



Obtención de celulosa microbiana, como subproducto de un hongo kéfir, para el desarrollo de biopelículas.

García Caicedo, Katherine Nicole

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

Msc. Sayavedra Delgado, Jonathan Javier

8 de marzo del 2024

Latacunga

Reporte de verificación de contenido



Plagiarism report

UIC_Garcia Caicedo Katherine Nicole....

Scan details

Scan time:
August 26th, 2023 at 3:20 UTC

Total Pages:
80

Total Words:
19986



Plagiarism Detection

Types of plagiarism	Words
Identical	0.5% 104
Minor Changes	0.2% 42
Paraphrased	3% 590
Omitted Words	16.9% 3385

AI Content Detection

Text coverage
AI text
Human text

Plagiarism Results: (15)

- T10540_Producción de celulosa microbiana a partir ...** 1.7%

<https://red.uao.edu.co/bitstream/handler/10614/14665/t1054...>

Yeimi Alejandra Marin Perdomo

PRODUCCIÓN DE CELULOSA MICROBIANA A PARTIR DE NOMBUCHA PARA USO POTENCIAL EN LA FABRICACIÓN DE APÓSITOS CON LIBERACIÓN DE...
- Food News Latam - ¿Qué es el kefir y cuáles son sus...** 0.7%

<https://www.foodnewslatam.com/paises/4685-1c2%bfc%bc...>

Inicio Quienes Somos Eventos Videos Imágenes Search ...
- Food News Latam - ¿Qué es el kefir y cuáles son sus...** 0.7%

Ing. Sayavedra Delgado, Jonathan Javier. Msc

C.C: 0502865850



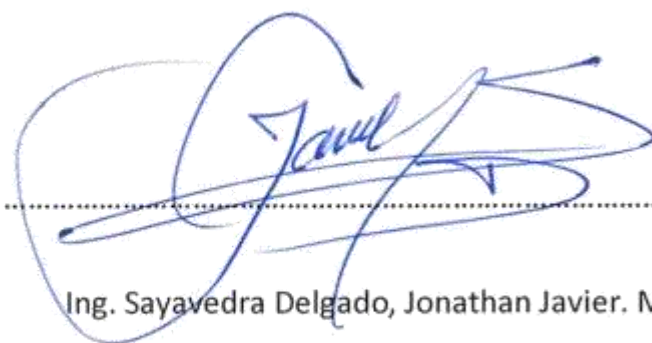
Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

Certificación

Certifico que el trabajo de Unidad de Integración Curricular: **“Obtención de celulosa microbiana, como subproducto de un hongo kéfir, para el desarrollo de biopelículas.”** fue realizado por la señorita **Katherine Nicole García Caicedo**, la misma que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de la Fuerza Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por lo cual me permito acreditar y autorizar para que se o sustente públicamente.

Latacunga, 8 de marzo de 2024



Ing. Sayavedra Delgado, Jonathan Javier. Msc

C.C: 0502865850



Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

Responsabilidad de Autoría

Yo **García Caicedo, Katherine Nicole**, con cédula de ciudadanía n°1804908323, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de Unidad de Integración Curricular: **Obtención de celulosa microbiana, como subproducto de un hongo kéfir, para el desarrollo 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, 8 de marzo de 2024

García Caicedo, Katherine Nicole

C.C: 1804908323



Departamento de Ciencias de la Energía y Mecánica

Carrera de Petroquímica

Autorización de Publicación

Yo **García Caicedo, Katherine Nicole**, con cédula de ciudadanía n°1804908323, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar del trabajo de Unidad de Integración Curricular: **Obtención de celulosa microbiana, como subproducto de un hongo kéfir, para el desarrollo de biopelículas** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Latacunga, 8 de marzo del 2024



García Caicedo, Katherine Nicole

C.C: 1804908323

Dedicatoria

A Dios, a quien le doy la gloria y la honra por haberme acompañado en esta larga etapa estudiantil, él ha sido mi perfecta paz en tiempos de angustia y oscuridad, me ha levantado y ha renovado mis fuerzas día a día; cuando ya parecía rendirme él me sostenido con su inmenso amor y me ha impulsado a seguir para cumplir mis metas y anhelos.

A mi familia, por haberme motivado con sus palabras de amor, esperanza y demostrarme su apoyo constante con sus consejos y acciones de apoyo. Por comprenderme completamente en mi carácter y amarme enteramente, por ser mis cómplices y compañeros en múltiples vivencias y aventuras. Su gran cualidad de escuchar mis ideas, celebrar mis éxitos y brindarme su apoyo incondicional, es la muestra invaluable de unión y cariño mutuo, son un motor que me ha impulsado a superarme cada día.

Dedico este logro con todo mi amor e inmensa gratitud. Sé que su apoyo continuo seguirá guiando mis pasos en el futuro, y espero poder retribuirles de la mejor manera posible.

Atentamente.

Katherine Nicole García Caicedo

Agradecimiento

A Dios que me ha brindado la vida, salud y fuerzas necesarias para salir adelante en cada reto de mi vida que con su amor infinito y misericordia a guiado cada uno de mis pasos para cumplir mis sueños y anhelos de mi corazón; además de enviar personas maravillosas a lo largo de mi vida estudiantil que han sido pilar fundamental en mi camino.

A mis padres por saber guiarme por el camino del bien, que con su gran amor y oraciones me han apoyado de forma incondicional; por haberme corregido y enriquecido como persona con sus consejos cuando las situaciones se tornaban difíciles han sido mi impulso para no rendirme y dar lo mejor de mí.

A mis hermanos: Santiago, Melanie y Andrés que con entrañable amor y ternura me animaron siempre y me inspiraron para ser mejor y convertirme en la mejor versión de mí. El regalo más bonito que llevo conmigo siempre es su ingenio y ocurrencias con un sin fin de historias compartidas que en medio de risas y momentos complicados, hemos crecido juntos en un apoyo mutuo.

A mi tutor, Ing. Javier Sayavedra Delgado por su invaluable apoyo y orientación durante todo este proceso académico, su conocimiento, paciencia y dedicación. La guía experta brindada, me ha permitido enfrentar desafíos con confianza y superar obstáculos, la confianza depositada en mí siempre presente con la disposición a escuchar mis ideas y brindarme retroalimentación constructiva, lo que enriqueció significativamente mi trabajo. También agradezco al Ing. Mauricio Bedón por su gran disposición, paciencia y comprensión durante el desarrollo de mi tesis.

A mi tío, Oswaldo Caicedo quien ha sido una gran figura de ejemplo en mi vida, que con sus atinados consejos me ha apoyado en mi carrera como estudiante y en mi vida personal.

A mis grandes amigos, Patricia Jiménez y Andrés Basantes que desde el inicio de la universidad me extendieron su sincera amistad y han sido incondicionales en cada etapa de mi vida compartiendo varias vivencias llenas de risas y anécdotas que quedan guardados en mi mente y que han hecho una hermosa huella en mi corazón.

Con el mayor agradecimiento.

Katherine Nicole García Caicedo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Carátula	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de contenido	9
Índice de figuras	15
Índice de tablas.....	17
Índice de ecuaciones.....	18
Índice de abreviaturas	19
Resumen	20
Abstract	21
Capítulo I: Generalidades.....	22
Introducción.....	22
Justificación e importancia.	24
Alcance	25
Objetivos.....	26

<i>Objetivo General</i>	26
<i>Objetivos Específicos</i>	26
Hipótesis	27
Variables de Investigación	27
<i>Variables Dependientes</i>	27
<i>Variables Independientes</i>	28
Capítulo II: Marco teórico	29
Biopolímeros.....	29
<i>Funcionalidad de polímeros biodegradables</i>	31
Biopelículas a partir de hongos.....	31
<i>Plastificantes</i>	31
Métodos de formación de biopelículas	33
Polisacáridos	35
<i>Kefiran</i>	35
<i>Celulosa Microbiana</i>	36
<i>Definición de celulosa microbiana</i>	36
<i>Estructura</i>	37
<i>Celulosa microbiana y Celulosa vegetal</i>	39
<i>Técnicas de fermentación</i>	39
<i>Producción de celulosa microbiana</i>	40
<i>Optimización de parámetros fisicoquímicos</i>	40
<i>Biopelícula de celulosa</i>	41
Consideraciones generales del kéfir.....	41
<i>Propiedades y composición de Kéfir</i>	43

<i>Producción de caldo de cultivo kéfir</i>	44
<i>Biofilm a partir de gránulos de kéfir</i>	45
Aplicaciones industriales.....	46
Ensayos fisicoquímicos.....	48
<i>Contenido humedad</i>	48
<i>Permeabilidad vapor de agua</i>	49
<i>Espesor de película</i>	49
Ensayos mecánicos	49
<i>Resistencia a la tracción y porcentaje de elongación</i>	50
Técnicas de análisis térmico.....	51
<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	51
<i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i>	52
<i>Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR)</i>	52
Capítulo III.....	54
Metodología	54
Equipos, Materiales y Reactivos Equipos	54
<i>Materia Prima</i>	55
<i>Materiales</i>	55
<i>Reactivos</i>	55
Obtención de materia prima.....	56
Acondicionamiento del cultivo.	56
Proceso de obtención de celulosa microbiana.....	57
Extracción de Celulosa Microbiana	58
Purificación de Celulosa Microbiana	58

Neutralización, Blanqueamiento, Secado y Pulverizado.	58
Diseño experimental.	59
<i>Diseño Factorial Completo 2^k</i>	59
<i>Diseño experimental para cultivo.</i>	59
<i>Diseño experimental para biopelícula a partir de celulosa.</i>	61
Rendimiento de Celulosa Microbiana	65
Rendimiento de Polisacárido.	65
Proceso de obtención de polisacárido de kéfir de leche	66
Preparación de películas	68
<i>Preparación de películas de celulosa microbiana</i>	68
<i>Preparación de películas de celulosa microbiana y polisacárido "kefiran"</i>	68
Pruebas fisicoquímicas.....	69
<i>Contenido de Humedad (%)</i>	69
<i>Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA)</i>	69
<i>Espesor</i>	71
Ensayos mecánicos	72
<i>Resistencia a la tracción y porcentaje de elongación</i>	72
Técnicas de análisis térmico.	73
<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	73
<i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i>	74
Características estructurales	75
<i>Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR)</i>	75
Capítulo IV: Resultados y Discusión	77
Análisis de Resultados	77

