



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
**CAMPUS TUXTEPEC**

---

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Optimización del proceso de hidrólisis  
enzimática parcial (Acellerase ®1500) para la  
obtención de nanofibras de celulosa a partir del  
raquis de plátano macho (*Musa paradisiaca* L.)**

**T E S I S**

Para obtener el grado de

**Maestra en Biotecnología**

Presenta:

**María Guadalupe Solano Martínez**

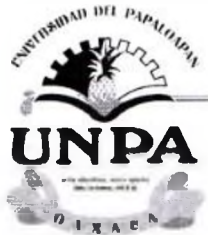
Director de Tesis:

**Dr. Andrés Aguirre Cruz**

Co-Director:

**Dr. Julián Mario Peña Castro**

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México. 2018**



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/032
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 26 de febrero de 2018

**C. MARÍA GUADALUPE SOLANO MARTÍNEZ**  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.


Dr. Andrés Aguirre Cruz	UNPA	Presidente
Dr. Erasmo Herman y Lara	ITTux	Vocal
Dr. Edgar García López	Cátedras CONACyT-UNPA	Secretario
Dra. Sandra T. del Moral Ventura	UNPA	1er Suplente
Dra. Ariana A. Huerta Heredia	Cátedras CONACyT-UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí jí jú



  
**Sandra T. del Moral Ventura**  
Jefe de la División de Estudios  
de Posgrado

DIVISION DE  
ESTUDIOS DE  
POSGRADO

C.c.p. Dr. Andrés Aguirre Cruz – Director de tesis.  
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo

  
**M. en C. Héctor López Arjona**  
Vice-rector Académico

Vo. Bo.

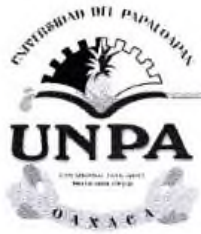


VICE-RECTORIA  
ACADEMICA

**CAMPUS TUXTEPEC**  
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

**CAMPUS LOMA BONITA**  
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/025
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 24 de mayo de 2018

**L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL**  
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la **C. María Guadalupe Solano Martínez**, matrícula **14140018**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Optimización del proceso de hidrólisis enzimática parcial (acellerase ®1500) para la obtención de nanofibras de celulosa a partir del raquis de plátano macho (*Musa paradisiaca* L.)**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí ji jú

**Dra. Sandra T. del Moral Ventura**  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. María Guadalupe Solano Martínez  
C.c.p. Archivo

**CAMPUS TUXTEPEC**  
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

**CAMPUS LOMA BONITA**  
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230

## DEDICATORIA

*A mi compañero, que en todo momento ha estado conmigo apoyándome y motivándome día a día.*

*A mis hijos que tanto amo.*

*A mis padres, pilares fundamentales de mi persona*

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a Dios por darme salud y permitirme culminar un proyecto más en mi vida.

A lo largo de este trayecto de vida recorrido, quiero agradecer a las personas que me han ayudado a seguir adelante , a seguir creciendo a quienes me han enseñado a no darme por vencida y seguir creyendo en mi a quienes me han brindado una palabra de aliento y motivación.

Gracias a mis padres quienes han estado en todo momento apoyándome incondicionalmente.

A mi esposo e hijos, que están día a día brindándome su amor, cariño y apoyo.

A mis hermanos que a la distancia siempre estuvieron al pendiente de mi persona.

A mi director y co-director de tesis, por su apoyo brindado en este proyecto.

A los profesores- investigadores quienes con su apoyo despejaron mis dudas.

A mis compañeros y amigos que aportaron conocimientos, momentos buenos y maravillosos durante mi estancia en Tuxtepec, muchas gracias a todos.

## RECONOCIMIENTO

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan (UNPA) campus Tuxtepec bajo la dirección del Dr. Andrés Aguirre Cruz.

Se contó con el financiamiento y beca del Consejo Nacional de Ciencia de Ciencia y Tecnología CONACyT a través del proyecto CB2012/182222.

## PRODUCTO

Solano-Martínez. M.G, Peña-Castro, J.M, Aguirre-Cruz, A. OBTENCIÓN DE NANOFIBRAS DE CELULOSA MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE RAQUIS DE PLÁTANO MACHO (*Musa paradisiaca* L.).IV Encuentro internacional sobre Biotecnología UATx. 03-06 de Diciembre de 2017.Tlaxcala, Tlax. México.

# INDICE

INDICE DE FIGURAS .....	iv
INDICE DE TABLAS .....	v
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	3
1. PLÁTANO MACHO.....	5
1.1 Taxonomía .....	5
1.2 Producción .....	5
1.3 Estructura del raquis de plátano.....	7
2 FIBRAS NATURALES .....	7
2.1 Fuentes lignocelulósicas .....	7
2.2 Residuos lignocelulósicos primarios y secundarios.....	8
2.3 Aplicaciones.....	9
3 CELULOSA .....	9
3.1 Estructura.....	9
3.2 Composición química .....	10
3.3 Hemicelulosa.....	11
3.4 Pretratamientos para la obtención de celulosa .....	12
3.4.1 Pretratamiento ácido .....	12
3.4.2 Pretratamiento alcalino.....	13
3.4.3 Pretratamiento enzimático .....	14
3.4.4 Pretratamiento físicos .....	14
3.4.5 Pretratamientos fisicoquímicos.....	14

4	Materiales compuestos .....	15
5	Nanomateriales .....	15
6	Nanofibras de celulosa (NFC) .....	16
6.1	Procesos de obtención de nanofibras .....	16
6.1.1	Hidrólisis ácida .....	16
6.1.2	Hidrólisis enzimática .....	17
6.2	Clasificación de las nanofibras de celulosa .....	18
6.2.1	Microfibrillas de celulosa .....	18
6.2.2	Nanofibras de celulosa.....	18
7	Diseño de experimentos.....	19
8	Optimización de nanofibras en sistemas vegetales.....	20
9	JUSTIFICACIÓN .....	23
10	HIPÓTESIS .....	24
11	OBJETIVO GENERAL .....	24
11.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
12	MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
12.1	Material biológico .....	25
12.2	Aislamiento de celulosa .....	26
12.3	Rendimiento de celulosa obtenida.....	27
12.4	Pretratamiento ácido.....	27
12.5	Hidrólisis enzimática de las fibras .....	27
12.6	Diseño experimental.....	28
12.7	Azúcares reductores totales.....	29
12.8	Caracterización.....	30

12.8.1	Distribución de tamaño de partícula (DTP).....	30
12.8.2	Microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	30
12.8.3	Difracción de Rayos X (DRX) .....	31
12.8.4	Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	31
12.8.5	Análisis de comportamiento Reológico.....	31
13	RESULTADOS .....	33
13.1	Obtención de celulosa de raquis de <i>M. paradisiaca</i> .....	33
13.2	Hidrólisis enzimática de las fibras de raquis pretratadas .....	33
13.3	Caracterización.....	39
13.3.1	Distribución de tamaño de partícula.....	39
13.3.2	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	41
13.3.3	Difracción de Rayos X (DRX) .....	44
13.3.4	Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	46
13.3.5	Análisis del comportamiento Reológico.....	47
14	CONCLUSIONES.....	51
15	PERSPECTIVAS.....	53
16	BIBLIOGRAFÍA .....	54

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de la configuración de las fibras del raquis de plátano .....	7
<b>Figura 2.</b> Estructura molecular y orden de celulosa .....	10
<b>Figura 3.</b> Cadenas de celulosa unidas mediante enlaces por puente de hidrógeno inter e intramoleculares.....	11
<b>Figura 4.</b> Estrategia Experimental .....	25
<b>Figura 5.</b> Efecto del contenido de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática .....	36
<b>Figura 6.</b> Efecto de los tratamientos en el contenido de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática vista en superficie 3D.....	38
<b>Figura 7.</b> Distribución de tamaño de partícula de microfibras de celulosa (MFC) y nanopartículas de celulosa (NPC).....	40
<b>Figura 8.</b> Imágenes de SEM de celulosa obtenida a partir de raquis de plátano .....	42
<b>Figura 9.</b> Imágenes de SEM de Nanopartículas de celulosa (NFC) secadas por liofilización .....	43
<b>Figura 10.</b> Patrones de difracción de rayos X de microfibras de celulosa (MFC) y nanofibras de celulosa (NFC) obtenidas por hidrolisis enzimática .....	45
<b>Figura 11.</b> Termogramas de DSC de microfibras de celulosa (MFC) nanofibras de celulosa extraídas por hidrólisis enzimática (NFCH) y nanofibras de celulosa extraídas por ultrasonido (NFCU).....	46
<b>Figura 12.</b> Comportamiento reológico de suspensiones de microfibras de celulosa (MFC), nanofibras de celulosa extraídas por hidrólisis enzimática (NFCH) y nanofibras de celulosa extraídas por ultrasonido (NFCU), evaluadas a 90 °C. G'.....	48
<b>Figura 13.</b> Comportamiento reológico de suspensiones de microfibras de celulosa (MFC), nanofibras de celulosa extraídas por hidrólisis enzimática (NFCH) y nanofibras de celulosa extraídas por ultrasonido (NFCU), evaluadas a 40 °C. G'.....	50

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales estados productores de plátano .....	6
<b>Tabla 2.</b> Principales municipios productores de plátano macho.....	6
<b>Tabla 3.</b> Tipos de pretratamiento más utilizados en fibras celulósicas.....	12
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de los diseños experimentales. ....	20
<b>Tabla 5.</b> Características de la enzima .....	26
<b>Tabla 6.</b> Factores para el diseño experimental Box-Behnken en la hidrólisis enzimática de plátano macho ( <i>Musa paradisiaca L.</i> ).....	28
<b>Tabla 7.</b> Matriz del diseño experimental Box-Behnken de un sistema de tres factores con valores codificados y valores reales. ....	29
<b>Tabla 8.</b> Matriz del diseño experimental de la MSR utilizada para optimizar el proceso de hidrólisis enzimática (Accellerase ®1500) de las fibras de raquis de plátano y la generación de azúcares reductores.....	34
<b>Tabla 9.</b> ANOVA para modelo de superficie de respuesta cuadrática. ....	39

## RESUMEN

Los desechos de cultivos agrícolas, como el del plátano (*Musa paradisiaca* L), han ido en aumento en la actualidad (75.73 millones de toneladas), esto se debe al uso principal de las hojas y del fruto, mientras que el pseudotallo y el raquis no son aprovechados en su totalidad por esta razón diversas investigaciones han sido desarrolladas para poder aprovechar estos residuos lignocelulósicos provenientes de cultivos agrícolas. En la actualidad, en la búsqueda de nuevos materiales (nanomateriales), se recurre a las fibras (celulosa) contenidas en los residuos lignocelulósicos; tal es el caso de las nanofibras de celulosa (NFC), estas presentan características de biodegradabilidad, resistencia mecánica y estabilidad térmica. Las nanofibras se pueden obtener mediante hidrólisis ácida o enzimática, siendo esta último un método menos agresivo. Para obtener un mayor rendimiento en la obtención de materiales, se recurre al diseño de experimentos, en la optimización de los procesos se utiliza la metodología de superficie de respuesta (MSR), donde se modela y analiza la respuesta de interés. El trabajo consistió en obtener nanofibras de celulosa del raquis de plátano, mediante una hidrólisis enzimática, utilizando la MSR para optimizar el proceso de hidrólisis para la obtención de NFC.

El rendimiento para la obtención de la celulosa a partir del raquis de plátano fue del  $25\pm 0.69\%$ . El modelo matemático para la optimización del proceso de hidrólisis enzimática fue adecuado, con coeficiente de determinación de 87%. El mayor contenido de azúcares reductores (AR) fue cuantificado (2.29 mg/mL) en el tratamiento No. 3 del diseño de MSR después de la hidrólisis (utilizando 100 mg de MFC, 60  $\mu$ L de enzima y un tiempo de 60 min). Las NFC de este tratamiento presentaron una distribución tamaño de partícula (DTP) muy homogéneo y tamaño promedio de 70 nm, mientras que las micro fibras de celulosa (MFC) presentaron una DTP bimodal entre 1280 y 4150 nm.

El análisis morfológico mediante SEM permitió evaluar los cambios en la morfología de las muestras (MFC y NFC). Las NFC presentan tamaños extremadamente pequeños, homogéneos y morfología muy diferente en comparación con las MFC, debido al proceso de hidrólisis enzimática (HE). El análisis de la difracción de rayos X (DRX), permitió

observar en las MFC un patrón de difracción característico para la celulosa (polimorfismo tipo I) y un porcentaje de cristalinidad del 72.74 y 65.52 para las MFC y NFC respectivamente. Mientras que el patrón de difracción para las NFC presentan un desfase de los picos, con pérdida ( $2\theta=15^\circ$ ) y aumento ( $2\theta=22^\circ$ ) de la intensidad. Las MFC, presentaron tres temperatura de transición térmica (125, 260 y a 300 °C) características de los fenómenos de evaporación de agua y fusión de celulosa. En el caso de las nanofibras de celulosa extraídas por hidrólisis enzimática (NFCH) y nanofibras de celulosa extraídas por ultrasonido (NFCU), estas también exhiben tres temperaturas de transición (125, 260 y 300 °C). Sin embargo estas temperaturas se ven ligeramente desfasadas y más acentuadas en comparación con las MFC.

El análisis reológico de las suspensiones (0.5 % p/p) de MFC, NFCH y NFCU a una temperatura de 90 °C (inicio de la gelificación) permitió observar y comparar el dominio del módulo elástico ( $G'$ ), sobre el módulo viscoso ( $G''$ ). Estas mismas suspensiones fueron evaluadas en la etapa de la formación del gel a 40 °C, las NCH y NFCU presentaron consistencias parecida a un gel con enlaces entrecruzados.

Se logró establecer y optimizar el proceso de hidrólisis enzimática parcial para la obtención de NFC a partir del raquis de plátano, se determinó que el material obtenido tiene la capacidad de formar geles con menor concentración en comparación al de otras fuentes de celulosa reportadas en literatura; estas NFC podrían tener una aplicación muy importante como agentes de refuerzo en matrices poliméricas o bien podrían ser funcionalizadas para aplicaciones específicas.

## INTRODUCCION

Los desechos de la industria platanera (plátano macho *Musa paradisiaca* L.) han sido en aumento debido a la demanda de este producto, esto se debe a que solo a la fruta y hojas (en ocasiones) se les da utilidad, mientras que al pseudotallo y el raquis son desechados. Valdez et al., en 2010 publicaron datos oficiales que establecen que en México se produjeron 75.73 millones de toneladas de materia proveniente de diferentes cultivos, siendo un problema potencial. Sin embargo, los residuos lignocelulósicos presentan fibras (celulosa) que pueden tener diferentes aplicaciones una de ellas es en el refuerzos de materiales compuestos (Lilholt y Lawther, 2000), estos están formados por un material específico de relleno, que a su vez sirve de refuerzo y una resina aglomerante con objeto de lograr características y propiedades deseadas. Sin embargo, se buscan nuevos materiales que presenten una elevada relación de resistencia y rigidez-peso, tal es el caso de los nanomateriales (Smith y Hashemi, 2006). Uno de los materiales que entran en este rubro son las nanofibras de celulosa ya que tiene las ventajas como rígidas y cristalinas, mejorando la permeabilidad en matrices poliméricas (Tibolla *et al.*, 2014), entre otras, siendo un material utilizado en diferentes aplicaciones (biocompositos, implantes quirúrgicos, empaques, automotriz, entre otras.). Existen diferentes métodos para obtención de celulosa a partir de residuos lignocelulósicos, estos pueden ser alcalinos, con ácidos, enzimáticos, físicos y fisicoquímicos; a partir de la extracción de celulosa pueden llevarse a cabo hidrólisis ácida (Galbe y Zacchi, 2002) o enzimática (Pierre *et al.*, 2011) para la obtención de nanofibras, siendo esta ultima un método menos agresivo con el medio. En la actualidad se buscan procesos en los que se obtenga un mayor rendimiento, para la optimización de procesos se recurre a herramientas como el diseño de experimentos, que ayuda a investigar los efectos de los factores sobre la respuesta al mismo tiempo. Estos experimentos consisten en una serie de corridas o pruebas, en las que se realizan cambios en variables de entrada, esto ayuda a identificar las condiciones del proceso y los componentes del producto que afectan, siendo una forma más eficaz de hacer pruebas en los procesos, en el caso de la optimización se utiliza una metodología de superficie de respuesta (Gutiérrez y de la Vara, 2008). El uso de la metodología de la superficie de

respuesta es para el modelo y análisis de problemas en los que una respuesta de interés recibe es influenciada por diversas variables y donde el objetivo es optimizar esta respuesta.

Por lo que en este trabajo se utilizó como alternativa en la obtención de nanofibras de celulosa, de desechos lignocelulósicos de la industria platanera (raquis), y mediante una hidrólisis enzimática se obtuvieron fibras en escala nanométrica, para esto se utilizó un diseño de experimentos y una metodología de superficie de respuesta para optimizar el proceso de hidrólisis y la obtención de nanofibras con propiedades distintas a las obtenidas de fuentes de celulosa convencionales.

