



**Obtención de celulosa bacteriana como subproducto de un hongo de té para posterior  
obtención de biopelículas**

Dorado Chilibingua, Luis Estheben

Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

Trabajo de Unidad de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Petroquímico

Ing. Sayavedra Delgado, Jonathan Javier. Msc

25 de agosto del 2023

Latacunga

## Reporte de verificación de contenido





Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

### Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Obtención de celulosa bacteriana como subproducto de un hongo de té para posterior obtención de biopelículas" fue realizado por el señor **Dorado Chiliquinga, Luis Estheben**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Latacunga, 25 agosto del 2023

Ing. Jonathan Javier Sayavedra Delgado. Msc

C. C: 0502865850



Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

#### Responsabilidad de Autoría

Yo, **Dorado Chilibingua, Luis Estheben**, con cédula de ciudadanía n° 0401837083, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Obtención de celulosa bacteriana como subproducto de un hongo de té para posterior obtención de biopelículas"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Latacunga, 25 agosto del 2023

**Dorado Chilibingua, Luis Estheben**

C.C.: 0401837083



Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

#### Autorización de Publicación

Yo **Dorado Chilibinga, Luis Estheben**, con cédula de ciudadanía n° 0401837083, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Obtención de celulosa bacteriana como subproducto de un hongo de té para posterior obtención de biopelículas** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Latacunga, 25 agosto del 2023

**Dorado Chilibinga, Luis Estheben**

C.C.: 0401837083

## Dedicatoria

Este trabajo de investigación está dedicado a mis padres Fabio Dorado y Vianey Chiliquinga quienes con su amor y comprensión me han apoyado y guiado en mi etapa estudiantil. Durante este tiempo han estado conmigo en los buenos y malos momentos que he pasado, pero siempre con sus consejos me han ayudado a lograr cada uno de mis sueños. Gracias por su amor, comprensión y tiempo dedicado hacia mí.

A mis hermanos William y Favio quienes siempre han estado conmigo desde el inicio de mi carrera estudiantil hasta el final. Cada uno de ellos siendo una pieza clave para cumplir mi meta, brindándome su cariño y apoyo incondicional. De igual manera, a mi sobrina Micaela quien llegó a cambiar nuestras vidas con sus locuras.

A Vanessa quien ha estado conmigo y con su amor y cariño me ha apoyado en cada una de mis decisiones.

Estas personas han formado parte toda de toda mi etapa estudiantil y me han guiado para lograr mi sueño, por lo cual les dedico esta tesis con todo mi amor y gratitud.

## **Agradecimiento**

A mis padres, quienes se convirtieron en la pieza clave para guiarme durante toda mi carrera, por el apoyo incondicional que me brindaron sin importar los momentos adversos por los que he pasado, siendo el motor que impulsaba mis sueños a través de su amor y comprensión. Hoy finalizó mi etapa profesional, que estoy seguro de que no hubiera sido posible sin su apoyo, y les agradezco infinitivamente por creer en mí.

A mis hermanos con las que he convivido durante toda mi etapa estudiantil, donde me han brindado su apoyo y me han extendido su mano durante momentos complicados, gracias a ellos puede culminar mi etapa profesional, debido a que se convirtieron en mis segundos padres.

A Vanessa que, durante estos años juntos, hemos compartido momentos maravillosos siempre mostrándome su cariño y comprensión a pesar de la distancia, siendo esa persona que estuvo conmigo alentándome a concluir mis estudios.

Y finalmente el mayor agradecimiento a mi tutor Ing. Javier Sayavedra Delgado, quien sin haberme conocido me permitió desarrollar este trabajo de investigación bajo su dirección, compartiéndome todo su conocimiento y brindándome todo su apoyo.

**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>Carátula .....</b>	<b>1</b>
<b>Reporte de verificación de contenido.....</b>	<b>2</b>
<b>Certificación .....</b>	<b>3</b>
<b>Responsabilidad de autoría .....</b>	<b>4</b>
<b>Autorización de publicación .....</b>	<b>5</b>
<b>Dedicatoria .....</b>	<b>6</b>
<b>Agradecimiento.....</b>	<b>7</b>
<b>Índice de contenidos .....</b>	<b>8</b>
<b>Índice de tablas .....</b>	<b>13</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>14</b>
<b>Índice de ecuaciones .....</b>	<b>16</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>17</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>18</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>19</b>
<b>Capítulo I: Generalidades.....</b>	<b>20</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>20</b>
<b>Planteamiento de problema .....</b>	<b>21</b>
<b>Justificación e importancia .....</b>	<b>23</b>
<b>Alcance .....</b>	<b>24</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>24</b>
<b><i>Objetivo general</i> .....</b>	<b>24</b>
<b><i>Objetivos específicos</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>25</b>
<b>Variables de investigación.....</b>	<b>25</b>



<i>Variable dependiente</i> .....	25
<i>Variable independiente</i> .....	25
<b>Capítulo II: Marco teórico</b> .....	<b>26</b>
Química verde.....	26
Biopolímeros .....	26
<i>Celulosa</i> .....	27
<i>Tipos de celulosa</i> .....	28
Celulosa Vegetal.....	28
Celulosa Bacteriana. ....	29
<i>Diferencias entre la celulosa bacteriana y vegetal</i> .....	30
Características de Celulosa Bacteriana.....	31
<i>Biosíntesis</i> .....	31
<i>Estructura</i> .....	32
Métodos de cultivo de celulosa bacteriana .....	34
<i>Cultivo estático</i> .....	34
<i>Cultivo agitado</i> .....	35
Hongo de Té (Kombucha).....	35
Componentes del Hongo de Té (Kombucha) .....	36
<i>Te negro</i> .....	36
<i>Sacarosa</i> .....	37
SCOBY.....	38
Parámetros que influyen en el crecimiento de celulosa bacteriana .....	39
<i>Temperatura</i> .....	39
<i>pH</i> .....	39
<i>Tiempo de incubación</i> .....	40
Formación de biopelículas a partir de celulosa bacteriana.....	41

<i>Estabilizadores</i> .....	41
<i>Plastificantes</i> .....	43
<b>Aplicaciones de biopelículas a partir de Celulosa Bacteriana</b> .....	45
<i>Aplicación en la medicina</i> .....	47
<i>Aplicación en la industria alimenticia</i> .....	48
<b>Métodos de caracterización para la celulosa bacteriana y biopelícula</b> .....	49
<i>Ensayos mecánicos</i> .....	49
<i>Análisis Termogravimétrico (TGA)</i> .....	50
<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i> .....	51
<i>Espectroscopia infrarroja (IR)</i> .....	52
<b>Capítulo III: Metodología</b> .....	54
<b>Equipos, Materiales y Reactivos</b> .....	55
<i>Equipos</i> .....	55
<i>Materiales</i> .....	55
<i>Reactivos</i> .....	56
<i>Materia prima</i> .....	56
<b>Obtención de materia prima</b> .....	56
<b>Obtención del hongo de té inicial para la posterior réplica de tratamientos</b> .....	56
<b>Cultivo de celulosa bacteriana mediante un proceso de fermentación</b> .....	58
<i>Obtención</i> .....	58
<i>Extracción y purificación</i> .....	59
<i>Blanqueamiento y secado</i> .....	59
<b>Diseño experimental Celulosa Bacteriana</b> .....	60
<b>Preparación películas de Celulosa Bacteriana</b> .....	61
<b>Diseño experimental Biopelículas a partir de Celulosa Bacteriana</b> .....	62
<b>Preparación de biopelículas a partir de Celulosa Bacteriana</b> .....	63

Evaluación de celulosa bacteriana.....	64
<i>Determinación de la cantidad de celulosa bacteriana húmeda</i> .....	64
<i>Determinación de la cantidad de celulosa bacteriana seca</i> .....	64
<i>Rendimiento de celulosa</i> .....	64
<i>Capacidad de retención de agua (WAC)</i> .....	65
Caracterización.....	65
Pruebas fisicoquímicas.....	65
<i>Espesor</i> .....	65
<i>Determinación de la humedad</i> .....	66
<i>Solubilidad</i> .....	66
Ensayos mecánicos .....	67
<i>Esfuerzo máximo a la tracción y elongación</i> .....	67
Técnicas de análisis térmico .....	68
<i>Análisis Termogravimétrico (TGA)</i> .....	68
<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i> .....	69
Composición estructural .....	70
<i>Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	70
Capítulo IV: Resultados y Discusión .....	71
Formación de películas de Celulosa bacteriana .....	71
Evaluación de celulosa bacteriana.....	72
<i>Cantidad de CB húmeda</i> .....	72
<i>Cantidad de CB seca</i> .....	73
<i>Capacidad de retención de agua</i> .....	75
Análisis del diseño experimental .....	76
Rendimiento total y diario.....	79
Caracterización celulosa bacteriana .....	80

<i>Espesor</i> .....	80
<i>Humedad y solubilidad</i> .....	81
<i>Esfuerzo máximo a la tracción y elongación</i> .....	83
<i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i> .....	84
<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i> .....	86
<i>Espectroscopia FT-IR</i> .....	87
<b>Formación de biopelículas a partir de CB</b> .....	88
<b>Análisis del diseño experimental</b> .....	90
<i>ANOVA con respecto al esfuerzo máximo a la tracción (<math>\sigma</math>)</i> .....	90
<i>ANOVA con respecto al porcentaje de elongación</i> .....	93
<b>Caracterización biopelículas a partir de celulosa bacteriana</b> .....	97
<i>Espesor</i> .....	97
<i>Humedad y solubilidad</i> .....	98
<i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i> .....	99
<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i> .....	101
<i>Espectroscopia FT-IR</i> .....	102
<b>Aplicación potencial con referencia a las biopelículas</b> .....	103
<b>Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones</b> .....	105
<b>Conclusiones</b> .....	105
<b>Recomendaciones</b> .....	107
<b>Bibliografía</b> .....	108
<b>Anexos</b> .....	118

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> <i>Diferencias entre celulosa bacteriana y celulosa vegetal.</i> .....	31
<b>Tabla 2</b> <i>Efecto de los estabilizadores en la vida útil de biopolímeros.</i> .....	42
<b>Tabla 3</b> <i>Usos de CB en aplicaciones industriales.</i> .....	45
<b>Tabla 4</b> <i>Aplicaciones de celulosa bacteriana con materiales de refuerzo.</i> .....	46
<b>Tabla 5</b> <i>Longitud de onda IR.</i> .....	52
<b>Tabla 6</b> <i>Factores y niveles de experimentación.</i> .....	60
<b>Tabla 7</b> <i>Diseño Experimental celulosa bacteriana.</i> .....	61
<b>Tabla 8</b> <i>Tratamientos y niveles de experimentación.</i> .....	62
<b>Tabla 9</b> <i>Diseño Experimental en biopelículas a partir de CB.</i> .....	63
<b>Tabla 10</b> <i>Cantidad de celulosa bacteriana húmeda.</i> .....	73
<b>Tabla 11</b> <i>Cantidad de celulosa bacteriana seca.</i> .....	74
<b>Tabla 12</b> <i>Análisis de varianza Rendimiento de celulosa bacteriana.</i> .....	76
<b>Tabla 13</b> <i>Test de Tukey de celulosa bacteriana.</i> .....	79
<b>Tabla 14</b> <i>Rendimientos de producción de celulosa bacteriana.</i> .....	80
<b>Tabla 15</b> <i>Espesor películas de celulosa bacteriana.</i> .....	81
<b>Tabla 16</b> <i>Resultados de las pruebas mecánicas de CB.</i> .....	83
<b>Tabla 17</b> <i>Ensayos preliminares en la formación de biopelículas.</i> .....	89
<b>Tabla 18</b> <i>Análisis de varianza del esfuerzo máximo a la tracción.</i> .....	90
<b>Tabla 19</b> <i>Test de Tukey del esfuerzo máximo a la tracción.</i> .....	92
<b>Tabla 20</b> <i>Análisis de varianza en % elongación.</i> .....	93
<b>Tabla 21</b> <i>Test de Tukey en % elongación.</i> .....	95
<b>Tabla 22</b> <i>Resultados de las pruebas mecánicas en biopelículas.</i> .....	97
<b>Tabla 23</b> <i>Espesor promedio de las biopelículas.</i> .....	98

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Estructura molecular del monómero de la celulosa.</i> .....	27
<b>Figura 2</b> <i>Estructura molecular de celulosa bacteriana.</i> .....	29
<b>Figura 3</b> <i>Enlaces de celulosa bacteriana.</i> .....	33
<b>Figura 4</b> <i>Efecto del plastificante con relación a la dureza en biopolímeros.</i> .....	44
<b>Figura 5</b> <i>Gráfica de representación del análisis TGA.</i> .....	51
<b>Figura 6</b> <i>Plan de investigación.</i> .....	54
<b>Figura 7</b> <i>Diagrama de flujo del cultivo inicial de hongo de té.</i> .....	57
<b>Figura 8</b> <i>Medio de cultivo de celulosa bacteriana.</i> .....	58
<b>Figura 9</b> <i>Proceso de filtrado al vacío.</i> .....	59
<b>Figura 10</b> <i>Máquina de ensayos universales.</i> .....	67
<b>Figura 11</b> <i>Equipo de análisis TGA – PerkinElmer.</i> .....	68
<b>Figura 12</b> <i>Equipo de análisis DSC- Mettler Toledo.</i> .....	69
<b>Figura 13</b> <i>Película de celulosa bacteriana.</i> .....	71
<b>Figura 14</b> <i>Película de celulosa bacteriana húmeda.</i> .....	72
<b>Figura 15</b> <i>Películas de celulosa bacteriana seca.</i> .....	74
<b>Figura 16</b> <i>Capacidad de retención de agua en películas de CB.</i> .....	75
<b>Figura 17</b> <i>Diagrama de Pareto de celulosa bacteriana.</i> .....	78
<b>Figura 18</b> <i>Humedad y solubilidad en películas de celulosa bacteriana.</i> .....	82
<b>Figura 19</b> <i>Diagrama fuerza vs desplazamiento de celulosa bacteriana.</i> .....	84
<b>Figura 20</b> <i>TGA celulosa bacteriana.</i> .....	85
<b>Figura 21</b> <i>DSC celulosa bacteriana.</i> .....	86
<b>Figura 22</b> <i>FT-IR celulosa bacteriana.</i> .....	88
<b>Figura 23</b> <i>Biopelículas a partir de celulosa bacteriana.</i> .....	89
<b>Figura 24</b> <i>Diagrama de Pareto del esfuerzo máximo a la tracción.</i> .....	91

<b>Figura 25</b> <i>Diagrama de Pareto % de elongación.</i> .....	94
<b>Figura 26</b> <i>Gráfica de contornos.</i> .....	96
<b>Figura 27</b> <i>Humedad y solubilidad en biopelículas.</i> .....	99
<b>Figura 28</b> <i>TGA de la biopelícula.</i> .....	100
<b>Figura 29</b> <i>DSC de la biopelícula.</i> .....	102
<b>Figura 30</b> <i>FT-IR de la biopelícula.</i> .....	103

**ÍNDICE DE ECUACIONES**

<b>Ecuación 1.</b> Rendimiento total de CB.....	64
<b>Ecuación 2.</b> Rendimiento diario de CB.....	65
<b>Ecuación 3.</b> Porcentaje de adsorción de agua en CB. ....	65
<b>Ecuación 4.</b> Contenido de humedad en las películas.....	66
<b>Ecuación 5.</b> Solubilidad en agua de las películas.....	66
<b>Ecuación 6.</b> Esfuerzo máximo a la tracción.....	67
<b>Ecuación 7.</b> Elongación. ....	67



## **ABREVIATURAS**

**CB:** Celulosa bacteriana.

**SCOBY:** Colonias simbióticas entre levaduras y bacterias.

**NaOH:** Hidróxido de Sodio.

**CMC:** Carboximetilcelulosa.

**GLY:** Glicerol.

**R<sub>T</sub>:** Rendimiento total.

**R<sub>D</sub>:** Rendimiento diario.

**WAC:** Capacidad de adsorción de agua.

**MC:** Determinación de humedad.

**WS:** Solubilidad en agua.

**TGA:** Análisis termogravimétrico.

**DTG:** Curvas termogravimétricas.

**FTIR:** Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier.

## Resumen

El primer objetivo de la investigación es encontrar las mejores condiciones de cultivo estático, para aumentar el rendimiento de producción de celulosa bacteriana (CB), mediante un proceso de fermentación de hongo de té. Las películas de CB fueron cultivadas con una infusión de té negro, manteniendo constante el analito de hongo de té con un 2% de *SCOBY* y 5% de líquido fermentando, durante un tiempo de incubación de 7 días. Se implementó un diseño multifactorial de dos factores, para evaluar el efecto de la temperatura y la concentración de sacarosa. La película seleccionada obtuvo un peso de 0,97 g y un rendimiento del 0,39 %, y su medio de cultivo fue de 30 °C y 250 g de sacarosa, evidenciado de todas maneras un bajo rendimiento. La caracterización consistió en analizar: espesor, solubilidad, humedad, propiedades mecánicas y térmicas. El segundo objetivo de la investigación, es la obtención de biopelículas de CB con mejores propiedades mecánicas mediante la adicción de un estabilizador (CMC) y un plastificante (GLY). La formación de las biopelículas consistió en una suspensión de CB con concentración constante del 95%, se implementó un diseño multifactorial de dos factores para evaluar el efecto del CMC y GLY en la resistencia mecánica. Entonces, las biopelículas que presentaron mayor resistencia mecánica fueron las que se agregó 3% de CMC y 3% de GLY con valor de esfuerzo máximo a tracción de 21,16 MPa y una elongación de 25,81%. Mediante la caracterización fue posible establecer que las biopelículas obtenidas son útiles para el recubrimiento de alimentos con alto grado de humedad, por su bajo grado de solubilidad, resistencia, espesor y análisis FT-IR que mostró bandas pertenecientes al CMC y GLY cambiando ligeramente el espectro de la CB. Por lo tanto, es posible obtener biopelículas con excelentes propiedades mecánicas para ser usadas en algún sector industrial.

*Palabras clave:* celulosa bacteriana, hongo de té, biopelículas, carboximetilcelulosa, glicerol.

## Abstract

The first objective of the research is to find the best static crop conditions, which let to increase the production yield of bacterial cellulose (BC) through a tea fungus fermentation process. The CB biopolymers were cultivated with an infusion of black tea, keeping the tea fungus analyte constant at 2% and fermenting liquid at 5%, with an incubation time of 7 days. A multifactorial design of two factors was implemented to evaluate the effect of temperature and sucrose concentration to choose the biopolymer in the dry state with the highest amount of CB and the best performance. The selected biopolymer got a weight of 0.97 g and a yield of 0.39 %, and its culture medium was 30 °C and 250 g of sucrose, showing a low production in any case. The characterization consisted of analyzing: thickness, solubility, humidity, mechanical and thermal properties. The second objective of the research is to obtain CB biopolymers with better mechanical properties by adding a stabilizer (CMC) and a plasticizer (GLY). The formation of the biopolymers consisted of a suspension of CB with a constant concentration of 95%. A multifactorial design of two factors was implemented to evaluate the effect of CMC and GLY on mechanical resistance. Therefore, the biopolymers that presented the highest mechanical resistance were those added 3% CMC and 3% GLY with a maximum tensile stress value of 21,16 MPa and an elongation of 25,81%. Through the characterization, it was possible to establish that the biopolymers obtained are useful for coating foods with a high degree of humidity; due to their low degree of solubility, resistance, thickness, and FT-IR analysis showed bands belonging to CMC and GLY, slightly changing the CB spectrum. Therefore, it is possible to obtain biofilms with excellent mechanical properties to be used in any industrial sector.

*Keywords:* bacterial cellulose, tea fungus, biopolymers, carboxymethylcellulose, glycerol.

## Capítulo I

### Generalidades

#### Introducción

Hoy en día, ha crecido drásticamente la preocupación por el deterioro del medio ambiente, causados por el consumo global de plásticos en el convivir diario y la fabricación de los mismo, que es llevada a cabo principalmente a través de fuentes no renovables. Por ende, durante los últimos años la ciencia y la tecnología se han enfocado en erradicar este problema a través de investigaciones con el objetivo de promover el desarrollo de biomateriales sostenibles principalmente de fuentes renovables (Treviño-Garza et al., 2020). Por lo tanto, para la disminución de contaminantes ambientales a causa de los plásticos se ha implantado el uso de biopolímeros a partir de materiales orgánicos, que estos al contener unidades monoméricas unidas a través de enlaces covalentes han permitido la obtención de materiales similares a los polímeros sintéticos con la ventaja de ser biodegradables (Engström, 2019).

La celulosa ha pasado a ser considerada como el polímero natural con mayor abundancia sobre el planeta tierra, obtenido a través de fuentes de energías renovables como pueden ser plantas, madera, cáñamo, el lino y algodón (Portela et al., 2019). Es por eso, que durante las últimas dos décadas la producción de celulosa aumentó considerablemente por su disponibilidad logrando que en el 2016 superará una producción de 100.000 millones de toneladas anuales (Petrosian, 2021).

A partir de investigaciones realizadas de celulosa, se ha identificado que solo una pequeña parte está centrada en estudiar este biopolímeros a través de cultivos de microorganismos, como es el caso del Hongo de té, líquido fermentado entre el té negro o verde y sacarosa (fuente de carbono), formando una membrana en la interfase aire-medio de cultivo,

que se obtiene mediante un proceso de agrupación simbiótica de bacterias, que son las causantes de la producción de celulosa bacteriana, donde se ha identificado, que la bacteria *Acetobacter Xylinum* es la precursora para la formación de este biopolímero (Merchan & Tigre, 2019).

La celulosa bacteriana ha presentado atractivas propiedades que difieren de la celulosa vegetal principalmente en su grado de pureza, ya que la celulosa vegetal en la mayoría de casos se obtiene mezclada con lignina y hemicelulosa. En cuanto a sus propiedades resaltan su cristalinidad elevada, pureza, biocompatibilidad, hidrofiliidad y el hecho de no ser toxica ni alérgica ha permitido que tenga un mayor número de aplicaciones principalmente en la conservación de alimentos como en la medicina, siendo materiales biodegradables. No obstante, su uso no se ha generalizado en el campo industrial, debido a que su proceso de producción presenta un alto grado de ineficiencia, relacionada principalmente con el tiempo de fermentación que requiere su formación (Hernández, 2018).

Cabe resaltar que antes del 2015 la obtención de la celulosa bacteriana se ha basado a través de procesos empíricos, pero su demanda ha crecido exponencialmente. Por lo tanto, las investigaciones recientes sobre la celulosa bacteriana han sido enfocadas en encontrar las condiciones óptimas como son la temperatura, área superficial, pH, oxígeno disuelto, tipo de fuente de carbono (sacarosa) y volumen del medio, que permitan reducir el tiempo de fermentación, para lograr aumentar el rendimiento de la síntesis de celulosa bacteriana (Guerrero Medina et al., 2022).

### **Planteamiento de problema**

En la actualidad el uso de material sintético y no biodegradable ha aumentado drásticamente, estos datos irán creciendo paulatinamente con el transcurrir del tiempo, en consecuencia, en el 2017 de los 9.000 millones de TON plásticas que han sido producidas tan

solo el 9% ha sido reciclado, mientras tanto el otro 91% ha generado una contaminación severa hacia el medio ambiente. (Nikiema & Asiedu, 2022).