Obtención de Celulosa Microbiana	77
Formación de películas.	78
<i>Cantidad de celulosa seca producida.</i>	79
<i>Contenido de Humedad (%)</i>	81
<i>Permeabilidad al Vapor de Agua</i>	84
<i>Espesor</i>	86
<i>Espesor de Celulosa Microbiana.</i>	86
<i>Espesor de Biopelícula a base de celulosa Microbiana.</i>	87
<i>Rendimiento de celulosa.</i>	90
<i>Rendimiento de polisacárido kefiran.</i>	91
Análisis de diseño experimental	91
<i>Rendimiento de celulosa.</i>	92
ANOVA con respecto a la permeabilidad al vapor de agua en biopelículas de celulosa.	95
<i>Diseño para películas de celulosa.</i>	95
<i>Diseño para películas de kefiran</i>	99
Características estructurales	101
<i>Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR)</i>	101
Técnicas de análisis térmico	105
<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	105
<i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i>	107
Ensayos mecánicos	110
<i>Resistencia a la tracción y porcentaje de elongación</i>	110
Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones	115
<i>Conclusiones</i>	115
<i>Recomendaciones</i>	117
Bibliografía	118

Anexos..... 128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Proceso de obtención de polisacárido kefiran.</i>	30
Figura 2 <i>Diagrama del método Casting.</i>	33
Figura 3 <i>Estructura molecular del kefiran.</i>	36
Figura 4 <i>Estructura molecular de la celulosa.</i>	38
Figura 5 <i>Curva de elongación en función del tiempo.</i>	50
Figura 6 <i>Proceso de obtención de celulosa bacteriana.</i>	57
Figura 7 <i>Proceso de obtención de polisacárido kefiran.</i>	67
Figura 8 <i>Sistema de cámara para análisis de permeabilidad al vapor de agua.</i>	71
Figura 9 <i>Máquina de ensayos de tracción.</i>	73
Figura 10 <i>Equipo de análisis DSC-Mettler Toledo.</i>	74
Figura 11 <i>Equipo de análisis TGA-Perkin-Elmer.</i>	75
Figura 12 <i>Película de celulosa microbiana.</i>	77
Figura 13 <i>Película de celulosa microbiana y biopelículas de celulosa y kefiran.</i>	78
Figura 14 <i>Esquema de barras del porcentaje de humedad de la película de celulosa microbiana.</i>	81
Figura 15 <i>Esquema de barras del porcentaje de humedad de la biopelícula de celulosa microbiana.</i>	82
Figura 16 <i>Esquema de barras del porcentaje de humedad de la biopelícula de celulosa microbiana.</i>	83
Figura 17 <i>Esquema de barras del porcentaje de humedad de la biopelícula de celulosa microbiana.</i>	86
Figura 18 <i>Diagrama de Pareto de la celulosa microbiana.</i>	93
Figura 19 <i>Gráfica de contorno del peso de celulosa y los factores de influencia.</i>	95
Figura 20 <i>Diagrama de Pareto de la biopelícula de celulosa.</i>	97
Figura 21 <i>Diagrama de contorno de la biopelícula de celulosa.</i>	98
Figura 22 <i>Diagrama de contorno de la biopelícula de kefiran.</i>	100

Figura 23	<i>Espectro FT-IR de la celulosa microbiana del hongo kéfir.</i>	101
Figura 24	<i>Espectro FT-IR de la biopelícula de celulosa microbiana del hongo kéfir.</i>	103
Figura 25	<i>Espectro FT-IR del polisacárido kefiran.</i>	104
Figura 26	<i>DSC de la celulosa microbiana.</i>	105
Figura 27	<i>DSC de la biopelícula de celulosa microbiana.</i>	106
Figura 28	<i>Termograma de película de celulosa microbiana A.</i>	107
Figura 29	<i>Termograma de la biopelícula de celulosa microbiana MC14</i>	108
Figura 30	<i>Termograma de la biopelícula del polisacárido kefiran.</i>	109
Figura 31	<i>Película MC15 después del ensayo de tracción.</i>	111
Figura 32	<i>Gráfica de resistencia a la tracción de la película MA.</i>	111
Figura 33	<i>Gráfica de resistencia a la tracción de la película MC15.</i>	112
Figura 34	<i>Gráfica de resistencia a la tracción de la película MK15.</i>	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales empresas dedicadas a la producción de celulosa.....	38
Tabla 2 Composición química de la bebida kéfir.....	44
Tabla 3 Población microbiana de la bebida kéfir.....	45
Tabla 4 Factores y variables significativas evaluadas para el cultivo del hongo kéfir.....	60
Tabla 5 Factores y niveles correspondientes del caldo de cultivo de hongo kéfir, aplicando el diseño.....	60
Tabla 6 Factores y variables significativas evaluadas para el desarrollo de biopelículas.....	61
Tabla 7 Combinaciones de celulosa microbiana, estabilizante CMC y plastificante.....	62
Tabla 8 Combinaciones de cantidad de kefirán, estabilizante CMC y plastificante.....	63
Tabla 9 Cantidad de celulosa microbiana seca.....	79
Tabla 10 Datos del peso de las muestras tomadas para prueba de permeabilidad.....	84
Tabla 11 Películas de celulosa respecto a los cultivos.....	87
Tabla 12 Espesor de Películas biodegradables con celulosa microbiana.....	87
Tabla 13 Espesor de Películas biodegradables con polisacárido kefirán.....	88
Tabla 14 Rendimiento total y diario de la celulosa microbiana.....	90
Tabla 15 Rendimiento total de polisacárido kefirán.....	91
Tabla 16 Rendimiento de producción de celulosa microbiana evaluado con ANOVA.....	92
Tabla 17 Test de Tukey de celulosa microbiana.....	94
Tabla 18 Análisis ANOVA respecto a las respuestas de peso y permeabilidad al vapor de agua.....	96
Tabla 19 Análisis ANOVA respecto a las respuestas de peso y permeabilidad al vapor de agua.....	99
Tabla 20 Resultados de las pruebas mecánicas de las películas.....	114

ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1 Rendimiento de celulosa Microbiana.....</i>	65
<i>Ecuación 2 Rendimiento diario de celulosa Microbiana</i>	65
<i>Ecuación 3 Rendimiento total de Polisacárido.....</i>	65
<i>Ecuación 4 Permeabilidad al vapor de agua.....</i>	70
<i>Ecuación 5 Resistencia a la tracción.....</i>	72
<i>Ecuación 6 Elongación</i>	72

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PVA: Permeabilidad al vapor de agua

BAA: Bacterias ácido acéticas.

LAA: bacterias acidolácticas. *Bacterias ácidolácticas*

CMC: Carboximetilcelulosa

CM: Celulosa microbiana

EPS: Exopolisacáridos

LAB: bacterias del ácido láctico

BAA: bacterias del ácido acético

IR: Espectroscopia infrarroja

TGA: Análisis termogravimétrico

FDA: Administración de alimentos y medicamentos

ASTM: American Society Testing Materials

DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido

RT: Rendimiento total

RD: Rendimiento diario

TS: Resistencia a la tracción

EB: alargamiento a la rotura

TEB: energía de tracción a la rotura

CMA: Celulosa microbiana natural

CMK: Película de celulosa microbiana y aditivos

Resumen

El presente trabajo, tuvo como objetivo la producción de celulosa microbiana dado a condiciones de cultivo estático del hongo kéfir; el caldo de fermentación contó con una fuente de carbono (azúcar) y una fuente de nitrógeno (cáscaras de piña) el proceso incubación fue de 15 días para la generación máxima de celulosa microbiana (CM). La matriz estructural secretada fue sometida a tratamientos químicos de purificación con NaOH y blanqueamiento con cloro comercial al 5%. El diseño del proceso se analizó mediante el diseño experimental factorial, para evaluar las variables del cultivo según la producción de celulosa seca. El cultivo de mayor rendimiento alcanzado fue de 2,315% en un cultivo a 25°C y 80 gr de azúcar. El desarrollo de biopelículas con base en la celulosa obtenida se analizó con el análisis de varianza y comparaciones de variables por el método Tukey. La caracterización de la película de celulosa y las biopelículas de celulosa y kefiran trató en función a variables como: espesor, contenido de humedad, propiedades mecánicas y térmicas. El espesor de las películas obtenidas con valores de 0,436 a 0,244 mm, el contenido de humedad entre rangos 1,55 y 3,47% y para resistencia a la tracción se requiere una fuerza máxima de 10,57 N en función al desplazamiento. Finalmente, la celulosa microbiana obtenida es insoluble, presenta amplia aplicación en el desarrollo de biomateriales; tal como el desarrollo de biofilm para el recubrimiento de alimentos además de convertirse en una alternativa eco amigable que presenta potenciales aplicaciones en distintas áreas de la industria. La obtención de biopelículas de celulosa y kefiran implican un desafío creciente en el desarrollo de tecnología para la reproducción del proceso a escala industrial.

Palabras clave: CM, kéfir, kefiran, biopelículas de kéfir, cultivo kéfir, fermentación túbicos.

Abstract

The objective of the present work was the production of microbial cellulose under static culture conditions of the kefir fungus; the fermentation broth had a carbon source (sugar) and a nitrogen source (pineapple peels) and the incubation process lasted 15 days for the maximum generation of microbial cellulose (MC). The secreted structural matrix was subjected to chemical treatments of purification with NaOH and bleaching with 5% commercial chlorine. The process design was analyzed by means of a factorial experimental design to evaluate the variables of the culture as a function of dry cellulose production. The highest yield achieved was 2,315% in a culture at 25°C and 80 g of sugar. The development of biofilms based on the cellulose obtained was analyzed by analysis of variance and comparisons of variables by the Tukey method. The characterization of the cellulose film and the cellulose and kefiran biofilms was based on variables such as: thickness, moisture content, mechanical and thermal properties. The thickness of the films obtained with values from 0.436 to 0.244 mm, the moisture content between 1.55 and 3.47% and for tensile strength a maximum force of 10.57 N was required according to the displacement. Finally, the microbial cellulose obtained is insoluble, it presents wide application in the development of biomaterials; such as the development of biofilm for food coating, besides becoming an eco-friendly alternative that presents potential applications in different areas of the industry. Obtaining cellulose and kefiran biofilms implies a growing challenge in the development of technology for the reproduction of the process on an industrial scale.

Capítulo I

Generalidades

Introducción

La creciente preocupación por la contaminación plástica ha impulsado la investigación de nuevos bioproductos con características superiores; los materiales de origen fósil(plásticos) han tenido una gran demanda mundial y su desmesurado uso se debe a: su bajo costo, alta versatilidad, buen desempeño funcional y de barrera; sin embargo, se han convertido en una potencial amenaza debido a los grandes impactos ambientales. El desarrollo de polímeros biodegradables apareció de forma incipiente en 1980, el impacto de estos materiales sugeriría afectaciones graves causando el calentamiento global; las posibles vías de mitigación aparecieron al emplear recursos sustentables, siendo la materia prima la “biomasa” para la producción de biopolímeros (Cottet et al., 2020).

