



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

**PRODUCCIÓN DE MEMBRANAS DE CELULOSA BACTERIANA CON  
ÁCIDO FERÚLICO PARA SU APLICACIÓN EN MASCARILLAS FACIALES  
ANTIEDAD**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

**PRISCILLA TAMARA ASTORGA AGUIRRE**

PROFESORA GUÍA:  
IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
FRANCK QUERO  
ARACELI OLIVARES MIRALLES

SANTIAGO DE CHILE  
2024

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR  
AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: PRISCILLA TAMARA ASTORGA AGUIRRE  
FECHA: 2024  
PROF. GUÍA: IRENE MARTÍNEZ

## **PRODUCCIÓN DE MEMBRANAS DE CELULOSA BACTERIANA CON ÁCIDO FERÚLICO PARA SU APLICACIÓN EN MASCARILLAS FACIALES ANTIEDAD**

Este documento presenta un trabajo de investigación que se enfoca en la producción de membranas de celulosa bacteriana y la incorporación de ácido ferúlico para su aplicación en mascarillas faciales antiedad.

La celulosa bacteriana es un material producido por bacterias que tiene propiedades como alta pureza, biocompatibilidad, resistencia mecánica y capacidad de retención de agua. Por otro lado, el ácido ferúlico es un compuesto con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y fotoprotectoras. Ambos compuestos tienen potenciales aplicaciones en la industria cosmética.

El objetivo del trabajo es comparar distintas metodologías de lavados de membranas, caracterizar sus propiedades físico-químicas y evaluar la incorporación de ácido ferúlico en las membranas de celulosa bacteriana.

Se realizaron dos lavados a las membranas de celulosa bacteriana, por un lado, utilizando NaOH a 0.1 M, y por otro, agua destilada, ambos a 80°C. El lavado con NaOH produjo membranas transparentes, mientras que el lavado con agua resultó en un producto menos transparente y de tono blanquecino.

Para caracterizar las membranas se realizaron estudios de Microscopía electrónica de barrido (SEM), Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), Difracción de rayos X (DRX), Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX) y Análisis termogravimétrico (TGA). El análisis de DRX mostró similitudes en la estructura cristalina de las membranas, esto pudo deberse al polimorfismo de la celulosa o la cristalización parcial. La TGA reveló diferencias en la estabilidad térmica de las membranas, la membrana lavada con NaOH mostró una descomposición a una temperatura 20°C más alta que el lavado con agua.

Para la incorporación, se aplicaron diferentes tiempos y temperaturas (50°C/35°C, 35 minutos/2 horas) a las soluciones de ácido ferúlico que estarían en contacto con las membranas. Siendo las membrana lavada con NaOH y autoclavada, y la membrana lavada con agua y autoclavada, ambas a una incorporación de 2 horas y 50°C, las que más solución de ácido ferúlico absorbieron.

El estudio utiliza también cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para medir la concentración de ácido ferúlico absorbido, mostrando que las membranas no absorben de manera selectiva el ácido ferúlico, teniendo la misma concentración antes, durante y después de la incorporación.

El estudio revela que el lavado de las membranas con NaOH y agua destilada tienen propiedades similares, no obstante, el lavado con NaOH resulta en una mayor porosidad de la membrana, lo cual puede influir en su capacidad de absorción y retención de soluciones.

Se concluye que la membrana lavada con agua y autoclavada es la mejor opción para la incorporación de ácido ferúlico, mostrando una mayor capacidad de absorción del compuesto.

*A las mujeres y disidencias  
que existen y luchan en este mundo,  
nada quedará impune.*

# Agradecimientos

Sin duda esta sección ha sido la más difícil de hacer. Un viaje tan largo no se puede recorrer sola, y aprendí que las personas que te acompañan en el camino son el verdadero destino.

Primero que todo, agradezco a mi familia; a mi mamita Rosy que ha sido mi apoyo y mi fuerza, la que siempre me ha cuidado sin esperar nada a cambio, a quien le debo la vida aunque no me la haya dado. A mi hermana Millaray, la persona que me ha acompañado en todos mis momentos, mi amiga incondicional y la mejor cómplice. A mi tía Susi que siempre tuvo fe en mí, y me dio una infancia inolvidable. A mis primos, Panchita, Fabi, Facu, Sergito y Gus, por darme tardes de risas y buenos momentos. A mi hermana Marti, por enseñarme a cuidar. A mis hermanos adoptivos Franco y Cheo, a mi Tito y mi mamá, que de alguna u otra forma me enseñaron quien quiero ser.

Gracias a mis amigos, que estuvieron en mis peores momentos, sacándome una sonrisa, escuchándome. Gracias por formar parte de quien soy, por enseñarme a recibir amor y a darlo. Jess, Fer, Cris, Seba, Marcelo, Jael, Joaki, Jo, Pancha, Miler, les tendré siempre en mi corazón.

Gracias a mi compañera de vida, Paola, que me mostró el respeto y el amor, que me apoya incondicionalmente, gracias por su preocupación y dedicación genuina. Gracias por tomar mi mano y avanzar juntas en la vida.

Gracias también a las personas que me encontré casualmente, pero me ayudaron mucho, Martín, Cata. A la tía Patricia, por ser la primera en mostrarme lo que es la amabilidad en un lugar tan hostil.

Por último, gracias a mí, por seguir adelante, por darme una segunda oportunidad, por enseñarme lo que valgo, por llegar aquí a pesar de todo. Gracias a mí por todo el esfuerzo, las caídas y los logros.

# Tabla de Contenido

<b>1. Introducción y Antecedentes</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>3</b>
2.1. Objetivo general . . . . .	3
2.2. Objetivos específicos . . . . .	3
<b>3. Estado del arte</b>	<b>4</b>
3.1. Celulosa bacteriana . . . . .	4
3.1.1. Biosíntesis . . . . .	4
3.1.2. Estructura . . . . .	5
3.1.3. Ventajas y desventajas . . . . .	7
3.1.4. <i>Komagataeibacter xylinus</i> . . . . .	8
3.2. Caracterización de la celulosa . . . . .	8
3.3. Lavados de membranas de celulosa bacteriana . . . . .	10
3.4. Incorporación de componentes bioactivos a las membranas de celulosa bacteriana	10
3.4.1. Aplicación de Taurina . . . . .	10
3.4.2. Aplicación de Propóleo . . . . .	11
3.5. Ácido ferúlico . . . . .	11
<b>4. Metodología</b>	<b>14</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>18</b>
5.1. Evaluación de metodologías de lavados . . . . .	18
5.1.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) . . . . .	19
5.1.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) . . . . .	20
5.1.3. Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX) . . . . .	22
5.1.4. Difracción de rayos X (DRX) . . . . .	24
5.1.5. Análisis termogravimétrico (TGA) . . . . .	26
5.2. Incorporación . . . . .	28
<b>6. Discusión</b>	<b>31</b>
6.1. Metodologías de lavados . . . . .	31
6.1.1. Análisis de características químicas y estructurales de las membranas (FTIR) . . . . .	32
6.1.2. Análisis de la morfología de la superficie de las membranas (SEM-EDX)	34
6.1.3. Análisis de las estructuras cristalinas de las membranas (DRX) . . . . .	36
6.1.4. Análisis de la estabilidad térmica y la influencia de la composición de las membranas (TGA) . . . . .	38

6.2. Análisis de la incorporación de ácido ferúlico a las membranas . . . . .	40
<b>7. Conclusiones</b>	<b>43</b>
<b>8. Recomendaciones</b>	<b>44</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>45</b>
<b>Anexos</b>	<b>48</b>
A. Estado del arte . . . . .	48
A.1. Lavados de membranas . . . . .	48
B. Metodología Lavado con NaOH . . . . .	49
B.1. Metodología Lavado con agua destilada . . . . .	50
C. Metodología Solubilización del ácido ferúlico . . . . .	51
D. Metodología previa a la Incorporación de ácido ferúlico . . . . .	53
E. FTIR . . . . .	53
F. Incorporación . . . . .	57

# Índice de Tablas

3.1.	Solubilidad de ácido ferúlico en diferentes solventes (Shakeel, Salem-Bekhit, Haq, y Siddiqui, 2017) . . . . .	11
4.1.	Metodologías de incorporación . . . . .	16
5.1.	Peso de las membranas pre y post lavado . . . . .	19
5.2.	Resumen TGA de las membranas . . . . .	28
5.3.	Peso de las membranas post prensado con diferentes tipos de lavados. NaOH (+): membrana lavada con NaOH y autoclavada, NaOH (-): membrana lavada con NaOH sin autoclavar, H2O (+): membrana lavada con H2O y autoclavada, H2O (-): membrana lavada con H2O sin autoclavar . . . . .	29
5.4.	Cantidad de solución con ácido ferúlico absorbida y porcentaje de recuperación de masa de cada membrana y cada tipo de incorporación. NaOH (+): membrana lavada con NaOH y autoclavada, NaOH (-): membrana lavada con NaOH sin autoclavar, H2O (+): membrana lavada con H2O y autoclavada, H2O (-): membrana lavada con H2O sin autoclavar. Las celdas rosadas indican el tipo de membrana que tuvo una mayor cantidad de incorporación. Las celdas azules indican el tipo de membrana que recuperó mayor peso con respecto a su peso inicial después de la incorporación. . . . .	29
5.5.	HPLC para cada metodología de lavado de membranas e incorporación de ácido ferúlico . . . . .	30
6.1.	Comparación de diversas características de las membranas obtenidas mediante diferentes condiciones de lavado . . . . .	41
A.1.	Resumen lavados de membranas . . . . .	49
E.1.	Análisis FTIR de membranas . . . . .	55
F.1.	Peso [gramos] de las membranas lavadas después de diferentes tipos de incorporación. NaOH (+): membrana lavada con NaOH y autoclavada, NaOH (-): membrana lavada con NaOH sin autoclavar, H2O (+): membrana lavada con H2O y autoclavada, H2O (-): membrana lavada con H2O sin autoclavar . . . . .	57

# Índice de Ilustraciones

3.1.	Proceso de síntesis de celulosa y su posterior liberación en el medio de cultivo a través de la membrana celular del microorganismo <i>Komagataeibacter xylinum</i> (C., ., y ., 2012) . . . . .	5
3.2.	Estructura molecular básica de la celulosa. Unidad repetitiva de celobiosa, donde el valor de n varía entre 2000 a 14000 unidades (Guinea, 2016) . . . . .	6
3.3.	Enlaces inter-hidrógeno e intra-hidrógeno de la celulosa bacteriana (Guinea, 2016)	6
3.4.	Microfotografía de <i>Komagataeibacter xylinus</i> (Cruz, 2015) . . . . .	8
5.1.	Membrana lavada con NaOH . . . . .	18
5.2.	Membrana lavada con agua . . . . .	19
5.3.	FTIR membrana sin lavar . . . . .	19
5.4.	FTIR comparación membranas con diferentes lavados. A: lavado con NaOH y autoclavada, B: lavado con NaOH sin autoclavar, C: lavado con agua y autoclavada, D: lavado con agua sin autoclavar . . . . .	20
5.5.	Imagen de Espectroscopía electrónica de barrido de membrana sin lavar . . . . .	20
5.6.	Imagen de Espectroscopía electrónica de barrido de membrana lavada con agua destilada y autoclavada . . . . .	21
5.7.	Imagen de Espectroscopía electrónica de barrido de membrana lavada con agua destilada sin autoclavar . . . . .	21
5.8.	Imagen de Espectroscopía electrónica de barrido de membrana lavada con NaOH sin autoclavar . . . . .	21
5.9.	Imagen de Espectroscopía electrónica de barrido de membrana lavada con NaOH y autoclavada . . . . .	22
5.10.	Concentraciones atómicas de membrana sin lavar, obtenida por la técnica EDX	22
5.11.	Concentraciones atómicas de membrana lavada con agua, sin autoclavar, obtenida por la técnica EDX . . . . .	23
5.12.	Concentraciones atómicas de membrana lavada con agua y autoclavada, obtenida por la técnica EDX . . . . .	23
5.13.	Concentraciones atómicas de membrana lavada con NaOH, sin autoclavar, obtenida por la técnica EDX . . . . .	24
5.14.	Concentraciones atómicas de membrana lavada con NaOH y autoclavada, obtenida por la técnica EDX . . . . .	24
5.15.	DRX membrana sin lavar . . . . .	25
5.16.	DRX membrana lavada con agua, sin autoclavar . . . . .	25
5.17.	DRX membrana lavada con agua y autoclavada . . . . .	25
5.18.	DRX membrana lavada con NaOH . . . . .	26
5.19.	Curva de pérdida de masa de membrana lavada con NaOH, obtenida mediante TGA . . . . .	26



5.20.	Primera derivada de la curva de pérdida de masa con respecto a la temperatura (derivada termogravimétrica) de membrana lavada con NaOH . . . . .	27
5.21.	Curva de pérdida de masa de membrana lavada con agua destilada y autoclavada, obtenida mediante TGA . . . . .	27
5.22.	Primera derivada de la curva de pérdida de masa con respecto a la temperatura (derivada termogravimétrica) de membrana lavada con agua destilada y autoclavada . . . . .	27
5.23.	Curva de pérdida de masa de membrana lavada con agua destilada, sin autoclavar, obtenida mediante TGA . . . . .	28
5.24.	Primera derivada de la curva de pérdida de masa con respecto a la temperatura (derivada termogravimétrica) de membrana lavada con agua destilada, sin autoclavar . . . . .	28
6.1.	Interconversión de los polimorfismos de la celulosa (O'Sullivan, 1997) . . . . .	34
6.2.	Microfotografía de referencia de membrana celulosa bacteriana (Cruz, 2015) . .	35
6.3.	Comparación DRX de membrana sin lavar y 3 tipos de lavados. MSL: membrana sin lavar, Agua s/a: membrana lavada con agua sin autoclavar, Agua c/a: membrana lavada con agua y autoclavada, NaOH: membrana lavada con NaOH, sin autoclavar . . . . .	37
6.4.	DRX de celulosa bacteriana sin lavar del estudio "Produciendo celulosa bacteriana a partir de lodos de desecho de papel reciclado industrial"(Nguyen Ngo et al., 2023) . . . . .	38
6.5.	Curvas de TGA de las muestras de CB (negro), CB con GO (azul), CB con GO y CMC (rojo), CB con CMC (azul claro). CB: Celulosa bacteriana. GO: Óxido de grafeno. CMC: Carboximetil celulosa (Radoselovics Lahoz, 2016) . . . . .	40
B.1.	Lavado NaOH . . . . .	50
B.2.	Resultados de lavado con agua destilada . . . . .	51
C.1.	Solubilidad ácido ferúlico a distintas temperaturas, con distintos pH. A: pH 4.13, 37°C. B: pH 4.3, 37°C. C: pH 5.1, 45°C. D: pH 5.1, 45°C . . . . .	51
C.2.	Solubilidad ácido ferúlico a 50°C, con pH 5.5. A: 2 minutos desde la aplicación de NaOH, B: 5 minutos desde la aplicación de NaOH, C: 10 minutos desde la aplicación de NaOH . . . . .	52
C.3.	Disminución de pH de 5.5 a 3.2, con HCl, a 50°C . . . . .	52
C.4.	Solución ácido ferúlico a temperatura ambiente con pH 5.5 . . . . .	53
D.1.	Prensa a 55°C por 2 minutos . . . . .	53
E.1.	FTIR membrana sin lavar, duplicado . . . . .	54
E.2.	FTIR comparación membranas con diferentes lavados, duplicado. A corresponde al lavado NaOH autoclavada, B corresponde al lavado NaOH sin autoclavar, C corresponde al lavado de agua autoclavada y D al lavado de agua sin autoclavar	54

# Capítulo 1

## Introducción y Antecedentes

En la sociedad contemporánea, la preocupación por el cuidado de la piel ha cobrado una importancia cada vez mayor. La piel, siendo el órgano más extenso del cuerpo humano y su primera línea de defensa ante el entorno externo (Benedetti, 2024), es de vital importancia en lo que respecta a la salud y el bienestar de las personas. Este reconocimiento de la piel como un componente esencial de la salud ha llevado a un enfoque más meticuloso en su cuidado y mantenimiento.

En este contexto, las mascarillas faciales han emergido como un elemento clave en la rutina de cuidado de la piel. Estas mascarillas están formuladas con una variada gama de componentes, cada uno de los cuales ofrece beneficios específicos para la piel, tales como la hidratación, la limpieza profunda, el rejuvenecimiento y la nutrición. Su uso regular ha demostrado ser efectivo para mejorar la apariencia y salud de la piel, brindando resultados visibles que respaldan su incorporación en la rutina de cuidado personal.

La eficacia de estas mascarillas se sustenta en la combinación de diversos componentes, que abarcan desde agentes hidratantes hasta antioxidantes y regeneradores. Esta gama de ingredientes potencia los beneficios y contribuye a una piel más radiante y saludable. Por lo tanto, se presenta una intersección entre el cuidado de la piel, las mascarillas faciales y la constante innovación en el campo de los materiales y componentes para el cuidado facial.

En este análisis sobre las mascarillas faciales, sus componentes y el panorama de la innovación en el cuidado de la piel, emerge una perspectiva prometedora: la fabricación de mascarillas a partir de celulosa bacteriana, debido a sus múltiples propiedades. La celulosa bacteriana, derivada de microorganismos, presenta características que la hacen idónea para aplicaciones en cuidado facial, incluyendo su capacidad de retención de humedad y su estructura tridimensional que facilita la liberación controlada de componentes bioactivos (El-Gendi, Taha, y Ray, 2022).

Uno de estos componentes bioactivos destacados es el ácido ferúlico, que podría añadirse a la celulosa bacteriana para potenciar aún más los beneficios de estas mascarillas. El ácido ferúlico es conocido por sus propiedades antioxidantes, que ayudan a proteger la piel contra el daño causado por los radicales libres y la radiación ultravioleta (Almeraya y Navarrete, 2021). Además, posee propiedades regenerativas que favorecen la renovación celular y la reducción de los signos del envejecimiento cutáneo. La capacidad del ácido ferúlico para mejorar la

estabilidad de otros ingredientes activos también lo convierte en un componente importante en el desarrollo de mascarillas de cuidado facial avanzadas.

La combinación de celulosa bacteriana y ácido ferúlico podría representar un potencial avance en la búsqueda de una piel sin signos de envejecimiento y saludable, aprovechando las propiedades naturales de estos componentes para revitalizar y proteger la piel de manera efectiva.

# Capítulo 2

## Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Evaluar la incorporación de ácido ferúlico en membranas de celulosa bacteriana preparadas con diferentes tipos de lavado, para su aplicación en mascarillas faciales antiedad.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Producir membranas de celulosa bacteriana utilizando la cepa *Komagataeibacter xylinus*.
2. Aplicar y comparar distintos tipos de lavados para las membranas.
3. Caracterizar las propiedades físico-químicas de las membranas.
4. Evaluar metodologías de incorporación de ácido ferúlico a la membranas.

# Capítulo 3

## Estado del arte

La celulosa bacteriana está experimentando un desarrollo significativo en la actualidad, y una de las aplicaciones más novedosas se encuentra en el ámbito de las mascarillas cosméticas.

Las mascarillas cosméticas a base de celulosa bacteriana ofrecen numerosos beneficios para el cuidado de la piel. La celulosa bacteriana, con su estructura única y capacidad de retención de agua, puede proporcionar una hidratación intensa y duradera a la piel, además de mantenerla suave y flexible (Didier Pedrosa De Amorim et al., 2020).

### 3.1. Celulosa bacteriana

La celulosa es el biopolímero más abundante en el planeta, y conforma el componente principal de la biomasa vegetal. La mayor fuente de celulosa proviene de las plantas, sin embargo, existe celulosa cuyo origen es bacteriano (Guinea, 2016).