Hoy en día, los plásticos generados a través del petróleo presentan una gran problemática, debido a que dichos productos sintéticos no presentan la capacidad de degradarse, oxidarse o descomponerse a través de un proceso de reacción dentro de su entorno en el transcurso del tiempo. Estos productos presentan dentro de su estructura componentes que los hacen resistentes a la degradación. Es por eso que la Organización Mundial de la Salud (OMS) hace énfasis que los índices de contaminación ambiental han aumentado dramáticamente, dando como resultado que 9 de cada 10 personas inhalan aire toxico evidenciando que 7 millones de personas mueren por polución ambiental (Jiménez-Sánchez, 2021).

La producción de biopolímeros en el campo industrial a nivel mundial representa el 1% del total de casi los 320 millones de toneladas de plásticos que se producen durante un año, donde se tiene en cuenta una estimación a futuro que a partir del 2022 la producción de biopolímeros se lleve a cabo con una cifra cercana a los 2.44 millones de TON, ya que en el 2017 la obtención de este fue producto fue de alrededor de 2.06 millones de TON. Cabe resaltar que en América del Sur los países que se han dedicado a la fabricación de biopolímeros son: Colombia, Chile, Argentina y Brasil, pero en muy poca proporción; entre tanto en Ecuador no existe una empresa dedicada a dicha producción simplemente existen investigaciones centradas en su obtención a partir de residuos agrícolas o mediante procesos que conlleven hongos y bacterias (Riera & Palma, 2018).

Por lo tanto, en el Ecuador al no existir industrias enfocadas a la obtención de biopolímeros, en este caso especialmente la celulosa bacteriana, debe buscar alternativas para fomentar este proceso, ya que disminuiría la problemática de contaminación en el país, además

de generar nuevos campos de explotación económica o negocio alternativo, debido a que está a diferencia de la celulosa vegetal, como señala Hernández (2018) en su investigación se obtiene en estado puro, libre de otros polímeros y con una excelente resistencia mecánica.

### **Justificación e importancia**

Se tiene una necesidad en la creación de nuevos productos biodegradables que vayan enfocados en el desarrollo tanto de la ingeniería como la tecnología, que ayude a satisfacer las necesidades relacionadas al cuidado ambiental. De igual manera, la sociedad requiere que dichos productos tengan excelentes propiedades mecánicas y a nivel económico sean baratos. Por lo tanto, este estudio se centrará en buscar dichas propiedades y características a partir de compuestos de origen bacteriológico, para la obtención de biopolímeros. Donde el objetivo de estos productos es que sean duraderos y produzcan la menor contaminación posible hacia el medio ambiente

Uno de estos biopolímeros es la celulosa bacteriana que es una fibra natural de fuente de energía renovable, que debido a sus propiedades ha sido usada en varias aplicaciones enfocadas principalmente en la medicina y el recubrimiento de alimentos. Donde la primera se ha encaminado en el tratamiento de quemaduras a través de tejido vivo; en cuanto a la alimentación se basa en la obtención de biopelículas con la capacidad de retener gran cantidad de agua y humedad, permitiendo reducir el crecimiento de microorganismos en los alimentos minimizando la cantidad de oxígeno y agua en estos (Wahid & Zhong, 2021).

Por tal motivo, este trabajo se centrará en la obtención de celulosa bacteriana a partir de la fermentación de hongo de Té (kombucha), donde posteriormente será usada para la formación de biopelículas.

## **Alcance**

La investigación realizada tiene como objetivo determinar las condiciones óptimas que mejoren el rendimiento de la celulosa bacteriana obtenida mediante un proceso de fermentación de microorganismos (bacterias).

Posteriormente otro de los objetivos es mejorar las propiedades físicas de la celulosa bacteriana, como la resistencia a la tracción, elongación, solubilidad, entre otras, a través de técnicas de mezclado con plastificante y estabilizador, que permita promover una posible aplicación en el campo alimenticio, principalmente películas de recubrimiento de alimentos, y biodegradables para la conservación del medio ambiente.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Obtener celulosa bacteriana como subproducto de un hongo de té para obtención de biopelículas.

### ***Objetivos específicos***

Determinar la cantidad de celulosa bacteriana a través de un proceso de fermentación de hongo de té como precursor de biopelículas.

Identificar las propiedades estructurales de celulosa bacteriana mediante análisis fisicoquímicos para especificar las características del biopolímero.

Determinar una aplicación con la biopelícula generada de celulosa bacteriana según las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y estructurales en algún sector industrial.



## **Hipótesis**

Es viable la creación de biopelículas a partir de celulosa bacteriana obtenida por la fermentación del hongo de té.

## **Variables de investigación**

### ***Variable dependiente***

- Rendimiento de obtención de celulosa bacteriana.
- Solubilidad.
- Esfuerzo máximo a la tracción.
- Elongación.

### ***Variable independiente***

- Concentración fuente de carbono.
- Temperatura.
- Concentración de Carboximetilcelulosa (CMC).
- Concentración de Glicerol (GLY).

## Capítulo II

### Marco teórico

#### Química verde

La química verde tiene como propósito la reducción o eliminación de contaminantes presentes en sustancias elaboradas mediante un proceso químico o la obtención de materiales tóxicos hacia el medio ambiente y ser humano, por ende, trata de evitar la utilización de compuestos peligrosos no solo en materias primas sino también en reactivos, disolventes, subproductos y productos. La química verde se ha enfocado en el uso de materias primas provenientes de fuentes de energía sostenible para la creación de productos innovadores con las mismas propiedades o incluso mejoradas de aquellos producidos por recursos fósiles (Nasrollahzadeh & Sajjadi, 2021).

A través de la química verde se trata de obtener síntesis de productos en condiciones adecuadas que permita la reducción de requerimientos energéticos, mejorando la eficiencia mediante el uso de las diversas áreas químicas como por ejemplo la catálisis, generando sustancias más seguras y beneficiosas para el medio ambiente, ya que se obtendrán principalmente productos biodegradables.

#### Biopolímeros

Los biopolímeros son sustancias creadas a partir de organismos vivos y presentan características únicas como su resistencia mecánica, no toxicidad y biodegradabilidad. De forma similar, presentan grandes cadenas moleculares repetitivas en forma de bloques químicos que provienen de recursos renovables. Los biopolímeros han progresado drásticamente y sus características han impulsado su uso en diversas aplicaciones como la electrónica, medicina, recubrimiento de alimentos, etc. (Mohiuddin et al., 2017).

En función de una escala, los biopolímeros se pueden clasificar en categorías de la siguiente manera:

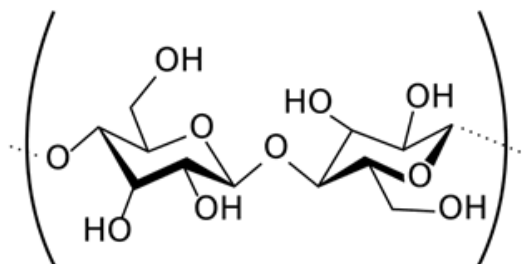
- Según su origen: sintético, natural y microbiano.
- Por degradabilidad: biodegradables y no biodegradables.
- Tipo de monómero: poliéster, polisacárido, proteínas y ácidos nucleicos.
- Respuesta al calor: elastómero, termoplástico, termoestable.

### **Celulosa**

La celulosa con formula química  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , es uno de los biopolímeros con mayor abundancia en el planeta, debido a que es obtenido y constituye el componente principal de las paredes celulares de las plantas o vegetales, pero igualmente se la puede sintetizar a través de algunas bacterias. La celulosa está formada por la unión de enlaces  $\beta$ -1,4 que hace referencia a los monómeros de la glucosa y además de ser un homopolímero de celulosa (Bai et al., 2019), tiene grupos hidroxilo están alineados de forma regular en la cadena polimérica de la celulosa Figura 1, lo que da lugar a la formación de puentes de hidrógeno generando propiedades cristalinas debido a su estructura fibrilar (Kögel-Knabner & Amelung, 2014).

### **Figura 1**

*Estructura molecular del monómero de la celulosa.*



*Nota.* La figura representa el monómero que forma la estructura de la celulosa. Tomado de Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinum*: Biosíntesis y aplicaciones (p.18), por Chavez et al., 2004, Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas.

Dependiendo de las distintas formas de extracción de celulosa, se obtiene diferentes propiedades de dicho biopolímero, donde una de las principales características de todas las extracciones es la resistencia mecánica. Así mismo, la caracterización de la celulosa presenta muchas propiedades fisicoquímicas relacionadas como son su alto grado de cristalinidad, despolimerización, capacidad de absorción, retención de agua, resistencia a la tracción, biocompatibilidad y biodegradabilidad (Havstad, 2020). Cabe resaltar que uno de los problemas que presentan los materiales procesados por la celulosa es la solubilidad limitada con solventes comunes y la limitante de difundirse (Lahiri et al., 2021).

### ***Tipos de celulosa***

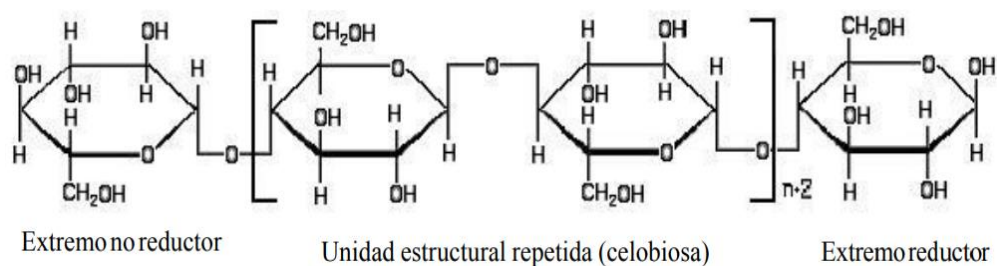
**Celulosa Vegetal.** La celulosa vegetal es un biopolímero de origen vegetal que se caracteriza por ser resistente, fibroso e insoluble al agua, que presenta un papel muy importante dentro del mantenimiento estructural de los vegetales principalmente en las paredes celulares, además siendo una barrera física protectora. Los enlaces poliméricos a través de la cadena de celulosa están conformados por microfibrillas que forma la pared celular vegetal. Además, esta estructura no solo ayuda en la estabilidad de la planta, sino que también se transforma en un biomaterial con altas propiedades mecánicas y de alta resistencia (Brigham, 2018).

**Celulosa Bacteriana.** La celulosa bacteriana es un tipo de biopolímero microbiano que se lo obtiene a partir de la fermentación de varios microorganismos, donde las bacterias que resaltan el proceso es del género *Acetobacter*. Además, químicamente está constituida por homopolisacáridos lineales formadas por unidades  $\beta$ -D-glucopiranososa unidos por enlaces covalentes al glucosídicos  $\beta$ -1,4, igualmente presenta dentro de su estructura grupos hidroxilo que forman parte de la cadena polimérica. La unión del al menos 10 de cadenas poliméricas forman microfibrillas, identificada en la Figura 2, que presentan dos características importantes como son: su polaridad en una sola dirección y que su grosor durante la unión de enlaces es variable dependiendo del cultivo (Chavez et al., 2004).

Se considera a la celulosa bacteriana como un producto completamente puro libre de cualquier otro tipo de sustancia, lo que permite que a partir también de su estructura y características fisicoquímicas sea apta para diferentes usos y aplicaciones (Lahiri et al., 2021).

## Figura 2

*Estructura molecular de celulosa bacteriana.*



*Nota.* La figura representa las cadenas estructurales de la CB para la formación del biopolímero. Tomado de Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinum*: Biosíntesis y aplicaciones (p.19), por Chavez et al., 2004, Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas.

En cuanto a las razones, del porque los microorganismos generan celulosa bacteriana aún en la actualidad sigue siendo tema de discusión, debido a que se presentan varias teorías, por ende, uno de los estudios señala que la formación de celulosa bacteriana se ve reflejada en el hecho de que los microorganismos aerobios generan una membrana para mantener una posición próxima a la interfase medio de cultivo-aire. De igual forma, otro postulado habla acerca de que los microorganismos tratan de evitar un contacto directo de entre el medio de cultivo y los rayos UV formando dicha película. Finalmente, se estipula que la formación de celulosa microbiana es para protegerse de agentes externos como iones de metales pesados para evitar alteraciones en su estructura, permitiendo que sus nutrientes sean aprovechados por difusión (García, 2017).

### ***Diferencias entre la celulosa bacteriana y vegetal***

La celulosa bacteriana presenta composición química semejante a la celulosa vegetal y la diferencia se centra principalmente en su conformación estructural, resaltando que la celulosa bacteriana presenta mayor grado de pureza, debido a que no existen rasgos de hemicelulosa y lignina durante su tiempo de formación, como ocurre en la celulosa vegetal. La celulosa de origen bacteriano presenta en su estructura cristales I $\alpha$  y I $\beta$  que hace que tenga mayor grado de polimerización que oscila entre 16.000 y 20.000 unidades, de la misma forma sus propiedades físico-químicas se diferencia por su elevado grado de cristalinidad, durabilidad, resistencia mecánica, maleabilidad y biocompatibilidad, dichas diferencias se especifican en la Tabla 1, permitiendo tener un mayor número de aplicaciones dentro de varios campos de la industrial con respecto a la celulosa de origen vegetal (Area & Park, 2017).

**Tabla 1**

*Diferencias entre celulosa bacteriana y celulosa vegetal.*

Característica	Celulosa Bacteriana	Celulosa Vegetal
Dimensiones de la cadena	70 - 133 nm	Pino: $3 - 7,5 \times 10^{-2}$ mm Abedul: $1,4 - 4 \times 10^{-2}$ mm
Grado de Polimerización	16.000 - 20.000	13.000 - 14.000
Módulo de Young (KPa)	4,9	Algodón: 0,085
Temperatura de Degradación (°C)	200 – 270	Algodón: 150

*Nota.* La tabla representa las diferencias estructurales y de caracterización entre la Celulosa bacteriana y vegetal. Tomado de Panorama de la Industria de Celulosa y Papel y Materiales Lignocelulósicos 2016 (p.50), por Area & Park, 2017, Libro digital PDF.

Sin embargo, este tipo de biopolímero de origen bacteriano tiene limitantes, debido a que su rendimiento y productividad es muy bajo, lo que ha llevado a imposibilitar su progreso a nivel industrial (Merchan & Tigre, 2019).

### **Características de Celulosa Bacteriana**

#### ***Biosíntesis***

El género *Acetobacter Xylinum* es un grupo de bacterias aerobias gramnegativas que promueven la producción de celulosa bacteriana a través de un proceso de fermentación, con alrededor del 50 % de rendimiento para su formación (Lahiri et al., 2021).

Una vez generado el medio de cultivo, el mecanismo de obtención pasa por varias etapas, donde en primer lugar las bacterias *Acetobacter* se desarrollan en gran población a partir de la absorción de oxígeno disuelto en la interfase aire-medio de cultivo, logrando producir celulosa líquida debido a la formación de turbidez. Cuando el oxígeno presente en la interfase se extingue las bacterias formadas en la superficie logran mantener una actividad de productividad de más bacterias, cabe resaltar que dichas bacterias son capaces de dividirse, con el objetivo de mantener un nivel más alto de productividad de celulosa bacteriana hasta lograr un equilibrio. Por otro lado, las bacterias que se encuentran fuera de la interfase, concretamente en el componente líquido tratan de adherirse al gel y las que no lo logran descienden hacia el fondo en un estado de inactividad. Por lo tanto, estas pueden reactivarse y ser utilizadas como un inóculo para un nuevo cultivo de celulosa bacteriana (Hernández, 2018).

Con respecto a la formación de celulosa bacteriana, ya sea en un medio de cultivo agitado o estático, es importante que los medios deben contener carbono y nitrógeno para dar inicio a la fermentación. Durante los primeros 10 a 14 días de formación, el espesor y el rendimiento de la celulosa bacteriana aumentará gradualmente, mientras que la tasa de crecimiento disminuirá luego de ese lapso de tiempo.

### **Estructura**

La celulosa bacteriana es un biopolímero de estructura lineal formado por la molécula celobiosa que presenta dos subunidades celulósicas discretas I y II. Asimismo, su estructura forma una malla 3D la cual evita cualquier tipo de contaminante microbiano. Cabe resaltar que su grado de polimerización está comprendido aproximadamente entre 16.000 - 20.000 nm y presenta un diámetro alrededor de 10 a 50 nm con una longitud de 100 a 1000 nm (Lahiri et al., 2021). Las propiedades estructurales antes mencionadas dependen estrictamente del método de cultivo, ya sea estático que genera una membrana en la interfase entre el medio de cultivo –



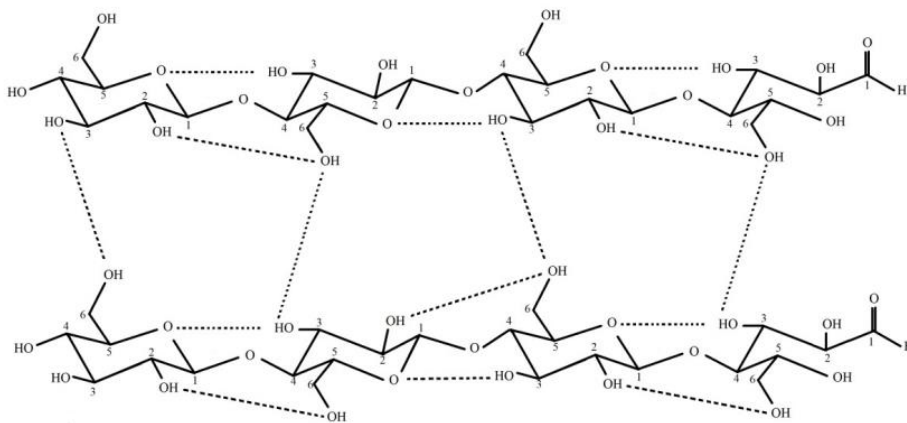
aire; mientras que el agitado conlleva una dispersión en el líquido a fermentar produciendo celulosa en forma de glomérulos (Area & Park, 2017).

La cadena polimérica  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 glucano precursora de celulosa bacteriana se encuentra en forma de fibrilla. Cada una de las cadenas poliméricas de glucano esta unidas mediante enlaces intramoleculares (intra) como intercatenarios (inter) de hidrógeno evidenciado en la Figura 3. (Esa et al., 2014). La existencia de dichos enlaces se debe a la presencia de átomos de oxígeno y grupos hidroxilo en grandes cantidades, permitiendo su alta cristalinidad (asociación de enlaces) por medio de puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals, donde se obtiene el desarrollo de nano fibras cristalinas, para la posterior formación de la estructura microfibrilar proporcionando a su vez la gran resistencia mecánica de la celulosa (Lahiri et al., 2021).

Por consiguiente, la celulosa bacteriana está caracterizada por las siguientes propiedades: alta retención de agua, excelente estabilidad mecánica y térmica, biocompatibilidad y biodegradabilidad; logrando obtener un biopolímero con un gran número de características que pueden ser indispensables y buen uso a nivel industrial (Esa et al., 2014).

### Figura 3

*Enlaces de celulosa bacteriana.*



*Nota.* La figura representa los diferentes tipos de enlaces intra e inter de hidrogeno en la CB. Tomado de Overview of Bacterial Cellulose Production and Application (p.144), por Esa et al, 2014, Agriculture and Agricultural Science Procedia.

### **Métodos de cultivo de celulosa bacteriana**

La obtención de celulosa bacteriana se realiza mediante la fermentación del hongo de té, que puede ser generada a través de dos medios de cultivo que son: estático y agitado. En cada uno de los procesos se obtiene celulosa bacteria con diferentes propiedades mecánicas descritos a continuación.

#### ***Cultivo estático***

El cultivo estático no presenta movimiento de partículas dentro del caldo durante el proceso de fermentación. La celulosa bacteriana se empieza a producir en la interfase aire-liquido en forma de película y dicha forma depende del recipiente en el cual se inició el proceso. Conforme se va desarrollando la fermentación se visualizan las primeras fibras cristalinas reticulares interconectadas de forma tridimensional, generando una película fina de celulosa bacteriana, donde su espesor dependerá del tiempo de incubación (Soriano & Barreto, 2018).

Las ventajas del medio de cultivo estático son: su alto rendimiento de productividad de celulosa bacteriana en largos periodos de tiempo, porque se obtiene mayor cantidad de enlaces C-H, debido a que este proceso está controlado por la dotación de carbono y aire, generando una mejor estabilidad genética relacionada entre las diferentes bacterias y levaduras producidas. De igual manera, presenta un mayor grado de polimerización y de cristalinidad, permitiendo que tenga mejores propiedades mecánicas, porque a través de diversos estudios se ha determinado que su valor de módulo de Young es elevado. Finalmente, para llevar a cabo este proceso se usan materias primas que presentan

geometrías fijas capaces de retener grandes cantidades de agua y una excelente resistencia a la tracción en medios húmedos mejorando el crecimiento (Lahiri et al., 2021).

Las desventajas de este proceso de fermentación se ven reflejadas principalmente en los largos periodos de tiempo para la incubación y colocarlo en grandes áreas superficiales para mayor rendimiento, por lo tanto, a escala industrial generar un mínimo de productividad de celulosa bacteriana.

### ***Cultivo agitado***

El cultivo agitado genera gran cantidad de oxígeno por el constante movimiento de partículas durante el proceso de fermentación, por ende, se obtiene celulosa bacteriana en lapsos menores de tiempo. Durante la fermentación de celulosa bacteriana esta se genera en forma de partículas suspendidas y distribuidas alrededor de todo el medio de cultivo, donde se las visualiza de diferentes formas como pueden ser: esférica, fibras suspendidas o esferas irregulares (Soriano & Barreto, 2018).

Aunque una de sus ventajas es su producción en menor lapsos de tiempo y dicha fermentación puede ser usada a una producción industrial, presenta diferentes deficiencias estructurales como la aparición de patógenos o mutaciones bacterianas debido a la agitación reduciendo su rendimiento y productividad. Además, presenta un grado de polimerización baja, así como de cristalinidad reduciendo sus propiedades mecánicas evidenciadas en el módulo de Young con un valor inferior en comparación con el de cultivo estático (Lahiri et al., 2021).

### **Hongo de Té (Kombucha)**

El hongo de Té más conocido como Kombucha es una bebida fermentada, para su elaboración es necesario el uso de agua purificada, té negro, sacarosa y la presencia de *SCOBY* que es un cultivo microbiano, donde la unión de estos elementos produce una

asociación simbiótica entre las bacterias y levaduras para formar la celulosa bacteriana en la interfase del cultivo. Para su desarrollo se requiere un rango de temperatura comprendido entre 20°C y 30°C, con un tiempo de cultivo de aproximadamente de 14 días (Ballesteros Pomar, 2018)

Cabe resaltar que durante la fermentación se obtiene una nueva capa de celulosa bacteriana sobre la anterior que es la del *SCOBY* que se usó para su obtención. Así mismo, dicha bebida fermentada usa microorganismos comprendidos entre levadura y bacterias que a través de la adición de glucosa promueven a la fermentación logrando que se obtenga beneficios para la salud durante su consumo ya que presentan antioxidantes, polifenoles, flavonoides (Villamar, 2021).

### **Componentes del Hongo de Té (Kombucha)**

#### ***Te negro***

El té negro, una planta que forma parte de la familia de las teáceas, se caracteriza por su alto grado de oxidación, logrando una mejor liberación de la teína durante la infusión, esto permite una mayor concentración de ácido glucónico durante la elaboración del hongo de té para la posterior obtención de celulosa bacteriana. El ácido glucónico se forma a través de la oxidación de la glucosa y tiene como función regular el pH durante el proceso de fermentación aeróbica entre las bacterias y el *SCOBY* (Corzo et al., 2015). Cabe resaltar que el té negro presenta gran cantidad de nutrientes y minerales que lo hacen diferente a otros extractos frutales.

