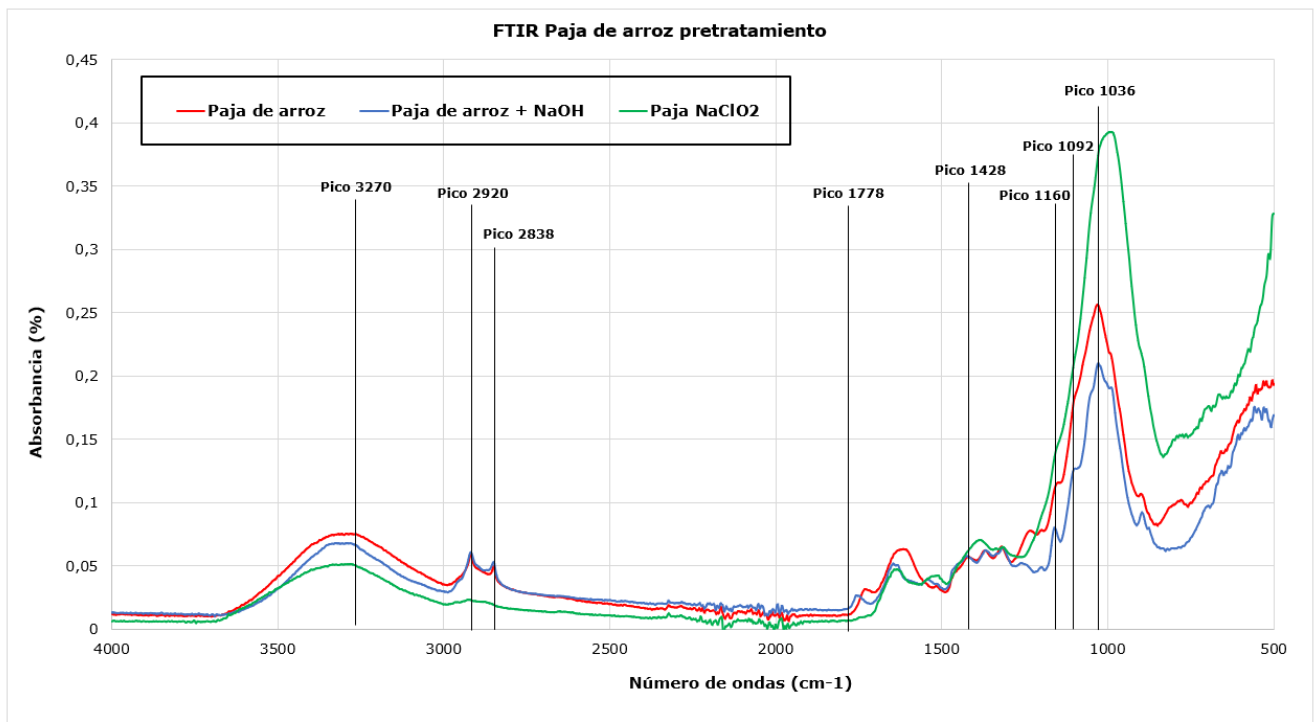


Figura XXXVIII: FTIR de la paja sin tratar y tratada con NaOH y NaOH y NaClO2.

3. Algodón

En el caso del algodón podemos observar en la Figura XXXIX que no presenta ninguna diferencia entre el algodón sin tratar y el algodón tratado con Kieralon. Esto puede ser debido a un error del equipo o a que el tratamiento no ha sido eficaz. Ya que en las imágenes obtenidas de microscopía electrónica se puede observar un aumento de la limpieza del algodón podemos concluir que es debido a un fallo del equipo.

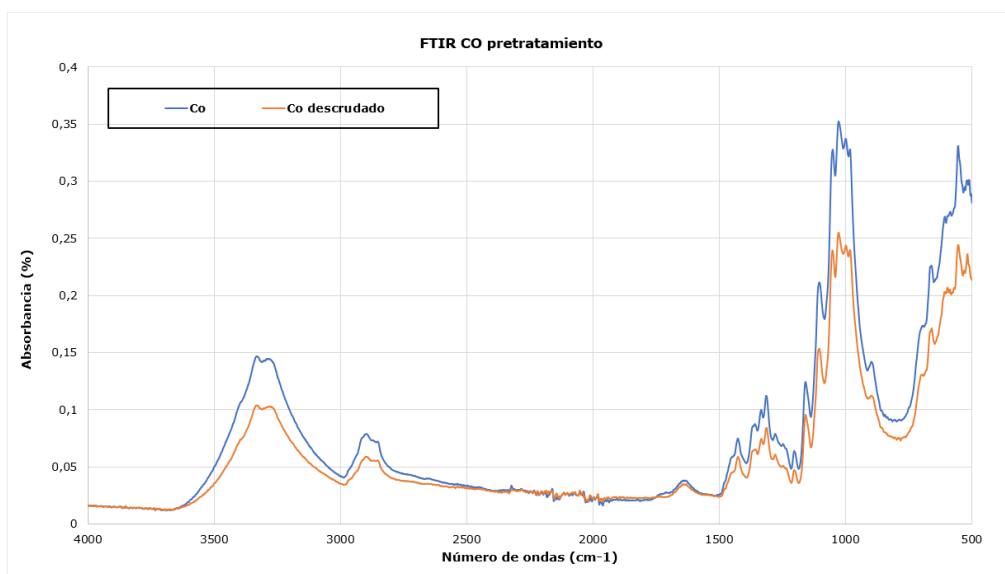


Figura XXXIX: FTIR del algodón sin tratar y tratado con Kieralon.

ii. Tratamiento enzimático

Con el objetivo de revalorizar residuos vegetales obteniendo nanocelulosa, se realizó una hidrólisis enzimática. Ésta, se realizó con la enzima suelta e inmovilizada a diferentes concentraciones y se utilizaron 3 materiales, alga *Poseidonea*, algodón y paja de arroz.

