



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y
MATERIALES

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL GRADO DE ENTRECruzAMIENTO QUÍMICO
SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE MEMBRANAS DE
CELULOSA NATURALMENTE FUNCIONALIZADAS CON PROTEÍNAS
PROVENIENTES DE PYURA CHILENSIS**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO E
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

MANUEL GONZALO SALAZAR CARRASCO

PROFESOR GUÍA:
FRANCK QUERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
HUMBERTO PALZA CORDERO
RAÚL QUIJADA ABARCA

Este trabajo ha sido financiado por ANID-FONDECYT,
proyecto N°1200675.

SANTIAGO DE CHILE
2022

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO
E INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA.
POR MANUEL GONZALO SALAZAR
CARRASCO
FECHA 2022
PROFESOR GUÍA: FRANCK QUERO

ESTUDIO DEL EFECTO DEL GRADO DE ENTRECruzAMIENTO QUÍMICO SOBRE LAS PROPIEDADES FÍSCOQUÍMICAS DE MEMBRANAS DE CELULOSA NATURALMENTE FUNCIONALIZADAS CON PROTEÍNAS PROVENIENTES DE PYURA CHILENSIS

La necesidad de reemplazo de materiales provenientes de fuentes no renovables como las que son derivadas del petróleo o del gas natural ha aumentado el interés por la obtención de materias primas renovables y sustentables para la elaboración de dichos materiales. Siendo la celulosa uno de los candidatos que puede ser utilizado como bloque de construcción para el desarrollo de nuevos materiales avanzados y materiales compuestos. Este biopolímero presenta buenas propiedades mecánicas como material de refuerzo, así como químicas debido a la posibilidad de modificar químicamente su superficie y así ajustar algunas de sus propiedades.

Los tunicados han surgido como una interesante fuente de celulosa debido a las características únicas del polímero obtenido de este organismo. Las peculiaridades de estas fibrillas de celulosa que destacan son su razón de aspecto, cristalinidad y asociación a un contenido relativamente alto de proteínas, entre otras. Estas características han llevado a su aplicación como material de refuerzo en materiales compuestos y a su uso como bloque de construcción para la confección de hidrogeles y membranas y sus posteriores usos para una gran variedad de aplicaciones.

En este proyecto se estudió la capacidad de hinchamiento de membranas fabricadas en base a fibrillas de celulosa proveniente de desechos de *Pyura chilensis*. Para esto, las fibrillas fueron sometidas a un tratamiento químico alcalino variando el tiempo de hidrólisis para obtener fibrillas con distintas cantidades de proteínas en la superficie. Luego, se realizó el entrecruzamiento químico gracias a los grupos carboxilos y amina pertenecientes a la estructura molecular de las proteínas presentes en la superficie. Para esto, se usó el entrecruzante químico comercial llamado 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) a distintas concentraciones.

Se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de los materiales obtenidos tras el entrecruzamiento químico determinándose que el aumento del tiempo de hidrólisis redujo la presencia de nitrógeno en la superficie del material desde un 1,27%, en el material sin modificar, hasta 0,18% en el material hidrolizado durante 24 horas y cantidades incuantificables en el material que fue hidrolizado por 24 horas. Para materiales hidrolizados por un máximo de 24 horas, se observó un aumento de la presencia de dominios cristalinos en las muestras entrecruzadas químicamente y una disminución de estos en las muestras del material hidrolizado por más tiempo. Mientras que las pruebas de estabilidad térmica arrojaron que no hubo un aumento en la estabilidad para los materiales modificados químicamente. Luego, se determinó que el porcentaje de hinchamiento de las membranas obteniéndose resultados en el rango de 70 y 190% dependiendo de la cantidad de proteínas presente en la superficie de las fibrillas y la cantidad de EDC/NHS usado.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción:	1
1.1. Justificación	1
1.2. Objetivos	2
1.2.1. Objetivo General	2
1.2.2. Objetivos específicos	2
2. Antecedentes generales	2
2.1. Celulosa	2
2.1.1. Características de la macromolécula de celulosa	2
2.1.2. Fuentes de celulosa	3
2.1.3. Nanomateriales de celulosa	3
2.1.4. Nanomateriales de celulosa proveniente de tunicados	5
2.2. Reacción de entrecruzamiento	5
2.3. Técnicas de caracterización	7
2.3.1. Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X	7
2.3.2. Espectroscopia infrarroja	7
2.3.3. Difracción de rayos X (DRX)	8
2.3.4. Titulación Conductimétrica	9
2.3.5. Microscopía de barrido electrónico	10
2.3.6. Análisis termogravimétrico	10
3. Metodología	10
3.1. Extracción de nano fibrillas de celulosa	10
3.1.1. Pretratamiento	10
3.1.2. Extracción alcalina	10
3.1.3. Caracterización de los materiales celulósicos sin modificar	12
3.2. Entrecruzamiento químico usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y N-hidroxisuccinimida	13
3.2.1. Preparación del buffer MES-NaCl	13
3.2.2. Formación de membranas de material celulósico	13
3.2.3. Entrecruzamiento de material celulósico en suspensión	13
3.2.4. Entrecruzamiento de membranas de material celulósico	13
3.2.5. Determinación del grado de entrecruzamiento	14
3.3. Caracterización de materiales celulósicos modificados por entrecruzamiento químico	14
3.3.1. Estructura molecular	14
3.3.2. Estructura cristalina	14

3.3.3.	Morfología superficial.....	14
3.3.4.	Estabilidad térmica y determinación de contenido inorgánico por TGA.....	14
3.3.5.	Hinchamiento de la membrana	15
4.	Resultados.....	15
4.1.	Extracción de fibras de celulosa	15
4.2.	Entrecruzamiento químico	15
4.3.	Caracterización de materiales celulósicos	16
4.3.1.	Composición atómica y cuantificación de proteínas.....	16
4.3.2.	Estructura molecular.....	20
4.3.3.	Estructura cristalina	22
4.3.4.	Determinación de grado de entrecruzamiento	25
4.3.5.	Estabilidad térmica	28
4.3.6.	Análisis superficial de las membranas	34
4.4.	Estudio de hinchamiento.....	43
5.	Conclusiones	49
6.	Bibliografía.....	51

Índice de Ilustraciones:

Ilustración 1: Estructura molecular de la celulosa.....	2
Ilustración 2: Estructura molecular del 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida * Cl (EDC). 6	
Ilustración 3: Mecanismo de entrecruzamiento entre carboxilo y amina mediado por EDC 6	
Ilustración 4: Mecanismo de acción de la reacción de entrecruzamiento químico mediado por EDC en presencia de NHS	7
Ilustración 5: Diagrama típico de un equipo utilizado para realizar espectroscopía fotoeléctrica por rayos X.	7
Ilustración 6: Difractograma típico para fibrillas de celulosa.	9
Ilustración 7: Gráfico típico de titulación conductimétrica.	9
Ilustración 9: Material <i>H1/4</i> magnificado x10.000..	35
Ilustración 10: Material <i>H1/4</i> magnificado x20.000.	35
Ilustración 11: Material <i>H1/4</i> magnificado x40.000..	36
Ilustración 12:Material <i>H1</i> magnificado x10.000..	36
Ilustración 13: Material <i>H1</i> magnificado x20.000..	37
Ilustración 14:Material <i>H1</i> magnificado x40.000..	37
Ilustración 15: Material <i>H2</i> magnificado x10.000..	38
Ilustración 16: Material <i>H2</i> magnificado x20.000..	38
Ilustración 17: Material <i>H2</i> magnificado x40.000..	39

Índice de Figuras

Figura 1: Espectro de baja resolución usado para la inspección de los elementos presentes en los materiales estudiados.....	16
Figura 2: Deconvolución de la señal de alta resolución de carbono para cada material celulósico estudiado sin modificar.	18
Figura 3:Deconvolución de la señal de alta resolución de nitrógeno para cada material celulósico estudiado sin modificar.	19
Figura 4: Espectro infrarrojo típico obtenido para el material inicial (PI) y los materiales celulósicos estudiados (<i>H1/4</i> , <i>H1</i> y <i>H2</i>).	20
Figura 5: Difractograma obtenido para los materiales celulósicos estudiados sin modificar	22
Figura 6: Difractograma obtenido para los materiales celulósicos estudiados modificados con una concentración final de 5 mg/ml de EDC como membrana.	23
Figura 7: Difractograma obtenido para los materiales celulósicos estudiados modificados con una concentración final de 5 mg/ml de EDC en suspensión.....	23
Figura 8: Porcentaje de cristalinidad calculado para los tres materiales celulósicos estudiados sin modificar y modificados con EDC a una concentración final de 5 mg/ml.	24
Figura 9: Resultados típicos de conductimetría para los materiales celulósicos hidrolizados.	25
Figura 10: Determinación de ácidos débiles presentes en la superficie de los materiales celulósicos.	27
Figura 11: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material celulósico sin modificar.	30
Figura 12: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material modificadas con una concentración final de EDC de 0,5 mg/ml en suspensión.	30

Figura 13: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material modificadas como membrana a una concentración final de 0,5 mg/ml.....	31
Figura 14: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material modificadas con una concentración final de EDC de 1 mg/ml en suspensión.....	31
Figura 15: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material modificadas como membrana a una concentración final de 1 mg/ml.....	32
Figura 16: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material modificadas con una concentración final de EDC de 5 mg/ml en suspensión.....	32
Figura 17: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material modificadas como membrana a una concentración final de 5 mg/ml.....	33
Figura 18: Distribución de ancho de las fibrillas en el material celulósico <i>H1/4</i> sin modificar y modificado con concentración final 5 mg/ml de EDC para imágenes obtenidas a una magnificación de x40.000	40
Figura 19: Distribución de ancho de las fibrillas en el material celulósico <i>H1</i> sin modificar y modificado con concentración final 5 mg/ml de EDC para imágenes obtenidas a una magnificación de x40.000	41
Figura 20: Distribución de ancho de las fibrillas en el material celulósico <i>H2</i> sin modificar y modificado con concentración final 5 mg/ml de EDC para imágenes obtenidas a una magnificación de x40.000	42
Figura 21: Resultados prueba de hinchamiento del material <i>H1/4</i> a distintas concentraciones de EDC.....	44
Figura 22: Resultados prueba de hinchamiento del material <i>H1</i> a distintas concentraciones de EDC.....	45
Figura 23: Resultados prueba de hinchamiento del material <i>H2</i> a distintas concentraciones de EDC.....	46
Figura 24: Porcentaje de hinchamiento luego de 72 horas.....	48

Índice de Tablas

Tabla 1: Características de las principales micro y nanopartículas de celulosa descritas en literatura ¹⁰	3
Tabla 2: Componentes atómicos de los distintos materiales celulósicos estudiados.....	17
Tabla 3: Energía de enlace asociada a los estados de energía de C 1s para el material sin modificar y los materiales hidrolizados H1/4, H1 y H2.....	17
Tabla 4: Energía de enlace asociada a los estados de energía de N 1s para el material sin modificar y los materiales hidrolizados H1/4, H1 y H2.....	17
Tabla 5: Intensidad relativa de la banda 1651 cm^{-1}	21
Tabla 6: Milimoles de grupos ácidos por gramo de material seco promedio.....	27
Tabla 7: Resultados del análisis termogravimétrico del material celulósico H1/4.	28
Tabla 8: Resultados del análisis termogravimétrico del material celulósico H1.	28
Tabla 9: Resultados del análisis termogravimétrico del material celulósico H2.	29

1. Introducción:

Diversas preocupaciones han surgido por los impactos que han causado al medio ambiente el uso y dependencia de materiales derivados del petróleo y otras fuentes no renovables, impulsando la investigación en búsqueda de materias primas alternativas naturales y renovables, junto a procesos de obtención de estos materiales que sean sustentables en el tiempo. Frente a esto, ha resurgido un interés por los nanomateriales derivadas de la materia prima de celulosa para el desarrollo de materiales avanzados. Su amplia disponibilidad, buenas propiedades mecánicas junto con su estabilidad química, biocompatibilidad y la posibilidad de ajustar sus propiedades por medio de modificaciones químicas a nivel de superficie la hace un excelente candidato como bloque de construcción para la obtención de nanocompuestos, membranas, hidrogeles, macrofibras entre otros¹.

Una posible fuente para la obtención de este biopolímero son los tunicados, un grupo de animales marinos capaces de sintetizar celulosa, debido a su abundancia y a las características propias de las fibrillas de celulosa obtenidas de ellos². Diversos estudios han utilizado celulosa proveniente de estos organismos para diversas aplicaciones, obteniendo resultados prometedores para su uso en áreas como, por ejemplo, ingeniería de tejidos³ y desarrollo de materiales compuestos^{4 5 6}. Una de las características que destaca de esta celulosa es que al encontrarse íntimamente asociada a proteínas en el tejido de la capa externa del organismo, es una fuente natural de celulosa funcionalizada por proteínas⁷. En otras palabras, estas proteínas se encuentran naturalmente unidas a la superficie de las fibrillas de celulosa, otorgándole una elevada estabilidad térmica^{7 8}. Además, estas proteínas pueden ser utilizadas para mejorar las funcionalidades químicas de la celulosa, permitiendo ampliar las modificaciones químicas posibles, de forma sencilla y amigable con el medio ambiente, en comparación con fibrillas de celulosa pura, es decir, sin presencia de proteínas residuales, obtenidas desde otras fuentes^{7 3}.

Este trabajo de tesis busca investigar el efecto del grado de entrecruzamiento químico de membranas constituidas de fibrillas de celulosa sobre sus propiedades físico-químicas y su capacidad de hinchamiento en agua.

1.1. Justificación

El piure (*Pyura chilensis*) es un tunicado autóctono de la costa de Chile del cual se extraen en promedio 2000 toneladas al año a lo largo de todo el territorio nacional⁹. Los órganos internos del marisco son utilizados por la industria alimentaria nacional mientras que la peña, la capa protectora que recubre el cuerpo del animal, es desechada terminando en los rellenos sanitarios locales.

Este proyecto busca permitir la valorización del desecho generado por la extracción y consumo del piure, transformado este en una fuente de celulosa para la confección de nuevos materiales en base a este biopolímero natural.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

El objetivo general de este proyecto consiste en estudiar el efecto del grado de entrecruzamiento químico de membranas construidas de fibrillas de celulosa naturalmente funcionalizadas con proteínas sobre el grado de hinchamiento en agua de estas, variando el tiempo de extracción alcalina y la concentración del agente entrecruzante EDC/NHS.

1.2.2. Objetivos específicos

- Extraer y caracterizar fibrillas de celulosa con varias cantidades de proteínas en su superficie.
- Preparar y caracterizar membranas constituidas de fibrillas de celulosa con varios grados de entrecruzamiento químico.
- Estudiar el efecto del grado de entrecruzamiento químico de las membranas sobre el hinchamiento en agua de estas.

2. Antecedentes generales

2.1. Celulosa

2.1.1. Características de la macromolécula de celulosa

La celulosa es un polímero lineal formado por una cadena de moléculas de glucosa en forma de anillo. Su monómero está compuesto por dos moléculas de anhidroglucosa ($C_6H_{10}O_5$) unidos por un enlace β 1-4 glucosídico ubicado entre el oxígeno unido al carbono 1 (C1) de una glucosa y el carbono 4 (C4) de un anillo de glucosa adyacente^{1 10}. Todos los anillos de glucosa adoptan una conformación de silla 4C_1 , lo cual genera que los grupos hidroxilos se encuentren principalmente en el plano ecuatorial del anillo, mientras que los átomos de hidrógeno adquieren una posición axial (vertical). Esta estructura se estabiliza mediante la formación de una red de puentes de hidrógeno intramoleculares desde el oxígeno unido al carbono 3 (C3) y el oxígeno unido al carbono 5 (C5) del siguiente anillo. Intermolecularmente, se forman puentes de hidrógeno entre los hidroxilos unidos al carbono 2 (C2) y los oxígenos unidos al carbono 6 (C6) pertenecientes a una cadena vecina.¹¹

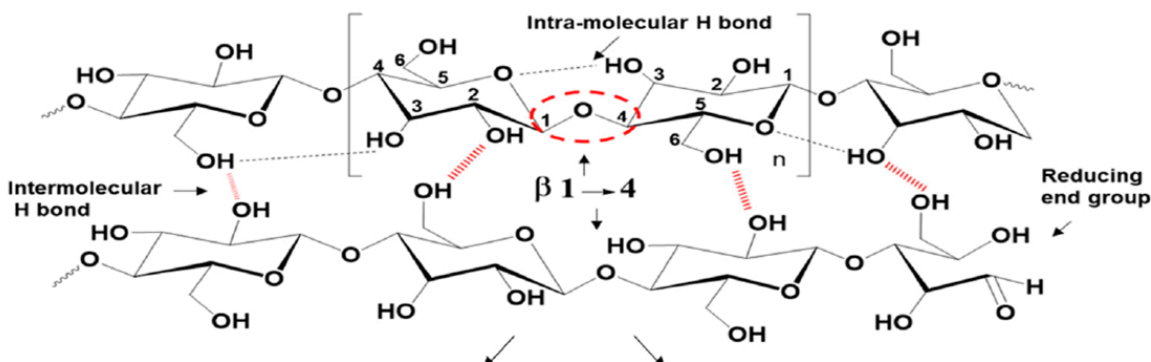


Ilustración 1: Estructura molecular de la celulosa. Entre corchetes se observa el monómero de la celulosa. Se incluyen los puentes de hidrógeno intermoleculares (rojo) e intra moleculares (línea segmentada)¹. En el círculo rojo se muestra el enlace β 1-4 glucosídico entre el carbono 1 de un anillo y el carbono 4 del siguiente unidos a través de un átomo de oxígeno.

2.1.2. Fuentes de celulosa

En la naturaleza la principal fuente de celulosa es de origen vegetal, ya que este polímero está presente en la pared de las células vegetales donde es usada como soporte mecánico, manteniendo la estructura de la planta. Sin embargo, otros organismos también son capaces de sintetizar celulosa, entre los que se encuentran las algas, los hongos, las bacterias e incluso un grupo de animales marinos llamados tunicados^{10 12}.

A pesar de la relativa simplicidad de la celulosa existe una alta variabilidad de sus propiedades específicas dependiendo del organismo de origen. Esto se debe al mecanismo y maquinaria celular utilizada en su biosíntesis, a la presencia de polisacáridos no celulósicos asociados a la cadena u otras modificaciones realizadas por el organismo quien la sintetiza¹⁰.

2.1.3. Nanomateriales de celulosa

Varios estudios en la década de 1950 mostraron que la degradación controlada de fibras de celulosa en medio ácido producía suspensiones de nanomateriales de celulosa con forma de aguja¹³⁻¹⁵. Posteriores estudios demostraron que estos bastones llamados nanocristales de celulosa conservaban la estructura cristalina propia de la celulosa, además de ser químicamente estables y fisiológicamente inactivos, despertando el interés comercial por estos nuevos nanomateriales¹¹.

Desde su descubrimiento, distintos métodos y orígenes para la obtención de nanomateriales de celulosa han sido descritos. Sin embargo, no existe una nomenclatura única para referirse a los distintos tipos de nanomateriales de celulosa, siendo diferenciados típicamente por sus dimensiones y el organismo de origen de la celulosa. En la Tabla 1 se muestran los principales tipos de nanomateriales de celulosa en función del organismo de origen, sus dimensiones características, forma del área transversal y porcentaje de cristalinidad.^{10,16,17}

Tamaño de partícula

Tipo de partícula	Largo (μm)	Ancho (nm)	Altura (nm)	Área transversal	Cristalinidad (%)
WF y PF	>2000	20-50 (μm)	20-50 (μm)	-	43-65
MCC	10-50	10-50 (μm)	10-50 (μm)	-	80-85
MFC	0,5-10's	10-100	10-100	-	51-69
NFC	0,5-2	4-20	4-20	-	-
CNC	0,05-0,5	3-5	3-5	Cuadrada	54-88
t-CNC	0,1-4	~20	~8	Paralelogramo	85-100
AC					>80
(<i>Valonia</i>)	>1	~20	~20	Cuadrada	-
(<i>Micrasterias</i>)	>1	20-30	5	Rectangular	-
BC					65-79
(<i>Acetobacter</i>)	>1	30-50	6-10	Rectangular	63
(<i>Acetobacter</i>)*	>1	6-101	6-10	Cuadrada	-
Celulosa II	Filamento	-	-	Cilíndrica	27-43

Tabla 1: Características de las principales micro y nanomateriales de celulosa descritas en literatura¹⁰

Las fibras provenientes de madera y plantas (WF y PF por sus siglas en inglés) son de dimensiones micrométricas y son las más grandes reportadas en la Tabla 1 ya que están compuestas por células vegetales individuales. Presentan una baja cristalinidad y dimensión transversal de varios micrómetros. Estas fibras son utilizadas para la obtención de celulosa microcristalina (MCC) y celulosa microfibrilada (MFC). Ambos tipos de celulosa presentan una mayor pureza, pero la celulosa microcristalina presenta una mayor cristalinidad, estando formada principalmente de regiones cristalinas de celulosa agregada mientras que la celulosa microfibrilada presenta tanto regiones amorfas como cristalinas.^{10 16}

La celulosa nanofibrilada (NFC) es producida al utilizar técnicas específicas para facilitar la fibrilación de fibras provenientes de plantas o madera. Al igual que la celulosa microfibrilada presenta regiones cristalinas como amorfas pero estas fibras son más finas teniendo dimensiones transversales menores a la de la celulosa microfibrilada.^{10 16}

Los nanocristales de celulosa (CNC) son partículas con forma de bastón o aguja obtenidas por hidrólisis ácida de las fibras descritas previamente. También han sido llamados bigotes de celulosa y celulosa nanocristalina. Los extremos de estas partículas tienden a angostarse por el proceso de hidrólisis ácida lo que las hace parecer agujas o bigotes. Son altamente puras y cristalinas.^{10 11}

Las fibras provenientes de tunicados pueden usarse para producir nanocristales de celulosa (t-CNC) por hidrólisis ácida o nanofibrillas de celulosa por hidrólisis básica. Los t-CNC se caracterizan por tener una forma de lazo y por presentar una diferente morfología, estructura cristalina y propiedades mecánicas que la celulosa nanocristalina proveniente de celulosa vegetal.^{10 11}

Las fibras provenientes de algas (AC) son extraídas de la pared celular de especies de alga como *Volonia* o *Micrasterias*. Suelen extraerse por hidrólisis ácida y un posterior refinamiento mecánico. También es posible obtener celulosa producida por bacterias (BC). Estas fibras son secretadas por varias especies de bacteria a su medio y sus características dependen principalmente de la especie de bacteria y el medio de cultivo utilizado.¹⁰

El proceso de extracción de los nanomateriales derivados de la celulosa suele consistir en dos etapas. La primera, un pretratamiento cuyo objetivo es la purificación y homogenización del material para obtener resultados más consistentes durante la siguiente etapa. El pretratamiento a utilizar en esta etapa puede ser mecánico o químico, dependiendo la elección de este de las características de la fuente de celulosa que se está utilizando y en un menor grado de la forma o morfología que se desea obtener de las fibras¹⁰. La segunda etapa consiste en la separación del material celulósico purificado en sus componentes fibrilares o cristalinos. Los tratamientos típicos son tratamientos mecánicos, hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática¹⁰.

Membranas y películas construidas en base a nanopartículas de celulosa han sido utilizadas para distintas aplicaciones debido a las propiedades que presenta el polímero^{3,5,18-32}. Destacando entre otras su uso como sustrato para la construcción de materiales “inteligentes” como sensores y actuadores. Estos materiales son producidos, típicamente, aplicando una o más capas de polímeros sensibles a ciertos estímulos sobre una membrana de celulosa la cual actúa como base y, en algunos casos, parte mecanismo del sensor o actuador. Las propiedades de la celulosa y de las membranas construidas con

nanopartículas de esta han permitido el desarrollo de sensores y actuadores para una amplia variedad de estímulos dependiendo de la composición del material estudiado, siendo uno de los estímulos estudiados el grado de humedad del material. Aprovechando la alta hidrofiliidad y flexibilidad de las membranas de celulosa es posible la construcción de materiales que cambian su forma dependiendo del contenido de agua del material.

Es importante para el estudio de estos materiales el controlar la cantidad de agua que puede absorber la membrana, ya que la cantidad de agua absorbida por esta puede afectar negativamente las propiedades mecánicas de la misma^{33,34}. Se cree que esto se debe a que las moléculas de agua impiden la interacción intermolecular, mediadas por puentes de hidrógeno, entre las cadenas de celulosa que componen el material. Es especialmente relevante en casos en que se desea utilizar micro y nanopartículas de celulosa como base para el desarrollo de sensores y actuadores en los que el estímulo al que responden es la humedad que presenta el material.