La búsqueda en pro desarrollo de nuevos materiales de base biológica sin causar impactos ambientales negativos, para aplicaciones de recubrimiento y envasado con características potenciales en la conservación y calidad de productos alimenticios por periodos de vida prolongados ha generado gran interés por la gran demanda en el mercado de materiales de protección impulsando la creación de películas comestibles o no comestibles biodegradables; cuya función es la protección de agentes externos como: microorganismos, vapor de agua, oxígeno y luz (Sorrentino et al., 2007).

La celulosa microbiana es un polímero que comparte similitudes con la vegetal en términos de características, pero difiere en fibras y pureza; pero destaca por tener mayor resistencia mecánica, cristalinidad e hidrofilia (Ramírez Tapias et al., 2020). La aplicación y uso de biopolímeros en investigaciones describe en áreas como: nanotecnología, biomedicina e industria alimentaria (Neera et al., 2015).

Las alternativas para obtener biopolímeros derivan de aquellos que han sido generados por microorganismos que sintetizan exopolisacáridos (EPS), formados principalmente por: glucosa manosa, fructuoso, galactosa y ácido urónico entre otros compuestos; existe diversos ejemplos de EPS, que son producidos por bacterias tales como: *Acetobacter* sp, *Gluconoacetobacter xylinum* y *G. hansenii*; el Kefiran, Dextrano presentes en la microflora del kéfir. El kéfir de agua o leche es una bebida fermentada que se inicia con granos del hongo kéfir, los granos de este hongo presentan un conjunto de microorganismos responsables de la fermentación (Coma et al., 2019).

Los granos de kéfir de agua tienen un polímero de glucosa llamado “dextrano” se encuentra formado por cadenas laterales con enlaces α -D-1,6 lineales y con un porcentaje bajo de cadenas laterales con enlaces α -1,3 (Fels et al., 2018). La diferencia entre el kéfir de leche es la presencia de un heteropolisacárido complejo denominado “kefiran”; estos dos tipos de kéfir presentan los mismos consorcios de microorganismos: bacterias del ácido láctico (LAB), bacterias del ácido acético (BAA) y levaduras (Garrote et al., 2001).

Los reportes de varios estudios en el uso de polisacáridos, para la fabricación de películas, films o recubrimientos con distintas propiedades ha señalado que estos materiales son prometedores en especial los EPS microbianos que han ganado atención en nuevas investigaciones de materiales a partir del mismo, que involucren bajos costos de obtención altos rendimientos de producción (Rimada & Abraham, 2001). Las biopelículas de kéfir implican un proceso complejo de varios pasos, donde ocurre la adhesión de microorganismos a la superficie, de acuerdo al desarrollo de las biopelículas las propiedades de adhesión microbiana y propiedades de superficie celular, la hidrofobicidad y los potenciales zeta son factores que influyen a la formación de los biofilms y se encuentran asociados a la adhesión de las células microbianas (Nozaka et al., 2013).

La formación de la red polimérica dependerá de las propiedades químicas de las cadenas poliméricas, de las condiciones y de la presencia de agentes plastificantes útiles para mejorar las propiedades mecánicas de la película y su apariencia superficial (Coma et al., 2019).

Justificación e importancia.

La necesidad imperativa del desarrollo de nuevos productos biodegradables se centra en la vía de sustentabilidad económica y ambiental. La ingeniería de diseño de nuevas materias junto al desarrollo tecnológico impulsa avances para sustituir productos de demanda comercial con las mismas propiedades y características que las existentes en el mercado. El objetivo primordial los biomateriales es la reducción del uso de fuentes derivadas del petróleo.

La celulosa microbiana, tiene ventaja sobre la vegetal por no presentar hemicelulosa, pectina y lignina, por lo que se reducen los costos de extracción; además es un polisacárido extracelular con alto grado de pureza, porosidad, cristalinidad, baja densidad, capacidad de degradación y afinidad biológica.

Los biopolímeros de celulosa microbiana, se describe como una película de fuente natural que presenta características de 100 nm de ancho, la cual es secretada en forma de nanofibrillas 2 a 4 nm durante el proceso de fermentación, cuyas características estructurales presenta alta resistencia y gran capacidad en retención de agua hasta 100 veces su peso; siendo ideal principalmente en aplicaciones en la industria alimenticia, química y biomédica (Brown & Laborie, 2007; Gorgieva & Trček, 2019; Tsouko et al., 2015).

Sin embargo, el costo de producción de celulosa microbiana resulta elevado en vista del uso de sustratos como azúcares y fuentes de nitrógeno empleados para mejorar el rendimiento; no obstante, para una proyección a gran escala de producción de celulosa, una fuente de

nitrógeno y a la vez de azúcar son los residuos de piña que podrían ser aprovechados de desechos producidos por empresas ecuatorianas, tal como Ecuadelicias Cía. Ltda. empresa que ofrece piñas en rodajas empacadas, el problema de dicha empresa se evidencia debido a las pérdidas económicas al no aprovechar al máximo la materia prima. Los desperdicios podrían ser aprovechados en el cultivo con los hongos de esta forma se minimizaría el impacto de estos residuos al medio ambiente, la racionalidad en el uso de recursos resulta un factor de relevancia que dirige al diseño de estrategias de aprovechamiento y reducción de impactos ocasionados por el material residual, los recursos para el desarrollo de nuevos productos viables de forma económica y ecológica conllevan hacia el desarrollo sostenible de un proceso de producción. La evaluación en relación a la producción de celulosa microbiana empleando cáscaras de piña en el proceso fermentativo marca un camino hacia la viabilidad del proceso (Capa et al., 2007)

La proyección del presente proyecto es el avance hacia la investigación de la producción de biopelículas a base celulosa microbiana para el recubrimiento de alimentos, tales revestimientos pueden ser aplicados de forma líquida en los alimentos o sobre el área superficial de otros materiales; de esta forma el uso como recubrimiento de alimentos suscita la extensión de vida de los alimentos (Ganiari et al., 2017).

Alcance

La proyección de alcance de la investigación tiene como eje principal la obtención de celulosa microbiana bajo condiciones óptimas para obtener alto rendimiento de su producción mediante el proceso de fermentación; además de lograr biopelículas con buenas propiedades físicas.

La celulosa microbiana en la biomedicina permite la realización de biomateriales; además en el área farmacéutico presenta su aplicabilidad en el recubrimiento de medicamentos; entre otras

aplicaciones interesantes se tiene en biofilms para empaque y conservación de alimentos (Ganiari et al., 2017).

En el presente estudio se plantea la formación de biopelículas a partir del hongo kéfir, empleando la celulosa microbiana formada del proceso de fermentación del caldo de cultivo de dicho hongo, siendo una vía sustentable para la obtención de un biopolímero; proceso que no causa daños medio ambientales; la trascendencia y trazabilidad extendida de la naturaleza de este biomaterial, lleva a potenciales aplicaciones en el empaque de alimentos conservando su calidad sin agregar aditivos químicos que implica costes a nivel industrial.

Objetivos

Objetivo General

Obtener celulosa microbiana, como subproducto de un hongo kéfir, para el desarrollo de biopelículas

Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones de cultivo en el proceso de fermentación para la obtención de mayor rendimiento de celulosa.
- Obtener celulosa microbiana bajo condiciones controladas empleando como inóculo el kéfir.
- Optimizar el proceso para obtener celulosa microbiana, mediante revisión bibliográfica y experimentación; para obtener la mayor cantidad en peso de celulosa.
- Identificar la celulosa microbiana obtenida en el caldo de fermentación del kéfir para el análisis de sus propiedades fisicoquímicas.
- Analizar las biopelículas, mediante espectroscopia infrarroja (IR), y análisis térmico (TGA).

- Evaluar los efectos de la proporción de celulosa microbiana, estabilizante, y plastificante en propiedades fisicoquímicas de la biopelícula formada.
- Evaluar las propiedades de las biopelículas a base de celulosa microbiana, mediante pruebas como permeabilidad, contenido de humedad y pruebas mecánicas.
- Determinar una aplicación innovadora y potencial a partir del biomaterial obtenido para la evaluación potencial en el ámbito comercial.

Hipótesis

El desarrollo de una biopelícula para el recubrimiento de alimentos a base de celulosa microbiana; por medio de la optimización de las proporciones de los componentes y la acción del agente filmogénico y plastificante empleado, se logre obtener un biofilm con propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua óptimas; además de maximizar la acción antimicrobiana y características antioxidantes.

El proceso de fermentación del hongo kéfir a condiciones de cultivo óptimo, permitirá la obtención de celulosa microbiana, para la producción y desarrollo de biopelículas por medio de la optimización de las proporciones de componentes y la acción del agente filmogénico y plastificante empleado, se logre obtener un biofilm con propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua óptimas; además de maximizar la acción antimicrobiana para una aplicación viable de acuerdo a las características.

Variables de Investigación

Variables Dependientes

- Cantidad en peso de celulosa microbiana obtenida.
- Permeabilidad.

- Esfuerzo máximo a la tracción.

Variables Independientes

- Tiempo.
- Temperatura.
- Concentración celulosa-agente plastificante y CMC.

Capítulo II

Marco teórico

Biopolímeros

La terminología “biopolímeros”, donde el prefijo “bio” describe el origen de base biológica producidos por microorganismos, plantas, algas y hongos. Las moléculas se encuentran formados por unidades funcionales que son biodegradables y compostables por las propiedades químicas de los componentes constituyentes. Las unidades monoméricas comprenden moléculas de ácidos nucleicos de nucleótidos, proteínas de aminoácidos o sacáridos procedentes de los azúcares. La producción de biopolímeros en base a estudios señala favorable su desarrollo en de nuevos y potenciales propuestas que apuntan hacia la optimización y mejoramiento funcional, las variables de diseño en la producción son: los aditivos y mezclas de bioplásticos. La funcionalidad se encuentra coligado a factores como: la cantidad y calidad del solvente, el propósito del biopolímero, la formación de viscosidad a granel, y el proceso de desarrollo estructural.

Ciertos biopolímeros son obtenidos de fibras naturales, almidón, celulosa o componentes orgánicos, añadiendo esta clase polímeros se puede clasificar según la naturaleza de unidad repetitiva, así como: polisacáridos formados por carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos.