Para demostrar la hidrólisis enzimática se han realizado varios estudios, entre ellos la espectroscopía de IR, a cada material únicamente con los tratamientos NPE y E.

1. Alga

En el caso del alga, Figura XL, apenas se pueden ver cambios en los picos de los diferentes espectros, esto se debe a que los espectros de IR se realizaron con los tratamientos EAlga y NPEAlga. En los cuales obtenemos una mezcla de nanocelulosa y celulosa micrométrica ya que la cantidad de celulosa añadida por residuo a tratar no es la adecuada, como comprobamos con la microscopía electrónica. Por tanto, al realizar el FTIR, las fibras micrométricas nos descuadran los espectros, para obtener mejores resultados deberíamos haber utilizado la técnica SEM-FTIR, donde es posible elegir dónde se realiza el FTIR.

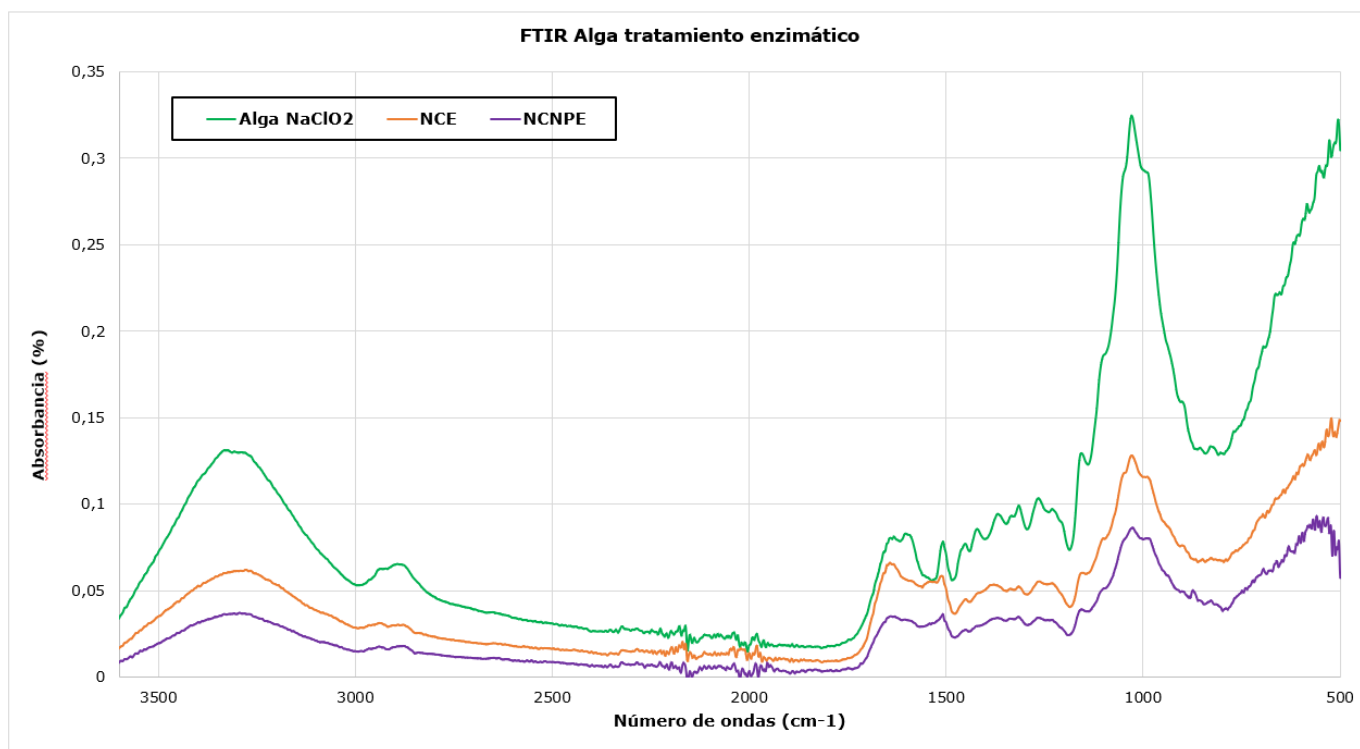


Figura XL: FTIR obtenido del alga con tratamiento enzimático EAlga y NPEAlga.