2.1.4. Nanomateriales de celulosa proveniente de tunicados

Los tunicados son los únicos animales capaces de sintetizar celulosa. Estos animales marinos usan este polímero como esqueleto para el tejido que los envuelve, conocido como túnica. Además de servir como barrera entre el animal y su entorno, la túnica cumple funciones biológicas como fagocitosis, conducción de impulsos y alorreconocimiento entre otros². La celulosa en la túnica se encuentra integrada a una matriz de proteínas donde, además, es posible encontrar otras sustancias en menores cantidades como por ejemplo lípidos, carotenoides o polisacáridos de cadena corta¹⁰.

El proceso de obtención de nanomateriales de celulosa desde tunicados suele incluir un pretratamiento mecánico, seguido de una extracción química por medio de una solución ácida o alcalina para eliminar la matriz proteica que envuelve las fibras de celulosa¹⁰. El producto del tratamiento ácido se conoce como nanocristales de celulosa (t-CNC) mientras que el tratamiento básico suele obtener nanofibrillas de celulosa.

Entre los nanomateriales de celulosa, los provenientes de tunicados destacan por su alta cristalinidad, área superficial y relación de aspecto², además de su alta pureza al compararla con aquella de origen vegetal. Se ha encontrado, además, que es posible obtener fibrillas de celulosa naturalmente funcionalizada por proteínas desde esta fuente, evitando la necesidad de funcionalizar químicamente la superficie de las fibrillas luego de su extracción y purificación⁷.

2.2. Reacción de entrecruzamiento

El entrecruzamiento químico, o *crosslinking* en inglés, es el proceso químico en que, por medio de uno o más reactivos entrecruzantes, se forma un enlace covalente entre dos o más moléculas. Estos reactivos pueden o no formar parte del enlace final y suelen clasificarse por los grupos funcionales con los que reaccionan.³⁵

Las carbodiimidas y en específico el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (ver Ilustración 2) , son entrecruzadores de largo cero (no forman parte del enlace final) utilizados para unir grupos carboxilos ($-COOH$) a aminas primarias ($-NH_2$). Como se reporta en la Ilustración 3, el EDC reacciona con los grupos carboxílicos formando un intermediario activo O-acilisourea, el cual es reemplazado fácilmente por un ataque nucleofílico, por ejemplo, por un grupo amino. Al ser reemplazado por una amina primaria

se forma un enlace tipo amida con el grupo carboxilo original, liberándose un subproducto isourea. El intermediario es inestable en solución acuosa regenerándose los reactantes por hidrólisis al no reaccionar con una amina.

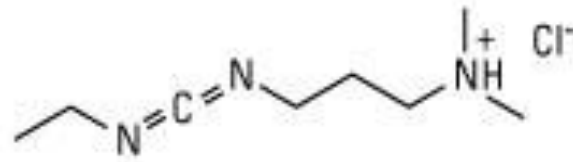


Ilustración 2: Estructura molecular del 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida * Cl (EDC).

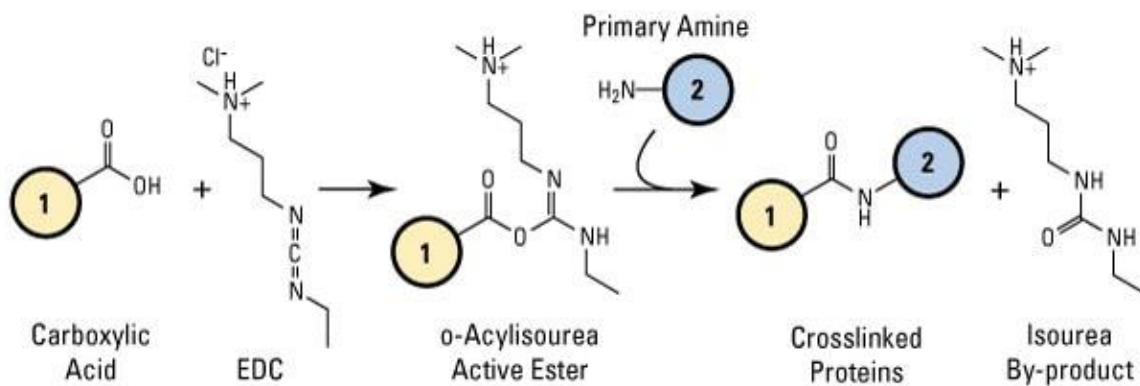


Ilustración 3: Mecanismo de entrecruzamiento entre carboxilo y amina mediado por EDC ³⁵

La molécula de N-hidroxisuccinimida (NHS) se utiliza en reacciones de entrecruzamiento donde el EDC media la reacción. El NHS permite mejorar la eficiencia de la reacción reportada en la Ilustración 3, permitiendo también la creación de intermediarios estables en seco. Al estar presentes en conjunto, el EDC une una molécula de NHS al grupo carboxilo creando un éster de NHS el cual puede reaccionar en presencia de una amina primaria para formar el enlace con el carboxilo (ver Ilustración 4).

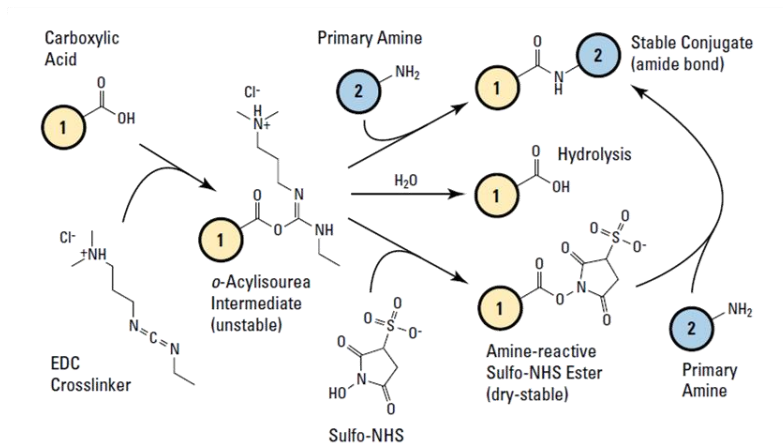


Ilustración 4: Mecanismo de acción de la reacción de entrecruzamiento químico mediado por EDC en presencia de NHS³⁵

2.3. Técnicas de caracterización

2.3.1. Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X

La espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X es una técnica utilizada para el estudio la composición de la superficie a escala atómica en materiales. Se caracteriza por su capacidad de identificación y cuantificación de elementos, detección de enlaces químicos, y su naturaleza no destructiva³⁶.

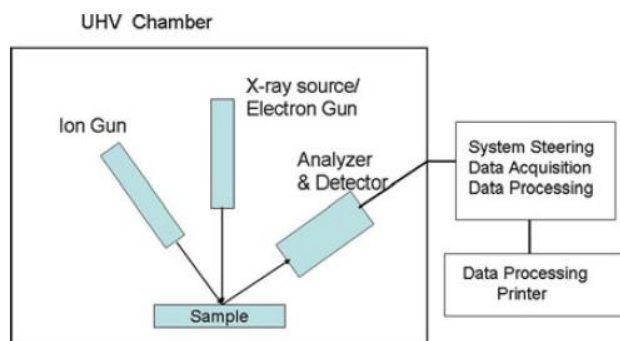


Ilustración 5: Diagrama típico de un equipo utilizado para realizar espectroscopía fotoeléctrica por rayos X³⁶, para lo cual se utiliza la fuente de rayos X.

En este método, la muestra es irradiada con fotones de una energía característica los cuales interactúan con los electrones internos del átomo. Esto genera estados ionizados los cuales emiten un fotoelectrón con una energía cinética equivalente, de manera aproximada, a la diferencia entre la energía del fotón incidente y la energía de enlace. Al medir el espectro fotoelectrónico, es posible identificar las energías de enlace presentes en la muestra y asociarlas directamente a los elementos correspondientes³⁶.

2.3.2. Espectroscopia infrarroja

La espectroscopía infrarroja es una técnica usada comúnmente para el estudio de la estructura molecular de distintas sustancias químicas a través de la medición de los modos vibracionales de los enlaces que las conforman. En general, la espectroscopía infrarroja es mejor para detectar vibraciones asimétricas y grupos polares³⁷.

2.3.2.1. *Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada*

La espectroscopía infrarroja transformada por Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) puede ser utilizada para el análisis tanto de moléculas como de células y tejidos³⁸. El método consiste en irradiar una muestra con luz infrarroja en el rango de número de onda $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$. Esta luz es absorbida cuando la vibración natural de un enlace al interior de la molécula o grupo funcional coincide con la frecuencia del haz. El cambio de intensidad es detectable y se registra como bandas o peak en el espectro infrarrojo³⁹.

El segmento del espectro entre $4000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ permite la identificación de grupos funcionales en la muestra, mientras que a $< 2000 \text{ cm}^{-1}$ se considera la zona "huella digital", específico para cada molécula ya que los peaks en este sector suelen formarse por la interacción de distintos modos vibracionales, dificultando asignar un peak a un tipo de enlace particular³⁸.

2.3.3. Difracción de rayos X (DRX)

En esta técnica, la muestra se irradia con haces de rayos X variando el ángulo de incidencia (θ). La interacción de los rayos X con los átomos del material genera un interferencia constructiva o destructiva dependiendo del ángulo en que incide el haz de luz, siendo el objetivo de esta técnica el identificar tanto la intensidad como el ángulo de difracción (2θ) en que se obtiene una interferencia constructiva generando un peak en el difractograma obtenido⁴⁰. Estos peaks solo son detectables cuando se cumple la ley de Bragg:

$$2 \times d \times \text{sen}(\theta) = n \times \lambda$$

Donde d es la distancia entre los planos atómicos de la estructura cristalina, λ es la longitud onda del haz de rayos X de la fuente de rayos X y n es un numero entero.

Para fibrillas de celulosa se obtiene un difragtograma con cuatro peaks característicos, como se muestra en la Ilustración 6, los cuales corresponden a los planos de difracción 101 , $10\bar{1}$, 002 y 040 , ubicados en las posiciones $14,7^\circ$, $16,6^\circ$, $22,5^\circ$ y $34,5^\circ$, respectivamente^{3,41}.

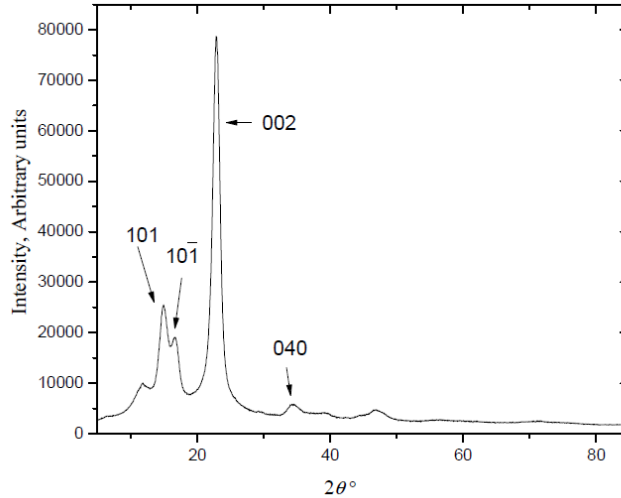


Ilustración 6: Difractograma típico para fibrillas de celulosa, se presentan cuatro peaks correspondientes a planos de difracción 101, $10\bar{1}$, 002 y 040⁴¹.

2.3.4. Titulación Conductimétrica

La titulación ácido base es un método ampliamente usado para la cuantificación de ácidos carboxílicos en la superficie de nanomateriales^{42 43 44}. En este método, el ácido de concentración desconocida es neutralizado por la adición lenta de una solución alcalina de concentración conocida hasta consumir la totalidad del ácido. En la titulación por conductimetría se determina que el ácido ha sido consumido en su totalidad en base al gráfico de conductividad en función del volumen de base agregado, donde, en el punto de término se observa un aumento de la conductividad debido a la acumulación de grupos básicos en solución.⁴⁵

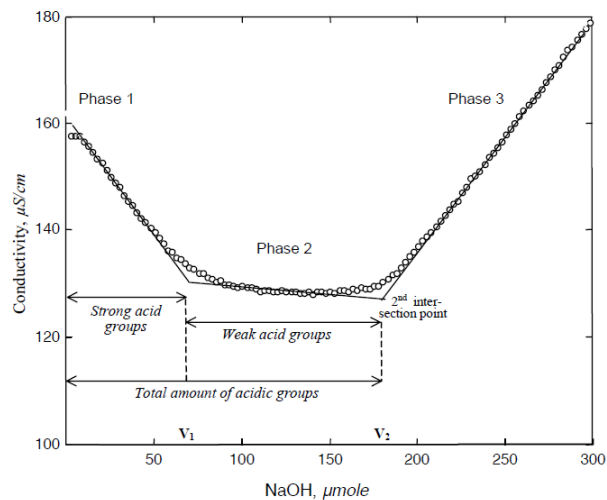


Ilustración 7: Gráfico típico de titulación conductimétrica. Se observan 3 fases en la curva, en la primera los ácidos fuertes son neutralizados causando una caída rápida en la conductividad de la solución. En la segunda fase los ácidos débiles son neutralizados observándose una zona donde el cambio en la conductividad es más lento. Finalmente, en la tercera fase la conductividad aumenta debido a la acumulación de grupos básicos en solución.

2.3.5. Microscopía de barrido electrónico

La microscopía de barrido electrónico es una técnica que, a diferencia de la microscopía convencional, utiliza un haz de electrones para observar la superficie de la muestra⁴⁶. Debido a que este haz presenta una longitud de onda mucho menor que la luz visible, es posible observar estructuras en la escala de hasta $\sim 1nm$ dependiendo del equipo usado. La imagen final es obtenida en base a la detección tanto de electrones dispersados por la superficie como electrones secundarios y rayos X generados por las moléculas en la superficie de la muestra al interactuar con el haz de electrones incidentes⁴⁶.

2.3.6. Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico es un método utilizado comúnmente en el estudio de la estabilidad térmica de materiales celulósicos^{19 47 48}. El método consiste en registrar el peso de una muestra mientras se aumenta la temperatura a una tasa constante en una atmósfera controlada. Además de permitir estudiar la estabilidad térmica de un material permite cuantificar la presencia de sustancias termoestables al interior del material.³

3. Metodología

3.1. Extracción de nano fibrillas de celulosa

3.1.1. Pretratamiento

El proceso de fabricación de los materiales a utilizar en el estudio comenzó con el pretratamiento de los fragmentos de peña de piure congelada, los cuales consistían en peña cortada con tijeras a un tamaño de alrededor de $2 \times 2cm$. Los fragmentos de peña fueron lavados en 4L de solución de KOH al 5% p/v bajo campana de extracción por 16 h siendo agitados constantemente por un agitador de paletas (Remi elektrotechnik ROG-16 6D, India).

Una vez terminado el proceso de lavado, los fragmentos se pasan por un colador descartándose la solución restante. Cada trozo de peña es lavado nuevamente bajo agua del grifo para eliminar cualquier contaminante que siga pegado a su superficie. Este proceso se repite 3 veces y es seguido por un lavado de todos los fragmentos de peña utilizando agua destilada.

Los fragmentos obtenidos son molidos utilizando un procesador de alimentos (Thomas TH-860D, Suiza), el equipo se llena hasta la mitad de su volumen con trozos de peña lavada y luego se completa hasta $3/4$ del volumen máximo con agua destilada. La peña es molida durante 15 segundos a nivel 8 4 veces, y luego durante 30 s a máxima potencia 2 veces. El material obtenido es denominado PI y se transfiere a un vaso de precipitado con una capacidad volumétrica apropiada, se cubre con un filme plástico y se guarda a una temperatura de $0-4^{\circ}C$ para su posterior uso.

3.1.2. Extracción alcalina

Antes de comenzar la etapa de extracción alcalina una muestra del material obtenido en el pretratamiento es pesada, sometida a secado en horno durante 12 h a $40^{\circ}C$ y luego, pesada nuevamente para determinar el porcentaje de peso seco del material. Con este valor se midió el equivalente a 9 g de masa seca para ser procesada.

El equivalente a 9 g de peso seco de peña lavada y molida fue agregado a un balón de destilación que contenía 378ml de solución alcalina de KOH al 5% p/v, el equivalente a 42

ml de solución por cada gramo de material seco. El balón fue puesto al interior de un baño térmico a 85°C, asegurándose que el material se encontrara bajo la línea del fluido de trabajo, y el contenido fue agitado utilizando un agitador magnético. Además, se instaló sobre el balón de destilación un condensador para mantener constante la concentración de la solución durante la duración del proceso de extracción alcalina.

La extracción alcalina se realizó durante tres tiempos de hidrólisis de 6, 24 y 48 horas para obtener los materiales celulósicos hidrolizados $H_{1/4}$, H_1 y H_2 respectivamente, utilizando el montaje experimental mostrado en la Imagen 1. Luego de haberse cumplido este periodo de tiempo el balón de destilación se desconectó del condensador, se retiró del baño térmico y el contenido fue filtrado utilizando un embudo Büchner y una bomba de vacío (Rocker Rocker-400, Taiwan).



Imagen 1: Montaje experimental para la hidrólisis alcalina del material celulósico. A la izquierda se observa que el balón de destilación que contiene el material a hidrolizar se encuentra al interior de un baño térmico y sobre un agitador magnético, y que se encuentra unido a un condensador para mantener constante la concentración de la solución durante el proceso. La imagen de la derecha muestra el interior del balón con el material celulósico cargado. Se mantiene bajo el nivel del baño térmico para asegurar una temperatura homogénea en todo el material.

El material filtrado fue transferido a un vaso precipitado de capacidad volumétrica adecuada y lavado con 300 ml de acetona durante 3 minutos manteniéndolo agitado por medio de un agitador magnético. El material resultante fue nuevamente filtrado y posteriormente fue lavado con agua destilada durante 3 minutos con agitación intensa. Este lavado con agua destilada se repitió tres veces filtrando el material al finalizar cada lavado y el material resultante fue suspendido con agua destilada a una concentración de 1% p/v con respecto al peso seco del material. Las suspensiones para $H_{1/4}$, H_1 y H_2 fueron guardadas en botellas de vidrio y dejadas a una temperatura de 0-4°C hasta ser posteriormente utilizadas.

3.1.3. Caracterización de los materiales celulósicos sin modificar

3.1.3.1. Estructura molecular

Se caracterizó la estructura molecular de los materiales celulósicos $Pl, H_{1/4}, H_1, H_2$ por medio de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). Para obtener los espectros, se utiliza un espectrómetro FTIR de marca Thermo Scientific (Nicolet iS10, EE. UU.), una resolución de 4 cm^{-1} con 32 escaneos en el rango de número de onda de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Los espectros fueron corregidos a línea base y normalizados en su intensidad.

3.1.3.2. Cuantificación de proteínas en la superficie de las fibras

Se cuantifica la cantidad de proteínas presente en la superficie del material por espectroscopía fotoelectrónica por rayos X (XPS). Cada espectro se obtuvo usando un equipo con un ánodo doble de Al K, el cual emite rayos X Al K_{α} ($1486,6\text{ eV}$) con una potencia constante de 400 W y un ángulo de emisión de 90° . Los experimentos se llevaron a cabo al vacío ($\sim 10^{-6}\text{ Pa}$) en un rango de energía entre $1350 - 0\text{ eV}$ con pasos de 1 eV para obtener un espectro de baja resolución y pasos de $0,1\text{ eV}$ para los espectros de alta resolución. Previo a los experimentos se utiliza la señal del orbital C 1s (C-C) para calibrar la energía de enlace. Los elementos químicos fueron cuantificados ajustando los espectros con una función Gaussiana. La cantidad de proteínas presentes se derivó por medio de la ecuación:

$$P(\%) = N(\%) \times K$$

donde N corresponde al porcentaje de nitrógeno presente en la superficie del material y K es un factor de conversión que relaciona el contenido de nitrógeno con el contenido de proteínas. Para tunicados se utiliza usualmente $K = 6,25^7$.

3.1.3.3. Estructura cristalina

La estructura cristalina de los materiales celulósicos se estudió por difracción de rayos X (XRD) usando un difractómetro de rayos X con una fuente de rayos X de cobre, la cual produce radiación Cu $K_{\alpha 1}$ con una longitud de onda de $0,154\text{ nm}$ operando a 40 kV y 30 mA . Los patrones fueron obtenidos en un rango de difracción $5^{\circ} - 40^{\circ}$ con una variación de $0,02^{\circ}$ cada 3 s y usando una velocidad rotacional de 60 rpm .

Se utilizaron los difractogramas obtenidos para calcular el índice de cristalinidad de las muestras por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de cristalinidad (\%)} = \frac{A_c}{A_c + A_a}$$

donde A_c corresponde al área bajo la curva de los peaks cristalinos y mientras que A_a corresponde al área generada por la fracción amorfa⁴¹.

3.1.3.4. Cuantificación de grupos carboxilo

Los grupos carboxilos superficiales de los materiales celulósicos $H_{1/4}, H_1, H_2$ fueron cuantificados por el método de titulación conductimétrico^{45 49}. 20 mL de material celulósico obtenido de por extracción alcalina fueron diluidos con agua destilada para obtener 40 mL de suspensión a una concentración de $0,5\%$ p/v de material celulósico. Esta suspensión es transferida a un vaso precipitado de 100 mL y se agregaron 4 mL de solución NaCl $0,01M$. El pH de la suspensión se ajusta utilizando HCl hasta obtener un valor entre 2 y 2,5. La

titulación de la muestra se realizó con hidróxido de sodio a una concentración de 0,05M. La cuantificación de los ácidos carboxílicos fue realizada identificando los volúmenes extremos de la segunda fase en el gráfico de conductividad. La concentración de ácidos débiles se calculó usando la ecuación:

$$X = \frac{C_t \times V}{m}$$

donde X es la cantidad de grupos ácidos carboxílicos en $\mu\text{mol/g}$, m es la masa de la muestra, C_t es la concentración de la solución de NaOH y V es el volumen de la base que se consume hasta el punto de inflexión en que la conductividad comienza a aumentar por la acumulación de NaOH.

3.2. Entrecruzamiento químico usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y N-hidroxisuccinimida

3.2.1. Preparación del buffer MES-NaCl

La reacción de entrecruzamiento se realizó en una solución buffer para mantener estable el pH. Específicamente, se utilizó buffer de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) a una concentración de 0,05M. Para la preparación de éste se disuelven 0,976 g dMES y 2,92 g de NaCl en 100 mL de agua desionizada. El pH de la solución fue ajustado hasta un valor de 5,5 usando una solución NaOH concentrada.

3.2.2. Formación de membranas de material celulósico

Para la formación de las membranas se toma una muestra de 40 ml de suspensión 0,5% p/v de material celulósico. La muestra fue procesada usando un homogeneizador de alto corte a 10000 rpm por 5 min. La suspensión se filtró por 15 min usando un embudo Büchner conectado a una bomba de vacío. La torta húmeda se colocó al interior de una serie de capas, la primera compuesta de rejillas metálicas de malla fina, luego papel filtro y finalmente dos platos de metal. Todo esto se prensó por 10 min a 12 MPa y luego se transfirió a una termo prensa a 85°C por 30 min, hasta retirar toda la humedad remanente.

3.2.3. Entrecruzamiento de material celulósico en suspensión

0,2g de material celulósico fueron agregados a 20 ml de buffer MES, agitando vigorosamente para obtener una suspensión homogénea. Se agregó EDC y NHS en una proporción 4:1 para obtener una concentración final de EDC entre 0 y 9 mg/ml y se dejó reaccionar durante 8h con agitación magnética constante y a temperatura ambiente. El material tratado se recuperó por filtración al vacío y posteriormente se lavó 4 veces por 30 min con agua destilada. Una vez lavado el material se utilizó para para la fabricación de membranas como se describe en la Sección 3.2.2.

3.2.4. Entrecruzamiento de membranas de material celulósico

Alternativamente se utilizó el material celulósico sin modificar para la fabricación de membranas. Posteriormente a su fabricación, se sumergieron estas, individualmente, en 20 ml de buffer MES agregando EDC y NHS a una razón 4:1, siendo las concentraciones finales de EDC las mismas que se utilizaron en el entrecruzamiento en suspensión. Se deja reaccionar durante 8h. Una vez terminado el tiempo de reacción, se eliminó la solución remanente y se secó la membrana utilizando la misma termoprensa usada en la fabricación de las membranas.