Durante la infusión, el té negro produce taninos, que son polifenoles con grandes moléculas y complejas dentro de su estructura. Estos polifenoles mejoran el crecimiento de las colonias microbióticas en la interfase aire-medio de cultivo durante el proceso de fermentación,

debido a sus características condensantes. A su vez minimiza la incrustación de proteínas o levaduras hacia el interior de la biopelícula porque al ser un antioxidante previene que dentro del cultivo se genere radicales libres (Villamar, 2021)

El té negro ayuda a acelerar el proceso de fermentación reduciendo la formación de alcohol o ácido acético dentro del cultivo. Pero al usar en forma de infusión, se debe considerar algunos, como la cantidad de aceites o esencias que se vuelven volátiles durante la fermentación y pueden dañar la celulosa bacteriana por el cambio de la estructura generada en el caldo de cultivo (Cuadrado, 2019).

### **Sacarosa**

Para la fermentación del hongo de Té y la posterior obtención de celulosa bacteriana es importante una fuente de carbono, debido a que permite el crecimiento y desarrollo del metabolismo de todos los microorganismos vivos que forman parte del cultivo. A su vez las fuentes de carbono permiten la síntesis de glucosa mediante un proceso de gluconeogénesis; en consecuencia, hay que tomar en cuenta que al existir un exceso de concentración de carbono implica la no formación de celulosa bacteriana, debido a la formación de ácidos principalmente (ceto)-glucónicos ya que se reduce el pH del medio. Cabe resaltar que a través de esta condición se genera el punto iniciador para la fermentación del hongo de Té (Kombucha) (Aguilar, 2020).

Una de las principales fuentes de carbono es la sacarosa, que es la de mayor impacto a nivel de estudios para la fermentación del hongo de té, pero igualmente ahí que tomar en cuenta que existen otras fuentes como: fructosa, etanol, manitol y alimentos que presentan azúcares. Estudios recientes han permitido identificar que para la síntesis de celulosa bacteriana el sustrato más efectivo es la sacarosa con una concentración comprendida entre 50 y 250 g/L, debido a que se obtuvo un rendimiento correspondiente a un valor de 66.9% para

aquellos sistemas fueron cultivados con 90 g/L de sacarosa. Además de comprobar que un exceso de glucosa genera una mayor producción de ácido glucónico por la disminución de pH en el caldo de cultivo, lo que provoca condiciones desfavorables para la fermentación de bacterias (Engström, 2019).

## **SCOPY**

Para la obtención de celulosa bacteriana es necesario la elaboración de la bebida del hongo de té, debido a que es usada como una colonia macroscópica que se ubica en el caldo de cultivo para formar una matriz de celulosa bacteriana y dar inicio a su crecimiento. Cabe resaltar que dicha matriz está compuesta por diferentes tipos de bacterias acéticas como son las *Acetobacterium*, *Acetobacter Pasteurianus*, *Acetobacter*, *Bacterium Gluconicum*. De igual manera, existe diferentes grupos de levaduras donde los géneros que resaltan son los siguientes: *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces* (Maldonado, 2022).

El SCOPY está formado por la unión de bacterias acéticas y los diferentes géneros de levaduras, donde existe una interacción entre ellas, dando lugar a que las levaduras se alimenten de las diferentes bacterias presentes durante la fermentación del hongo de té y a su vez estas se alimentan de los subproductos utilizados en su elaboración, creando una nueva cepa de celulosa bacteriana (Machado, 2020). La simbiosis existente entre levaduras y bacterias permiten generar una barrera que evita la entrada de microorganismos o agentes patógenos que pueden alterar las condiciones de la formación de celulosa bacteriana. De igual manera, ayudan a reducir el pH, rompiendo las membranas celulares y bloqueando cualquier tipo de toxina que pueda dañar el líquido fermentado (Villamar, 2021).

## **Parámetros que influyen en el crecimiento de celulosa bacteriana**

### ***Temperatura***

Un de los aspectos más importantes durante la producción de celulosa bacteriana es el efecto de la temperatura, debido a que según (Lahiri et al., 2021) es el encargado de regular la adaptación de las bacterias, levadura y microorganismos dentro del medio de cultivo, prolongando su existencia al tener contacto con la fisiología homeostática normal. Los diversos estudios realizados han establecido que el rango óptimo para un mayor crecimiento y rendimiento de celulosa bacteriana está comprendido entre 20 a 30 °C durante el proceso de fermentación, debido a que mejoran la actividad enzimática.

Otro de los puntos a considerar en la temperatura es que al sobrepasar los 30 °C el medio de cultivo produce una desnaturalización que causa acidificación provocando que la película de celulosa bacteriana presente quemaduras. Por otro lado, cuando se reduce de los 20 °C el proceso de desarrollo disminuye y reduce el metabolismo celular, debido a la reducción de energía proporcionada. Según (Nava, 2016) el grado de polimerización y la capacidad de retención de agua se ven afectados cuando durante el proceso de fermentación de hongo de té ocurre una variación en el rango de temperatura ideal.

### ***pH***

Otro de los factores cruciales para la obtención de celulosa bacteriana es el pH, que oscila entre 4 y 7. Este rango permite mejorar las condiciones del medio de cultivo aumentando el rendimiento y promoviendo un crecimiento microbiano ideal. Es importante destacar que cada una de las bacterias presenta su rango de pH apropiado para mejorar su formación, en este caso el rango de pH de la bacteria *Acetobacter xylinum* está comprendida entre 5.4 a 6.3 (Engström, 2019).

El pH se ve afectado principalmente durante el proceso de fermentación cuando existe la conversión de glucosa a ácido glucónico. Este cambio refleja un significativo descenso cuando existe una relación inversamente proporcional que mayor cantidad de sacarosa, el pH reducirá. Como resultado, la alta concentración de sacarosa impide el crecimiento de celulosa bacteriana porque aumenta la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico, acético, glucónico) en el medio de cultivo. Por lo tanto, se usa un inóculo de líquido fermentado anteriormente obtenido para reducir la acidez y evitar la formación de agentes patógenos (Goh et al., 2012).

### ***Tiempo de incubación***

Comúnmente cuando se realiza un proceso de fermentación del hongo de té tiene un tiempo estimado de 7 a 60 días. Sin embargo, varios estudios, incluido el de (Villarreal-Soto et al., 2018) han demostrado que durante los primeros 15 días se puede lograr obtener una biopelícula de celulosa y un líquido fermentado de excelente calidad (2018). Por otro lado, el proceso de incubación puede tener actividad biológica y prolongarse por largos periodos de tiempo, pero esto no es beneficioso porque empieza la acumulación de ácidos orgánicos, lo que provoca quemaduras en la biopelícula de celulosa bacteriana.

Cuanto más prolongado sea el tiempo de incubación, mayor cantidad de CO<sub>2</sub> se produce, lo que dificulta la transferencia de nutrientes entre el medio de cultivo y la biopelícula de celulosa bacteriana en formación ya que el CO<sub>2</sub> genera un bloqueo. En el lapso de 7 a 15 días el hongo de té experimenta los cambios más importantes, lo que refleja en un crecimiento significativo de bacterias y levaduras dentro del caldo de fermentación, llegando a un máximo de rendimiento. A partir de ese momento, el crecimiento se ve afectado porque se ha consumido la gran parte de la fuente de carbono (sacarosa). Esto genera que ya no exista



energía dentro del medio de cultivo provocando la formación de ácidos orgánicos, que producen un sabor a vinagre (Jayabalan et al., 2014).

### **Formación de biopelículas a partir de celulosa bacteriana**

Las biopelículas de origen bacteriano son cepas de microorganismos que crecen a través de una matriz extracelular producidas por las mismas bacterias, hongos y levaduras. Se originan de una fuente renovable, donde su estructura presenta un alto peso molecular formado por varias unidades monoméricas. En cuanto a su característica principal su grado de degradación se lleva a cabo en periodos cortos de tiempo, pero siempre teniendo en cuenta las condiciones ambientales del medio donde se encuentre (Ortega-Peña & Hernández-Zamora, 2019).

La formación de biopelículas de origen bacteriano se basa en un mecanismo de defensa que generan las bacterias, hongos y levaduras dentro del medio de cultivo o en algunos casos como un almacenamiento de productos. Por otro lado, este tipo de biopolímeros generan mayor expectativa y aceptación a nivel industrial por sus múltiples usos y por ser sustentables con el medio ambiente con el fin de disminuir el uso de polímeros sintéticos generados a través de recursos fósiles.

### ***Estabilizadores***

Para la obtención de biopelículas o biopolímeros, se debe tener en cuenta que estos se degradan por diferentes reacciones químicas presentes en el medio que los rodean, por ende, es necesario el uso de sustancias denominadas estabilizadores. Estos productos ralentizan la degradación de polímero, porque reducen la actividad catalítica o limita la aparición de especies nocivas que podrían acelerar este proceso. La aplicación de los diferentes estabilizadores está estrechamente relacionada con el uso y actividad a que se aplique, donde

pueden alcanzar un tiempo de vida desde meses hasta cientos de años como se evidencia en la Tabla 2 (Gijsman, 2011).

**Tabla 2**

*Efecto de los estabilizadores en la vida útil de biopolímeros.*

Aplicación	Tiempo de vida útil
Embalaje	1 año
Automoción	De 15 a 20 años
Construcción	50 años
Ingeniería civil	200 años

*Nota.* La tabla representa el efecto de los estabilizadores en el tipo de vida útil en los biopolímeros en su respectiva aplicación. Tomado de Polymer Stabilization (p.375), por P. Gijsman, 2011, In Applied Plastics Engineering Handbook.

Uno de los principales objetivos de los estabilizadores es proteger a los biopolímeros durante largos periodos de tiempo, por ende, estos se agregan en mezclas o en aditivos. Así mismo, el rendimiento y la durabilidad de estos pueden verse afectados con el contacto con otros productos que generen reacciones químicas y loguen desactivar el estabilizador limitando su durabilidad.

La carboximetilcelulosa (CMC) o mejor conocida como goma de celulosa es un polisacárido que se sintetiza a través de la modificación de celulosa vegetal, donde existen enlaces entre grupos carboximetilo con grupos hidroxilo. La CMC forma enlaces de coordinación con ion divalente que le permite tener bajo grado de solubilidad en agua, elevada retención de agua, excelente resistencia a químicos o disolventes y principalmente inhibir la formación de ácidos. Estas características han hecho que la CMC pueda ser usada para la

obtención de películas en recubrimiento alimenticio, ya que no es tóxico y presenta un alto grado de biodegradabilidad y biocompatibilidad (Martínez-Pérez et al., 2019).

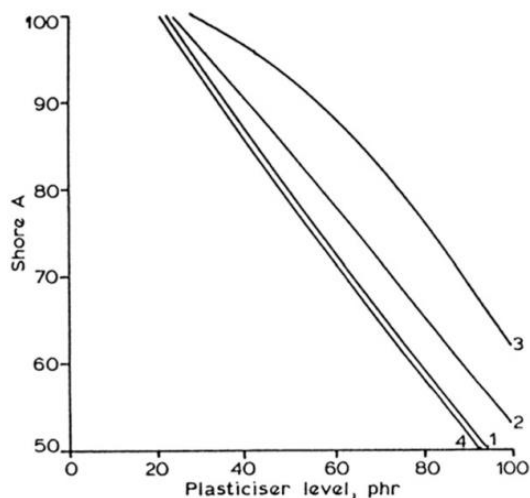
### ***Plastificantes***

Los plastificantes son compuestos de bajo peso molecular, moléculas orgánicas voluminosas y algo polares, que ayudan a mejorar las propiedades térmicas y mecánicas de los polímeros debido a que las modifican. El uso de los plastificantes se basa principalmente en mejorar la plasticidad y flexibilidad, debido a que son aplicadas en soluciones poliméricas, pero siempre que exista relación química entre ambos. Por ende, su objetivo principal es lograr que sus moléculas rompan los enlaces o interacciones polímero-polímero, introduciéndose en los espacios intermoleculares de las cadenas poliméricas individuales, debido a su bajo peso molecular (Foroughi-Dahr et al., 2017).

Los plastificantes disminuyen la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), propiedad que permite medir la movilidad de cadena de un polímero, permitiendo identificar cuál es la temperatura a la que el material polimérico se convierte de duro y vítreo a blando y gomoso. Por lo tanto, una concentración elevada de un plastificante disminuye la dureza y resistencia a la tracción, mientras incrementa su flexibilidad de los polímeros, evidenciando en la Figura 4. (Chaudhary et al., 2016).

## Figura 4

*Efecto del plastificante con relación a la dureza en biopolímeros.*



*Nota.* La figura representa el efecto de los plastificantes en relación a dureza en los biopolímeros. Tomado de Plasticized PVC (p.3), por Chaudhary et al, 2016, In Reference Module in Materials Science and Materials Engineering.

El glicerol ( $C_3H_8O_3$ ) es un alcohol que en su estructura presenta tres grupos de hidroxilos. Es una sustancia líquida, viscosa, incolora y lo más trascendental que no es tóxico, permitiendo su uso en la obtención de películas para recubrimiento de alimentos. De igual manera sus propiedades físicas son: densidad  $1,261 \text{ g cm}^{-3}$ ; punto de fusión  $18,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ; punto de ebullición  $290 \text{ }^\circ\text{C}$ .

En la actualidad existen gran cantidad de compuestos usados como plastificantes, uno de los más usados es el glicerol para la elaboración de biopelículas principalmente biodegradables, esta sustancia presenta las siguientes propiedades: capacidad alta de plastificación, mejorando la interacción con el polímero que permite que el material se convierta en higroscópico aumentando la absorción de humedad del ambiente. Así mismo, presenta un bajo valor de volatilidad que permite una mejor compatibilidad con los enlaces intra e inter de

hidrogeno para formar un material más estable. Finalmente, gracias a los tres grupos hidroxilos le permite ser soluble en agua y alcoholes (Arrieta et al., 2018).

El uso del glicerol como plastificante, favorece a la reducción de fuerzas intra e intermoleculares, debido a que incrementa la movilidad de las cadenas poliméricas del biopolímero y gracias a su estructura ayuda a la reducción de energía superficial en la solución polimérica en estado acuoso (Arrieta et al., 2018).

### **Aplicaciones de biopelículas a partir de Celulosa Bacteriana**

La celulosa bacteriana producida por fermentación de hongo de té se distingue por sus propiedades fisicoquímicas, que incluyen una excelente estabilidad química, resistencia mecánica, alta pureza, alto grado de cristalinidad, no toxicidad, biocompatibilidad, transparencia y capacidad de retención de gran cantidad de agua. Como se establece en la Tabla 3, este tipo de biopolímeros ha crecido durante los últimos años a nivel industrial destacando su uso en el ámbito médico, alimenticio, como disolvente en el campo minero, industria textil, como papel, tratamientos de residuos, etc. (Chawla et al., 2009).

**Tabla 3**

*Usos de CB en aplicaciones industriales.*

Industria	Aplicaciones
Cosmética	Estabilización de emulsiones, acondicionadores, cremas.
	Generación de uñas artificiales.
Textil	Alta absorción acuosa en materiales.
Refinería	Materiales que permitan la absorción de toxinas y aceites.
Papel	Obtención de papel de mayor resistencia y mejor calidad.
	Restauración de documentos científicos.

Industria	Aplicaciones
Alimentos	Biopelículas para el recubrimiento de alimento para mejorar su conservación.
Investigación	Inmovilidad de proteínas y células. Resinas para cromatografía.
Tecnología	Gomas o cauchos de alta sensibilidad en micrófonos o audífonos Procesamiento de piel artificial para implementar en quemaduras.
Medicina	Obtención de implantes dentales

*Nota.* La gráfica representa los diferentes usos de CB en aplicaciones industriales. Tomado de la Determinación del rendimiento y caracterización de la producción de celulosa bacteriana de Kombucha (p.36), por L. Hernández, 2018, Tesis de Grado.

Por otra parte, la celulosa bacteriana puede ser usada como sustrato hidrófilo, capaz de elaborar biocompuestos usando materiales de refuerzo, donde a través de estos se logra incluir propiedades nuevas al biopolímero como: la capacidad oxidante, conductividad y magnetismo, generando un mayor campo de aplicación como se describen en el Tabla 4.

#### **Tabla 4**

*Aplicaciones de celulosa bacteriana con materiales de refuerzo.*

Clase de compuesto	Material de refuerzo	Propiedades mejoradas	Aplicaciones
Nanocelulosa	Nanotubos de carbón (CNT)	Mecánica, Conducción eléctrica	Dispositivos electrónicos

Clase de compuesto	Material de refuerzo	Propiedades mejoradas	Aplicaciones
Nanocelulosa	Óxido de grafeno (GO)	Térmica, Mecánica, Conductividad eléctrica	Dispositivos electrónicos e Industriales
Biopolímeros	Gel de Aloe Vera	Mecánica y Física	Biomedicina y Física
Biopolímeros	Colágeno (COL)	Andamio de ingeniería de tejido	Biomedicina
Celulosa Bacteriana	Paladio	Conducción	Sensores y electrónica
Celulosa Bacteriana	Nanopartícula de oro	Óptica, Fotocatálisis y Biosensibilidad	Biosensores y dispositivos ópticos

*Nota.* La tabla representa las diferentes aplicaciones de la CB en combinación con materiales de refuerzo especificando las propiedades que mejoran en la estructura. Tomado de Síntesis y estudio de propiedades de celulosa bacteriana obtenida de piña y banano, inoculados con Kombucha (p.15), por Soriano & Barreto, 2018, Trabajo De Titulación.

### ***Aplicación en la medicina***

En la medicina principalmente por sus propiedades fisicoquímicas como son su alta porosidad, resistencia a la tracción y al tener una estructura microfibrilar son usadas para combatir heridas crónicas que provienen de enfermedades como úlceras, úlceras diabéticas, etc. que son difíciles de cicatrizar necesitando un medio húmedo para poder cicatrizar. La celulosa bacteriana en forma de película es colocada en la parte afectada debido a que no es

tóxica para la piel y ayuda a la transferencia de antibióticos hacia la herida, así como también se transforma en una barrera protectora contra cualquier tipo de infección (Chawla et al., 2009).

En la actualidad ya se han desarrollado productos como Biofill y Geniflex que son producidos con celulosa bacteriana que han sido aplicados en cirugías e implantes dentales usados como sustitutos de piel, logrando la disminución de dolor, reducción de tasa de infección debido a su capacidad de retención de agua y finalmente mejor y más rápida cicatrización (García, 2017). Otro de los campos a investigar dentro de la medicina es la implementación de Tissue Scaffolds una aplicación basa a la regeneración tejidos muertos del ser humano mediante la implementación de estructuras tridimensionales a base de nanocelulosa.

### ***Aplicación en la industria alimenticia***

En la industria alimenticia, la aplicación de celulosa bacteriana se basa principalmente en la obtención de biopolímeros, que se utilizan como recubrimientos de alimentos, lo que permite preservar su estructura y evitar la descomposición de los mismos, porque actúan como estabilizadores del entorno. Estas biopelículas impiden que agentes contaminantes ingresen al alimento. Pero debido a su bajo rendimiento de producción de celulosa bacteriana, por el tiempo que requiere el proceso de fermentación y su elevado costo, se han realizado pocos estudios sobre esta aplicación (Azeredo et al., 2019).

Los biopolímeros a base de celulosa bacteriana se podrían convertir en un sustituto ideal de los plásticos sintéticos, debido a su alto grado de biodegradabilidad en la naturaleza y sus excelentes propiedades mecánicas. Diferentes estudios han permitido establecer que al introducir bacterias probióticas en biopelículas de recubrimiento alimenticio ayuda a aumentar el grado de conservación de los alimentos envasados por la presencia de cepas bacterianas y



propiedades antimicrobianas (Atta et al., 2021). En cuanto a su estructura en forma de fibrillas de 70 a 80 nm de ancho y su capacidad de retención de agua comprendida entre 60 y 700 veces su peso seco, se convierte en una barrera UV, permitiendo controlar cualquier tipo de alteración química como la oxidación del producto envuelto (Cazón et al., 2020).

### **Métodos de caracterización para la celulosa bacteriana y biopelícula**

Las técnicas de caracterización ayudan a identificar la estructura, propiedades y características propias del compuesto o material, permitiéndolo clasificar mediante su respuesta al equipo y naturaleza. De igual manera, una vez conocidas sus propiedades es posible predeterminar una aplicación acorde a su composición. Por lo tanto, se puede analizar la composición química, resistencia mecánica, y propiedades físicas en celulosa bacteriana y biopelículas.

### ***Ensayos mecánicos***

Las propiedades mecánicas de los biopolímeros hoy en día tienen gran trascendencia a nivel industrial, debido a que estas propiedades a través de los años han ido mejorando tanto en composición y estructura, un caso en particular es el cambio de la temperatura de transición vítrea de un polímero que hace que se vuelvan más elásticos o presente mayor dureza. Además, existe modificación en su orden tridimensional. Estos ensayos tienen el objetivo de predecir las condiciones adecuadas en las que dicho polímero puede ser aplicado en la industria, entablando una relación entre las fuerzas o cargas con la deformación del material. Los análisis de propiedades mecánicas que generalmente se realizan en biopolímeros son los siguientes: esfuerzo a la tracción, elongación y módulo de Young (Morocho, 2013).

### **Análisis Termogravimétrico (TGA)**

Los análisis de TGA son utilizados para determinar la estabilidad térmica de diferentes compuestos poliméricos, donde se obtiene información acerca de la temperatura de degradación de los componentes que lo conforman (Radoselovics, 2016).

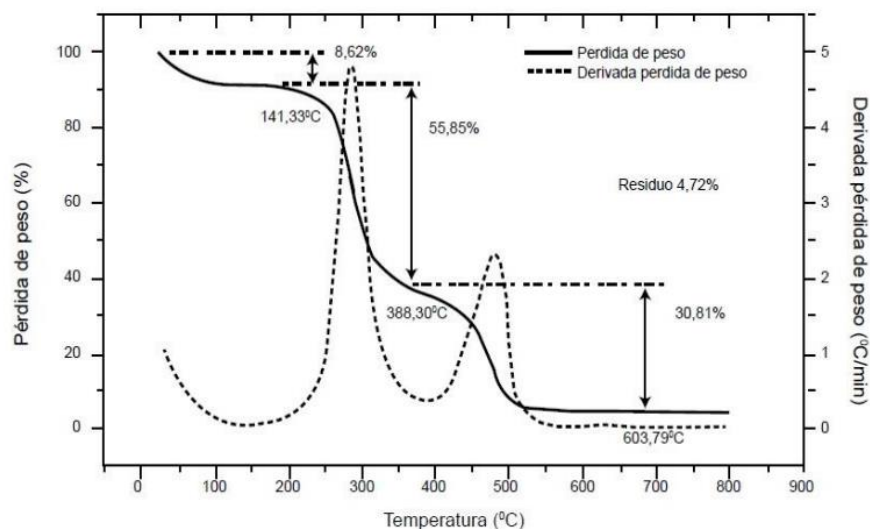
El análisis de TGA se basa principalmente a la disminución de la cantidad de masa en una muestra, resultado de ser expuesta a temperatura que aumenta progresivamente de forma controlada en función del tiempo, la reducción de la masa se debe en determinados procesos a la degradación de la cadena polimérica o pérdida de agua. De igual manera este método se lo lleva a cabo en ambientes inertes resaltando los siguientes: aire, nitrógeno, oxígeno y ambientes oxidativos. Por lo tanto, permite determinar las diferentes reacciones de descomposición como su estabilidad a altas temperaturas de cualquier material o compuesto (Radoselovics, 2016).