Los biopolímeros se clasifican en:

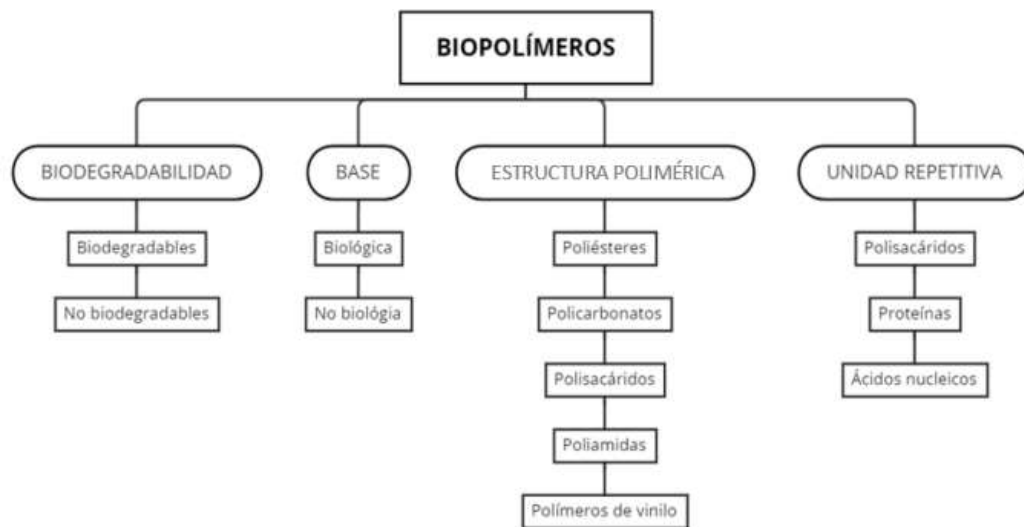
- Procesado de tipo artificial: Ácido poliláctico, resinas de succinato de polibutileno.
- Procesado de tipo microorgánico: Poli-3-hidroxi-butirato, copolímeros de 3-hidroxi-hexanoato entre otros.
- Procesado de tipo natural: Almidón combinado con ésteres o quitosano-celulosa e incluso en fusión con alcoholes (George et al., 2020).

Las técnicas de síntesis presentan un desarrollo in situ, por medio del cual se producen múltiples respuestas químicas en un material, la polimerización se produce mediante la inyección directa de una mezcla del monómero y los componentes del iniciador que son colocados en moldes resultando un matriz con refuerzo que es un sólido con propiedades mecánicas especiales (George et al., 2020).

Clasificación de biopolímeros en base a parámetros como: degradabilidad, base biológica, en base a su estructura polimérica y en función a su unidad repetitiva.

Figura 1

Proceso de obtención de polisacárido kefiran.



Nota. El gráfico muestra un mapa conceptual de la clasificación principal de biopolímeros. Tomado de *Biopolímeros como sistemas de bioencapsulación* (p.3), por Molina& Flórez-Castillo, 2020,

<https://doi.org/DOI: 10.13140/RG.2.2.1952117767/1>

Funcionalidad de polímeros biodegradables.

La composición química y estructural del polímero determina la funcionalidad destino para su aplicación. La protección para preservar la calidad de sustancias, en particular de alimentos marca un notable interés en función a films de empaque eco amigables.

Biopelículas a partir de hongos.

La red macromolecular que dependerá de agentes formadores como: disolvente plastificante, la interacción entre los mismos permite la conformación de la estructura de la película con propiedades que se encuentra en función a la estructura química de cadenas poliméricas de origen, los parámetros y condiciones de proceso y de la presencia de plastificantes (Chiralt et al., 2020).

El interés creciente por el estudio y desarrollo de biomateriales a partir de exopolisacáridos microbianos y películas de kéfir en consecuencia presenta una solución futura atractiva para la sustitución de plásticos de origen petroquímico (Monar et al., 2014).

Plastificantes.

Los plastificantes son sustancias no volátiles de peso molecular bajo, es ampliamente utilizado en la industria de los polímeros; además son agregados al material plástico o elastómero, útiles para potenciar parámetros como: flexibilidad, manejabilidad y elasticidad influye a las propiedades mecánicas y de barrera del biofilm. La adición de plastificantes incrementa la movilidad entre las cadenas del polímero disminuyendo de tal forma su adhesión, aumentando la permeabilidad y decreciendo la temperatura de transición vítrea. La capacidad de los plastificantes para romper los enlaces entre las cadenas del polímero depende según su: naturaleza, química, tamaño, polaridad,

longitud de cadena, estado físico y número de grupos funcionales del plastificante que interaccionan con el polímero.

Para mejorar las propiedades mecánicas de los polímeros, se añaden plastificantes de bajo volumen y con varios grupos polares; pero los plastificantes de molécula lineal se esparcen fácilmente en la estructura polimérica comparando con las estructuras con anillos en su molécula. La naturaleza hidrofílica o hidrofóbica de los plastificantes definen las propiedades de barrera de la biopelícula, para mejorar la eficiencia de los plastificantes busca el equilibrio hidrofílico/hidrofóbico. Los plastificantes hidrofílicos agregados a dispersiones poliméricas se disuelven en el medio; por otro lado, los plastificantes hidrofóbicos actúan disminuyendo la absorción de agua, debido al cierre de los micro vacíos en la estructura. Además, la permeabilidad de vapor de agua aumenta, en consecuencia, de la separación de fases al añadir plastificantes insolubles al agua que provoca también pérdida de flexibilidad.

El aumento de la concentración del plastificantes provoca un resultado directamente proporcional según propiedades como: mecánicas y de barrera al vapor de agua y oxígeno, flexibilidad, elongación y permeabilidad de la película, pero en condiciones específicas para determinados plastificantes puede provocar efectos contrarios a los requeridos (Escobar, 2020).

Glicerol

El glicerol, es un alcohol (poliol), incoloro y soluble en agua por la presencia de grupos hidroxilo en su estructura. Es una sustancia viscosa no tóxica, es el plastificantes comúnmente empleado para la producción de recubrimientos y films comestibles es agregado a bajas concentraciones de lo contrario su influencia en la permeabilidad de los biofilm se verá afectado de forma negativa. En

general, el glicerol es formado de soluciones nuestras y la FDA autoriza para usarse en alimentos sin peligro (Escobar, 2020). HagaHaga clic o pulse aquí para escribir texto.

Métodos de formación de biopelículas

- Casting

El método casting, es un proceso por el cual el un líquido es vaciado en un recipiente o molde a determinadas condiciones para la formación de un material que adquiere la forma del molde. Por medio de este proceso se tiene una distribución homogénea, máxima integridad óptica y consistencia dimensional.

Figura 2

Diagrama del método Casting.



Nota. El gráfico muestra, el esquema convencional del proceso Casting para la formación de biopelículas. Tomado de *Elaboración y caracterización de biopelículas elaboradas con quitosano y adicionadas con partículas de almidón* (p.27), por Flores, L. ,2011, Trabajo de Tesis.

<http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/201>

- *Coater*

La técnica coater o conocida como fundición en tiras, empleado a gran escala en industrias de fabricación de plásticos, cerámica, papel y pintura. En el proceso una suspensión formadora de película se propaga en un gran soporte y en correas de transporte continua, lo cual permite el control del espesor de película mediante una cuchilla en la parte inferior del dispositivo de dispersión. La película formada es secada en un soporte, por medio de un secado por conducción, secado por convección, radiación infrarroja o su vez una combinación de estas técnicas (De Moraes et al., 2013)

- *Extrusión*

El método de extrusión emplea tornillos giratorios que se encuentran instalados en un barril, con el propósito de incrementar de forma progresiva la presión e impulsar hacia adelante y mezclar los ingredientes necesarios para la elaboración del polímero (Espitia et al., 2014)

- *Electrospinning*

El electrospinning aplica un campo eléctrico a una disolución de polímeros que evidencia una determinada viscosidad, que circula por un tubo capilar. La física del campo eléctrico generado entre el inyector y el colector del electrospinner; por tanto, el campo eléctrico actúa sobre la gota de solución polimérica arrastra las fibras en dirección axial o tangencial. Es una técnica usada para obtener estructuras fibrosas de polímeros a escala micro y nanométrica para el desarrollo de materiales para diversas aplicaciones; el desarrollo de fibras fabricadas presenta superficies amplias, porosidad y buenas propiedades mecánicas (Cuahuizo-Huitzil et al., 2021).

Polisacáridos

Los polisacáridos son polímeros naturales como: el almidón, la celulosa, la pectina y quitosano, se encuentran formados por monómeros simples y estructuras complejas e impredecibles, presenta varios grupos hidroxilo e hidrófilo en la estructura de hidratos de carbono neutros (Hassan et al., 2018). Empleados para preparar películas comestibles y/o recubrimientos, la formación de recubrimientos y sus características se deben principalmente a los enlaces de hidrógeno. La celulosa es un compuesto con unidades de glucosa pertenece al grupo de los polisacáridos, es insoluble en agua y puede ser modificado químicamente para conformar éteres de celulosa solubles en agua, tal como: carboximetilcelulosa CMC (Marangoni Júnior et al., 2020a)

Pertenecen a la familia de polímeros naturales tienen baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad; además son de gran utilidad en las industrias farmacéuticas, biotecnología y alimentaria. Presentan en su estructura un esqueleto macromolecular que enlazan a grupos hidrófilos e hidrófobos, el enfoque de aplicación depende de la arquitectura de la composición en relación del balance hidrofílico/hidrofóbico apropiado

Los polisacáridos que tienen varias ramificaciones con o sin carga aniónica forman recubrimientos más frágiles; por consiguiente, los films y recubrimientos a base de polisacáridos son de apariencia transparente, cohesivos y homogéneos además a ventaja se encuentra en las propiedades mecánicas y la capacidad de retardar la transmisión de O₂ Y CO₂ (Escobar, 2020).

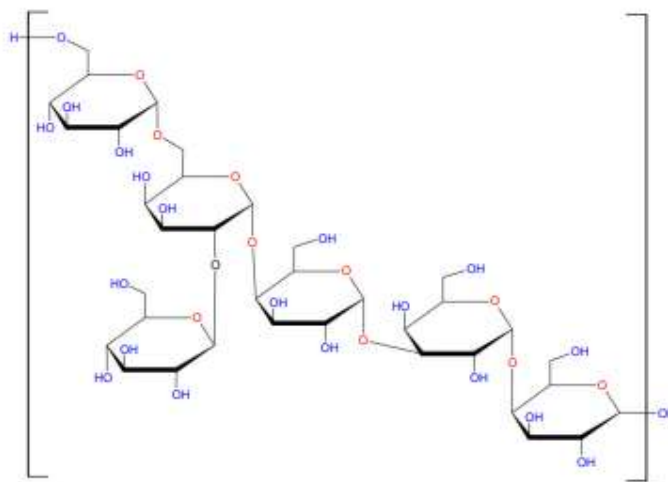
Kefiran.