La celulosa bacteriana, a diferencia de la vegetal, no desempeña un papel estructural, sino una capa protectora a las bacterias que la producen. La celulosa bacteriana, tiene un aspecto gelatinoso y semitransparente, y usualmente crece en la superficie del medio de cultivo (Guinea, 2016).

El motivo por el que algunas bacterias en presencia de oxígeno pueden producir esta membrana no es del todo claro, no obstante, se tienen tres teorías al respecto. La primera indica que la membrana es una película que ayuda a la bacteria a estar cerca de la superficie y, de esta forma, recibir la mayor cantidad de oxígeno posible. La segunda teoría dice que esta membrana se utiliza como medio de protección para los rayos UV. La última teoría, apunta a que las bacterias crean una especie de armazón que las protege contra otras especies e iones metálicos, a la vez que reciben sus nutrientes por difusión (Guinea, 2016).

#### 3.1.1. Biosíntesis

Las bacterias pertenecientes al género *Acetobacter* son capaces de llevar a cabo la producción de celulosa a partir de diversas fuentes de carbono, tales como glucosa, sacarosa, glicerol, manitol o arabitol. El proceso de síntesis de celulosa se compone fundamentalmente de dos etapas. En primer lugar, se lleva a cabo la conversión de la fuente de carbono en uridin difosfato glucosa (UDP-glucosa), la cual se convierte en el sustrato utilizado para la posterior

producción de celulosa. La segunda etapa del proceso implica la formación de la celulosa y su posterior secreción al medio de cultivo (C. et al., 2012).

La primera etapa del proceso se inicia con la introducción del sustrato en el microorganismo, donde experimenta una conversión en glucosa-6-fosfato mediante la acción de la enzima glucoquinasa. A continuación, la glucosa-6-fosfato se transforma en glucosa-1-fosfato gracias a la actividad de la enzima fosfoglucomutasa. En un paso subsiguiente, la glucosa-1-fosfato se convierte en UDP-glucosa en presencia de la enzima UDPG pirofosforilasa. Finalmente, la formación de la celulosa se lleva a cabo por medio de la acción de la enzima celulosa-sintasa, la cual se encarga de la polimerización de las unidades de glucosa (C. et al., 2012).

La segunda etapa del proceso implica la polimerización de la glucosa, seguida de la excreción de la celulosa al medio de cultivo. En la membrana celular del microorganismo se observan una serie de poros con un diámetro de 3.5 nm, dispuestos diametralmente. En el interior de la membrana, se encuentra ubicado el complejo enzimático celulosa-sintasa que rodea cada uno de estos poros. La celulosa es liberada al medio de cultivo en forma de subfibrillas elementales con un diámetro de 1.5 nm. La agrupación de estas subfibrillas conduce a la formación de microfibrillas, y el ensamblaje de microfibrillas contribuye a la producción de fibras y cintas de celulosa (C. et al., 2012).

En la Figura 3.1 se observa la fabricación de la membrana desde un punto de vista interno de la bacteria.

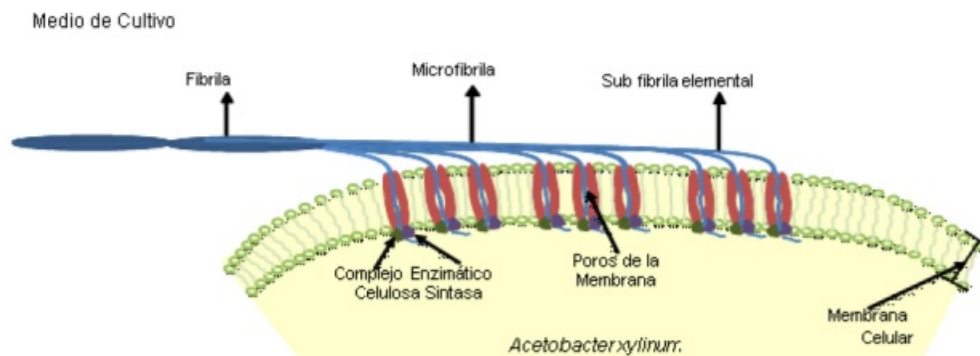


Figura 3.1: Proceso de síntesis de celulosa y su posterior liberación en el medio de cultivo a través de la membrana celular del microorganismo *Komagataeibacter xylinum* (C. et al., 2012)

### 3.1.2. Estructura

La estructura básica de la celulosa corresponde a 2000 a 14000 unidades de la cadena no-ramificada  $\beta$ -1,4-glucano (Guinea, 2016). Su fórmula molecular es  $[C_6H_{10}O_5]_n$  como se observa en la Figura 3.2.

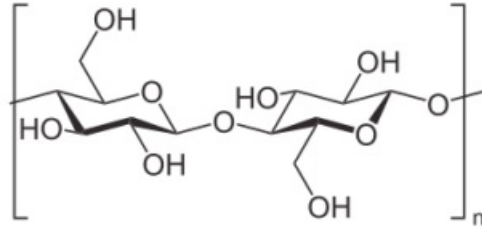


Figura 3.2: Estructura molecular básica de la celulosa. Unidad repetitiva de celobiosa, donde el valor de  $n$  varía entre 2000 a 14000 unidades (Guinea, 2016)

La celulosa bacteriana está formada de moléculas de  $\beta$ -glucopiranosas, las que se unen mediante enlaces covalentes  $\beta$ -1,4-glucosídico, esto da como resultado una cadena polimérica lineal con alta cantidad de grupos hidroxilo. Estas cadenas se unen por enlaces inter-hidrógeno e intra-hidrógeno, como se muestra en la Figura 3.3. Además, se pueden cristalizar mediante puentes de Hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, formando microfibrillas de celulosa (Guinea, 2016).

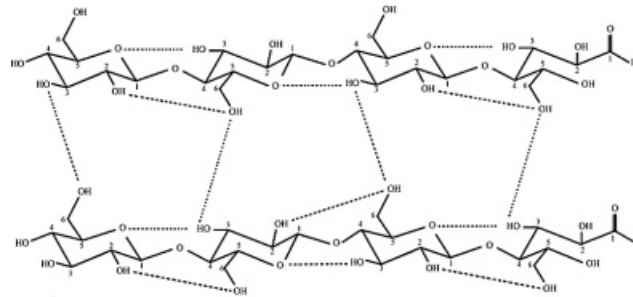


Figura 3.3: Enlaces inter-hidrógeno e intra-hidrógeno de la celulosa bacteriana (Guinea, 2016)

La celulosa bacteriana posee un poliformismo, debido a que tiene regiones con alto ordenamiento y bajo ordenamiento (C. et al., 2012). Se conocen seis diferentes estructuras ( $I$ ,  $II$ ,  $III_I$ ,  $III_{II}$ ,  $IV_I$  y  $IV_{II}$ ) que pueden ser convertidas unas en otras mediante calor o tratamiento con agentes químicos (C. et al., 2012).

La celulosa  $I$  o celulosa nativa tiene 2 tipos de estructura,  $I_\alpha$  e  $I_\beta$ . La primera es producida en mayor cantidad por algas y bacterias, mientras que la segunda es producida mayoritariamente en plantas (Guinea, 2016).

La celulosa  $II$  tiene una estructura más estable y se puede obtener desde la celulosa  $I$  mediante diferentes métodos fisicoquímicos, además, se produce de manera natural por la bacteria *Komagataeibacter xylinus* y por algas de la especie *Halicystis*. También es importante mencionar que la bacteria *Komagataeibacter xylinus* puede hacer celulosa  $I$  en cultivo estático, y celulosa  $II$  bajo otras condiciones (Guinea, 2016).

Las principales diferencias entre ambas celulosas son las dimensiones de las celdas unitarias, y la polaridad de sus cadenas. Además, las cadenas paralelas de  $\beta$ -1,4-glucano tienen un

orden axial para la celulosa I, mientras que para la II tiene un orden aleatorio (Guinea, 2016).

### 3.1.3. Ventajas y desventajas

La celulosa bacteriana presenta diversas ventajas en comparación con la celulosa vegetal, lo que la convierte en un material atractivo en numerosas aplicaciones. Estas ventajas incluyen (El-Gendi et al., 2022):

- **Mayor pureza y cristalinidad:** La celulosa bacteriana tiene una estructura más pura y cristalina en comparación con la celulosa vegetal. Esto significa que su composición química y su disposición molecular son más homogéneas, lo que resulta en propiedades físicas y químicas más predecibles y consistentes.
- **Biocompatibilidad:** La celulosa bacteriana es compatible con el tejido vivo y tiene una baja probabilidad de provocar respuestas adversas en el cuerpo humano.
- **Flexibilidad y resistencia mecánica:** La celulosa bacteriana es flexible y posee una alta resistencia mecánica en comparación con la celulosa vegetal. Esta combinación de propiedades le confiere versatilidad para su uso en una amplia gama de aplicaciones, desde materiales de embalaje hasta dispositivos biomédicos.
- **Alta capacidad de retención de agua:** La celulosa bacteriana tiene alta capacidad de retención de agua. Esto la convierte en un material hidratante y puede ser utilizado en productos cosméticos y de cuidado de la piel para proporcionar hidratación duradera.
- **Versatilidad de aplicaciones:** La celulosa bacteriana se puede utilizar en una variedad de aplicaciones, como materiales biodegradables, membranas filtrantes, recubrimientos protectores, dispositivos médicos y productos de cuidado personal.
- **No depende de terreno cultivable:** A diferencia de la celulosa vegetal, que se obtiene de plantas y, por lo tanto, requiere tierras cultivables y recursos naturales, la celulosa bacteriana se produce en cultivos bacterianos. Esto la hace independiente de las limitaciones geográficas y reduce la presión sobre los recursos agrícolas.

Sin embargo, también existen algunas desventajas asociadas con la celulosa bacteriana (El-Gendi et al., 2022):

- **Crecimiento más lento:** La producción de celulosa bacteriana es más lenta en comparación con la celulosa vegetal. Requiere un tiempo de cultivo prolongado para obtener volúmenes significativos de celulosa bacteriana.
- **Requiere recursos específicos:** El cultivo de bacterias para la producción de celulosa bacteriana requiere recursos específicos, como medios de cultivo y condiciones de crecimiento controladas. Esto puede requerir inversiones adicionales y una infraestructura adecuada.
- **Limitaciones en forma y tamaño:** A diferencia de la celulosa vegetal, que se puede obtener en diferentes formas y tamaños a partir de diferentes plantas, la celulosa bacteriana tiene limitaciones en términos de su forma y tamaño. Esto puede restringir su uso en ciertas aplicaciones donde estas características son factores críticos.



### 3.1.4. *Komagataeibacter xylinus*

La bacteria aerobia *Komagataeibacter xylinus*, anteriormente conocida como *Acetobacter xylinus*, es la especie con mayor capacidad de producción de celulosa. Se puede encontrar en frutas en estado de putrefacción, tiene forma de varilla o bastones (ver Figura 3.4), puede tener un tamaño de más de 2  $\mu\text{m}$  y no presenta flagelo, no obstante, se puede observar movimiento en algunas cepas durante la formación de celulosa (Cruz, 2015).

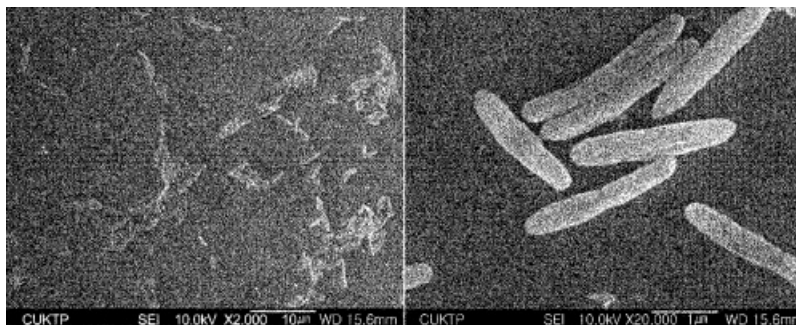


Figura 3.4: Microfotografía de *Komagataeibacter xylinus* (Cruz, 2015)

## 3.2. Caracterización de la celulosa

Para caracterizar la celulosa bacteriana, y analizar sus propiedades fisicoquímicas, se utilizan las siguientes pruebas:

- Microscopía electrónica de barrido (SEM) (Cruz, 2015): Esta técnica presenta un método avanzado de visualización microscópica, empleado con el propósito de capturar imágenes detalladas de muestras a una escala minúscula. Su funcionamiento se basa en el envío de un haz de electrones de alta energía hacia la muestra, seguido por la detección y registro de la señal resultante de la interacción entre dichos electrones y la muestra. El proceso inicia con la preparación de la muestra, usualmente mediante la aplicación de una capa delgada de un material conductor, como oro o grafito, con el fin de mejorar la conductividad eléctrica y mitigar la carga estática durante la observación. Posteriormente, la muestra se coloca dentro de la cámara de vacío del microscopio, donde se localiza el cañón de electrones. Dentro del SEM, el cañón de electrones genera un haz altamente enfocado que se dirige hacia la muestra. Al interactuar con la superficie de la misma, los electrones provocan una serie de efectos, incluyendo la emisión de electrones secundarios, retrodispersados y de rayos X característicos. Los electrones secundarios, originados en la parte superior de la muestra, son recogidos por un detector y empleados para crear imágenes detalladas de la topografía superficial. Paralelamente, los electrones retrodispersados, procedentes de capas más profundas, también son detectados y utilizados para generar imágenes de contraste de composición.
- Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX) (Cruz, 2015): A partir del análisis SEM, se utiliza el espectro de rayos X generado por la interacción de los electrones con la muestra para identificar los elementos químicos presentes en la muestra. Esto se logra analizando la energía y la intensidad de los rayos X emitidos, lo que proporciona información sobre la composición elemental de la muestra.

- Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (Oh, Yoo, Shin, Kim, et al., 2005) (Oh, Yoo, Shin, y Seo, 2005): Es una técnica analítica utilizada para estudiar las interacciones de las moléculas con la radiación infrarroja. En su funcionamiento, un haz de radiación infrarroja se dirige hacia la muestra en estudio, y parte de esta radiación es absorbida por las moléculas de la muestra en ciertas frecuencias específicas. Las moléculas absorben la radiación infrarroja en función de su estructura y de los enlaces químicos presentes.

El sistema FTIR opera mediante un interferómetro de transformada de Fourier, el cual divide el haz de radiación infrarroja en dos caminos: uno que viaja a través de la muestra y otro que no. Después, estos dos caminos se combinan nuevamente y se registran los cambios de intensidad resultantes, los cuales están relacionados con la absorción de la radiación infrarroja por parte de la muestra.

El espectro resultante se convierte en una representación gráfica de la intensidad de la radiación infrarroja absorbida en función de la frecuencia de la radiación. Este espectro proporciona información sobre las vibraciones de las moléculas en la muestra, lo que a su vez permite identificar los grupos funcionales presentes en las moléculas y analizar su composición química.

- Difracción de rayos X (DRX) (Nguyen Ngo et al., 2023): Es una técnica utilizada para analizar la estructura cristalina de materiales sólidos. Su funcionamiento se basa en la interacción de los rayos X con la red cristalina de un material, lo que resulta en la dispersión de los rayos X en diferentes direcciones según la disposición de los átomos en la muestra.

Cuando los rayos X inciden sobre un cristal, los átomos que componen la red cristalina dispersan los rayos X en diferentes ángulos debido a la difracción. Estos rayos X dispersados interfieren entre sí, creando un patrón de interferencia que puede ser detectado y analizado.

El patrón de difracción resultante es característico de la estructura cristalina del material y contiene información sobre la distancia interatómica y la orientación de los planos cristalinos. Al medir los ángulos y las intensidades de los picos en el patrón de difracción, es posible determinar la estructura cristalina del material y resolver su disposición atómica tridimensional.

- Análisis termogravimétrico (TGA) (Radoselovics Lahoz, 2016): Es una técnica utilizada para estudiar los cambios en la masa de una muestra en función de la temperatura o el tiempo, bajo condiciones controladas de temperatura y atmósfera. Su funcionamiento se basa en la medida precisa de la masa de la muestra mientras se somete a un programa de calentamiento o enfriamiento gradual.

Durante un análisis TGA, la muestra se coloca en una celda de medida dentro de un horno controlado. La temperatura se incrementa o disminuye de manera gradual y constante, y la masa de la muestra se registra continuamente mediante un sensor de balanza sensible.

Los cambios en la masa de la muestra se producen debido a procesos como la descomposición térmica, la pérdida de agua, la desorción de gases o la oxidación. Estos cambios se reflejan en la curva termogravimétrica, que muestra la variación de la masa de la muestra en función de la temperatura o el tiempo.

### 3.3. Lavados de membranas de celulosa bacteriana

Al momento de cosechar las membranas de celulosa bacteriana, estas deben pasar por un tratamiento de lavado, con el fin de no tener un riesgo biológico en su manipulación y potenciales aplicaciones. La forma más común de lavar estas membranas es con NaOH, utilizando distintos tiempos de contacto y temperaturas de la solución con la celulosa (ver Anexo A). Algunas de estas metodologías son descritas a continuación:

- En un estudio, se usó 0.1 M de NaOH con agua destilada, se dejó remojando en esta solución durante toda la noche. Posteriormente, se hizo otra solución con NaOH 0,1 M, pero esta vez se dejó solo 20 minutos. Luego, se neutralizó la membrana con ácido acético 5 % v/v durante 3 a 5 segundos, y luego se hirvió en agua destilada repetidas veces. Para finalizar, se autoclavaron las membranas a 121°C por 15 minutos (E. Bilgi E. Homan Gokce y Bayir, 2021).
- Para otro estudio, se utilizó 0.1 M de solución con NaOH a 90°C por 20 minutos. Finalmente, se lavan en agua desionizada hasta tener un pH neutro. Las membranas se esterilizan en un autoclave a 121°C por 15 minutos (Didier Pedrosa De Amorim et al., 2020).
- En otro estudio, la membrana se lavó primero con agua destilada a 90°C por 10 minutos. Luego, se hizo una solución con NaOH 0.1 M, donde se lavaron las membranas durante 30 minutos a 90°C. Finalmente, se lavó con agua destilada repetidas veces hasta eliminar el NaOH (Carreño, 2011).

### 3.4. Incorporación de componentes bioactivos a las membranas de celulosa bacteriana

En la actualidad, las propiedades de la celulosa bacteriana son aprovechadas de distintas maneras, por ejemplo, aplicando diversos extractos de hierba o componentes bioactivos a la membrana. Otros estudios se han enfocado en el uso de celulosa bacteriana para administración transdérmica de fármacos (Pedro Jaramillo, Cuautle Ortíz, y Arrieta Hernández, 2023). Todos estos estudios son enfocados en la capacidad de retención de las membranas, y sus propiedades bioafines con la piel. A continuación, se muestran 2 estudios que tratan de la aplicación de componentes a la celulosa bacteriana.

#### 3.4.1. Aplicación de Taurina

Este estudio muestra la aplicación del componente Taurina a celulosa bacteriana (CB). En primer lugar, se produce CB utilizando *Komagataeibacter xylinus* (ATCC 700178) en un cultivo con medio HS (conforme al protocolo propuesto por Hestrin y Schramm, el cual incluye una composición de 2.0 % de glucosa (p/v), 0.5 % de extracto de levadura (p/v), 0.5 % de peptona, 0,27 % de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (p/v) y 0.15 % de ácido cítrico (v/v)) (E. Bilgi E.

Homan Gokce y Bayir, 2021).

Para la incorporación de Taurina, las membranas son sumergidas en una solución con 50 mM de este compuesto (aprox. 0.63 %) y agua destilada. Por 1 unidad de CB hidratada, son 4 unidades de solución Taurina (w/v). Además, se le adiciona fenostato al 1 % (para preservar la solución), y la muestra se deja en un agitador magnético a 80°C por 2 horas (E. Bilgi E. Homan Gokce y Bayir, 2021).