2. Paja de arroz

En el caso de la paja de arroz, Figura XLI, como en los casos anteriores apenas se pueden ver cambios en los picos de los diferentes espectros, esto se debe a que los espectros de IR se realizaron con los tratamientos EPaja y NPEPaja. En los cuales obtenemos una mezcla de nanocelulosa y celulosa micrométrica ya que la cantidad de celulosa añadida por residuo a tratar no es la adecuada, como comprobamos con la microscopía electrónica. Por tanto, al realizar el FTIR, las fibras micrométricas nos descuadran los espectros, para obtener mejores resultados deberíamos haber utilizado la técnica SEM-FTIR, donde es posible elegir dónde se realiza el FTIR.

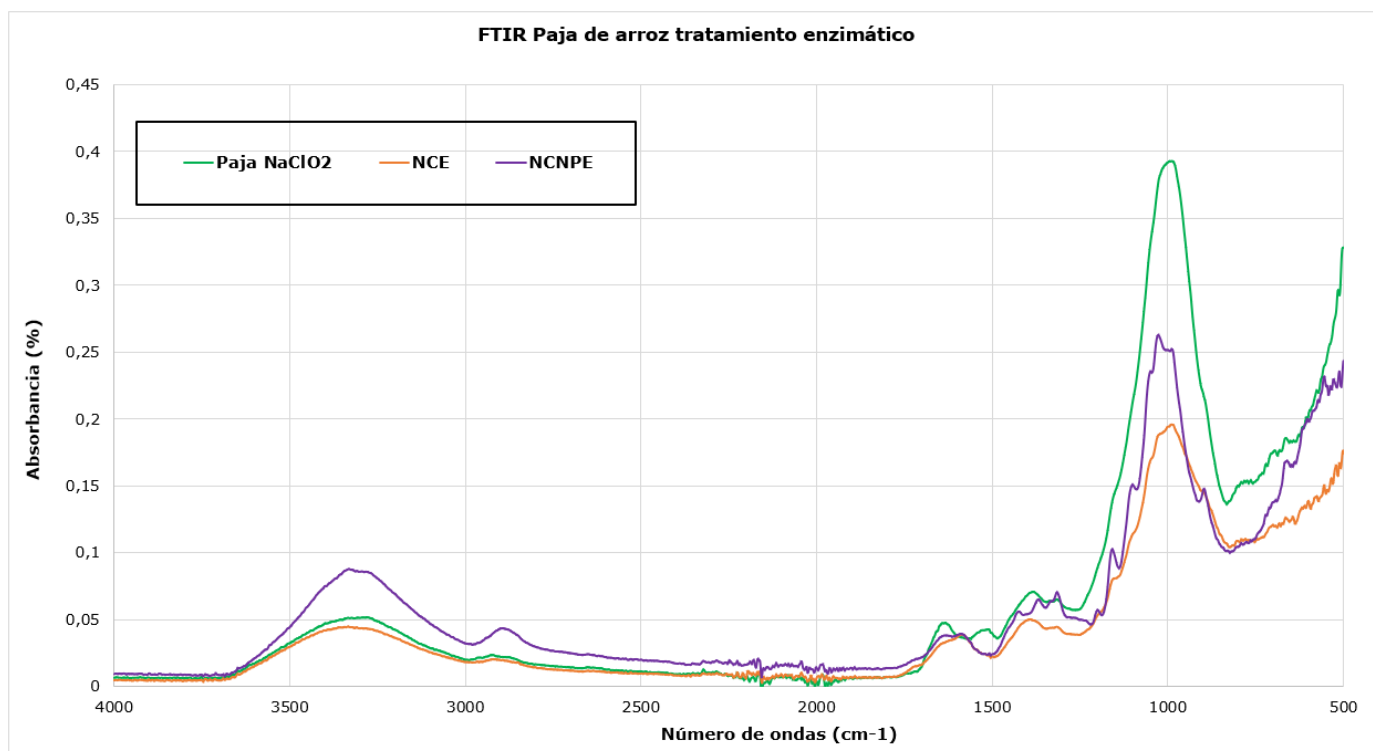


Figura XLI: FTIR obtenido de la paja con tratamiento enzimático EPaja y NPEPaja.

3. Algodón

En el caso del algodón, Figura XLII, como en los casos anteriores, apenas se pueden ver cambios en los picos de los diferentes espectros, esto se debe a que los espectros de IR se realizaron con los tratamientos ECo y NPECo. En los cuales obtenemos una mezcla de nanocelulosa y celulosa micrométrica ya que la cantidad de celulosa añadida por residuo a tratar no es la adecuada, como comprobamos con la microscopía electrónica. Por tanto, al realizar el FTIR, las fibras micrométricas nos descuadran los espectros, para obtener mejores resultados deberíamos haber utilizado la técnica SEM-FTIR, donde es posible elegir dónde se realiza el FTIR.