Los resultados son descritos a través de un termograma que es una relación entre el %Pérdida de masa con respecto a la temperatura como se evidencia en la Figura 5. Donde la pérdida de masa en la mayoría de casos sigue un orden de eliminación expresado de la siguiente manera:

- Desprendimiento de subproductos volátiles.
- Comienzo a la degradación del polímero.
- Combustión de restos orgánicos.
- Compuestos de naturaleza inorgánica.

## Figura 5

Gráfica de representación del análisis TGA.



*Nota.* La figura representa las diferentes pérdidas de peso en un análisis de TGA. Tomado de Caracterización de las propiedades térmicas y dieléctricas de composites de celulosa bacteriana/ carboximetil celulosa/ óxido de grafeno oxidado (p.33), por Rodoselovics, 2016, Trabajo De Titulación.

### Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Este análisis a diferencia del TGA presenta mayor versatilidad, debido a que abarca más aspectos a analizar entre ellas está la degradación de la muestra, análisis cualitativo y cuantitativo del material especificado en procesos térmicos acumulados.

Los análisis DSC permiten establecer las diferentes temperaturas a las que son expuestos los polímeros, permitiendo establecer una aplicación acorde a sus propiedades térmicas. Por lo tanto, se logra identificar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusión ( $T_m$ ), temperatura de cristalización ( $T_c$ ) y temperatura de degradación ( $T_z$ ). Este

método de caracterización identifica los cambios de energía en relación a la atmosfera intente, analizando la absorción de calor en la muestra (Radoselovics, 2016).

### ***Espectroscopia infrarroja (IR)***

La espectroscopia infrarroja es un método que utiliza vibraciones para aumentar la resolución de la muestra y evidenciar su estructura molecular y estructural. Esto se logra mediante transiciones de niveles de energía molecular evaluando la absorción o la emisión de radiación infrarroja que oscila una frecuencia de 20 y 1450  $\text{cm}^{-1}$ , que es la encargada de atravesar la muestra midiendo la absorción a través de una longitud de onda (Lakin, 2017).

Los resultados expresados del IR son gráficos conocidos como espectro de infrarrojo, donde el eje X o de las abscisas hace referencia a la cantidad de energía absorbida y el eje y o de las ordenadas es el número de ondas de frecuencia en la cual se obtuvo dicha absorción y estas comprenden diferentes rangos de longitud expresada en la Tabla 5. En relación a las ondas de frecuencia están determinadas por la masa de los átomos, la geometría molecular y la fuerza de los enlaces. Resaltando que cada enlace molecular genera un espectro único y son comparados con espectros patrones (Soriano & Barreto, 2018).

**Tabla 5**

Longitud de onda IR.

Tipo de Infrarrojo	Rango de longitud de onda
Infrarrojo Lejano	400 $\text{cm}^{-1}$ – 25 $\text{cm}^{-1}$
Infrarrojo Medio	4000 $\text{cm}^{-1}$ – 400 $\text{cm}^{-1}$
Infrarrojo Cercano	12800 $\text{cm}^{-1}$ – 400 $\text{cm}^{-1}$

*Nota.* La tabla representa el tipo de infrarrojo con su respectiva longitud de onda. Tomado de Síntesis y estudio de propiedades de celulosa bacteriana obtenida de piña y banano, inoculados con Kombucha (p.26), por Soriano & Barreto, 2018, Trabajo De Titulación.

Para un amplio rango de muestras se está utilizando la espectroscopia infrarroja, donde se puede realizar desde un análisis simple de identificación molecular, hasta muestras que presenten resultados cuantitativos y cualitativos referente a una propiedad específica. Las muestras pueden ser analizadas en grandes cantidades o cantidades microscópicas y pueden estar en cualquier tipo de estado físico (sólido, líquido, gas, película, fibra, polvo, etc.) (Lakin, 2017)

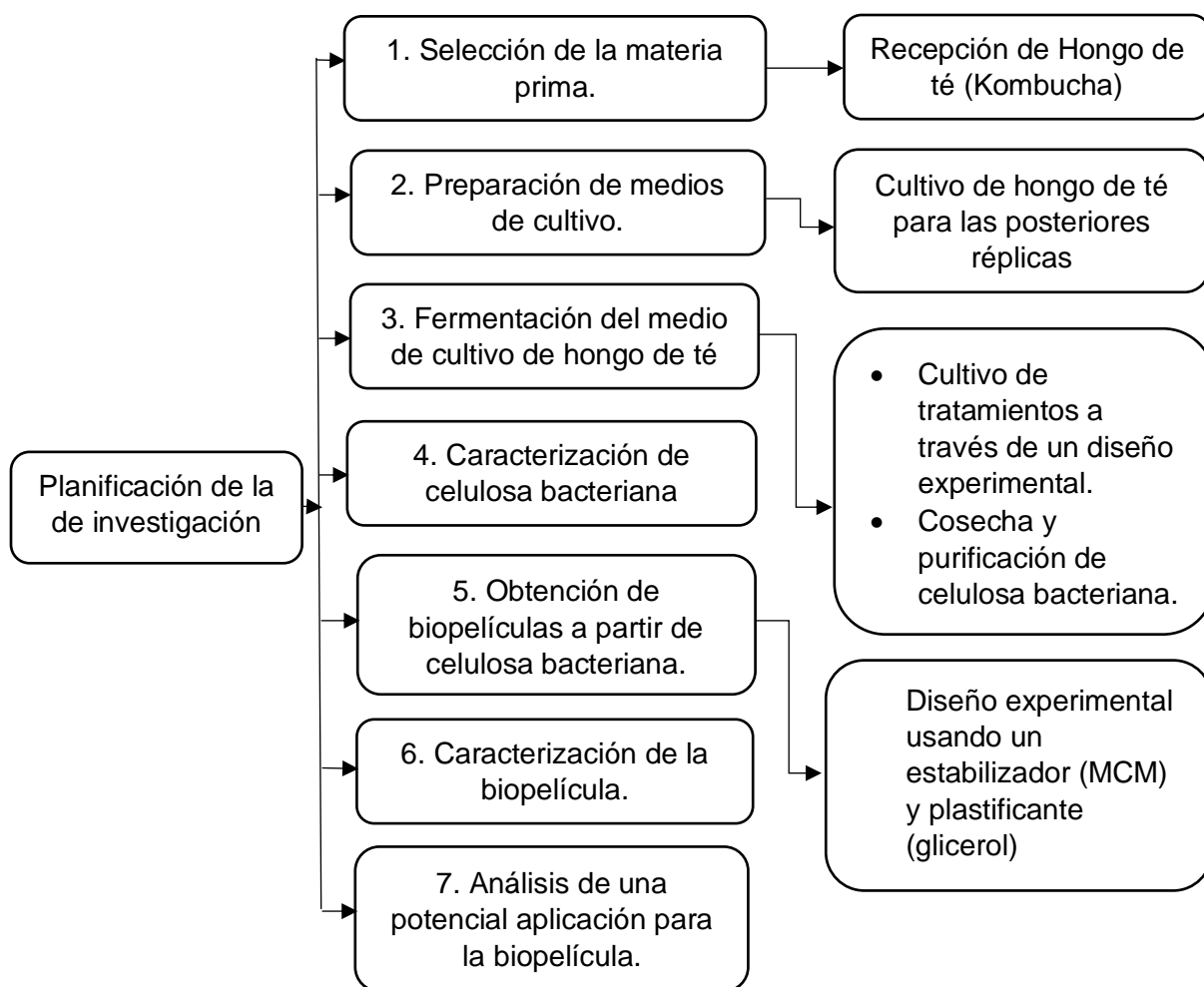
## Capítulo III

### Metodología

Esta investigación utilizó los recursos de los laboratorios pertenecientes a la carrera de Petroquímica en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. El plan de investigación para la obtención de CB a partir del hongo de té, como para la posterior obtención de biopelículas, se detalla en la Figura 6. De igual manera, se incluye las actividades a desarrollar, como los ensayos correspondientes para su caracterización.

**Figura 6**

*Plan de investigación.*



*Nota.* Diseño del plan de investigación, para la obtención de celulosa bacteriana y biopelículas.

## **Equipos, Materiales y Reactivos**

### ***Equipos***

- Balanza analítica digital.
- Estufa de secado ESCO Isotherm.
- Plancha de calentamiento con agitación - BOECO
- Papel de Indicadores de pH 0-14.
- Espectrofotómetro de Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) - PerkinElmer.
- Analizador termogravimétrico (TGA) PerkinElmer, modelo Pyris 1.
- Bomba de Vacío.
- Estufa al vacío BINDER
- Máquina de ensayos universales TESTING MACHINE

### ***Materiales***

- Vasos de precipitación de 1000 mL, 600 mL, 250 mL.
- Probetas de 50 mL, 100 mL.
- Pipeta volumétrica de 5 mL.
- Papel filtro.
- Termómetro -10 a 110 °C.
- Varilla de agitación.
- Matraz Kitasato.
- Cajas Petri.
- Embudo buchner.
- Balones aforados de 250 mL

**Reactivos**

- Hidróxido de Sodio.
- Glicerol.
- Carboximetilcelulosa (CMC).
- Agua destilada.
- Hipoclorito de sodio.
- Té negro.
- Sacarosa (Azúcar morena).

**Materia prima**

- Hongo de té.
- Líquido fermentado del hongo de Té.

**Obtención de materia prima**

El hongo de té es obtenido a través de cultivos iniciadores, que fue entregado en forma de *SCOBY* con su respectivo líquido fermentado, donde existía la presencia de la bacteria *Acetobacter Xylinum* y de levaduras en estado activo. Este proceso de fermentación fue realizado en la ciudad de Latacunga y su preparación consistió de una infusión de té negro y azúcar morena en un litro de agua purificada. El tiempo de fermentación fue de doce días a temperatura ambiente, en un lugar completamente aislado de luz y acceso al oxígeno, hasta evidenciar la presencia de la membrana.

**Obtención del hongo de té inicial para la posterior réplica de tratamientos**

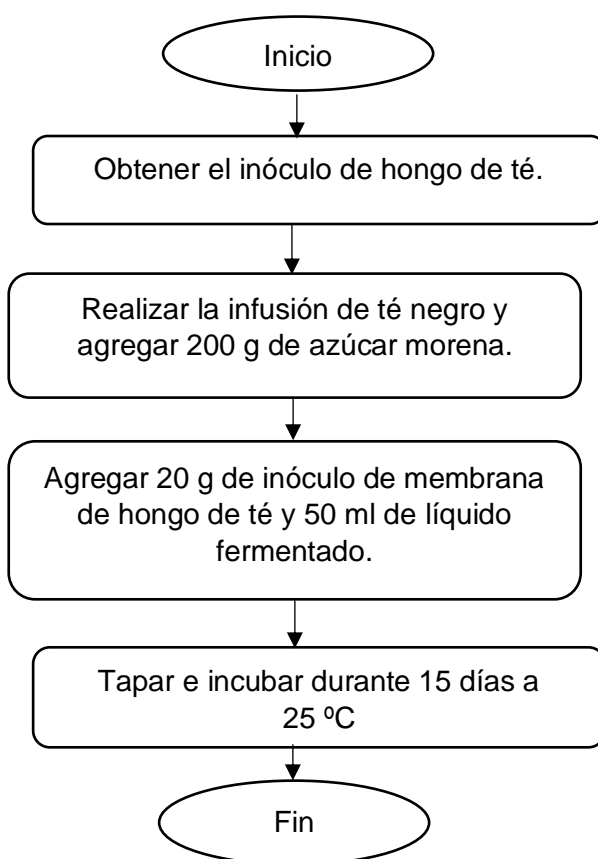
El medio de cultivo inicial se preparó mediante una infusión de té negro, sacarosa (azúcar morena), analito perteneciente al hongo de té y líquido fermentado en un litro de agua



purificada. El proceso se realizó en recipientes cuadrados de 15 cm x 25 cm, tapados con papel adsorbente y ligas, con un tiempo de incubación de quince días y una temperatura de 25 °C. Durante este tiempo, la bacteria *Acetobacter xylinum* se fermenta, crece y da lugar a la producción de películas de hongo de té. Por lo tanto, se obtiene dos películas que serán usadas para los diversos tratamientos. Ver figura 7.

### Figura 7

Diagrama de flujo del cultivo inicial de hongo de té.



*Nota.* Proceso de obtención del hongo de té inicial usado para implementar el diseño experimental.

## Cultivo de celulosa bacteriana mediante un proceso de fermentación

### *Obtención*

Para la síntesis de celulosa bacteriana, se realiza una infusión de té negro en vasos de precipitación de 1000 mL, que primeramente son desinfectados con alcohol y agua caliente. Para disolver mejor la fuente de carbono, se agrega la sacarosa (azúcar morena) una vez que la infusión alcanza su punto de ebullición. El analito y un volumen de líquido fermentado se extraen de la película de hongo de té inicial y son colocados en los recipientes anteriormente mencionados, pero se enfatiza que la temperatura de la mezcla de infusión y sacarosa no debe superar los 20 °C, para evitar algún tipo de daño en la muestra por exceso de temperatura. Las muestras realizadas son colocadas en lugares aislados de luz y tapados con papel adsorbente y ligas, como se observa en la Figura 8. El proceso de fermentación se realizó durante un periodo de 7 días a manteniendo una temperatura constante durante la incubación.

### **Figura 8**

*Medio de cultivo de celulosa bacteriana.*



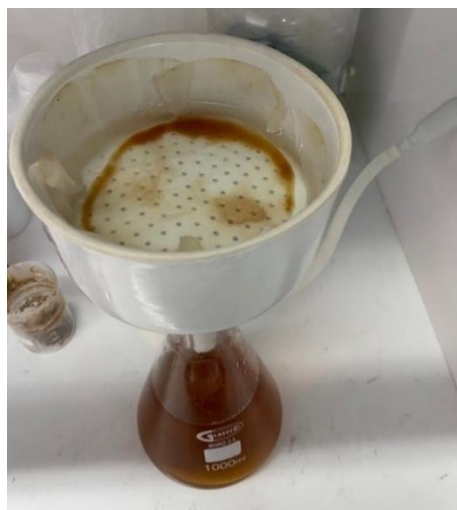
*Nota.* Proceso de fermentación para la obtención de celulosa bacteriana.

### ***Extracción y purificación***

Una vez transcurrido el periodo de fermentación de 7 días, se procede a retirar las películas de celulosa bacteriana formadas en la interfase aire-medio de cultivo. Para la purificación se usa hidróxido de sodio a una concentración de 0.5 M (Hernández, 2018). Se procede a cubrir la película por completo con la solución y calentarla en una estufa a 90 °C durante una hora, este proceso se realizó para eliminar las bacterias y/o células indeseables que se generan durante la fermentación, además de componentes pertenecientes al medio de cultivo. Después se retira las películas de la solución de NaOH y se procedió a realizar 3 lavados con agua destilada y caliente hasta alcanzar un pH neutro, mediante un filtrado al vacío en un Kitasato y embudo Buchner al, evidenciado en la Figura 9.

### **Figura 9**

*Proceso de filtrado al vacío.*



*Nota.* Filtración al vacío para el lavado de la celulosa bacteriana.

### ***Blanqueamiento y secado***

Una vez realizado el lavado para eliminar el NaOH, se procede a blanquear las muestras de celulosa bacteriana con hipoclorito de sodio (cloralex) con una concentración del

0.5 % es decir una solución compuesta de 15 mL de HClO con 270 mL de agua destilada (García-Alcocer et al., 2019). Se procedió a cubrir la muestra con 240 mL de la solución y homogenizarla con agitación constante durante una hora. Luego se procede a realizar 3 lavados con agua destilada hasta eliminar el contenido de cloro alcanzado un pH neutro, este proceso se realiza mediante un proceso de filtrado al vacío. A continuación, la celulosa bacteriana purificada y blanqueada se coloca en cajas Petri y se procedió a secar a una temperatura de 40 °C durante 24 horas en una estufa de secado ESCO Isotherm.

### **Diseño experimental Celulosa Bacteriana**

La evaluación del rendimiento con respecto a la obtención de celulosa bacteriana seca, se determinó mediante un diseño multifactorial de dos factores con dos niveles de estudio evidenciado en la Tabla 6. Las variables que se mantienen constantes durante el proceso de fermentación fueron los siguientes: cantidad de inóculo de hongo de té, líquido fermentado, periodo de incubación, pH inicial, cantidad de té negro y finalmente todas las muestras fueron cultivadas en recipientes iguales en forma, volumen y material.

**Tabla 6**

*Factores y niveles de experimentación.*

Factores	Niveles de estudio
Temperatura (°C)	Tamb (17 °C - 20 °C) 30
Concentración de sacarosa (g/L)	100 250

*Nota.* Diseño experimental preliminar donde se varía la temperatura y la concentración de sacarosa para la obtención de celulosa bacteriana.

En la Tabla 7, se evidencia el diseño experimental de la obtención de CB. Donde para el análisis y evaluación de los resultados, se empleó el Software Minitab 20 realizando las diferentes pruebas estadísticas y para especificar las diferencias significativas entre los tratamientos, a través de ANOVA y diagrama de Pareto y para la comparación de los tratamientos se usa el test de Tukey.

**Tabla 7**

*Diseño Experimental celulosa bacteriana.*

Tratamiento	Código	Temperatura (°C)	Concentración de sacarosa (g/L)	Rendimiento (%)
1	PCB1	Tamb	100	-
2	PCB2	30	100	-
3	PCB3	Tamb	250	-
4	PCB4	30	250	-

*Nota.* La tabla hace referencia a los tratamientos mostrando la combinación de los diferentes niveles de estudio para analizar el rendimiento de producción de CB.

### **Preparación películas de Celulosa Bacteriana**

La infusión se prepara con una concentración de té negro de 6 g/L en agua destilada, hasta alcanzar su punto de ebullición. Se eligió trabajar con un valor constante de analito referente al hongo de té y liquido fermentado, con concentraciones %p/v de 2 y %v/v de 5 respectivamente. El proceso de fermentación se realizó durante 7, a continuación, se procede a purificar y secar la celulosa bacteriana a 40 °C durante 24 horas.

### Diseño experimental Biopelículas a partir de Celulosa Bacteriana

Para analizar el efecto de aditivos como estabilizante (CMC) y plastificante (GLY) en relación a las propiedades mecánicas principalmente en el esfuerzo máximo de ruptura y elongación en la elaboración de biopelículas a partir de CB, se utilizó un diseño multifactorial de dos factores con dos niveles de investigación mostrado en la Tabla 8. Donde se varía las concentraciones de estos aditivos manteniendo constante la concentración de suspensión de celulosa bacteriana al 95%.

**Tabla 8**

*Tratamientos y niveles de experimentación.*

Factores	Niveles de estudio
Concentración de	1%
CMC	3%
Concentración de	1%
GLY	3%

*Nota.* Diseño experimental preliminar donde se la contracción del CMC y GLY para la elaboración de biopelículas, para la posterior evaluación de la resistencia.

En la Tabla 9, se expresa el diseño experimental con respecto a las biopelículas. Donde para el análisis, la evaluación de los resultados y para especificar las diferencias significativas entre los tratamientos, se realiza a través de ANOVA, diagrama de Pareto y finalmente para la comparación se usa el test de Tukey.

**Tabla 9**

*Diseño Experimental en biopelículas a partir de CB.*

Tratamiento	Código	Concentración de glicerol (%)	Concentración de CMC (%)	Esfuerzo máximo de ruptura (MPa)	Elongación (%)
1	BPCB1	1	1	-	-
2	BPCB2	1	3	-	-
3	BPCB3	3	1	-	-
4	BPCB4	3	3	-	-

*Nota.* La tabla hace referencia a los tratamientos, mostrando la combinación de los diferentes niveles de estudio para evaluar su resistencia de la biopelícula.

### **Preparación de biopelículas a partir de Celulosa Bacteriana**

Para la elaboración de biopelículas, se tomó en cuenta el tratamiento que obtuvo mayor peso húmedo de celulosa bacteriana una vez concluido el proceso de fermentación, debido a que se realiza una suspensión de CB en agua destilada. Por ende, se procede a realizar nuevamente cuatro cultivos con las condiciones del tratamiento PCB4 que consiste en: temperatura de 30 °C, concentración de sacarosa 250 g y las mismas variables constantes usadas en la experimentación anterior para la obtención de celulosa bacteriana. La suspensión se realiza en proporción 1:4 entre CB húmeda y agua destilada respectivamente. Esta suspensión se convierte en el producto principal para la formación de las biopelículas, con la adición de un plastificante (glicerol) y un estabilizante (CMC) a diferentes concentraciones. A la mezcla en solución se realizó una agitación constante hasta conseguir la homogeneidad dejándola reposar durante 5 min. Luego se procedió a realizar un proceso de desgasificación que consiste en calentar la mezcla a 150 °C por 1 h y llevando las muestras a una estufa al

vacío para eliminar todas las burbujas generadas. Para la impresión de las biopelículas se usó el método de casting, proceso en el cual consiste verter la solución en un molde para que tome su forma y secado a 40 °C durante 24 h.

## **Evaluación de celulosa bacteriana**

### ***Determinación de la cantidad de celulosa bacteriana húmeda***

Una vez terminado el proceso de fermentación que fue 7 días, se extrae las membras húmedas, con el objetivo de medir la cantidad de celulosa bacteriana en estado húmedo en una balanza.

### ***Determinación de la cantidad de celulosa bacteriana seca***

Cada membrana de celulosa bacteriana fue secada a 40 °C durante 24 h, tiempo en el cual ya no existe contenido de humedad y el peso de la membrana ya no difiere significativamente. Por lo tanto, mediante una balanza se mide la cantidad de celulosa bacteriana seca.

### ***Rendimiento de celulosa***

El rendimiento total ( $R_T$ ) del proceso de fermentación en la obtención de celulosa bacteriana, se determina mediante el peso de la membrana seca (g/L) dividida para la concentración de fuente de carbono (g/L). Para su análisis se usa la ecuación 1.

$$R_T (\%) = \frac{\text{Masa de celulosa seca } \left(\frac{g}{L}\right)}{\text{Concentración de la fuente de carbono } \left(\frac{g}{L}\right)} \times 100$$

**Ecuación 1.** Rendimiento total de CB.



Mientras tanto, para determinar el rendimiento diario ( $R_D$ ) se usa el valor del rendimiento total (%) de CB perteneciente a la ecuación 1, dividido para los días de cultivo. Por lo tanto, el análisis se realiza mediante la ecuación 2.

$$RD (\%) = \frac{RT (\%)}{\text{dias de cultivo}}$$

**Ecuación 2.** Rendimiento diario de CB.

### **Capacidad de retención de agua (WAC)**

Para determinar la cantidad de agua que adsorbe la celulosa bacteriana se utiliza el método descrito por Arfa Yanti et al., 2021 mediante la ecuación de 3, después de un proceso de secado.

$$WAC (\%) = \frac{\text{Masa de agua removida de CB durante el secado} \left(\frac{g}{L}\right)}{\text{Peso humedo de la CB} \left(\frac{g}{L}\right)} \times 100$$

**Ecuación 3.** Porcentaje de adsorción de agua en CB.

## **Caracterización**

### **Pruebas fisicoquímicas**

Los análisis siguientes: espesor, humedad y solubilidad se realizan tanto para la celulosa bacteriana como biopelículas.