Es un polisacárido glucogalactano, es un exopolisacáridos generado por microorganismos presentes en los granos de kéfir; además, tienen capacidad para formar films en adición de un plastificante. El kefiran pertenece al género de heteropolisacárido compuesto de glucosa y

galactosa, se encuentra formado en la microflora del cultivo fermentativo del hongo kéfir (Piermaria et al., 2009).

Figura 3

Estructura molecular del kefiran.



Nota. El gráfico representa la estructura química del kefiran. *Películas a base de Kefiran: conceptos fundamentales, estrategias de formulación y propiedades* (p.45), por Marangoni Júnior et al., 2020^a, <https://hdl.handle.net/20.500.12672/17780>

Celulosa Microbiana.

Definición de celulosa microbiana.

La celulosa es una macromolécula conformada por matriz estructural presente en las paredes celulares de la plantas, hongos y ciertas algas; se constituye como un polímero homogéneo cuya conformación es la disposición de unidades D-glucopiranosas asociadas por medio de enlaces β contiene usualmente de 9000 a 10000 unidades polimerizadas. La celulosa puede ser producida

por cepas de microbios. El polisacárido extracelular posee alto grado de pureza, cristalinidad, porosidad, polimerización, alta capacidad para degradarse, afinidad biológica y baja densidad.

La síntesis del polímero puede ocurrir por medio de diversos géneros bacterianos tales como: Agrobacter, Agrobacterium, Achromobacter, Azotobacter, Sarcina, Pseudomonas, Rhizobium, Salmonella y Komagataeibacter, en varios estudios describen a la Komagataeibacter xylinus por su alta tasa de producción de celulosa bacteriana en cultivos con medios líquidos o semilíquidos (Calderon, 2022).

Estructura.

El homopolisacárido conformado por β -D-glucosa enlazadas por β -1-4 glucósidos, compuesta de 1000 cadenas individuales de β -1,4 glucano. La disposición estructural le asigna hidrofobicidad, quiralidad, degradabilidad y modificaciones químicas por los grupos presentes -OH (Gupta et al., 2019)

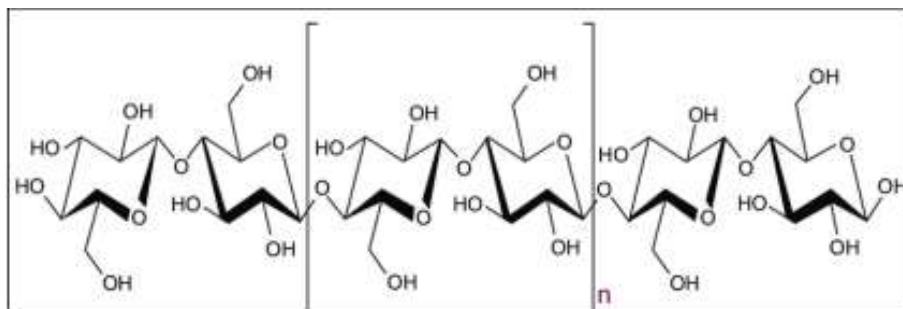
Las nano fibras de su estructura son 100 veces inferiores que las de origen vegetal; además se encuentran enlazadas por medio de puentes de hidrógeno intramoleculares que permiten la estabilidad de la estructura. Las nanoestructuras presentes poseen un alto grado de polimerización con poros entre fibras que forman un área de superficial que aumenta en función a variables como: tipo de especie productora, cantidad de inóculo, composición del medio y condiciones de cultivo (Naz et al., 2019; Ullah et al., 2019).

Las conformaciones con nanofibras en disposición organizada son llamadas estructuras cristalinas y las que poseen bajo nivel de organización o conocida como amorfa. Las estructuras polifomórficas que son obtenidas de forma natural corresponden al tipo I y II, la primera presenta

hebras paralelas sin fuentes de hidrógeno entre láminas; la segunda es estable termodinámicamente (Calderon, 2022).

Figura 4

Estructura molecular de la celulosa.



Nota. El gráfico representa la estructura de la celulosa obtenida de forma natural. Tomado de *Producción de celulosa por Komagataeibacter sp. SU12 usando extracto de Mangifera indica (mango) para su potencial aplicación biotecnológica* (p.18), por Calderón, V.,2022, <https://hdl.handle.net/20.500.12672/17780>

Principales empresas que producen celulosa microbiana.

Tabla 1

Principales empresas dedicadas a la producción de celulosa.

Empresa	Aplicaciones	País
Cellulose Lab (69)	Nanocristales y nanofibras para nivel de laboratorio e industrial	Canadá
USDA Forest Products Laboratory, University of Maine (70)	Nanofibras y nanocristales estructurales y funcionales.	USA
Empresa	Aplicaciones	País
American Process (71)	Biorrefinería, ingeniería y energética.	USA
Innventia AB (72)	Papelería y empaquetamiento.	Suecia
Borregaard (73)	Papelería, biomateriales y biorrefinerías.	Noruega
Nippon (74)	Papelería, energética y alimentaria.	Japón

Empresa	Aplicaciones	País
Axcelon Biopolymers (75)	Injertos de piel, prótesis y otras aplicaciones médicas.	Canadá

Nota. La presente tabla, muestra las principales empresas en el mundo que producen celulosa, adjunto a ello su aplicación destino. Tomado de *Producción de celulosa por Komagataeibacter sp. SU12 usando extracto de mangifera indica (mango) para su potencial aplicación biotecnológica* (p.25), por Calderón, V.,2022, Tesis de Grado.

Celulosa microbiana y Celulosa vegetal.

La estructura y propiedades de la celulosa de origen vegetal y microbiana presenta composiciones químicas similares, sin embargo, presentan marcadas diferencias en referencias en composición estructural y propiedades físicas. La pureza de la celulosa microbiana tiene mayor pureza que la vegetal, debido a que esta última presenta lignina y hemicelulosa asociada. Las características importantes identificadas es el gado de cristalinidad >60%, los cristales de formación son de tipo I β y I α este tipo de conformaciones está relacionado con el microorganismo y las condiciones de cultivo (Arbeláez & Sánchez, 2023).

Técnicas de fermentación.

La celulosa microbiana es generada mediante un caldo de cultivo estático o agitado. Las condiciones de cultivo son factores clave en la macroestructura de la celulosa. El cultivo estático produce una película de aspecto gelatinoso y transparente en una interfase aire/líquido del medio de cultivo en presencia de un sustrato (fuente de glucosa) y los inóculos (gránulos de kéfir) a condiciones de cultivo entre 20 a 30°C, en un tiempo de fermentación de 7 a 15 días. Por lo que se refiere al cultivo agitado produce una película de aspecto gelatinoso cuyo agrupamiento de las nanofibrillas es menos resultando una formación de gránulos irregulares de celulosa (Avcioglu et al., 2021).

Producción de celulosa microbiana.

La primera fase de la biosíntesis ocurre con la entrada del sustrato al microorganismo, para ser transformado en glucosa-6-fosfato debido a la acción de la enzima glucoquinasa, luego se convierte en glucosa-1-fosfato por la enzima fosfoglucomutasa; por consiguiente, está es transformada a UDP-glucosa por la enzima UDPG pirofosforilasa y finalmente por la actividad de la enzima celulosa-sintasa produce la polimerización de la glucosa originando la celulosa microbiana.

En la segunda fase cuando ha ocurrido la polimerización de la glucosa con la excreción de la celulosa al medio de cultivo en forma de nanofibrilla de glucosa con 1.5 nm que se agrupa entre 10 a 100 unidades conformando nanocintas más anchas; por lo tanto, la unión de las nanofibrillas y los espacios entre fibras es adecuada para que ocurra la formación de una membrana de celulosa nanoporosa y con gran área superficial. La perfecta organización de las nanofibras de celulosa microbiana permite la formación de varios enlaces tipo puente hidrógeno proporcionando una alta capacidad de interacción con distintas moléculas.

En la formación de la celulosa microbiana el agua entre capas es eliminada; por lo tanto, se forman nuevos enlaces en medio de grupos hidroxilo de capas contiguas formando una lámina de cristalinidad superior al 60%. El proceso final describe una celulosa microbiana con una estructura que presenta numerosos enlaces intramoleculares, haciendo que la arquitectura estructural adopte gran resistencia mecánica (Arbeláez & Sánchez, 2023).

Optimización de parámetros fisicoquímicos

Para optimizar las fuentes de carbono de producción microbiana de celulosa (glucosa, sacarosa, maltosa, lactosa), diferentes concentraciones de la fuente de carbono seleccionada fuente (2 %-10 %), pH (3,0-8,0), temperatura (25 °C, 30 °C, 37 °C), cantidad de fuente de nitrógeno

(0,25 %-2 %), cantidad de inoculación (2,5 %-30 %) y periodo de incubación (5, 10, 15 y 20 días) para un cultivo estático (Avcioglu et al., 2021).

Biopelícula de celulosa

Es producida por una bacteria ácido-acética que transforma los monómeros de glucosa en celulosa, la biopelícula aparece al día 3 del proceso de fermentación como una membrana fina transparente de apariencia gelatinosa, luego de 10 a 14 días se forma una capa de 2cm de espesor que adopta la forma del recipiente y cubre la superficie del cultivo. Al formarse el biofilm el proceso fermentativo se acelera y surge un olor fuerte con presencia de burbujas (Kaewkod et al., 2019; Paucar & Gabriela, 2020).

Las funciones de la película durante la fermentación son: como barrera encapsulante protegiendo el microbiota de cambios severos medioambientales y de diversos patógenos, asiste a que sobrevivan especies a condiciones del medio líquido, permite el paso de oxígeno atmosférico, guarda recursos, retiene agua y resistente a los rayos UV, evitando la desecación (Paucar & Gabriela, 2020).

Consideraciones generales del kéfir.

Definición de Kéfir.

El kéfir es obtenido a partir de soluciones azucaradas o proveniente de un sustrato lácteo que ha sido fermentado, de origen de la antigua Asia de la provincia de Xinjiang China consumida desde la edad de bronce comprendida entre los años de 1980 a 1450 a.C. Los gránulos de kéfir estructurados como masas gelatinosas de superficie irregular, multilocular de color blanco o ligeramente amarillento cuya consistencia es elástica y no soluble en agua. Los gránulos están conformados por un conjunto simbiótico de bacterias ácido-lácticas homo y heterofermentativas,

levaduras fermentadoras y no fermentadoras de la lactosa, bacterias ácido-acéticas y *Geotrichum candidum*. El auge de la bebida fermentada inició en Europa y a finales del siglo XIX se extendió a nivel mundial (Gamba, 2015).

Tipos de Kéfir.

Kéfir de Agua.