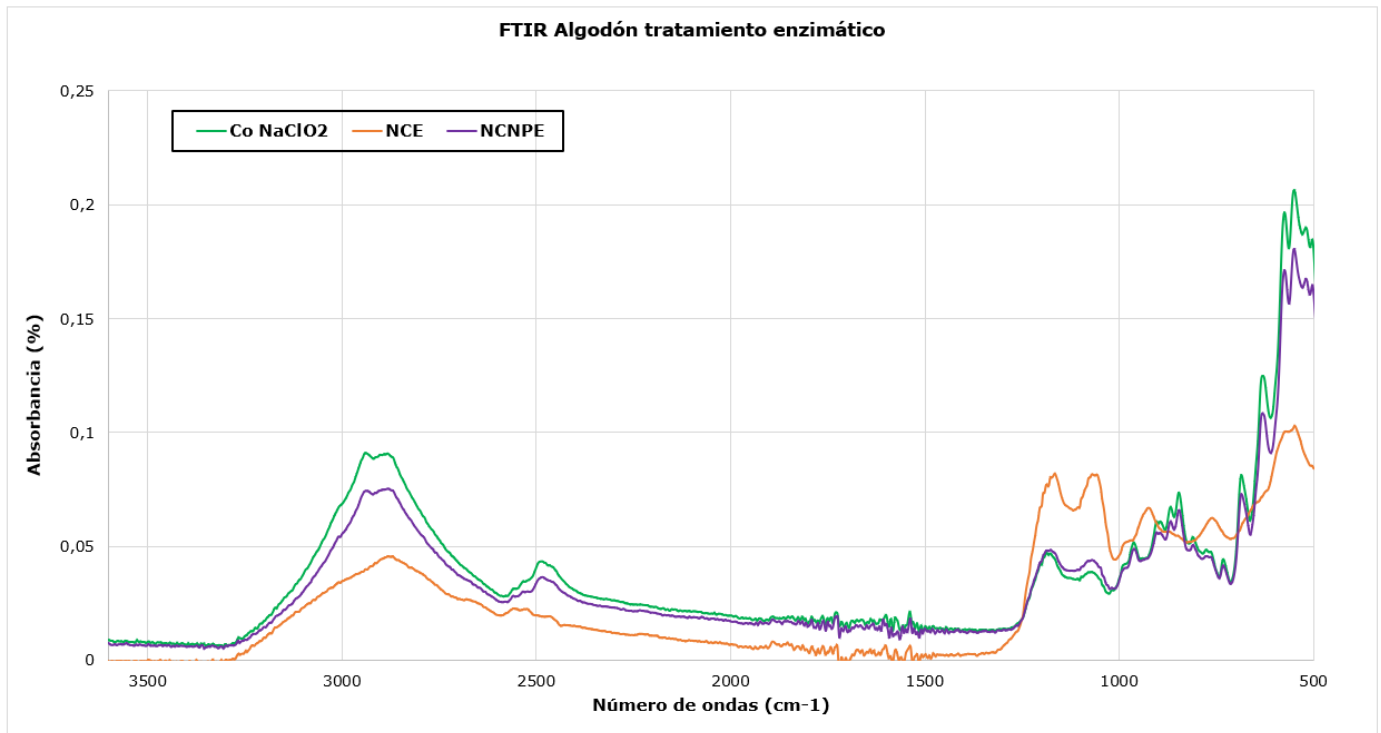


Figura XLII: FTIR obtenido de la paja con tratamiento enzimático EPaja y NPEPaja.

VI. Conclusiones

La conclusión principal es que el objetivo de este trabajo de fin de máster ha sido conseguido, ya que se han revalorizado residuos vegetales, concretamente de algodón, paja de arroz y alga Poseidonia, con la obtención de nanocelulosa. Además, se ha realizado tanto con la enzima celulasa suelta como con la enzima inmovilizada, por tanto, se ha conseguido la inmovilización de la enzima y su posterior recuperación, ofreciendo un procedimiento más sostenible y eficaz. Sin embargo, no se ha conseguido optimizar totalmente el proceso, caracterizar en profundidad la nanocelulosa obtenida ni electrohilarla.

Si hacemos un estudio más en profundidad, se pueden obtener diferentes conclusiones dependiendo del ensayo analizado. Se han realizado los siguientes: Filtrado de la nanocelulosa, DLS y FESEM de la inmovilización y FESEM y FTIR de las fibras pretratadas y de la nanocelulosa.

En el primer estudio, el filtrado de la nanocelulosa, se concluye que al obtener tanto fibras micrométricas como nanométricas no es un buen método para obtener los rendimientos de nanocelulosa.

Con el DLS concluimos que ha habido una disminución de la distribución dimensional de las nanopartículas de hierro a las otras fases de la inmovilización. Además, ha habido un aumento en el tamaño de las nanopartículas al ir avanzando entre las fases de la inmovilización, lo cual es lo esperado, ya que al realizar la inmovilización se van añadiendo capas de

diferentes productos, quitosano, glutaraldehído y por último la enzima. Sin embargo, se aprecia la presencia de una porción de partículas de menor tamaño, pero se cree que ha sido debido a que en cada fase se muele las nanopartículas, haciendo más fino el material de partida. Por tanto, podemos concluir que la inmovilización ha sido realizada correctamente, sin embargo, si hablamos de la inmovilización de la enzima a nivel de microscopía electrónica, no somos capaces de determinar si hemos realizado correctamente la inmovilización, ya que no existen diferencias morfológicas entre las nanopartículas obtenidas de diferentes fases.