#### **Espesor**

La determinación del espesor se realizó mediante un calibrador digital de marca Stanley, donde se toma 5 mediciones en posiciones aleatorias de las películas. Para el cálculo a reportar se toma el valor promedio.

### **Determinación de la humedad**

El contenido de humedad, se analizó a través del método descrito por Atta et al., (2021). Para lo cual, se cortan muestras de 2 x 2 cm de cada uno de los tratamientos de las películas y se procede a tomar su peso inicial en una balanza. A continuación, las muestras se secan en una estufa a 110 °C durante 24 horas. Finalmente, las muestras se pesan y el contenido de humedad se determina mediante la ecuación 4. Donde, MC contenido de humedad;  $W_b$  peso antes del secado;  $W_o$  peso después del secado.

$$MC(\%) = \frac{W_b - W_o}{W_o} \times 100$$

**Ecuación 4.** Contenido de humedad en las películas (Atta et al., 2021).

### **Solubilidad**

La solubilidad de las películas se realizó mediante el método descrito por Atta et al., (2021). Las muestras se cortan de 2 x 2 cm y se procede a secarlas a 110 °C durante 24 horas. Una vez secas las muestras son colocadas en 20 mL de agua destilada durante un lapso de 3 horas a 60 °C, luego de este tiempo se realiza un proceso de filtración, para evitar cualquier tipo de daño en su forma y son secadas a 110 °C en una estufa durante 24 horas. Concluido el tiempo de secado se procede a pesar las muestras. La solubilidad en agua se analizó mediante la relación entre el peso seco inicial y el peso seco después de ser colocado en el agua y se determina a través de la ecuación 5. Donde, WS solubilidad en agua;  $W_o$  peso seco inicial;  $W_f$  peso seco después de la inmersión en agua destilada.

$$WS(\%) = \frac{W_o - W_f}{W_f} \times 100$$

**Ecuación 5.** Solubilidad en agua de las películas (Atta et al., 2021).

## Ensayos mecánicos

### ***Esfuerzo máximo a la tracción y elongación***

Los ensayos se llevan a cabo de acuerdo a la norma ASTM D-822. Las pruebas de esfuerzo máximo a la tracción ( $\sigma$ ) se realizó en una máquina de ensayos universales (Figura 10) y se calcularon utilizando la fórmula 6. Para el análisis es necesario calcular el área transversal de las películas en  $\text{mm}^2$ . Mientras tanto, se calcula la elongación ( $e$ ) usando la fórmula 7, estableciendo una longitud inicial ( $L_0$ ) en la película. Las muestras son cortadas en tiras de 9 mm x 15 mm, y se limita que la distancia entre mordazas sea inferior a la longitud de la tira, antes de iniciar la prueba. Por último, se aplicó una velocidad de carga de 5 mm/min.

$$\sigma(\text{MPa}) = \frac{F}{A} = \frac{\text{Fuerza entregada por la máquina (N)}}{\text{área transversal (mm}^2\text{)}}$$

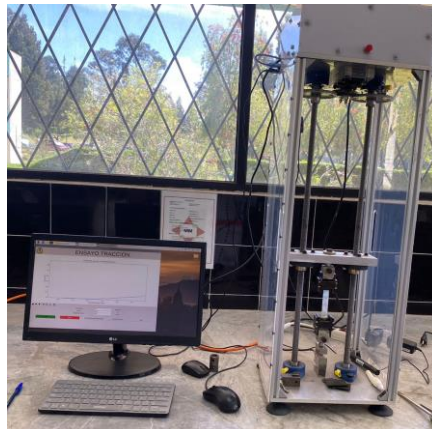
**Ecuación 6.** Esfuerzo máximo a la tracción.

$$\varepsilon(\%) = \frac{L - L_0}{L_0} \times 100$$

**Ecuación 7.** Elongación.

### **Figura 10**

*Máquina de ensayos universales.*



*Nota.* Máquina de ensayos universales con la colocación de la muestra, para su posterior operación.

## Técnicas de análisis térmico

### ***Análisis Termogravimétrico (TGA)***

Para el análisis termogravimétrico se empleó un equipo PerkinElmer modelo Pyris 1 (Figura 11). El proceso es llevado a cabo mediante la norma ASTM E1131, donde se tomó un peso de muestra que oscila entre 5 a 10 mg. Su tratamiento térmico consiste: rango de temperatura de 30 °C a 700 °C y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Todas las medidas se llevaron a cabo en una atmosfera inerte con una velocidad de flujo de nitrógeno de 20 mL/min con un tiempo de purga de 2 min. La evaluación de la pérdida de peso con respecto a la temperatura se analizará en curvas termogravimétricas (DTG).

### **Figura 11**

*Equipo de análisis TGA – PerkinElmer.*



*Nota.* Equipo de análisis termogravimétrico (TGA).

### **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Para el análisis DSC se realizó en un equipo de marca Mettler Toledo y modelo Star, evidenciado en la Figura 12. Este análisis permite establecer las propiedades térmicas de las diferentes muestras, como es la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y la temperatura de fusión cristalina ( $T_m$ ). Las muestras son cortadas en trozos pequeños para un rango de peso comprendido entre 5 mg y 10 mg y son colocados en bandejas de aluminio para su posterior prensado. El análisis se realiza en atmósfera de nitrógeno con un flujo de 20 mL/min y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y finalmente en un rango de calentamiento de 0 °C a 300 °C.

#### **Figura 12**

*Equipo de análisis DSC- Mettler Toledo.*



*Nota.* Equipo de análisis el análisis de propiedades térmicas DSC.

## **Composición estructural**

### ***Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR)***

Para caracterizar la estructura se usó un espectrofotómetro ATR-FTIR PerkinElmer Frontier, con el objetivo de caracterizar la celulosa bacteriana e identificar las interacciones tanto del plastificante como el estabilizador en las biopelículas. Cada uno de los espectros se usa con la misma resolución en un rango de transmitancia de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  en condiciones ambientales, las muestras fueron secadas previamente durante 24 horas a 40 °C

## Capítulo IV

### Resultados y Discusión

#### Formación de películas de Celulosa bacteriana

La formación de películas de celulosa bacteriana (Figura 13) se obtuvieron mediante la fermentación del hongo de té, donde los cultivos se realizaron variando la temperatura de incubación y la concentración de sacarosa de 100 g/L y 250 g/L.

#### Figura 13

*Película de celulosa bacteriana.*



*Nota.* La figura representa la película de CB formada en la interfase aire-medio de cultivo una vez finalizado el proceso de fermentación.

Antes de la realización de los cultivos, se hicieron pruebas de ensayo para identificar condiciones adecuadas que permitan el crecimiento de la CB, evitando alguna alteración. Cuando se realizó el cultivo con una concentración de sacarosa 50 g/L, al extraer la película formada era muy delgada y frágil que durante el proceso de purificación tendió a romperse y desintegrarse. Mientras tanto, al usar una concentración de sacarosa de 300 g/L el caldo de cultivo se volvió ácido con un valor de pH inferior a 2, que según Lestari et al., (2013) el rango

óptimo de pH para un crecimiento de la bacteria *Acetobacter Xylinum* es de 2 a 3. Por lo tanto, las películas presentaron quemaduras cuando termino el periodo de fermentación.

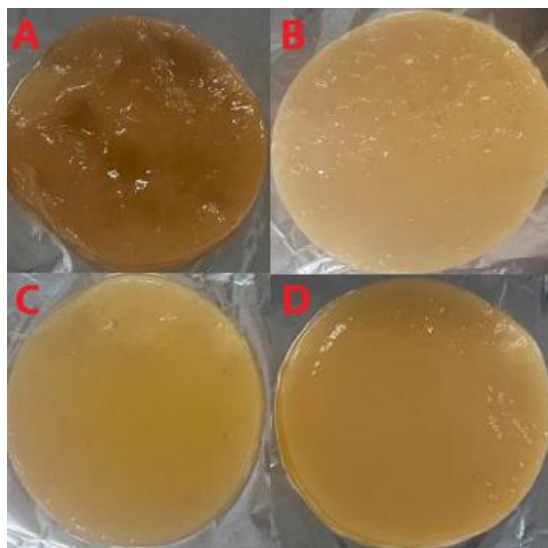
## Evaluación de celulosa bacteriana

### *Cantidad de CB húmeda*

Una vez concluido el tiempo de fermentación del hongo de té se extrajo las películas de celulosa bacteriana como se evidencia en la Figura 14. Las membranas presentaron una estructura flexible y excelente resistencia, que permitió inferir que tenían una excelente formación de fibras celulares.

## Figura 14

*Película de celulosa bacteriana húmeda.*



*Nota.* La figura hace referencia a la extracción de CB húmeda de los diferentes medios de cultivo; A) PCB1; B) PCB2; C) PCB3; D) PCB4.

La CB se formó a través de diferentes condiciones de cultivo por triplicado, para determinar la cantidad producida y posteriormente analizar cuáles son las condiciones de



cultivo que arrojan mejores resultados. Por lo tanto, en la Tabla 10 se observa la cantidad promedio de CB producida en estado húmedo.

**Tabla 10**

*Cantidad de celulosa bacteriana húmeda.*

Código	Cantidad promedio de CB húmeda (g)
PCB1	56,2933
PCB2	38,2733
PCB3	51,0067
PCB4	64,1667

*Nota.* La tabla hace referencia a la cantidad promedio de CB húmeda de los diferentes medios de cultivo obtenidos a través de un proceso de fermentación de hongo de té.

Aunque PCB1 exhibe uno de los mejores resultados en cuanto a la cantidad de peso húmedo con un valor de 56,2933 g, resultó que la bacteria *Acetobacter xylinum* no pudo adaptarse al medio de cultivo, debido a la baja temperatura que no le permitió regular su fisiología homeostática y la falta de energía por la escasez de sacarosa. Dando como resultado la incrustación de levadura hacia el interior de la película de CB. Mientras tanto, los siguientes cultivos no tuvieron dicho inconveniente y el PCB4 presenta mayor cantidad de CB húmeda con un valor de 64,1667 g, evidenciando la importancia de la concentración de la fuente de carbono y la temperatura para un mejor desarrollo de la bacteria *Acetobacter xylinum*.

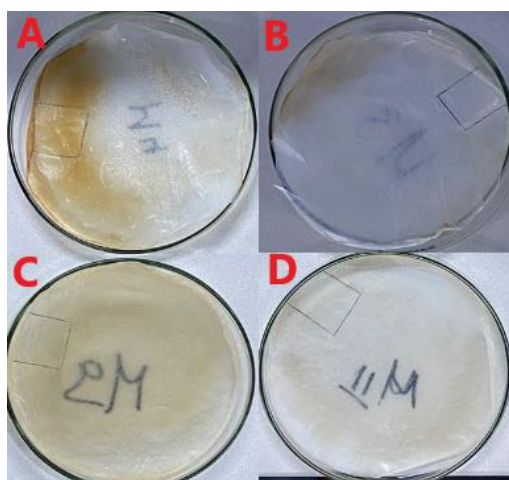
#### **Cantidad de CB seca**

Después de someter a la CB a un proceso de purificación, blanqueamiento y secado, se procede a tomar su peso (Figura 15). Por lo tanto, en Tabla 11 se observa la obtención de la

cantidad promedio en peso seco de CB de cada medio de cultivo que fue realizado por triplicado.

### Figura 15

*Películas de celulosa bacteriana seca.*



*Nota.* La figura representa las películas de CB después de un proceso de secado de los diferentes medios de cultivo; A) PCB1; B) PCB2; C) PCB3; D) PCB4.

### Tabla 11

*Cantidad de celulosa bacteriana seca.*

Código	Cantidad promedio de CB seca (g)
PCB1	0,5400
PCB2	0,2967
PCB3	0,4333
PCB4	0,9767

*Nota.* La tabla hace referencia a la cantidad promedio de CB seca de los diferentes medios de cultivo obtenidos a través de un proceso de fermentación de hongo de té.

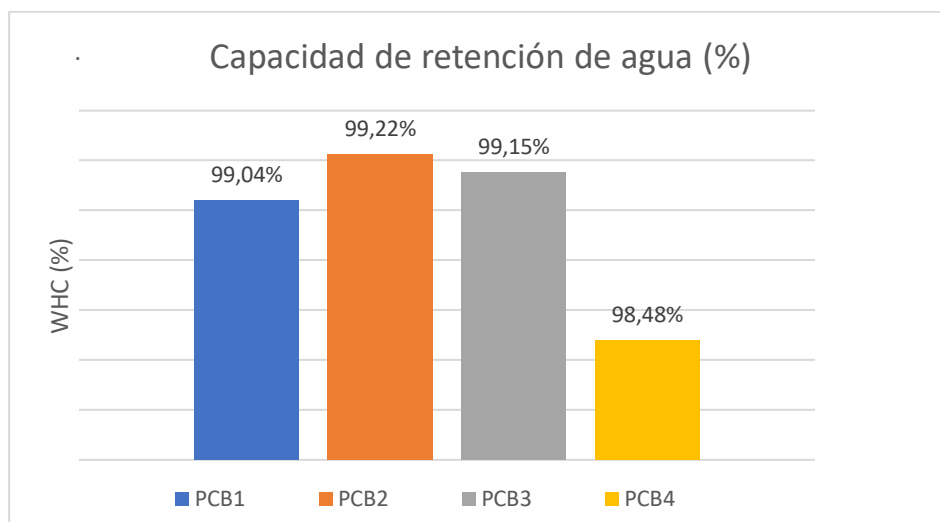
El problema de la incrustación de levadura en PCB1, que se muestra en la Figura 14A, se debe a la apreciación del color marrón en la película, lo que hace que aumente su peso exhibiendo un valor de 0,5400 g, como sucede con el peso de la CB húmeda. Por lo tanto, se evidencia que la PCB4 presenta mayor cantidad de celulosa bacteriana con un valor de 0,9767 g. Su grado de purificación se evidencia en la Figura 14D por la transparencia de la película.

### ***Capacidad de retención de agua***

Una de las propiedades más importantes para predecir una aplicación como biopolímero de CB en campos industriales, principalmente en la biomedicina y recubrimiento de alimentos es la capacidad de retención de agua (Arfa Yanti et al., 2021). Por lo tanto, según (S. M. Costa et al., 2015) hace referencia a que un biopolímero debe tener una capacidad de retención de agua mayor al 80 %, valores que se asemejan a la investigación evidenciados en la Figura 16.

### **Figura 16**

*Capacidad de retención de agua en películas de CB.*



*Nota.* La tabla hace referencia a la cantidad promedio de CB seca de los diferentes medios de cultivo obtenidos a través de un proceso de fermentación de hongo de té.

La variación de esta propiedad está relacionada con la porosidad y el área superficial presente en las películas de CB (Tsouko et al., 2015). Por ende, el ensayo se realizó por triplicado, donde la PCB1 al tener levadura en su estructura hace que se reduzcan el tamaño de los poros y aumente su área superficial evitando la incrustación del agua para ser envuelta en la matriz polimérica de la CB. En cuanto a la PCB2 y PCB3 su área superficial es más reducida y permite una mayor absorción agua porque sus fibrillas son delgadas. Mientras tanto, el PCB4 sus fibrillas de CB son más compactas y gruesas por alcanzar un mayor grado de polimerización, que evitan la penetración del agua, reduciendo el tamaño de poro, aunque presente mayor área superficial.

### **Análisis del diseño experimental**

Antes de analizar la significancia de los factores en los tratamientos a través de un análisis de varianza, se debe tener presente que el objetivo primordial es encontrar la película de CB con mayor rendimiento en forma seca. Por lo tanto, para un valor p menor que 0,05 los factores son significantes, mientras tanto, un valor p mayor a 0,05 los factores no son significantes.

**Tabla 12**

*Análisis de varianza Rendimiento de celulosa bacteriana.*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	0,215428	0,071809	34,10	0,000
Lineal	2	0,056267	0,028134	13,36	0,003
Temperatura (°C)	1	0,000507	0,000507	0,24	0,637

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración Sacarosa (g)	1	0,055760	0,055760	26,48	0,001
Interacciones de 2 términos	1	0,159160	0,159160	75,57	0,000
Temperatura (°C)*Concentración Sacarosa (g)	1	0,159160	0,159160	75,57	0,000
Error	8	0,016848	0,002106		
Total	11	0,232276			

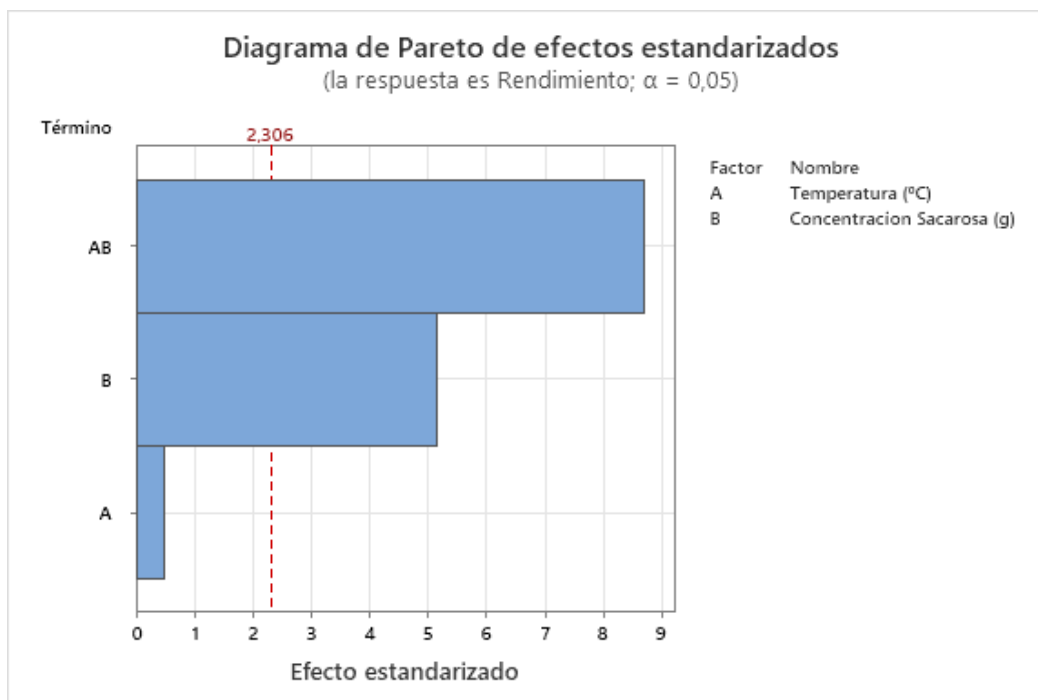
*Nota.* La tabla idéntica el grado de significancia de los factores y su interacción con respecto al rendimiento de la película de CB.

A través de la Tabla 12 y con el Valor p, se puede determinar qué factores son significativos para el modelo. Por lo tanto, la temperatura al tener un valor p mayor a 0,05 no presenta una diferencia significativa y es un factor que no altera el rendimiento. En cuanto a la concentración de sacarosa y la interacción Temperatura (°C) \* Concentración Sacarosa (g) presentan un valor p menor a 0,05 por ende, son considerados significativos, es decir, influyen al rendimiento de la celulosa bacteriana.

Mediante una gráfica de Pareto (Figura 17), se determinó cual factor tiene mayor contribución en el modelo. Entonces, se evaluará la A-temperatura, B-concentración de sacarosa e interacción AB. Los resultados muestran que Temperatura no influyen directamente en el modelo, en cuanto a la concentración de sacarosa presenta cierta influencia, pero en menor proporción. Finalmente, la interacción de AB expuesta por el diseño experimental es la de mayor relevancia teniendo una influencia directa para aumentar el rendimiento de celulosa bacteriana.

**Figura 17**

*Diagrama de Pareto de celulosa bacteriana.*



*Nota.* La figura representa el grado de influencia de los factores y su interacción para la mejora del rendimiento en la producción de CB.

Al existir interacción entre los factores, mediante una prueba de Tukey al 95 % de confianza, se analiza cuáles tratamientos son significativamente iguales. Por lo tanto, en la tabla 13 se evidencia que los tratamientos PCB2 y PBC4, son estadísticamente similares.

**Tabla 13**

*Test de Tukey de celulosa bacteriana.*

Temperatura (°C) *Concentración Sacarosa (g)	N	Media	Agrupación
Tamb 100	3	0,540000	A
30 250	3	0,390667	B
30 100	3	0,296667	B
Tamb 250	3	0,173333	C

*Nota.* La tabla representa las comparaciones de los tratamientos para identificar cuáles son significativamente iguales mediante el test de Tukey.

En relación a los diferentes resultados obtenidos a través del diseño experimental, se concluye que el tratamiento a seleccionar para mayor rendimiento es el tratamiento 4 (PCB4), que emplea una concentración de sacarosa de 250 g/L y una temperatura de 30 °C.

### **Rendimiento total y diario**

En la Tabla 14 se especifican los diferentes rendimientos de la obtención de celulosa bacteriana tanto en estado seco y húmedo. Se puede evidenciar que el mayor rendimiento total de CB seca es el PCB4 con un valor de 0,39 g, que se relaciona con el diseño experimental empleado. No obstante, se evidencia un valor de rendimiento mayor perteneciente a PCB1, pero este valor es descartado por la presencia de levadura, en cuanto al mejor rendimiento diario es 0,055 g de igual manera perteneciente a PCB4. Para el rendimiento total y diario en estado húmedo el mejor es el tratamiento PBC2 con valores de 38,27 g y 5,46 g respectivamente.

Por lo tanto, con los valores calculados de rendimiento y el test de Tukey se afirma que los tratamientos PCB2 y PCB4, son significativamente iguales ya que arrojaron mejores índices de rendimiento.

**Tabla 14**

*Rendimientos de producción de celulosa bacteriana.*

Código	RT de CB	RT de CB	RD de CB	RD de CB
	húmeda (%)	seca (%)	húmeda (%)	seca (%)
PCB1	56,29	0,54	8,04	0,08
PCB2	38,27	0,29	5,46	0,042
PCB3	20,40	0,17	2,91	0,024
PCB4	25,66	0,39	3,66	0,055

*Nota.* La tabla representa las comparaciones de los tratamientos para identificar cuáles son significativamente iguales mediante el test de Tukey.

### **Caracterización celulosa bacteriana**

#### ***Espesor***

El espesor promedio de cada película de CB, donde se tomaron cinco medias aleatorias, se muestra en la Tabla 15. La investigación realizada por Lee et al., 2017 obtuvo un rango de espesor comprendido entre 0,103 mm a 0,207 mm. Mientras tanto, en la investigación realizada el espesor oscila entre 0,141 mm a 0,201 mm. Esta variación se debe principalmente por la influencia de las condiciones en la que se prepara el cultivo para el proceso de fermentación.



**Tabla 15***Espesor películas de celulosa bacteriana.*

Código	Espesor (mm)
PCB1	0,173
PCB2	0,141
PCB3	0,181
<i>PCB4</i>	<i>0,201</i>

*Nota.* La tabla hace referencia a los espesores de cada tratamiento en la producción de CB.

El espesor de las películas no presento una diferencia significativa, pero cabe resaltar que los tratamientos PCB1, PCB2, PCB3 presentan una estructura más blanda con respecto al PCB4, que permite inferir que el grado de polimerización es menor.