Los tísticos son gránulos similares a una coliflor, con un diámetro promedio de 5 a 20 mm, apariencia transparente y estructura elástica, este tipo comprenden un consorcio de bacterias y levaduras en simbiosis, por el crecimiento de levaduras el medio (agua) se acidifica, el crecimiento de las bacterias ocurre por la producción de factores de crecimiento y compuestos nitrogenados por parte de las levaduras. Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyentes de los tísticos conforman tres géneros tradicionales tales como: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, incluye también a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus*. Pertenecen a bacilos o cocos Grampositivos asporógenos, generan ácido láctico a partir de hexosas, crecen dentro de un rango de pH de 4.0 a 4.5; debido a su metabolismo se tienen homofermentativas y heterofermentativas (Monar et al., 2014).

Kéfir de Leche.

Los microorganismos de kéfir son inoculados en leche, del proceso de fermentación los gránulos crecen y aumentan en el medio. La leche como medio de fermento contiene ácido láctico, ácido acético, etanol, dióxido de carbono, vitaminas del complejo B y compuestos aromáticos como diacetilo y acetaldehído. El polisacárido presente es el "kefiran" conformado por D-glucosa y galactosa en proporción 1:1, soluble en agua que constituye un 25% del peso seco de los gránulos; además los cultivos con los granos de kéfir presentan bacterias del género

Leuconostoc, Lactococcus y Acetobacter, con producción de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono, están constituidos por levaduras fermentadoras de la lactosa (Kluveromcesmarxianu y levaduras no fermentadoras de la lactosa (Saccharomces omnisporus, Saccharomces cereviciaey Saccharomcesexiguus), Lactobacillus casei, Bifidobacterium spp y Streptococcus salivarius subsp.termophilus) (Gamba, 2015).

Propiedades y composición de Kéfir.

Los granos de kéfir cuyo medio de inoculación es el agua contiene “dextrano”, que es un polímero de glucosa, este compuesto presenta cadenas laterales con enlaces tipo α -D-1,6 lineales y con enlaces α -1,3 (Marangoni Júnior et al., 2020a). El kéfir de leche tiene un heteropolisacárido cuya estructura es más compleja denominada “kefiran”, estos dos tipos poseen los mismos tipos de microorganismos tales como: bacterias ácido láctico (BAL), bacterias del ácido acético (BAA) y levaduras. En la matriz de polisacáridos se encuentran los microorganismos simbióticos (Fels et al., 2018b).

El cultivo presenta acidez, consistencia cremosa, olor agrio producto del proceso de fermento, en relación a las propiedades fisicoquímicas presenta un pH ácido de 4,6 y alcohol entre 0,5 a 2%.

Tabla 2

Composición química de la bebida kéfir.

Componentes	Descripción
Lípidos	3.5 g/100 g
Proteínas	3-3.4 g/100 g
Azúcares	Lactosa (2-3.5 g/100 g)
Etanol	0.5-2% p/p
CO₂	0.08-0.2% p/p
Aminoácidos	Serina, treonina, alanina, lisina, valina, isoleucina, Metionina, fenilalanina, triptófano
Macroelementos	Calcio, magnesio, fósforo, sodio.
Microelementos	Cobre, zinc, hierro.
Ácidos orgánicos	Ácido láctico (0.6-1%), ácido acético, succínico Fórmico, caproico, caprílico y láurico.
Vitaminas	B1, B2, B5, B12, A, C, K, caroteno, ácido fólico.
Componentes aromáticos	Diacetilo, acetaldehído, etilo
Antioxidantes	Catequina.

Nota. Tabla descriptiva de la composición química de la bebida del hongo kéfir.

Producción de caldo de cultivo kéfir.

La bebida fermentada agria, alcohólica es el resultado de la fermentación de los granos del hongo kéfir en un medio (agua o leche), y está compuesto por un consorcio de diferentes microorganismos que realizan el proceso.

Según el informe de Transparency Market Research predice que en el mercado global ocurrirá una expansión con una tasa de crecimiento anual de 5.9% entre 2017 y 2025 a un valor estimado de \$ 2154.0 millones a finales del 2025 (Marangoni Júnior et al., 2020b)

Cultivo de microorganismos.

La comunidad microbiana se encuentra organizada en una matriz extracelular polimérica rica en carbohidratos adherido a una superficie, esta matriz es el componente principal en la formación

del biofilm asociado al consorcio microbiano conformado por exopolisacáridos, proteínas y ADN (Han et al., 2018).

Tabla 3

Población microbiana de la bebida kéfir.

Microorganismos	Género	Especies
Bacterias Ácido-Lácticas	Lactobacillus	L. kefir (80% del consorcio) L. paracasei L. casei L. kefiranofaciens L. acidophilus
Microorganismos	Género	Especies
	Lactococcus	L. lactis
	Streptococcus	Streptococcus thermophilus
Bacterias Ácido-Acéticas	Acetobacter	Acetobacter lovaniensis
Levaduras	Fermentadoras de lactosa	Kluyveromyces marxiaanus Kluyveromyces lactis Kluyveromyces Hansenii
	No fermentadoras de lactosa	Saccharomyces cerevisiae Pichia fermentans Saccharomyces turicensis

Nota. En la tabla indica los diferentes microorganismos coexistentes en el cultivo kéfir. Tomado y adaptado de *Biopolímeros Producción de celulosa* por Dimidi et al., 2019; Farag et al., 2020.

Biofilm a partir de gránulos de kéfir.

La formación de biofilm comprende un factor complejo que implica varios pasos de formación, el proceso inicia en la adhesión de microorganismos a la superficie y luego del desarrollo de las biopelículas; por tanto, las propiedades microbianas y de superficie celular, agregan características de síntesis importantes como la hidrofobicidad y los potenciales zeta, son factores de influencia en la formación de las películas. Los parámetros directos de influencia es la composición bacteriana y fúngica de los gránulos y las condiciones de partida en el caldo de fermentación. Los polímeros

segregados por las bacterias en el proceso de formación de la biopelícula aumento su espesor con el tiempo teniendo entre los días de mayor crecimiento de 3 a 7 días, el decrecimiento de producción en el cultivo precedió por la disminución de metabolitos microbianos y la aglomeración de bacterias muertas. El potencial de formación de biofilm tiene una variación por la influencia del tiempo de incubación, que aumenta con el tiempo de incubación entre periodos de hasta 13 días (Han et al., 2018).

Aplicaciones industriales.

Textil

En la industria textil la demanda ha crecido, por lo cual la búsqueda y desarrollo de materiales nuevos como fibras y membranas de costo accesible. La celulosa destaca por sus propiedades tales como: fuerza tensil, durabilidad y porosidad ideal para integración de tintes. La simplificada manipulación en corte y ensamblaje muestran alta adaptabilidad. El empleo de celulosa bacteriana se ha convertido en materia base para la fabricación de polos y abrigos. Las características fisicoquímicas óptimas del material polimérico pueden ser controladas partiendo de las condiciones de cultivo y método de síntesis (Calderón, 2022).

Alimentaria

En el área alimenticio es aprovechado por sus propiedades y beneficios al ser bajo en calorías, su funcionalidad se describe por el decreciente de lípidos y colesterol a través de la regulación en la secreción de adipocitoquinas y proteínas asociadas, es decir el riesgo de resistencia a la insulina, daño hepático e inflamación de forma general es un alimento seguro de consumo.

La aplicación como estabilizante reológico por su consistencia se ha empleado en preparaciones alimentarias y es resistente a altas temperaturas sin cambios estructurales y de consistencia. En el empaquetamiento de alimentos engloba su mayor aplicación, debido al control cambio gaseoso y transferencia de agua adquiriendo un refuerzo mecánico como films de empaque (Amorim et al., 2022).

Ingeniería eléctrica y electrónica

La microestructura de la celulosa empleados como matrices para electrodos y separación electrolitos, implica un diseño de extrusión, filtración y secado en la construcción de fibras, papel/capas y aerogeles; por tanto, las modificaciones para la adherencia y recubrimientos compuestos en base a carbono, polímeros u otros. Tienen alta adaptabilidad electrónica por sus características adecuadas en flexibilidad y porosidad permitiendo la adherencia de materiales. La hidrofilia incrementa el contacto entre los materiales electroactivos u electrolitos acuosos, asegurando la electroquímica y la estabilidad mecánica de los electrodos (Ma et al., 2020).

En función de la estructura con carbonos, se puede modificar mediante la activación con CO_2 y químicos, originando un aumento en el área de superficie y porosidad como capacitancia normalizada de hasta 1617 F cm^{-2} . Las diversas técnicas para lograr modificaciones resultan de ahorro en gastos en producción de membranas de transferencia iónica, supercondensadores, entre otros elementos de electrónica (Lei et al., 2020).

Biomédica

La alta biocompatibilidad que tiene la celulosa bacteriana ha expandido su aplicación tales como: injerto o sustitutos temporales en tejidos dañados o que han sufrido lesiones y quemaduras. La capacidad de retención de agua de 60 a 700 veces su peso permite que el tejido

lesionado en completa hidratación y absorbe el sudor transmitido, con un balance adecuado en la humedad, reduciendo el tiempo de tratamiento del tejido afectado. También se ha comprobado que la incorporación de células madre para potenciar el funcionamiento en la regeneración de tejido dañado ayuda al crecimiento del epitelio pigmentario de la retina, añadiendo la gran probabilidad de disminuir el rechazo de corneas en el trasplante. Las modificaciones químicas o físicas mediante tratamientos con tripéptidos o conjugados para sustituir pequeños vasos sanguíneos mediante la sujeción a las células endoteliales (Calderón, 2022).

Ensayos fisicoquímicos

Contenido humedad.

La humedad es la cantidad de agua presente en una película en relación a su peso, por tanto, una medida que permite estimar la cantidad de agua retenida del film. El valor de contenido de humedad óptimo o estándar de un material asegura la estabilidad y rendimiento requerido para distintas aplicaciones. Los métodos para determinar el contenido de humedad son:

- Método de pesada: Se pesa la muestra de forma preliminar previo a ser secado al aire y después se vuelve a pesar.
- Método de Karl Fisher: Método químico cuyo análisis, se desarrolló con el reactivo del nombre de Karl Fisher el proceso inicia cuando el reactivo reacciona con agua existente en la muestra y produce una corriente eléctrica que aloja un valor utilizado para el cálculo del contenido de humedad.
- Método de vaporización: Se pesa la muestra antes y después del secado que emplea una fuente de calor para vaporizar (Nielsen, 2010).

Permeabilidad vapor de agua.