3.2.5. Determinación del grado de entrecruzamiento

La concentración de grupos carboxilo presentes en los materiales celulósicos se determinó por titulación conductimétrica. Se define el grado de entrecruzamiento en base a la cantidad de grupos carboxilo iniciales en el material celulósico y los grupos carboxilos consumidos durante la reacción y se puede calcular usando la fórmula siguiente:

$$[\%] = \frac{[COOH]_i - [COOH]_f}{[COOH]_i - [COOH]_{100}}$$

donde $[COOH]_i$ es la concentración inicial de grupos carboxilo en el material, $[COOH]_f$ es la concentración de carboxilos luego de la reacción de entrecruzamiento y $[COOH]_R$ corresponde al valor remanente de grupos carboxilo con un grado de entrecruzamiento igual a 100%.

3.3. Caracterización de materiales celulósicos modificados por entrecruzamiento químico

3.3.1. Estructura molecular

La estructura molecular de las membranas con distinto porcentaje de entrecruzamiento se caracterizó por FTIR utilizando una resolución de 4 cm^{-1} en el rango $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

3.3.2. Estructura cristalina

La estructura cristalina de los materiales celulósicos se estudió por DRX usando un difractómetro de rayos X con una fuente de rayos X de cobre, la cual produce radiación $\text{Cu } K_\alpha$ con una longitud de onda de $0,154\text{ nm}$ operando a 40 kV y 30 mA . Los patrones fueron obtenidos en un rango de difracción $5^\circ\text{--}40^\circ$ con una variación de $0,02^\circ$ cada 3 s y usando una velocidad rotacional de 60 rpm .

3.3.3. Morfología superficial

La morfología de la superficie de las membranas entrecruzadas químicamente se observó usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo de alta resolución. Las imágenes se obtuvieron con un voltaje de aceleración de 10 kV , tamaño de punto de 3 y una distancia de trabajo de 6 mm . Previo a la toma de imágenes, las muestras fueron fijadas a una tachuela metálica usando pestañas de adhesivo de carbón y posteriormente cubiertas con oro usando un recubridor por pulverización. El grosor de la capa de oro fue de $\sim 5\text{ nm}$.

3.3.4. Estabilidad térmica y determinación de contenido inorgánico por TGA

La estabilidad térmica de las membranas, al igual que la cuantificación de contaminantes inorgánicos, se determinó usando un analizador termogravimétrico TGA Q50. Muestras de membrana con una masa inicial de $\sim 8\text{ mg}$ fueron sometidas a un aumento gradual de temperatura de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ desde 30°C a 600°C bajo una atmósfera de aire a un flujo de $40\text{ mL}/\text{min}$. Las temperaturas al comienzo y peak de degradación se determinaron usando la primera derivada de la pérdida de peso como una función de la temperatura.

3.3.5. Hinchamiento de la membrana

El grado de hinchamiento de las membranas fue cuantificado sumergiendo las membranas en 20 mL de agua destilada a 20°C. Luego de 1, 2, 24, 72 h de inmersión, los materiales fueron retirados y secados suavemente entre dos hojas de papel y pesados. El grado de hinchamiento se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de hinchamiento}[\%] = \frac{m_{s(t)} - m_{s(0)}}{m_{s(0)}} \times 100\%$$

donde $m_{s(t)}$ es el peso del material luego de la inmersión en agua; $m_{s(0)}$ el peso del material antes de la inmersión.

4. Resultados

4.1. Extracción de fibras de celulosa

La celulosa presente en la túnica del piure, al igual que en otras especies de tunicados, se encuentra integrada a una matriz proteica¹⁰ donde las fibras de celulosa-proteína se encuentran ligadas por glucanos no celulósicos y lípidos⁷. Para extraer las fibras de celulosa funcionalizada de la matriz se utilizó una etapa de hidrólisis alcalina. Se utilizó diferentes tiempos de extracción obteniéndose tres materiales con distinto contenido de proteína unido a las fibras de celulosa. El material sometido a 6 horas de extracción se denominó $H_{1/4}$, aquel tratado durante 24 horas H_1 y el material tratado por 48 horas H_2 . Los tres materiales obtenidos presentaban una ligera coloración salmón independiente del tiempo de tratamiento utilizado.

Las muestras de material celulósico obtenidas fueron lavadas de acuerdo con el protocolo. Luego fueron resuspendidas en una concentración de 1% p/v de acuerdo con su peso seco y refrigeradas 4°C hasta ser utilizadas.

4.2. Entrecruzamiento químico

Se prepararon muestras de las suspensiones de los materiales celulósicos obtenidos a varios tiempos de hidrólisis alcalina ($H_{1/4}$, H_1 y H_2), una parte de estas muestras fue tratada en suspensión con los agentes entrecruzantes EDC y NHS a varias concentraciones finales

Las suspensiones de los materiales celulósicos $H_{1/4}$, H_1 y H_2 fueron preparadas para realizar la reacción de entrecruzamiento aplicando el EDC/NHS a concentraciones finales de EDC de 0, 0,25, 0,5, 1, 5 y 10 mg/mL los cuales se utilizaron para la confección de membranas entrecruzadas en suspensión. Otra parte del material fue usado para la confección de membrana de material celulósico primero, siendo aplicado el agente entrecruzante posteriormente, usando las mismas concentraciones finales de EDC que para el grupo anterior.

Para cada material celulósico estudiado ($H_{1/4}$, H_1 y H_2), se obtuvieron tres membranas entrecruzadas en suspensión y una entrecruzada como membrana por cada una de las seis concentraciones del agente entrecruzante estudiadas (un total de 72 membranas). Además, para cada material hidrolizado, se prepararon tres muestras de 0,1g en peso seco de material entrecruzado en suspensión por cada concentración del agente entrecruzante, los cuales no fueron convertidos en membrana, para su uso en detección de grupos ácidos.

4.3. Caracterización de materiales celulósicos

4.3.1. Composición atómica y cuantificación de proteínas

La composición atómica de los materiales celulósicos en la superficie fue determinada utilizando espectroscopía fotoeléctrica por rayos X. La Figura 1 muestra el espectro de baja resolución para los materiales celulósicos PI, $H_{1/4}$ y H_1 , se detecta la presencia de elementos como nitrógeno, oxígeno y carbono los cuales se asocian directamente a la composición de la celulosa y las proteínas unidas a esta. Se detectan además otros elementos como silicio y calcio los cuales pueden deberse a la presencia de contaminantes inorgánicos en la muestra.

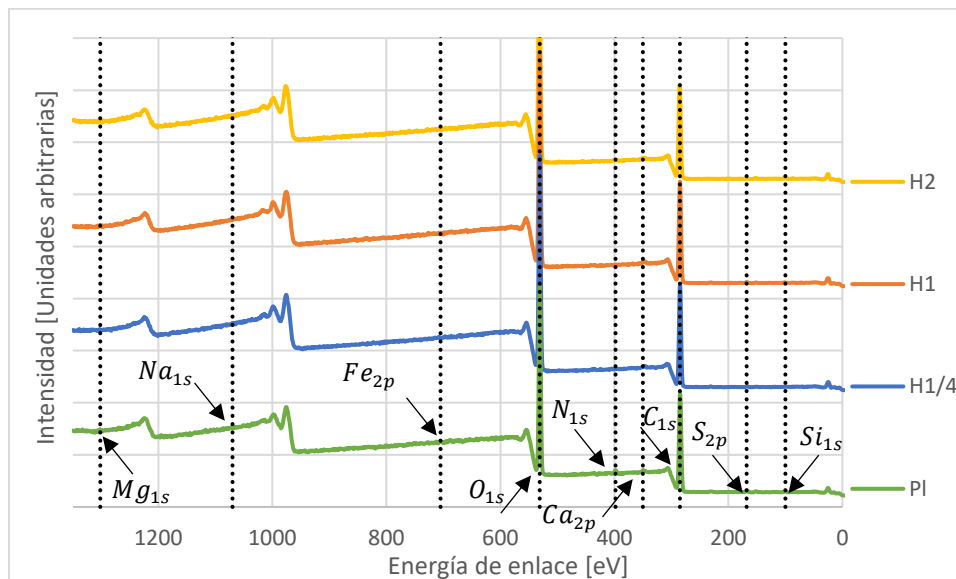


Figura 1: Espectro de baja resolución usado para la inspección de los elementos presentes en los materiales estudiados

La composición porcentual por elemento detectado y el porcentaje de proteína calculado se muestra en la Tabla 2. Se observa una disminución en el nitrógeno detectado con respecto a reportes previos de materiales celulósicos provenientes de peña de piure y de similar tratamiento⁷. Sin embargo, se conserva la tendencia previamente reportada en la que materiales hidrolizados por periodos de tiempo más largos presentan un menor porcentaje de nitrógeno en la superficie, lo cual se asocia a la denaturación y pérdida de proteínas asociadas al esqueleto de celulosa^{3,7}. Se observa, además que, con respecto al material celulósico no hidrolizado, tanto $H_{1/4}$ como H_1 presentan una disminución en el porcentaje de silicio detectado, esto puede deberse a la eliminación de granos de arena durante el proceso de hidrólisis y en los lavados posteriores del material^{3 7 50}, mientras que otros átomos como calcio, magnesio y hierro no se ven principalmente afectados por estos procesos.

		Si (2p)	S (2p)	C (1s)	Ca (2p)	N (1s)	O (1s)	Fe (2p)	Mg (1s)	Proteína %
PI		0,65	0,48	56,49	0,13	1,27	40,52	0,27	0,19	7,94
$H_{1/4}$	%	0,18	0,22	54,01	0,21	0,36	44,87	0,15	ND	2,25
H_1		0,32	0,26	53,92	0,42	0,18	44,44	0,3	0,16	1,13
H_2		0,42	ND	53,45	ND	ND	45,42	0,27	0,21	ND

Tabla 2: Componentes atómicos de los distintos materiales celulósicos estudiados. Para H_2 y $H_{1/4}$ algunos componentes no fueron detectados por la metodología utilizada.

Para obtener más información se estudiaron los espectros de alta resolución de los materiales celulósicos para carbono y nitrógeno. Los peaks individuales fueron obtenidos por deconvolución de la señal como se muestra en la Figura 2 y Figura 3, los valores máximos para cada peak se encuentran en las Tabla 3 y Tabla 4. Para el carbono se observa la presencia de tres bandas claramente definidas que corresponden a los distintos enlaces formados por este átomo. La banda ~283 eV (C1) corresponde a un enlace formado entre dos átomos de carbono o un enlace entre carbono e hidrógeno, la banda 284,5 eV (C2) corresponde a la unión entre un átomo de carbono y un átomo de oxígeno no carbonilo, mientras que la banda ubicada en ~285,3 eV (C3) corresponde a un enlace entre carbono y oxígeno carbonilo o a un carbono unido a dos átomos de oxígeno^{7 29 51}. En muestras de celulosa se suele encontrar una cuarta banda (C4)^{51,52} correspondiente a un átomo de carbono unido a un átomo de oxígeno carbonilo y un oxígeno no carbonilo, pero en este caso no se detectó dicha banda para ninguna de las muestras estudiadas.

De acuerdo a publicaciones anteriores^{7 29} se esperaba observar dos bandas presentes en la señal de nitrógeno tal como se puede observar en la Figura 3 B, C y D, las cuales corresponden a enlaces entre nitrógeno y carbono en la banda 398 eV (N2) y a enlaces nitrógeno e hidrógeno en la banda ~395eV (N1). Siendo esta última banda no detectada para el material PI, sin embargo, dado que es este el material con mayor cantidad de proteína presente lo más probable es que la señal de esta banda se encuentre escondida bajo el peak asociado al enlace N-C.

Material	BE (eV) C- C, C-H	BE (eV) C- O	BE (eV) O=C-O, O-C-O
PI	282,7	284,4	285,0
$H_{1/4}$	283,3	284,5	285,6
H_1	283,0	284,5	285,4
H_2	283,0	284,6	285,9

Tabla 3: Energía de enlace asociada a los estados de energía de C 1s para el material sin modificar y los materiales hidrolizados $H_{1/4}$, H_1 y H_2 .

Material	Be (eV) N- H	Be (eV) N- C
PI	ND	397,9
$H_{1/4}$	395,0	397,9
H_1	394,1	398,0
H_2	394,1	398,0

Tabla 4: Energía de enlace asociada a los estados de energía de N 1s para el material sin modificar y los materiales hidrolizados $H_{1/4}$, H_1 y H_2 .

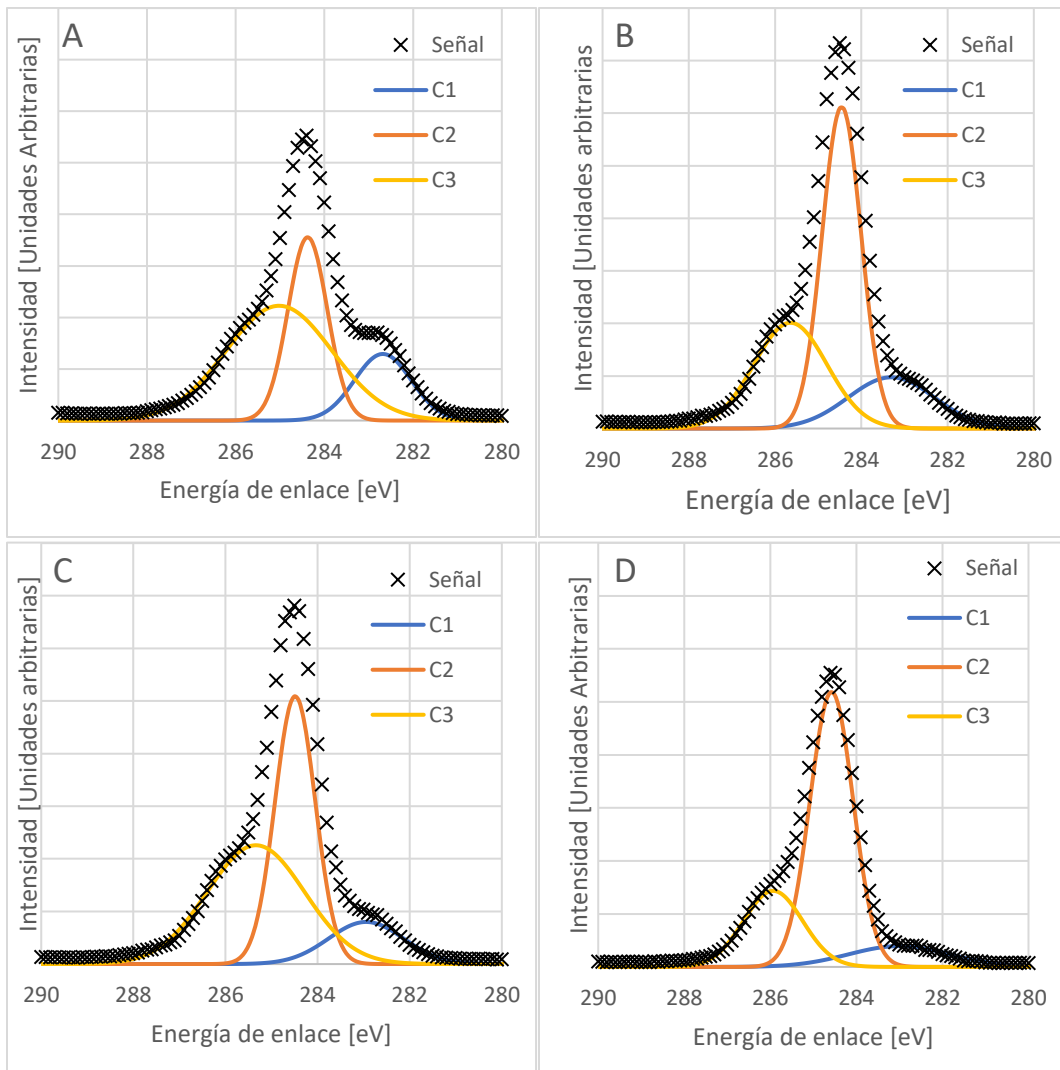


Figura 2: Deconvolución de la señal de alta resolución de carbono para cada material celulósico estudiado sin modificar. En A se muestra la señal del material PI, B corresponde al material $H_{1/4}$, C al material H_1 y D para el material H_2 .

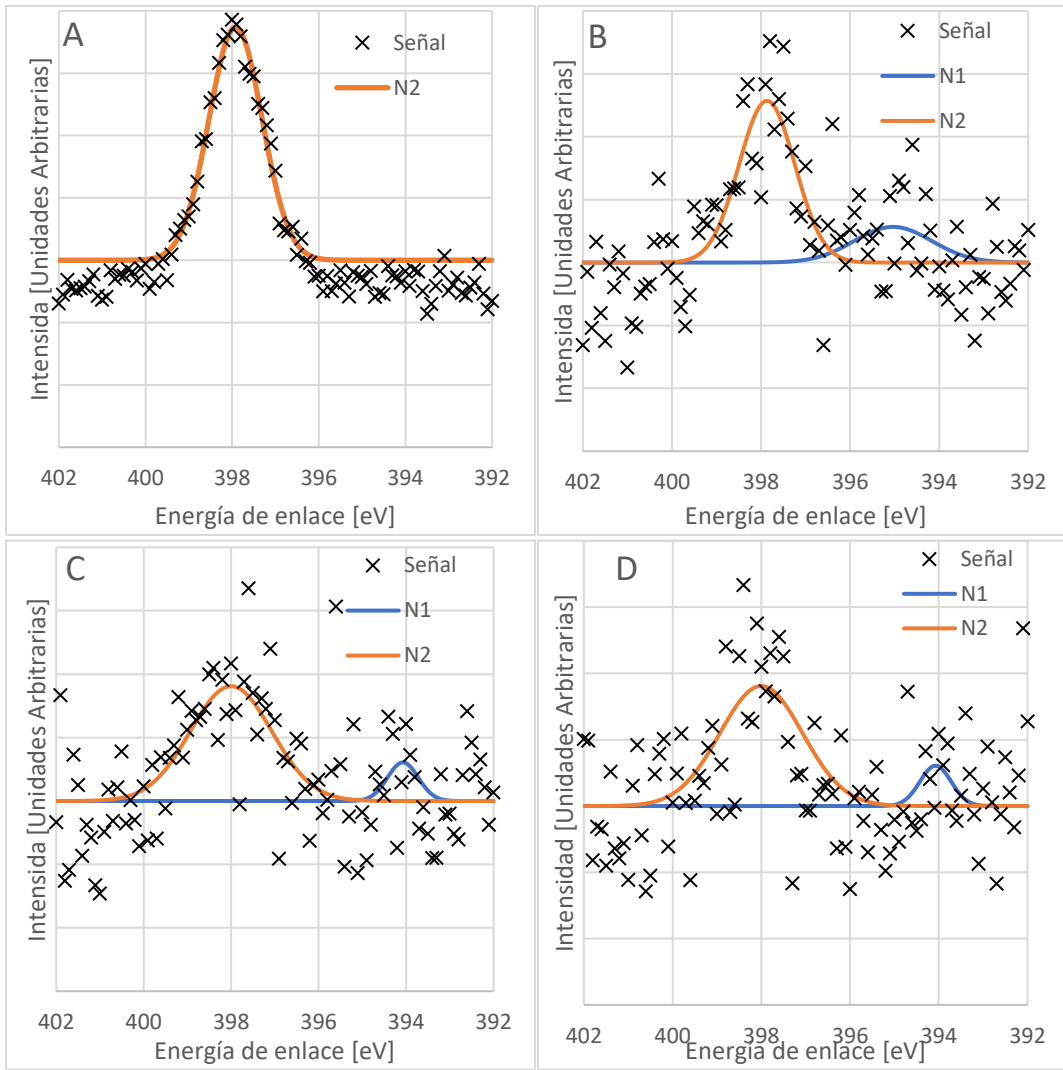


Figura 3: Deconvolución de la señal de alta resolución de nitrógeno para cada material celulósico estudiado sin modificar. En A se muestra la señal del material PI, B corresponde al material $H_{1/4}$, C al material H_1 y D al material H_2 .

4.3.2. Estructura molecular

La estructura molecular de los materiales celulósicos $H_{1/4}$, H_1 y H_2 , y del material inicial PI fueron estudiados usando espectroscopía infrarroja. En la Figura 4 se observan cuatro bandas en los números de onda ~ 1033 , 1055 , 1110 y 1160cm^{-1} los cuales, de acuerdo a estudios previos³, se asocian a movimientos vibracionales y de estiramiento en los enlaces que forman el esqueleto de la molécula de celulosa. Específicamente, las bandas ubicadas en ~ 1033 y 1055cm^{-1} se asocian a la vibración de los enlaces C-O-C presentes en el anillo de piranosa, la banda ubicada en 1110cm^{-1} a la vibración de los enlaces C-OH y en 1160cm^{-1} al estiramiento asimétrico de los enlaces C-O³.

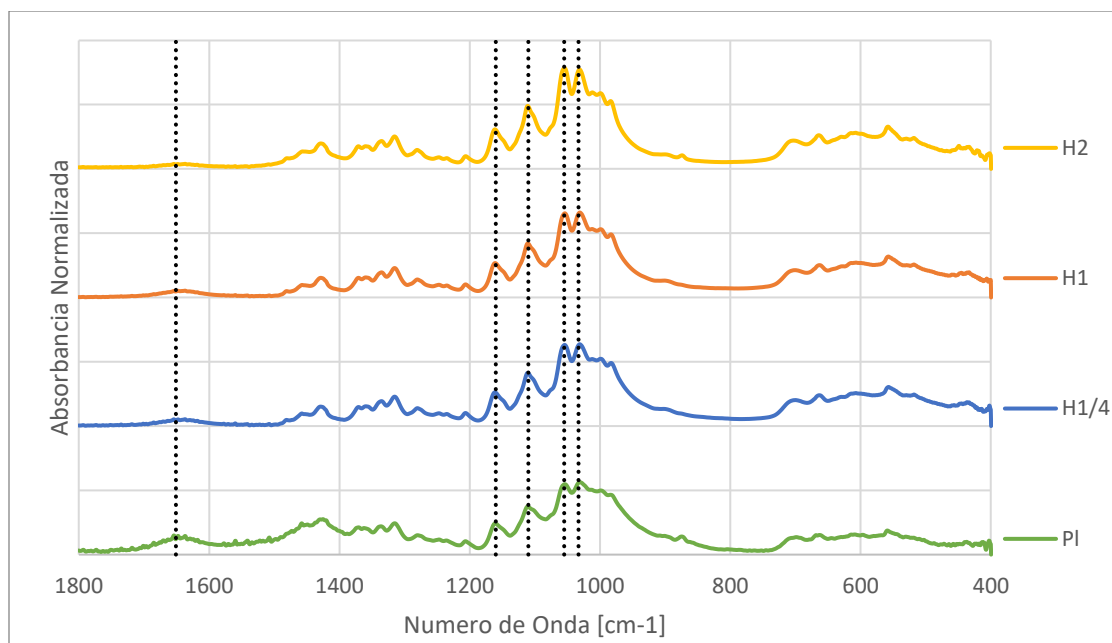


Figura 4: Espectro infrarrojo típico obtenido para el material inicial (PI) y los materiales celulósicos estudiados ($H_{1/4}$, H_1 y H_2). Las líneas punteadas corresponden a bandas asociadas a sitios de interés.

Se observa que la banda ubicada en $\sim 1651\text{cm}^{-1}$, la cual está asociada a la presencia de amida I, presenta una continua reducción en su intensidad desde el valor obtenido para PI hasta un mínimo en el material H_2 . Esta disminución se debe a la remoción de las proteínas presentes en el material original por el proceso de hidrólisis alcalina⁷, siendo el efecto más prominente en los materiales con un mayor tiempo de reacción. Se realizaron estudios por espectroscopía infrarroja a los materiales celulósicos H_1 , H_1 y H_2 modificados por entrecruzamiento químico para evaluar la variación de la banda ubicada en $\sim 1651\text{cm}^{-1}$. La reacción de entrecruzamiento genera enlaces tipo amida entre los grupos ácido carboxílico y aminos presentes en la superficie del material por lo que se esperaba observar un aumento en la intensidad relativa en este sitio.