### ***Humedad y solubilidad***

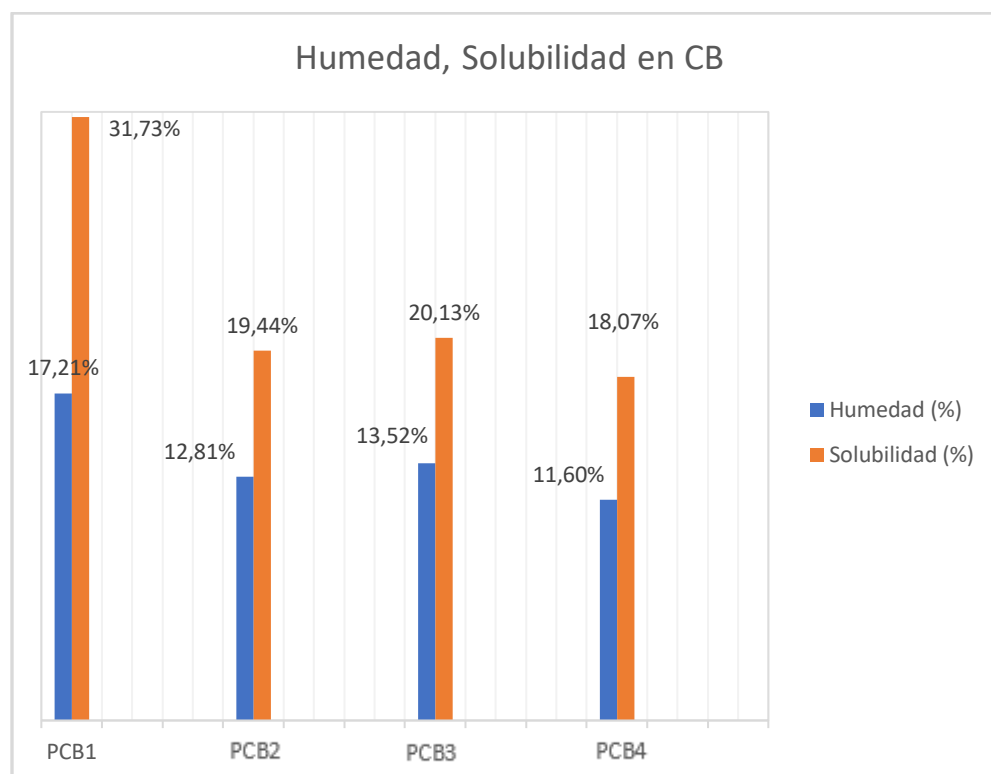
Los resultados de los ensayos de humedad y solubilidad de las películas de CB se muestran en la Figura 18 y fueron realizados por triplicado.

Para el contenido de humedad todas las películas fueron sometidas al mismo proceso de secado, obteniendo valores significativamente similares a diferencia del tratamiento PCB1. La investigación realizada por (Cazón et al., 2020) expresa que las películas de celulosa bacteriana, se encuentran en estado de equilibrio cuando el contenido de humedad no supera el 14%, lo que permite inferir que las películas de los tratamientos PCB2, PCB3 y PCB4 no son vulnerables a una degradación rápida. En cuanto al tratamiento PCB1, probablemente esta diferencia se deba a la presencia de residuos de células generadas por el cultivo que presenten propiedades hidrofílicas, generando el crecimiento de hongos y una rápida degradación.

Las películas de celulosa bacteriana presentan bajo grado de solubilidad en agua debido a la fuerte interacción intramolecular de sus enlaces (Jayani et al., 2019). El tratamiento más soluble es el PCB1 con un valor de 31,37 %. Esto indica que la presencia de levadura hizo minimizar la fuerza de los enlaces de hidrogeno inter e intra molecular de la CB aumentando la solubilidad. En cuanto a los demás tratamientos PCB2, PCB3 y PCB4 presentaron un valor de solubilidad de 19,44 %, 20,13% y 18,07 % respectivamente, que pueden hacer referencia a desechos celulares, proteínas, polifenoles, etc. Que se generaron durante el proceso de fermentación en la matriz polimérica de CB y posiblemente son solubles en agua (Márquez-Reyes et al., 2022).

### Figura 18

*Humedad y solubilidad en películas de celulosa bacteriana.*



*Nota:* La figura hace referencia a los resultados del contenido de humedad y solubilidad de las películas de CB.

### ***Esfuerzo máximo a la tracción y elongación***

El ensayo de esfuerzo máximo a la tracción ( $\sigma$ ) y elongación ( $\epsilon$ ) se realizó a la película de CB con mayor rendimiento y se realizó por triplicado. Para la prueba de elongación se estableció una longitud inicial de 65 mm.

En la Figura 19 se observa el desplazamiento de la película de CB (elongación) a una velocidad de 5 mm/min, hasta alcanzar la fuerza máxima y producir la ruptura. Por lo tanto, los valores promedio se expresan en el Tabla 16.

**Tabla 16**

*Resultados de las pruebas mecánicas de CB.*

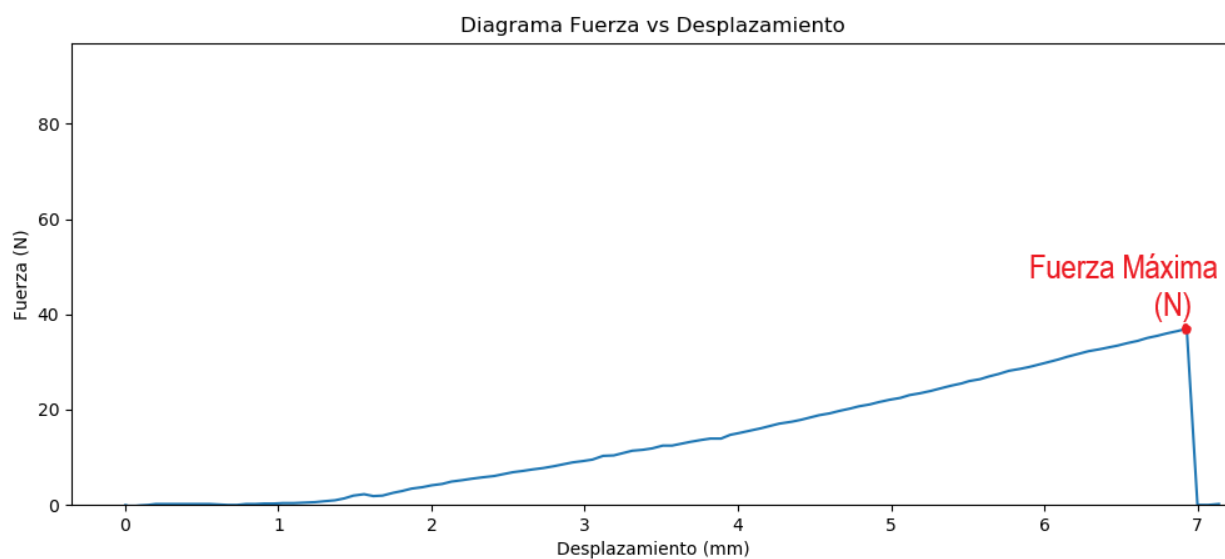
Código	Fuerza (N)	$\sigma$ (MPa)	Elongación (%)
PCB4	36,98	25,24	9,12

*Nota.* La tabla muestra los resultados de la película de CB con respecto al esfuerzo máximo a la ruptura y elongación.

A pesar de que la película de CB soporta una resistencia a la tracción de 25,24 MPa, el valor es muy bajo en comparación con otras investigaciones. Según A. F. S. Costa et al., (2017) quien obtuvo películas con resistencia a la tracción de 48,17 MPa, esto puede deberse principalmente a la morfología de la CB al presentar una red de fibrillas más organizadas permitiendo tener una trenza de fibrilla más compacta, que se logra mediante un mayor tiempo de incubación.

**Figura 19**

*Diagrama fuerza vs desplazamiento de celulosa bacteriana.*



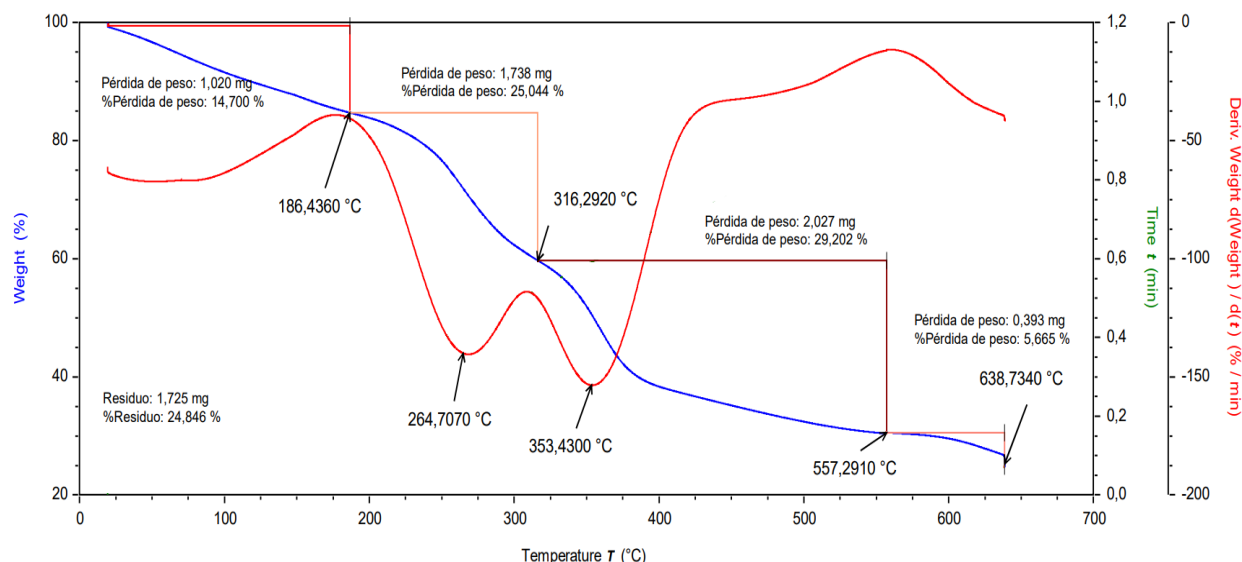
*Nota.* La grafica muestra la deformación que sufre la película de CB con respecto a la fuerza hasta su fractura.

**Análisis termogravimétrico (TGA)**

El análisis de TGA se realizó a la película de CB que obtuvo mayor rendimiento, que fue la PCB4. Este ensayo se realizó para examinar la capacidad de la CB para retener agua y principalmente como es su comportamiento a la degradación térmica. El análisis de TGA se llevó a cabo con un peso de muestra de 7,001 mg y el resultado se muestra en la Figura 20.

Figura 20

TGA celulosa bacteriana.



*Nota.* La figura hace referencia a los resultados de TGA de película de CB.

La grafica de TGA revela cuatro fases de degradación. En la primera se observa una ligera pérdida de peso del 14,7% desde temperatura ambiente hasta los 186,43 °C que hace referencia a la evaporación y deshidratación de agua retenida en la matriz polimérica. La segunda etapa va desde 186,43 °C a 316,29 °C con una disminución de peso del 25,04 % esto se debe a una degradación térmica provocando una despolimerización y degradación de la CB por deshidratación, a través de la primera derivada o diagrama DTG se observa que la mayor pérdida de peso en esta etapa se da a 264,70 °C. En cuanto a la tercera perdida se idéntica desde 316,29 °C a 557,21 °C con pérdida de peso del 29,20 % evidenciando la descomposición de los enlaces glucosa y reordenándolos para dar lugar a la formación de grupos carbonilo y carboxilo (Avcioglu et al., 2021), de la misma manera con el diagrama DTG se identifica que a 353,43 °C la muestra sufre la mayor pérdida de masa. Finalmente, la cuarta etapa comprende desde 557,29 °C a 638,73 °C con una pérdida de peso de 5,66 % y la formación de residuos de carbono.

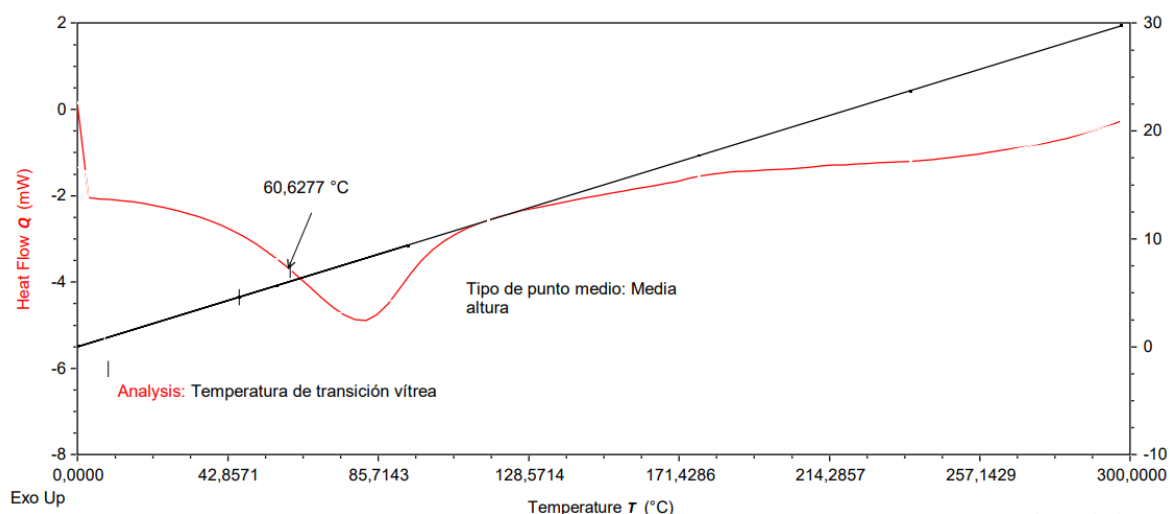
Por lo tanto, la pérdida de peso total fue del 75,15 % obteniendo un residuo (contenido de cenizas) de 1,72 mg, dando como resultado que la película de celulosa bacteriana no presenta una buena estabilidad térmica, debido a que según el estudio de (Avcioglu et al., 2021) la CB debe presentar como mínimo 3 etapas de degradación, cuando ocurre lo contrario A. F. S. Costa et al., (2017) afirma que este problema se puede deber a su composición estructural, donde la masa molecular, grado de cristalinidad y las fibras moleculares afectan a dicho parámetro.

### **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

El análisis DSC se realizó a la PCB4 que fue aquella película de mayor rendimiento. Las propiedades térmicas evidenciadas en la Figura 21 son la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) que comprendió un valor de 60,62 °C. De igual manera, se observa la no presencia de picos relacionados con la temperatura cristianización ( $T_c$ ) en el rango de 0 a 300 °C. Según (Amin et al., 2012) la no presencia de la propiedad se debe a que la película de celulosa bacteriana presenta una elevada estabilidad térmica y se relaciona con una alta cristalinidad de la cadena dentro de las fibrillas de la matriz polimérica.

**Figura 21**

*DSC celulosa bacteriana.*



*Nota.* La figura hace referencia a los resultados del análisis DSC con respecto a la celulosa bacteriana.

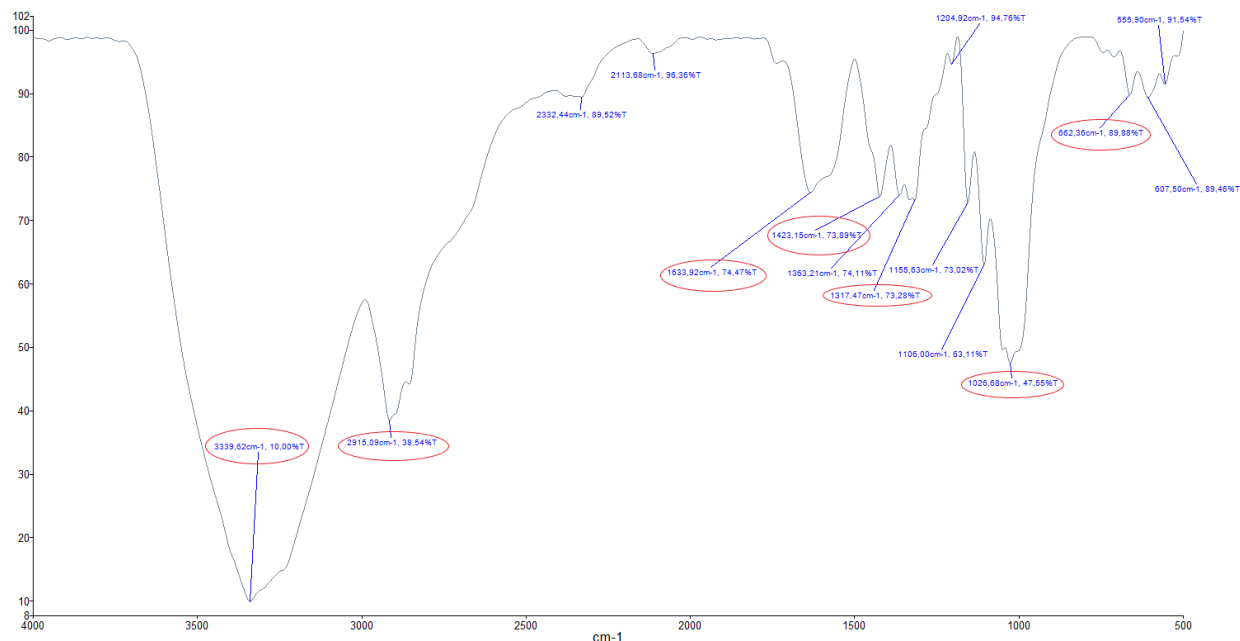
### ***Espectroscopia FT-IR***

El análisis de FT-IR con respecto a la CB se realizó en la película con mayor rendimiento, por ende, pertenece al tratamiento PCB4. El FT-IR de CB se representa en la Figura 22, donde se han identificado el ancho de banda de  $3339,62\text{ cm}^{-1}$ , que es aquel pico característico de la celulosa bacteriana, referente a los grupos hidroxilos con vibraciones de estiramiento OH que son los formadores de los enlaces inter e intramoleculares de hidrogeno. Con respecto a la banda  $2915,09\text{ cm}^{-1}$  es característica del estiramiento C-H del grupo CH<sub>3</sub>, el pico en  $1633,92\text{ cm}^{-1}$  presenta una vibración de H<sub>2</sub>O absorbida con una flexión OH, en cuanto en el ancho de banda  $1423,15\text{ cm}^{-1}$  existe flexión del CH<sub>2</sub>O, mientras tanto en el intervalo de banda  $1317,47\text{ cm}^{-1}$  y  $1204,92\text{ cm}^{-1}$  hace referencia a la flexión de CH. Los monómeros carbohidratos se encuentra entre los anchos de banda de  $1151,63\text{ cm}^{-1}$  a  $1026,68\text{ cm}^{-1}$  y estas enlazados a un polímero mediante bandas de estiramiento de COC y CO (Lestari et al., 2013). Finalmente, el pico  $662,36\text{ cm}^{-1}$  expresa el -OH con deformación fuera del plano.

Por lo tanto, el espectro referente a la celulosa bacteriana de mayor rendimiento muestra la gran mayoría de picos similares a establecidos por bibliografía.

## Figura 22

*FT-IR celulosa bacteriana.*



*Nota.* La figura hace referencia a los resultados del análisis FT-IR con respecto a la celulosa bacteriana.

### Formación de biopelículas a partir de CB

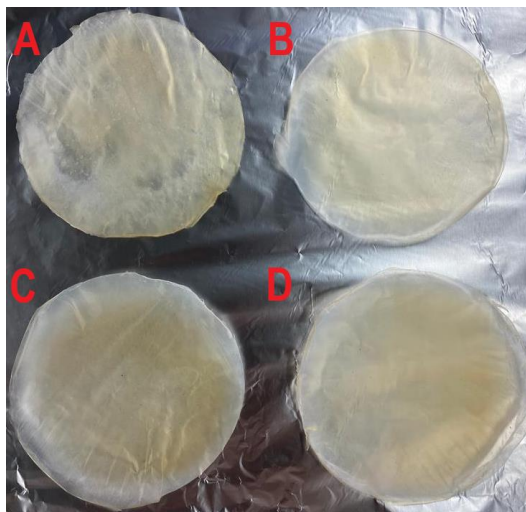
La formación de biopelículas a partir de CB (Figura 23), se obtuvieron mediante la adición de un estabilizador (CMC) y un plastificante (GLY) a la suspensión de celulosa bacteriana con 95 % de concentración, usando el método de casting.

Antes de obtener las biopelículas se realizó ensayos para identificar el comportamiento del CMC y GLY con la CB, debido a que el CMC es soluble en agua por sus propiedades polianiónicas y por el contrario la CB es insoluble en agua. Es por eso que se optó por realizar una suspensión en lugar de usar la membrana después de su extracción, aumentando así la solubilidad de la CB.



### Figura 23

*Biopelículas a partir de celulosa bacteriana.*



*Nota.* La figura hace referencia a las diferentes biopelículas obtenidas; A) BPCB1; B) BPCB2; C) BPCB3; D) BPCB4.

En cuanto a la concentración del CMC y GLY en la tabla 17 se exponen los resultados de ensayos preliminares y se identifica que a bajas concentraciones de aditivos las biopelículas tornaban a ser muy frágiles y sin resistencia.

### Tabla 17

*Ensayos preliminares en la formación de biopelículas.*

%CMC	%GLY	Apariencia de la película después del secado
0,5	0	Quebradiza, superficie irregular
0	0,5	Quebradiza y sin resistencia
0,5	0,5	Buena, pero sin mucha resistencia
2	2	Mejor resistencia

*Nota.* La tabla muestra las características que tomaron las biopelículas al ser sometidas a diferentes concentraciones de aditivos.

### **Análisis del diseño experimental**

Para el análisis de significancia de los factores en los distintos tratamientos a través de un análisis de varianza con una ANOVA, se debe tener presente que el objetivo es encontrar la biopelícula que soporten el máximo esfuerzo a la tracción y presenten mayor porcentaje de elongación. Por lo tanto, los resultados son evaluados con un nivel de significancia del 95 %, para determinar qué factores afectan en el modelo.