Gracias al FESEM, se ha podido demostrar la eficacia de los pretratamientos y de la hidrólisis enzimática. En el primer caso se ha demostrado gracias a las imágenes obtenidas de los materiales tratados, los cuales se encuentran más limpios, en los tres casos, y más disgregados, en el caso del alga y de la paja de arroz. Pero, además, se ha demostrado que las condiciones de los tratamientos enzimáticos, condiciones ácidas durante muchas horas, no hidrolizan la enzima, ya que las imágenes de los tratamientos SE de cada material no presentaban cambios respecto a las imágenes de los materiales tratados sin el procedimiento enzimático. En el segundo caso, la hidrólisis enzimática, podemos concluir que los tratamientos NPE y E de cada material no son eficaces, ya que apenas se obtiene nanocelulosa. En el caso de la paja y la carboximetilcelulosa se obtiene mayor cantidad de nanofibras, sin embargo, se encuentran entre una gran cantidad de microfibras. Cuando hablamos de los tratamientos a mayor concentración de enzima, nos encontramos que sí se produce la hidrólisis de los materiales. En el caso de la enzima suelta (sin inmovilizar) obtenemos una gran cantidad de nanopartículas de celulosa con tamaños de entre 300 nm y 500 nm, aunque en todos los materiales menos en la carboximetilcelulosa se observa la presencia de alguna microfibra. Sin embargo, cuando hablamos de la enzima inmovilizada, se obtiene degradación excesiva, ya que la microscopía nos muestra un film de azúcares con algún residuo de fibra o enzima inmovilizada. Esto se cree que es debido a la presencia de hierro, el cual actúa como catalizador. También se ha demostrado que el hierro por sí mismo no hidroliza los materiales, ya que en los tratamientos NPE no se encuentra apenas hidrólisis. Por último, el control positivo, la carboximetilcelulosa, ha demostrado que la enzima funciona en los tratamientos con mayor cantidad de celulosa.

Cuando profundizamos en la espectroscopía infrarroja, podemos corroborar la eficacia de los pretratamientos, ya que, observamos la eliminación de la lignina y de las ceras en los materiales tratados, sin contar el alga, la cual no encontramos lignina ni en el material tratado ni en el no tratado. También podemos observar que se produce oxixelulosa en el alga y en la paja. Sin embargo, el espectro del algodón no nos da mucha información, solo podemos concluir que ha sido eficaz gracias a la microscopía electrónica. Respecto a la hidrólisis enzimática, no se ha obtenido resultados concluyentes, ya que este estudio se realizó en los tratamientos E y NPE, dónde encontramos mezcla de fibras micrométricas y nanométricas, lo cual entorpece los espectros y no da grandes cambios entre los materiales antes

y después de ser tratados con la enzima, tanto suelta como inmovilizada. Para haber obtenido mejores resultados se debería haber realizado el ensayo de SEM-FTIR, dónde se puede elegir exactamente donde realizar el FTIR, con este estudio podríamos haber realizado el FTIR únicamente en la nanofibras, y así, obtener espectros más concluyentes.

VII. Acciones futuras

Debido a la duración del trabajo de fin de máster, no ha sido posible la realización de algunos ensayos que habrían enriquecido el trabajo. Entre ellos podemos encontrar los siguientes:

- Ajustar la cantidad de enzima a utilizar respecto a la cantidad de residuo vegetal, sobre todo en el caso de la enzima inmovilizada. Es decir, intentar descubrir la menor cantidad necesaria de celulasa para obtener una cantidad óptima de nanocelulosa.
- Conseguir filtrar la nanocelulosa con el fin de obtenerla a altas concentraciones.
- Caracterizar de manera más profunda la nanocelulosa, realizando de nuevo el FTIR con otros tratamientos y analizarlo más pausadamente, obtener la actividad de la celulasa inmovilizada, ya que en la bibliografía encontrada disminuía la actividad durante la inmovilización, pudiendo ser un indicativo de la correcta inmovilización de la enzima, obtención de la eficiencia de carga de la enzima, es decir, cuanta cantidad de enzima se ha inmovilizado, siendo también un indicativo de la correcta inmovilización, realizar estudios termogravimétricos para determinar la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada, ya que en la bibliografía encontrada aumentaba la estabilidad, obtener rendimientos con el fin de determinar la eficiencia del proceso y realizar el DLS en la nanocelulosa obtenida con el objetivo de obtener de manera más exacta su diámetro.
- Investigar otros métodos de inmovilización, por ejemplo, en vez de nanopartículas de hierro utilizar membranas, las cuales son más fácilmente recuperables.
- Realizar la reutilización de la enzima, determinando cuantas veces es posible reutilizarla y si se va perdiendo la actividad.
- Electro hilar la nanocelulosa obtenida con diferentes disolventes.
- Caracterizar las propiedades de la nanocelulosa electrohilada.
- Investigar la eliminación o sustitución de los pretratamientos químicos.