Material	Concentración EDC mg/ml					
	0	0,25	0,5	1	5	10
	1651/1055					
$H_{1/4}$	0,07	0,08	0,05	0,07	0,08	0,05
H_1	0,08	0,10	0,06	0,07	0,07	0,07
H_2	0,05	0,09	0,17	0,16	0,08	0,16
	Mat mod/Mat sin modificar					
$H_{1/4}$	1,00	1,09	0,66	1,00	1,08	0,71
H_1	1,00	1,26	0,69	0,87	0,87	0,90
H_2	1,00	1,71	3,16	2,99	1,59	3,10

Material	Concentración EDC mg/ml					
	0	0,25	0,5	1	5	10
	1651/1055					
$H_{1/4}$	0,07	0,09	0,11	0,14	0,10	0,11
H_1	0,08	0,09	0,05	0,10	0,09	0,17
H_2	0,05	0,04	0,06	0,06	0,06	0,10
	Mat mod/Mat sin modificar					
$H_{1/4}$	1,00	1,29	1,55	2,05	1,36	1,60
H_1	1,00	1,16	0,66	1,31	1,18	2,09
H_2	1,00	0,84	1,11	1,07	1,16	1,94

Tabla 5: Intensidad relativa de la banda 1651cm^{-1} . a) muestra la intensidad normalizada con la intensidad de la banda 1055 para el mismo material y la razón entre la intensidad normalizada del material sin modificar y los materiales entrecruzados en suspensión. b) muestra las intensidades normalizadas y razones de intensidad en los materiales modificados como membrana.

Los valores de la intensidad de la banda asociada al grupo amida fue normalizada usando un peak típicos de materiales celulósicos, el cual no se ve afectados por el proceso de entrecruzamiento químico⁵³. La Tabla 5 muestra el valor normalizado de la intensidad obtenida para la banda $\sim 1651\text{ cm}^{-1}$ tanto para los materiales celulósicos modificados por entrecruzamiento en suspensión (A) como para los materiales modificados como membrana (B).

Se calculó la razón entre el valor de intensidad normalizada de los materiales modificados a distintas concentraciones de EDC y la intensidad normalizada en la misma banda para materiales sin modificar. En el caso los materiales celulósicos modificados en suspensión no se observa una tendencia en función a la concentración final de EDC utilizada, observándose en algunos casos un aumento de la intensidad relativa y en otros una disminución de esta. Cabe destacar que H_2 presenta un comportamiento en que la intensidad no aumenta proporcionalmente a la cantidad de EDC utilizada, sin embargo, la intensidad obtenida para los materiales modificados es mayor que la intensidad del material sin modificar para todos las concentraciones estudiadas.

En el caso de los materiales modificados como membrana, tampoco existe una proporcionalidad entre la intensidad relativa obtenida y la cantidad de agente entrecruzante utilizado. A pesar de esto, se observa que para casi todas las concentraciones estudiadas en los tres materiales celulósicos hay un aumento de la intensidad obtenida. La diferencia de los resultados obtenidos entre estas dos metodologías puede deberse a una limitada capacidad de difusión de los reactivos utilizados al interior de la membrana, causando que la reacción de entrecruzamiento se dé principalmente sobre la superficie, donde es fácilmente detectable por el espectrómetro infrarrojo. Mientras que parte de los nuevos enlaces formados en el material entrecruzado en suspensión quedan al interior de la membrana donde la capacidad de penetración de las ondas infrarrojas podría dificultar la detección de enlaces.

4.3.3. Estructura cristalina

La estructura cristalina de los materiales celulósicos $H_{1/4}$, H_1 y H_2 sin modificar y modificados con una concentración de EDC de 5 mg/ml. Para estos últimos, se estudió el material modificado en suspensión y modificado como membrana. Los difractogramas obtenidos se presentan en las Figura 5, Figura 6 y Figura 7.

En los difractogramas presentados para los distintos materiales se puede observar la presencia de los cuatro peaks característicos para celulosa, ubicados en la posición $14,7^\circ$, $16,6^\circ$, $22,5^\circ$ y $34,5^\circ$ que representan los planos de refracción 101 , $10\bar{1}$, 002 y 040 , respectivamente, en las fibrillas. Se detectan además peaks secundarios en el rango $2\theta \sim 25^\circ$ a 30° . Estos corresponden a distintos contaminantes cristalinos presentes en el material, los cuales serán caracterizados más adelante.

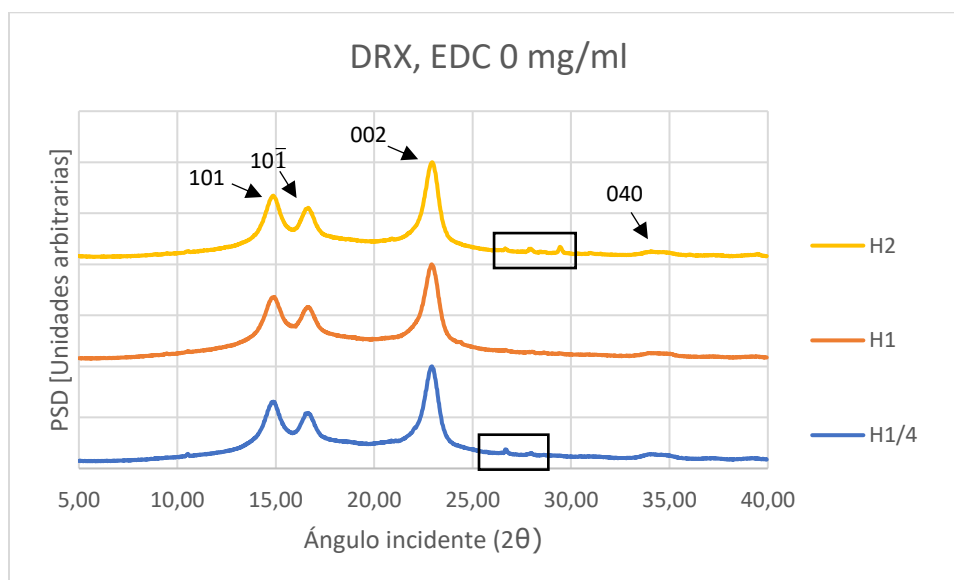


Figura 5: Difractograma obtenido para los materiales celulósicos estudiados sin modificar. Se observan los cuatro peaks típicos para la celulosa ubicados en posiciones $14,7^\circ$, $16,6^\circ$, $22,5^\circ$ y $34,5^\circ$. Además, es posible observar algunos peaks los cuales se asocian a la presencia de contaminantes cristalinos.

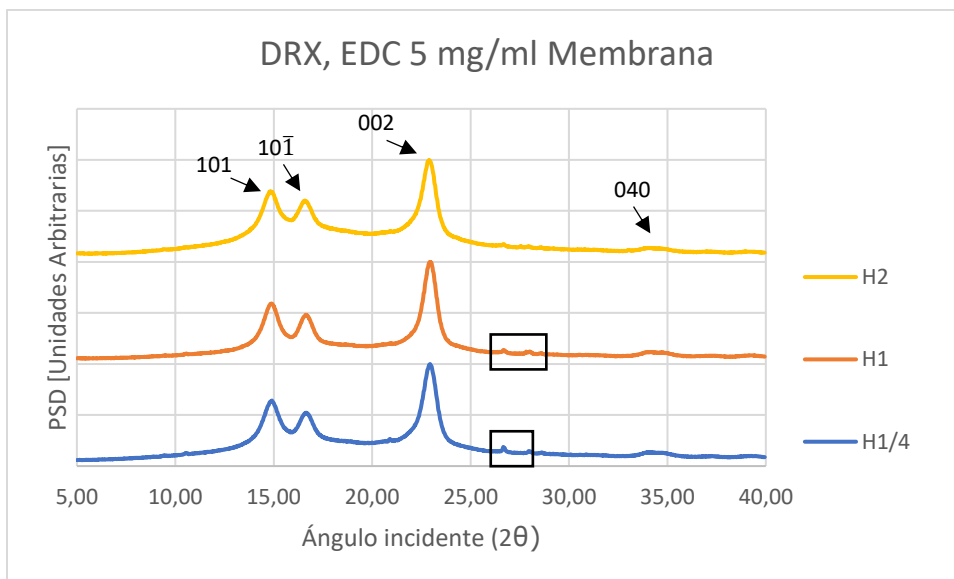


Figura 6: Difractograma obtenido para los materiales celulósicos estudiados modificados con una concentración final de 5 mg/ml de EDC como membrana. Se observan los cuatro peaks típicos de la celulosa en posiciones 14,7°, 16,6°, 22,5° y 34,5°. Además, es posible observar algunos peaks los cuales se asocian a la presencia de contaminantes cristalinos.

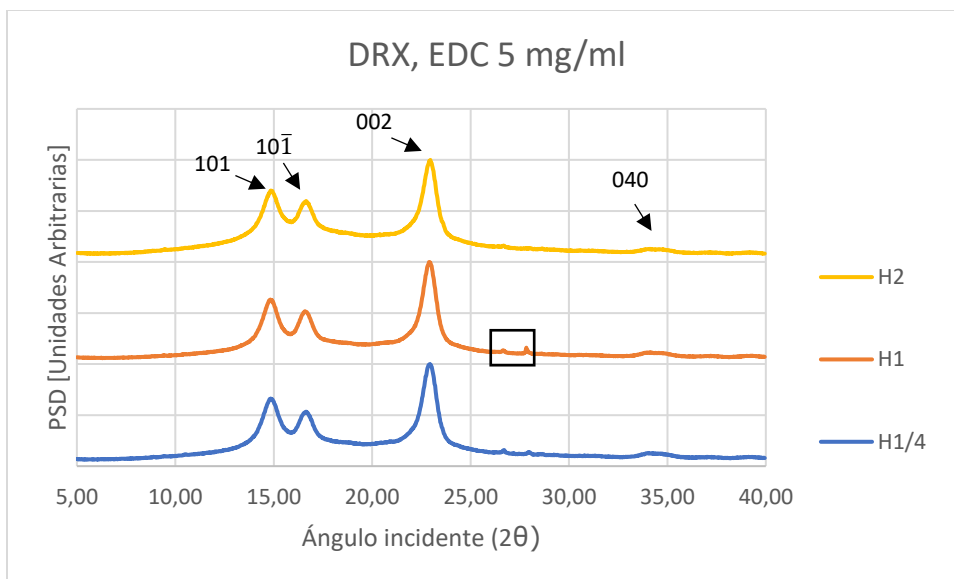


Figura 7: Difractograma obtenido para los materiales celulósicos estudiados modificados con una concentración final de 5 mg/ml de EDC en suspensión. Se observan los cuatro peaks típicos de la celulosa en posiciones 14,7°, 16,6°, 22,5° y 34,5°. Además, es posible observar algunos peaks los cuales se asocian a la presencia de contaminantes cristalinos

Los resultados obtenidos fueron utilizados para calcular el índice de cristalinidad de los materiales estudiados, los cuales se presentan en la Figura 8. Para los materiales $H_{1/4}$ y H_1 se observa un aumento del contenido de celulosa cristalina en los materiales modificados con respecto al material sin modificar, siendo mayor el aumento en ambos casos para el material modificado en suspensión. El material H_2 presenta un comportamiento contrario, observándose una reducción del índice de cristalinidad para los materiales modificados con respecto al material sin modificar. Esta variación es relevante, ya que es la parte amorfa de

la celulosa la que determina la capacidad de absorción de agua por parte del material ⁵⁴. En base a los resultados obtenidos es esperable una reducción de la capacidad de hinchamiento del material entrecruzado con respecto al material sin modificar.

Los resultados del índice de cristalinidad para las muestras sin modificar presentan una disminución de su valor con respecto a las referencias bibliográficas, siendo el resultado obtenido (~30-45%) mucho menor que el previamente reportado (~75%) ^{3,10}.

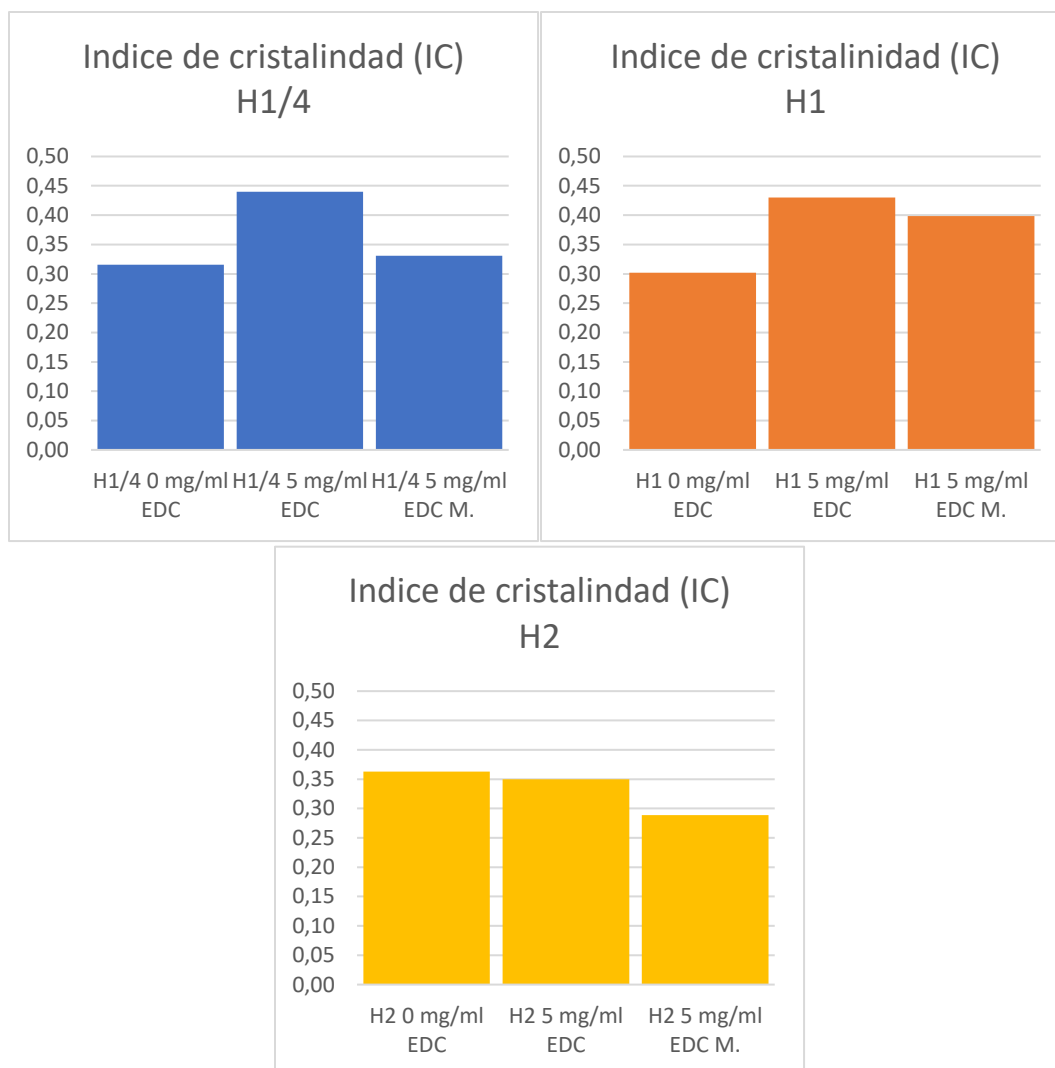


Figura 8: Porcentaje de cristalinidad calculado para los tres materiales celulósicos estudiados sin modificar y modificados con EDC a una concentración final de 5 mg/ml.

4.3.4. Determinación de grado de entrecruzamiento

Se utilizó titulación conductimétrica para cuantificar la presencia de grupos carboxilo en la superficie de los materiales celulósicos suponiendo que estos serían el principal ácido débil presente en la superficie de las muestras estudiadas⁴⁵⁻⁴⁹. Para luego, por medio del seguimiento de su presencia en la superficie de los materiales modificados por entrecruzamiento químico, determinar el grado de entrecruzamiento obtenido para cada concentración de EDC utilizado. Para cada muestra se obtuvieron resultados como los que se muestran en la Figura 9, donde se observan las tres fases típicas de un gráfico para este tipo de estudio. Por medio de regresión lineal, se obtuvo una recta representativa para cada fase, las cuales al interceptarse permiten obtener los volúmenes de solución alcalina utilizada al comienzo y fin de la fase II, aquella en que se neutralizan los ácidos débiles presentes en la muestra estudiada.

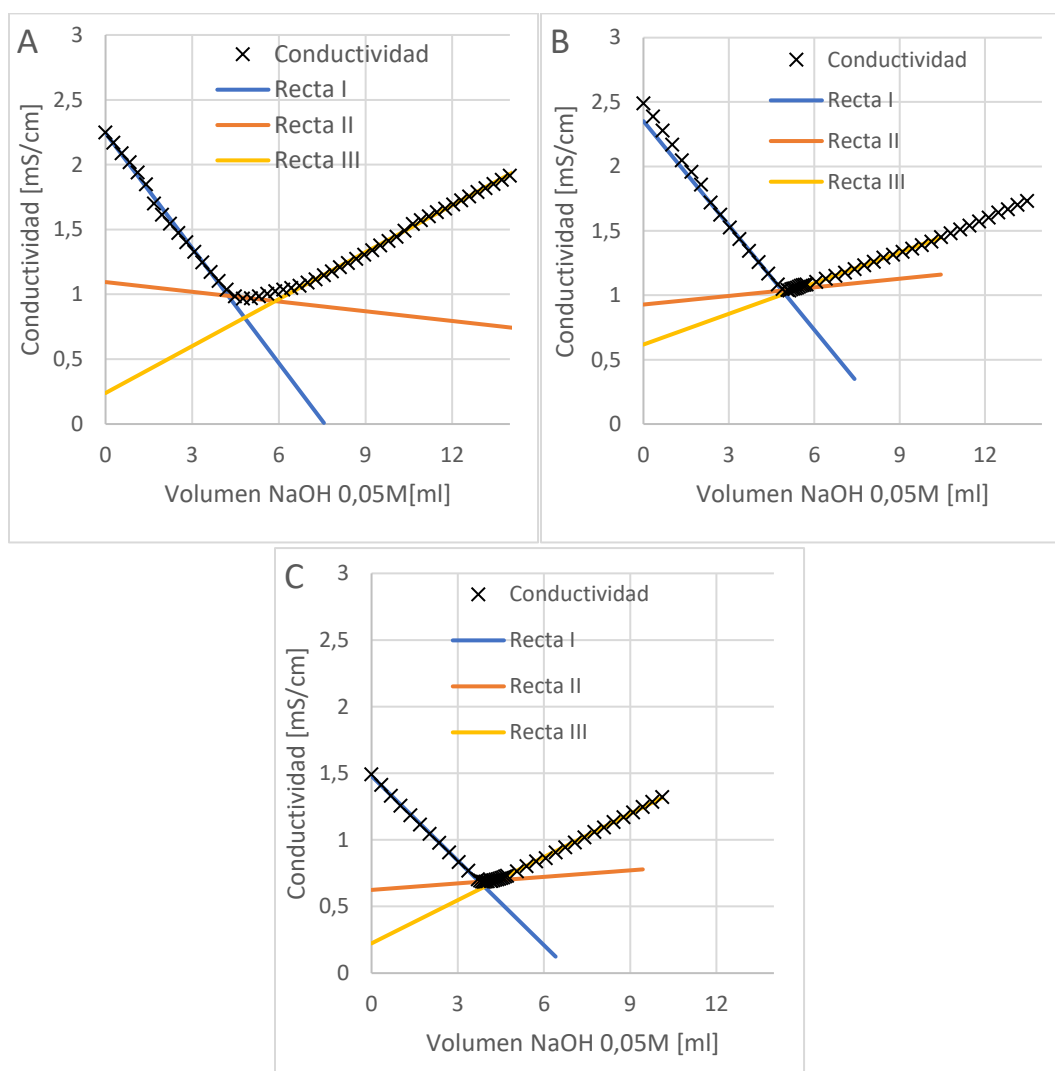


Figura 9: Resultados típicos de conductimetría para los materiales celulósicos hidrolizados. A una de las mediciones obtenidas para el material $H_{1/4}$, mientras que B y C muestran resultados para los materiales H_1 y H_2 respectivamente

Sin embargo, por medio de una búsqueda bibliográfica se determinó durante la realización de los experimentos que los grupos amina presentes en la superficie también actúan como ácido en el rango de pH requerido para esta técnica afectando los resultados obtenidos, ya que es imposible diferenciarlos con este método de los grupos carboxilo que se deseaban medir. Además, se detectó que la sensibilidad del método, para el protocolo utilizado, era insuficiente para cuantificar correctamente los grupos ácidos resultando en una gran variabilidad de los valores obtenidos para un mismo tipo de muestra. Esto se debió principalmente a la reducida cantidad de material que se tenía disponible (0,1g por muestra), siendo imposible escalar la producción del material utilizada debido a la cantidad limitada del agente entrecruzante que se tenía disponible y al alto consumo de éste para la preparación de muestras con una alta concentración. En base a esto se decidió descartar el uso del grado de entrecruzamiento y se optó por asociar los resultados a la concentración de agente entrecruzante utilizada. A pesar de esto, los resultados ya obtenidos se utilizaron de manera cualitativa para confirmar la acción de EDC y NHS sobre los grupos funcionales objetivo de la reacción de entrecruzamiento químico.

Como se observa en Figura 10 las muestras de $H_{1/4}$, H_1 y H_2 sin modificar presentan un número similar de grupos ácidos los cuales rondan los 0,31mmol/g, este valor es equivalente al doble del valor detectado para pulpa blanqueada TMP y CTMP y 2,8 veces la cantidad de grupos ácidos detectados para pulpa Kraft sin blanquear⁴⁵. Los valores de grupos ácidos obtenidos a distintas concentraciones no presentan el comportamiento esperado ya que varios puntos presentan un aumento de los ácidos débiles detectados frente a un aumento de la concentración del agente entrecruzante utilizado. Los resultados presentan, además, una gran variabilidad, teniendo una desviación del 50% del valor detectado en algunos casos. A pesar de esto, todos los resultados muestran una disminución del total de grupos ácidos detectados, indicando que en efecto la reacción mediada por EDC/NHS reduce, parcialmente, los grupos ácidos presentados en la superficie del material.

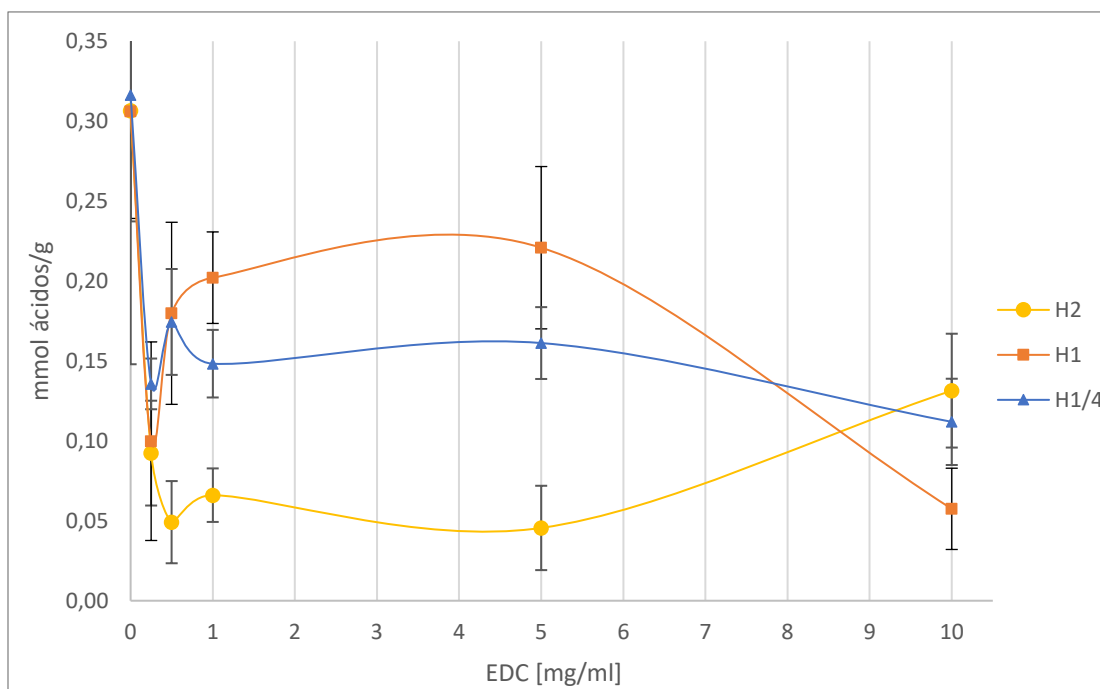


Figura 10: Determinación de ácidos débiles presentes en la superficie de los materiales celulósicos.