#### ***ANOVA con respecto al esfuerzo máximo a la tracción ( $\sigma$ )***

**Tabla 18**

*Análisis de varianza del esfuerzo máximo a la tracción.*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	237,63	79,211	40,18	0,000
Lineal	2	216,63	108,314	54,95	0,000
%GLY	1	185,28	185,282	93,99	0,000
%CMC	1	31,35	31,346	15,90	0,004
Interacciones de 2 términos	1	21,00	21,004	10,66	0,011
%GLY*%CMC	1	21,00	21,004	10,66	0,011
Error	8	15,77	1,971		
Total	11	253,40			

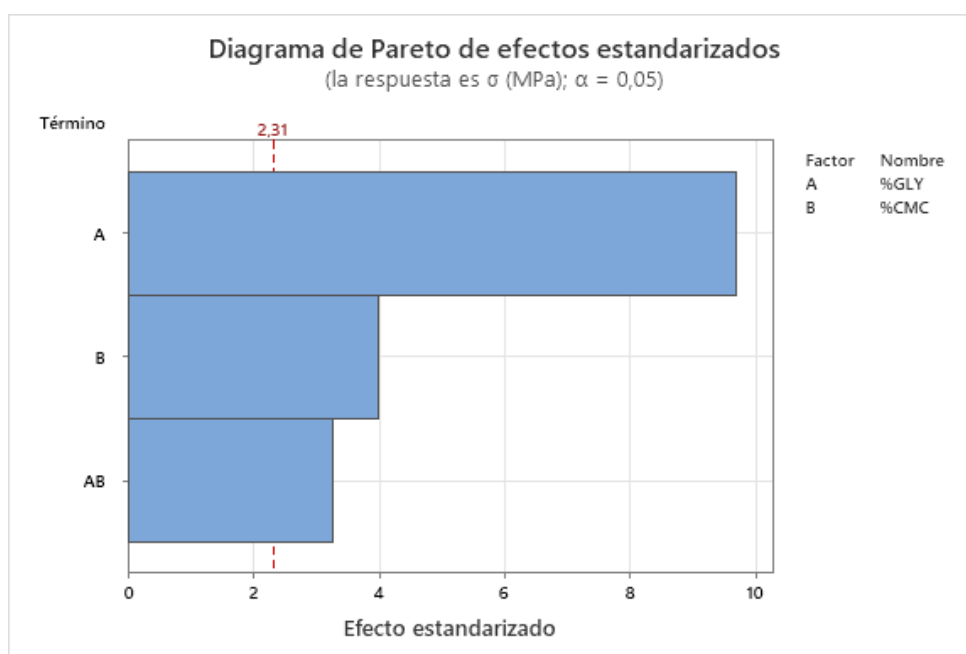
*Nota.* La tabla identifica el grado de significancia de los factores y su interacción con respecto al esfuerzo máximo de ruptura.

Mediante la Tabla 18 y con el Valor p, se logra identificar cuales factores son significativos para el modelo. Entonces, el GLY, CMC y la interacción %GLY\*%CMC, presentan significancia ya que su Valor p es menor a 0,05. Por lo tanto, se puede concluir que los factores afectan el esfuerzo máximo a la tracción ( $\sigma$ ), de la biopelícula formada a partir de celulosa bacteriana.

A través de una gráfica de Pareto expresada en la Figura 24, permite evaluar el grado de contribución de los factores en el modelo. Por ende, se analiza los factores de la siguiente manera: A-GLY (%), B-CMC (%) y finalmente la interacción AB. Donde se evidencia que tanto A, B y AB presentan influencia significativa en el modelo. El factor con mayor impacto en los tratamientos es la concentración de glicerol (A). Por lo tanto, reducir la concentración de A y aumentar la concentración tanto de B como AB permitirán aumentar la resistencia mecánica de las biopelículas.

### Figura 24

*Diagrama de Pareto del esfuerzo máximo a la tracción.*



*Nota.* La figura representa la influencia de los factores (GLY y CMC) y su significancia para aumentar la resistencia a la tracción de las biopelículas.

Al existir interacción entre los factores, a través del test de Tukey con un 95 % de confianza, es posible determinar cuáles tratamientos son significativamente iguales. Entonces mediante la Tabla 19 se comprueba que los tratamientos BPCB1 y BPCB2 son estadísticamente iguales.

**Tabla 19**

*Test de Tukey* del esfuerzo máximo a la tracción.

%GLY*%CMC	N	Media	Agrupación
3 3	3	21,1616	A
3 1	3	15,2831	B
1 3	3	10,6568	C
1 1	3	10,0704	C

*Nota.* La tabla representa las comparaciones de los tratamientos de las biopelículas para identificar cuáles son estadísticamente iguales mediante el test de Tukey.

**ANOVA con respecto al porcentaje de elongación****Tabla 20***Análisis de varianza en % elongación.*

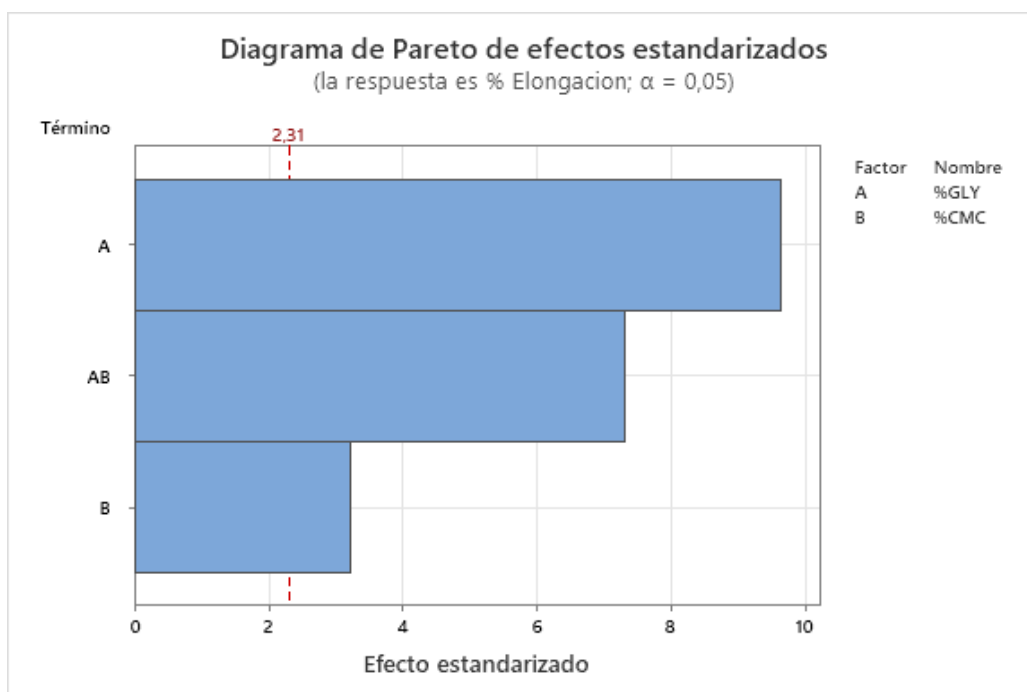
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	430,65	143,552	52,30	0,000
Lineal	2	283,77	141,886	51,70	0,000
%GLY	1	255,30	255,302	93,02	0,000
%CMC	1	28,47	28,469	10,37	0,012
Interacciones de 2 términos	1	146,88	146,883	53,52	0,000
%GLY*%CMC	1	146,88	146,883	53,52	0,000
Error	8	21,96	2,745		
Total	11	452,61			

*Nota.* La tabla expresa la significancia del modelo con respecto a los factores relacionados con el grado de elongación de las diferentes biopelículas.

El modelo empleado tiene significancia debido a que el Valor p es menor a 0,05, por lo cual los factores GLY, CMC y su interacción %GLY\*%CMC afectan el grado de elongación de las biopelículas, debido a que su respectivo Valor p es menor al grado de significancia del 5%.

**Figura 25**

Diagrama de Pareto % de elongación.



*Nota.* La figura expresa el efecto de los factores para el análisis de mayor grado de elongación.

Como se visualiza en la figura 25, al igual que en el esfuerzo máximo a la tracción el factor de mayor contribución al modelo es el glicerol con respecto a la elongación, mientras tanto el de menor contribución es el CMC. En cuanto a la interacción de GLY y CMC presenta cierta de influencia, pero cabe resaltar que todos los factores influyen significativamente en el modelo y permiten establecer cuáles son las concentraciones idóneas de los aditivos para tener un mayor grado de elongación en las biopelículas.

Al coexistir interacción entre factores es necesario identificar los tratamientos que presentan igualdad estadística, por ende, mediante el test de Tukey al 95 % de confianza se analizara dicho parámetro. Ver tabla 21.

**Tabla 21***Test de Tukey en % elongación.*

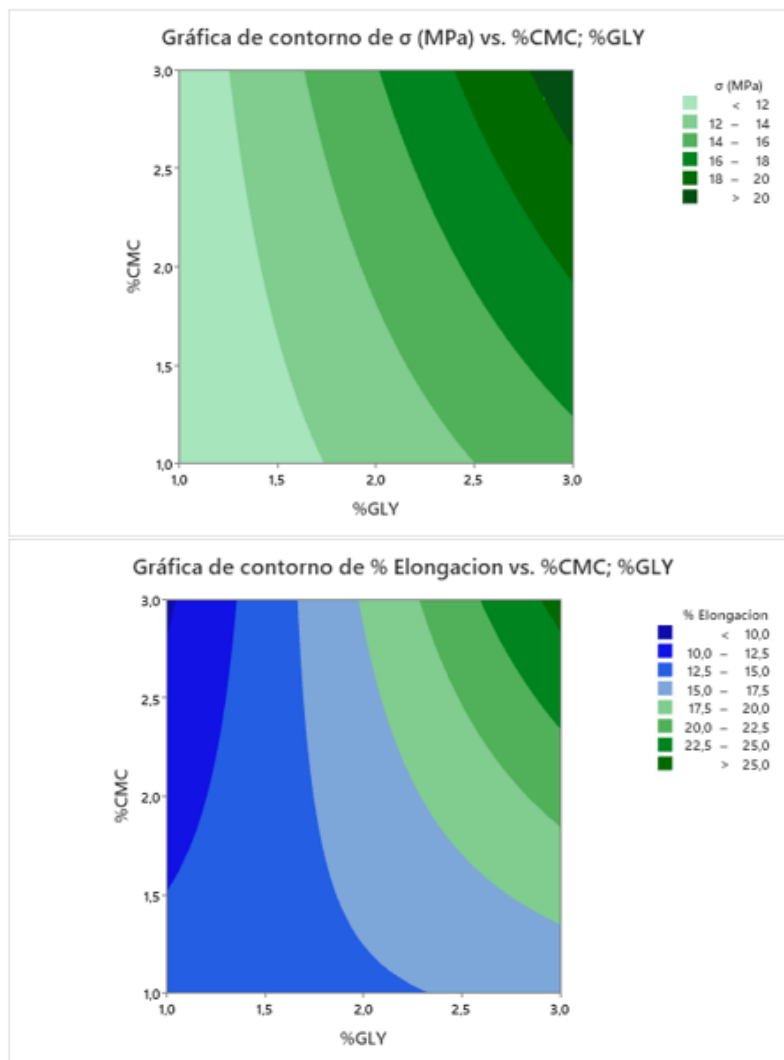
%GLY*%CMC	N	Media	Agrupación	
3 3	3	25,8111	A	
3 1	3	15,7333	B	
1 1	3	13,5056	B	C
1 3	3	9,5889	C	

*Nota.* La tabla expresa los diferentes tratamientos significativamente iguales en relación al % de elongación.

Los resultados expresados mediante un test de Tukey indican que los tratamientos BPCB3 y BPCB1 presentan similitud estadística al igual que los tratamientos BPCB1 y BPCB2.

A través de los resultados obtenidos de los diseños experimentales tanto del esfuerzo máximo a la tracción y el mayor porcentaje de elongación, se puede concluir que el tratamiento que hace referencia a estas propiedades es el tratamiento 4 (BPCB4).

El resultado del tratamiento 4 que emplea una concentración de GLY del 3% y CMC del 3%, se lo evidencia en gráficos de contornos (Figura 26), donde se logra apreciar las concentraciones idóneas que permitan optimizar materia prima y conseguir el objetivo de biopelículas con mayor esfuerzo máximo a la tracción y % de elongación. Donde la zona de color verde oscuro indica que la biopelícula BPCB4 va obtener un esfuerzo máximo a la tracción superior a 25 MPa y una elongación superior al 20 %.

**Figura 26***Gráfica de contornos.*

*Nota.* La figura muestra la capacidad que adquiere la biopelícula en relación al esfuerzo máximo a la tracción (MPa) y el porcentaje de elongación.

### **Esfuerzo máximo a la tracción y elongación**

En la tabla 22, se especifican los valores promedio tanto del esfuerzo máximo a la tracción como elongación, de los diferentes tratamientos de la obtención de biopelículas a partir



de CB. Por lo tanto, se puede inferir que al aumentar la concentración de CMC reduce tanto la resistencia como la elongación de las biopelículas, siendo el aditivo que influye en estas propiedades. Finalmente, al igual que en el diseño experimental se puede observar que el tratamiento BPCB4 presenta mejor resistencia.

**Tabla 22**

*Resultados de las pruebas mecánicas en biopelículas.*

Código	Fuerza (N)	$\sigma$ (MPa)	Elongación (%)
BPCB1	7,799	10,071	13,506
BPCB2	6,844	10,657	9,5889
BPCB3	11,953	15,283	15,733
BPCB4	17,281	21,162	25,811

*Nota.* La tabla muestra los resultados al esfuerzo máximo a la tracción y % de elongación en la obtención de biopelículas.

### **Caracterización biopelículas a partir de celulosa bacteriana**

#### ***Espesor***

El espesor promedio de las biopelículas se evidencia en la Tabla 23, donde se tomó cinco medias aleatorias. El rango de espesor oscila entre 0,0456 mm a 0,0544 mm, que tiene relación con la investigación realizada por Márquez-Reyes et al., (2022) que presenta un intervalo de 0,045 mm a 0,083 mm. Los diferentes incrementos de espesor se deben principalmente a la adicción de CMC y GLY, donde principalmente el CMC se incrusta a los espacios vacíos de la matriz polimérica presentes en la CB, logrando así aumentar su espesor.

**Tabla 23**

*Espesor promedio de las biopelículas.*

Código	Espesor (mm)
BPCB1	0,0522
BPCB2	0,0456
BPCB3	0,0533
BPCB4	0,0544

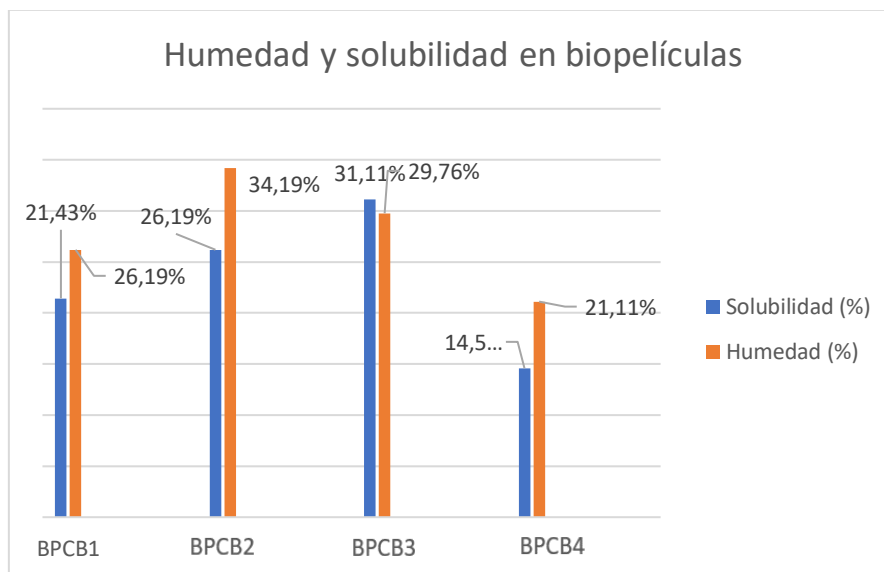
*Nota.* La tabla hace referencia a los espesores de cada tratamiento en la obtención de biopelículas.

### ***Humedad y solubilidad***

Mediante la Figura 27, se puede visualizar como la solubilidad decrece desde un 31,11% hasta un 14,58 %, mientras tanto la humedad aumenta desde 21,11 % hasta 34,19 %, esto se debe principalmente al efecto del CMC y GLY en los tratamientos. Los resultados obtenidos se relacionan con lo expuesto en la investigación realizada por Arfa Yanti et al., (2021), donde hace referencia que al aumentar la concentración de CMC, disminuye el grado de solubilidad y aumenta el contenido de humedad. De igual manera, menciona que el rango óptimo de solubilidad para biopelículas de CB está comprendido entre 20 % y 60 %. Por ende, al ser la celulosa bacteriana poco soluble en agua por lo presencia de la gran cantidad de grupos hidroxilos en su estructura hace que tenga fuertes enlaces intermoleculares, generando que los resultados de solubilidad sean bajos.

## Figura 27

*Humedad y solubilidad en biopelículas.*

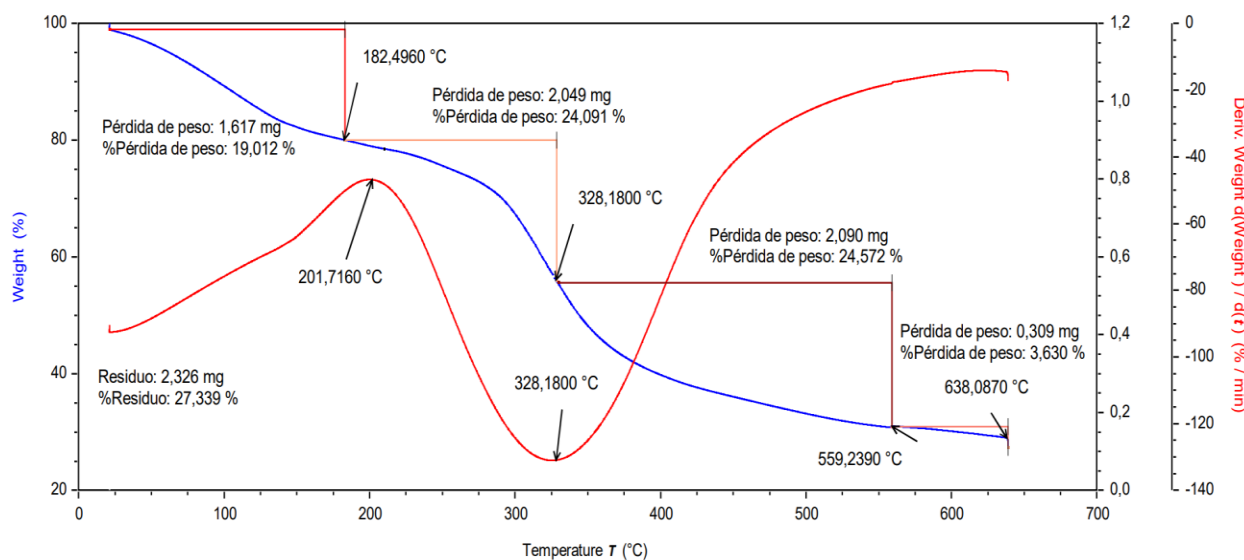


*Nota.* La figura muestra los resultados de humedad y solubilidad de las biopelículas a partir de celulosa bacteriana.

Finalmente, el grado de humedad en las biopelículas aumentó al incrementar la concentración del glicerol, evidenciado en los tratamientos (Figura 27). Esta condición se debe principalmente a que el glicerol es higroscópico e hidrofílico propiedades que le permiten formar enlaces con el agua con mayor facilidad.

### **Análisis termogravimétrico (TGA)**

La grafica expuesta en la Figura 28 revela el análisis TGA de la biopelícula con mayor esfuerzo a la tracción y mejor porcentaje de elongación, la cual fue BPCB4. Además, expone la estabilidad térmica de las biopelículas.

**Figura 28***TGA de la biopelícula.*

*Nota.* La figura representa el resultado del análisis TGA de la biopelícula a partir de celulosa bacteriana

El análisis de TGA se realizó con un peso de muestra de 8,58 mg. La estabilidad térmica de la biopelícula, presentó cuatro etapas de degradación. La pérdida de peso del 19,01% por deshidratación, evaporación y pérdida de humedad, hace referencia a la etapa uno, con un rango de temperatura desde la  $T_{amb}$  hasta los 182,49 °C. Cabe resaltar que en esta etapa la biopelícula presenta mayor pérdida de peso en relación con las películas de CB que fue del 14,7%, esto debido a la presencia del CMC causante de retener mayor cantidad de agua en la matriz polimérica por sus propiedades hidrofílicas y no permitir deshidratarse completamente en el secado (Atta et al., 2021). En la segunda etapa, la degradación térmica empieza desde 182,496 °C y termina en 328,18 °C, consiguiendo la descomposición de las cadenas poliméricas y deshidratación de la CB con una pérdida de peso del 24,09 % y mediante el diagrama DTG se visualiza la temperatura de máxima degradación que es de 201,71 °C, lugar donde se pierde mayor cantidad de peso. En cuanto a la etapa tres se

identifica la ruptura de las unidades glucosídicas y la formación de grupos carbonilo y carboxilo al igual que en las películas de celulosa bacteriana. Esta etapa, se llevó a cabo en un rango de temperatura que va desde los 328,18 °C a 559,23 °C, con una pérdida de masa del 24,57%.

En las etapas dos y tres del análisis de TGA, como menciona Atta et al., (2021) en su investigación, se evidencia como la adición de GLY provocó que ligeramente aumente la temperatura de degradación de las biopelículas y presente mejor estabilidad a temperaturas elevadas en relación a las películas de CB que fue de 316,29 °C y 557,29 °C respectivamente.

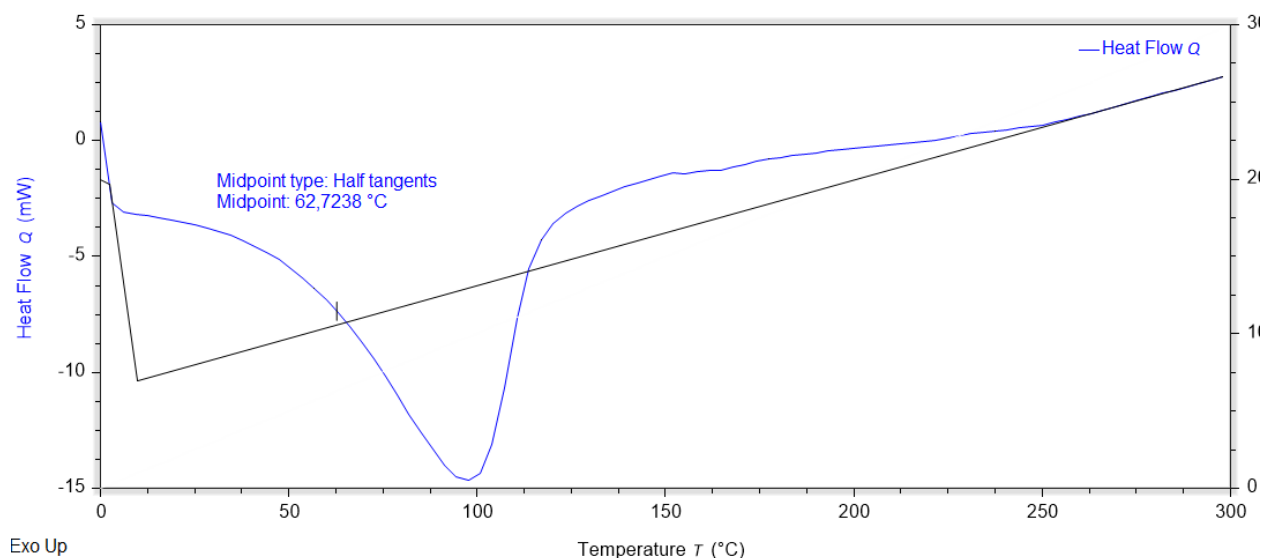
Finalmente, la etapa 4 comprendida entre 557,29 °C y 638,08 °C con una pérdida de masa del 3,63% hace referencia a residuos carbonosos. Por lo tanto, el total de pérdida de peso fue del 72,66 % con un residuo o contenido de cenizas de 2,23 mg.

#### ***Calorimetría diferencial de barrido (DSC)***

Este análisis se realiza en relación a la biopelícula que obtuvo mayor esfuerzo a la tracción y porcentaje de elongación que fue el tratamiento BPCB4. En la Figura 29 se evidencia la propiedad térmica asociada a la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) que comprende de 62,7238 °C siendo similar a la obtenida en PCB4 de 60,62 °C. De igual manera, no existen picos relacionados con la temperatura de fusión de cristalización ( $T_m$ ) especificando una excelente estabilidad térmica.