VIII. Bibliografía

- [1] MINISTERIO PARA LA TRANSICIÓN ECOLÓGICA Y EL RETO DEMOGRÁFICO GOBIERNO DE ESPAÑA. *Posidonia oceánica*. Visto el 14 de Febrero de 2022 [Posidonia oceanica \(miteco.gob.es\)](https://www.miteco.gob.es/)
- [2] TALAVERA, S. Y GALLEGO, M.J. (2010). *Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. XVII. Butomaceae-Juncaceae*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- [3] ROIG, F.X., RODRÍGUEZ, A., MARTÍN, J.Á. Y GELABERT, B. (2019). Cuantificación de la pérdida de sedimento por la retirada mecánica de bermas (banquettes) de *Posidonia oceanica* en las playas de las islas Baleares: consecuencias geomorfológicas. *Revista de la Sociedad Geológica de España*, 32(2), 73-86.
- [4] RIBÓ, M., ALBIACH, R., POMARES, F. Y CANET R. (2017). Alternativas de gestión de la paja de arroz en la albufera de Valencia. Valencia. *Nota Técnica*. IVIA. 9 pp.
- [5] YU, C. (2015). Natural Textile Fibres: Vegetable Fibres. En R. Sinclair (Ed.), *Textiles and Fashion* (pp 26-59). Woodhead Publishing Series in Textiles. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-931-4.00002-7>
- [6] TIERRA FÉRTIL MULTIMEDIA AGROPECUARIA. (2018, Febrero) *Algodón de Coahuila, afectado por vaivén del mercado y coyotaje*. [Algodón de Coahuila, afectado por vaivén del mercado y coyotaje - Tierra Fértil@ Multimedia Agropecuaria \(tierrafertil.com.mx\)](https://www.tierrafertil.com.mx/)
- [7] CHEN, H.L. AND BURNS, L.D. (2006). Environmental Analysis of Textile Products. *Clothing and Textiles Research Journal*, 24(3), 248-261. <https://doi.org/10.1177/0887302X06293065>
- [8] LIU, W., LIU, S., LIU, T., LIU, T., ZHANG, J. AND LIU, H. (2019). Eco-friendly post-consumer cotton waste recycling for regenerated cellulose fibers. *Carbohydrate Polymers*, 206, 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.046>
- [9] ZIELINSKA, D., SZENTNER, K., WASSKIEWICZ, A. AND BORYSIK, S. (2021). Production of Nanocellulose by Enzymatic Treatment for Application in Polymer Composites. *Materials*, 14(9), 2124. <https://doi.org/10.3390/ma14092124>
- [10] MICHELIN, M., GOMES, D.G., ROMANÍ, A., POLIZELI, M.L.T.M. AND TEIXEIRA, J.A. (2020). Nanocellulose Production: Exploring the Enzymatic Route and Residues of Pulp and Paper Industry. *Molecules*, 25(15), 3411. <https://doi.org/10.3390/molecules25153411>
- [11] KARGARZADEH, H., IOELOVICH, M., AHMAD, I., THOMAS, S. AND DIFRESNE, A. (2017). Methods for Extraction of Nanocellulose from Various Sources. En H. Kargarzadeh, I. Ahmad, S. Thomas y A. Dufresne (Eds.),

Handbook of Nanocellulose and Cellulose Nanocomposites (pp. 1-49) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

<https://doi.org/10.1002/9783527689972.ch1>

[12] ARROYO, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23-39.

[13] MOO-YOUNG, M. (Ed.). (2019). *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon. [Comprehensive Biotechnology | ScienceDirect](https://doi.org/10.1016/j.combiotech.2019.01.004)

[14] BHARDWAJ, N. AND KUNDU, S.C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 325-347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>

[15] CHEN, X.Q., PANG, G.X., SHEN, W.H., TONG, XIN. AND JIA, M.Y. (2019). Preparation and characterization of the ribbon-like cellulose nanocrystals by the cellulase enzymolysis of cotton pulp fibers. *Carbohydrate Polymers*, 207, 713-719. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.042>

[16] MARTELLI-TOSI, M., MASSON, M.M., SILVA, N.C., ESPOSTO, B.S., BARROS, T.T., ASSIS, O.B.G. AND TAPIA-BLÁCIDO, D.R. (2018). Soybean straw nanocellulose produced by enzymatic or acid treatment as a reinforcing filler in soy protein isolate films. *Carbohydrate Polymers*, 198, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.053>

[17] SQUINCA, P., BILATTO, S., BADINO, A.C. AND FARINAS, C.S. (2020). Nanocellulose Production in Future Biorefineries: An Integrated Approach Using Tailor-Made Enzymes. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(5), 2277-2286. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06790>

[18] PEREIRA, M.C., GUENTER, T., FIRMANU, R., TOMIÊ, J., VILLALBA, S.A. AND ROMANELLI, J.P. (2019). Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric análisis. *Process Biochemistry*, 76, 95-110. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.016>

[19] WANG, Y., QI, Y., CHEN, C., ZHAO, C., MA, Y. AND YANG, W. (2019). Layered Co-Immobilization of β -Glucosidase and Cellulase on Polymer Film by Visible-Light-Induced Graft Polymerization. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(47), 44913-44921. <https://doi.org/10.1021/acsmi.9b16274>

[20] CAI, Z., WEI, Y., WU, M., GUO, Y., XIE, Y., TAO, R., LI, R., WANG, P., MA, A. AND ZHANG, H. (2019). Lipase Immobilized on Layer-by-Layer Polysaccharide-Coated Fe₃O₄@SiO₂ Microspheres as a Reusable Biocatalyst for the Production of Structured Lipids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(7), 6685-6695. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05786>