### 3.4.2. Aplicación de Propóleo

Para la generación de la celulosa bacteriana, se empleó una cepa de la bacteria *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 53582), inoculada en un medio agar HS.

Para la incorporación del bioactivo a la mascarilla, a las membranas hidratadas se les sacó el 50 % de su masa utilizando presión. Luego, estas fueron inmersas en una solución de agua destilada con 2 % de extracto de propóleo. Estas membranas sumergidas en la solución son agitadas durante 35 minutos a 150 RPM y a 30°C. Las membranas se dieron vuelta cada 5 minutos para obtener una distribución homogénea de la sustancia (Didier Pedrosa De Amorim et al., 2020).

## 3.5. Ácido ferúlico

El ácido ferúlico es un compuesto fenólico natural que se encuentra en una variedad de plantas, como granos de cereal (trigo, arroz, avena), frutas (naranjas, manzanas, peras), verduras y hierbas. Es conocido por su capacidad antioxidante y por sus propiedades beneficiosas para la salud.

El ácido ferúlico tiene varias características, entre las que se encuentran (Guillén, 2014):

- **Propiedades antioxidantes:** El ácido ferúlico se destaca por su capacidad antioxidante, neutralizando los radicales libres y protegiendo las células y los tejidos del daño oxidativo. Esta propiedad le confiere un potencial significativo para prevenir el envejecimiento prematuro y proteger contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.
- **Solubilidad:** El ácido ferúlico es altamente soluble en solventes orgánicos polares, como el etanol y el metanol, para diferentes presiones y temperaturas. Sin embargo, con el agua su solubilidad es baja. A continuación, es posible ver la Tabla 3.1, que muestra la solubilidad del ácido ferúlico en distintos solventes (Shakeel et al., 2017):

Tabla 3.1: Solubilidad de ácido ferúlico en diferentes solventes (Shakeel et al., 2017)

Disolvente	Solubilidad (fracción molar) a 45.05°C
Agua	$1.36 \times 10^{-4}$
Metanol	$3.15 \times 10^{-2}$
Etanol	$3.08 \times 10^{-2}$

- Estabilidad: El ácido ferúlico exhibe sensibilidad a la luz y al calor, lo que puede afectar su estabilidad. Resguardar el ácido ferúlico de la luz ultravioleta y almacenarlo en envases opacos y herméticos, a temperaturas adecuadas, contribuirá a minimizar su degradación y a preservar sus propiedades.
- Derivados y conjugados: El ácido ferúlico tiene la capacidad de formar derivados y conjugados con otros compuestos, tales como aminoácidos, azúcares y lípidos. Estos derivados pueden exhibir propiedades biológicas específicas y a su vez mejorar la estabilidad y biodisponibilidad del ácido ferúlico. Al formar estos derivados, se pueden mejorar tanto la solubilidad como la capacidad de penetración del ácido ferúlico en los tejidos.
- Actividad antiinflamatoria: El ácido ferúlico posee propiedades antiinflamatorias al inhibir la producción de mediadores inflamatorios y reducir la respuesta inflamatoria en células y tejidos. Estas características lo convierten en un ingrediente atractivo en el desarrollo de productos para el cuidado de la piel y tratamientos de enfermedades inflamatorias.
- Actividad fotoprotectora: El ácido ferúlico tiene propiedades fotoprotectoras, ya que tiene la capacidad de absorber la radiación ultravioleta (UV) y reducir el daño causado por los rayos UV en la piel. Al aplicarse tópicamente, el ácido ferúlico puede actuar como una barrera protectora frente a los rayos UV, ayudando a preservar la salud y la apariencia de la piel y reduciendo el riesgo de daño cutáneo inducido por el sol, como el envejecimiento prematuro y el riesgo de cáncer de piel.

El ácido ferúlico tiene una amplia gama de aplicaciones en diversos campos debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y fotoprotectoras. Aquí se presentan algunas de sus aplicaciones más comunes (Almeraya y Navarrete, 2021):

- Cosmética: Este compuesto se encuentra presente en una variedad de productos como cremas, lociones, sueros y protectores solares, con el objetivo de prevenir el daño ocasionado por los radicales libres y la radiación ultravioleta, así como para combatir los signos del envejecimiento cutáneo, como las arrugas y las manchas oscuras.
- Alimentos y bebidas: El ácido ferúlico es un compuesto que se encuentra de forma natural en diversos alimentos, como granos enteros, frutas y verduras. Además, se utiliza ampliamente en la industria alimentaria como aditivo debido a sus propiedades antioxidantes, que ayudan a proteger los alimentos del deterioro. Además, tiene incidencia en la reducción de la formación de compuestos tóxicos durante el procesamiento de alimentos.
- Medicina: Este ácido ha generado un gran interés en el ámbito médico debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Se ha investigado su potencial terapéutico en diversas enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, trastornos neurodegenerativos y enfermedades hepáticas.
- Productos para el cuidado del cabello: El ácido ferúlico se encuentra presente en una variedad de productos para el cuidado del cabello, como champús, acondicionadores y tratamientos capilares. Este compuesto desempeña un papel importante en fortalecer el cabello, al tiempo que previene el daño ocasionado por los radicales libres.

- Química industrial: El compuesto tiene aplicaciones en la industria química. Es un componente clave en la producción de polímeros, resinas, tintes, adhesivos y otros compuestos químicos.

Debido a todas las propiedades antes mencionadas, el ácido ferúlico tiene múltiples aplicaciones como bioactivo en la cosmetología. Existen algunos estudios que muestran su incorporación a diferentes fuentes para su aplicación en la piel.

En la actualidad, se encuentra disponible un documento académico que aborda la incorporación del ácido ferúlico en matrices de hidrogel. Este documento, titulado "*Estabilización del ácido ferúlico en formulación de gel tópico mediante nanoencapsulación y optimización del pH*", se enfoca en mejorar la estabilidad del ácido ferúlico con el propósito de aprovechar sus ventajas en el contexto de la cosmetología (Das y Wong, 2020).

El objetivo principal de este estudio consiste en lograr la estabilización del ácido ferúlico mediante la implementación de técnicas de nanoencapsulación. Con este fin, se desarrollan nanocápsulas que contienen ácido ferúlico empleando el método de homogeneización a alta presión. Adicionalmente, se preparan dos formulaciones de gel con diferentes valores de pH para la posterior incorporación de estas nanocápsulas (Das y Wong, 2020).

Para la incorporación de las nanocápsulas de ácido ferúlico en los geles, se emplearon dos geles con valores de pH diferentes. El Gel A posee un pH superior al pKa del ácido ferúlico, mientras que el Gel B tiene un pH inferior a su pKa (Das y Wong, 2020).

En los resultados obtenidos, se observó que el Gel B demostró una liberación del ácido ferúlico más gradual y controlada en comparación con el Gel A. Además, se constató que el Gel B exhibe una mejor apariencia y una mayor estabilidad química en comparación con el Gel A. No obstante, es importante señalar que el Gel A presenta ventajas significativas en términos de la incorporación del ácido ferúlico sin nanocápsulas (Das y Wong, 2020).

Estos hallazgos permiten concluir que el pH bajo desempeñó un papel fundamental tanto en la apariencia del producto como en la estabilidad química del ácido ferúlico. Además, se destaca que los productos para el cuidado de la piel con pH bajo pueden ser beneficiosos, ya que contribuyen a mantener la homeostasis cutánea y el microbioma dérmico (Das y Wong, 2020).

# Capítulo 4

## Metodología

La metodología que se realiza consta de cinco pasos principales para la producción, lavado, caracterización e incorporación de ácido ferúlico en la celulosa bacteriana. A continuación se describe en detalle cada paso:

### 1. Producción de celulosa

- Cultivar la bacteria *Komagataeibacter xylinus* en medio HS. La composición de este medio es glucosa 2% (p/v), peptona 0.5%, extracto de levadura 0.5%, fosfato disódico 0.27% y ácido cítrico 0.115%.
- Mantener el cultivo en medio estático en placas durante 6 días.
- Extraer las membranas y cortar en cuadrados de 1x1 cm en la misma placa.
- Poner las membranas ya cortadas en un tubo de centrifuga de 50 mL, junto con el líquido que queda en la placa.
- Agitar los tubos de centrifuga en un Vortexer a 2000 RPM con la máxima intensidad. Hacer una serie de agitaciones de 1 minuto y medio, 10 veces, cambiando de lugar los tubos en cada ciclo de tiempo.
- Después de la agitación, extraer los restos de membranas y dejar únicamente el líquido en los tubos.
- Inocular las placas con medio HS utilizando 100  $\mu\text{L}$  de la solución presente en los tubos de centrifuga.
- Dejar crecer el cultivo en la estufa a 30°C, durante un período de 7 días.
- Cosechar las membranas y pesar, luego guardar en un vaso precipitado, a 4°C.

### 2. Limpieza: La limpieza de la celulosa se evalúa a través de 4 vías.

- Utilización de hidróxido de sodio: En primer lugar, pesar 2.4 gramos de Hidróxido de Sodio (E. Bilgi, Homan Gokce, y Bayir, 2021). Mientras, calentar 600 mL de agua destilada con agitación magnética a 80°C en un vaso precipitado de 1000 mL, luego, vertir lentamente el NaOH al agua destilada. Posteriormente, poner 5 membranas en la solución, y lavar durante 30 minutos. Repetir el proceso nuevamente realizando otra solución con NaOH, y lavar durante 30 minutos. Después, lavar las membranas en 600 mL de agua destilada a 80°C con agitación magnética, durante 30 minutos. Finalmente, separar la mitad de las membranas para autoclavar, utilizando 100 mL de agua destilada en un vaso precipitado, y poniendo una tapa de papel aluminio. En el Anexo B es posible apreciar con mayor detención cada etapa de este lavado.

- Lavado de membranas con agua destilada: En primer lugar, realizar la extracción de las membranas de celulosa bacteriana a partir del medio de cultivo. Posteriormente, someter las membranas a un proceso de lavado en 600 mL de agua destilada a una temperatura de 80°C durante un período de 3 horas, cambiando el agua cada 1 hora, utilizando agitación magnética para asegurar una distribución uniforme del calor y una limpieza efectiva de las membranas. Una vez completado el lavado, esterilizar la mitad de las muestras en autoclave con 100 mL de agua destilada como medio acuoso. En el Anexo B.1 es posible apreciar con mayor detención cada etapa de este lavado.
3. Análisis de propiedades fisicoquímicas de las membranas (Auta, Adamus, Kwiecien, Radecka, y Hooley, 2017): Se envían muestras de celulosa lavadas con los diferentes métodos a un laboratorio fisicoquímico, para analizar las características conformacionales de la membrana, utilizando las siguientes pruebas:
- Microscopía electrónica de barrido (SEM): Con el fin de estudiar su composición química, estructura cristalina y morfología externa.
  - Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR): Para estudiar su estructura química y características físicas. Se realizaron 2 réplicas de las muestras para este análisis.
  - Difracción de rayos X (DRX): Con el fin de conocer el índice de cristalinidad y el grado de polimerización de diversos materiales.
  - Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDX): Para determinar la composición elemental de las muestras.
  - Análisis termogravimétrico (TGA): Para medir la estabilidad térmica de las membranas producidas.
4. Pruebas solubilidad ácido ferúlico: Para analizar la solubilidad del ácido ferúlico en agua destilada, se realizan diferentes pruebas, las cuales se pueden apreciar en el Anexo C. De esta manera, se llega a la siguiente metodología para la preparación de ácido ferúlico, con el fin de incorporarlo en las membranas:
- a) Preparar una solución acuosa de ácido ferúlico al 0.3 % (p/p) (Das y Wong, 2020) mediante el método de neutralización.
  - b) Dispersar 6 g de ácido ferúlico en 1000 mL de agua destilada en un vaso precipitado.
  - c) Añadir gota a gota una solución acuosa de hidróxido de sodio 2 M mientras se agita con un agitador magnético hasta que el ácido ferúlico se disuelve por completo. El pH final de la solución debe quedar en 5.5.
  - d) Aforar en una probeta con la cantidad necesaria de agua destilada para ajustar la solución a 2000 mL.
5. Evaluación de metodologías de incorporación: Se evalúan diferentes metodologías de incorporación de ácido ferúlico para cada método de limpieza de membrana. Para explicar la metodología, se presenta la Tabla 4.1, todo a una concentración del 0.3 % de ácido ferúlico.



Tabla 4.1: Metodologías de incorporación

Tipo de membranas	Condiciones de incorporación			
Membranas lavadas con agua destilada y autoclavadas	35°C, 35 minutos	35°C, 2 horas	50°C, 35 minutos	50°C, 2 horas
Membranas lavadas con agua destilada sin autoclavar				
Membranas lavadas con NaOH y autoclavadas				
Membranas lavadas con NaOH sin autoclavar				

Para realizar la incorporación de ácido ferúlico a las membranas, se realiza el siguiente procedimiento:

- a) Preparar la solución con ácido ferúlico al 0.3 % y pH 5.5.
- b) Sacar una muestra de la solución con ácido ferúlico en tubos eppendorf de 2 mL.
- c) Pesar las membranas que fueron lavadas.
- d) Poner membranas con pinzas en el molde para la máquina de prensa, la cual se puede apreciar en el Anexo D.
- e) Encender máquina de prensa a 50 °C.
- f) Dejar las membranas en la máquina de prensa 2 minutos.
- g) Sacar las membranas y volver a pesar post prensa.
- h) Preparar 200 mL de solución con ácido ferúlico en matraces de 500 mL.
- i) Paralelamente, poner los shaker con las condiciones de incorporación necesarias, para que se ambienten.
- j) Introducir cada membrana en un matraz diferente, etiquetándolos con el tipo de lavado (NaOH (+), NaOH (-), H<sub>2</sub>O (+), H<sub>2</sub>O (-)) y el tipo de incorporación (temperatura (T1 o T2) y tiempo (35 min o 2 hrs)).
- k) Dejar los matraces en el shaker, para que el ácido ferúlico se incorpore a las membranas, con las condiciones descritas en la Tabla 4.1.
- l) Esperar el tiempo de incorporación correspondiente.
- m) Retirar las membranas de los matraces y ponerlas en placas.
- n) Extraer muestras de la solución restante de cada matraz, 2 mL en tubos eppendorf.
- ñ) Pesar las membranas post incorporación.

Se comparan los pesos antes y después de la incorporación, con el fin de conocer la membrana que absorbió mayor cantidad de solución, bajo las condiciones mencionadas.

Además, se calcula el porcentaje de peso recuperado, que es un parámetro que permite dimensionar la capacidad de absorción de la membrana con respecto a su peso antes de la incorporación. Se calcula con la Fórmula 4.1:

$$\%_{\text{incorporación}} = \frac{P_i \cdot 100}{P_0} \quad (4.1)$$

Siendo  $P_i$  la cantidad de peso incorporado neto en gramos.  $P_0$  es el peso inicial de la membrana (post prensado).

También se mide la concentración de ácido ferúlico en el medio antes y después de la absorción utilizando el método de Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), el cual se describe a continuación.

- HPLC: Se utiliza el cromatógrafo de la marca Shimadzu, modelo CBM-20A, con detector SPD-20AV/prominence UV/VIS. Se usa una columna Eclipse XDB-C18, tamaño de la columna de 4.6 x 150 mm, y tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ . Se operó a una temperatura de 40°C a un flujo de 0.1 mL/min.

Se realizan los siguientes buffers, todo bajo campana de extracción. Se necesitan 3 frascos de vidrio borosilicato de 1000 mL, 2 probetas de 1000 mL y una probeta de 50 mL, todo previamente lavado y enjuagado con agua mili Q. La fase orgánica se hizo con 40 % Metanol y 60 % Acetonitrilo. La fase inorgánica lleva 20.3 mL de ácido ortofosfórico y el resto con agua mili Q hasta 1000 mL, luego, se filtra con una bomba de vacío. Ambas fases se sonicán por 20 minutos. Paralelamente, se calienta agua mili Q en la estufa y se sonica por 10 minutos.

Posteriormente, se lava el equipo con agua mili Q, y luego con fase orgánica e inorgánica para las diferentes bombas.

Finalmente, se hacen diluciones a partir de los 5 mg/L de ácido ferúlico (0.5 %), con el fin de realizar la curva de calibrado. Y se miden las muestras extraídas de las diferentes incorporaciones.

Por último, se calcula la desviación estándar de los datos obtenidos del HPLC, con el fin de notar si existieron diferencias significativas en los cambios de concentración del ácido ferúlico.

# Capítulo 5

## Resultados

A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir de la metodología descrita.

### 5.1. Evaluación de metodologías de lavados

El primer lavado, realizado con NaOH 0.1 M, presenta una membrana transparente y de menor grosor que la membrana sin lavar, esto se muestra en la Figura 5.1.



Figura 5.1: Membrana lavada con NaOH

Por otro lado, el lavado con agua destilada presenta una membrana blanquecina, más delgada que la lavada con NaOH, y se presenta en la Figura 5.2.



Figura 5.2: Membrana lavada con agua

Se realizaron 4 tipos de lavados, no obstante, al autoclavar las membranas, no se muestra una diferencia en su aspecto superficial, por ende, solo se fotografiaron las membranas sin autoclavar.

Siguiendo lo anterior, también se pesaron las membranas antes y después del autoclave, lo que no dio diferencias significativas, por ende, se muestra la Tabla 5.1 con el promedio de los pesos de todas las membranas.

Tabla 5.1: Peso de las membranas pre y post lavado

	Lavado con NaOH	Lavado con H2O
Pre lavado [gramos]	12.98 (+/- 2.67)	9.35 (+/- 1.95)
Post lavado [gramos]	5.75 (+/- 1.38)	3.38 (+/- 0.89)

### 5.1.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 5.3 muestra el FTIR de la membrana sin tratamiento de lavado.

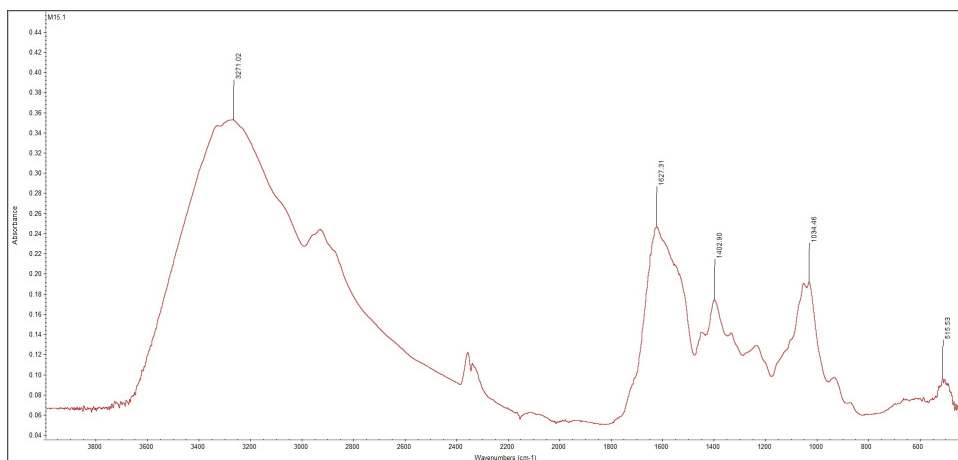


Figura 5.3: FTIR membrana sin lavar

En la Figura 5.4, se aprecian los espectros de las membranas lavadas.