# **1. PLÁTANO MACHO**

## **1.1 Taxonomía**

La planta o mata de plátano, es un arbusto monocotiledóneo de tipo perene de la familia Musaceae, que puede alcanzar hasta 7 metros de altura. Es una planta de consistencia herbácea y estolonífera que posee tallo subterráneo, que también se le llama rizoma corto o basal, y en donde se almacenan los elementos nutritivos elaborados por las hojas. Tiene un pseudotallo o vaina formada por las cortezas de las hojas enrolladas y adheridas unas sobre las otras, lo que les confiere su consistencia característica. Es un tallo endeble que sorprendentemente puede soportar el peso de un racimo con numerosos frutos, a pesar de su aparente fragilidad. Tiene enormes hojas, con un macizo en el centro en donde se desarrolla un vástago que crece a una velocidad considerable alrededor de 8 cm por día. Tiene un vástago o tallo floral que termina en una enorme inflorescencia de color rojo oscuro, sobre la cual se forma el racimo (Anido y Cartay, 2010).

## **1.2 Producción**

En México el plátano es uno de los frutos más cultivados. En 2013, Chiapas fue el estado con la mayor superficie sembrada, generando una producción de 723,626 toneladas de plátano, seguida de otros estados de la república mexicana (Ver tabla 1).

**Tabla 1.** Principales estados productores de plátano

<b>País</b>	<b>Producción en Toneladas</b>
<b>Chiapas</b>	723,626
<b>Veracruz</b>	277,515
<b>Tabasco</b>	526,968
<b>Nayarit</b>	37,201
<b>Colima</b>	166,054
<b>Michoacán</b>	9,9893
<b>Oaxaca</b>	69,140
<b>Guerrero</b>	70,734
<b>Jalisco</b>	120,969
<b>Puebla</b>	26,800
<b>Quintana Roo</b>	5,710
<b>Yucatán</b>	1,114
<b>Campeche</b>	1,337
<b>Estado de México</b>	214
<b>Morelos</b>	492

Fuente: SIAP-SAGARPA, (2013)

Por otro lado en el municipio de San Juan Bautista Tuxtepec en la cuenca del Papaloapan es el principal productor de plátano macho con una producción de 37,594 toneladas, seguida de otros municipios (Tabla 2).

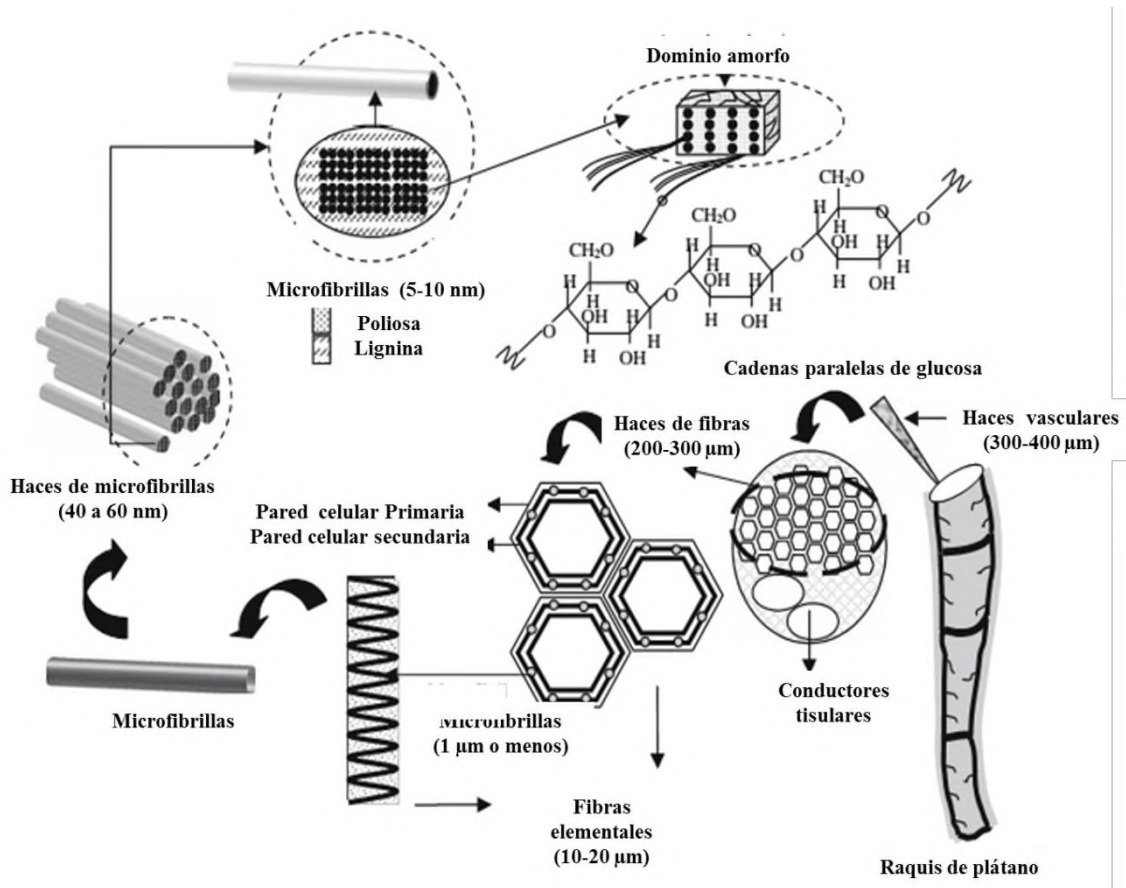
**Tabla 2.** Principales municipios productores de plátano macho.

<b>Municipio</b>	<b>Producción en Toneladas</b>
<b>San Juan Bautista Tuxtepec</b>	37,594
<b>San Pedro Tututepec</b>	8,011
<b>Santa María Huatulco</b>	3,816
<b>Santa María Jacatepec</b>	1,430

Fuente: SIAP-SAGARPA, (2013)

### 1.3 Estructura del raquis de plátano

Gañan *et al.* (2008), mencionan que la estructura que tienen las fibras del raquis pueden agruparse en dos niveles: microscópico y nanoscópico. El primero está formado por haces vasculares y fibras elementales, el segundo formado haces de microfibrilla y microfibrillas de celulosa como se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Diagrama de la configuración de las fibras del raquis de plátano (Gañan *et al.*, 2008).

## 2 FIBRAS NATURALES

### 2.1 Fuentes lignocelulósicas

Los materiales residuales procedentes de bosques y de algunos cultivos, así como de la industria maderera, se puede emplear para la obtención de biopolímeros como la celulosa y otros derivados (lignina, hemicelulosa y pectinas). Esencialmente, tres categorías de plantas

son usadas en la producción de fibras no madereras; fibras procedentes de plantas (ej. lino, cáñamo, yute, y kenaf), fibras de la hoja (ej. sisal, piña, plátano y abacá) y fibras de semillas (ej. algodón y coco). En teoría, casi cualquier planta fibrosa puede ser utilizada, algunos ejemplos son la paja de trigo, maíz, paja de arroz, bagazo de caña y hierbas silvestres como pastos y bambú (Lilholt y Lawther, 2000).

## **2.2 Residuos lignocelulósicos primarios y secundarios**

Los residuos lignocelulósicos se encuentran en la biomasa vegetal y permiten la obtención de productos sustentables y no contaminantes del medio ambiente, así mismo son considerados como sobrantes o subproductos de bajo valor agregado, el material lignocelulósico está conformado sobre todo por tres polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina, cuya interrelación es compleja. En general las características de los residuos lignocelulósicos son muy variadas, dependen de la materia prima y del proceso que los generó, no obstante, comparten una característica principal que es el contenido de materia orgánica constituida por diferentes porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina.

Valdez et al., (2010) publicaron datos oficiales de 2006 que establecen que en México se produjeron 75.73 millones de toneladas de materia seca proveniente de 20 cultivos, de los cuales 60.13 millones de toneladas corresponden a residuos primarios, obtenidos al momento de la cosecha, entre los que están las hojas y tallos del maíz, tallos y vaina de sorgo, puntas y hojas de caña de azúcar, paja de trigo, paja de cebada y de frijol, así como cáscara de algodón. El resto, 15.60 millones de toneladas, corresponden a residuos secundarios obtenidos del procesamiento post-cosecha, como el bagazo de caña de azúcar, mazorcas y olotes, bagazo de maguey o agave, así como pulpa de café.

Algunos datos que sirven para tener una idea del volumen de residuos que generan diferentes tipos de industrias son los siguientes: la industria de la cerveza solamente utiliza el 8% de los componentes del grano, el restante 92%, es un residuo; la industria del aceite de palma utiliza el 9%, el 91% restante es un residuo; la industria del café utiliza el 9.5%, el 90.5% restante es un residuo y la industria del papel utiliza menos del 30%, el resto es un residuo.

### **2.3 Aplicaciones**

Los residuos lignocelulósicos se emplean directamente para la obtención de productos energéticos secundarios por un proceso de pirolisis, de gasificación o de reformado catalítico con vapor, así como por hidrólisis química o enzimática y fermentación etanólica. Se trata de productos de bajo valor añadido que presentan una rentabilidad ligada a los precios de los combustibles convencionales.

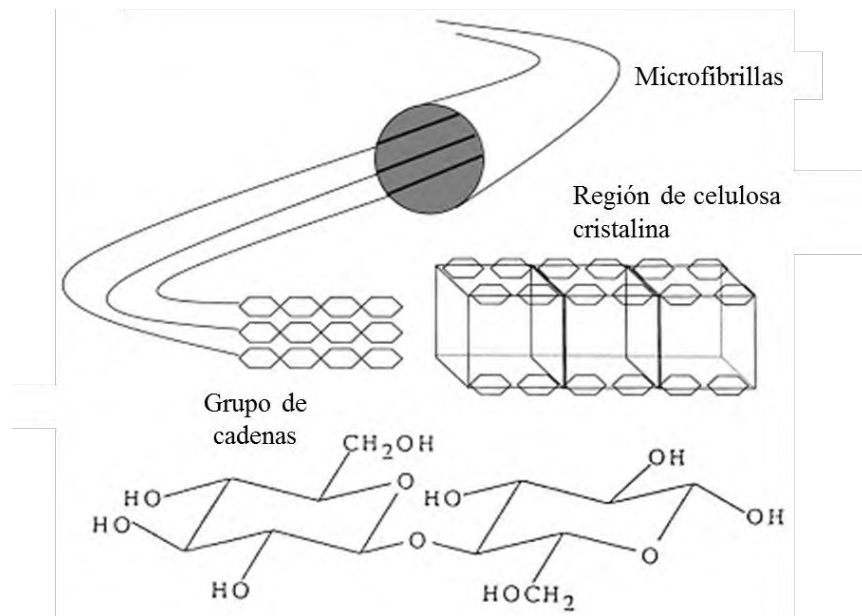
No obstante, se pueden obtener una amplia gama de productos de alto valor agregado como celulosas para usos textiles, alimenticios o farmacéuticos, fibras papeleras, paneles, derivados de la lignina usados como adhesivos y derivados hemicelulósicos como xilosa, manosa. Recientemente, existe otra área de aplicación como en refuerzos de materiales compuestos (Lilholt y Lawther, 2000).

## **3 CELULOSA**

### **3.1 Estructura**

La celulosa, el principal componente estructural de la pared celular vegetal, es un polímero de enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1-4) que se estructura en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Cuervo *et al.*, 2009). El tamaño de sus cadenas es variable, ya que presentan grados de polimerización, número de unidades de repetición de la glucosa muy variables. En su organización estructural, cada residuo de glucosa está invertido con relación al residuo contiguo presentando así una orientación espiral de  $180^\circ$ , lo que resulta en una cadena lineal de residuos de azúcar con unidades alternadas en cuanto a la disposición del oxígeno piranósico, siendo la celobiosa (disacárido) la unidad de repetición. Con esta disposición, la unión hemiacetálica entre residuos de glucosa se ve fortalecida por las interacciones por puente de hidrógeno entre residuos adyacentes de glucosa. Además, como resultado de dicha organización estructural (Figura 2), cada cadena de celulosa dispondrá de un extremo reductor, con un grupo reductor hemiacetal libre en la posición

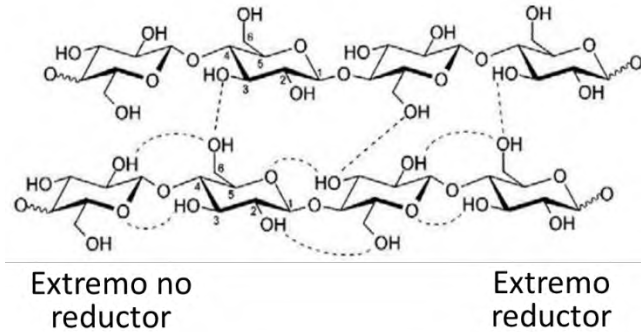
C1, y de un extremo no reductor, con el carbono anomérico implicado en la formación del enlace glicosídico  $\beta$ -(1-4) (Pinkert *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Estructura molecular y orden de celulosa (Lilholt y Lawther, 2000).

### 3.2 Composición química

Las microfibrillas de celulosa son en su mayoría independientes, pero la ultraestructura de la celulosa se debe en gran medida a la presencia de los enlaces por puente de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Fig. 3). Las regiones donde las microfibrillas se encuentran bien ordenadas se denominan regiones cristalinas, mientras las regiones menos ordenadas se conocen como regiones amorfas. Cuanto más cristalina es la celulosa, más difícil es de degradar, volviéndose altamente recalcitrante (Zhang *et al.*, 2013).



**Figura 3.** Cadenas de celulosa unidas mediante enlaces por puente de hidrógeno inter e intramoleculares (Pinkert *et al.*, 2009).

Las zonas amorfas presentes en la celulosa han sido descritas como zonas de anclaje para la hemicelulosa. El desorden de estas zonas facilita el acceso a las enzimas hidrolíticas, por lo que el aumento de las regiones amorfas de la celulosa mediante diferentes pretratamientos, proporciona un medio para aumentar su digestibilidad. La alta estabilidad química y mecánica de la celulosa así como su naturaleza hidrofóbica son consecuencia tanto de la fortaleza enlaces glucosídicos, como del gran número de puentes hidrógeno. Los puentes hidrógeno no sólo actúan como interconectores de las unidades de celobiosa, sino que también parecen participar en las propiedades hidrófobas del polímero (Pinkert *et al.*, 2009).

La celulosa es rica en grupos hidroxilo, pero como consecuencia de su forma lineal y alta cristalinidad, poca agua puede entrar y ser acomodada dentro de las microfibrillas por lo que el polímero es menos hidrófilo (Pinkert *et al.*, 2009).

### 3.3 Hemicelulosa

Es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa, L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-D-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, los azúcares están unidos por enlaces β-1,4 y ocasionalmente por enlaces β-1,3 (Cuervo *et al.*, 2009).

Químicamente, la hemicelulosa difiere de la celulosa en tres aspectos, en primer lugar, contiene varias unidades diferentes de carbohidratos, mientras que celulosa contiene sólo unidades de glucosa; en segundo lugar, presenta una cadena polimérica ramificada que da lugar a regiones amorfas, mientras que la celulosa es un polímero lineal y en tercer lugar, el grado de polimerización de la celulosa es de 10 a 100 veces mayor que el de la hemicelulosa. La hemicelulosa es de naturaleza hidrofílica, soluble en álcali y fácilmente hidrolizada en ácidos (Maya, 2008).

### 3.4 Pretratamientos para la obtención de celulosa

Existen diversos pretratamientos que pueden ser utilizados para obtener material celulósico (Tabla 3).

**Tabla 3.** Tipos de pretratamiento más utilizados en fibras celulósicas

<b>Físico</b>	- Pulverizado Mecánico	Molienda
	- Ultrasonicación	>300 °C
<b>Químicos</b>	-Ozonólisis	-Ozono a temperatura y presión ambiente.
	-Hidrolisis con ácidos	-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl, HNO
	-Hidrolisis Alcalina	-NaOH
<b>Fisicoquímico</b>	-Exposición a vapor	-Vapor saturado a 160-260 ° C. -1-2 kg de amoniacó /kg de material seco 90 °C/30min.
	-Explosión de fibra con amoniacó (AFEX)	
<b>Biológico</b>	-Tratamiento con Hongos	- <i>Aspergillus Niger</i>
	-Tratamiento con bacterias	- <i>Bacillus Sp</i>
	-Tratamiento con enzimas	-Celulasas

#### 3.4.1 Pretratamiento ácido

El pretratamiento tiene como objetivo solubilizar la hemicelulosa y de esta forma hacer más accesible la celulosa. Estos pretratamientos pueden realizarse con ácidos diluidos o

concentrados. La principal reacción que ocurre durante el pretratamiento ácido es una hidrólisis de la hemicelulosa, especialmente en xilosa, la hemicelulosa solubilizada (oligómero) puede ser sometida en medio ácido a reacciones hidrolíticas que hacen que produzcan monómeros y otros productos volátiles. A una temperatura moderada, la sacarificación tiene bajos rendimientos. A altas temperaturas el tratamiento con ácido favorece la hidrólisis de la celulosa y se hidroliza cerca del 80% de la hemicelulosa. La lignina no se solubiliza pero si aumentan los rendimientos de la hidrólisis enzimática (Sun *et al.*, 2001).