Se investigó el uso de otras metodologías para determinar correctamente el grado de entrecruzamiento obtenido para las distintas concentraciones de EDC, sin embargo, debido al tiempo disponible para la realización de este trabajo fue imposible de implementar. El método más prometedor consiste en hacer reaccionar la muestra con ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS)²⁰ lo cual permite la cuantificación por absorbancia, usando una curva de calibración, de los grupos amina no unidos. Con esta cuantificación es posible definir, usando una fórmula similar a la propuesta a usar con los grupos carboxílicos, el grado de entrecruzamiento alcanzado.

EDC mg/ml	mmolCOOH/g					
	$H_{1/4}$		H_1		H_2	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
0,00	0,316	0,168	0,306	0,067	0,307	0,069
0,25	0,136	0,016	0,100	0,062	0,092	0,033
0,50	0,174	0,033	0,180	0,057	0,049	0,026
1,00	0,148	0,021	0,202	0,029	0,066	0,017
5,00	0,161	0,022	0,221	0,051	0,046	0,026
10,00	0,112	0,027	0,057	0,025	0,131	0,036

Tabla 6: Milimoles de grupos ácidos por gramo de material seco promedio calculados desde los resultados de la titulación conductimétrica de suspensión de los materiales celulósicos $H_{1/4}$, H_1 y H_2 tratados con distintas concentraciones de EDC.

4.3.5. Estabilidad térmica

En las Tabla 7, Tabla 8 y Tabla 9 se presentan los resultados del análisis termogravimétrico para los materiales celulósicos $H_{1/4}$, H_1 y H_2 sin modificar y modificados a distintas concentraciones, utilizando ambos métodos descritos previamente. Todas estas pruebas se realizaron por triplicado utilizando aire como atmosfera, asegurando la degradación de los compuestos orgánicos presentes en los materiales.

Material celulósico	EDC [mg/ml]	T° Onset [°C]		T° Peak [°C]		Masa residual [%]	
		□	σ	□	σ	□	σ
$H_{1/4}$	0	262	5,1	292	1,4	5,5	2,6
	0,5 M	255	1,5	291	1,4	4,3	2,0
	0,5	256	1,3	302	0,2	6,1	2,6
	1 M	249	9,0	291	1,4	6,0	1,1
	1	247	1,9	299	1,1	5,3	2,3
	5 M	244	7,2	286	2,1	4,3	2,2
	5	265	2,8	294	0,3	2,1	0,9

Tabla 7: Resultados del análisis termogravimétrico del material celulósico $H_{1/4}$. En las concentraciones marcadas con una M, el material fue modificado como membrana. T° onset corresponde a la temperatura en que comienza la degradación térmica de la muestra mientras que T° peak la temperatura con mayor tasa de degradación de la muestra.

Material celulósico	EDC [mg/ml]	T° Onset [°C]		T° Peak [°C]		Masa residual [%]	
		□	σ	□	σ	□	σ
H_1	0	259	3,9	294	0,9	7,6	1,0
	0,5 M	263	2,0	297	1,8	5,0	1,7
	0,5	255	4,0	301	1,3	3,9	1,1
	1 M	260	1,2	286	3,1	8,2	0,9
	1	267	0,3	298	0,3	4,8	0,8
	5 M	259	0,9	295	3,9	3,5	1,3
	5	263	1,4	293	1,2	5,5	1,3

Tabla 8: Resultados del análisis termogravimétrico del material celulósico H_1 . En las concentraciones marcadas con una M, el material fue modificado como membrana. T° onset corresponde a la temperatura en que comienza la degradación térmica de la muestra mientras que T° peak la temperatura con mayor tasa de degradación de la muestra.

Material celulósico	EDC [mg/ml]	T° Onset [°C]		T° Peak [°C]		Masa residual [%]	
		□	σ	□	σ	□	σ
H_2	0	293	5,9	311	7,1	7,5	1,9
	0,5 M	286	0,5	306	0,1	5,4	0,9
	0,5	288	1,6	311	0,8	6,4	4,1
	1 M	284	1,8	306	2,1	6,7	2,5
	1	301	1,5	314	0,9	3,7	1,0
	5 M	277	1,7	302	1,4	6,8	1,4
	5	294	2,4	313	2,0	3,8	1,3

Tabla 9: Resultados del análisis termogravimétrico del material celulósico H_2 . En las concentraciones marcadas con una M, el material fue modificado como membrana. Tonset corresponde a la temperatura en que comienza la degradación térmica de la muestra mientras que Tpeak la temperatura con mayor tasa de degradación de la muestra.

Se observa que para los materiales celulósicos sin modificar (0 mg/ml EDC) la temperatura en que comienza la degradación y la temperatura en que se alcanza la mayor tasa de pérdida de peso es muy similar para los materiales $H_{1/4}$ y H_1 (262 y 259°C T°Onset, 292 y 294°C T° Peak, respectivamente). Son estos materiales los que presentan cantidades detectables de proteínas en la superficie de las fibrillas de celulosa que componen las membranas. El material H_2 presenta un aumento en ambas temperaturas con respecto a los materiales anteriores presentando una variación de 30°C en su T°Onset y 20°C en su T°Peak.

Los materiales modificados por entrecruzamiento químico presentaron una reducción en la temperatura de comienzo de degradación y máxima tasa de pérdida de peso con respecto al material sin modificar para el caso del material $H_{1/4}$ y H_2 , observándose un aumento en estos valores a mayor concentración final de EDC utilizada, alcanzando en 5 mg/ml valores similares a los obtenidos con las muestras sin modificar. H_1 presenta un aumento en los valores de T°Onset y T°Peak para la mayoría de las concentraciones de EDC estudiadas con respecto al material sin modificar.

Es posible observar también una diferencia en los resultados para los materiales entrecruzados en suspensión de aquellos entrecruzados como membrana. Teniendo los primeros una mayor temperatura de comienzo de la degradación para todos los casos excepto H_1 entrecruzado con una concentración final de EDC de 0,5 mg/ml. Esta variación puede deberse a que, debido a la metodología utilizada para la reacción de entrecruzamiento del material, las membranas obtenidas de material entrecruzado en suspensión presentan un entrecruzamiento químico de las fibrillas distribuido de manera homogénea en todo su ancho. Mientras que para aquellas modificadas como membrana los nuevos enlaces se encuentran principalmente en las fibrillas de la superficie del material. Haciendo a las primeras térmicamente más estables que las segundas. Esta diferencia en los resultados puede apreciarse también en un desplazamiento de la temperatura peak de degradación donde se observa la misma tendencia.

Todas las muestras presentan una masa residual de material inorgánico, el cual corresponde a <10% de la masa original de la muestra. Estos contaminantes inorgánicos han sido detectados previamente en bibliografía ^{3,7} asociándose a granos de arena

presentes entre las fibrillas de celulosa. Estos también pueden ser observados en los difractogramas obtenidos a través de refracción de rayos x. La composición de algunos de estos contaminantes fue estudiada por Análisis dispersivo de energía por rayos X, obteniéndose que además de compuestos a base de silicio se detectaron partículas metálicas compuestas por hierro, níquel y aluminio, entre otros.

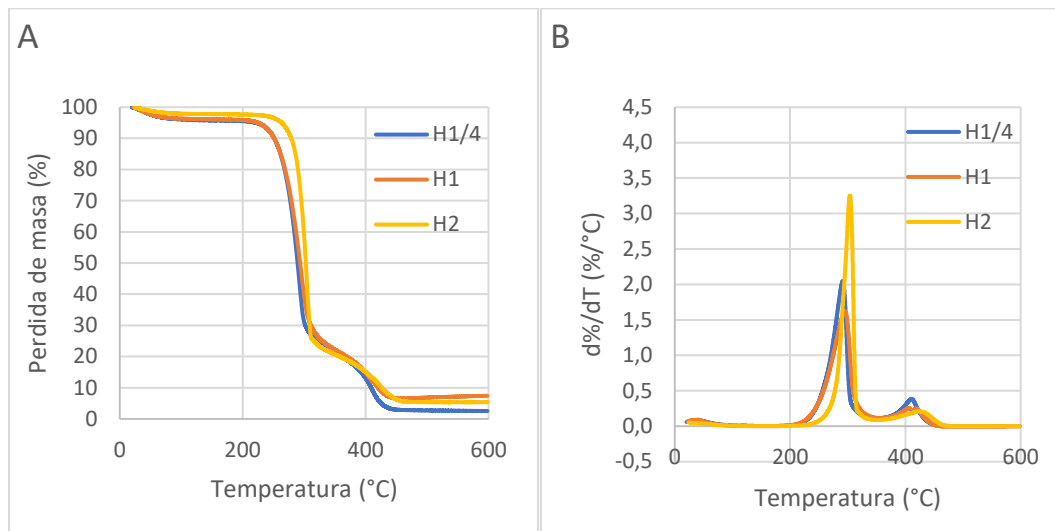


Figura 11: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) en A y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material celulósico sin modificar.

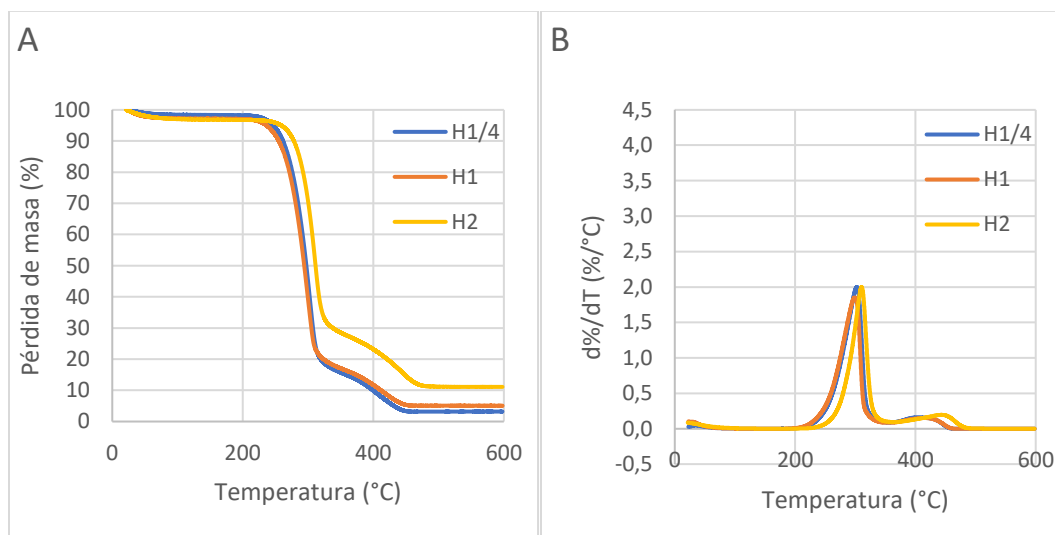


Figura 12: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) en A y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material modificadas con una concentración final de EDC de 0,5 mg/ml en suspensión.

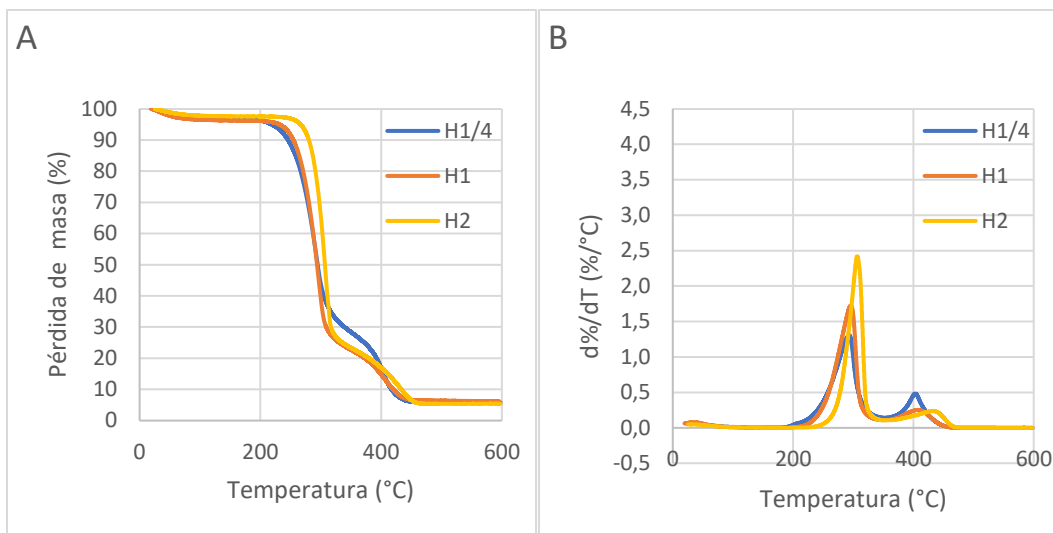


Figura 13: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) en A y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material modificadas como membrana a una concentración final de 0,5 mg/ml.

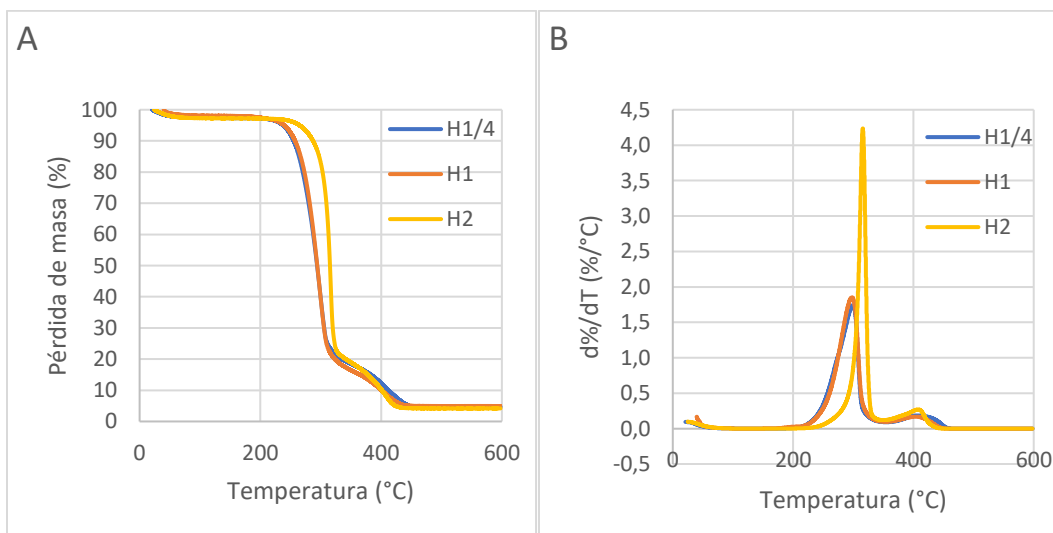


Figura 14: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) en A y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material modificadas con una concentración final de EDC de 1 mg/ml en suspensión.

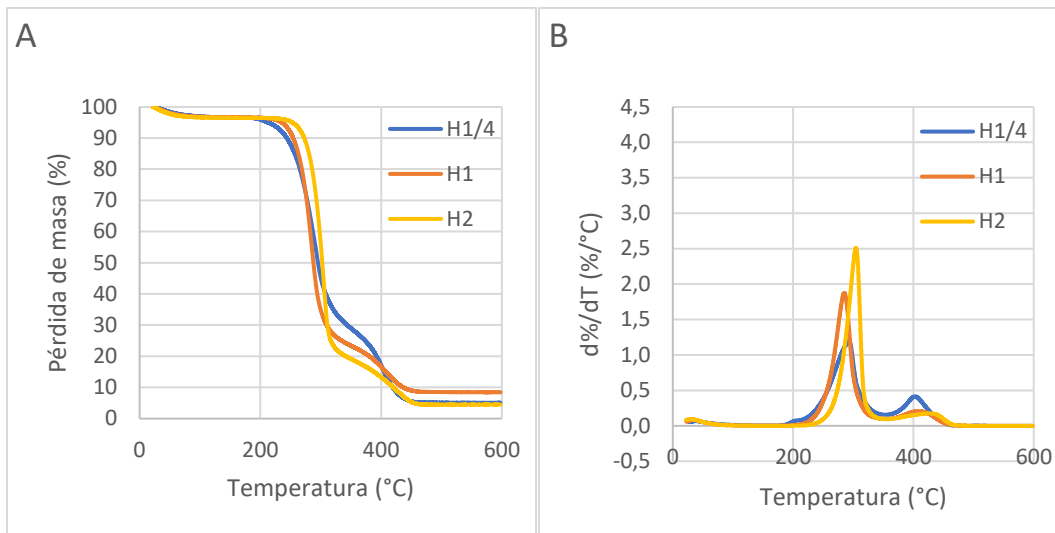


Figura 15: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) en A y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material modificadas como membrana a una concentración final de 1 mg/ml.

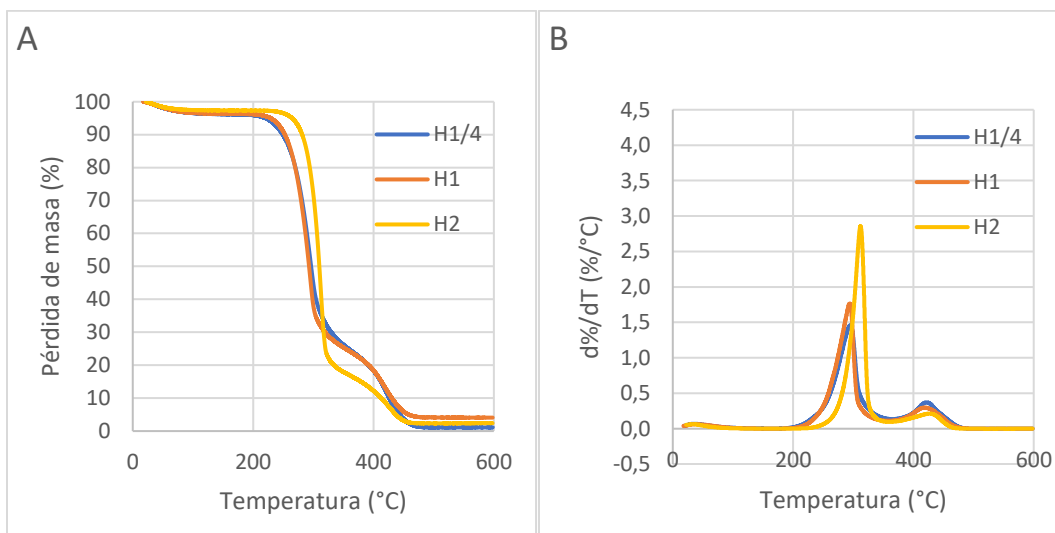


Figura 16: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) en A y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material modificadas con una concentración final de EDC de 5 mg/ml en suspensión.

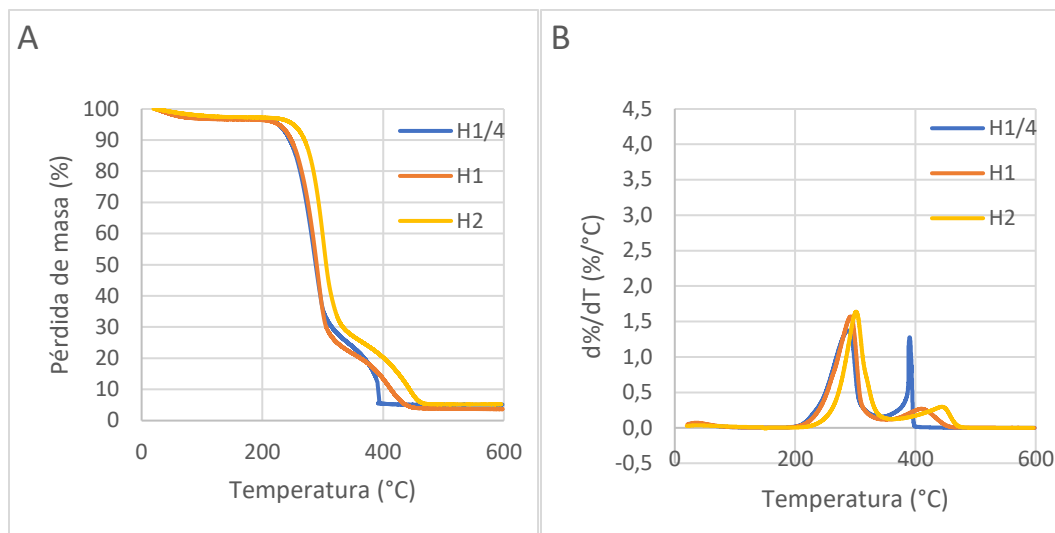


Figura 17: Curvas típicas de análisis termogravimétrico (TGA) en A y primera derivada de la pérdida de masa (DTGA) para las muestras de material modificadas como membrana a una concentración final de 5 mg/ml.

Se observa en las curvas de degradación térmica obtenida, para todos los materiales y concentraciones de agente entrecruzante (Figura 11, Figura 12, Figura 13, Figura 14, Figura 15, Figura 16 y Figura 17), que todas presentan un comportamiento similar, donde hasta alcanzar los 200°C la masa de la muestra varía muy poco (<5%). Estando esta variación asociada principalmente a la pérdida de humedad y compuestos volátiles de baja masa molecular^{3,7}. Posterior a esto, cuando las muestras alcanzan una temperatura ~250°C, se produce una rápida pérdida de masa hasta alcanzar un valor de entre 20% y 30% de la masa original de la muestra. Esta segunda pérdida de masa corresponde a la degradación térmica de la celulosa, dejando atrás una mezcla de alquitrán y residuos inorgánicos. Esta última porción comienza a degradarse alrededor de los 300°C notándose un cambio de rapidez en la pérdida de masa, la velocidad máxima en esta porción se alcanza alrededor de los 430°C formando un segundo peak en los gráficos de velocidad de degradación. A diferencia de estudios previos con materiales similares, es posible degradar esta porción debido a la presencia de O_2 en el gas utilizado, en un ambiente inerte la masa de este material tiende a estabilizarse a partir de los 360°C rondando el 36% de la masa original³, mientras que en los resultados obtenidos la masa tiende a estabilizarse alrededor de los 470°C conservando este valor hasta los 600°C siendo el remanente residual menor al 10% de la masa original en todos los casos.

Se esperaba que la formación de nuevos enlaces covalentes en la superficie de las fibrillas de celulosa aumentara la estabilidad térmica, siendo este aumento más notorio en las muestras con mayor presencia de proteínas en la superficie tratadas con mayor concentración del agente entrecruzante, sin embargo, luego de la modificación química a los materiales $H_{1/4}$ y H_1 , estos materiales solo obtuvieron valores comparables al material sin modificar. Es el material H_2 , aquel en que no fue posible detectar la presencia de proteínas, el que presenta los valores más altos en las pruebas de estabilidad térmica. Es posible que la ausencia de proteínas en la superficie de las fibrillas de celulosa haya aumentado los valores obtenidos en los ensayos termogravimétricos debido a que permitió una interacción más íntima entre las fibrillas de celulosa permitiendo la formación de más puentes de hidrógeno entre las cadenas de celulosa^{10,11,16}.

4.3.6. Análisis superficial de las membranas

La superficie de las membranas fue analizada por medio de microscopía electrónica, realizándose observaciones a una magnificación x10.000, x20.000 y x40.000 para cada uno de los tres materiales celulósicos estudiados sin modificar ($H_{1/4}$, H_1 y H_2). Además, se observó la superficie de las membranas de material entrecruzado en suspensión y como membrana a una concentración de EDC de 5mg/ml, para los tres materiales celulósicos estudiados.

A una magnificación de X10.000 (Ilustración 8, Ilustración 11 y Ilustración 14) se puede observar que las membranas obtenidas están formadas por fibras depositadas en direcciones aleatorias, tanto para el material sin entrecruzar como para ambas membranas de material entrecruzado químicamente. Es posible observar para el material $H_{1/4}$ y H_1 , tanto para la membrana de material entrecruzado en suspensión como para aquella entrecruzada como membrana, la formación de fibras con un mayor ancho, las cuales están compuestas por fibras más delgadas unidas entre sí. Si bien la celulosa se organiza naturalmente en esta forma jerárquica¹¹ la menor presencia de estas en la celulosa sin modificar apunta a que esto puede haber sido causado por la modificación química a la que se sometió a estos materiales. Esto se hace más evidente a mayor magnificación (Ilustración 9, Ilustración 10, Ilustración 12 y Ilustración 13), donde puede observarse que la membrana de material sin modificar presenta en su mayoría fibras delgadas independientes mientras que las fibras del material modificado son más gruesas, formadas por fibrillas más delgadas aglomeradas.