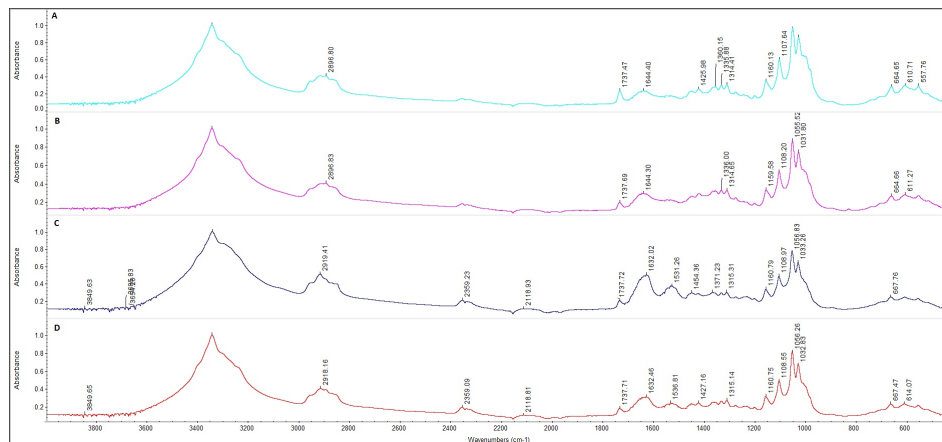


Figura 5.4: FTIR comparación membranas con diferentes lavados. A: lavado con NaOH y autoclavada, B: lavado con NaOH sin autoclavada, C: lavado con agua y autoclavada, D: lavado con agua sin autoclavada

Los resultados de los duplicados se encuentran en el Anexo E, en las Figuras E.1 y E.2.

### 5.1.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes obtenidas mediante la técnica SEM se pueden observar en la Figura 5.5 para las membranas sin lavar, Figura 5.6 para la membrana lavada con agua destilada y autoclavada, Figura 5.7 para la membrana lavada con agua destilada sin autoclarar, Figura 5.8 para la membrana lavada con NaOH sin autoclarar, y Figura 5.9 para la membrana lavada con NaOH y autoclavada.

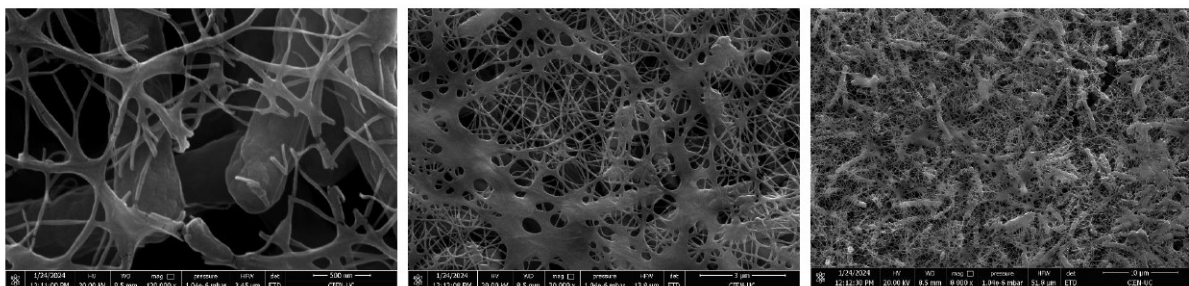


Figura a: SEM 120000x

Figura b: SEM 30000x

Figura c: SEM 8000x

Figura 5.5: Imagen de Espectroscopía electrónica de barrido de membrana sin lavar

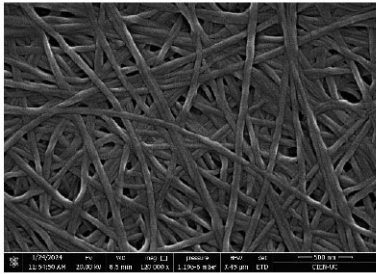


Figura a: SEM 120000x

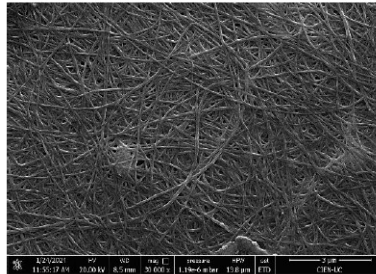


Figura b: SEM 30000x

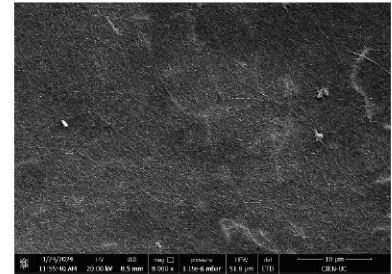


Figura a: SEM 8000x

Figura 5.6: Imagen de Espectroscopía electrónica de barrido de membrana lavada con agua destilada y autoclavada

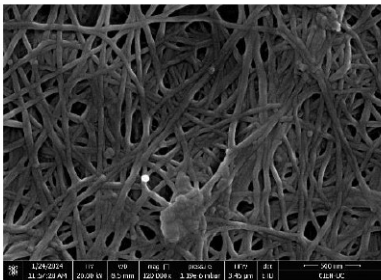


Figura a: SEM 120000x

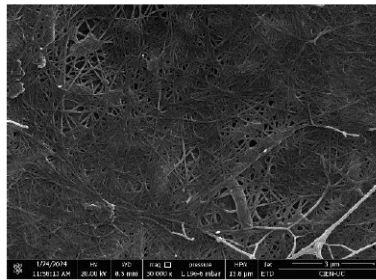


Figura b: SEM 30000x

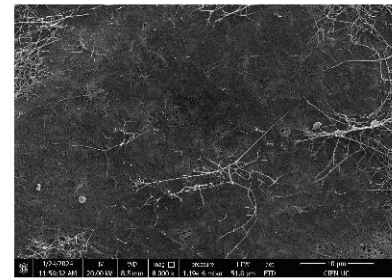


Figura c: SEM 8000x

Figura 5.7: Imagen de Espectroscopía electrónica de barrido de membrana lavada con agua destilada sin autoclavar

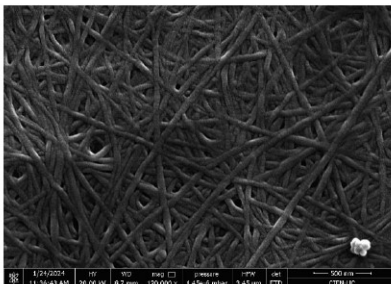


Figura a: SEM 120000x

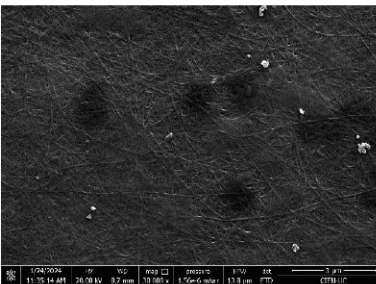


Figura b: SEM 30000x

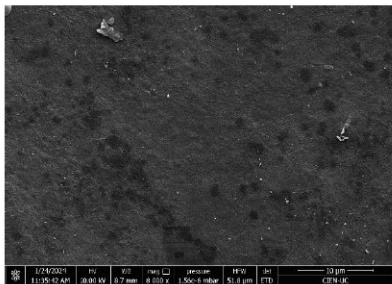


Figura c: SEM 8000x

Figura 5.8: Imagen de Espectroscopía electrónica de barrido de membrana lavada con NaOH sin autoclavar

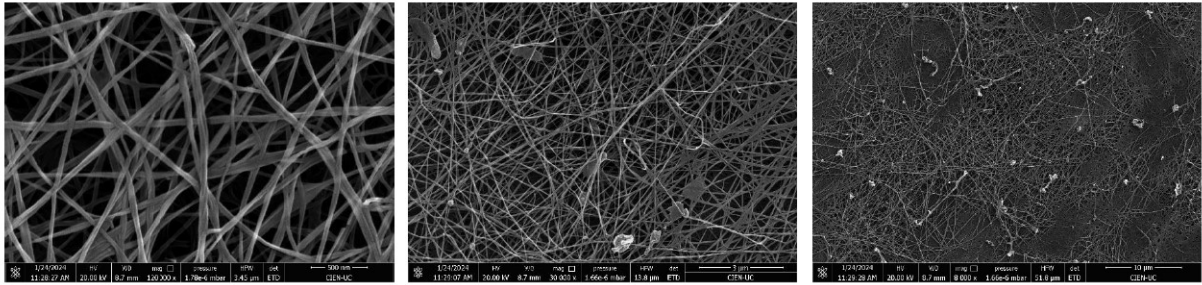


Figura a: SEM 120000x

Figura b: SEM 30000x

Figura c: SEM 8000x

Figura 5.9: Imagen de Espectroscopía electrónica de barrido de membrana lavada con NaOH y autoclavada

### 5.1.3. Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX)

La prueba de EDX arroja las concentraciones atómicas de distintos elementos presentes en las membranas. La Figura 5.10 muestra un gráfico de barras con las respectivas concentraciones atómicas de una membrana sin lavar. Análogamente, la Figura 5.11 presenta el gráfico de la membrana lavada con agua y sin autoclavar, la Figura 5.12 representa la membrana lavada con agua y autoclavada, la Figura 5.13 muestra el gráfico de la membrana lavada con NaOH sin autoclavar, y la Figura 5.14 representa la membrana lavada con NaOH y autoclavada.

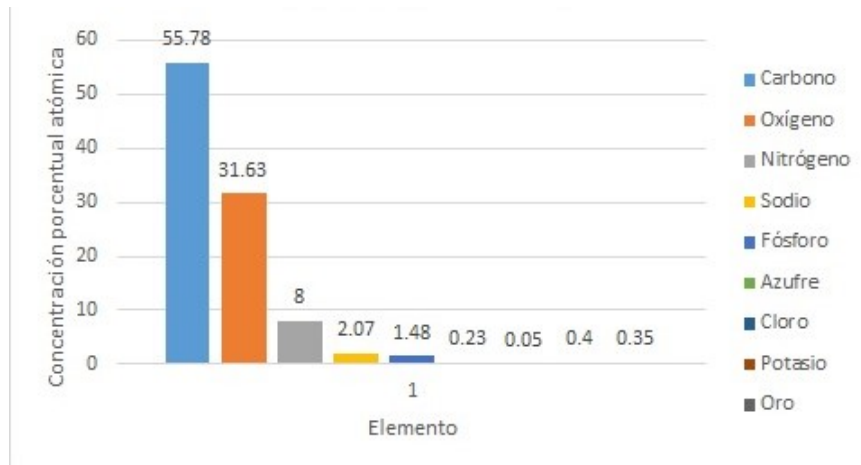


Figura 5.10: Concentraciones atómicas de membrana sin lavar, obtenida por la técnica EDX

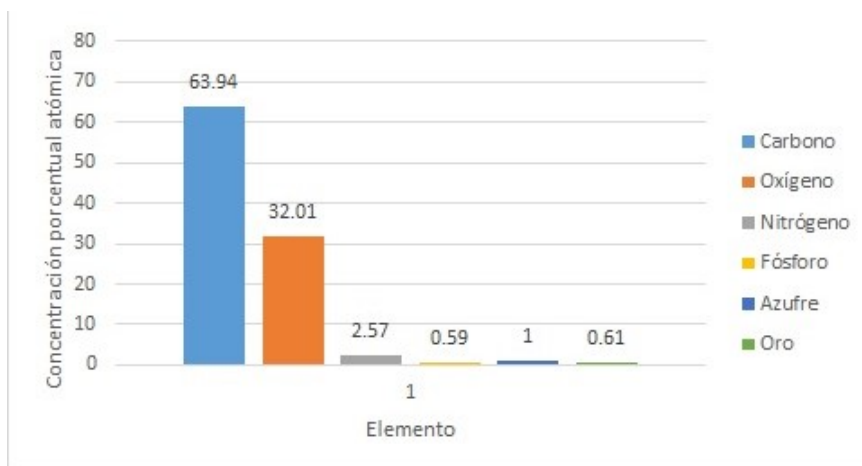


Figura 5.11: Concentraciones atómicas de membrana lavada con agua, sin autoclavar, obtenida por la técnica EDX

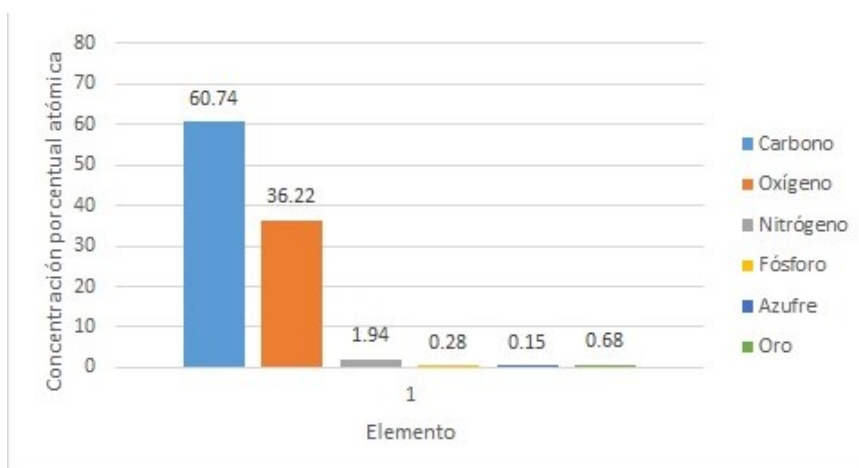


Figura 5.12: Concentraciones atómicas de membrana lavada con agua y autoclavada, obtenida por la técnica EDX



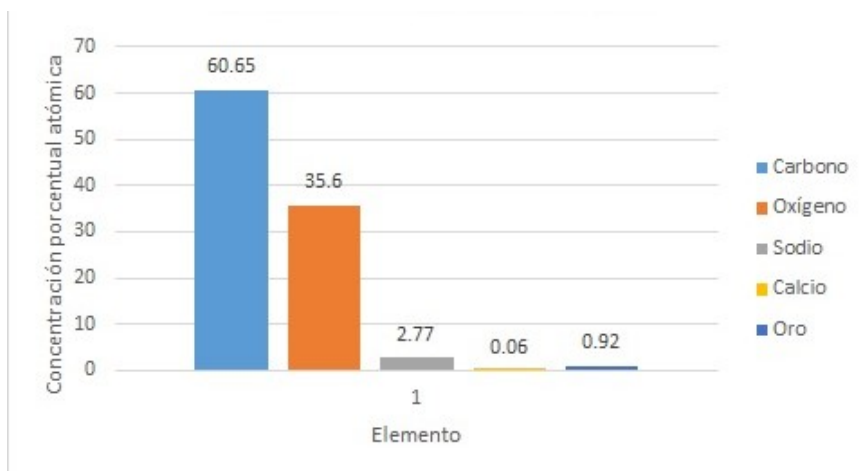


Figura 5.13: Concentraciones atómicas de membrana lavada con NaOH, sin autoclavar, obtenida por la técnica EDX

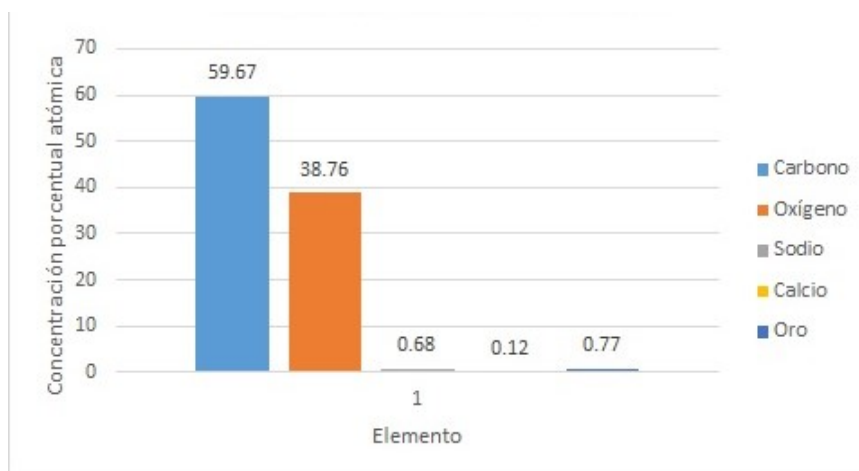


Figura 5.14: Concentraciones atómicas de membrana lavada con NaOH y autoclavada, obtenida por la técnica EDX

#### 5.1.4. Difracción de rayos X (DRX)

La técnica DRX muestra la estructura de las membranas a nivel atómico. Esto se representa en la Figura 5.15, la cual muestra una curva de difracción de la membrana sin lavar. Asimismo, la Figura 5.16 presenta la curva de difracción para la membrana lavada con agua y sin autoclavar, la membrana lavada con agua y autoclavada es representada por la Figura 5.17, y la curva de la membrana lavada con NaOH se muestra en la Figura 5.18.