Existen dos pretratamientos, ácido a altas temperaturas (entre 160-200°C) y bajas cargas de sólidos (5-10 % peso sustrato/peso mezcla), y a bajas temperaturas (120-160°C) con alta carga de sólidos (10-40%). Estos tipos de pretratamientos han sido probados con éxito en materiales lignocelulósicos como madera, paja de trigo, bagazo de caña, desechos de maíz, entre otros. En estos pretratamientos es utilizado el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, HNO<sub>3</sub> entre 1-5% (Guo *et al.*, 2009).

### **3.4.2 Pretratamiento alcalino**

En este pretratamiento las primeras reacciones que dan lugar son la solvatación y saponificación provocando una hinchazón de la biomasa y haciéndola más accesible para enzimas y bacterias. Bajo condiciones de alcalinidad ocurre además de la hidrólisis alcalina, la degradación y descomposición de los polisacáridos disueltos. La pérdida de polisacáridos es debida a las reacciones hidrolíticas.

Un aspecto importante de esta etapa alcalina es que la biomasa en sí misma consume algo de álcali. Y por tanto la concentración de álcali residual después del pretratamiento es el álcali que no participo en la reacción. En cuanto a la lignina el pretratamiento alcalino puede causar su solubilidad, redistribución y condensación, estos efectos pueden disminuir o contrarrestar los efectos de remoción de lignina e hinchamiento de la celulosa. Este pretratamiento también puede causar un cambio en la estructura de la celulosa a una forma que es más densa y termodinámicamente más estable que la celulosa sin tratamiento (Hendriks y Zeeman, 2009).

### **3.4.3 Pretratamiento enzimático**

Es un mecanismo mediado por celulasas incluye básicamente una acción sinérgica de dos tipos enzimáticos denominados exo y endoglucanasas. Estas últimas (endo 1,4  $\beta$ -glucanoglucano-hidrolasas) hidrolizan puntos al azar de las cadenas celulósicas, produciendo polisacáridos de un amplio rango de tamaño molecular. Las endonucleasas actúan sobre enlaces glucosídicos adyacentes a los extremos no reductores, liberando fragmentos de bajo peso molecular a partir de los extremos generados por las enzimas mencionadas. El resultado final es la producción de una mezcla de glucosa, celobiosa, y oligosacáridos cortos, el uso de enzimas está ligado a la resolución de ciertos problemas como largos tiempos de hidrólisis e inversión de energía.

### **3.4.4 Pretratamiento físicos**

#### 3.4.4.1 Fragmentación mecánica y pirolisis

En este método el material lignocelulósico es fragmentado, triturado y molido (hasta 0.2-2 mm) para aumentar el área de contacto, esto facilita el acceso de las celulasas a las fibras de celulosa y aumentando conversión en tratamientos enzimáticos (Millet *et al.*, 1979) en la pirólisis la lignocelulosa se descompone en diferentes productos y carbón residual cuando es tratada con temperaturas altas de hasta 300°C (Kilzer y Broido, 1965). Aunque es un método eficiente para tratar el material lignocelulósico tiene un costo elevado en comparación con otros métodos.

### **3.4.5 Pretratamientos fisicoquímicos**

#### 3.4.5.1 Explosión por vapor

Es uno de los pretratamientos más efectivos para las maderas duras y desechos agrícolas, pero menos eficiente para maderas suaves. La biomasa es tratada con vapor saturado a una temperatura de 160-260 °C (0.69-4.83 MPa) durante cierto tiempo causando reacciones de autohidrólisis, donde la hemicelulosa y la lignina son convertidos en oligómeros solubles. La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mejora la posterior hidrólisis enzimática y disminuye la producción de compuestos inhibitorios. Los factores que afectan el proceso son el tiempo del

tratamiento, la temperatura, el tamaño de partícula y el contenido de humedad (Duff y Murray, 1996). Las ventajas de este método son un requerimiento bajo de energía comparado con los métodos físicos convencionales que requieren 70% más energía para alcanzar el mismo tamaño de reducción de las partículas. Las limitaciones del proceso son las destrucciones parciales del xilano y la separación incompleta de la lignina y los carbohidratos así como la generación de compuestos inhibitorios para los microorganismos utilizados en el proceso de fermentación (Mackie et al., 1995).

#### **4 Materiales compuestos**

Un material compuesto se puede definir como dos o más materiales (fases o constituyentes) integrados para formar un material nuevo. Los constituyentes conservan sus propiedades y el nuevo compuesto tendrá propiedades distintas a la de cada uno de ellos. La mayoría de los compuestos están formados por un material específico de relleno, que a su vez sirve de refuerzo y una resina aglomerante con objeto de lograr características y propiedades deseadas. Los materiales compuestos pueden ser de muchos tipos, los que predominan son los fibrosos (compuestos o fibras en una matriz) y compuestos o partículas en una matriz.

Los materiales compuestos han sustituido a numerosos componentes mecánicos, en particular en la industria aeronáutica, electrónica, de la aviación, automotriz, estructuras civiles y de equipos deportivos. Una de las razones es su elevada relación de resistencia y rigidez-peso (Smith y Hashemi, 2006).

#### **5 Nanomateriales**

Los nanomateriales son aquellos materiales que tienen escala de longitudes características (esto es diámetro de las partículas, tamaño de los granos, es espesor de las capas, etc.) menor a 100 nm ( $1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$ ). Los nanomateriales pueden ser metálicos, poliméricos, cerámicos, electrónicos, pero desarrollados con una dimensión en la escala nanométrica. Tienen propiedades que permiten el desarrollo de materiales y dispositivos con funcionalidades y características completamente nuevas. En esta área se incluyen agregados

atómicos y partículas de hasta 100 nm de diámetro, fibras con diámetros inferiores a 100 nm, láminas delgadas de espesor inferior a 100nm, nanoporos y materiales, las propiedades dependerán de su morfología (Smith y Hashemi, 2006).

## **6 Nanofibras de celulosa (NFC)**

Son materiales celulósicos que tienen dimensiones dentro de los rangos nanométricos y pueden ser obtenidos de diferentes fuentes lignocelulósicas, su tendencia o magnitud del diámetro es de 10 a 20 nm y la de su longitud es 10 veces o más que la de su diámetro, esto hace que sea sensible a diferentes campos de aplicación (Khalil *et al.*, 2014).

Las nanofibras de celulosa ofrecen muchas ventajas, pues son mecánicamente resistentes, rígidas y muy cristalinas por lo que son diversas las aplicaciones que pueden encontrar en la biomedicina, farmacéutica, y sobre todo en la industria de papel, también pueden funcionar como agentes en matrices poliméricas de refuerzo.

La adición de nanofibras de celulosa a matrices poliméricas culmina en materiales compuestos con mejores propiedades mecánicas de permeabilidad (Tibolla *et al.*, 2014). Las propiedades resistentes, la ligereza y la excelente conductividad eléctrica que los caracteriza lo convierte en un material ideal que puede tener diferentes aplicaciones en la industria confeccionando chalecos de protección ultraligeros, pantallas de dispositivos electrónicos, elaboración de biocomposito, y en el área de la medicina como implantes quirúrgicos (Ramírez, 2010). Así como también se le puede dar una aplicación en empaques de alimentos, y en la industria automotriz.

### **6.1 Procesos de obtención de nanofibras**

#### **6.1.1 Hidrólisis ácida**

La hidrólisis ácida consiste introducir un ácido, que se incorpore profundamente en la estructura morfológica de la celulosa que mediante catalizadores ácidos, transforman las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus

monómeros elementales. Este tipo de hidrólisis puede realizarse empleando diferentes clases de ácidos, como el ácido sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, y fórmico, sin embargo los ácidos clorhídricos y sulfúricos han sido empleados a escala industrial.

Los procesos industriales de hidrólisis ácidas pueden agruparse en dos tipos: los que emplean ácidos concentrados y los que utilizan ácidos diluidos.

Los procesos que implican ácidos concentrados operan a bajas temperaturas y los procesos que emplean ácidos diluidos tienen una ventaja el bajo consumo de ácidos, sin embargo se requieren relativamente altas temperaturas para alcanzar rendimientos aceptables (Galbe y Zacchi, 2002).

### **6.1.2 Hidrólisis enzimática**

La hidrólisis enzimática de la celulosa es llevada a cabo por enzimas celulasas que poseen una alta especificidad. Los productos de las hidrolisis son en sí mayoría pentosas y hexosas, incluida la glucosa, que puede ser fermentado por levaduras. Las condiciones de uno de la hidrolisis enzimática son suaves (pH 4.8 y temperatura entre 45 y 50 °C). Las bacterias y hongos son capaces de producir microorganismos capaces de producir celulasas son las bacterias del genero *Clostridium*, *Acetovibrio*, *Microbispora* y *Streptomyces*. Las Celulasas comerciales están centradas en hongos como *Sclerotiumrolfsii*, *P. chysoporuim* y especies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium* (Sun *et al.*, 2001). Según Pierre *et al.* (2011), las celulasas son una mezcla de varias enzimas al menos tres grupos de Celulasas están involucradas en el proceso de la hidrolisis.

- Las endoglucanasas: están atacan las regiones internas de baja cristalinidad en las fibras de celulosa creando cadenas libres de enlaces.
- Las exoglucanasas o celobiohidrasas: degradan las moléculas por la eliminación de unidades de celobiosa desde los extremos de las cadenas,
- Las  $\beta$ -glucosidasas: hidrolizan celobiosa para producir glucosa.

Aparte de estos tres grupos principales de enzimas de celulosa existen otras enzimas que atacan la hemicelulosa como las glucoronidasas, acetilsterasas, xilanasas,  $\beta$ -xilosidasas, galactomanasas y glucomanasas.

## **6.2 Clasificación de las nanofibras de celulosa**

### **6.2.1 Microfibrillas de celulosa**

Las microfibrillas de celulosa son fibras unidas superficialmente mediante puentes de hidrogeno que dan una o más fibras, de formas ovoides o casi cuadradas en sección transversal con un diámetro de 3-4 nm son inherentemente muy fuertes con resistencia a atracción superior al acero (Lilholt y Lawther, 2000).

### **6.2.2 Nanofibras de celulosa**

Son materiales celulósicos que tienen dimensiones dentro de los rangos nanométricos son términos utilizados para la celulosa microfibrilada siendo la unidad estructural más pequeña de fibra vegetal aproximadamente de 1-100 nm de tamaño. Su composición es cristalina alterna, se produce generalmente a través de la presión mecánica antes o después de un tratamiento químico o enzimático y con dominios amorfos, esto hace que sea sensible a diferentes campos de aplicación (Khalil *et al.*, 2014).

Las nanofibras de celulosa ofrecen muchas ventajas pues son mecánicamente resistentes, rígidas y muy cristalinas por lo que son diversas las aplicaciones que pueden atribuírseles en la biomedicina, farmacéutica, y sobre todo en la industria de papel, también pueden funcionar como agentes en matrices poliméricas de refuerzo.

La adición de nanofibras de celulosa a matrices poliméricas culmina en materiales compuestos con mejores propiedades mecánicas de permeabilidad (Tibolla *et al.*, 2014). Existen diversos métodos para producir nanofibras de celulosa, su aislamiento por lo general consta de 3 pasos:

- El tratamiento previo de la materia prima.
- Hidrólisis parcial.

- Desintegración mecánica.

Durante el proceso hay condiciones que conducen a diferentes dimensiones nanométricas afectando a las características morfológicas de las nanofibras.

#### 6.2.2.1 Nanocristales de celulosa

Su forma es alargada de varilla, su flexibilidad es muy limitada respecto a las nanofibrillas de celulosa ya que no contienen regiones amorfas, también conocidas como nanocilindros, que pueden ser aisladas por métodos de hidrólisis ácida. Suelen tener un diámetro de 2-20 nm y su longitud es variable de 100 nm a varios micrómetros. El grado de cristalinidad refleja su diversidad dimensional y de su morfología dependerán las condiciones que tenga la preparación para aislarlas (Khalil *et al.*, 2014).

De acuerdo a las técnicas de obtención de nanopartículas, se opta por la generación de diseños de experimentos para disminuir las muestras que se realizaran y así mismo observar su tendencia y observar el comportamiento de los factores que intervienen en los experimentos.

## 7 Diseño de experimentos

El diseño de experimentos (DOE) ayuda a investigar los efectos de variables de entrada (factores) sobre variables de salida (respuesta) al mismo tiempo. Estos experimentos consisten en una serie de corridas o pruebas, en las que se realizan cambios en variables de entrada. En cada corrida se recolectan datos.

El (DOE) se utiliza para identificar las condiciones del proceso y los componentes del producto que afectan para posteriormente determinar una configuración de factores que optimiza los resultados.

El diseño estadístico experimentos es la forma más eficaz de hacer pruebas en los procesos. Existen diferentes diseños que pueden ser utilizados como se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4.** Clasificación de los diseños experimentales.

<b>Diseño para comparar dos o más tratamientos</b>	Diseño completamente al azar	
		Diseño de bloques completos al azar
<b>Diseños para estudiar el efecto de varios factores sobre una o más variables de respuesta</b>		Diseño de cuadros latino y grecolatino
		Diseño factorial $2^k$
		Diseño factorial $3^k$
<b>Diseños para la optimización de procesos</b>		Diseño factorial fraccionado $2^{k-p}$
	Diseños para el modelo de primer orden	Diseños factoriales $2^k$ y $2^{k-p}$
		Diseño de Plakett-Burman
	Diseños para el modelo de segundo orden	Diseño Simplex
		Diseño Central compuesto
		Diseño de Box-Behnken
	Diseño Equirradial	
<b>Diseños robustos</b>	Arreglos ortogonales (diseños factoriales)	
	Diseño con arreglos interno y externo	
<b>Diseños de mezclas</b>	Diseño simplex-reticular	
	Diseño simplex con centroide	
	Diseño con restricciones	
	Diseño axial	

Dentro de los diseños experimentales se encuentra el diseño para la optimización de los procesos, el cual es necesario utilizar una metodología de superficie de respuesta (Gutiérrez y de la Vara, 2008).

## 8 Optimización de nanofibras en sistemas vegetales

Diversas investigaciones han sido desarrolladas en los últimos años utilizando pretratamientos biológicos como enzimas para reducir el tamaño de las fibras de diferentes residuos lignocelulósicos.

Para ello Henriksson y Berglun (2007), realizaron investigaciones para la obtención de nanofibras de celulosa (NFC) a partir de madera blanda blanqueada como material lignocelulósico utilizando una hidrólisis enzimática (HE). Las nanofibras obtenidas por HE presentaron un diámetro promedio de 38-42 nm observando así que la hidrólisis enzimática es menos agresiva en comparación con la hidrólisis ácida.

George *et al.* (2011), realizaron una investigación para la obtención de nanocristales de celulosa bacteriana (BCNC) para observar las propiedades mecánicas y térmicas para ello utilizaron hidrólisis química (HQ) e hidrólisis enzimática (HE) obteniendo como resultado en la HE se obtuvieron nanocristales con un diámetro aproximado de 10-15 nm y una longitud de 100-300 nm de igual forma se observó que en la HE se presentó una excelente estabilidad térmica y una mejora de sus propiedades mecánicas en comparación con la HQ. Este tipo de nanopartículas se espera que puedan tener un potencial en la preparación de películas de nanocompuestos y así poder aplicarlas en el envasado de alimentos.

Tibolla *et al.* (2014), realizaron una investigación para la obtención de nanofibras de celulosa (NFC) a partir de cascara de plátano utilizando hidrólisis química (HQ) e hidrólisis enzimática (HE). Las nanofibras obtenidas por HQ y HE presentaron un diámetro promedio 10.9 y 7.6 nm con una longitud de 454.9 y 2889.4 nm, respectivamente. El porcentaje de cristalinidad para las nanofibras obtenidas por los métodos propuestos HQ y HE también fue muy diferente, las nanofibras obtenida por HQ presentaron un porcentaje de cristalinidad de 58.6 % mientras que las nanofibras obtenidas por HE presentaron un porcentaje de cristalinidad de 49.2% lo que indica que el proceso de HQ genera partículas más cristalinas. Este tipo de nanopartículas aisladas a partir de la cascara de plátano por ambos tratamientos pueden tener una aplicación potencial como agente de refuerzo en materiales compuestos.

Meyabadi y Dadashian (2014), realizaron una investigación para la obtención de partículas finas de celulosa, a partir de fibras de algodón utilizando una hidrólisis enzimática con tratamiento ultrasónico y para optimizar su proceso utilizaron un diseño experimental Box-Behnken. Las nanopartículas obtenidas tienen una forma esférica y la mayoría de ellas se encuentran en un rango aproximado de 40-90 nm, también se observó que el tratamiento

enzimático y de ultrasonido causaron un aumento en la cristalinidad y una disminución en el grado de polimerización del algodón.

## 9 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se han buscado formas para obtener polímeros de fibras naturales como el algodón, lino, cáñamo, yute, madera, y raquis de plátano. La celulosa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, siendo uno de los componentes principales de la pared celular de todas las plantas, y de las mencionadas anteriormente, la que presenta mayor cantidad de celulosa es el raquis de plátano. Hoy en día, las investigaciones recientes, se enfocan en utilizar métodos que sean menos agresivos y eficientes al momento de extraer nanopartículas a partir de residuos lignocelulósicos, generando así un gran interés de investigación científica. Es por ello que en el presente trabajo se pretende utilizar los residuos de raquis de plátano macho generados por los productores de la región de Tuxtepec, Oax., aprovechando así las propiedades tanto físicas y químicas de estos residuos. Se usará hidrólisis enzimática parcial para obtener el tamaño a nivel nanométrico, buscando a su vez la caracterización morfológica estructural y térmica de las nanofibras de celulosa, con la finalidad de sugerir posibles aplicaciones.