[21] HOSSEINI, S.H., HOSSEINI, S.A., ZOHREH, N., YAGHOUBI, M. AND POURJAVADI, A. (2018). Covalent Immobilization of Cellulase Using Magnetic Poly(ionic liquid) Support: Improvement of the Enzyme Activity

and Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(4), 789-798.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03922>

[22] ARDILA, N., MEDINA, N., ARKOUN, M., HEUZEY, M.C., AJJI, A. AND PANCHAL, C.J. (2016). Chitosan–bacterial nanocellulose nanofibrous structures for potential wound dressing applications. *Cellulose*, 23, 3089–3104. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1022-y>

[23] BRANDES, R., BELOSINSCHI, D., BROUILLETTE, F. AND CHABOT, B. (2019). A new electrospun chitosan/phosphorylated nanocellulose biosorbent for the removal of cadmium ions from aqueous solutions. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(6), 103477.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103477>

[24] WANG, H., KONG, L. AND ZIEGLER, G.R. (2019). Fabrication of starch - Nanocellulose composite fibers by electrospinning. *Food Hydrocolloids*, 90, 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.047>

[25] KUMARI, P., PATHAK, G., GUPTA, R., SHARMA, D. AND MEENA, A. (2019). Cellulose nanofibers from lignocellulosic biomass of lemongrass using enzymatic hydrolysis: characterization and cytotoxicity assessment. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 683–693.
<https://doi.org/10.1007/s40199-019-00303-1>

[26] TANG, Y., SHEN, X., ZHANG, J., GUO, D., KONG, F. AND ZHANG, N. (2015). Extraction of cellulose nano-crystals from old corrugated container fiber using phosphoric acid and enzymatic hydrolysis followed by sonication. *Carbohydrate Polymers*, 125, 360-366.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.063>

[27] ZANG, L., QIU, J., WU, X., ZHANG, W., SAKAI, E. AND WEI, Y. (2014). Preparation of Magnetic Chitosan Nanoparticles As Support for Cellulase Immobilization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(9), 3448-3454. <https://doi.org/10.1021/ie404072s>

[28] LI, X., HU, Y., DU, C., AND KI LIN, C.S. (2018). Recovery of Glucose and Polyester from Textile Waste by Enzymatic Hydrolysis. *Waste and Biomass Valorization*, 10 (12), 3763-3772. [10.1007/s12649-018-0483-7](https://doi.org/10.1007/s12649-018-0483-7)

[29] WOTTON, A., YEUNG, T., JENNEPALLI, S., THE, Z.L., PICKFORD, R., HUANG, S., CONIBEER, G., STRIDE, J.A. AND PATTERSON, R.J. (2021). Simultaneous Fe₃O₄ Nanoparticle Formation and Catalyst-Driven Hydrothermal Cellulose Degradation. *ACS Omega*, 6(16),10790-10800.
[10.1021/acsomega.1c00393](https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00393)

IX. Anexos

a. Fotografías de los reactivos puros.

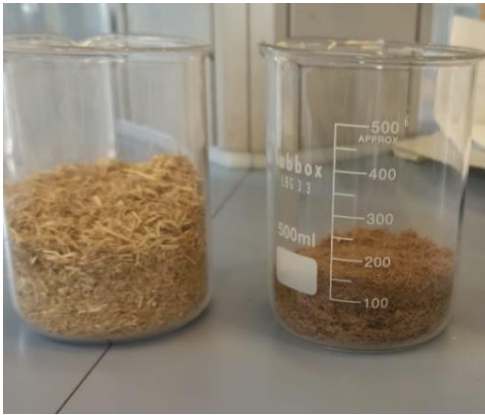


Figura XLIII: Alga y paja de arroz originales.



Figura XLIV: Algodón original.

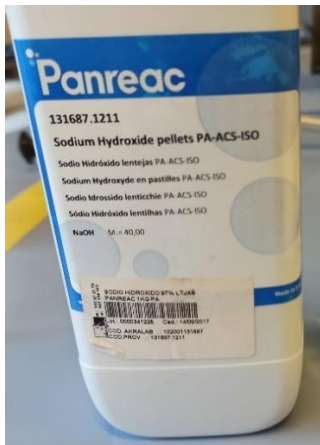


Figura XLV: NaOH al 97% de PanReac.

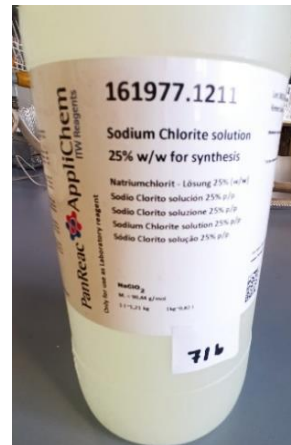


Figura XLVI: NaClO₂ al 25% de PanReac.



Figura XLVII: Kieralon de ECO.