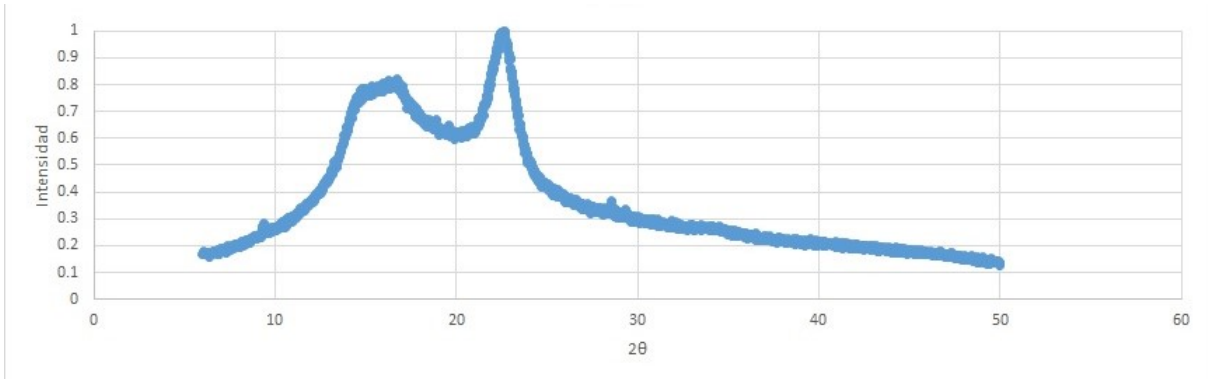


Figura 5.15: DRX membrana sin lavar

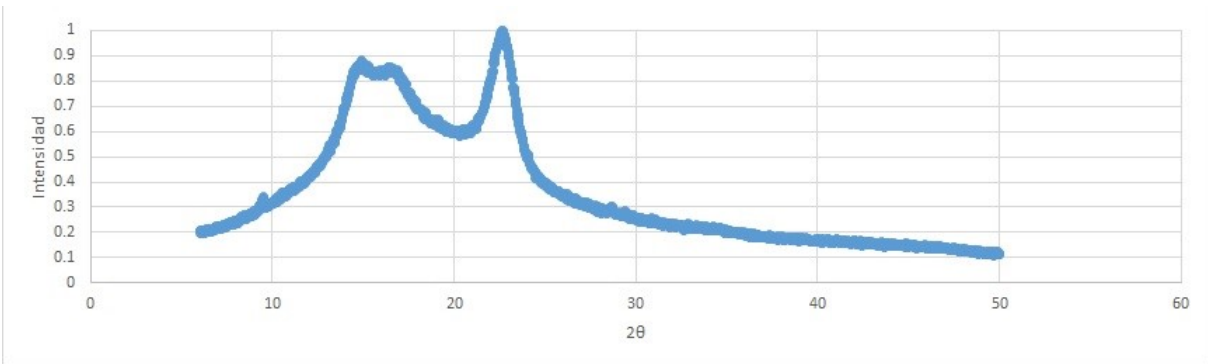


Figura 5.16: DRX membrana lavada con agua, sin autoclavar

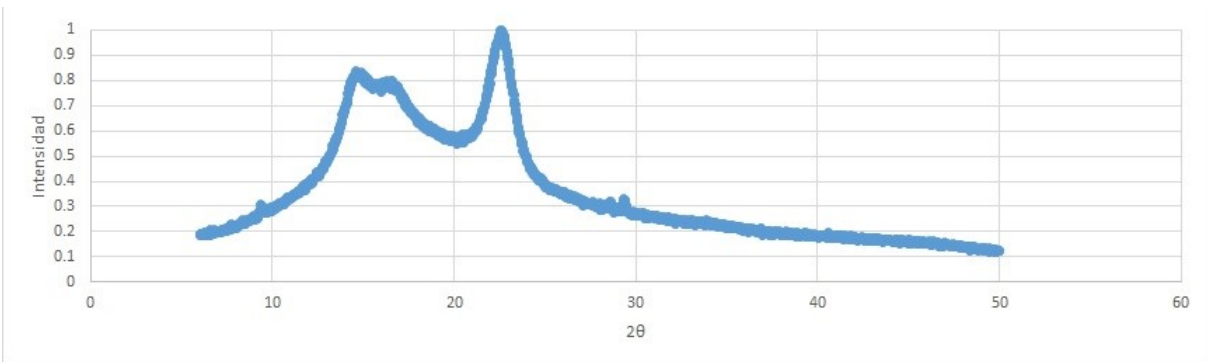


Figura 5.17: DRX membrana lavada con agua y autoclavada

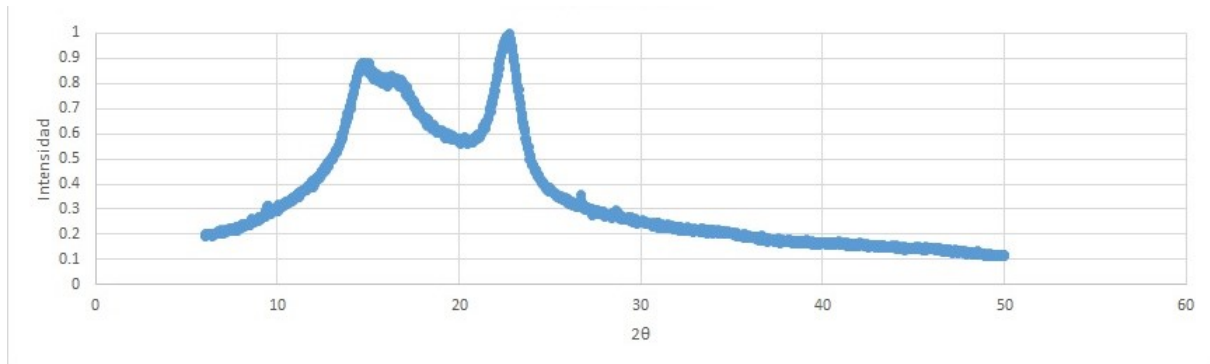


Figura 5.18: DRX membrana lavada con NaOH

### 5.1.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

Las curvas de pérdida de masa mediante el TGA son representadas en las Figuras 5.19, 5.21 y 5.23, para la membrana lavada con NaOH, la membrana lavada con agua y autoclavada, y la membrana lavada con agua sin autoclavar respectivamente.

Por otro lado, las Figuras 5.20, 5.22 y 5.24 muestran los gráficos de la primera derivada de la curva de pérdida de masa con respecto a la temperatura, para la membrana lavada con NaOH, la membrana lavada con agua y autoclavada, y la membrana lavada con agua sin autoclavar respectivamente.

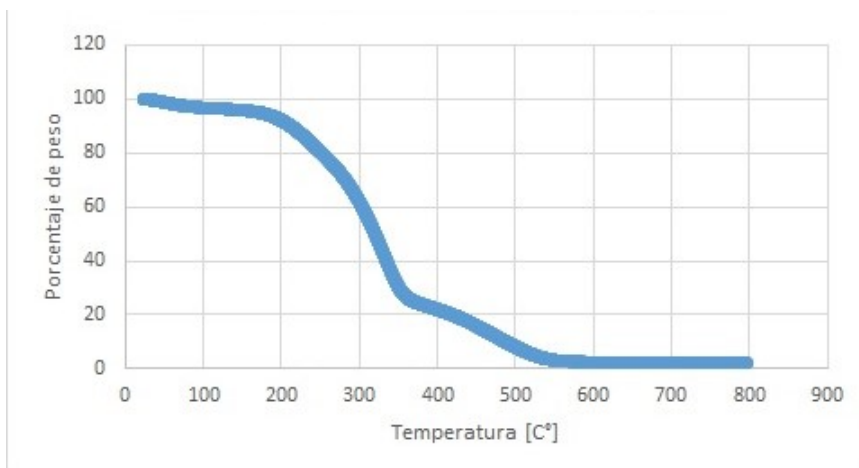


Figura 5.19: Curva de pérdida de masa de membrana lavada con NaOH, obtenida mediante TGA

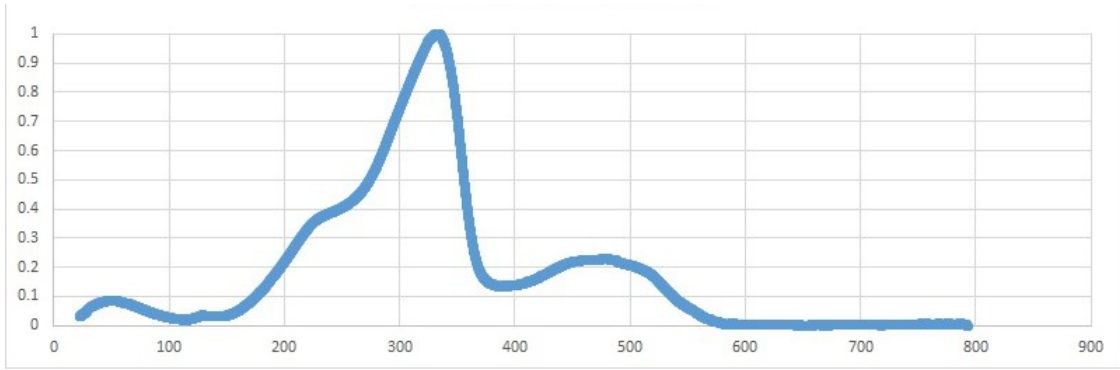


Figura 5.20: Primera derivada de la curva de pérdida de masa con respecto a la temperatura (derivada termogravimétrica) de membrana lavada con NaOH

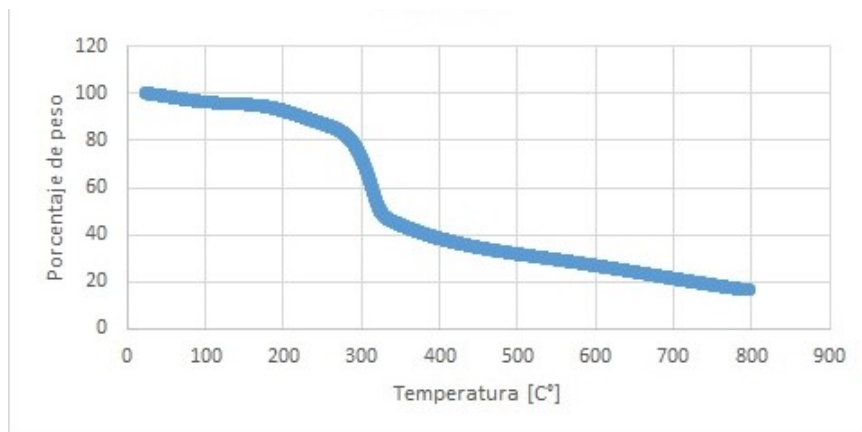


Figura 5.21: Curva de pérdida de masa de membrana lavada con agua destilada y autoclavada, obtenida mediante TGA

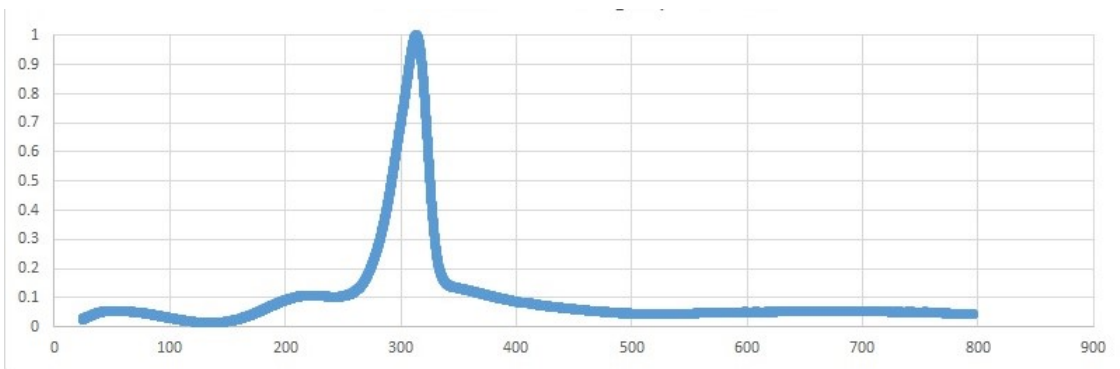


Figura 5.22: Primera derivada de la curva de pérdida de masa con respecto a la temperatura (derivada termogravimétrica) de membrana lavada con agua destilada y autoclavada

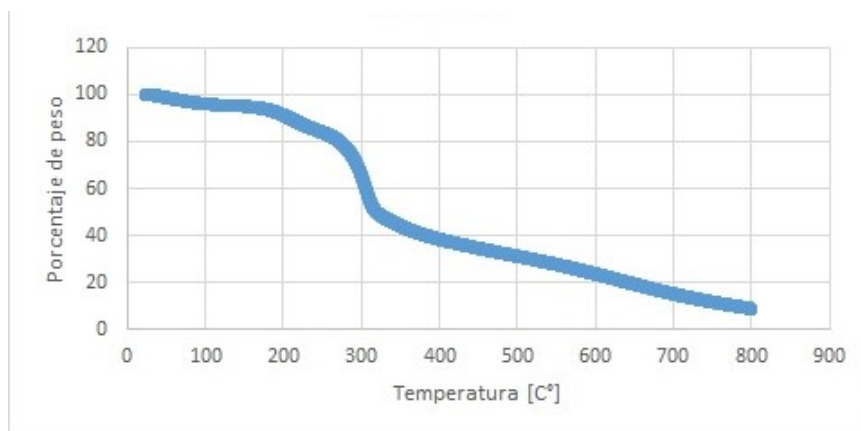


Figura 5.23: Curva de pérdida de masa de membrana lavada con agua destilada, sin autoclavar, obtenida mediante TGA

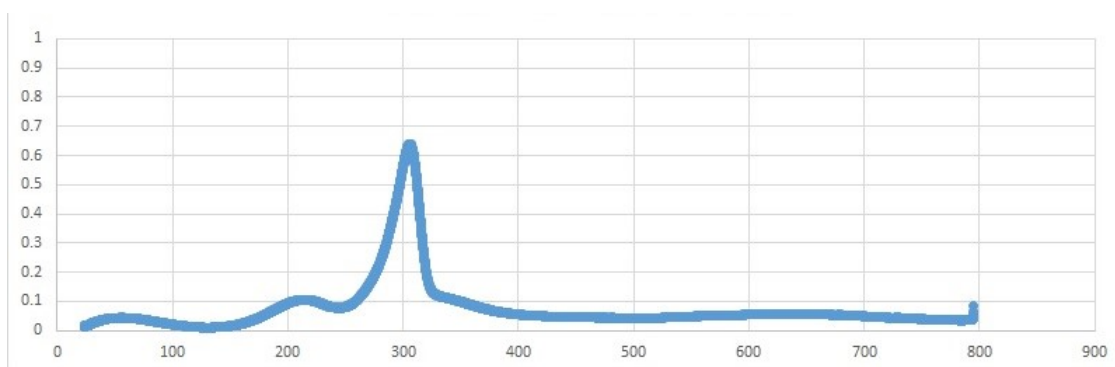


Figura 5.24: Primera derivada de la curva de pérdida de masa con respecto a la temperatura (derivada termogravimétrica) de membrana lavada con agua destilada, sin autoclavar

A continuación, se muestra la Tabla 5.2, que indica los diferentes cambios en el peso de las membranas cuando se aumenta la temperatura; al llegar a los 100°C, al perder el 20% del peso inicial y la temperatura final de descomposición.

Tabla 5.2: Resumen TGA de las membranas

Tratamiento	Pérdida de peso a 100°C (%)	Temperatura de descomposición [°C]	Temperatura de pérdida del 20% de peso [°C]
Lavado NaOH	96.75	332.17	251.31
Lavado agua destilada	95.97	305	271.88
Lavado agua destilada y autoclave	96.37	313	286.55

## 5.2. Incorporación

Antes de la incorporación, las membranas son prensadas, como se describe en la metodología. La Tabla 5.3 presenta los pesos de las membranas después del prensado.

Tabla 5.3: Peso de las membranas post prensado con diferentes tipos de lavados. NaOH (+): membrana lavada con NaOH y autoclavada, NaOH (-): membrana lavada con NaOH sin autoclavar, H2O (+): membrana lavada con H2O y autoclavada, H2O (-): membrana lavada con H2O sin autoclavar

	Peso [gramos]
Post prensa NaOH (+)	1.29 (+/- 0.52)
Post prensa NaOH (-)	1.42 (+/- 0.46)
Post prensa H2O (+)	0.83 (+/- 0.23)
Post prensa H2O (-)	0.78 (+/- 0.72)

A continuación, la Tabla 5.4 presenta la cantidad de solución incorporada por cada tipo de membrana lavada y cada tipo de incorporación. Esto se realiza restando el peso final de las membranas, descrito en Anexo F Tabla F.1 con el peso inicial de la Tabla 5.3. Además, se muestra el porcentaje (%) de peso recuperado, el cual indica la proporción entre el peso inicial de las membranas (es decir, el peso después de la prensa) y la cantidad incorporada (peso después de la incorporación), es decir, el rendimiento de absorción de las membranas.

Tabla 5.4: Cantidad de solución con ácido ferúlico absorbida y porcentaje de recuperación de masa de cada membrana y cada tipo de incorporación. NaOH (+): membrana lavada con NaOH y autoclavada, NaOH (-): membrana lavada con NaOH sin autoclavar, H2O (+): membrana lavada con H2O y autoclavada, H2O (-): membrana lavada con H2O sin autoclavar. Las celdas rosadas indican el tipo de membrana que tuvo una mayor cantidad de incorporación. Las celdas azules indican el tipo de membrana que recuperó mayor peso con respecto a su peso inicial después de la incorporación.

Tipo de incorporación	Tipo membrana	Cantidad incorporada [gramos]	% de peso recuperado
2 horas, 35°C	NaOH (+)	0.97 (+/- 0.33)	75.42
	NaOH (-)	2.42 (+/- 0.27)	170.26
	H2O (+)	1.33 (+/- 0.02)	159.86
	H2O (-)	2.03 (+/- 1.14)	260.99
2 horas, 50°C	NaOH (+)	2.52 (+/- 0.15)	195.47
	NaOH (-)	1.34 (+/- 1.20)	93.91
	H2O (+)	2.41 (+/- 1.18)	289.59
	H2O (-)	1.25 (+/- 0.32)	161.09
35 min, 35°C	NaOH (+)	1.48 (+/- 0.09)	114.75
	NaOH (-)	1.62 (+/- 1.43)	113.58
	H2O (+)	1.34 (+/- 0.12)	160.66
	H2O (-)	1.76 (+/- 0.83)	225.83
35 min, 50°C	NaOH (+)	1.66 (+/- 0.82)	128.46
	NaOH (-)	1.37 (+/- 0.92)	96.49
	H2O (+)	1.25 (+/- 0.85)	149.85
	H2O (-)	2.20 (+/- 1.30)	282.42

Por último, se muestran los resultados de la cromatografía en la Tabla 5.5. Esta indica la concentración final del ácido ferúlico en las soluciones post incorporación. Además, se calcula la desviación estándar de los datos, para analizar si los resultados tienen diferencias significativas.

Tabla 5.5: HPLC para cada metodología de lavado de membranas e incorporación de ácido ferúlico

Tipo de incorporación	Tipo de muestra	Concentración [g/L]
30 min, 50°C	NaOH (+)	3.05
	H2O (+)	2.84
	NaOH (-)	2.88
	H2O (-)	2.83
2 horas, 50°C	NaOH (+)	2.91
	H2O (-)	3.05
	H2O (+)	3.00
	NaOH (-)	3.04
2 horas, 35°C	NaOH (+)	3.06
	H2O (+)	2.88
	NaOH (-)	2.98
	H2O (-)	3.09
35 min, 35°C	NaOH (+)	3.07
	H2O (+)	2.97
	NaOH (-)	3.18
	H2O (-)	3.10
<b>Desviación estándar</b>		<b>0.10</b>

# Capítulo 6

## Discusión

A continuación se muestran las principales discusiones de la investigación, analizando los resultados obtenidos.

### 6.1. Metodologías de lavados

La utilización de dos tipos diferentes de lavado puede dar lugar a diferencias evidentes en el producto final.

El lavado con NaOH produce una membrana transparente (Figura 5.1), mientras que el lavado con agua da como resultado un producto final menos transparente y de tono más blanquecino (Figura 5.2).

La diferencia observada podría deberse al hecho de que el lavado con NaOH penetra de manera más efectiva en las membranas, lo que facilita la eliminación de impurezas y células, como consecuencia, se presenta una membrana transparente y homogénea. Durante el lavado con NaOH pueden ocurrir las siguientes interacciones bioquímicas, las cuales pueden explicar lo anterior:

- Desnaturalización de proteínas (Chávez Huerta, Acevedo, Valbuena, y Colina, 2016): El NaOH alcaliniza el medio, lo que puede provocar la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos presentes en la membrana de celulosa. Esto puede resultar en la pérdida de la estructura y función de estas biomoléculas, facilitando su eliminación de la membrana.
- Hidrólisis de ésteres (Fernandez, 2024): El NaOH puede reaccionar con ésteres presentes en la membrana de celulosa, como ésteres de ácidos grasos, desencadenando la hidrólisis de estos compuestos y rompiendo enlaces químicos. Esta reacción puede ayudar a eliminar compuestos no celulósicos que estén unidos a la celulosa a través de enlaces éster.
- Solubilización de impurezas: El aumento del pH debido al NaOH puede solubilizar ciertas impurezas y contaminantes presentes en la membrana, permitiendo que se disuelvan en el medio de lavado alcalino. Esto facilita su separación de la membrana de celulosa.
- Limpieza de superficie: El lavado con NaOH puede ayudar a eliminar partículas y contaminantes superficiales que pueden estar adheridos a la membrana.



Por otro lado, el lavado con agua es menos penetrante, lo que explicaría el color blanquecino y la presencia de marcas de colonias de bacterias en la membrana. Algunos de los efectos que podría tener el lavado con agua sobre la membrana serían:

- Eliminación de impurezas solubles: El agua caliente a 80°C puede ayudar a solubilizar y eliminar impurezas y contaminantes solubles en la membrana. Los componentes no celulósicos y las impurezas que son solubles en agua a esta temperatura pueden ser eliminados en el proceso de lavado.
- Pérdida de componentes no celulósicos: Si la membrana contiene componentes no celulósicos que son sensibles al calor o solubles en agua a esta temperatura, es posible que se eliminen o se vean afectados de alguna manera.

Por último, es posible observar de la Tabla 5.1 que el lavado con NaOH tiene un porcentaje de pérdida de masa inicial mayor que el lavado con agua. Esto podría deberse a la capacidad de interacciones químicas del NaOH explicadas anteriormente, lo que desprende más compuestos de las membranas, que luego son eliminados.