## **10 HIPÓTESIS**

El proceso hidrólisis enzimática parcial y su optimización sobre fibras de celulosa extraídas a partir del raquis de plátano, permitirá la obtención de nanofibras de celulosa (NFC), con tamaños homogéneos y propiedades distintas a las obtenidas de fuentes de celulosa convencionales.

## **11 OBJETIVO GENERAL**

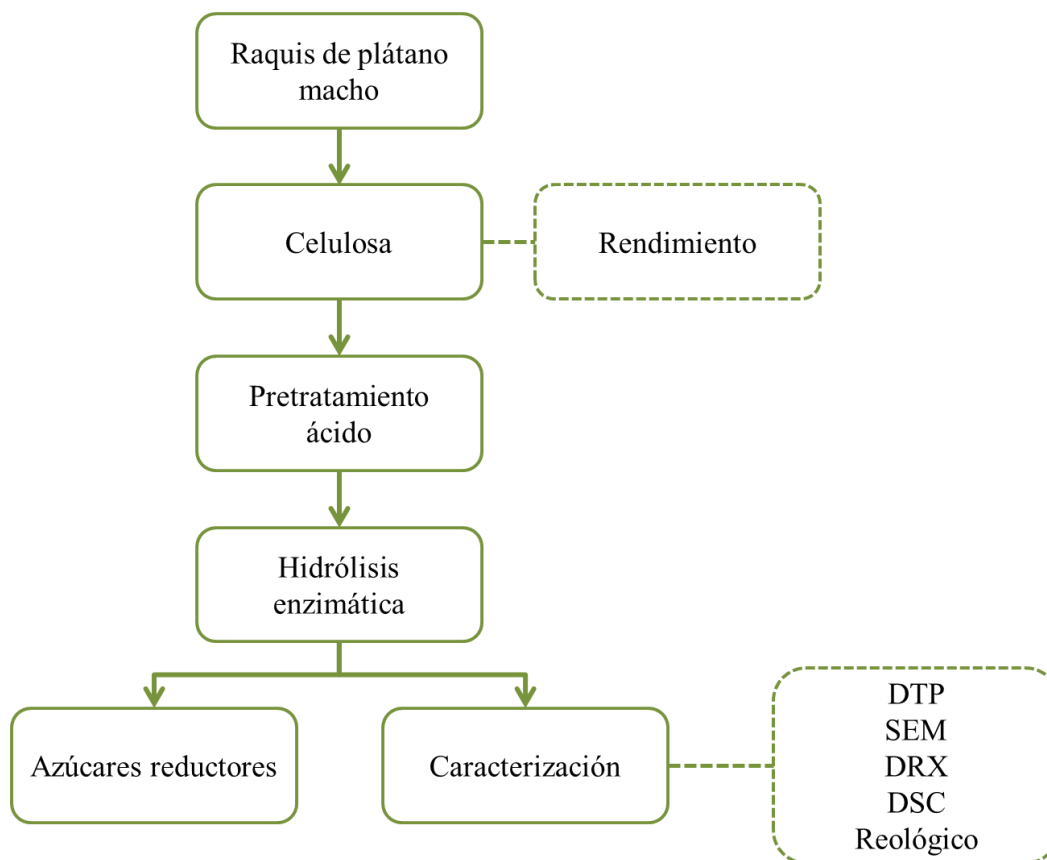
Optimizar el proceso de hidrólisis enzimática parcial para la obtención de nanofibras de celulosa a partir de raquis de plátano macho para la obtención de NFC.

### **11.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener fibras de celulosa a partir del raquis de plátano.
- Optimizar el proceso de hidrólisis enzimática parcial mediante metodología de superficie de respuesta.
- Caracterizar morfológica y estructuralmente el material obtenido.
- Evaluar la estabilidad térmica y comportamiento reológico de las nanofibras de celulosa.

## 12 MATERIALES Y MÉTODOS

Se aplicó la siguiente estrategia experimental:



**Figura 4.** Estrategia Experimental

### 12.1 Material biológico

Como materia prima se utilizó el raquis de plátano macho (*Musa paradisiaca* L.) el cual fue proporcionado por la Finca “Mundo Nuevo” ubicada en el municipio de San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca, México. Para el aislamiento de la celulosa se utilizó peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e hidróxido de sodio (NaOH) en diferentes concentraciones, para el pretratamiento ácido se utilizó ácido sulfúrico 6 M, en la hidrólisis enzimática se utilizó una enzima comercial (Accellerase ® 1500, DuPont) cuyas características se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.** Características de la enzima

<b>Actividad de la Endoglucanasa</b>	<b>2200-2800 CMC U/g</b>
<b>Actividad de la Beta-Glucanasa</b>	450-775 pNPG U/g
<b>Aspecto</b>	Líquido marrón
<b>pH</b>	4.6-5.0
<b>Temperatura</b>	50°C

## 12.2 Aislamiento de celulosa

Para el aislamiento de la celulosa a partir del raquis de plátano macho, primero se realizó un pretratamiento de las fibras, se cortó el raquis de plátano de manera vertical con dimensiones de 10 cm de largo y 5cm de ancho y un grosor aproximado de 0.5 cm. Estos cortes se sumergieron en una solución de ácido cítrico al 3% durante 30 min para evitar la oxidación y eliminar algunas gomas, después se dejó escurrir y secar en un horno (BINDER GmbH, FD 115) a una temperatura de 60°C por 24 h. Después que se secó el raquis se realizó una molienda en una licuadora doméstica (Osterizer Blender) durante 1 min. Una vez terminado este proceso, se prosiguió a realizar un acondicionamiento de las fibras pesando 5 g de fibra del raquis de plátano y se agregaron a un matraz Erlenmeyer de 500 ml, posteriormente se adicionaron 250 ml de agua destilada para ser sometido a un proceso de acondicionamiento utilizando temperatura de 121 °C y una presión de 15 psi por 15 min. Una vez que las fibras se atemperaron, se licuaron durante 1 min en una licuadora domestica (Osterizer Blender), realizando posteriormente un filtrado. Las fibras se lavaron con agua destilada hasta que el sobrenadante estuvo lo más claro posible. Las fibras que se acondicionaron, se blanquearon depositándolas en un matraz de bola de tres cuellos con capacidad de 1L, al cual se le agregó una mezcla de NaOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 5% (p/v) y 11% (v/v) respectivamente en una relación 1:1 dejándolo reaccionar por 24 h con una temperatura de 65°C, con agitación constante, pasado el tiempo de blanqueado de las fibras se lavaron con agua destilada hasta tener un pH 7. Una vez que se terminó el proceso de blanqueado, las fibras se colocaron en una placa para someterlas a secado en un horno a una temperatura de 65 °C por 24h. Una vez transcurrido el tiempo de secado se colocaron en un desecador, para posteriormente pesar en una balanza Termo gravimétrica.

Finalmente, la muestra se colocó en un frasco de plástico y se recubrió con papel aluminio para su uso posterior.

### **12.3 Rendimiento de celulosa obtenida**

Para obtener el rendimiento de la celulosa procesada, se pesaron 3 charolas de aluminio y se sometieron a peso constante en un horno a 65°C por 24 horas hasta no observar una variación en su peso. Después, se tomó una alícuota de 10 ml y se agregó a las charolas que se pusieron en peso constante para secar nuestra la muestra de interés a 65°C por 24 horas. Una vez seca la muestra, se colocó en un desecador, se pesó y se calculó el porcentaje con la siguiente fórmula:

$$ST = \left( \frac{A-B}{V} \right) \times 1000$$

En dónde:

A: es el peso del residuo seco más charola de aluminio.

B: peso de la charola seca.

V: volumen de la muestra.

### **12.4 Pretratamiento ácido**

Se realizó un pretratamiento ácido previo a la hidrólisis enzimática para fracturar las fibras de raquis de plátano y que hubiera homogeneidad y puedan ser mejor hidrolizadas. Para ello, se tomaron 25 g de muestra seca (fibras de raquis de plátano) y se colocaron en un matraz de 1L con ácido sulfúrico 6 M a una temperatura de 65°C durante 3 horas a 340 rpm. Concluido este tiempo se retiró el residuo de ácido sulfúrico realizando enjuagues con H<sub>2</sub>O.

### **12.5 Hidrólisis enzimática de las fibras**

El proceso de hidrólisis enzimática se llevó a cabo bajo las especificaciones que el proveedor de la enzima proporciona en la ficha técnica del producto. Se utilizó como sustrato la celulosa de raquis de plátano, un buffer de acetatos 1M con pH 5 y la enzima

comercial Accellerase ® 1500. La reacción se montó en un baño maría con recirculador de inmersión y agitador constante en una parrilla de calentamiento, para lo cual se agregaron diferentes concentraciones de sustrato en frascos ámbar de 30 ml, se le agregaron 10 ml de buffer de acetatos 1M con pH 5. La muestra se dejó calentar 30 minutos a una temperatura de 50 °C en el baño maría a 250 rpm, transcurrido el tiempo se agregó la concentración correspondiente de enzima, dejando así la reacción por diferentes tiempos siguiendo su monitoreo. Una vez transcurrida la hidrólisis, se paró la reacción elevando la temperatura a 70°C por 10 minutos, después se centrifugó por 20 minutos para hacer la separación de las partículas, se filtraron y las partículas se dejaron suspendidas en agua destilada para futuros análisis.

## 12.6 Diseño experimental

El diseño Box-Behnken se utilizó para modelar y optimizar las variables que más afectan el proceso de hidrólisis enzimática de las fibras de celulosa extraídas a partir de raquis de plátano. Los factores más importantes contemplados en estudio fueron tres: 1) Concentración de sustrato (mg), 2) Concentración de enzima (µL) y 3) Tiempo de la hidrólisis (ver tabla 6). El diseño realizado constó de 17 experimentos con cinco repeticiones en el punto central, como variable de respuesta se cuantificó la concentración de azúcares reductores generados después del proceso de hidrolisis enzimática. Se utilizó el software Design-Expert versión 7.0.

**Tabla 6.** Factores para el diseño experimental Box-Behnken en la hidrolisis enzimática de plátano macho (*Musa paradisiaca L.*).

Variable independiente	Intervalo
Concentración de sustrato	100-200 (mg)
Concentración de enzima	20-60 (µL)
Tiempo	15-1440 (min)

En la tabla 7 se muestra la matriz del diseño experimental en la cual se observan las 17 corridas experimentales que se realizaron para el proceso de hidrólisis enzimática de las fibras del raquis en donde, X<sub>1</sub>= Concentración de sustrato (mg); X<sub>2</sub>= Concentración de enzima (µL), X<sub>3</sub>= tiempo (minutos).

**Tabla 7.** Matriz del diseño experimental Box-Behnken de un sistema de tres factores con valores codificados y valores reales.

Experimento	Valores codificados			Valores reales		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Sustrato (mg)	Enzima (μL)	Tiempo (min)
<b>1</b>	0	0	0	150	40	727.5
<b>2</b>	1	0	-1	200	40	15
<b>3</b>	-1	1	0	100	60	727.5
<b>4</b>	0	0	0	150	40	727.5
<b>5</b>	0	1	1	150	60	1440
<b>6</b>	1	1	0	200	60	727.50
<b>7</b>	0	0	0	150	40	727.50
<b>8</b>	0	-1	-1	150	20	15
<b>9</b>	-1	0	-1	100	40	15
<b>10</b>	1	0	1	100	40	1440
<b>11</b>	0	-1	1	150	20	1440
<b>12</b>	1	0	1	200	40	1440
<b>13</b>	0	0	0	150	40	727.50
<b>14</b>	0	1	-1	150	60	15
<b>15</b>	1	-1	0	200	20	727.50
<b>16</b>	0	0	0	150	40	727.50
<b>17</b>	-1	-1	0	100	20	727.50

### 12.7 Azúcares reductores totales

Para determinar la concentración de azúcares reductores liberados en la hidrólisis de la celulosa mediante el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1995). Este método se basa en la reacción entre el grupo reductor aldehído del azúcar y el DNS que origina un compuesto coloreado (ácido 3-amino-5 nitrosalicílico). Por tanto, la concentración del azúcar reductor presente puede determinarse aplicando un método fotocolorímetro.

La composición del reactivo (DNS) es la siguiente:

- ácido 3,5 dinitrosalicílico 1g
- NaOH 1.6g
- Tartrato de sodio y potasio 30g
- Se ajustó y aforó a 100 ml

Inicialmente se tomaron 50  $\mu$ l de muestra, a ésta se le adicionó 450  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y 500  $\mu$ l de DNS, se calentaron en baño de agua a 80-85 °C durante 5 minutos. Posteriormente se introdujeron durante 5 min en un baño de agua fría y se midió la absorbancia a 540 nm.

La concentración de azúcares reductores totales se calculó a partir de una recta patrón determinada previamente con disoluciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1,1.2 y 1.4 g/L. Dicha serie se determinó para cada serie de medidas de azúcares totales.

## **12.8 Caracterización**

### **12.8.1 Distribución de tamaño de partícula (DTP)**

Esta técnica fue utilizada para determinar el tamaño de las partículas de celulosa que más predomina después de la hidrólisis. Para llevar a cabo esta técnica se determinó a temperatura ambiente utilizando un analizador de difracción de láser Malvern Master Sizer (Malvern Instrument, Ltd.), con una celda de Fourier (0.02 a 200 $\mu$ m) y una unidad de dispersión de muestra de volumen pequeño (SVSDU) con una capacidad de 50 a 120  $\mu$ L. Con esta técnica es posible calcular la distribución de tamaño de partículas (Carmona *et al.*, 2009).

### **12.8.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

La técnica de microscopia electrónica de barrido se utilizó para observar y caracterizar superficialmente las nanofibras de celulosa, a escala micrométrica y nanométrica, arrojando así información morfológica de las nanofibras de celulosa. Para realizar esta técnica se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FEI Helios NanoLab 600 Dual-Beam). Primero, se espolvorea una pequeña cantidad de muestra sobre una cinta

de cobre conductora de doble adhesión, la cual se fijó previamente en un soporte de aluminio del equipo. Posteriormente la muestra se cubrió con una capa de carbono de 30 nm, se colocó en el ionizador de metales y se recubrió con una capa de oro de 60 nm (Carmona *et al.*, 2009; García, 2015).

### **12.8.3 Difracción de Rayos X (DRX)**

Esta técnica se utilizó para obtener información de la estructura cristalina de la celulosa, identificando así los picos característicos para la región amorfa y cristalina. Se llevó a cabo colocando una cantidad de nanofibras de celulosa sobre el porta muestra del difractor de rayos-X marca BrukerAxs, modelo D8 Advance, con un generador de radiación de Cu-K $\alpha$  con filtro de Ni y rejillas de 2 mm, se correrán las muestras en 2 $\Theta$  de 5 a 55 ° con una intensidad de 30 mA y un voltaje de 40 kV (García J., 2015).

El porcentaje de cristalinidad (% C) se determinó mediante la siguiente formula:

$$\% C = \text{ACD} / \text{ATD} \times 100$$

Dónde:

ATD = Área total dispersa

ACD = Área cristalina dispersa

### **12.8.4 Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

Las propiedades térmicas como temperatura y entalpía de fusión se evaluaron en un calorímetro de barrido diferencial (TA Instrumentos), calibrado con indio. Previamente se pesa la charola como referencia. Se pesaron 2 mg de muestra en una charola. En seguida se sometió la muestra a un programa de calentamiento de 20 a 200 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

### **12.8.5 Análisis de comportamiento Reológico**

Las mediciones reológicas se llevaron a cabo usando un equipo ARES (TA Instrumentos), mediante esfuerzo controlado, con una geometría de placas paralelas de 40 mm. El espacio de placa y placa fue 1 mm. Se prepararon suspensiones de las muestras al 0.50 % p/p. Antes

del proceso de medición, las muestras fueron calentadas a 80 ° C por 30 min. Se realizó primero un barrido de frecuencia (frecuencia angular) en un rango de 100-0,1 Rad s<sup>-1</sup> a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min. Posteriormente la primera etapa se realizó desde 80 °C hasta 20°C y en seguida llevada nuevamente de 20 °C a 80°C y de vuelta a 20 °C, a una frecuencia angular de 1 rad s<sup>-1</sup>, esto con la finalidad de evaluar la dependencia de la temperatura. En todos los experimentos, las mediciones se realizaron con una tensión del 0,7%, para asegurar que las mediciones fueran realizadas en la región viscoelástica lineal.

## 13 RESULTADOS

### 13.1 Obtención de celulosa de raquis de *M. paradisiaca*

En la primera etapa de este trabajo se procedió a extraer la celulosa de las fibras del raquis de plátano, a partir de 5 g de fibras de raquis de plátano se obtuvieron  $1.27 \pm 0.03$  g con un rendimiento de  $25.4 \pm 0.69$  % (tres réplicas).