Se observa en las imágenes a distintas magnificaciones la presencia de partículas de distintos tamaños, ubicadas sobre las fibras o envueltas por estas. El análisis de estas partículas apunta a que estas corresponden en su mayoría a sustancias inorgánicas compuestas principalmente de silicio o metales como hierro, níquel o titanio, los cuales se asocian a contaminantes capturados por el animal en vida e incorporados a la peña durante su formación.

No se observa la aparición de estructuras ordenadas luego del proceso de entrecruzamiento químico, ni la formación de poros de un tamaño específico. Como se observa en la Ilustración 9 y Ilustración 11, las fibras de celulosa se encuentran más compactadas en las imágenes B y C comparadas con la imagen A, esto podría dificultar la difusión del agua al interior de la membrana.

A diferencia de los dos materiales estudiados previamente, el material H_2 presenta un similar comportamiento de las fibrillas tanto para las membranas sin modificar como para aquellas a las que se aplicó el tratamiento de entrecruzamiento. A una magnificación de x10.000 es posible observar un gran número de fibrillas delgadas individuales y al aumentar la magnificación no es evidente una diferencia en la distribución de anchos de las fibrillas observadas. Esto podría indicar que la reacción de entrecruzamiento es menos efectiva en este material debido a la ausencia de grupos amino presentes en la superficie de las fibrillas, dificultando la formación de fibrillas más gruesas en el material.

Al igual que en los dos materiales anteriores se observa la presencia de partículas contaminantes de distintos tamaños presentes entre las fibras que componen la membrana. Siendo estas partículas las responsables de la masa residual observada en el análisis termogravimétrico.

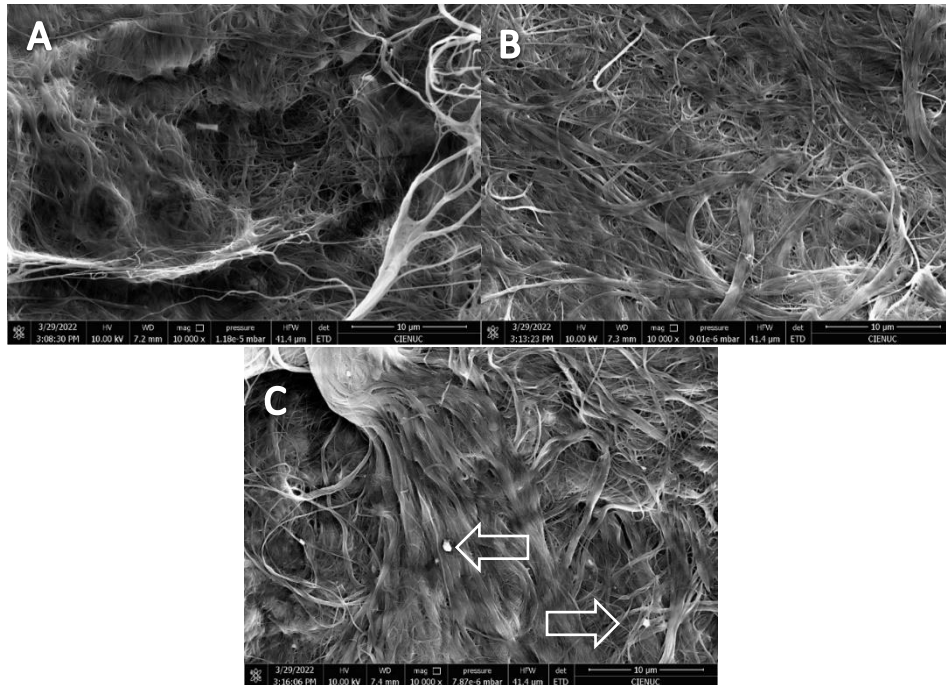


Ilustración 8: Material $H_{1/4}$, magnificado $\times 10.000$. La imagen A muestra el material sin modificación química, mientras B y C corresponden al material $H_{1/4}$ entrecruzado usando 5mg/ml de EDC en suspensión y como membrana, respectivamente. En C. se pueden observar contaminantes inorgánicos entre las fibras de celulosa.

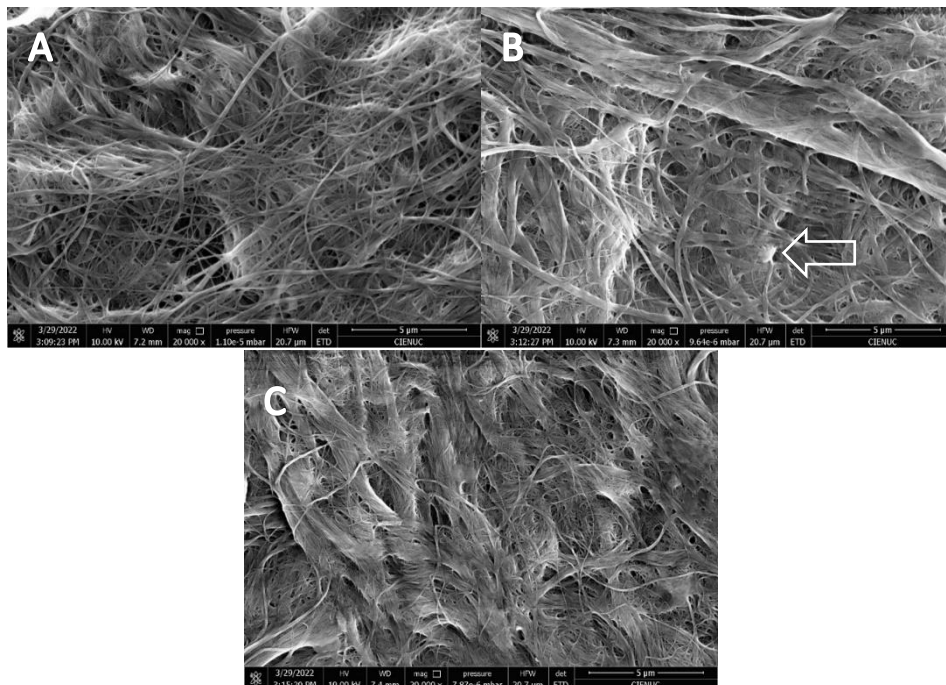


Ilustración 9: Material $H_{1/4}$, magnificado $\times 20.000$. La imagen A muestra el material sin modificación química, mientras B y C corresponden al material $H_{1/4}$ entrecruzado usando 5mg/ml de EDC en suspensión y como membrana, respectivamente. Las flechas blancas indican la presencia de contaminantes en las fibras de celulosa.

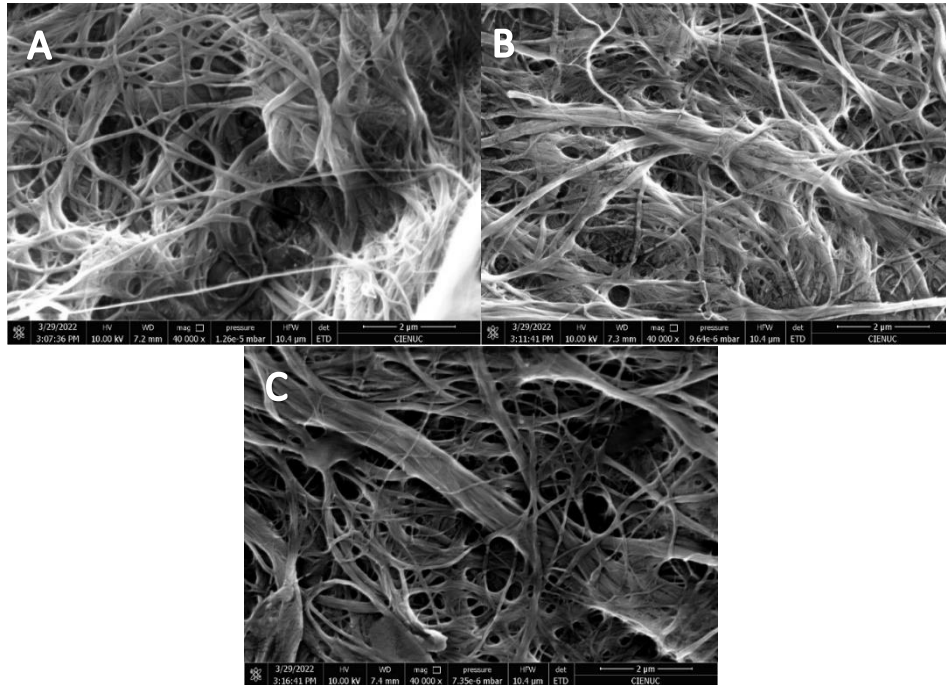


Ilustración 10: Material $H_{1/4}$ magnificado $\times 40.000$. La imagen A muestra el material sin modificación química, mientras B y C corresponden al material $H_{1/4}$ entrecruzado usando 5mg/ml de EDC en suspensión y como membrana, respectivamente.

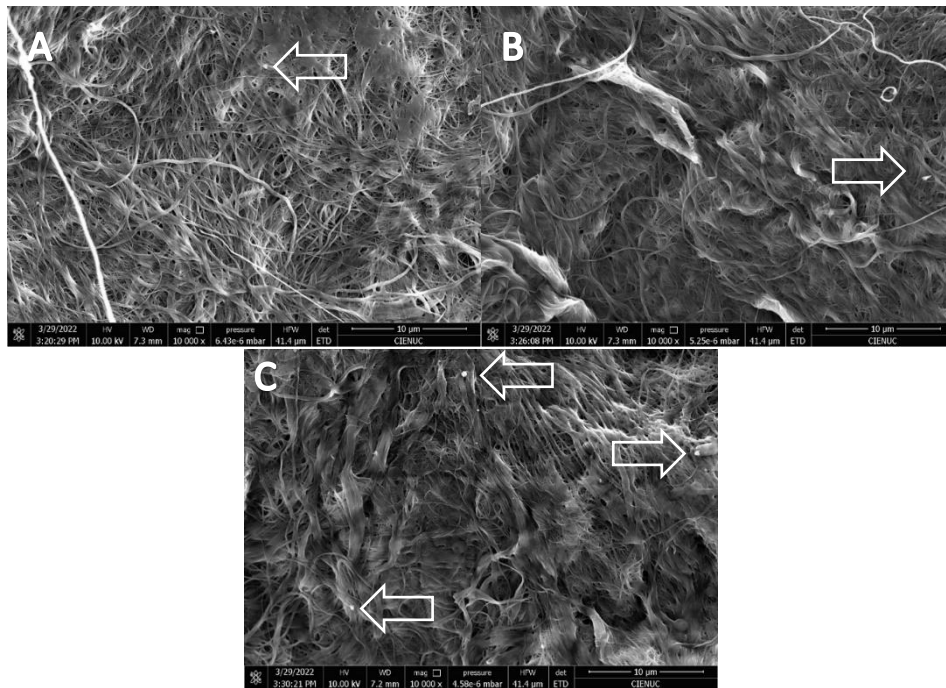


Ilustración 11: Material H_1 magnificado $\times 10.000$. La imagen A muestra el material sin modificación química, mientras B y C corresponden al material $H_{1/4}$ entrecruzado usando 5mg/ml de EDC en suspensión y como membrana, respectivamente. Se observa en las imágenes la presencia de partículas de contaminantes inorgánicos entre las fibras de celulosa.

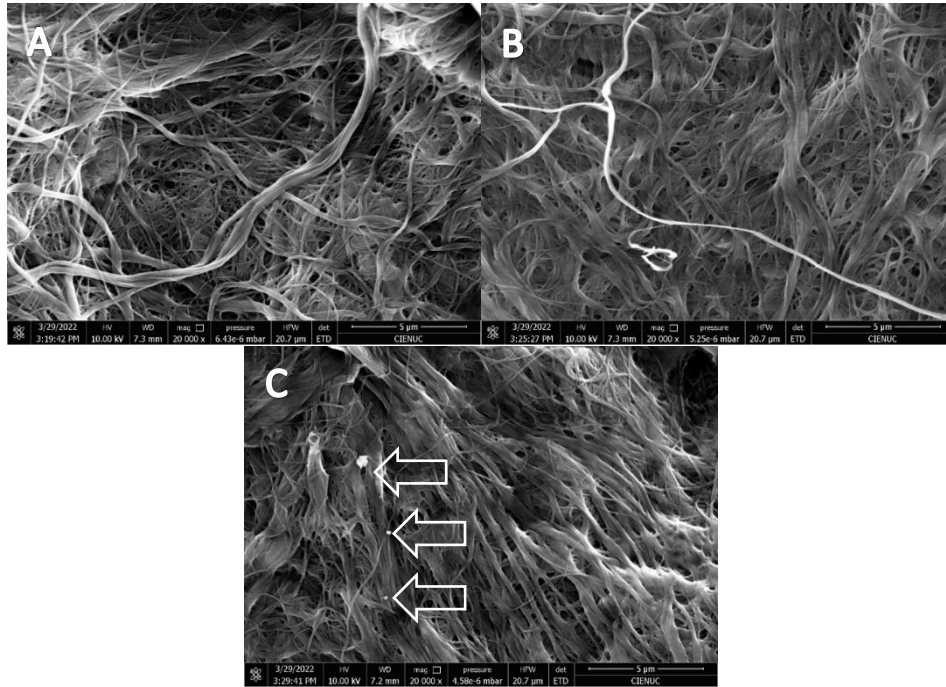


Ilustración 12: Material H₁ magnificado x20.000. La imagen A muestra el material sin modificación química, mientras B y C corresponden al material H₁ entrecruzado usando 5mg/ml de EDC en suspensión y como membrana, respectivamente. Se puede observar en C la presencia de partículas contaminantes entre las fibras de celulosa.

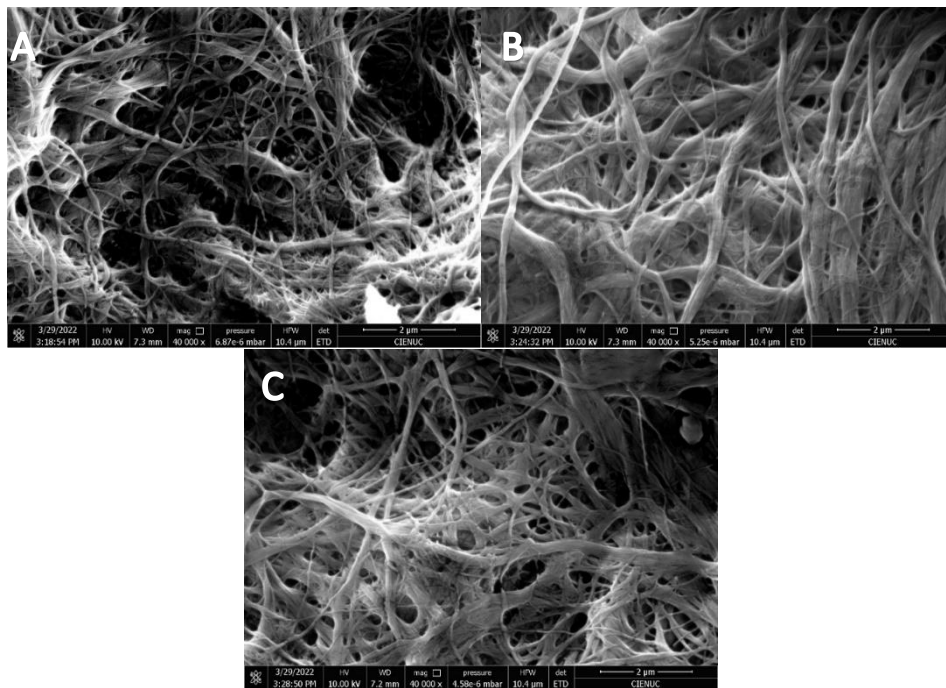


Ilustración 13: Material H₁ magnificado x40.000. La imagen A muestra el material sin modificación química, mientras B y C corresponden al material H₁ entrecruzado usando 5mg/ml de EDC en suspensión y como membrana, respectivamente.

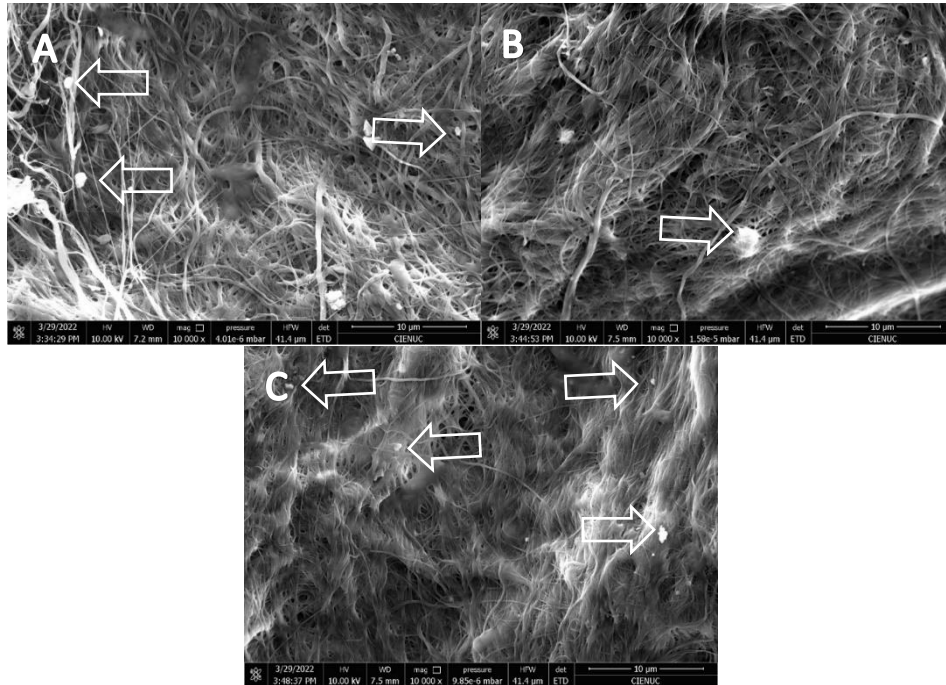


Ilustración 14: Material H_2 magnificado $\times 10.000$. La imagen A muestra el material sin modificación química, mientras B y C corresponden al material H_2 entrecruzado usando 5mg/ml de EDC en suspensión y como membrana, respectivamente. Es posible observar la presencia de partículas inorgánicas entre las fibras de celulosa.

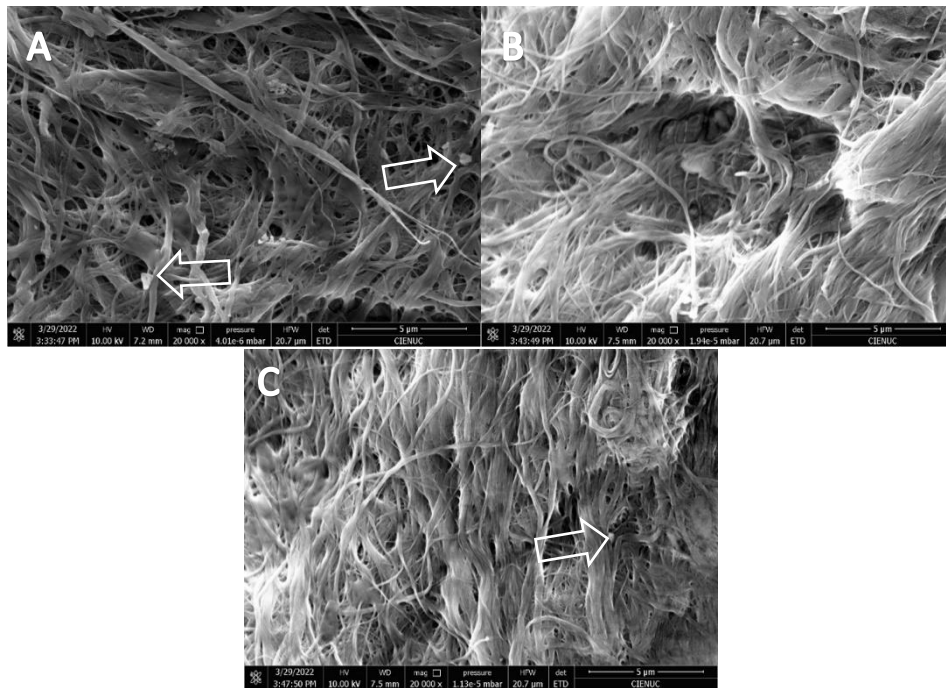


Ilustración 15: Material H_2 magnificado $\times 20.000$. La imagen A muestra el material sin modificación química, mientras B y C corresponden al material H_2 entrecruzado usando 5mg/ml de EDC en suspensión y como membrana, respectivamente. Se observa la presencia de partículas contaminantes entre las fibras de celulosa.

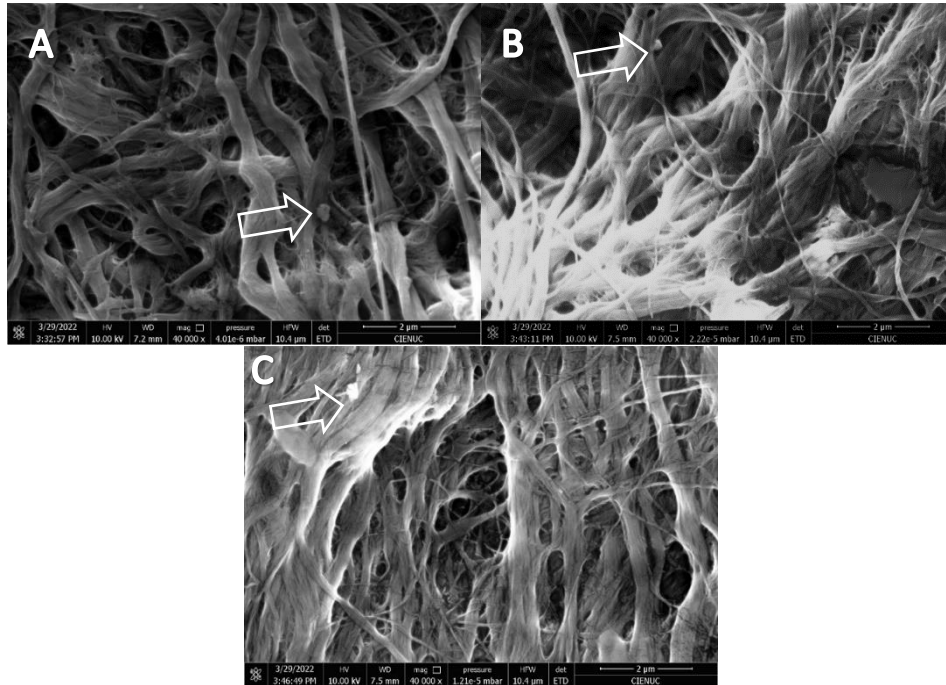


Ilustración 16: Material H_2 magnificado $\times 40.000$. La imagen A muestra el material sin modificación química, mientras B y C corresponden al material H_2 entrecruzado usando 5mg/ml de EDC en suspensión y como membrana, respectivamente. Se observa entre las fibras de celulosa la presencia de contaminantes inorgánicos.

Los anchos de las fibrillas presentes en las imágenes magnificadas $\times 40.000$ para los materiales celulósicos $H_{1/4}$, H_1 y H_2 sin modificar y modificados con 5 mg/ml de EDC, utilizando las dos metodologías, fueron estudiados utilizando el software ImageJ versión 1,53k. La imagen fue dividida en cuatro cuadrantes y en cada uno de estos se midió el ancho de 25 fibrillas para un total de 100 mediciones. La distribución de los anchos para cada imagen se presenta en las Figura 18, Figura 19 y Figura 20.

Se aprecia en estas figuras para el material $H_{1/4}$ y H_1 , la frecuencia de fibrillas con un ancho menor a los 100 nm es similar entre las muestras sin entrecruzar y aquellas con un entrecruzamiento químico, sin embargo, para las muestras entrecruzadas se observa un aumento de la frecuencia de anchos mayores comparado con el material sin entrecruzar. El grosor promedio de las mediciones aumenta desde 0,095 μm a $\sim 0,108 \mu\text{m}$ para $H_{1/4}$ y de 0,075 μm a 0,103 μm para H_1 . No es posible detectar este comportamiento para las muestras del material H_2 , donde se observa una distribución similar entre la muestra sin modificar con aquellas sometidas al tratamiento de entrecruzamiento químico.