### 6.1.1. Análisis de características químicas y estructurales de las membranas (FTIR)

Los resultados de FTIR mostrados en la Tabla del Anexo E son comparados con 3 investigaciones de referencia (Navarro, 2018) (Wang et al., 2017) (Cortez, 2020), en las cuales se realizó el análisis de membranas bajo diferentes características de crecimiento y/o tratamientos de lavado.

- El mayor número de onda detectado es en la membrana sin lavar, de  $3271.02\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la vibración de estiramiento de O-H de celulosa I (Navarro, 2018), lo que coincide con pruebas realizadas a membranas producidas con la bacteria *Komagataeibacter sp.*, utilizando medio HS, en los papers de referencia (Wang et al., 2017) (Oh, Yoo, Shin, Kim, et al., 2005).
- El número de onda alrededor de  $2900\text{ cm}^{-1}$  indica la vibración de grupos C-H lo que corresponde al grado de cristalinidad de la membrana (Navarro, 2018). Además, es posible notar pequeñas diferencias entre los números, por ejemplo, las membranas lavadas con NaOH muestran un número de onda de  $2896\text{ cm}^{-1}$ , lo cual corresponde a celulosa de tipo II (Oh, Yoo, Shin, Kim, et al., 2005). Por otro lado, las membranas lavadas con agua destilada presentan un número de onda cerca de  $2918\text{ cm}^{-1}$ , lo que corresponde a celulosa de tipo I (Oh, Yoo, Shin, Kim, et al., 2005).
- Otro número de onda detectado corresponde a  $2359\text{ cm}^{-1}$ , el cual es común para todas las membranas (lavadas y sin lavar), lo que significa una vibración de estiramiento de los enlaces alquinos  $\text{C}\equiv\text{C}$ .
- El número de onda de  $2118\text{ cm}^{-1}$  solo se presenta para las membranas lavadas con agua destilada. Esto corresponde a enlaces  $\text{C}\equiv\text{N}$ , sin embargo, la banda tiene una apariencia muy débil, y puede no ser relevante para la interpretación del espectro (Cortez, 2020).
- Las membranas lavadas, con NaOH y con agua, presentan un número de onda de  $1737\text{ cm}^{-1}$ , lo que señala grupos carbonilos en la estructura, con vibración de estiramiento del grupo  $\text{C}=\text{O}$ .

- El espectro de 1627-1642  $cm^{-1}$  indica una curvatura de los enlaces H-O-H de agua absorbida (Oh, Yoo, Shin, y Seo, 2005). Estos enlaces están en las membranas lavadas y en la no lavada, lo que implica la presencia de agua en todas las membranas.
- Los números de onda alrededor de 1540  $cm^{-1}$  están presentes en la membrana lavada con NaOH sin autoclavar, agua con y sin autoclave, y membrana sin lavar. Esto corresponde al enlace amida N-H, y tiene relación con residuos de proteínas presentes en la muestra (Cruz, 2015). Es importante mencionar que la banda de la membrana lavada con NaOH tiene una apariencia débil en comparación a las demás, por lo que podría no ser relevante para esta muestra.
- El número de onda de 1426  $cm^{-1}$  está presente en todas las membranas, lavadas y sin lavar. Esto representa la flexión simétrica del enlace  $CH_2$  (Wang et al., 2017), y sugiere la presencia de Celulosa tipo I (Cruz, 2015).
- Los números de onda entre 1360-1370  $cm^{-1}$  corresponden a la deformación angular del enlace C-H (Cruz, 2015), y están presentes en la membrana lavada con NaOH y la membrana lavada con agua y autoclave (con una intensidad menor). Además, con este número de onda es posible medir el índice de cristalinidad, lo cual puede indicar una mayor o menor transparencia en la membrana, tal como puede verse en las Figuras 5.1 y 5.2.
- Las membranas lavadas con NaOH presentan números de onda de 1335  $cm^{-1}$ , que significa una deformación del enlace C-H o una curvatura en el plano O-H (Wang et al., 2017). Además, este número puede verse en otros resultados donde se lavaron las membranas con NaOH (Oh, Yoo, Shin, Kim, et al., 2005), destacando que solo se da cuando se utiliza esta base. Por último, este número corresponde a Celulosa I y II (Oh, Yoo, Shin, Kim, et al., 2005).
- El número de onda 1315  $cm^{-1}$  está presente en todas las membranas lavadas, y corresponde a movimientos vibracionales de los grupos  $CH_2$  fuera de plano (Wang et al., 2017).
- El número de onda 1233  $cm^{-1}$  solo se presenta en la membrana sin lavar, y responde a una curvatura de los enlaces COH, además de pertenecer al sistema cristalino de la Celulosa I (Oh, Yoo, Shin, Kim, et al., 2005).
- El estiramiento del puente asimétrico C-O-C es representado por el número de onda 1160  $cm^{-1}$  (Wang et al., 2017), y se encuentra en las membranas lavadas tanto con NaOH como agua. Este número corresponde a la Celulosa de tipo II (Oh, Yoo, Shin, Kim, et al., 2005).
- El número de onda alrededor de 1107  $cm^{-1}$  corresponde a enlaces C-C de las unidades monoméricas de polisacárido o vibración en los enlaces C-O (Wang et al., 2017). Estas propiedades se presentan únicamente en las membranas lavadas.
- Las membranas lavadas con NaOH sin autoclavar, y lavadas con agua, presentan un número de onda de 1055  $cm^{-1}$ , lo que indica una curvatura del enlace C-O-H (Oh, Yoo, Shin, Kim, et al., 2005).

- El número de onda de  $1033\text{ cm}^{-1}$ , presente en todas las membranas (lavadas y no lavadas), sugiere una vibración de los enlaces C-O. Este número también se presenta en pruebas de otros estudios, con la misma bacteria y el mismo medio de cultivo (Cruz, 2015), lo que puede indicar que este enlace es parte de la estructura profunda de la membrana, la cual no se puede modificar con los lavados.
- El número de onda  $665\text{ cm}^{-1}$  significa una curvatura de COH fuera del plano (Oh, Yoo, Shin, Kim, et al., 2005), esto se puede apreciar en las membranas lavadas, no obstante, estos peaks resultan ser de baja intensidad, por lo que no resultan relevantes en el estudio.

Es posible apreciar que la membrana de celulosa bacteriana sin lavar tiene, en su mayoría, atributos otorgados a la Celulosa tipo I o nativa (Navarro, 2018). No obstante, las membranas suelen ser polimorfas, lo que implica que pueden tener celulosa tipo I y II, pero con la dominancia de una de ellas.

Además, se puede observar que las membranas lavadas con NaOH muestran una dominancia de la celulosa tipo II. Esto se podría atribuir al proceso de mercerización, el cual explica que al someter las membranas a distintos tratamientos químicos, como el lavado con NaOH (Santos de Dios, 2015), estas dan lugar a distintos tipos de celulosa. Este proceso se aprecia en la Figura 6.1.

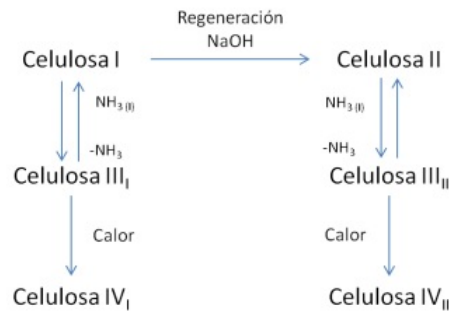


Figura 6.1: Interconversión de los polimorfismos de la celulosa (O'Sullivan, 1997)

### 6.1.2. Análisis de la morfología de la superficie de las membranas (SEM-EDX)

El análisis de las imágenes SEM permite observar las microfibrillas que componen la membrana de celulosa. Además, es posible notar las siguientes características:

- La magnificación a 120000x permite apreciar las fibrillas de cerca y como se entrelazan. En la Figura 5.5, se observan cuerpos alargados en forma de cilindro (Cruz, 2015), que son células de *Komagataeibacter xylinus*. Después del lavado, estas células ya no se observan en la membrana, lo que implica un lavado efectivo. La exposición prolongada de la célula al NaOH puede desnaturalizar las proteínas, lo que descompone a las bacterias. Por otro lado, el agua a altas temperaturas provoca el mismo efecto, y deja

sin actividad enzimática a la célula, provocando su descomposición y posterior solubilización. Sin embargo, esto es debido a la ya mencionada exposición prolongada, ya que las bacterias de este género son altamente resistentes, por ende, es posible que no se descompongan por completo con estas técnicas, sino que se desprenden de la celulosa a la que están adheridas, y con la agitación magnética se pueden eliminar por completo de la membrana.

- La magnificación a 30000x también permite observar las bacterias presentes en la membrana, únicamente antes del lavado (Figura 5.5), siendo muy similar a la microfotografía de la Figura 6.2, tomada en un estudio con la misma bacteria y el mismo medio de cultivo (HS) (Cruz, 2015):

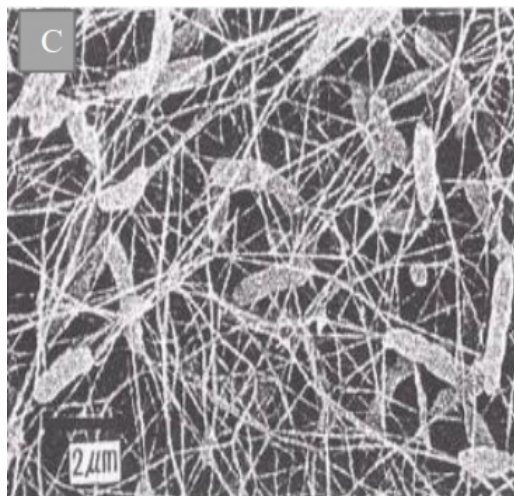


Figura 6.2: Microfotografía de referencia de membrana celulosa bacteriana (Cruz, 2015)

Comparando los resultados obtenidos con los de referencia, es posible afirmar que las bacterias están presentes de forma entrelazada en la membrana. Además, las microfibrillas no tienen un orden definido, entrelazándose aleatoriamente entre sí.

- La magnificación a 8000x permite observar de manera general el orden de las microfibrillas de la membrana. En la Figura 5.5 se aprecian las bacterias con forma de bastones. Por otro lado, las membranas lavadas con agua destilada presentan una superficie relativamente lisa, con algunas ramificaciones de microfibrillas más marcadas, no obstante, las membranas lavadas con NaOH muestran lugares con menor densidad de microfibrillas, lo que podría ser porosidad producida por el lavado.

El análisis EDX permite observar que los compuestos en común de todas las membranas son el C y el O. Esto tiene sentido ya que la fórmula de la celulosa es  $C_6H_{10}O_5$  (Cruz, 2015), y el Hidrógeno no puede ser detectado en estas pruebas.

Además, es posible notar que la membrana sin lavar presenta más componentes que las demás muestras, esto debido a que no pasó por procesos de lavado. También, el lavado de

membrana con NaOH presenta menos compuestos que el lavado con agua.

Por otro lado, los compuestos en común de la membrana sin lavar y las membranas lavadas con agua son: C, O, N, P, S, mientras que los compuestos en común de la membrana sin lavar y las membranas lavadas con NaOH son: C, O, Na.

Es posible observar que el Nitrógeno no es detectado únicamente en las membranas lavadas con NaOH, lo cual puede deberse a los siguientes motivos:

- Eliminación de contaminantes: El NaOH pudo haber eliminado contaminantes que contenían N, así como también impurezas orgánicas (restos de medios de cultivo, residuos celulares, lípidos, proteínas u otros), ya que el NaOH, al ser una base fuerte, puede solubilizar estas impurezas. Además, el NaOH puede hidrolizar enlaces químicos, transformándolos en productos más simples, y también puede eliminar productos adheridos en la superficie de las membranas, permitiendo que se desprendan. Lo anterior puede implicar la reducción o eliminación de la señal de N en los resultados.
- Modificación química: El NaOH puede causar eliminación de grupos funcionales que contienen N. Por ejemplo, puede reaccionar con aminas en una reacción de neutralización, lo cual forma agua y sales orgánicas solubles en agua (Marquez y Olivares, 2016). También reacciona con amidas, lo cual libera ácido carboxílico y amoniaco (Vallecilla, Zuluaga, Agudelo, Ríos, y Charry, 2018).

Asimismo, se detecta Ca únicamente en las membranas lavadas con NaOH, lo que puede tener las siguientes explicaciones:

- Presencia de sales o contaminantes: El Ca pudo estar asociado a sales que en el lavado fueron solubilizadas, lo que resultó en su detección en el EDX.
- Interacción del NaOH: La interacción química del NaOH con la membrana pudo haber liberado o movilizado el Ca presente en la muestra.
- Remoción de materia orgánica: El NaOH pudo haber eliminado materia orgánica que estaba ocultando la presencia de Ca en la membrana sin lavar.

Por último, es posible observar que todas las muestras contienen un pequeño porcentaje de oro, que varía entre 0.35 y 0.92. Esto puede deberse a contaminantes de nanopartículas de oro, que pueden estar tanto en las placas como en los equipos de laboratorio.

### **6.1.3. Análisis de las estructuras cristalinas de las membranas (DRX)**

Para realizar un análisis de los resultados DRX se ubican las 4 curvas de las diferentes membranas, como se muestra en la Figura 6.3.

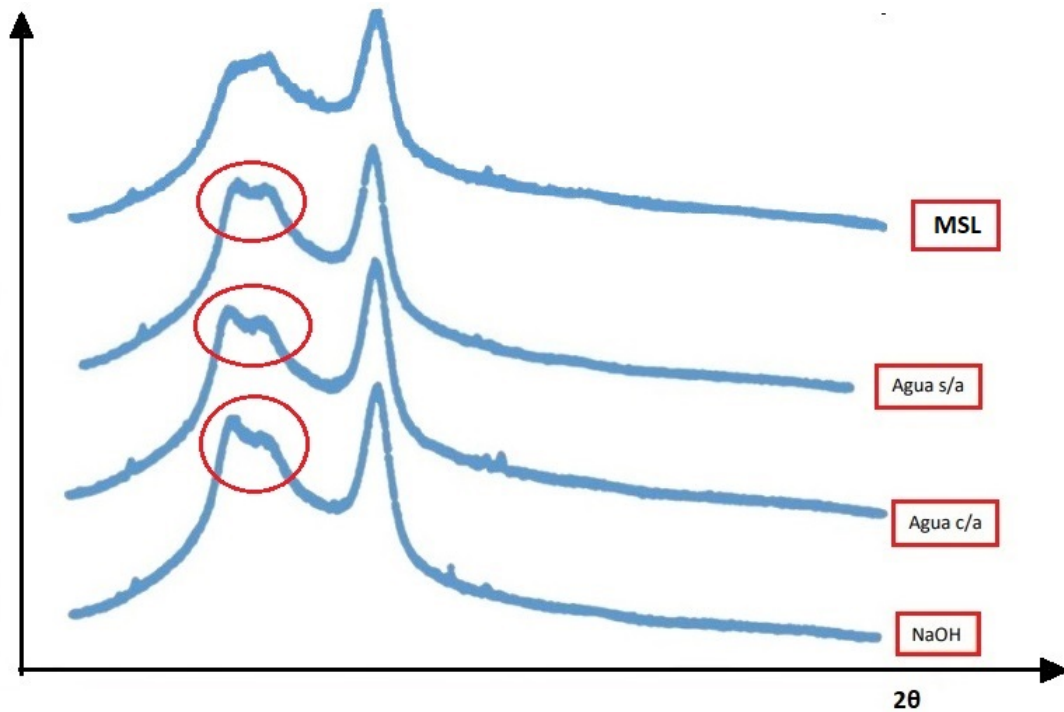


Figura 6.3: Comparación DRX de membrana sin lavar y 3 tipos de lavados. MSL: membrana sin lavar, Agua s/a: membrana lavada con agua sin autoclavar, Agua c/a: membrana lavada con agua y autoclavada, NaOH: membrana lavada con NaOH, sin autoclavar

Cuando las muestras producen curvas similares significa que tienen simetrías cristalinas, debido a que presentan los mismos patrones de difracción. Esto a su vez indica que los diferentes tipos de lavados no alteran significativamente la estructura cristalina principal.

Los peaks más agudos indican el nivel de cristalinidad de las muestras, además, entre más nítidos y prominentes, implica un mayor orden en las cadenas de celulosa.

Por otro lado, es posible observar en las membranas lavadas que hay 2 curvas superpuestas una después de otra, las cuales son marcadas con un círculo (Figura 6.3), lo cual puede tener las siguientes interpretaciones:

- Poliformismo de la celulosa: esto quiere decir que la membrana puede tener estructuras cristalinas de distintos tipos de celulosa, por ejemplo, puede tener formas cristalinas correspondientes a la celulosa I y celulosa II, es decir, contiene ambos polimorfos de celulosa.
- Cristalización parcial: esto sugiere que parte de la membrana está cristalizada y otra parte en estado amorfo (Nguyen Ngo et al., 2023).
- Grado de cristalinidad: el peak más pequeño podría presentar una fase menos cristalina, mientras que la otra una mayor concentración de cristalinidad (Castro et al., 2011). Esto puede indicar diferencias en la organización o en la concentración de la celulosa cristalina en diferentes partes de la membrana. Al ser las 4 muestras con curvas altamente similares, podría deducirse que esto es parte de la organización de la celulosa cultivada.

Además, es importante notar que la membrana sin lavar tiene solo 2 peaks, al analizar DRX de otros estudios, como es el caso de la Figura 6.4 con una membrana producida por la bacteria *Komagateibacter xylinum* (Nguyen Ngo et al., 2023):

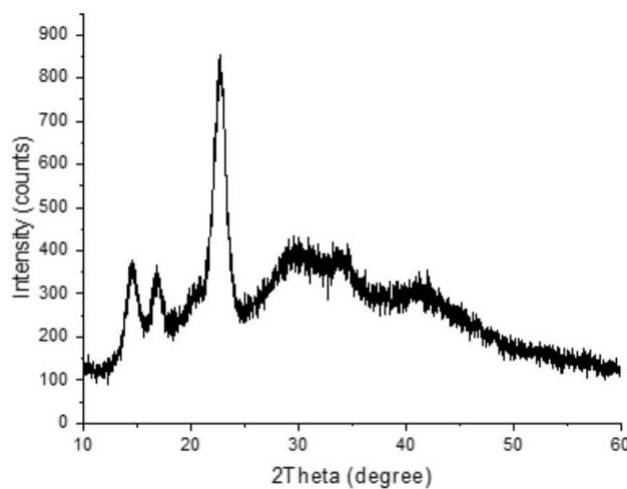


Figura 6.4: DRX de celulosa bacteriana sin lavar del estudio "Produciendo celulosa bacteriana a partir de lodos de desecho de papel reciclado industrial"(Nguyen Ngo et al., 2023)

Es posible notar que el resultado de la prueba de DRX sin lavar (Figura 6.4) muestran 3 picos sin superponerse, mientras que el resultado propio del estudio (Figura 5.15) tiene solo 2 peaks, uno con mayor grosor y más pequeño, por lo que se podría afirmar que las condiciones de crecimiento pudieron interferir en la cristalización completa de la celulosa.

#### 6.1.4. Análisis de la estabilidad térmica y la influencia de la composición de las membranas (TGA)

A una temperatura de 100°C, se registra una pérdida del 5% de la masa en todas las membranas. La temperatura más alta de descomposición alcanza los 332°C en las membranas lavadas con NaOH sin someterse al autoclavado. Por otro lado, la membrana que presenta una descomposición más rápida es aquella que ha sido lavada con agua destilada y no ha sido autoclavada.