Este resultado es ligeramente menor al reportado por Canché *et al.* (2005), mediante una hidrólisis alcalina en donde obtuvieron un rendimiento de celulosa del 27.2% (con una sol. NaOH al 20% y pH 8.4), pero mayor que el que reporta Tibolla *et al.* (2017), en donde obtuvieron un rendimiento de celulosa de 16.5% (con una solución de KOH al 5% w/v), estas diferencias son debidas al pretratamiento, el cual se utiliza básicamente para eliminar ceras pectinas y resinas, mientras que en este trabajo se realizó un pretratamiento en las fibras, primero fueron sometidas en ácido cítrico al 0.3% para eliminación de estos residuos y posteriormente fueron sometidas en autoclave (para el ablandamiento de las fibras y eliminación de pigmentos), el cual es menos agresivo y provocar menor destrucción de la integridad de las fibras.

### 13.2 Hidrólisis enzimática de las fibras de raquis pretratadas

El uso de la enzima Accellerase ®1500 presentó un efecto positivo en la generación de azúcares reductores ( $A_R$ ) estos resultados se pueden observar en la tabla 8. El valor más alto de  $A_R$  fue de 2.29 mg/mL para el tratamiento No. 3, utilizando una concentración de sustrato de 100 mg, una concentración de enzima de 60  $\mu$ L y un tiempo de 60 min. Por otro lado el valor más bajo en la concentración (0.34 mg/mL) de  $A_R$  fue para el experimento No. 8, utilizando una concentración de sustrato de 150 mg, una concentración de enzima de 20  $\mu$ L y un tiempo de 15 min.

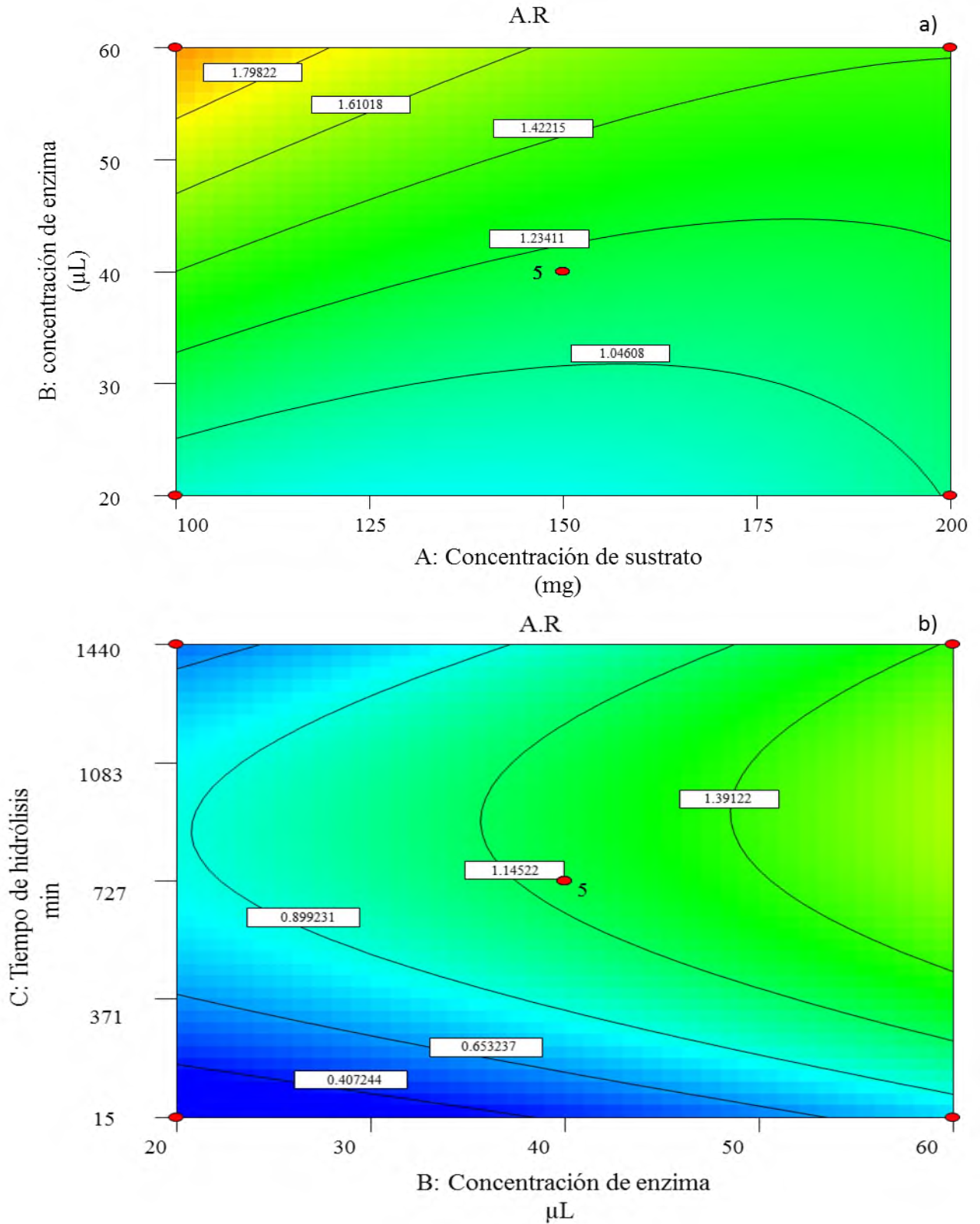
**Tabla 8.** Matriz del diseño experimental de la MSR utilizada para optimizar el proceso de hidrólisis enzimática (Accellerase ®1500) de las fibras de raquis de plátano y la generación de azúcares reductores.

Tratamiento	Factor 1 A sustrato mg	Factor 2 B enzima µL	Factor 3 C Tiempo de hidrólisis min	A <sub>R</sub> mg/mL
1	150	40	727.5	1.08±0.07
2	200	40	15	0.61±0.09
3	100	60	727.5	2.29±0.11
4	150	40	727.5	1.16±0.06
5	150	60	1440	1.23±0.09
6	200	60	727.5	1.46±0.03
7	150	40	727.5	1.31±0.09
8	150	20	15	0.34±0.02
9	100	40	15	0.47±0.03
10	100	40	1440	1.1±0.13
11	150	20	1440	0.72±0.01
12	200	40	1440	1.09±0.07
13	150	40	727.5	1.1±0.07
14	150	60	15	0.62±0.08
15	200	20	727.5	0.75±0.08
16	150	40	727.5	1.3±0.04
17	100	20	727.5	0.89±0.08

Estos resultados en la tendencia de A<sub>R</sub> son razonables, pues al comparar estos dos experimentos (3 y 8), se observa que la concentración de A<sub>R</sub> se ve favorecida con el uso de la concentración máxima de enzima (60 µL), tomando en cuenta una concentración de sustrato y tiempo moderado o intermedio (100 mg y 727.5 min respectivamente), mientras que para el tratamiento No. 8 la concentración de sustrato utilizada fue mayor (150 mg), con una menor concentración de enzima (20 µL) y un el tiempo de hidrólisis mínima (15 min). Esto se puede deber al efecto del tiempo de hidrólisis y la concentración de enzima (tabla 9) donde presenta una influencia en la obtención de los azucares reductores, debido a que la enzima, no alcanza a hidrolizar por completo las regiones amorfas de las fibrillas de celulosa debido al tiempo y la concentración de enzima (Bolio-López *et al.*, 2011) como se muestra en el tratamiento 8.

En la figura 5 se presentan las gráficas de contornos (5a y 5b) del efecto que tienen las variables involucradas en el proceso de hidrólisis enzimática (concentración de sustrato, concentración de enzima y tiempo de hidrólisis) de las fibras de raquis y su efecto en la concentración de  $A_R$ . En la gráfica 4a se puede observar el efecto que tiene la concentración de sustrato y enzima sobre la generación de  $A_R$ , + se puede apreciar como a una concentración base de sustrato (100 mg), la concentración de  $A_R$  va en aumento a medida que aumenta la concentración de enzima (20 a 60  $\mu\text{L}$ ). Sin embargo, al incrementar la concentración de sustrato ( $100 \geq 200$  mg) la concentración de  $A_R$  va disminuye. Esto puede ser debido a que al incrementar la concentración de sustrato la enzima no pueda ser suficiente para hidrolizarlo.

En la figura 5b se puede apreciar el efecto que tiene la concentración de enzima y tiempo de hidrólisis sobre la generación de  $A_R$ . Entre mayor es la concentración de enzima (20 a 60  $\mu\text{L}$ ) y mayor el tiempo de hidrólisis (15 a 1440 min), la concentración de  $A_R$  va en aumento. Sin embargo la gráfica de contornos nos muestra que con una concentración máxima de enzima (60  $\mu\text{L}$ ) y un tiempo intermedio (727.5 min), también puede obtener una concentración similar de  $A_R$  y con esto disminuye sustancialmente el tiempo de hidrólisis, lo cual resulta ser muy costoso ya en escalamientos a nivel planta piloto o industrial.



**Figura 5.** Efecto del contenido de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática. a) Concentración de sustrato y concentración de enzima; b) Concentración de enzima y tiempo de hidrólisis.

En la figura 6 se presentan las gráficas de superficie (6a y 6b) del efecto de las variables (concentración de sustrato, concentración de enzima y tiempo de hidrólisis) en el proceso de hidrólisis enzimática de las fibras de raquis y su efecto sobre concentración de  $A_R$ . En la gráfica 6a se observa el efecto que tiene la concentración de sustrato y enzima, al igual que en la figura 5a se aprecia la tendencia que al aumentar la concentración del sustrato hay una disminución en la eficiencia de la enzima.

Cuando se observa el efecto de la concentración de enzima y el tiempo de hidrólisis (fig. 6b) en la generación de  $A_R$ , la tendencia es similar a la gráfica de contornos que se muestra en la figura 5b, donde se muestra una similitud en la concentración de  $A_R$  en una máxima de enzima de 60  $\mu\text{L}$  con un tiempo de 727.5 min.

De acuerdo a los datos obtenidos de los azúcares reductores se obtuvo un coeficiente de determinación de 87% y del cual se obtuvo el modelo de regresión en la obtención de  $A_R$ :

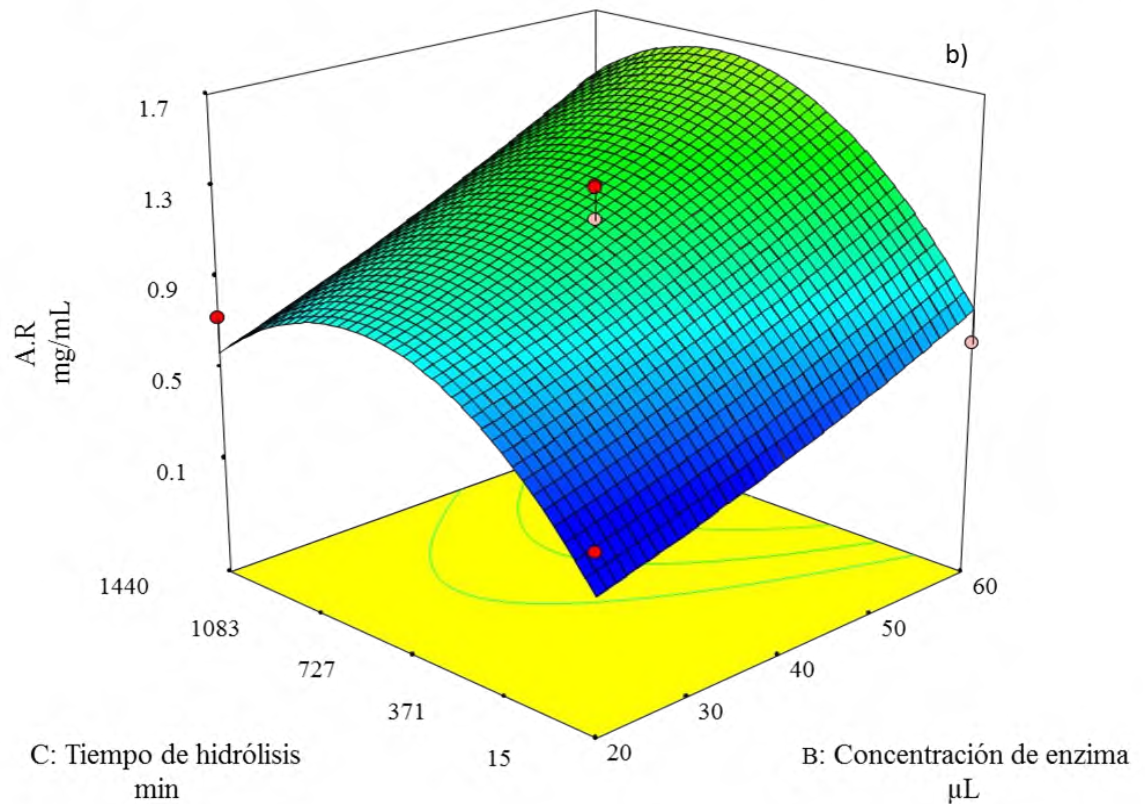
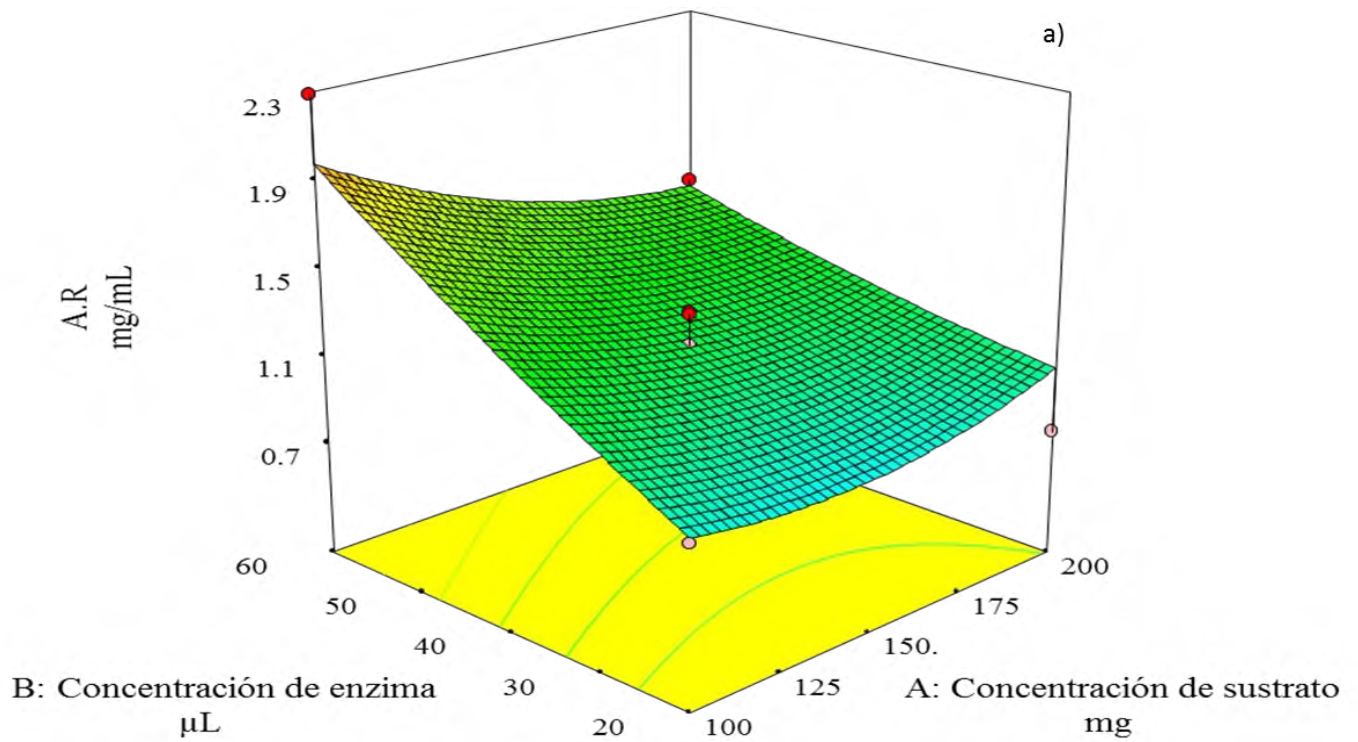
$$A_R = +0.238 - 9.409_E^{-3}S + 0.033E + 1.795_E^{-3}H - 1.700_E^{-4}SE - 1.052_E^{-6}SH + 3.859_E^{-6}EH + 4.950S^2 + 9.062 E^2 - 9.775 H^2$$

Dónde:

**S**= concentración de sustrato

**E**= concentración de enzima

**H**= tiempo de hidrólisis



**Figura 6.** Efecto de los tratamientos en el contenido de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática vista en superficie 3D. a) Concentración de sustrato y concentración de enzima; b) concentración de enzima y tiempo de hidrólisis.

El análisis de varianza (ANOVA) para este experimento entre las variables se presenta en la siguiente tabla.