La permeabilidad de vapor (PVA) de agua, es la tasa de transmisión de vapor de agua en el área de la estructura material, bajo condiciones específicas de temperatura y humedad. La evaluación al PVA determina de forma gravimétrica según el método ASTM E95-96 y la modificada por Mc-Hugh y copartícipes; la permeabilidad se determina mediante el índice de movimiento de vapor de agua en la superficie de la película encontrados mediante el cambio peso de la película por la transmisión de humedad.

El ensayo parte de la norma ASTM E96, la cual se enfoca en evaluar materiales de uso común y producción masiva; no obstante, existen ciertas adaptaciones a esta norma específicamente para realizar ensayos en películas biodegradables y comestibles (Trejo et al., 2001).

Espesor de película.

Los films comestibles en su mayoría presentan una alta característica hidrofílica; además existe una relación dependiente entre la permeabilidad de vapor de agua y el espesor de biopelículas por lo tanto a medida que el espesor incrementa la resistencia a la transmisión de masa por el área del recubrimiento también lo hace. En el proceso la presión parcial de vapor de agua de equilibrio se eleva en la superficie interior del material evitando de esta forma la transferencia del medio externo. (Escobar, 2020)

Ensayos mecánicos

Los ensayos mecánicos a polímeros dependen de su composición, estructura, condiciones de proceso; empleados para la determinación de propiedades características de un material. La respuesta de un material se evalúa mediante sus propiedades mecánicas en función de una carga

aplicada; indica la relación de la fuerza aplicada y la deformación del material en el ensayo (Chulde, 2020). Haga clic o pulse aquí para escribir texto.

Resistencia a la tracción y porcentaje de elongación.

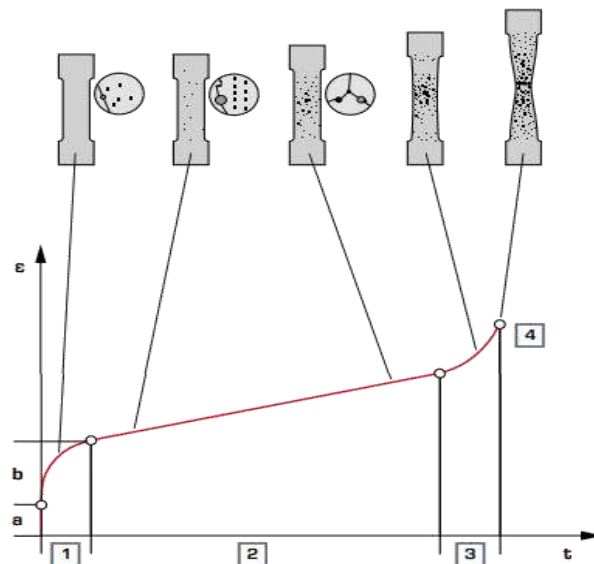
Resistencia a la tracción y elongación final.

Este ensayo es utilizado para la evaluación de materiales sujetos a fatiga y esfuerzos mecánicos, la energía aplicada de tracción a la rotura resulta ser la energía total por unidad de volumen de muestra hasta alcanzar el punto crítico de rotura.

En la prueba de elongación, sucede un aumento de masa longitudinal de una estructura, al final de la prueba la elongación medida indica la evolución característica conocida como la curva de fluencia, la misma que es útil para la determinación de valores en distintos puntos del ensayo (Hamburg, 2018).

Figura 5

Curva de elongación en función del tiempo.



Nota. La imagen muestra una elongación, donde dicho material es estirado de forma longitudinal, muestra el progreso de estiramiento hasta alcanzar la rotura. Tomado de *Métodos de ensayo mecánicos Ensayo de materiales* (p.6), por Hamburg, 2018.

La figura 5, indica lo siguiente:

- 1) Es la fluencia primaria, la cual decrece en función a la velocidad de fluencia, donde es relevante la fluencia del ablandamiento del material adquiriendo el mismo mayor velocidad.
- 2) Es la fluencia secundaria, la cual presenta mayor velocidad permanece constante encontrando un equilibrio estacionario.
- 3) La fluencia terciaria, una creciente velocidad que incrementa hasta el punto de rotura.
- 4) Ocurre la fractura de la probeta fase.

Técnicas de análisis térmico.

Las propiedades térmicas son estudiadas en los polímeros, permite mediante el análisis obtener una estimación del tiempo de vida útil. El análisis térmico es de vital importancia en el área de investigación y control de calidad para la fabricación materiales. Los métodos más empleados para analizar las propiedades térmicas se tienen: calorimetría diferencial de barrido y el análisis termogravimétrico.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Es una técnica mediante la cual se halla la cantidad de calor que absorbe o libera un material al ser calentada o enfriada a una velocidad definida constante; por lo tanto, se tiene transiciones que involucra un intercambio de energía. La DSC implica, una diferencia de la tasa de flujo de calor en una sustancia y toma una referencia es medida en función de la temperatura, la muestra es

expuesta a un programa de temperatura controlada, presenta dos capsulas, las mismas que se someten al análisis donde la temperatura de cada una es medida por sensores donde se analizan la muestra del experimento teniendo a la vez una cápsula de referencia (Salazar, 2021).

Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico, evalúa el porcentaje de peso de una determinada muestra en función al tiempo o temperatura a una atmósfera controlada de ensayo. En este tipo de ensayo considera los rangos de temperatura determinados para cada tipo de muestra. En el proceso un gas de purga fluye a través de la balanza creando una atmósfera inerte los gases de uso común son: nitrógeno, argón o helio. En el equipo TGA, se inserta una muestra y una de referencia, se mide por separado con bobinas calibradas, la diferencia entre masas se envía como señal, mediante una medición de masa diferencial; por lo tanto, se eliminan los efectos de expansión del haz, el flujo de convección y la fuerza de flotación, logrando la medición termogravimétrica. Los termogramas, son gráficas de los resultados del análisis donde se representan en el eje de las coordenadas el porcentaje de masa de la muestra y en el eje de las abscisas representa la variación de la temperatura o del tiempo (Salazar, 2021a)

Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR)

El espectro FTIR proporciona información acerca de la posición e intensidad de los picos de absorción de una sustancia, lo que revela detalles sobre los grupos funcionales presentes en la película analizada. Al examinar el espectro de la celulosa microbiana, se observaron picos que coinciden con los descritos en la bibliografía, lo que confirma la presencia de la estructura básica característica de la celulosa bacteriana (Zhong, 2020)

Este tipo de análisis parte de la absorción de la radiación infrarroja por moléculas en vibración, cuando la energía de un haz infrarrojo sea suficiente para que una molécula comience a vibrar de una manera específica, la molécula absorberá la luz infrarroja. Los tipos de vibración son las de tensión y flexión. Las vibraciones de tensión describen cambios en función de la distancia interatómica en el eje de enlace entre dos átomos; por otro lado, las vibraciones de flexión ocurren debido a cambios en el ángulo formado entre dos enlaces. Presentan un IR característico cada molécula, debido a que todas las especies presentan vibraciones que al activarse generan la absorción de una determinada longitud de onda. Las señales características de una muestra permiten abstraer información acerca de la composición de la molécula determinada; por otra parte, las muestras coligadas a varios componentes exhiben diferentes tipos de interacciones que influyen en características funcionales de los materiales (Corsello, 2015).

Capítulo III

Metodología

En el presente trabajo, fue de tipo experimental realizado en condiciones de laboratorio de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, extensión Latacunga de la carrera de Petroquímica. En este capítulo se detallan: los materiales, reactivos, equipos y procesos empleados en el desarrollo para el procesamiento de la materia prima. Las actividades se describen desde el acondicionamiento del cultivo del hongo hasta la obtención de las biopelículas para luego evaluarlas y caracterizarse con ensayos fisicoquímicos, mecánicos, análisis térmicos y análisis estructural.

Equipos, Materiales y Reactivos Equipos

- Balanza analítica digital.
- Estufa de secado 115 litros ESCO Isotherm.
- Estufa al vacío BINDER.
- DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido) Mettler Toledo DSC 1 STAR System.
- Espectrómetro de infrarrojos por transformada de Fourier FT-IR ATR PerkinElmer, modelo Frontier.
- Analizador termogravimétrico PerkinElmer, modelo Pyris 1 TGA.
- Agitador magnético Boeco, modelo MSH 420.
- Centrifuga Boeco C-28.
- pH-metro digital.
- Analizador de humedad Mettler Toledo, modelo HB43S halógeno.
- Agitador magnético con calefacción.
- Molino de eléctrico.

Materia Prima

- Gránulos de hongo kéfir de agua(tibetano) y leche(búlgaro).
- Cáscaras de piña.
- Endulzante.

Materiales

- Vasos de precipitación de 10, 100, 250, 400, 600 y 1000 ml.
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10 ml.
- Probetas de 10,100 ml.
- Matraz Kitasato.
- Balones aforados de 100, 250 y 500 ml.
- Embudo buchner.
- Embudos de vidrio
- Mortero.
- Matraces aforados de 250, 500 ml.
- Termómetros -10 a 110 °C.
- Cernidor
- Papel filtro.
- Toallas doble hoja.
- Paquete de ligas.

Reactivos

- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Ácido clorhídrico (HCl).

- Glicerina.
- Carboximetilcelulosa CMC.
- Agua destilada.
- Etanol al 96 %.
- Azúcar morena.
- Cloro comercial.

Obtención de materia prima

La obtención de gránulos de hongo kéfir fue por medio de un cultivo previo de un familiar cercano y mediante la compra realizada en internet.

Los túbicos obtenidos, ha sido producto de cultivos iniciales para aumentar la producción de los gránulos a condiciones óptimas de temperatura, cantidad de endulzante y fuente de nitrógeno, es importante el control de los factores mencionados para la reproducción de bacterias y levaduras que coexisten en el proceso de fermentación para la obtención de la celulosa que es secretada hacia la superficie del cultivo.

Acondicionamiento del cultivo.