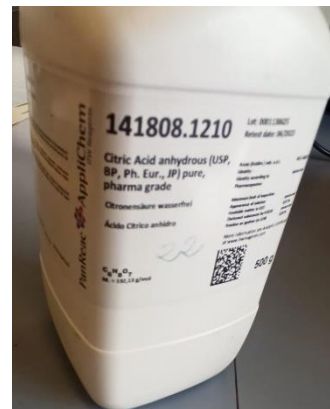


Figura XLVIII: Ácido cítrico puro de PanReac.

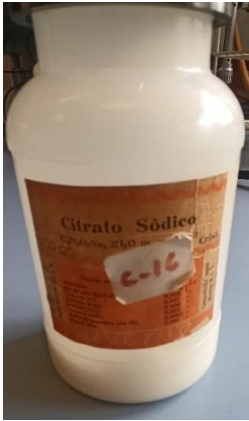


Figura XLIX: Citrato trisódico puro de Probus.

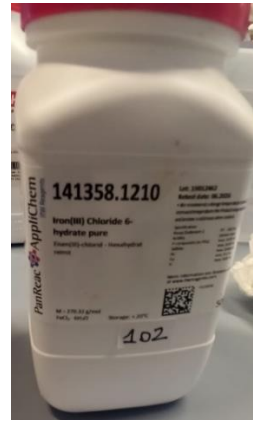


Figura L: $FeCl_3$ puro de PanReac.

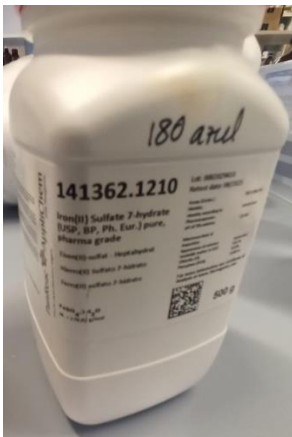


Figura LI: $FeSO_4$ puro de PanReac

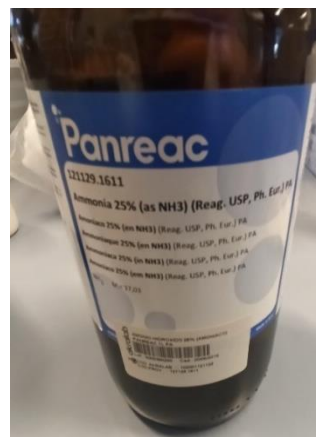


Figura LII: NH_4OH al 25% de PanReac.

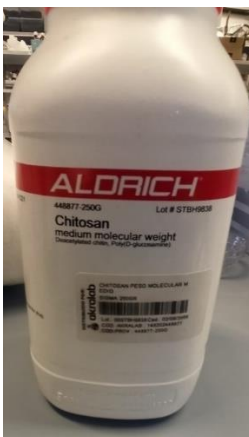


Figura LIII: Quitosano de Aldrich.

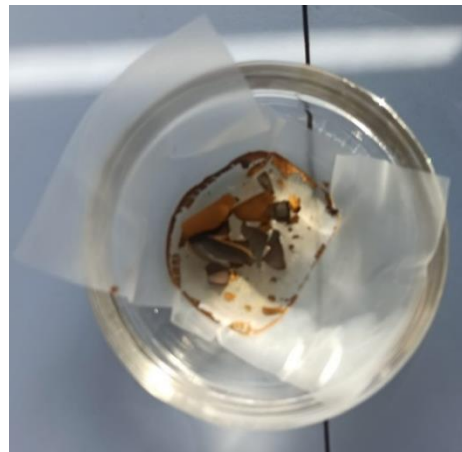


Figura LIV: Nanopartículas de hierro.

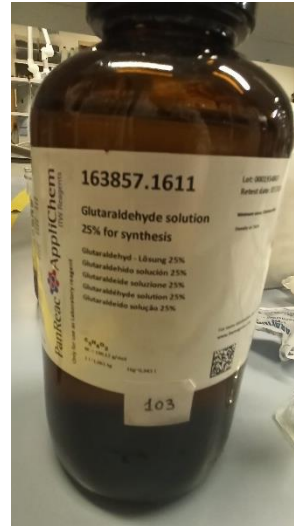
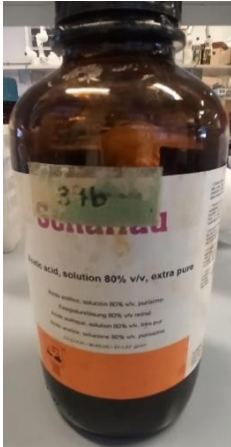


Figura LV: Ácido acético al 80% de Scharlau. Figura LVI: Glutaraldehído al 25% de PanReac.

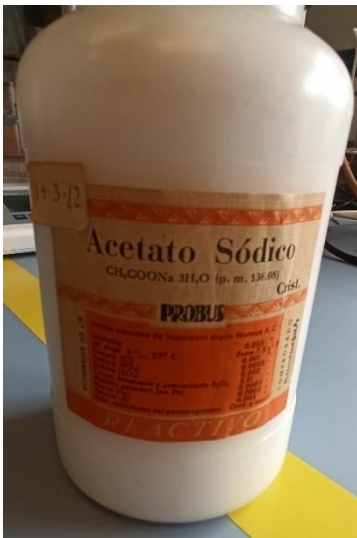


Figura LVII: Acetato sódico puro de Probis.