**Tabla 9.** ANOVA para modelo de superficie de respuesta cuadrática.

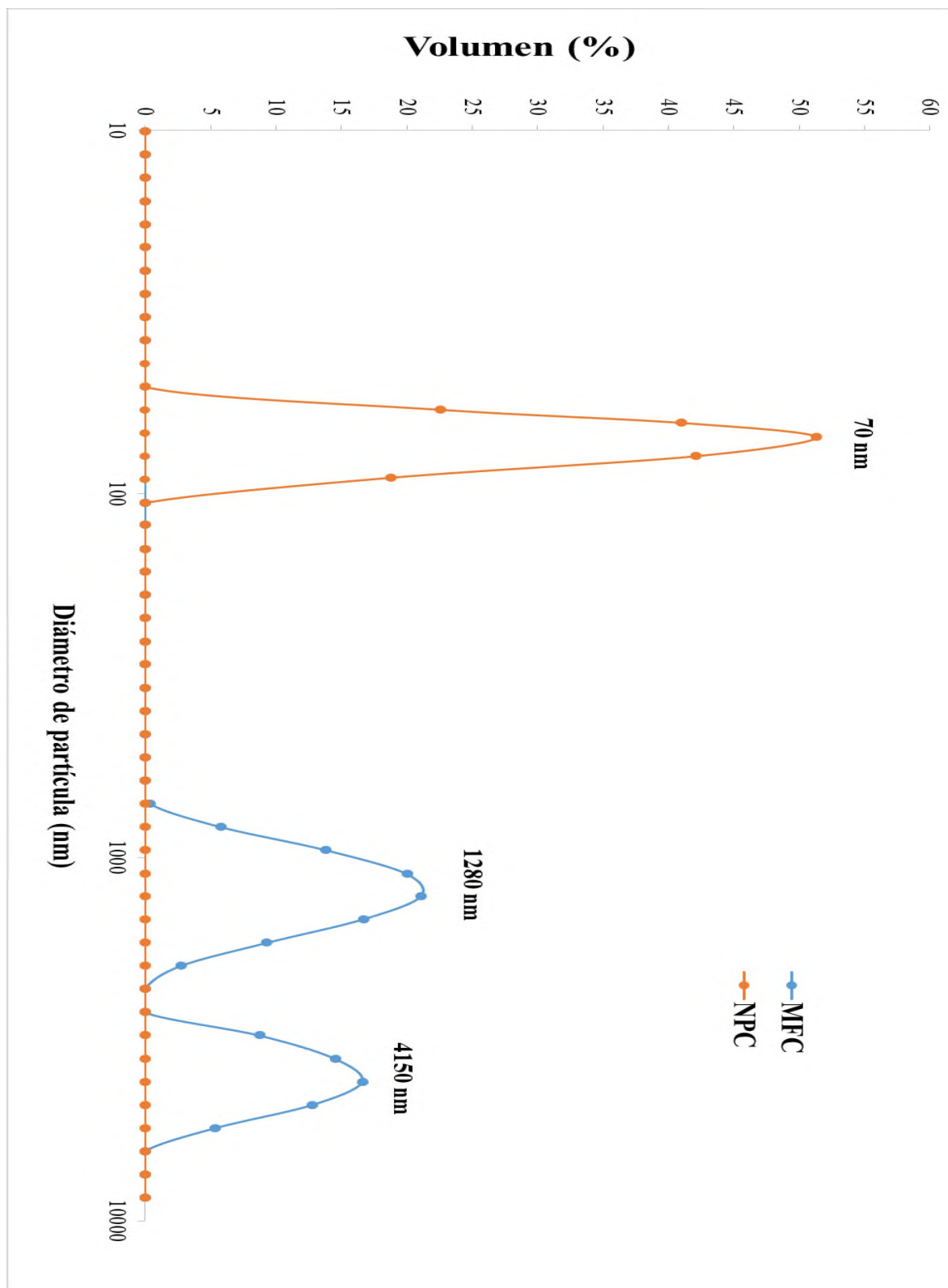
<b>Fuente de variación</b>	<b>F<sub>0</sub></b>	<b>Valor de P</b>	
Modelo	5.35	0.0189	Significativo
A.-Concentración de sustrato	1.5	0.2600	
B.- Concentración de enzima	17.24	0.0043	
C.- Tiempo de hidrólisis	9.25	0.0188	
AB	1.92	0.2081	
AC	0.094	0.7686	
BC	0.2	0.6673	
A <sup>2</sup>	1.07	0.3349	
B <sup>2</sup>	0.092	0.7705	
C <sup>2</sup>	17.24	0.0043	
Residual			
Falta de ajuste			
Error puro	10.46	0.0231	Significativo

Donde el valor F de la estadística del modelo fue 5.35 esto implica que el modelo es significativo y que solo hay una probabilidad del 1.89 % que un modelo F-Valor podría ocurrir debido al ruido, los valores de Prob > F inferiores a 0.05 indican que los términos del modelo son significativos, en este caso; B, C, C<sup>2</sup>, son términos de modelos significativos los valores superiores a 0.10 indican que los términos del modelo no son significativos, por lo que el tratamiento no. 8 es estadísticamente significativo.

### 13.3 Caracterización

#### 13.3.1 Distribución de tamaño de partícula

De acuerdo a la hidrólisis enzimática realizada de las MFC de raquis de plátano se obtuvo la siguiente distribución de tamaño de partículas como se muestra en la figura 7. Las fibras de celulosa de raquis de plátano a las que se les realizaron la hidrólisis enzimática mostraron una distribución de partículas en dos grupos, de NFC con tamaños 51 a 100 nm y

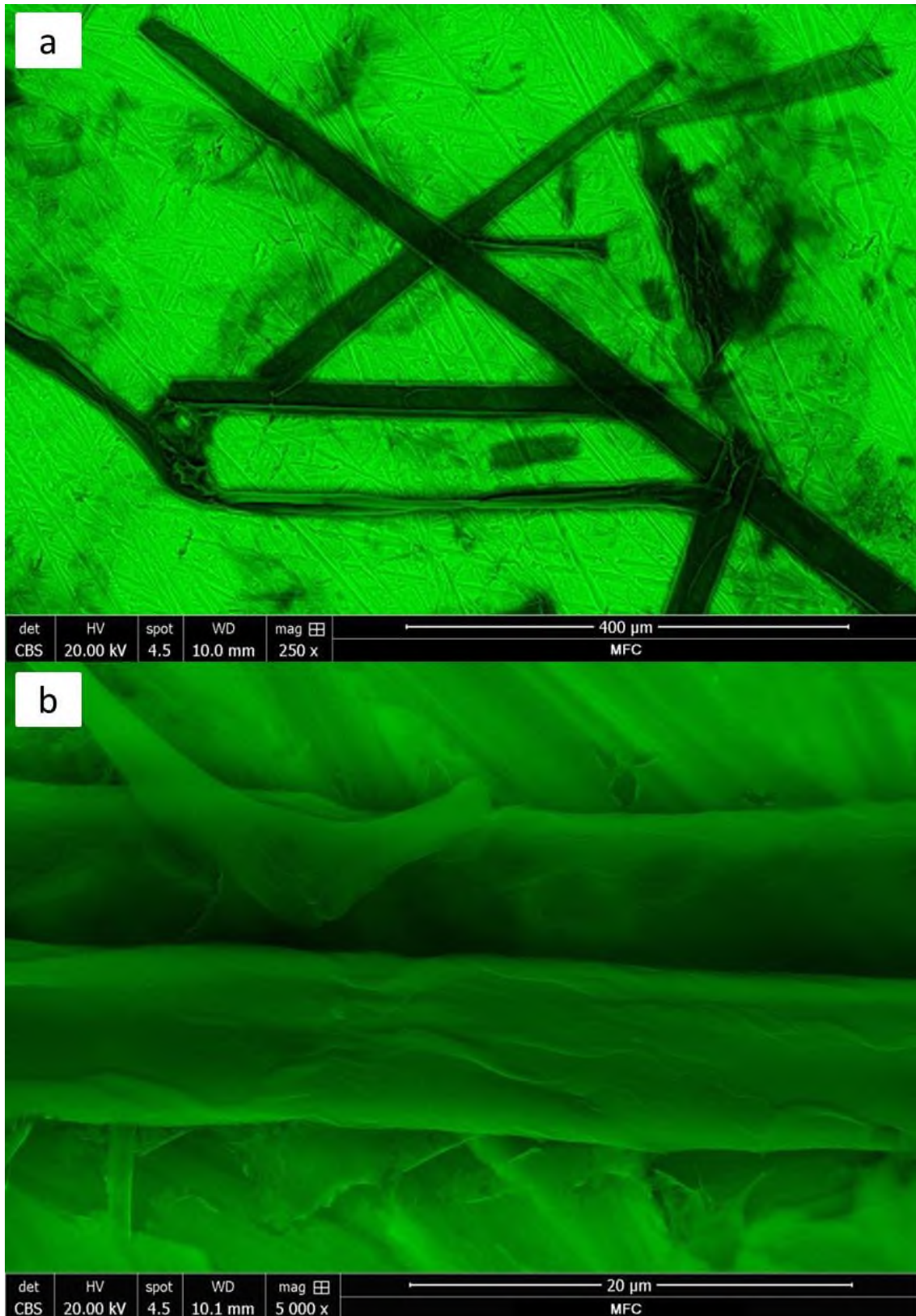


**Figura 7.** Distribución de tamaño de partícula de microfibras de celulosa (MFC) y nanopartículas de celulosa (NPC).

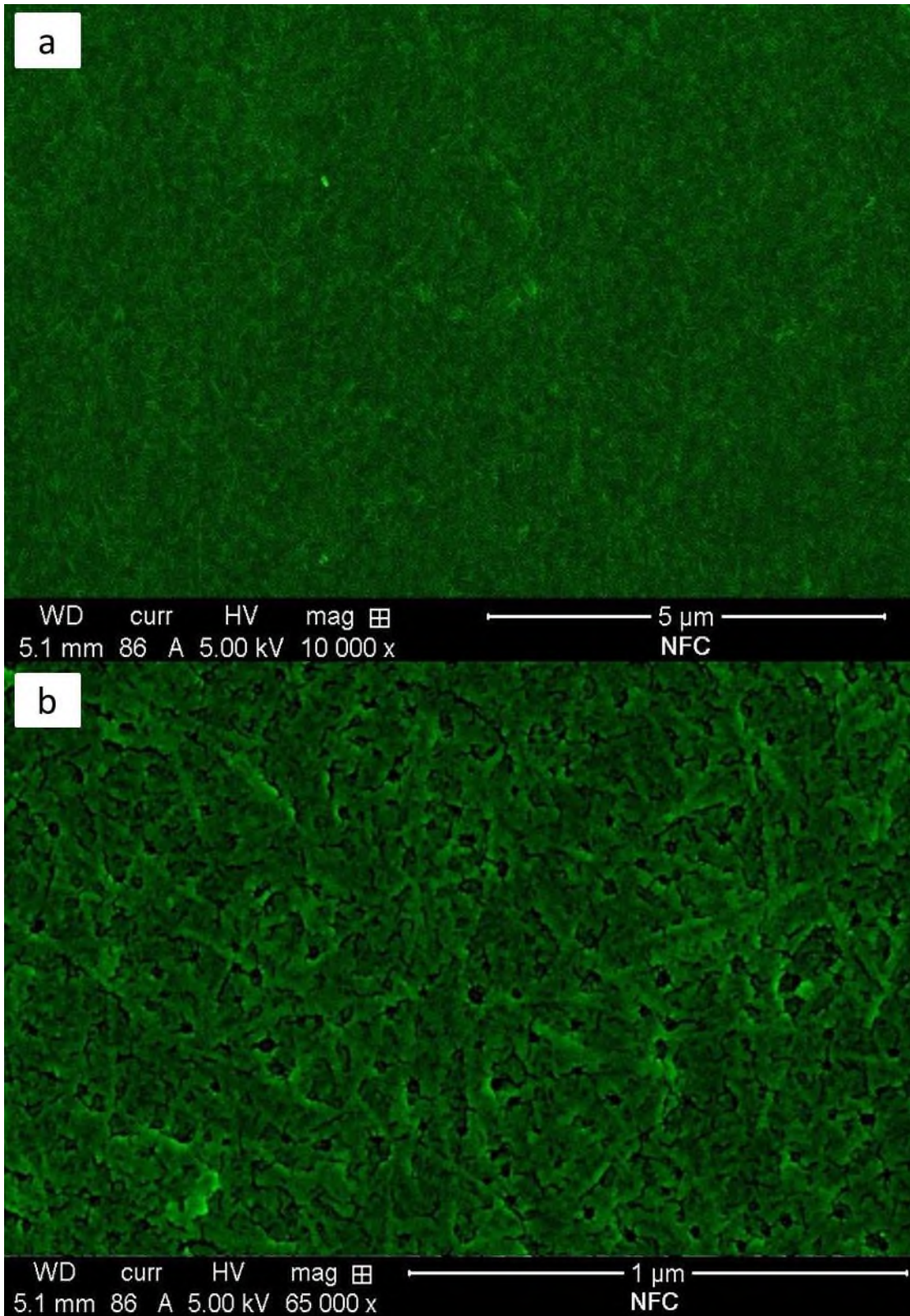
MFC que van de 990 a 9800 nm, por lo que se demostró que mediante la hidrólisis enzimática se pueden obtener NFC, esto se debe a que las condiciones experimentales de sustrato (100 mg), enzima (60 $\mu$ L) y tiempo (727.5 min) de la hidrólisis son fundamentales en la regulación de distribución y tamaño de las partículas. Estos resultados tienen una similitud con lo reportados por Tibolla *et al.* (2014), en nanofibras obtenidas a partir de cascara de plátano con un tamaño de partícula de (10.9 -7.6) menor a lo que se encontró en esta investigación. Sin embargo, Meyabadi y Dadashian (2012), usando desechos de fibra de algodón obtuvieron nanopartículas de tamaño de partícula de 40-90 nm mediante una hidrólisis enzimática y ultrasonicación observando que lo reportado en este trabajo se asemeja a lo reportado por Meyabadi y Dadashian. Las diferencias son asociadas principalmente a la fuente utilizada método y tiempo de hidrólisis utilizados durante el proceso de extracción de las NFC. De acuerdo al tamaño de las NFC obtenidas mediante la hidrólisis enzimática pueden tomar una gran importancia ya que pueden tener diferentes aplicaciones por ejemplo como agentes reforzantes en matrices poliméricas.

### **13.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

Por medio del SEM se observó un cambio definitivo en la estructura morfológica de las fibras de celulosa obtenidas del raquis de plátano y que se produjo mediante la hidrólisis enzimática y secada por liofilización. En la Figura 8a (magnificación de 250 x) y 8b (magnificación de 5000 x) se presentan las micrografías de SEM para las MFC. En estas se puede observar pequeñas microfibrillas alargadas con tamaños variados, estas microfibras presentan también pequeños desgarres y rupturas como evidencia de los tratamientos a los cuales fueron sometidos para su obtención (Fig. 8a). También se realizó un barrido la magnificación de una microfibrillas para poder observar más a detalle su morfología (Fig. 8b), en esta se puede observar dos fragmentos de microfibras en forma paralela, con una superficie lisa y rugosa con pequeños plegamientos y en algunos casos pequeñas impurezas o fragmentos de celulosa como consecuencia de obtención de la misma. Se puede distinguir también que estas microfibras no presentan grosor y tamaño similar. Debido al proceso de obtención de la materia prima (celulosa) antes del proceso de hidrólisis.



**Figura 8.** Imágenes de SEM de celulosa obtenida a partir de raquis de plátano. a) magnificación a 250x y b) magnificación a 5000X.



**Figura 9.** Imágenes de SEM de Nanopartículas de celulosa (NFC) secadas por liofilización. a) magnificación a 10,000 y b) magnificación a 1 μm.

De acuerdo a las micrografías del SEM, se confirma un cambio morfológico de las fibras de celulosa de raquis de plátano mediante una hidrólisis enzimática, obteniendo tamaños de partículas de 50 hasta 6440 nm (fig. 9) como muestra la distribución de partícula (fig. 7.). Siqueira *et al.* (2010), realizaron una hidrólisis enzimática de celulosa microfibrilada a partir de fibras nativas de sisal (*Agave sisalana*) obteniendo microfibras de tamaño promedio de 277 nm de largo y 8.7 nm de diámetro, siendo de un tamaño mayor a las NFC obtenidas en este trabajo, sin embargo, no se pueden apreciar las fibras debido al tipo de secado (liofilizado) debido a que presentan una aglomeración de las nanofibras.