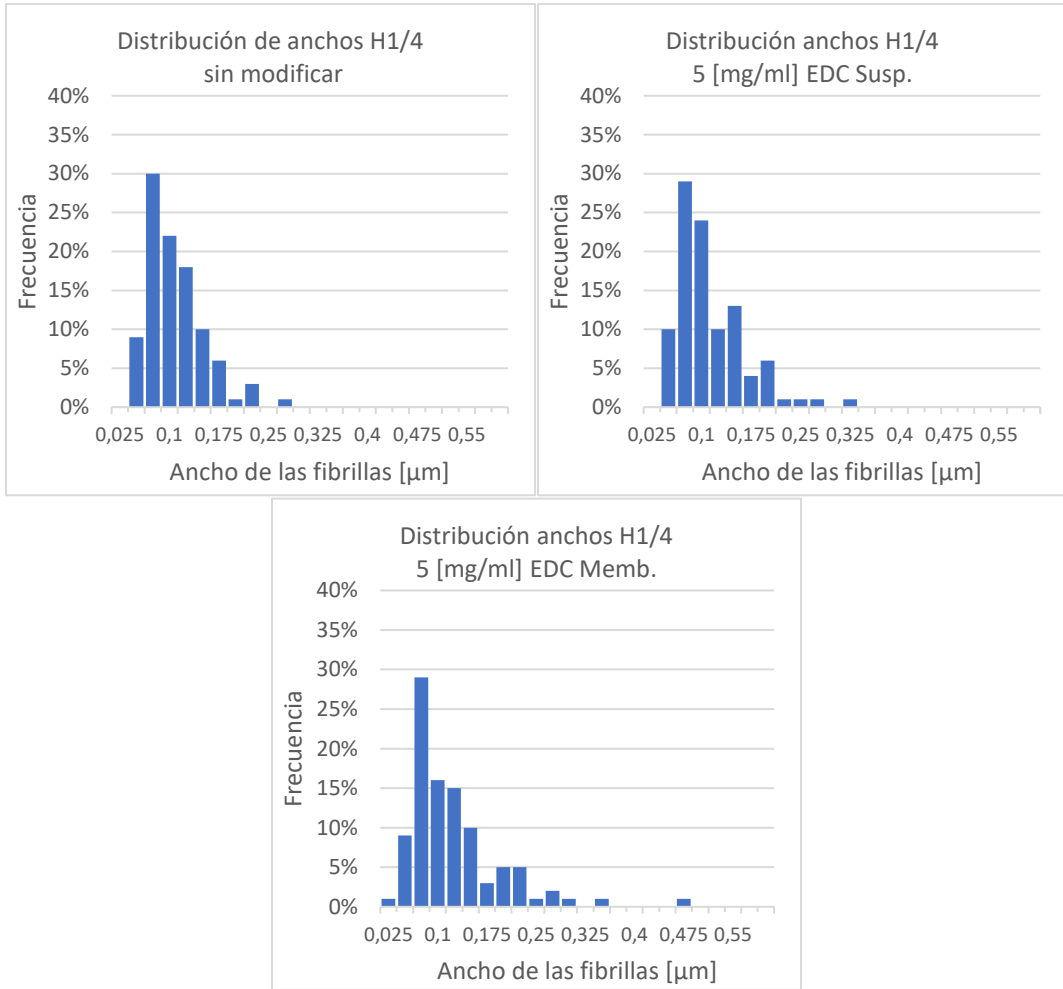


Figura 18: Distribución de ancho de las fibrillas en el material celulósico H_{1/4} sin modificar y modificado con concentración final 5 mg/ml de EDC para imágenes obtenidas a una magnificación de x40.000

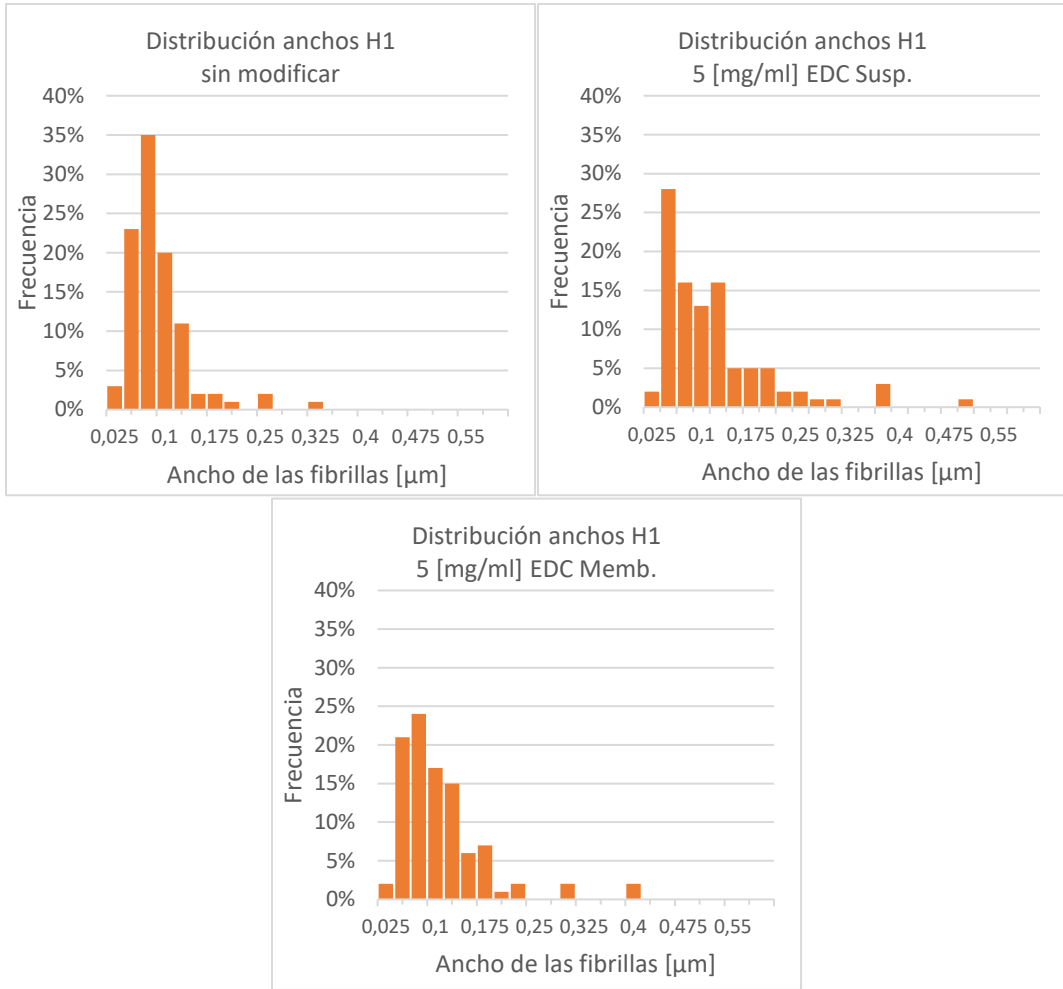


Figura 19: Distribución de ancho de las fibrillas en el material celulósico H₁ sin modificar y modificado con concentración final 5 mg/ml de EDC para imágenes obtenidas a una magnificación de x40.000

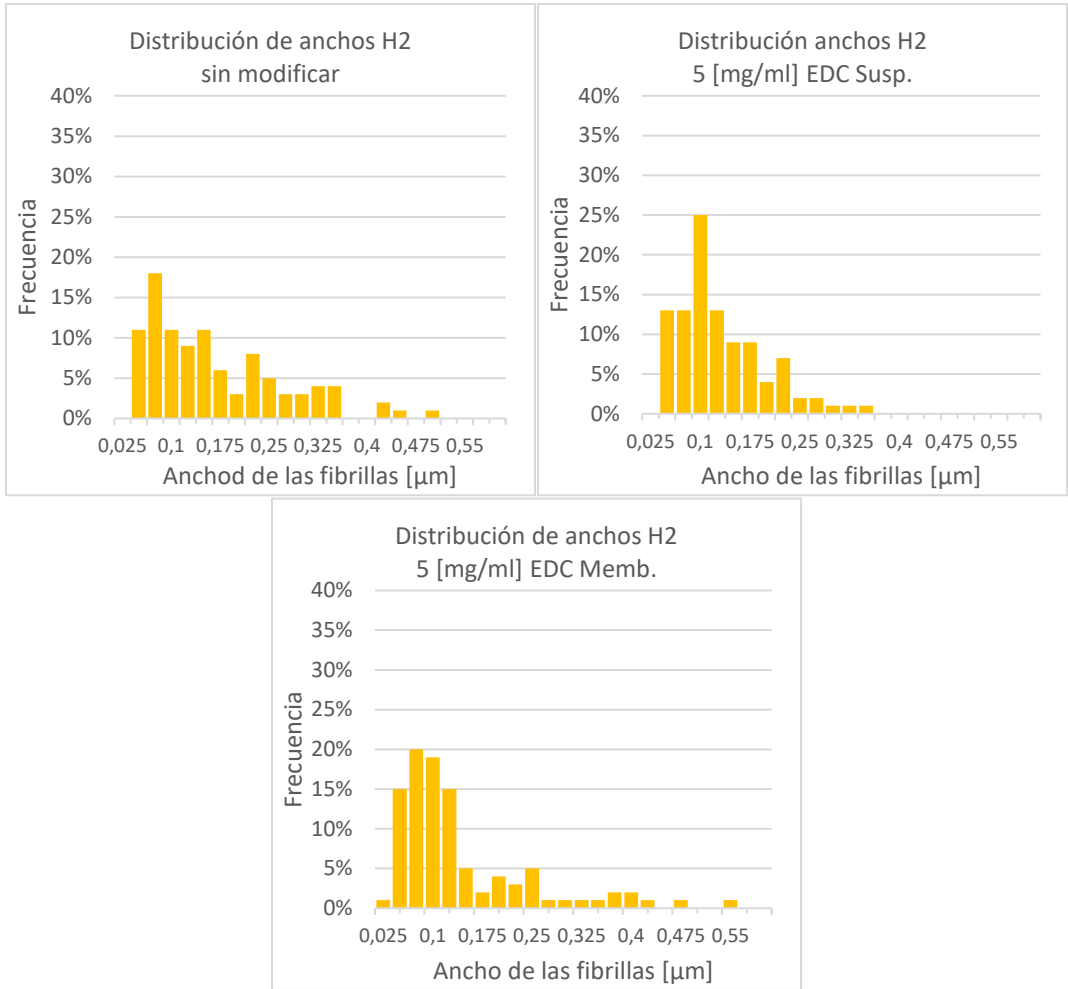


Figura 20: Distribución de ancho de las fibrillas en el material celulósico H₂ sin modificar y modificado con concentración final 5 mg/ml de EDC para imágenes obtenidas a una magnificación de x40.000

4.4. Estudio de hinchamiento

Estudios de hinchamiento fueron realizados en los materiales hidrolizados $H_{1/4}$, H_1 y H_2 entrecruzados a distintas concentraciones de EDC y NHS con el fin de determinar el porcentaje de hinchamiento alcanzado por estos luego de 72 horas sumergidos en agua destilada. Los experimentos fueron realizados en triplicado tanto para las muestras entrecruzadas en suspensión como para aquellas entrecruzadas como membrana.

Las Figura 21, Figura 22 y Figura 23 muestran los resultados comparativos entre la prueba de hinchamiento para los materiales $H_{1/4}$, H_1 y H_2 entrecruzados como suspensión y sus contrapartes entrecruzadas como membrana. La principal diferencia encontrada para las dos metodologías estudiadas consiste en que los materiales entrecruzados como membrana tienden a absorber una menor cantidad de agua por gramo de material seco para cada concentración estudiada. Este fenómeno puede deberse a cambios en la estructura o la formación de estructuras ordenadas que dificultan el ingreso y/o la retención del agua al interior de las membranas²⁰ debido a la formación de los nuevos enlaces entre las microfibrillas formados entre los grupos amina y ácido carboxilo de la superficie. Además, se observa que para la mayoría de los casos el material entrecruzado como membrana tiene una clara tendencia en la que una mayor concentración del agente entrecruzante, al momento de llevar a cabo la reacción, resulta en una menor absorción de agua, dándole un claro orden a las curvas. Mientras que, en aquellos entrecruzados en suspensión, las curvas no muestran un orden claro en base a la concentración usada durante la reacción de entrecruzamiento.

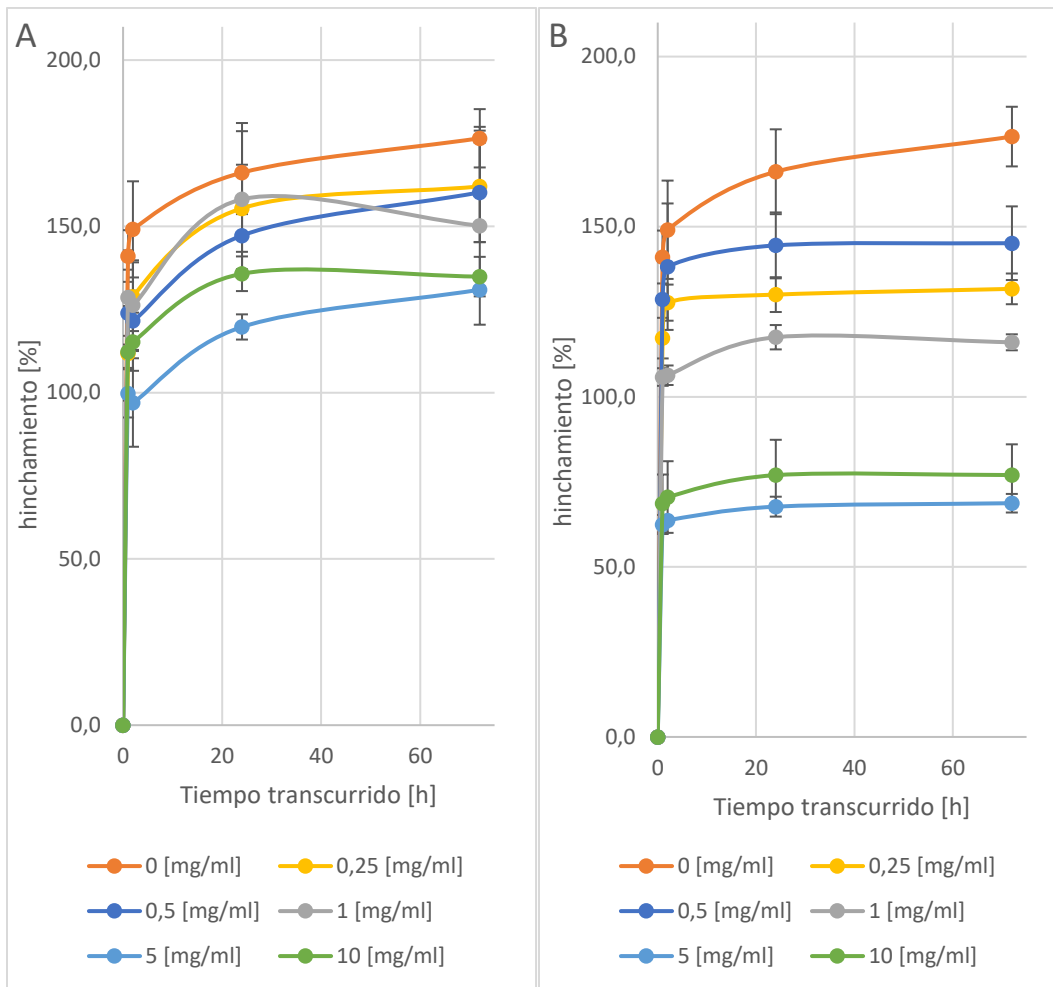


Figura 21: Resultados prueba de hinchamiento del material $H_{1/4}$ a distintas concentraciones de EDC. La figura A muestra los resultados obtenidos del material modificado en suspensión, mientras que B muestra los resultados del material modificado como membrana.

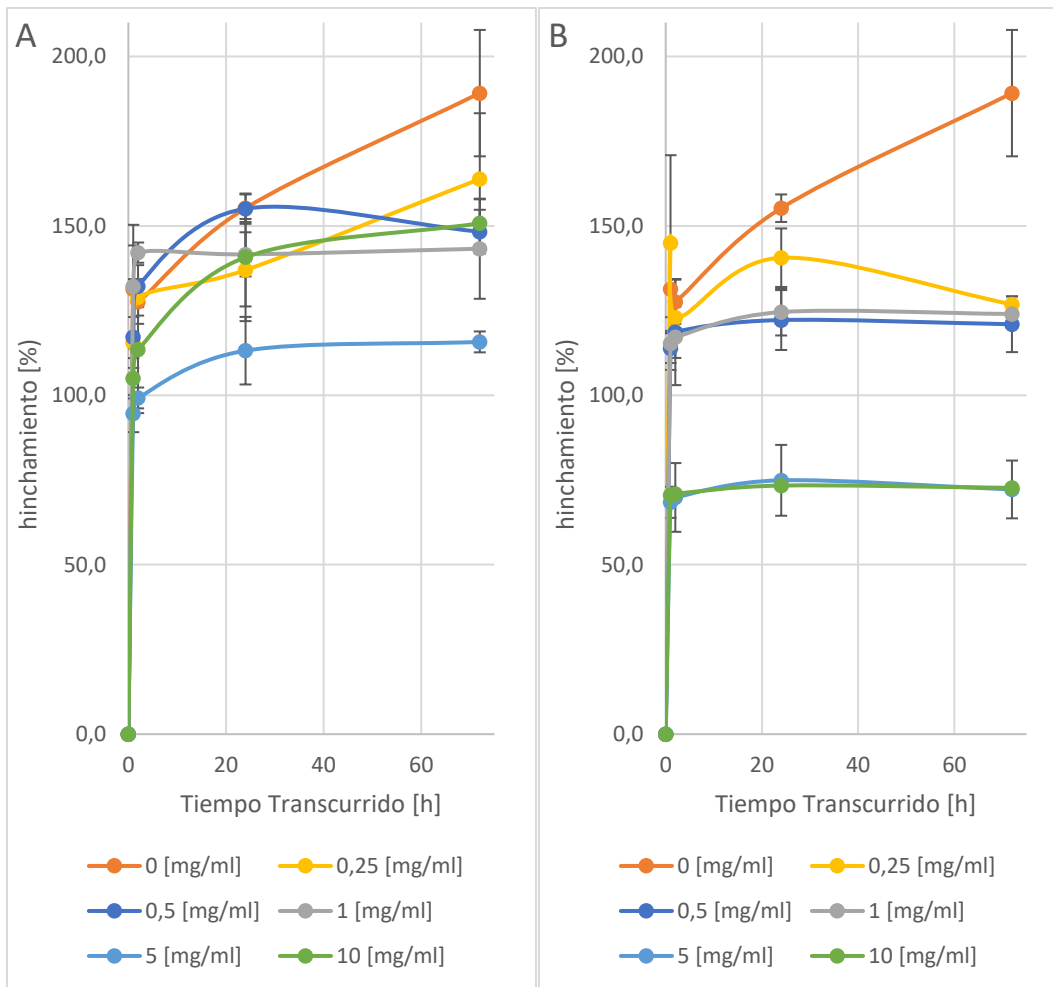


Figura 22: Resultados prueba de hinchamiento del material H_1 a distintas concentraciones de EDC. La figura A muestra los resultados obtenidos del material modificado en suspensión, mientras que B muestra los resultados del material modificado como membrana.

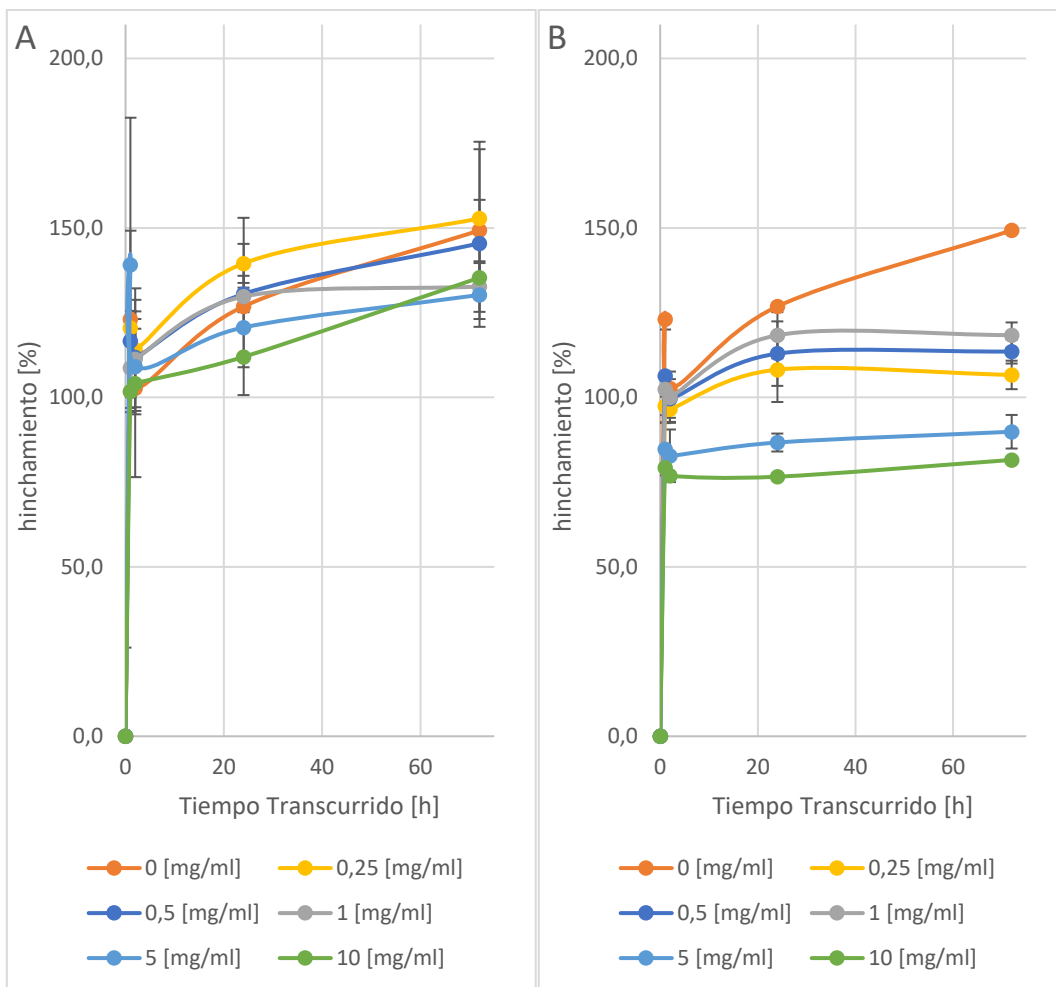


Figura 23: Resultados prueba de hinchamiento del material H_2 a distintas concentraciones de EDC. La figura A muestra los resultados obtenidos del material modificado en suspensión, mientras que B muestra los resultados del material modificado como membrana.

En la Figura 24 se comparan los resultados obtenidos por material celulósico hidrolizado para cada concentración estudiada luego de 72 horas. Para los tres materiales celulósicos hidrolizados estudiados se observa que los porcentajes alcanzados por las muestras entrecruzadas como membrana tienen un menor valor que su contraparte entrecruzada en suspensión para todas las concentraciones de agente entrecruzante estudiada.

En la Figura 24A se muestra los resultados del material $H_{1/4}$, se observa que el porcentaje de hinchamiento se reduce desde un 166% en el material sin modificar hasta 130% a una concentración de EDC de 5mg/ml al entrecruzar en suspensión y a un 69% al entrecruzar en la membrana obtenida del mismo material. Los resultados obtenidos a 10mg/ml presentan un ligero aumento con respecto a la concentración anterior obteniéndose 135% y 77% respectivamente.

Para el material H_1 se muestran los resultados en la Figura 24B. El material sin entrecruzar presenta un porcentaje de hinchamiento de 186%. Las muestras entrecruzadas en suspensión alcanzan un valor mínimo de 116% a 5mg/ml de EDC mientras que las muestras entrecruzadas como membrana alcanzan un valor mínimo de 72% a la misma concentración. En este caso los resultados obtenidos a 10 mg/ml difieren en su comportamiento entre las dos metodologías observándose que para el material entrecruzado como membrana se obtiene una mínima variación con respecto a la concentración anterior con un valor obtenido de 73%, mientras que el material modificado en suspensión presenta un aumento considerable en su porcentaje de hinchamiento obteniéndose un valor promedio de 150%.