## Figura 29

*DSC de la biopelícula.*



*Nota.* La figura representa el resultado del análisis DSC de la biopelícula a partir de celulosa bacteriana.

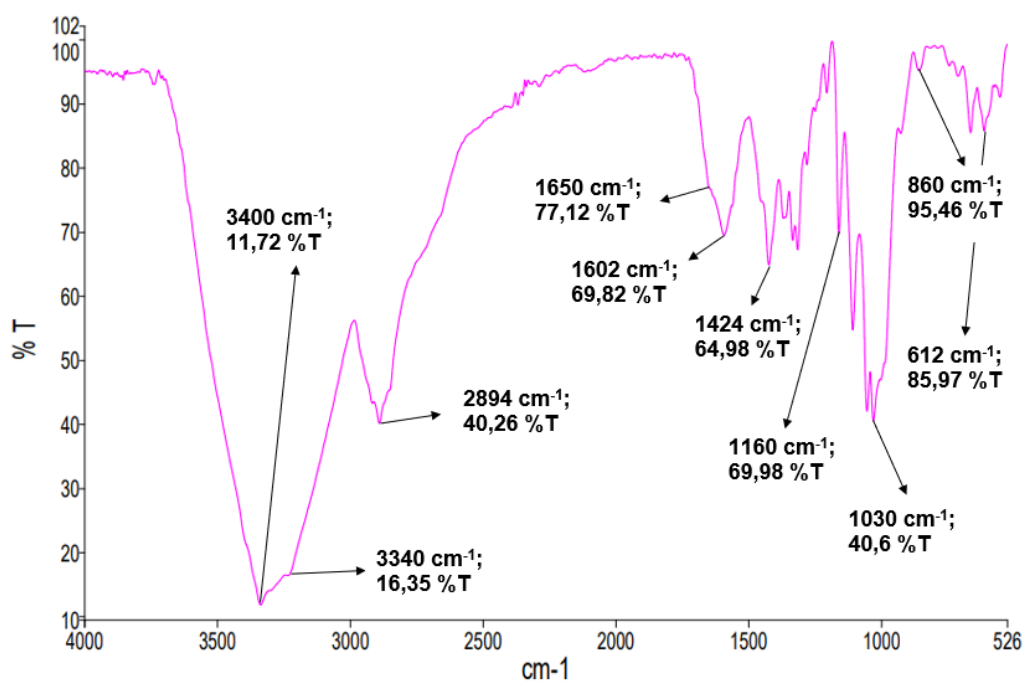
## ***Espectroscopia FT-IR***

Para la evaluación del análisis de FT-IR se realizó en la biopelícula con mayor esfuerzo a la tracción y mayor elongación, se tomó la del tratamiento BPCB4. Primeramente, se evidenció en el resultado del FT-IR expuesto en la Figura 30, que existía una amplia relación con el FT-IR de la película de CB, debido a que los anchos de banda fueron prácticamente similares. Pero la diferencia estuvo en los picos  $3400\text{ cm}^{-1}$  que hacía referencia al estiramiento de los grupos hidroxilo (-OH) tanto de la CB como del glicerol, donde su absorbancia presentó una ampliación en el pico por la interacción de los grupos hidroxilo con los grupos principales de la cadena polimérica, generando una mayor resistencia en las propiedades mecánicas de las biopelículas. Finalmente, en el pico de  $1602\text{ cm}^{-1}$  expone la presencia de CMC. Todas las diferencias anteriormente mencionadas se relacionaron la investigación realizada por Arfa Yanti et al., (2021)

En cuanto a los picos relacionados con la celulosa bacteriana fueron:  $3340\text{ cm}^{-1}$  estiramiento de grupos hidroxilo (-OH),  $2894\text{ cm}^{-1}$  estiramiento de CH de alcanos,  $1650\text{ cm}^{-1}$  deformación del  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ,  $1424\text{ cm}^{-1}$  deformación C-OH,  $1030\text{ cm}^{-1}$  estiramiento de -COH,  $1160\text{ cm}^{-1}$  estiramiento de COC,  $860\text{ cm}^{-1}$  presencia del monómero de glucosa  $\beta\text{-1,4}$  y finalmente el  $612\text{ cm}^{-1}$  especifica la deformación del -OH fuera del plano.

**Figura 30**

*FT-IR de la biopelícula.*



*Nota.* La figura muestra los resultados de un análisis FT-IR de la biopelícula a partir de celulosa bacteriana.

### **Aplicación potencial con referencia a las biopelículas**

Mediante los resultados obtenidos de caracterización de las biopelículas a partir de celulosa bacteriana con la adición de carboximetilcelulosa y glicerol, es posible predecir una

aplicación que estará relacionado con el campo alimenticio específicamente como biopelículas para el recubrimiento de alimentos.

Según Indriyati & Indrarti, (2018), para aplicaciones comestibles específicamente para el recubrimiento de alimentos con alto grado de humedad requieren biopelículas que sean poco solubles para evitar su desintegración al contacto con el producto. Por ende, las biopelículas obtenidas presentan un bajo grado de solubilidad, evidenciado en el tratamiento BPCB4 con un valor de 21,11 %. En cuanto al espesor el valor obtenido de 0,0544 mm es ideal soportar el esfuerzo mecánico de los alimentos durante el recubrimiento.

En relación a los análisis de FT-IR se obtiene los picos  $3400\text{ cm}^{-1}$  y  $1602\text{ cm}^{-1}$  que son característicos en películas de CB aplicadas en la conservación de alimentos como describe en su investigación (Arfa Yanti et al., 2021).



## Capítulo V

### Conclusiones y Recomendaciones

#### Conclusiones

- Con un proceso de fermentación de hongo de té se logra obtener celulosa bacteriana y ser precursora en la formación de biopelículas.
- Al aplicar en los medios de cultivos una temperatura de 30 °C y una concentración de sacarosa de 250 g/L, se obtuvo las cantidades más altas en cuanto a la producción de celulosa bacteriana con un valor promedio de 0,97 g y un rendimiento total del proceso del 0,39 %, evidenciando que su grado de producción es muy bajo con respecto al tiempo que requiere el proceso de fermentación.
- Una baja concentración de sacarosa y temperatura, hace que la bacteria *Acetobacter xylinum* no se adapte al medio de cultivo, provocando la incrustación de levadura en el interior de las películas de celulosa bacteriana, evidenciado en los cultivos que fueron fermentados a temperatura ambiente y 100 g/L de sacarosa, afectando su peso y rendimiento.
- Las películas de celulosa bacteriana con mejor rendimiento poseen propiedades mecánicas adecuadas con un esfuerzo máximo a la tracción de 25,24 MPa, pero una baja elongación con un 9,12%, esto debido a la alta cristalinidad de la película. Con una humedad de 11,60%, hace que la película no sea vulnerable a la degradación rápida por crecimiento de hongos, en cuanto a la solubilidad con un valor 18,07 % la película es poco soluble en agua. No presenta cambios térmicos y su espectro de IR presenta la mayoría de picos relacionados con la estructura de la celulosa bacteriana.
- Las biopelículas obtenidas presentaron mejores propiedades mecánicas debido al GLY y CMC obteniendo un esfuerzo máximo a la tracción de 21,16 MPa y una elongación de

25,811%. En cuanto a las propiedades fisicoquímicas los valores de humedad aumentaron al 21,11% por la presencia del GLY y se redujo la solubilidad al 14,5% por la interacción de CMC.

- Con las propiedades obtenidas en las biopelículas estas pueden ser usada en la industria alimenticia, para el recubrimiento de alimentos con alto grado de humedad, debido a que las biopelículas proporcionan resistencia, no se desintegran al ser poco solubles, baja humedad presenta estabilidad térmica evitando una degradación rápida.

## Recomendaciones

- Se recomienda utilizar otro tipo de fuente de carbono diferente a la sacarosa, para identificar si produce mayor cantidad de celulosa bacteriana y mejora el rendimiento.
- Establecer el rango de temperatura de entre 25 °C y 30 °C para realizar el proceso de fermentación, de tal manera acelere de crecimiento de celulosa bacteriana, ya que este se ve afectado por esta variable y así reducir el tiempo de cultivo obteniendo el mismo rendimiento.
- Identificar la concentración exacta de la fuente de carbono, para evitar que el crecimiento de la bacteria *Acetobacter xylinum* sea mínimo por la no adaptación en el medio de cultivo o a su vez producir un cultivo ácido que haga que se quemara la celulosa bacteriana.
- Para la realización de la suspensión de CB establecer una relación acorde con el agua, para evitar que se pierda las propiedades de la celulosa bacteriana por exceso de agua.
- Realizar un análisis microscopía electrónica de barrido para especificar mejor la estructura tanto de la celulosa bacteriana como biopelícula.

## Bibliografía

- Aguilar, A. (2020, January 13). *La celulosa bacteriana: un material universal del futuro*. Química y Gestión Ambiental. <https://es.linkedin.com/pulse/la-celulosa-bacteriana-un-material-universal-del-matoso-aguilar>
- Amin, M., Abadi, G., Ahmad, N., Katas, H., & Jamal, J. (2012). Bacterial Cellulose Film Coating as Drug Delivery System: Physicochemical, Thermal and Drug Release Properties. *Sains Malaysiana*, 41(5), 561–568. [http://www.ukm.my/jsm/pdf\\_files/SM-PDF-41-5-2012/06%20Mohammad%20Cairul.pdf](http://www.ukm.my/jsm/pdf_files/SM-PDF-41-5-2012/06%20Mohammad%20Cairul.pdf)
- Area, M., & Park, S. (2017). *Panorama de la Industria de Celulosa y Papel y Materiales Lignocelulósicos 2016* (1st ed.). <http://hdl.handle.net/11336/108749>
- Arfa Yanti, N., Wirdhana A, S., H. Muhiddi, N., Ahmad Nur, L. O., S., & Walhidayah, T. (2021). Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* Strain LKN6 Using Sago Liquid Waste as Nutrient Source. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 24(3), 335–344. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2021.335.344>
- Arrieta, A., Durango, L., & Arizal, E. (2018). Estudio de las propiedades absorbentes de un biopolímero a base de almidón de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Espacios*, 39 (Número 53) (0798 1015).
- Atta, O. M., Manan, S., Ahmed, A. A. Q., Awad, M. F., Ul-Islam, M., Subhan, F., Ullah, M. W., & Yang, G. (2021). Development and Characterization of Yeast-Incorporated Antimicrobial Cellulose Biofilms for Edible Food Packaging Application. *Polymers*, 13(14), 2310. <https://doi.org/10.3390/polym13142310>

- Avcioglu, N. H., Birben, M., & Seyis Bilkay, I. (2021). Optimization and physicochemical characterization of enhanced microbial cellulose production with a new Kombucha consortium. *Process Biochemistry*, *108*, 60–68.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.005>
- Azeredo, H. M. C., Barud, H., Farinas, C. S., Vasconcellos, V. M., & Claro, A. M. (2019). Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007>
- Bai, F.-W., Yang, S., & Ho, N. W. Y. (2019). Fuel Ethanol Production From Lignocellulosic Biomass. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 49–65). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00150-6>
- Ballesteros Pomar, M. (2018). Papel de los prebióticos y los probióticos en la funcionalidad de la microbiota del paciente con nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*.  
<https://doi.org/10.20960/nh.1956>
- Brigham, C. (2018). Biopolymers. In *Green Chemistry* (pp. 753–770). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00027-3>
- Cazón, P., Velázquez, G., & Vázquez, M. (2020). Bacterial cellulose films: Evaluation of the water interaction. *Food Packaging and Shelf Life*, *25*, 100526.  
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100526>
- Chaudhary, B. I., Liotta, C. L., Cogen, J. M., & Gilbert, M. (2016). Plasticized PVC. In *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.02631-X>

- Chavez, J., Martínez, S., Contreras, M., & Escamilla, M. (2004). Celulosa bacteriana en gluconacetobacter xylinum: Biosíntesis y aplicaciones. *Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 7(1), 18–25.  
<http://repositorio.pediatrica.gob.mx:8180/handle/20.500.12103/3137>
- Chawla, P., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technol. Biotechnol*, 47(2), 107–124.  
<https://hrcak.srce.hr/file/59853>
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., Lombo, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F. J., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M. L., & Clemente, A. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*, 31, 99–118.  
<https://doi.org/http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309238517015>
- Costa, A. F. S., Almeida, F. C. G., Vinhas, G. M., & Sarubbo, L. A. (2017). Production of Bacterial Cellulose by Gluconacetobacter hansenii Using Corn Steep Liquor As Nutrient Sources. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02027>
- Costa, S. M., Aguiar, A., Luz, S. M., Pessoa, A., & Costa, S. A. (2015). Sugarcane Straw and Its Cellulose Fraction as Raw Materials for Obtainment of Textile fibers and Other Bioproducts. In *Polysaccharides* (pp. 513–533). Springer International Publishing.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0\\_53](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_53)
- Cuadrado, K. (2019). *INTELIGENCIA DE MERCADOS PARA LA EXPORTACIÓN DE BEBIDA DE TÉ NEGRO FERMENTADA A BASE DE KOMBUCHA ANDINA DE LA EMPRESA UQU DE LA CIUDAD DE OTAVALO* [Tesis de Grado, PONTIFICIA UNIVERSIDAD

CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA].

<https://dspace.pucesi.edu.ec/bitstream/11010/308/1/TESIS.pdf>

Engström, A. (2019). *Production of Bacterial Cellulose from Molasses by Kombucha Fermentation* [MSc in Resource Recovery – Polymer Technology, University of Borås].

<https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1442844/FULLTEXT01.pdf>

Esa, F., Tasirin, S. M., & Rahman, N. A. (2014). Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113–119.

<https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.017>

Foroughi-Dahr, M., Mostoufi, N., Sotudeh-Gharebagh, R., & Chaouki, J. (2017). Particle Coating in Fluidized Beds. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12206-1>

García, A. (2017). *OPTIMITZACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE NANOCELULOSA BACTERIANA POR FERMENTACIÓN* [TRABAJO FINAL DE MÁSTER, Universitat Politecnica de Catalunya].

<https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/115472/tfm.pdf?sequence=1&isallowe>

García-Alcocer, S. K., Salgado-García, S., Córdova-Sánchez, S., Rincón-Ramírez, J. A., Bolio-López, G. I., Castañeda Ceja, R., Saucedo-Corona, , Alma R., Falconi-Calderón, R., & Valerio-Cárdenas, C. (2019). Blanqueo de la fibra de celulosa de paja de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) con peróxido de hidrógeno. *Agro Productividad*, 12(7).

<https://doi.org/10.32854/agrop.v0i0.1434>

Gijsman, P. (2011). Polymer Stabilization. In *Applied Plastics Engineering Handbook* (pp. 375–399). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3514-7.10021-2>

- Goh, W. N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A., & Bhat, R. (2012). Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *International Food Research Journal*, 19, 109–117.  
<http://search.proquest.com/docview/953561139/>
- Guerrero Medina, A. S., Treviño Garza, M. Z., Báez-González, J. G., García Gómez, C., Luna Maldonado, A. I., & Márquez Reyes, J. M. (2022). Fermentación de té verde con dextrosa y glucosa como fuentes de carbono para producir películas de celulosa microbiana. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 7, 49–53.  
<https://doi.org/http://eprints.uanl.mx/23519/1/20.pdf>
- Havstad, M. R. (2020). Biodegradable plastics. In *Plastic Waste and Recycling* (pp. 97–129). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817880-5.00005-0>
- Hernández, L. (2018). *DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA DE KOMBUCHA* [Tesis de Grado, Universidad Rafael Landívar].  
<http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2018/02/02/Hernandez-Lisbeth.pdf>
- Indriyati, & Indrarti, L. (2018). Preparation and characterization of bacterial cellulose-beeswax films. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 160, 012010.  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/160/1/012010>
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2014). A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>



- Jayani, T., Marimuthu, S., & Sivakumar, U. (2019). Bacterial Cellulose Dissolution for High-Value Nano Fibre Application. *Madras Agricultural Journal*, 106, 199–204.  
<https://doi.org/10.29321/MAJ 2019.000246>
- Jiménez-Sánchez, Y. Y. (2021). APLICACIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA EN EL DISEÑO DE PRODUCTOS: UN CAMINO A LA SUSTENTABILIDAD. *DISEÑO ARTE Y ARQUITECTURA*, 11, 41–57. <https://doi.org/10.33324/daya.vi11.458>
- Kögel-Knabner, I., & Amelung, W. (2014). Dynamics, Chemistry, and Preservation of Organic Matter in Soils. In *Treatise on Geochemistry* (pp. 157–215). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.01012-3>
- Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, A., Sarkar, T., Pati, S., Edinur, H. A., Abdul Kari, Z., Mohd Noor, N. H., & Ray, R. R. (2021). Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23).  
<https://doi.org/10.3390/ijms222312984>
- Lakin, P. (2017). *Infrared and Raman Spectroscopy Principles and Spectral Interpretation* (2nd ed., Vol. 1). Elsevier. <https://shop.elsevier.com/books/infrared-and-raman-spectroscopy/larkin/978-0-12-804162-8>
- Lee, Y.-J., An, S.-J., Bae, E.-B., Gwon, H.-J., Park, J.-S., Jeong, S. I., Jeon, Y.-C., Lee, S.-H., Lim, Y.-M., & Huh, J.-B. (2017). The Effect of Thickness of Resorbable Bacterial Cellulose Membrane on Guided Bone Regeneration. *Materials (Basel, Switzerland)*, 10(3).  
<https://doi.org/10.3390/ma10030320>
- Lestari, P., Elfrida, N., Suryani, A., & Suryadi, Y. (2013). Study on the Production of Bacterial Cellulose from *Acetobacter xylinum* using Agro-Waste. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 7, 75–80. <https://jjbs.hu.edu.jo/files/v7n1/Short%20Communication-3m.pdf>

- Machado, K. (2020). Uso de probióticos en el tratamiento y laprevención de diarrea aguda en niños. *Archivos de Pediatría Del Uruguay*, 91(1). <https://doi.org/10.31134/AP.91.1.6>
- Maldonado, J. (2022). *Elaboración de una bebida de té negro fermentado a base de kombucha (Manchurian Fungus) utilizando las propiedades bromatológicas del jackfruit, en la parroquia San Antonio de Pichincha,2022* [Tesis de Grado]. INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR ECUATORIANO DE PRODUCTIVIDAD.
- Márquez-Reyes, J. M., Rodríguez-Quiroz, R. E., Hernández-Rodríguez, J. P., Rodríguez-Romero, B. A., Flores-Breceda, H., Napoles-Armenta, J., Romero-Soto, I. C., Galindo-Rodríguez, S. A., Báez-González, J. G., & Treviño-Garza, M. Z. (2022). Production and Characterization of Biocomposite Films of Bacterial Cellulose from Kombucha and Coated with Chitosan. *Polymers*, 14(17). <https://doi.org/10.3390/polym14173632>
- Martínez-Pérez, P., Ortín, A. B. B., Durand, V., & Gómez-Plaza, E. (2019). Reemplazo de la estabilización tartárica por frío en las bodegas: El uso de carboximetil celulosa, poliaspartato de potasio y resinas intercambiadoras de iones. *BIO Web of Conferences*, 12, 02018. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191202018>
- Merchan, J., & Tigre, J. (2019). *OBTENCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA A BASE DE KOMBUCHA POR SUSTITUCIÓN DE TÉ NEGRO POR TÉ DE CÁSCARA DE CAFÉ* [Trabajo de Titulación, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/45570>
- Mohiuddin, M., Kumar, B., & Haque, S. (2017). Biopolymer Composites in Photovoltaics and Photodetectors. In *Biopolymer Composites in Electronics* (pp. 459–486). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809261-3.00017-6>

Morocho, V. (2013). *Estudio del comportamiento a fatiga mecánica de polímeros compuestos con fibra natural y su incidencia en la aplicación para la fabricación de accesorios de la industria carrocera* [Tesis de Grado, Universidad Técnica de Ambato].

<http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/6107>

Nasrollahzadeh, M., & Sajjadi, M. (2021). An introduction to green chemistry. In *Biopolymer-Based Metal Nanoparticle Chemistry for Sustainable Applications* (pp. 3–22). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822108-2.00001-6>

Nava, M. (2016). *Diseño de planta piloto para producción de Celulosa Bacteriana* [Trabajo de Fin de Grado, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona].

<http://hdl.handle.net/2117/98499>

Nikiema, J., & Asiedu, Z. (2022). A review of the cost and effectiveness of solutions to address plastic pollution. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(17), 24547–24573.

<https://doi.org/10.1007/s11356-021-18038-5>

Ortega-Peña, S., & Hernández-Zamora, E. (2019). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 75(2). <https://doi.org/10.24875/BMHIM.M18000012>

Petrosian, A. (2021). *Production of bacterial cellulose from kombucha SCOBY: optimization of the bioprocess and industrial application* [Dissertações de Mestrado, Saint-Petersburg State Institute of Technology]. <http://hdl.handle.net/10198/25113>

Portela, R., Leal, C. R., Almeida, P. L., & Sobral, R. G. (2019). Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microbial Biotechnology*, 12(4), 586–610.

<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13392>

- Radoselovics, Á. (2016). *Caracterización de las propiedades térmicas y dieléctricas de composites de celulosa bacteriana/ carboximetil celulosa/ óxido de grafeno oxidado* [Tesis de Grado, Universitat Politècnica de València]. <https://riunet.upv.es/handle/10251/68547>
- Riera, M. A., & Palma, R. (2018). Obtención de bioplásticos a partir de desechos agrícolas. Una revisión de las potencialidades en Ecuador. *Avances En Química*, 13, 69–78. <https://doi.org/https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6886403>
- Soriano, J., & Barreto, M. (2018). *SÍNTESIS Y ESTUDIO DE PROPIEDADES DE CELULOSA BACTERIANA OBTENIDA DE PIÑA Y BANANO, INOCULADOS CON KOMBUCHA*. [TRABAJO DE TITULACIÓN, UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/27913>
- Treviño-Garza, M., Guerrero-Medina, A., González-Sánchez, R., García-Gómez, C., Guzmán-Velasco, A., Báez-González, J., & Márquez-Reyes, J. (2020). Production of Microbial Cellulose Films from Green Tea (*Camellia Sinensis*) Kombucha with Various Carbon Sources. *Coatings*, 10(11), 1132. <https://doi.org/10.3390/coatings10111132>
- Tsouko, E., Kourmentza, C., Ladakis, D., Kopsahelis, N., Mandala, I., Papanikolaou, S., Paloukis, F., Alves, V., & Koutinas, A. (2015). Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 14832–14849. <https://doi.org/10.3390/ijms160714832>
- Villamar, M. (2021). *EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTEO DE PROBIÓTICOS DE UNA BEBIDA KOMBUCHA (Manchurian fungus) ELABORADA CON JACKFRUIT (Artocarpus heterophyllus)* [Trabajo de Titulación, Universidad Agraria del Ecuador].

<https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/VILLAMAR%20MOTA%20MICHELLE%20ANDREA.pdf>

Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.-P., & Taillandier, P. (2018).

Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>

Wahid, F., & Zhong, C. (2021). Production and applications of bacterial cellulose. In *Biomass,*

*Biofuels, Biochemicals* (pp. 359–390). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821888-4.00010-1>

## Anexos