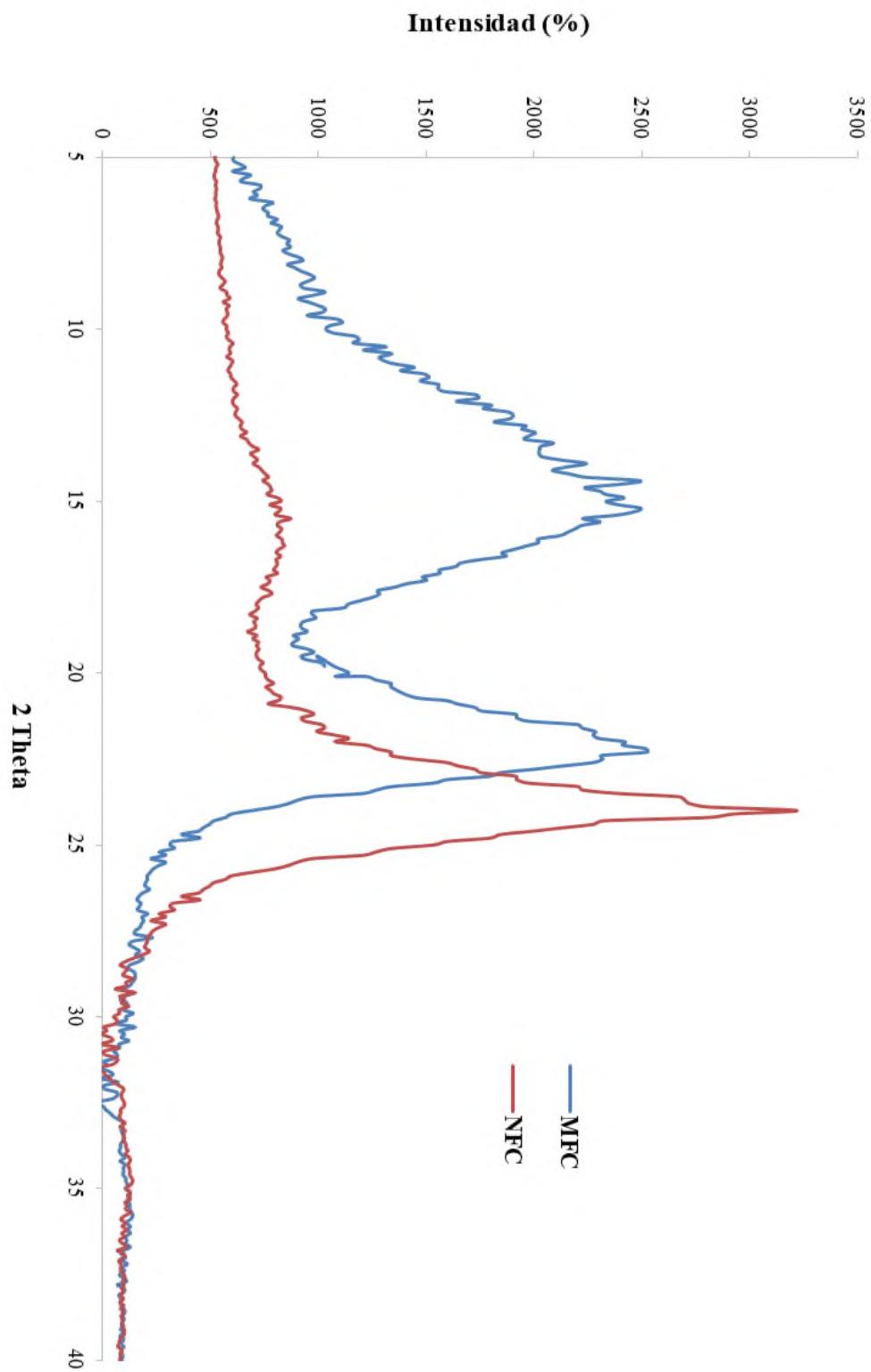
### 13.3.3 Difracción de Rayos X

Se analizaron los espectros de Difracción de Rayos X sobre las muestras obtenidas de la hidrólisis de celulosa de raquis de plátano. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10.

Las MFC presentan picos característicos del polimorfismo tipo I de la celulosa, mientras que las NFC obtenidas por hidrólisis enzimática presentan un desfase en sus picos y disminución de la intensidad en  $2\theta = 15$  y  $22^\circ$ .

Se observó en los patrones de difracción de rayos X de las NFC obtenidas presentan un aumento en el ángulo  $2\theta$  en comparación de las MFC el pico principal de  $2\theta = 24^\circ$  (material cristalino), en el caso de las MFC de  $2\theta = 22.2^\circ$ ; en el pico de material amorfo de las NFC fue de  $2\theta = 15.5^\circ$  y en las MFC de  $2\theta = 14.5^\circ$ , esto puede deberse a la hidrólisis enzimática, ya que la enzima rompe las estructuras amorfas aumentando la cristalinidad, y por lo tanto aumenta su ángulo  $\theta$ . De acuerdo a la literatura para el plano cristalino de la celulosa tipo I corresponden las difracciones próximas a  $2\theta$ :  $23^\circ$  (plano 002),  $15^\circ$  (plano 101),  $35^\circ$  (plano 040) (León, 2014).

Se determinó la cristalinidad de las fibras obtenidas mediante hidrólisis enzimática de las cuales las NFC tuvieron un porcentaje de cristalinidad del 72.74 %, mientras que las MFC fue de 65.52% las diferencias encontradas pueden asociarse al pretratamiento que se le realizó a la celulosa obtenida del raquis del plátano, sin embargo, en las NFC hubo una disminución en el material amorfo ( $2\theta = 22.2^\circ$ ) debido a la hidrólisis enzimática.

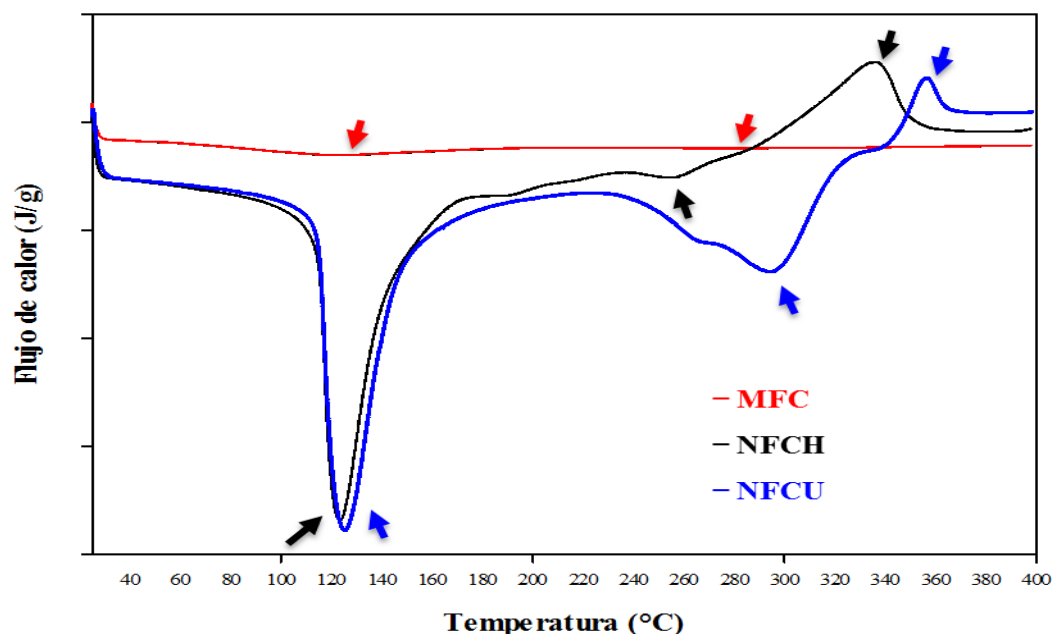


**Figura 10.** Patrones de difracción de rayos X de microfibras de celulosa (MFC) y nanofibras de celulosa (NFC) obtenidas por hidrólisis enzimática.

Hassan *et al.* (2010), determinaron el efecto de pretratamientos realizados al bagazo de celulosa mediante un tratamiento enzimático obteniendo un 73.9 % de cristalinidad; además, Hassan *et al.* (2014), realizaron un aislamiento asistido por enzimas de celulosa microfibrilada a partir de tallos de fruta de palma (*Phoenix dactylifera*), donde obtuvieron un porcentaje de cristalinidad del 77%, estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo (74.34 %), sin embargo, se observaron que las fibras mantuvieron su morfología, y el tamaño es similar a las obtenidas de las NFC.

### 13.3.4 Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En la figura 11, se muestra el termograma de DSC para las muestras microfibras de celulosa (MFC) nanofibras de celulosa extraídas por hidrólisis enzimática (NFCH) y nanofibras de celulosa extraídas por ultrasonido (NFCU). En ella se pueden observar las temperaturas de transición térmica de los diferentes componentes como el agua y la celulosa.



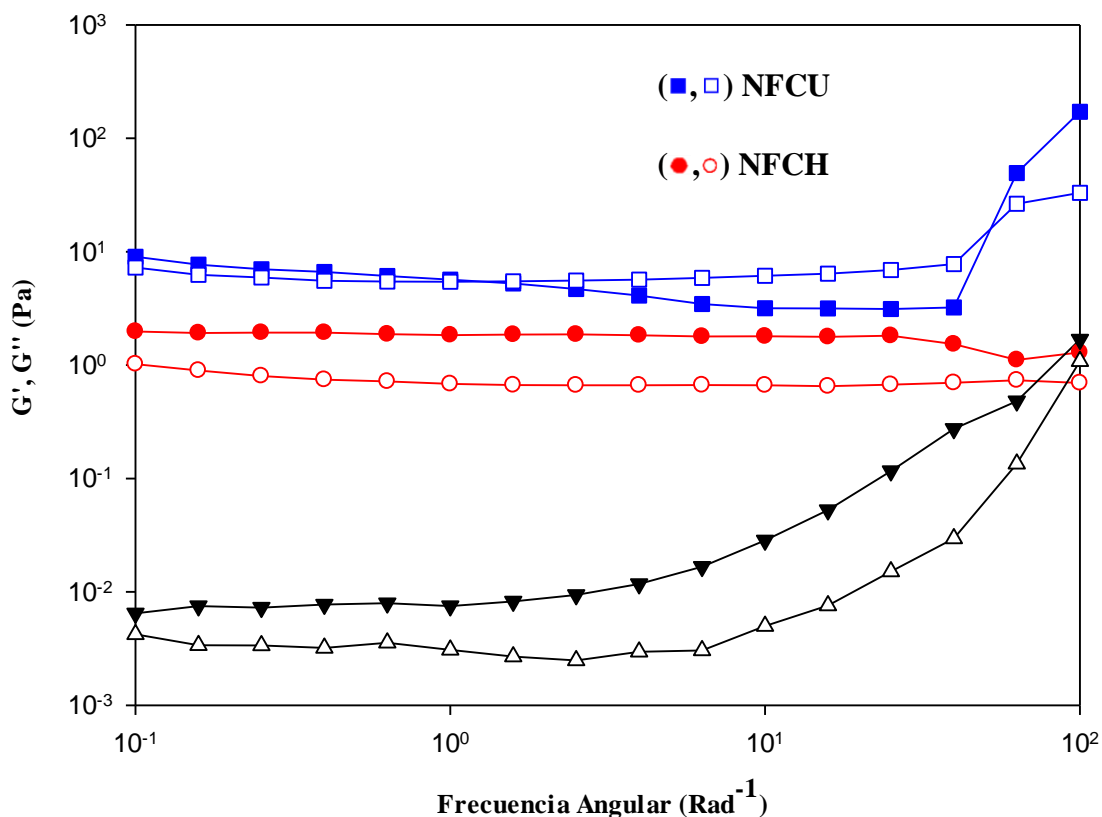
**Figura 11.** Termogramas de DSC de microfibras de celulosa (MFC) nanofibras de celulosa extraídas por hidrólisis enzimática (NFCH) y nanofibras de celulosa extraídas por ultrasonido (NFCU).

La muestra de MFC exhibe dos temperaturas de transición la primera alrededor de los 100 °C y la segunda en 300 °C, sin embargo esta se aprecia muy ligeramente debido a que las temperaturas de transición térmica de las demás muestras son más pronunciadas (NFCH y NFCU). La NFCH y NFCU por otro lado exhiben tres temperaturas de transiciones, la primera transición se presenta alrededor de los 125 °C (muy similares en ambas muestras) y ligeramente desfasada en comparación con la primera transición de las MFC. Este pico endotérmico correspondiente a la absorción de energía del proceso de desorción de agua, debido al carácter higroscópico de la celulosa. El segundo pico endotérmico aparece alrededor de 260 °C para las NFCH y a 300 °C para las NFCU. Este fenómeno es atribuido a la pérdida de agua y a la descomposición térmica de la celulosa, debido al proceso de pirólisis (Nyström *et al.*, 2010; Kokol *et al.*, 2015). Estas diferencias en las temperaturas de fusión pueden ser debidas a una mayor estabilidad térmica en las NFCU y puede ser atribuida a su mayor flexibilidad, ya que a mayor flexibilidad de las microfibras existe mayor posibilidad de interacciones, esto a su vez aumento la estabilidad térmica debido al efecto de enredamiento de las nanofibras (Das *et al.*, 2010). El tercer pico fue exotérmico y aparece en 340 y 360 °C para las NFCH y NFCU respectivamente. Se puede observar claramente que estas transiciones de fases están desfasadas entre una y otra muestras, lo cual indica que el mecanismo de degradación de las muestras no es el mismo. La naturaleza de las transiciones endotérmicas y exotérmicas pueden ser característica de la composición del material y cada una de estas tres transiciones proporciona idea de la naturaleza cristalina o estructura del material. Maiti *et al.* (2013), observaron temperaturas de fusión de 230 a 250 °C para la nanocelulosa cristalina extraída a partir de algodón.

### **13.3.5 Análisis del comportamiento Reológico**

En la Figura 12 se presentan los resultados del análisis reológico dinámico de las suspensiones (0.05% p/p) de microfibras de celulosa (MFC), nanofibras de celulosa extraídas por hidrólisis enzimática (NFCH) y nanofibras de celulosa extraídas por ultrasonido (NFCU). En estas figuras se puede apreciar el comportamiento del módulo elástico ( $G'$ ) y modulo viscosos ( $G''$ ) para cada una de las muestras a un temperatura de 90 °C. Los valores de  $G'$  para MFC y NFCH son más altos en comparación con los de  $G''$ . Un

comportamiento inverso presentaron las NFCU a valores de frecuencia de  $10^0$  a  $10^1$  Pa y predominando  $G''$  a valores más altos de frecuencia ( $10^2$ ).

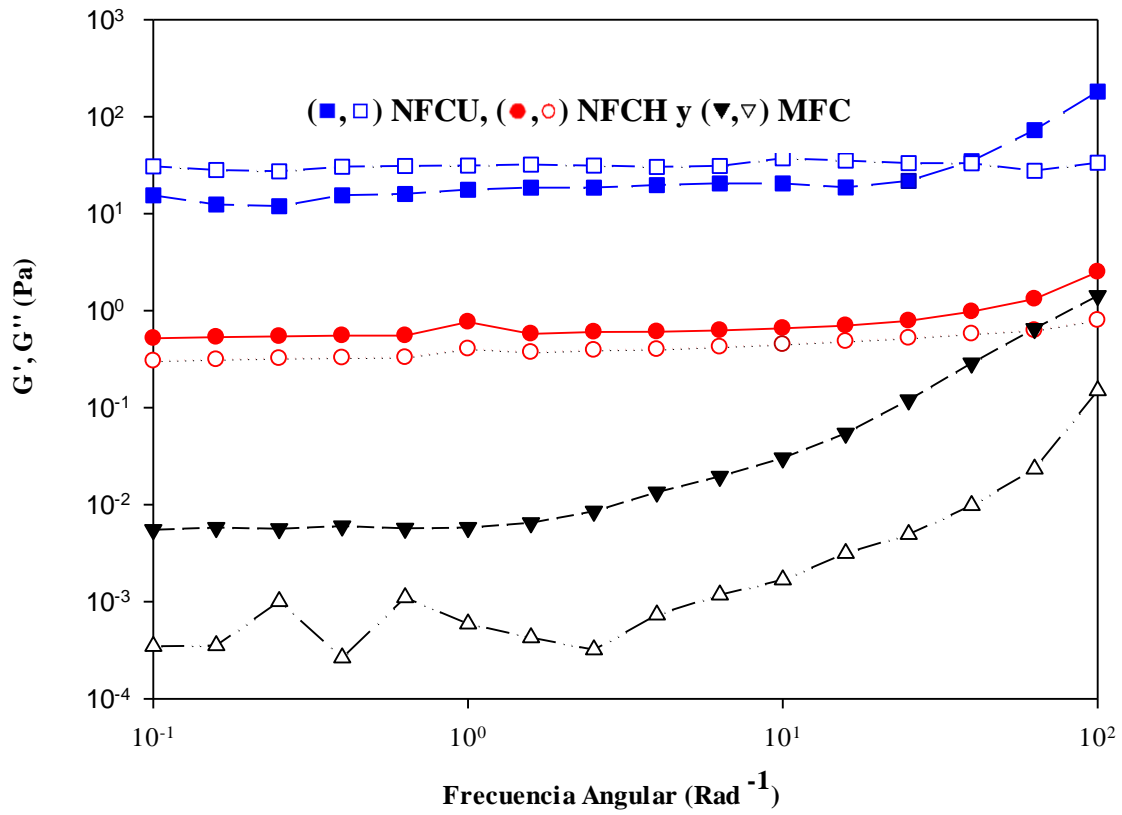


**Figura 12.** Comportamiento reológico de suspensiones (0.50 % p/p) de microfibras de celulosa (MFC), nanofibras de celulosa extraídas por hidrólisis enzimática (NFCH) y nanofibras de celulosa extraídas por ultrasonido (NFCU), evaluadas a 90 °C.  $G'$  Símbolos llenos (■●▼) y  $G''$  Símbolos vacíos (□○▽).