Según las observaciones, se han identificado posibles razones que podrían explicar los resultados obtenidos, entre las cuales se incluyen la composición de la membrana, el contenido de humedad, la estructura y morfología (donde una mayor porosidad puede implicar una mayor sensibilidad a las temperaturas), la estabilidad térmica, y la presencia de contaminantes e impurezas.

Algunos posibles motivos por los cuales el lavado con agua es más sensible a la temperatura son:

- Contenido residual de agua: al lavar las membranas con agua, es probable que reten gan una mayor cantidad de este líquido, el cual es más sensible a las variaciones de temperatura.

- Efecto de la base NaOH: el lavado con NaOH puede presentar cambios en la estructura química y la morfología de la membrana. Además, puede provocar un aumento en la presencia de los grupos carboxilos.
- Eliminación de impurezas: al ser el lavado con NaOH un tratamiento más invasivo, este puede causar la eliminación de contaminantes que se pueden descomponer a temperaturas más bajas.
- Cambios en la estructura de la membrana: los distintos lavados pueden alterar la cristalinidad de la celulosa, y con esto, afectar su estabilidad térmica.

Por otro lado, el NaOH podría cambiar la estructura de la celulosa, y esto a su vez afectar la temperatura a la que se descompone. Lavar las membranas con una base fuerte puede provocar hidrólisis de los enlaces glucosídicos de la celulosa, lo que implica la ruptura de las cadenas de celulosa en unidades de glucosa (Auta et al., 2017). Esto aumenta la porosidad de la membrana, lo que puede explicar que la pérdida de masa sea más rápida al inicio.

Además, el NaOH puede provocar la saponificación de grupos acetilo, los cuales se encuentran en las cadenas de la celulosa bacteriana. Esta reacción convierte los grupos acetilos en grupos hidroxilo, los cuales se oxidan y se transforman en grupos carboxilo.

Los grupos carboxilos pueden actuar como estabilizadores de radicales libres y pueden inhibir las reacciones de degradación térmica. Los radicales libres tienen la capacidad de desencadenar reacciones de oxidación y degradación debido a su alta reactividad. Esto podría explicar que la temperatura de descomposición de la membrana lavada con NaOH sea más alta.

A continuación, se observa un gráfico donde se estudió el TGA con membranas cultivadas con carboximetil celulosa (CMC), y también membranas que posterior a la cosecha han sido reforzadas con óxido de grafeno (GO). Además, se comparan las muestras con la membrana sin ninguna modificación.



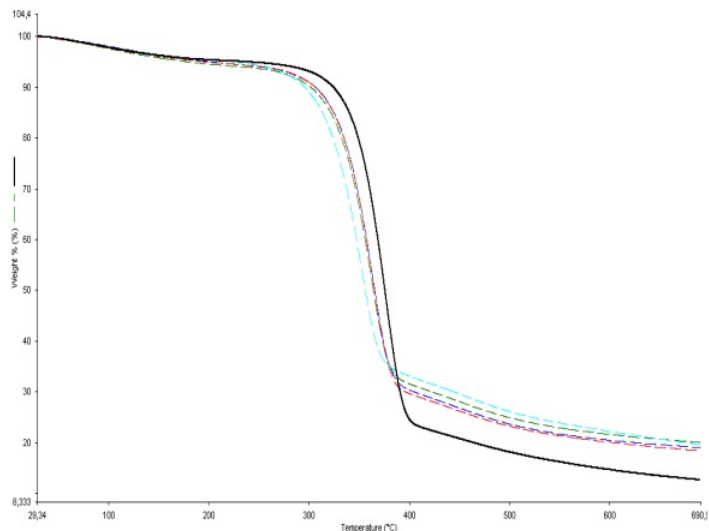


Figura 6.5: Curvas de TGA de las muestras de CB (negro), CB con GO (azul), CB con GO y CMC (rojo), CB con CMC (azul claro). CB: Celulosa bacteriana. GO: Óxido de grafeno. CMC: Carboximetil celulosa (Radoselovics Lahoz, 2016)

Esto permite observar que la concentración de algunos compuestos químicos pueden afectar la estabilidad térmica original de la membrana. En este caso, la membrana sin modificaciones tiene una degradación térmica a los 370°C, mientras que al tratarla con CMC la temperatura de degradación térmica disminuye a los 300°C, ya que esta aumenta el contenido de agua de las muestras (Radoselovics Lahoz, 2016).

Lo anterior podría explicar el motivo por los que la temperatura de descomposición es menor en las membranas lavadas con agua, esto debido a que durante el proceso, las membranas absorben el agua del lavado, lo que las hace más propensas a la inestabilidad térmica.

## 6.2. Análisis de la incorporación de ácido ferúlico a las membranas

En primer lugar, de la Tabla 5.3 se puede notar que el prensado permite eliminar el 76 % de la masa inicial de la membrana post lavado. Esto sirve para que la membrana pueda expulsar el exceso de líquido en su interior, y de esta forma, retener la solución que se busca incorporar.

Es posible observar que el método de incorporación con mayor cantidad de absorción de solución de ácido ferúlico, es de 2 horas a 50°C para la membrana lavada con NaOH y autoclavada. Luego, en segundo lugar, se tiene a la membrana lavada con NaOH sin autoclave, con la incorporación de 2 horas a 35°C. En el tercer lugar se encuentra la membrana lavada con H<sub>2</sub>O y autoclavada, con la incorporación de 2 horas a 50°C.

Por otro lado, también es posible notar que el porcentaje de peso recuperado es mayor en la membrana lavada con H<sub>2</sub>O y autoclavada, en la incorporación de 2 horas a 50°C, seguido de la membrana lavada con H<sub>2</sub>O sin autoclavar, en la incorporación de 35 minutos a 50°C.

Además, es posible observar que no hay diferencias significativas en los datos obtenidos del HPLC, debido a que su desviación estándar es de 0.1. Esto quiere decir que la membrana no absorbe selectivamente el ácido ferúlico, por lo tanto, el parámetro más importante a considerar para elegir un tipo de lavado de membrana e incorporación, es la cantidad neta de solución absorbida.

Se puede notar que, según los resultados obtenidos, al tener mayor absorción, implica una mayor cantidad de ácido ferúlico dentro de la membrana. En la Tabla 5.5 se aprecia una mayor capacidad de recuperación de peso en las membranas lavadas con agua (para autoclavadas y sin autoclavar), a pesar de que la cantidad neta incorporada sea menor. Por otro lado, la capacidad de recuperación de peso de las membranas lavadas con NaOH es menor, lo que podría deberse a que, al tener una porosidad mayor, la solución no puede retenerse dentro de la membrana como se retiene en las que están lavadas con agua.

Siguiendo lo anterior, es posible afirmar que el tipo de incorporación más conveniente es el de 2 horas a 50°C, ya que abarca la mayor cantidad incorporada para la membrana lavada con NaOH y autoclavada (2.52 gramos), seguida por la membrana lavada con agua y autoclavada (2.41 gramos), teniendo solo 0.1 gramos de diferencia entre las cantidades incorporadas. Además, la membrana lavada con agua y autoclavada presenta una capacidad de recuperación de masa del 289%, es decir, las 2 membranas absorben la misma cantidad en gramos, pero cuentan con distinto peso inicial, lo que implica que la capacidad de absorción de la membrana lavada con agua y autoclavada es mayor.

Debido al empate que se genera entre las 2 membranas mencionadas anteriormente, se deben analizar otras aristas para elegir la que se pueda adaptar de mejor manera a los objetivos requeridos. La Tabla 6.1 analiza las principales propiedades estudiadas de las membranas.

Tabla 6.1: Comparación de diversas características de las membranas obtenidas mediante diferentes condiciones de lavado

Cantidad de producto utilizado en el lavado	Estética de la membrana	Propiedades fisicoquímicas	Capacidad de absorción	Pérdida de masa post lavado
2 productos: NaOH y agua destilada	Transparente, más gruesa que membrana lavada con agua	Estabilidad térmica similar, mayor porosidad, estructura cristalina similar, cantidad de elementos similar	Porcentaje máx. de absorción: 195 %	44 % de la masa inicial
1 producto: agua destilada	Blanca y con menor grosor	Estabilidad térmica similar, menor porosidad, estructura cristalina similar, cantidad de elementos similar	Porcentaje máx. de absorción: 289 %	36 % de la masa inicial

Es posible notar que la mayor diferencia entre ambas membranas radica en la cantidad (número) de producto utilizado en el lavado y el porcentaje de absorción. Utilizando estos

criterios, la mejor membrana para incorporar ácido ferúlico y ser potencialmente aplicada en la piel es la membrana lavada con agua y autoclavada, con un tiempo de incorporación de 2 horas a 50°C. Esto debido a que solo necesita agua destilada para lavarse, no requiere bases fuertes, tiene una mayor capacidad de absorción y el lavado genera menor pérdida de masa.

# Capítulo 7

## Conclusiones

Con base a los resultados obtenidos, es posible concluir:

- El lavado con NaOH resulta en una membrana más transparente y homogénea, mientras que el lavado con agua resulta en un producto final menos transparente y de tono blanquecino. Esto podría ser porque el NaOH puede penetrar de mejor manera las membranas, reaccionando químicamente con proteínas y ésteres, mientras que el agua realiza una limpieza únicamente de impurezas solubles.
- Es posible afirmar la presencia de carbono y oxígeno en todas las membranas, debido a su estructura principal. La presencia de poros se observa en membranas lavadas con NaOH, y la presencia de bacterias únicamente en la membrana sin lavar.
- Las membranas lavadas tienen simetrías cristalinas con respecto a la membrana sin lavar, es decir, los diferentes lavados no afectan su estructura principal.
- El lavado afecta la estabilidad térmica de la membrana. El lavado con NaOH resulta ser el más estable.
- La mejor metodología de incorporación, considerando la cantidad de solución absorbida, es la de 2 horas a 50°C, para membranas lavadas con agua y autoclavadas, y también membranas lavadas con NaOH y autoclavadas.
- También es posible afirmar que la capacidad de recuperar el peso es mayor en las membranas lavadas con agua, es decir, tienen mayor capacidad de absorción.
- Por otro lado, el ácido ferúlico no se absorbe selectivamente en la membrana, teniendo la solución una concentración constante durante el proceso.

Es posible determinar que, para utilizar membranas de celulosa bacteriana en cosmética, el lavado con agua y autoclave resulta tener beneficios tanto en su estructura como en su capacidad de absorción. Además, su tratamiento de lavado permite que no haya peligro biológico en su aplicación.

# Capítulo 8

## Recomendaciones

Para continuar el estudio del uso de la celulosa bacteriana en cosmética, se recomienda lo siguiente:

- Analizar la liberación de ácido ferúlico desde la membrana hacia un medio que simule la temperatura, pH y porosidad de la piel.
- Evaluar diferentes sustratos para el crecimiento de membranas, como residuos agroindustriales, y su influencia sobre la producción de celulosa. De esta manera, su producción podría ser más sustentable y podría disminuir costos.
- Estudiar la estabilidad y compatibilidad, es decir, cómo la celulosa bacteriana interactúa con otros ingredientes comúnmente utilizados en cosméticos, como emulsionantes, conservantes, fragancias y agentes activos. Esto es crucial para garantizar que los productos cosméticos formulados con celulosa bacteriana sean estables y seguros para su uso.
- Analizar si el ácido ferúlico cambia el pH de la membrana, y si este podría afectar la piel.
- Probar la incorporación a la membrana de otros compuestos beneficios para la piel, y combinarlos con el ácido ferúlico. Por ejemplo, ácido salicílico o Vitamina C.
- Hacer más estudios sobre los tipos de estructuras de la celulosa bacteriana y su influencia en la capacidad de absorción.
- Estudiar que lavado gasta más energía eléctrica, con el fin de tener un criterio más al momento de decidir el lavado más conveniente.

# Bibliografía

- Almeraya, M., y Navarrete, A. (2021, Junio). Estudio teórico de las propiedades antioxidantes del ácido ferúlico a través del mecanismo de formación de aductos con el radical oh. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 7(7), 2448-6663. Descargado de <http://zaloamati.azc.uam.mx//handle/11191/9338>
- Auta, R., Adamus, G., Kwiecien, M., Radecka, I., y Hooley, P. (2017, March). Production and characterization of bacterial cellulose before and after enzymatic hydrolysis. *African Journal of Biotechnology*, 16(10), 470-482. Descargado de <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text/735516363098>
- Benedetti, J. (2024, Enero). *Estructura y funcionamiento de la piel*. Manual MSD Versión Para Público General. Descargado de <https://www.msmanuals.com/es/hogar/trastornos-de-la-piel/biolog%C3%ADa-de-la-piel/estructura-y-funcionamiento-de-la-piel>
- Bilgi, E., Homan Gokce, E., y Bayir, E. e. a. (2021, Sept.). Bacterial cellulose based facial mask with antioxidant property and high moisturizing capacity. *Cellulose*, 28, 10399–10414. Descargado de <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04106-z> doi: 10.1007/s10570-021-04106-z
- Bilgi, E., E. Homan Gokce, y Bayir, E. e. a. (2021, September). Bacterial cellulose based facial mask with antioxidant property and high moisturizing capacity. *Cellulose*, 28, 10399–10414. Descargado de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10570-021-04106-z>
- C., L. D., ., L. A., y ., C. A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 8(16), 307-335. Descargado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83524625012>
- Carreño, L. (2011). Efecto de las condiciones de cultivo y purificación sobre las propiedades fisicoquímicas y de transporte en membranas de celulosa bacteriana. (Trabajo de grado para optar a Doctorado. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. 150p.)
- Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J.-L., Caro, G., Mondragon, I., y Gañán, P. (2011). Structural characterization of bacterial cellulose produced by gluconacetobacter swing-sii sp. from colombian agroindustrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 84, 96-102. Descargado de <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.072> doi: 10.1016/j.carbpol.2010.10.072
- Chávez Huerta, A., Acevedo, S., Valbuena, A., y Colina, M. (2016). Extracción y caracterización de proteínas recuperadas en el proceso de producción de quitosano. *Revista Ibero-*

- americana de Polímeros*, 17(2), 102-109. Descargado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5373684>
- Cortez, P. M. M. (2020). Análisis de los espectros de infrarrojo. , 66-82. Descargado de <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/743>
- Cruz, K. (2015). Producción de celulosa microbiana a partir de cepas nativas de gluconacetobacter sp. obtenidas de diferentes fuentes en cultivo batch.  
(Para optar el Título Profesional de INGENIERO BIOTECNÓLOGO. Arequipa, Perú. Universidad Católica de Santa María. Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. 174p.)
- Das, S., y Wong, A. (2020, July). Stabilization of ferulic acid in topical gel formulation via nanoencapsulation and ph optimization. *Scientific Reports*, 10, 12288. Descargado de <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68732-6> doi: 10.1038/s41598-020-68732-6
- Didier Pedrosa De Amorim, J., Galdino Junior, C. J., De Santana Costa, A. F., Nascimento, H., Vinhas, G. M., y Asfora Sarubbo, L. (2020, Apr.). Biomask, a polymer blend for treatment and healing of skin prone to acne. *Chemical Engineering Transactions*, 79, 205-210. Descargado de <https://www.cetjournal.it/index.php/cet/article/view/CET2079035>
- El-Gendi, H., Taha, T., y Ray, J. e. a. (2022, July). Recent advances in bacterial cellulose: a low-cost effective production media, optimization strategies and applications. *Cellulose*, 29, 7495–7533. Descargado de <https://doi.org/10.1007/s10570-022-04697-1> doi: 10.1007/s10570-022-04697-1
- Fernandez, G. (2024). Hidrólisis de Ésteres. Descargado de <https://www.quimicaorganica.net/esteres-hidrolisis.html>
- Guillén, R. (2014). Síntesis y estudio teórico-experimental de las propiedades y mecanismos de oxidación de nuevos ésteres tipo bis- y tris- derivados de ácido ferúlico.  
(Universidad Veracruzana. Tesis para título de Maestro en Ciencias en Química Bioorgánica. Xalapa, Veracruz, México. Universidad Veracruzana. 119p.)
- Guinea, M. (2016). Diseño de planta piloto para producción de celulosa bacteriana.  
(Trabajo de Fin de Grado Ingeniería Química. Barcelona, España. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona. 92p.)
- Marquez, C., y Olivares, D. (2016). Clasificación de compuestos orgánicos por solubilidad. Descargado de [https://sites.google.com/site/organicaiii/quimica\\_organica/quimica-organica-iii-nueva/quimica-organica-iii-2009-2012/test-analisis-funcional-2011/e11\\_2011\\_1](https://sites.google.com/site/organicaiii/quimica_organica/quimica-organica-iii-nueva/quimica-organica-iii-2009-2012/test-analisis-funcional-2011/e11_2011_1)
- Navarro, M. (2018). Obtención de celulosa bacteriana a partir de gluconacetobacter sp. mediante fermentación de extractos de frutas de descarte.  
(Tesis de Ingeniero Ambiental. Lima, Perú. Universidad Católica Sedes Sapientiae. Facultad de Ingeniería Agraria. 106p.)
- Nguyen Ngo, T. T., Phan, T. H., Thong Le, T. M., Tu Le, T. N., Huynh, Q., Trang Phan, T. P., ... Nguyen, D. Q. (2023). Producing bacterial cellulose from industrial recycling paper waste sludge. *Heliyon*, 9(7), e17663. Descargado de <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17663> doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e17663
- Oh, S. Y., Yoo, D. I., Shin, Y., Kim, H. C., Kim, H. Y., Chung, Y. S., ... Youk, J. H. (2005,

- October). Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of x-ray diffraction and ftir spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 340, 2376-2391. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000862150500399X> doi: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.08.007>
- Oh, S. Y., Yoo, D. I., Shin, Y., y Seo, G. (2005, 28 February). Ftir analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. *Carbohydrate Research*, 340, 417-428. Descargado de <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.11.027> doi: 10.1016/j.carres.2004.11.027
- O'Sullivan, A. (1997, June). Cellulose: the structure slowly unravels. *Springer Link*, 4, 173–207. Descargado de <https://doi.org/10.1023/A:1018431705579>
- Pedro Jaramillo, A., Cuautle Ortíz, L., y Arrieta Hernández, J. (2023). Desarrollo de un pre-prototipo de la membrana del parche transdérmico reservorio a partir de celulosa bacteriana para la administración de insulina glargina. Descargado de <https://repositorio.iberopuebla.mx/handle/20.500.11777/5700?locale-attribute=en> (Expo Ibero Primavera 2023 [26].)
- Radoselovics Lahoz, (2016). Caracterización de las propiedades térmicas y dieléctricas de composites de celulosa bacteriana/carboximetilcelulosa/óxido de grafeno oxidado. (Trabajo fin de grado en Ingeniería Química. Valencia, España. Universidad Politécnica de Valencia. 93p.)
- Santos de Dios, S. M. (2015). Aplicación de la celulosa bacteriana a la restauración del patrimonio bibliográfico y documental en papel. (Tesis Doctoral. Madrid. Universidad Politécnica de Madrid. Departamento de Ingeniería y Gestión Forestal y Ambiental Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. 260p.)
- Shakeel, F., Salem-Bekhit, M. M., Haq, N., y Siddiqui, N. A. (2017, June). Solubility and thermodynamics of ferulic acid in different neat solvents: Measurement, correlation and molecular interactions. *Journal of Molecular Liquids*, 236, 144-150. Descargado de <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.04.014> doi: 10.1016/j.molliq.2017.04.014
- Vallecilla, K., Zuluaga, M., Agudelo, F., Ríos, E., y Charry, P. (2018, 18 septiembre). Semisíntesis de Ésteres y amidas a partir de un alcaloide obtenido desde ají (*capsicum annuum*). *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 9(3). Descargado de <https://www.executivebs.org/publishing.cl/avances-en-ciencias-e-ingenieria-vol-9-nro-3-aa%20b1o-2018-articulo-3/>
- Wang, S.-S., Han, Y.-H., Ye, Y.-X., Shi, X.-X., Xiang, P., Chen, D.-L., y Li, M. (2017, Sept.). Physicochemical characterization of high-quality bacterial cellulose produced by *komagataeibacter* sp. strain w1 and identification of the associated genes in bacterial cellulose production. *The Royal Society of Chemistry*, 7, 45145-45155. Descargado de <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA08391B>



# Anexos

## Anexo A. Estado del arte

### A.1. Lavados de membranas

A continuación, se muestra la Tabla A.1, la cual muestra un resumen de los distintos tipos de lavados de membranas que se hacen comunmente, reportados en literatura (Carreño, 2011).