El comportamiento del material H_2 al ser modificado en suspensión presenta un comportamiento distinto al resto de las muestras estudiadas ya que, si bien H_2 es el material con menor porcentaje de hinchamiento sin modificar con un promedio de 137%, prácticamente no reduce su porcentaje de hinchamiento al aumentar la concentración con la que es tratado llegando a un mínimo de solo 130% a 5mg/ml de EDC. Por otra parte, el comportamiento del material modificado como membrana es similar al de $H_{1/4}$ y H_1 reduciéndose el porcentaje de hinchamiento a un mínimo de 82% a una concentración de EDC de 10mg/ml.

De los resultados anteriores se desprende que la combinación de hidrólisis alcalina y entrecruzamiento químico, mediado por EDC y NHS, permite controlar la cantidad de agua que es absorbida por membranas obtenidas de celulosa naturalmente funcionalizada proveniente de la peña de piure, en un rango entre ~70% y 190% del peso seco de la membrana utilizada. Además, se detectó que aumentar la concentración del agente entrecruzante más allá de los 5 mg/ml no genera una mayor reducción en la absorción de agua pudiendo hallarse este límite incluso a menores concentraciones en el rango de 1 a 5 mg/ml debido a la conversión total de los grupos amina y carboxilo disponibles para la reacción de entrecruzamiento²⁰. El aumento del tiempo de hidrólisis también parece tener efectos decrecientes en el rango de absorción de agua, siendo el material intermedio H_1 el que permite un mayor rango de valores al variar la concentración utilizada durante el proceso de entrecruzamiento.

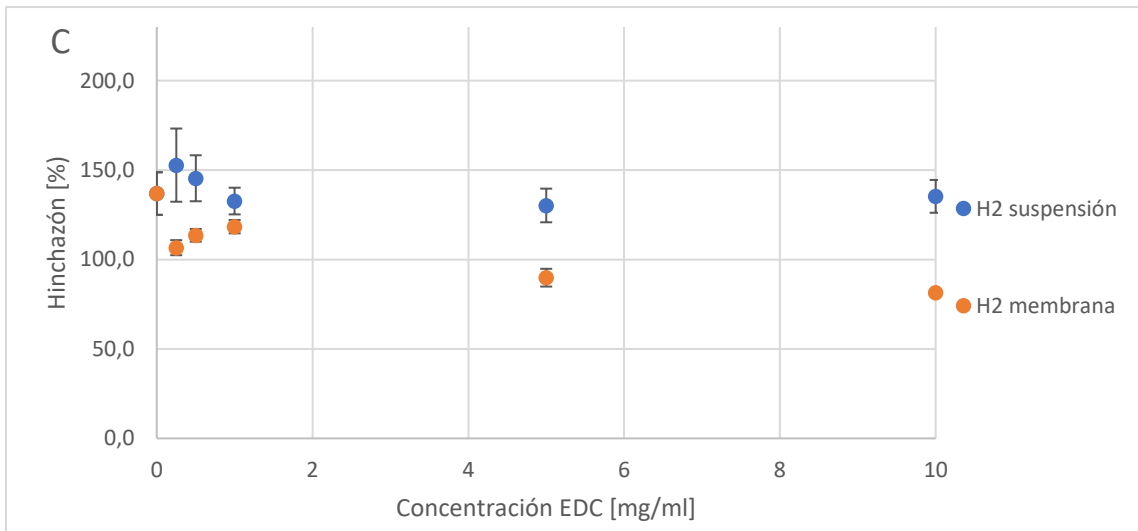
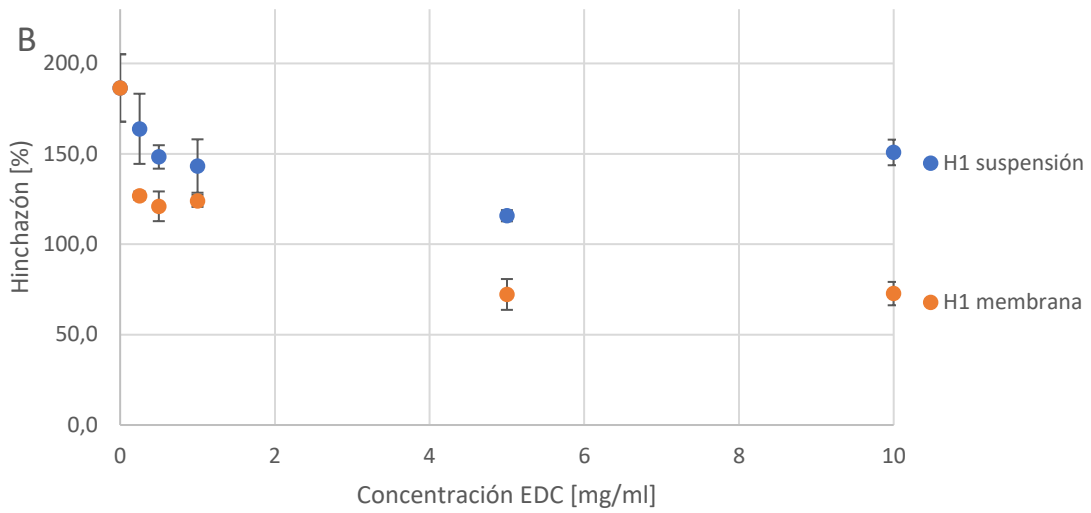
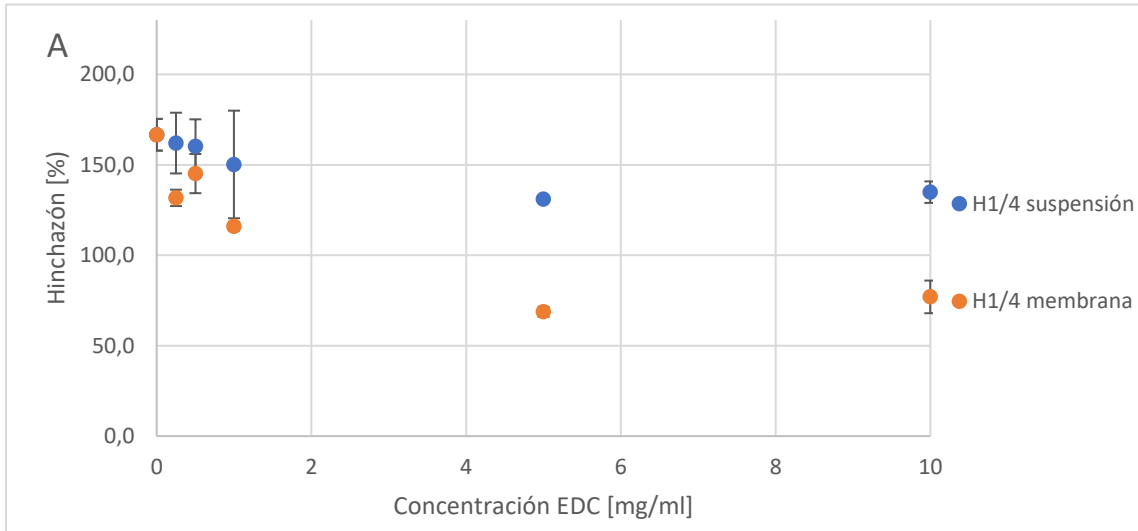


Figura 24: Porcentaje de hinchamiento luego de 72 horas. En A se muestran el porcentaje de hinchamiento promedio y junto a su desviación estándar para el material $H_{1/4}$ entrecruzado en suspensión y como membrana, mientras que B y C muestran los resultados para H_1 y H_2 respectivamente.

5. Conclusiones

En el presente estudio se evaluaron los efectos del entrecruzamiento químico mediado por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y N-Hidroxisuccinimida sobre la capacidad de hinchamiento de membranas producidas en base a nanofibrillas de celulosa naturalmente funcionalizada extraída de la túnica de *Pyura chilensis*. Tres materiales de celulosa nanofibrilada $H_{1/4}$, H_1 y H_2 , fueron fabricados por medio de hidrólisis alcalina a distintos tiempos de reacción utilizando el acercamiento *top-down*.

Por medio de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X se determinó la composición elemental de estos materiales y se cuantificó la cantidad de proteínas presentes en cada uno, confirmándose que mayores tiempos de reacción consiguen menor cantidad de proteína en el material sin afectar mayormente la cantidad de otros elementos presentes. Utilizando espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada se estudiaron las interacciones intramoleculares de los materiales fabricados confirmando que el material se encuentra formado principalmente por celulosa y reafirmando la disminución de proteínas presentes por una disminución de la intensidad detectada en la banda asociada a amina I para materiales con mayor tiempo de hidrólisis.

El estudio de cristalinidad realizado a los materiales celulósicos estudiados mostró un aumento del índice de cristalinidad para los materiales $H_{1/4}$ y H_1 modificados químicamente con respecto al mismo material sin modificar, coincidiendo con los resultados de estudios previos en que un mayor valor de este índice coincide con una menor absorción de humedad por parte del material. Mientras que el material H_2 cuyo índice se reduce con respecto al material sin modificar presente una variación menor en cuanto a la cantidad de agua que absorbe el material.

El análisis termogravimétrico no mostró una tendencia clara en el efecto del entrecruzamiento químico y la estabilidad térmica de la muestra, ya que para los materiales $H_{1/4}$ y H_2 el material sin modificar fue más resistente a la degradación térmica comparado con aquellos entrecruzados, a diferencia del material H_1 en el cual los materiales entrecruzados comenzaron a degradarse a mayor temperatura que el material sin modificar. Sin embargo, se detectó que para los materiales modificados químicamente la estabilidad térmica es mayor en aquellos entrecruzados en suspensión que aquellos entrecruzados como membrana.

La titulación conductimétrica permitió validar el efecto del entrecruzamiento químico sobre las nanofibrillas de celulosa por reducción de los grupos ácidos detectados, pero no fue posible determinar el grado de entrecruzamiento obtenido para cada concentración del agente entrecruzante utilizado, debido a las limitantes del método.

Las dos metodologías utilizadas durante la etapa de entrecruzamiento permiten obtener material celulósico modificado químicamente por la formación de enlaces tipo amida entre los grupos carboxilo y amina presentes en la superficie, comprobado por la disminución de los grupos ácidos detectados por titulación conductimétrica para las muestras modificadas como suspensión y por el aumento de la intensidad relativa de la banda 1651 cm^{-1} para aquellas modificadas como membrana. Los estudios de hinchamiento de las membranas obtenidas muestran que el uso de hidrólisis alcalina y entrecruzamiento mediado por EDC y NHS permiten controlar el grado de hinchamiento de la celulosa extraída de piure en un rango entre 70% y 190% siendo H_1 el material con el mayor rango valores.

6. Bibliografía

- (1) Tayeb, A. H.; Amini, E.; Ghasemi, S.; Tajvidi, M. Cellulose Nanomaterials-Binding Properties and Applications: A Review. *Molecules* **2018**, *23* (10), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules23102684>.
- (2) Zhao, Y.; Li, J. Excellent Chemical and Material Cellulose from Tunicates: Diversity in Cellulose Production Yield and Chemical and Morphological Structures from Different Tunicate Species. *Cellulose* **2014**, *21* (5), 3427–3441. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0348-6>.
- (3) Quero, F.; Quintro, A.; Orellana, N.; Opazo, G.; Mautner, A.; Jaque, N.; Valdebenito, F.; Flores, M.; Acevedo, C. Production of Biocompatible Protein Functionalized Cellulose Membranes by a Top-Down Approach. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5* (11), 5968–5978. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01015>.
- (4) Zhang, T.; Zuo, T.; Hu, D.; Chang, C. Dual Physically Cross-Linked Nanocomposite Hydrogels Reinforced by Tunicate Cellulose Nanocrystals with High Toughness and Good Self-Recoverability. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (28), 24230–24237. <https://doi.org/10.1021/acscami.7b06219>.
- (5) Cao, L.; Huang, J.; Chen, Y. Dual Cross-Linked Epoxidized Natural Rubber Reinforced by Tunicate Cellulose Nanocrystals with Improved Strength and Extensibility. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6* (11), 14802–14811. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03331>.
- (6) Pylypchuk, I.; Selyanchyn, R.; Budnyak, T.; Zhao, Y.; Lindström, M.; Fujikawa, S.; Sevastyanova, O. “Artificial Wood” Lignocellulosic Membranes: Influence of Kraft Lignin on the Properties and Gas Transport in Tunicate-Based Nanocellulose Composites. *Membranes (Basel)*. **2021**, *11* (3). <https://doi.org/10.3390/membranes11030204>.
- (7) Quero, F.; Opazo, G.; Zhao, Y.; Feschotte-Parazon, A.; Fernandez, J.; Quintro, A.; Flores, M. Top-down Approach to Produce Protein Functionalized and Highly Thermally Stable Cellulose Fibrils. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (8), 3549–3559. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00831>.
- (8) Guo, J.; Uddin, K. M. A.; Mihhels, K.; Fang, W.; Laaksonen, P.; Zhu, J. Y.; Rojas, O. J. Contribution of Residual Proteins to the Thermomechanical Performance of Cellulosic Nanofibrils Isolated from Green Macroalgae. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5* (8), 6978–6985. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01169>.
- (9) Sernapesca. Desembarque total por región <http://www.sernapesca.cl/informes/estadisticas>.
- (10) Moon, R. J.; Martini, A.; Nairn, J.; Simonsen, J.; Youngblood, J. *Cellulose Nanomaterials Review: Structure, Properties and Nanocomposites*; 2011; Vol. 40. <https://doi.org/10.1039/c0cs00108b>.
- (11) Habibi, Y.; Lucia, L. A.; Rojas, O. J. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (6), 3479–3500. <https://doi.org/10.1021/cr900339w>.
- (12) Klemm, D.; Kramer, F.; Moritz, S.; Lindström, T.; Ankerfors, M.; Gray, D.; Dorris, A. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angew. Chemie - Int. Ed.*

- 2011**, 50 (24), 5438–5466. <https://doi.org/10.1002/anie.201001273>.
- (13) Ribi, E. Submicroscopic Structure of Fibres and Their Formation. *Nature* **1951**, 168 (4286), 1082–1083. <https://doi.org/10.1038/1681082a0>.
- (14) Rånby, B. G. III. Fibrous Macromolecular Systems. Cellulose and Muscle. The Colloidal Properties of Cellulose Micelles. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 11 (111), 158–164. <https://doi.org/10.1039/DF9511100158>.
- (15) Rånby, B. G.; Banderet, A.; Sillén, L. G. Aqueous Colloidal Solutions of Cellulose Micelles. *Acta Chemica Scandinavica*. 1949, pp 649–650. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.03-0649>.
- (16) Siró, I.; Plackett, D. Microfibrillated Cellulose and New Nanocomposite Materials: A Review. *Cellulose* **2010**, 17 (3), 459–494. <https://doi.org/10.1007/s10570-010-9405-y>.
- (17) Abdul Khalil, H. P. S.; Davoudpour, Y.; Islam, M. N.; Mustapha, A.; Sudesh, K.; Dungani, R.; Jawaid, M. Production and Modification of Nanofibrillated Cellulose Using Various Mechanical Processes: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 99, 649–665. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.069>.
- (18) Cao, Y. Applications of Cellulose Nanomaterials in Pharmaceutical Science and Pharmacology. *Express Polym. Lett.* **2018**, 12 (9), 768–780. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2018.66>.
- (19) Yang, H.; Tejado, A.; Alam, N.; Antal, M.; Van De Ven, T. G. M. Films Prepared from Electrosterically Stabilized Nanocrystalline Cellulose. *Langmuir* **2012**, 28 (20), 7834–7842. <https://doi.org/10.1021/la2049663>.
- (20) Yang, C. Enhanced Physicochemical Properties of Collagen by Using. *Bull. Mater. Sci.* **2012**, 35 (5), 913–918.
- (21) Naidu, B. V. K.; Aminabhavi, T. M. Pervaporation Separation of Water/2-Propanol Mixtures by Use of the Blend Membranes of Sodium Alginate and (Hydroxyethyl) Cellulose: Roles of Permeate-Membrane Interactions, Zeolite Filling, and Membrane Swelling. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, 44 (19), 7481–7489. <https://doi.org/10.1021/ie050108t>.
- (22) Hooshmand-Ardakani, A.; Talaei-Khozani, T.; Sadat-Shojai, M.; Bahmanpour, S.; Zarei-Fard, N. In Vitro Characterization of Multilamellar Fibers with Uniaxially Oriented Electrospun Type i Collagen Scaffolds. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2020**, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4084317>.
- (23) Courtenay, J. C.; Filgueiras, J. G.; Deazevedo, E. R.; Jin, Y.; Edler, K. J.; Sharma, R. I.; Scott, J. L. Mechanically Robust Cationic Cellulose Nanofibril 3D Scaffolds with Tuneable Biomimetic Porosity for Cell Culture. *J. Mater. Chem. B* **2019**, 7 (1), 53–64. <https://doi.org/10.1039/c8tb02482k>.
- (24) Lavoine, N.; Desloges, I.; Dufresne, A.; Bras, J. Microfibrillated Cellulose - Its Barrier Properties and Applications in Cellulosic Materials: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 90 (2), 735–764. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.026>.
- (25) Chinta, M. L.; Velidandi, A.; Pabbathi, N. P. P.; Dahariya, S.; Parcha, S. R. Assessment of Properties, Applications and Limitations of Scaffolds Based on Cellulose and Its Derivatives for Cartilage Tissue Engineering: A Review. *Int. J. Biol.*

- Macromol.* **2021**, *175*, 495–515. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.196>.
- (26) Heinze, T.; Siebert, M.; Berlin, P.; Koschella, A. Biofunctional Materials Based on Amino Cellulose Derivatives - A Nanobiotechnological Concept. *Macromol. Biosci.* **2016**, *16* (1), 10–42. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500184>.
- (27) Arcot, L. R.; Lundahl, M.; Rojas, O. J.; Laine, J. Asymmetric Cellulose Nanocrystals: Thiolation of Reducing End Groups via NHS–EDC Coupling. *Cellulose* **2014**, *21* (6), 4209–4218. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0426-9>.
- (28) Saito, T.; Kuramae, R.; Wohler, J.; Berglund, L. A.; Isogai, A. An Ultrastrong Nanofibrillar Biomaterial: The Strength of Single Cellulose Nanofibrils Revealed via Sonication-Induced Fragmentation. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (1), 248–253. <https://doi.org/10.1021/bm301674e>.
- (29) Barazzouk, S.; Daneault, C. Amino Acid and Peptide Immobilization on Oxidized Nanocellulose: Spectroscopic Characterization. *Nanomaterials* **2012**, *2* (2), 187–205. <https://doi.org/10.3390/nano2020187>.
- (30) Kalaskar, D. M.; Ulijn, R. V.; Gough, J. E.; Alexander, M. R.; Scurr, D. J.; Sampson, W. W.; Eichhorn, S. J. Characterisation of Amino Acid Modified Cellulose Surfaces Using ToF-SIMS and XPS. *Cellulose* **2010**, *17* (4), 747–756. <https://doi.org/10.1007/s10570-010-9413-y>.
- (31) Kozłowska, J.; Stachowiak, N.; Sionkowska, A. Collagen/Gelatin/Hydroxyethyl Cellulose Composites Containing Microspheres Based on Collagen and Gelatin: Design and Evaluation. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10* (4). <https://doi.org/10.3390/polym10040456>.
- (32) Grabska-Zielińska, S.; Sionkowska, A.; Carvalho, Â.; Monteiro, F. J. Biomaterials with Potential Use in Bone Tissue Regeneration-Collagen/Chitosan/Silk Fibroin Scaffolds Cross-Linked by EDC/NHS. *Materials (Basel)*. **2021**, *14* (5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ma14051105>.
- (33) Wei, J.; Jia, S.; Guan, J.; Ma, C.; Shao, Z. Robust and Highly Sensitive Cellulose Nanofiber-Based Humidity Actuators. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (45), 54417–54427. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c17894>.
- (34) Zhu, Q.; Jin, Y.; Wang, W.; Sun, G.; Wang, D. Bioinspired Smart Moisture Actuators Based on Nanoscale Cellulose Materials and Porous, Hydrophilic EVOH Nanofibrous Membranes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (1), 1440–1448. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b17538>.
- (35) Thermo Fisher. Chemical Reactivity of Crosslinkers and Modification Reagents. *Crosslink. Technol. React. Chem. Appl. Struct. Ref.* **2012**, 3–4.
- (36) Hofmann, S. Auger- and X-Ray Photoelectron Spectroscopy in Materials Science A User-Oriented Guide. 1st ed. 2013. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27381-0>.
- (37) Larkin, P. (Peter J. . Infrared and Raman Spectroscopy Principles and Spectral Interpretation. Elsevier: Amsterdam [Netherlands]; 2011.
- (38) Berthomieu, C.; Hienerwadel, R. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Photosynth. Res.* **2009**, *101* (2–3), 157–170. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>.

- (39) Khan, J. I.; Kennedy, T. J.; Christian, D. R. *Basic Principles of Forensic Chemistry*, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-437-7>.
- (40) Waseda, Y. *X-Ray Diffraction Crystallography Introduction, Examples and Solved Problems*. 1st ed. 2011. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg 2011. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16635-8>.
- (41) Rusli, R. Interfacial Micromechanics of Natural Cellulose Whisker Polymer Nanocomposites Using Raman Spectroscopy. **2011**.
- (42) Wen, C. Y.; Sun, J. Y. Quantitative Determination of the Carboxyl Groups on Individual Nanoparticles by Acid-Base Titrimetry. *ChemistrySelect* **2017**, 2 (33), 10885–10888. <https://doi.org/10.1002/slct.201702242>.
- (43) Kawaguchi, S.; Yekta, A.; Winnik, M. A. Surface Characterization and Dissociation Properties of Carboxylic Acid Core-Shell Latex Particle by Potentiometric and Conductometric Titration. *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, 176 (2), 362–369. <https://doi.org/10.1006/jcis.1995.9956>.
- (44) Okubo, M.; Suzuki, T.; Tsuda, N. Estimation of Distribution State of Carboxyl Groups within Submicron-Sized, Carboxylated Polymer Particle with Isothermal Titration Calorimeter. *Colloid Polym. Sci.* **2006**, 284 (11), 1319–1323. <https://doi.org/10.1007/s00396-006-1480-0>.
- (45) Scandinavian Pulp Paper and Board Testing Committee. SCAN-CM 65-02 Pulp - Total Acidic Group Content. **2002**, No. January.
- (46) Ul-Hamid, A. *A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy*. 1st ed. 2018. Springer International Publishing: Cham 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-98482-7>.
- (47) Sebio-Puñal, T.; Naya, S.; López-Beceiro, J.; Tarrío-Saavedra, J.; Artiaga, R. Thermogravimetric Analysis of Wood, Holocellulose, and Lignin from Five Wood Species. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2012**, 109 (3), 1163–1167. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-2133-1>.
- (48) Masruchin, N.; Park, B. D.; Lee, J. M. Surface Modification of TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibrils for Composites to Give Color Change in Response to PH Level. *Cellulose* **2018**, 25 (12), 7079–7090. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2072-0>.
- (49) Zhuang, C.; Tao, F.; Cui, Y. Eco-Friendly Biorefractory Films of Gelatin and TEMPO-Oxidized Cellulose Ester for Food Packaging Application. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, 97 (10), 3384–3395. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8189>.
- (50) Quero, F.; Nogi, M.; Lee, K. Y.; Poel, G. Vanden; Bismarck, A.; Mantalaris, A.; Yano, H.; Eichhorn, S. J. Cross-Linked Bacterial Cellulose Networks Using Glyoxalization. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, 3 (2), 490–499. <https://doi.org/10.1021/am101065p>.
- (51) Popescu, C. M.; Tibirna, C. M.; Vasile, C. XPS Characterization of Naturally Aged Wood. *Appl. Surf. Sci.* **2009**, 256 (5), 1355–1360. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.08.087>.
- (52) Barazzouk, S.; Daneault, C. Amino Acid and Peptide Immobilization on Oxidized Nanocellulose: Spectroscopic Characterization. *Nanomaterials* **2012**, 2 (2), 187–

205. <https://doi.org/10.3390/nano2020187>.

- (53) Roa, D. F.; Santagapita, P. R.; Buera, M. P.; Tolaba, M. P. Amaranth Milling Strategies and Fraction Characterization by FT-IR. *Food Bioprocess Technol.* **2014**, 7 (3), 711–718. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1050-7>.
- (54) Awa, K.; Shinzawa, H.; Ozaki, Y. An Effect of Cellulose Crystallinity on the Moisture Absorbability of a Pharmaceutical Tablet Studied by Near-Infrared Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **2014**, 68 (6), 625–632. <https://doi.org/10.1366/13-07273>.