Las MFC exhiben valores de  $G'$  menores ( $10^{-3}$  a  $10^0$  Pa) en comparación con las NFCH ( $10^0$  Pa) con una fuerte dependencia de la frecuencia. Sin embargo, los valores de  $G'$  y  $G''$  de para las NFCU son más altos en comparación con lo que presentan las NFCH. Este mismo comportamiento fue observado para el caso del módulo de pérdida ( $G''$ ) dentro de la gama de la frecuencia angular medida ( $10^{-1}$  a  $10^2$  Pa). Esto significa que en caso de la MFC y NFCH el modulo elástico predomina sobre el modulo viscoso ( $G''$ ). También se puede observar que  $G''$  es ligeramente dependiente de la frecuencia angular, comportamiento parecido al de un gel. La gelificación de las suspensiones (MFC, NFCH y NFCU) podría atribuirse al efecto de la temperatura, la cual provoca interacción entre las nanofibras

formando una red tridimensional, la repulsión de cargas electrostáticas entre ellas, aumentan la estabilidad de los geles (Pääkkö *et al.*, 2007; Agoda-Tandjawa *et al.*, 2010). Un comportamiento similar encontró Winuprasith *et al.* (2013), en MFC extraídas a partir de la corteza de jobo de la india, en el cual reportaron valores de  $10^0$  a  $10^3$  Pa para  $G'$  y  $G''$ , estos valores son más bajos a los observados (0.01 a 1000 Pa) en esta investigación, a pesar de utilizar concentraciones (0.05% p/p) más bajas a las utilizadas (1% p/p) por estos autores.

En la Figura 13 se presentan los resultados del análisis reológico dinámico de las suspensiones (0.05% p/p) de microfibras de celulosa (MFC), nanofibras de celulosa extraídas por hidrólisis enzimática (NFCH) y nanofibras de celulosa extraídas por ultrasonido (NFCU) evaluadas a un temperatura de 30 °C. En esta se puede apreciar el comportamiento del módulo elástico ( $G'$ ) y modulo viscosos ( $G''$ ) para cada una de las muestras en la etapa que corresponde a la formación propia del gel durante el proceso de enfriamiento. Los valores de  $G'$  para MFC y NFCH son ligeramente más altos en comparación con los de  $G''$ . Sin embargo, las NFCU presentaron un comportamiento diferente con dominio de  $G''$  sobre  $G'$  durante casi toda la gama de frecuencia ( $10^0$  a  $10^1$ ) y cambiando su comportamiento ( $G' > G''$ ) al final de esta ( $10^2$  Pa). Este comportamiento diferente de NFCU puede ser atribuido dos aspectos: a) Morfología de las nanofibras obtenidas y b) Formación de una red por efecto de las interacciones electrostáticas entre las nanofibras de celulosa en la matriz del gel formado (Cassagnau, 2013; Khoshkava y Kamal, 2014).



**Figura 13.** Comportamiento reológico de suspensiones (0.50 % p/p) de microfibras de celulosa (MFC), nanofibras de celulosa extraídas por hidrólisis enzimática (NFCH) y nanofibras de celulosa extraídas por ultrasonido (NFCU), evaluadas a 40 °C.  $G'$  Símbolos llenos (■●▼) y  $G''$  Símbolos vacíos (□○▽).

## 14 CONCLUSIONES

El proceso de obtención de celulosa a partir del raquis de plátano permitió la obtención de fibras de celulosa con un rendimiento de 25.4%. La implementación de la MSR en la evaluación de las variables del proceso de hidrólisis enzimática (concentración de sustrato, concentración de enzima y tiempo) permitió evaluar y optimizar la respuesta ( $A_R$ ), para obtener las condiciones idóneas de hidrólisis de las MFC a NFC. Las condiciones óptimas para el proceso de hidrólisis enzimática fueron: 100 mg de celulosa, 60  $\mu\text{L}$  de enzima y un tiempo de hidrólisis de 727.5 min. El modelo matemático generado fue de segundo orden y permite explicar el comportamiento de las variables y su relación con un 87% de confiabilidad (coeficiente de determinación).

La distribución de tamaño de partícula (DTP) de las NFC obtenidas bajo las condiciones óptimas de hidrólisis fue 70 nm, este tamaño es menor en comparación con el sustrato de partida (MFC), el cual presentó una distribución bimodal con tamaños mayores (1.280 y 41.50  $\mu\text{m}$ ). La morfología de las NFC fue muy diferente en comparación con las MFC, presentando tamaños extremadamente pequeños y homogéneos, lo cual fue corroborado con el análisis de DTP. Esto indica que el proceso de obtención de NFC a partir del raquis de plátano es un proceso viable, rápido y amigable con el medio ambiente, ya que el tamaño de partículas puede ser controlado con este tratamiento enzimático.

El patrón de DRX para las MFC fue característico de la celulosa microcristalina con polimorfismo tipo I y un porcentaje de cristalinidad de 72.74%. Las NFC por otro lado presentaron un porcentaje de cristalinidad menor (65.52%), con desfaseamiento en los picos ( $2\theta = 15$  y  $22^\circ$ ) y cambios en su intensidad (disminución y aumento). Esto significa que el proceso de hidrólisis enzimática generó NFC más amorfas o lineales, las cuales pudieran presentar una mejor interacción o reorganización entre sí.

El comportamiento térmico de las MFC fue muy parecido al de otras fuentes de celulosa (algodón, Sisal, yute, henequén, etc.), reportado en otras investigaciones. Fueron observadas tres temperaturas de transición a 125, 260 y 300  $^\circ\text{C}$ . Características de los

fenómenos de evaporación de agua y fusión de celulosa. En el caso de las nanofibras de celulosa extraídas por hidrólisis enzimática (NFCH) y nanofibras de celulosa extraídas por ultrasonido (NFCU), estas temperaturas se desfasaron ligeramente y aparecen con mayor intensidad. Lo cual pudiera sugerir que existe una mejor organización o reacomodo de estas nanofibras después del proceso de secado ya que es necesaria mayor energía para su desorganización y fusión.

El comportamiento reológico a una temperatura de 90 °C (inicio de la gelificación) de las MFC y NFCH presento dominio del comportamiento elástico ( $G'$ ). NFCH presentaron valores más altos ( $10^0$  a  $10^1$ ) comparados con el de las MFC. Sin embargo estos valores son ligeramente más bajos en comparación con los observados en las NFCU. El comportamiento reológico para estas últimas nanofibras (NFCU) fue diferente, ya que el comportamiento del módulo elástico se invierte a mayor frecuencia ( $G'' > G'$ ). El comportamiento reológico de las NFCH y NFCU fue siempre constante (dominio de  $G'$  sobre  $G''$ ) en la etapa de la formación del gel a 40 °C con valores más altos ( $10^0$  a  $10^2$  Pa) para el caso de as NFCU. Las NCH y NFCU en esta etapa presentaron consistencia de gel con enlaces entrecruzados.

Estas características de las NFCH podrían ser interesante para sugerir posibles aplicaciones en la elaboración de nanocompositos, cuya dispersión podría ser más homogénea en algunas matrices poliméricas (punto clave en la generación de materiales nanoestructurados), mejorando las propiedades mecánicas de los materiales compuestos reforzados con este tipo de nanofibras. Mejor susceptibilidad a procesos de modificación debido a su estructura y morfología, que serían de gran utilidad en la elaboración de nanopapel, lo cual mejoraría su transparencia y resistencia a la tensión.

En esta investigación se implementó y optimizo el proceso de hidrólisis enzimática a partir de una enzima comercial Acellerase ®1500, con la finalidad de obtener un nuevo método de obtención de nanofibras de celulosa a partir de residuos lignocelulósico (raquis) de la Agro-industria del plátano.

## 15 PERSPECTIVAS

- Evaluar la DTP de las NFCH obtenidas durante todos los puntos del proceso de hidrólisis enzimática. Complementar el estudio morfológico con TEM.
- Evaluar el comportamiento térmico de las NFCH por MDSC y su temperatura de transición vítrea (Tg).
- Implementa y escalar las condiciones óptimas del proceso de hidrólisis enzimática en un reactor.
- Considerando la naturaleza de las nanofibras de celulosa darle una aplicación.

## 16 BIBLIOGRAFÍA

1. Agoda-Tandjawa G., Durand S., Berot S., Blassel C., Gaillard C., Garnier C., Doublier J.-L.(2010). Rheological characterization of microfibrillated cellulose suspensions after freezing. *Carbohydrate Polymer*, 80,677-686.
2. Anido R y Cartay R. (2010) “El plátano en la gastronomía Venezolana”Universidad de los andes Venezuela. Venezuela. Pag. 15-16.
3. Bolio G., Valadez A., Veleza L., Andreeva A. (2011). Cellulose whiskers from agro-industrial banana wastes: Insolation and characterization. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10 (2), 291-299.
4. Canché G., De los Santos J., Andrade A., Gómez R. (2005). Obtención de Celulosa a Partir de los Desechos Agrícolas del Banano. *Información Tecnológica*. 16 (1), 83-88.
5. Carmona-Garcia R., Sanchez-Rivera M., Méndez-Montevalvo G., Garza-Montoya B., Bello-PérezL. (2009). Effect of the cross-linked reagent type on some morphological, physicochemical and functional characteristics of banana starch (*Musa paradisiaca*). *Carbohydrate Polymers*. 76, 117–122.
6. Cassagnau P. (2013). Linear viscoelasticity and dynamics of suspensions and molten polymers filled with nanoparticles of different aspect ratios. *Polymer* 54, 4762-4775.
7. Cuervo L, Quiroz E. (2009.) Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *Biotecnología*.13, 3.
8. Das K., Ray D., Bandyopadhyay N. R., & Sengupta, S. (2010). Study of the properties of microcrystalline cellulose particles from different renewable resources by XRD, FTIR, nanoindentation, TGA and SEM. *Journal of Polymers and the Environment*, 18, 355-363.
9. Duff S. y Murray W. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*. 55, 1–33.

10. El-Zawawy W, Ibrahim M, Yasser R. Abdel-Fattah Y, Nadia A. Soliman N, Mahmoud M. (2011) Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. *Carbohydrate Polymers*. 84,865–871.
11. Food and Agriculture Organization. (2014). Banana Market Review and Banana Statistics 2012-2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/docrep/019/i3627e/i3627e.pdf>.
12. Galbe M. y Zacchi G. (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiology Biotechnology*. 59, 618-628.
13. Gañan P., Zuluaga R., Cruz J., Velez J.M., Retegi A., Mondragon I., (2008). Elucidation of the fibrous structure of Musaceae mature rachis. *Cellulose*. 15, 131-139.
14. Garcia J. (2015). Obtención de nanopartículas de celulosa (Nanowhiskers de celulosa) a partir de raquis de plátano Macho: Caracterización térmica, morfológica, estructural y reológico. Tesis de licenciatura.
15. Genencor®. ACCELLERASE®1500. *GENECOR and ACCELLERASE* (2009). Patents: US6,022,725
16. George J, Ramana K V, Bawa A., Siddaramaiah S.(2011). Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. *International Journal of Biological Macromoleculare*. 48, 50-57.
17. Gutiérrez H. y De la Vara R. (2008). “Análisis y diseño de experimentos”, McGraw Hill Interamericana. México. Pag. 545.
18. Hassan M L., Bras J., Hassan E A., Silard C., Mauret E.(2014). Enzyme-assisted isolation of microfibrillated cellulose from date palm fruit stalks. *Industrial Crops and Products*. 55, 102–108.
19. Hassan M.L., Mathew A.P., Hassan E.A., Oksman, K., (2010). Effect of Pretreatment of bagasse pulp on properties of isolated nanofibers and nanopaper sheets. *Wood Fiber Science*. 43, 1–15.
20. Hendriks G. y Zeeman. (2009). "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass." *Bioresource Technology*. 100, 10-18.

21. Khalil H., Davoudpour Y., Islam M., Mustapha A., Sudesh K., Dungani R., Jawaid M. (2014). Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. *Carbohydrate Polymers*. 99, 649–665.
22. Khoshkava V. and Kamal M. R. (2014). Effect of drying conditions on cellulose nanocrystal (CNC) agglomerate porosity and dispersibility in polymer nanocomposites, *Powder Technology* 261, 288-298.
23. Kilzer F. y Broido A. (1965) Speculations on the nature of cellulose pyrolysis. *Pyrodynamics*. 2, 151–163.
24. Kokol V., Božič M., Vogrinčić R., Mathew A. P. (2015). Characterisation and properties of homo- and heterogenously phosphorylated nanocellulose. *Carbohydrate Polymers*, 125(10): 301-313.
25. Larsson S., Quintana-Sáinz A., Reimann A., Nilvebrant N., & Jönsson L. (2000). The influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84-86, 617-632.
26. León V. (2014). Obtención y caracterización de un nuevo copolímero de celulosa, su evaluación como cubierta entérica del diclofenaco de sodio y análisis del mecanismo de liberación. Universidad de la Habana, Facultad de Química. Tesis.
27. Lilholt H., Lawther J. (2000). Natural Organic Fibers. *Comprehensive Composite Materials*. 1, 303-325.
28. Mackie K., Brownell H., West K. y Saddler J. (1995). Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood. *J. Wood Chemistry Technology*. 5, 405–425.
29. Maiti S., Jayaramudu J., Das K., Reddy S. M., Sadiku R., Ray S. S., Liu D. (2013). Preparation and characterization of nano-cellulose with new shape from different precursor, *Carbohydrate Polymers*, 98, 562-567.
30. Maya J., Sabu T. (2008) Biofibres and biocomposites. En: *Carbohydrate Polymers*. 71, 343–364.

31. Meyabadi T y Dadashian F. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis of waste cotton fibers for nanoparticles. *Fibers and Polymers*. 13 (3), 313-321.
32. Millet M., Baker A. y Scatter L. (1976). Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 6, 125–153.
33. Montgomery, D.C. (2004). *Diseño y Analisis de Experimentos*. Editorial Limusa, Segunda Edición. Pag.427-429.
34. Nyström G., Mhraryan A., Razaq A, Lindström T., Nyholm L., Strømme M. A. (2010). Nanocellulose polypyrrole composite based on microfibrillated cellulose from wood. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114 (12): 4178-82.
35. Paakko M., Ankerfors M., Kosonen H., Nykanen A., Ahola S., Osterberg M., Ruokolainen J., Laine J., Larsson P., Ikkala O., Lindstrom T. (2007). Enzymatic Hydrolysis Combined With Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels. *Biomacromolecules*. 8, 1934-1941.
36. Pierre G., Sannier F, Goude R, Nouviaire A., Maache-Rezzoug Z, Rezzoug, S, Maugard, T.(2011). Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*. 54, 305-310.
37. Pinkert A., Marsh K., Pang S., Staiger M. (2009). Ionic liquids and their interaction with cellulose. *Chemical Reviews*. 109, 6712–6728.
38. Ramirez, M. (2010). Cellulose Nanocrystals reinforced electrospun poly (lactic acid) fibers as potential scaffold for bone tissue engineerin. Forest Biomaterials. Raleigh, North Carolina State University. Master of Science.
39. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2013). Producción Agrícola, ciclo perenne, modalidad riego más temporal plátano. SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>.

40. Shchipunov Y. (2012). Bionanocomposites: Green sustainable materials for the near future. *Pure and Applied Chemistry*. 84 (12), 2579-2607.
41. Siqueira G., Taping-Lingua S., Bras J., Da Silva D., Dufresne A.(2010). Morphological investigation of nanoparticles obtained from combined mechanical shearing, and enzymatic and acid hydrolysis of sisal fibers. *Cellulose* 17,1147-1158.
42. Smith W y Hashemi J. (2006) “Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales”. Mc Graw Hill. Cuarta Edición. México.
43. Sun Y. y Cheng J. (2001). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83, 1-11.
44. Tibolla H., Franciele M., Florencia C. (2014). Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and enzymatic treatment. *LWT-FoodScience and Technology*. 59 (2), 1311-1318.
45. Tibolla H., Pelissari F., Rodrigues M., Menegalli F. (2017). Cellulose nanofibers produced from banana peel by enzymatic treatment: Study of process conditions. *Industrial Crops and Products*. 95, 664-674.
46. Valdez-Vazquez I, Acevedo-Benitez J. y Hernandez-Santiago C. (2010) Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, 2147-2153.
47. Vieira M., Heinze T., Antonio-Cruz R, Mendoza A. (2002). Cellulose derivatives from cellulosic material isolated from Agave lechuguilla and fourcroydes. *Cellulose*. 9, 203-212.
48. Winuprasith T y Suphantharika M.(2013) Microfibrillated cellulose frommangosteen (*Garcinia mangostana* L.) rind,preparation ,characterization and evaluation as an emulsion stabilizer. *Food Hidrocolloids*.32, 383-394.

49. Zhang Q, Zhang P., Pei Z., Wang D. (2013). Relationships between cellulosic biomass particle size and enzymatic hydrolysis sugar yield: Analysis of inconsistent reports in the literature. *Renewable Energy*. 60, 127-136.
50. Zuluaga R., Putaux J., Cruz J., Velez J., Mondragon I., Gañán P.(2009). Effect of Cellulose microfibrils from banana rachis: Effect of alkaline treatments on structural and morphological features. *Carbohydrate Polymers* 76 51–59.
51. Zuluaga R., Putaux J., Cruz J., Velez J., Mondragon I., Gañán P. (2009). Effect of Cellulose microfibrils from banana rachis: Effect of alkaline treatments on structural and morphological features. *Carbohydrate Polymers* 76 51–59.