Tabla A.1: Resumen lavados de membranas

AGENTE	CONC.	TEMP	TIEMPO (h)	REF
NaOH	0.1 M	60°C	4	Bäckdahla y colaboradores (2006)
Dodecil sulfato de sodio	4% v/v	70°C	3	Sokolnicki y colaboradores (2006)
NaOH	4% v/v	70°C	1	
NaOH	2% p/v	Ebullición	1	Yamanaka y colaboradores (1989)
NaOH	0.1% p/v	Ebullición	8	Yamamoto y colaboradores (1996)
NaOH	0.1N	80°C	0.33	Watanabe y colaboradores (1998)
NaOH	1% p/v	80°C	0.5	Shibazaki y colaboradores (1998)
NaOH	0.1% p/v	Ebullición	8	Hirai y colaboradores (1998)
NaOH	0.5 M	90°C	1	Son y colaboradores (2001)
NaOH	0.1% p/v	Ebullición	0.2	Caicedo y colaboradores (2001)
NaOH	0.25 N	80°C	2h	Wanichapichart y colaboradores (2002)
NaOH	0.1 M	90°C	0.5	Cheng y colaboradores (2002)
NaOH	sin saturada	T ambiente	48	Duvey y colaboradores (2002)
NaOH	0.3 M	100°C	0.08	Jung y colaboradores (2005)
NaOH	0.1N	90°C	0.5	Zuo y colaboradores (2006)
NaOH/KOH/Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.2 N	Ebullición	0.5	Zuo y colaboradores (2006)

## Anexo B. Metodología Lavado con NaOH

En primer lugar, se lavan las membranas con una solución de NaOH y agua destilada, en agitación magnética y 80°C. Es posible observar en la primera imagen de la Figura B.1 que la solución se torna de un color amarillo al insertar las membranas en la misma.

Luego, la membrana se extrae de la solución y se pone en otra solución fresca con las

mismas condiciones, durante 30 minutos. Es posible observar por la Figura que el agua al entrar en contacto con las membranas no cambia su color, y las membranas pueden notarse blanquecinas y transparentes.

Posteriormente, la membrana es lavada en agua destilada a  $80^{\circ}\text{C}$  para sacar cualquier exceso de NaOH, durante 30 minutos. Es posible observar en la Figura membranas transparentes y sin bacterias en su interior (lugares de color café).

Finalmente, se obtienen los resultados del lavado, los cuales se traducen en membranas altamente cristalinas, con una textura más seca y más delgadas que al inicio del estudio, como se puede observar en la Figura.

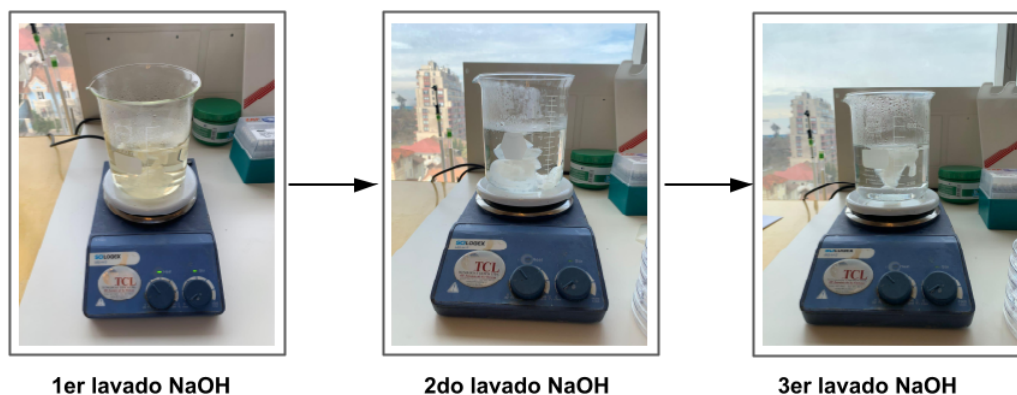


Figura B.1: Lavado NaOH

## B.1. Metodología Lavado con agua destilada

Se realiza el primer lavado con 600 mL de agua destilada a  $80^{\circ}\text{C}$ , con agitación magnética durante 1 hora. Una vez que entran las membranas al agua, esta se pone ligeramente amarilla.

Luego, se realiza el mismo procedimiento pero con agua destilada limpia. Es posible ver que las membranas están de un color marrón-blanquecino.

Posteriormente, se realiza lo mismo que en el segundo paso, dejando las membranas una hora más lavándose a  $80^{\circ}\text{C}$ . Es posible observar que las membranas están de un color blanco.

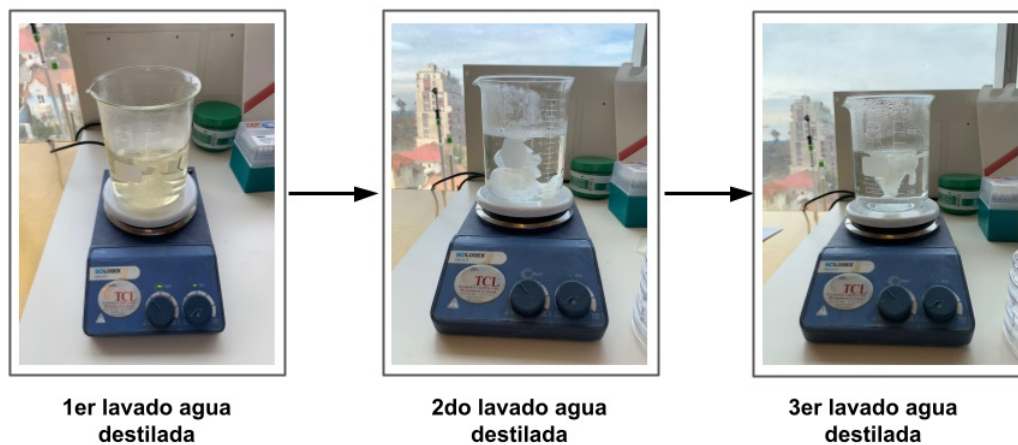


Figura B.2: Resultados de lavado con agua destilada

## Anexo C. Metodología Solubilización del ácido ferúli-co

A continuación, es posible notar el comportamiento de la solución de ácido ferúlico al 0.3%, variando su pH y temperatura, tal como se observa en la Figura C.1.

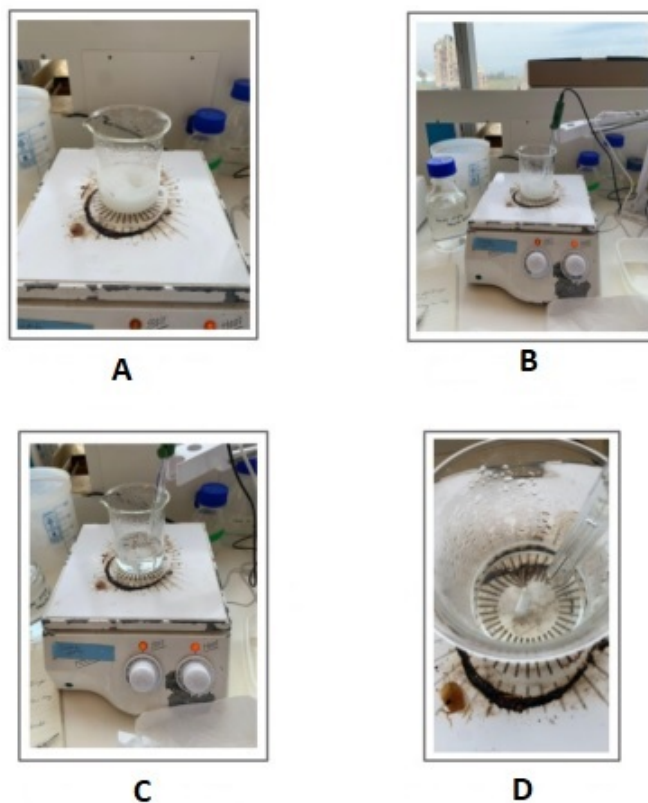


Figura C.1: Solubilidad ácido ferúlico a distintas temperaturas, con distintos pH. A: pH 4.13, 37°C. B: pH 4.3, 37°C. C: pH 5.1, 45°C. D: pH 5.1, 45°C

Al llegar a un pH de 5.5 y una temperatura de 50°C, es posible notar que el ácido ferúlico

se solubiliza por completo, dejando una solución transparente. Además, se mantienen estas condiciones a través del tiempo, para analizar el comportamiento de la solución, lo que se puede observar en la Figura C.2.

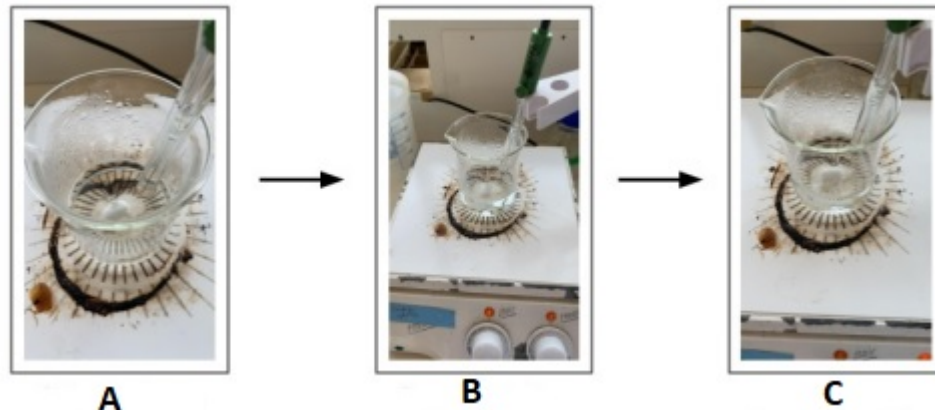


Figura C.2: Solubilidad ácido ferúlico a 50°C, con pH 5.5. A: 2 minutos desde la aplicación de NaOH, B: 5 minutos desde la aplicación de NaOH, C: 10 minutos desde la aplicación de NaOH

Para analizar si el ácido ferúlico se mantiene soluble con la temperatura de 50°C, se disminuye el pH con HCl, y es posible observar en la Figura C.3 que el ácido ferúlico se aglomera, volviéndose inmisible.

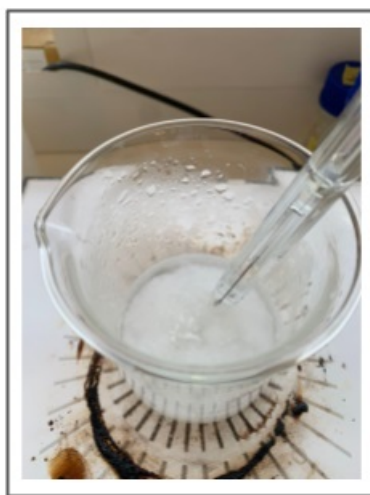


Figura C.3: Disminución de pH de 5.5 a 3.2, con HCl, a 50°C

Por último, la solución con pH 5.5 y completamente disuelta se extrae del calor, con el fin de notar si se aglomera a temperatura ambiente. Es posible observar en la Figura C.4 que el ácido sigue miscible en la solución.



Figura C.4: Solución ácido ferúlico a temperatura ambiente con pH 5.5

## Anexo D. Metodología previa a la Incorporación de ácido ferúlico

Antes de incorporar el ácido ferúlico, las membranas son prensadas para eliminar el exceso de agua en su interior. La Figura D.1 muestra la prensa utilizada.

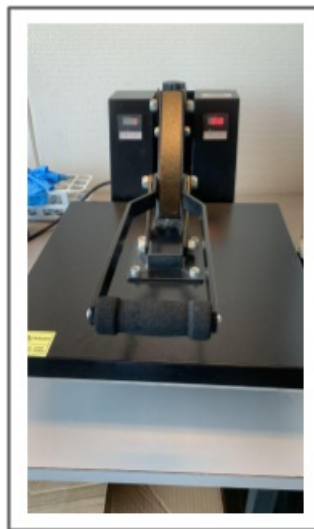


Figura D.1: Prensa a 55°C por 2 minutos

## Anexo E. FTIR

En las Figuras E.1 y E.2 se muestran los duplicados de los resultados de FTIR.

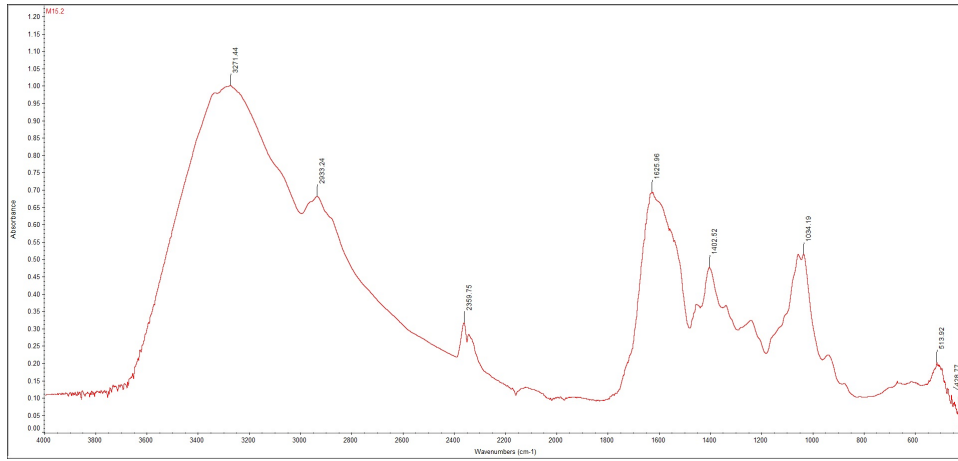


Figura E.1: FTIR membrana sin lavar, duplicado

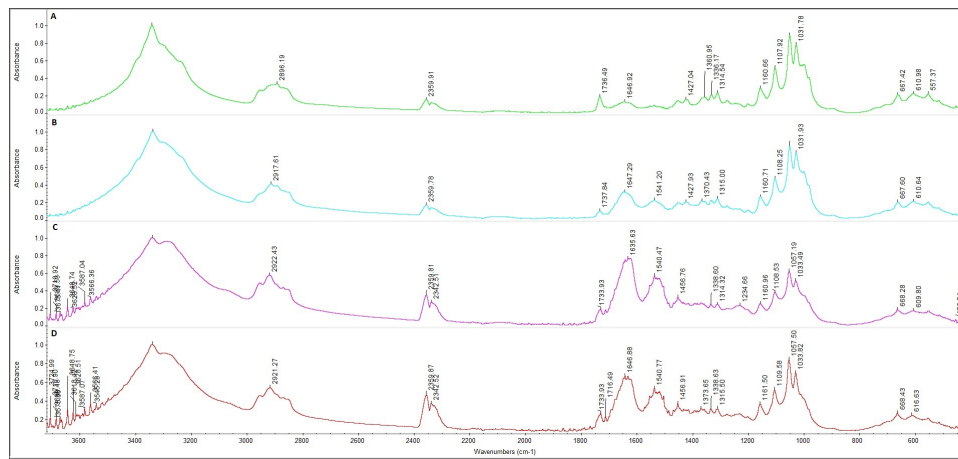


Figura E.2: FTIR comparación membranas con diferentes lavados, duplicado. A corresponde al lavado NaOH autoclavada, B corresponde al lavado NaOH sin autoclavar, C corresponde al lavado de agua autoclavada y D al lavado de agua sin autoclavar

A continuación se presenta la Tabla E.1, que asigna la longitud de onda de los resultados FTIR de cada membrana, a su grupo funcional correspondiente, complementando la información otorgada por las Figuras 5.3, E.1, 5.4 y E.2.

Tabla E.1: Análisis FTIR de membranas

N° Onda (cm <sup>-1</sup> ) Memb. NaOH (+)	N° Onda (cm <sup>-1</sup> ) Memb. NaOH (-)	N° Onda (cm <sup>-1</sup> ) Memb. H2O (+)	N° Onda (cm <sup>-1</sup> ) Memb. H2O (-)	N° Onda (cm <sup>-1</sup> ) Memb. AIMA	Grupo Funcional
-	-	-	-	3271.02	Vibración de estiramiento O-H
2896.8	2896.83	2919.41	2918.16	2933.24	Estiramiento de C-H de grupos CH2 y CH3
2359.78	2359.91	2359.23	2359.09	2359.75	Enlaces C≡C, vibración de estiramiento de los enlaces alquinos
-	-	2118.93	2118.81	-	Enlaces C≡N, vibración de estiramiento de los enlaces cianuros
1737.47	1737.69	1737.72	1737.71	-	Grupos carbonilo en la estructura, vibración de estiramiento del grupo C=O
1644.4	1644.3	1632.02	1632.46	1627.31	Curvatura H-O-H de agua absorbida
-	1541.2	1531.26	1536.81	1540.8	Enlaces C=C, vibración de estiramiento de los enlaces dobles
1425.98	1427.93	1454.36	1427.16	1402.9	Curvatura simétrica de CH2 o curvatura en plano de O-H



Nº Onda (cm <sup>-1</sup> ) Memb. NaOH (+)	Nº Onda (cm <sup>-1</sup> ) Memb. NaOH (-)	Nº Onda (cm <sup>-1</sup> ) Memb. H2O (+)	Nº Onda (cm <sup>-1</sup> ) Memb. H2O (-)	Nº Onda (cm <sup>-1</sup> ) Memb. AIMA	Grupo Funcional
1360.15	1370.43	1371.23	-	-	Curvatura de C-H
1335.88	1336	-	-	-	Deformación de C-H o curvatura en plano de O-H
1314.41	1314.65	1315.31	1315.14	-	Balanceo fuera de plano de los grupos CH2
1160.13	1159.58	1160.79	1160.75	-	Estiramiento de puente antisimétrico C-O-C de 1,4-b-D-glucósido
1107.64	1108.2	1108.97	1108.55	-	Enlaces C-C de las unidades monoméricas de polisacárido o vibración de curvatura C-O
-	1055.52	1056.83	1056.26	-	Curvatura del enlace C-O-H de carbohidratos o vibración esquelética del anillo piranosa C-O-C
1031.78	1031.8	1033.26	1032.83	1034.46	Enlaces C-O, vibración de estiramiento de los enlaces carbono-oxígeno
664.65	664.66	667.76	667.47	-	Curvatura fuera de fase O-H

## Anexo F. Incorporación

Tabla F.1: Peso [gramos] de las membranas lavadas después de diferentes tipos de incorporación. NaOH (+): membrana lavada con NaOH y autoclavada, NaOH (-): membrana lavada con NaOH sin autoclavar, H<sub>2</sub>O (+): membrana lavada con H<sub>2</sub>O y autoclavada, H<sub>2</sub>O (-): membrana lavada con H<sub>2</sub>O sin autoclavar

	35°C		50°C	
	35 min.	2 hrs	35 min.	2 hrs
NaOH (+)	2.77	2.26	2.94	3.81
NaOH (-)	3.04	3.85	2.8	2.76
H <sub>2</sub> O (+)	2.17	2.16	2.08	3.24
H <sub>2</sub> O (-)	2.53	2.81	2.97	2.03