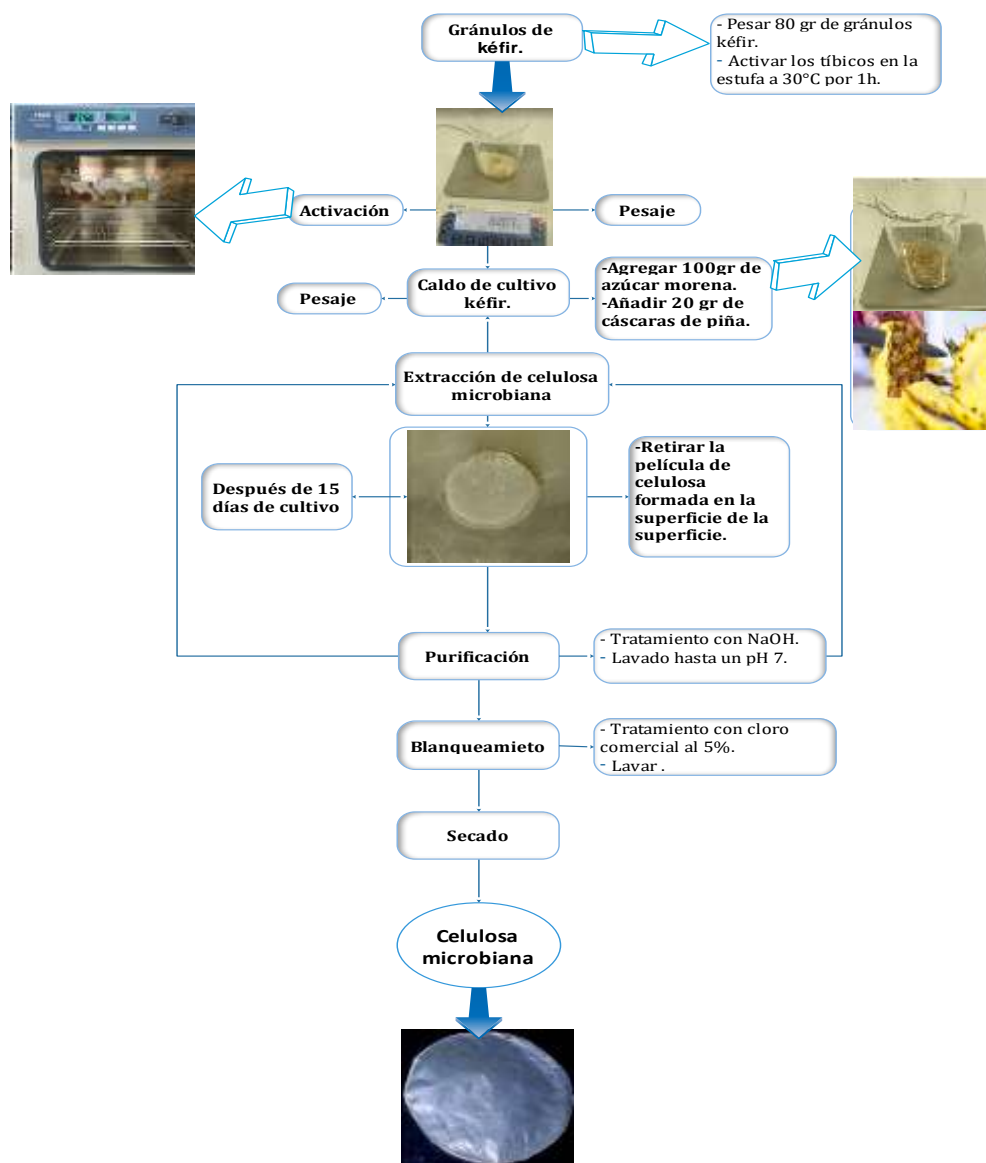
El cultivo inicial con los túbicos de kéfir, se emplearon 80 gr en 800mL de agua para el kéfir tibetano y leche para el kéfir búlgaro; luego se colocó papel toalla en la parte superior del vaso precipitado y se sujetó con una liga, para evitar la contaminación exterior (Koh et al., 2018). Los gránulos de kéfir fueron activados en la estufa a 30°C, además el pH del cultivo fue controlado hasta llegar a 4 para que todo el sistema de cultivo se encuentre óptimo para el proceso fermentativo de síntesis. El tiempo de fermentación fue de 15 días a temperatura ambiente, en un espacio de aislamiento de luz.

Proceso de obtención de celulosa microbiana.

La obtención de celulosa microbiana a partir del hongo kéfir se ha logrado mediante el proceso de cuatro etapas: cultivo de kéfir, extracción de celulosa microbiana, purificación y blanqueamiento.

Figura 6

Proceso de obtención de celulosa bacteriana.



Nota. Esquema muestra los procesos asociados para obtener la síntesis de celulosa microbiana a partir del hongo kéfir de agua.

Extracción de Celulosa Microbiana

La extracción de la celulosa microbiana ocurrió luego de que la matriz polimérica se haya formado en la superficie del cultivo como producto del proceso de fermentación; por lo cual a los 15 días se evidenciará la formación de una película cristalina la misma que debe ser retirada para el siguiente proceso de tratamiento. Las medidas adecuadas para retirar el biofilm natural deben ser consideradas para evitar la contaminación del cultivo, así como las condiciones de: temperatura, pH del medio y fuente de nitrógeno empleada (cáscara de piña). La estructura superficial, el espesor y la dureza de película estará directamente influenciada por las condiciones de cultivo.

Purificación de Celulosa Microbiana

La purificación de la celulosa microbiana se logra al tratar a la película con NaOH al 1M de concentración a 80°C durante 1h, el proceso permite remover las células atrapadas en la matriz polimérica estructural (Avcioglu et al., 2021). A continuación, la celulosa fue sometido a lavados consecutivos con agua destilada o dejar en reposo durante la noche y nuevamente lavar al día siguiente, este proceso se realiza para eliminar las impurezas adheridas por contaminación en el cultivo o del ambiente exterior.

Neutralización, Blanqueamiento, Secado y Pulverizado.

Subsecuente al proceso de extracción y purificación de celulosa microbiana, sigue el proceso de lavados continuos hasta que el pH sea de 5 o 6 siguiendo el proceso se tiene el filtrado al vacío y finalmente el secado a 65°C durante 48h para luego ser pulverizado en un molino de café modelo Hamilton Beach.

La celulosa microbiana en polvo debe ser reservada en un recipiente de vidrio con tapa y en un desecador para evitar contaminantes del ambiente y absorción de agua del mismo.

Diseño experimental.

El diseño para el análisis del rendimiento de la celulosa microbiana obtenida es determinado por el diseño factorial de dos factores con tres niveles de estudio; además, las variables constantes en el estudio son: la cantidad de túbicos de hongo kéfir, cantidad de medio de fermentación (agua), periodo de incubación y pH.

El software empleado en la obtención del diseño experimental es Minitab 18 y Desing Expert los programas permiten obtener le orden de corridas en los ensayos y verifica el diseño de aplicación en un estudio.

Diseño Factorial Completo 2^k

En el diseño factorial completo 2^k, aplicado en el estudio para optimizar el cultivo, se realizó según tres puntos centrales para encontrar los niveles de mayor significancia sobre los factores de influencia identificados. Los factores fijados en tres niveles (-1, 0, +1) asociado a niveles alto, medio y bajo de forma correspondiente.

Los factores de influencia para el cultivo de kéfir, en función a la formación de celulosa microbiana se ha desarrollado con una cantidad de fija de túbicos, a condiciones de ambientales y a un tiempo de cultivo de 15 días.

Diseño experimental para cultivo.

Tabla 4

Factores y variables significativas evaluadas para el cultivo del hongo kéfir.

Factores	Niveles de estudio		
	-1	0	+1
Cantidad de Endulzante (gr).	40	60	80
Cantidad de fuente de N (gr).	5	15	25

Nota. En esta tabla se muestra, dos factores principales los cuales tienen tres niveles de estudio para el caldo de cultivo del hongo de kéfir para la producción de celulosa.

Tabla 5

Factores y niveles correspondientes del caldo de cultivo de hongo kéfir, aplicando el diseño factorial completo.

N° Muestra	Cantidad de endulzante (gr)	Cantidad de fuente de N (cáscaras de piña) (gr)	Peso de celulosa producida (gr)
1	80	15	
2	40	5	
3	40	15	
4	80	35	
5	40	35	
6	60	5	
7	60	35	
8	80	5	
9	60	15	

Nota. La tabla indica cada factor de influencia con su nivel correspondiente, en función a la variable de respuesta peso de celulosa.

En la tabla 5, se muestra el diseño experimental para obtener CM; donde el análisis y evaluación de resultados se realiza en el software Minitab aplicando distintas pruebas estadísticas en la especificación de significancias entre tratamientos, mediante el análisis ANOVA y diagrama de Pareto; para comparar los tratamientos se usa el test de Tukey.

Diseño experimental para biopelícula a partir de celulosa.

En el análisis en función al efecto de aditivos empleados en la formación de la biopelícula se tiene: el estabilizante CMC y plastificante glicerol se ha realizado en relación a la variable de respuesta de permeabilidad de vapor de agua.

El diseño para el desarrollo de biopelículas tanto de celulosa como de kefiran presenta 3 factores y 3 niveles.

Tabla 6

Factores y variables significativas evaluadas para el desarrollo de biopelículas a partir de celulosa microbiana.

Factores	Niveles de estudio		
	-1	0	+1
Cantidad de celulosa (gr).			
Cantidad de CMC (gr).			
Cantidad de glicerol			

Nota. En esta tabla se muestra, dos factores principales los cuales tienen tres niveles de estudio el desarrollo de biopelículas.

Tabla 7

Combinaciones de celulosa microbiana, estabilizante CMC y plastificante para la producción de biopelículas.

N° Muestra	Masa de celulosa (g)	Masa de CMC (g)	Cantidad de glicerina (g)	Permeabilidad al vapor de agua
1	0,2	0,2	2	
2	0,2	0,4	2	
3	1	0,2	0,3	
4	0,2	0,4	4	
5	0,4	0,2	2	
6	0,4	0,4	4	
7	0,4	0,2	4	
8	0,4	0,4	4	
9	0,3	0,3	3	
10	0,3	0,3	3	
11	0,3	0,3	3	
12	0,1	0,3	3	
13	0,1	0,3	3	
14	2,5	0,3	0,6	
15	2	0,3	0,6	
16	0,3	0,1	3	
17	0,3	0,5	3	
18	0,3	0,3	1	
19	1,5	0,3	5	
20	1,5	0,3	3	
21	0,3	0,3	3	
22	0,3	0,3	3	
23	0,3	0,3	3	

N° Muestra	Masa de celulosa (g)	Masa de CMC (g)	Cantidad de glicerina (g)	Permeabilidad al vapor de agua
24	0,3	0,3	3	
25	0,3	0,3	3	

Nota. En la tabla actual, se muestra las combinaciones de composición de la biopelícula que se establecieron para su estudio, donde se emplea glicerina como agente reticulante, las posibles combinaciones se analizan en un diseño ajustado en tres factores y dos respuestas.

En la tabla 7, se muestra el diseño experimental para la obtención de CM; donde el análisis y evaluación de resultados se realizó en el software Minitab aplicando distintas pruebas estadísticas en la especificación de significancias entre tratamientos, mediante el análisis ANOVA y diagrama de Pareto; para comparar los tratamientos se usa el test de Tukey.

Además, se ha usado el software Desing Expert, para obtener la gráfica de contornos y establecer que tratamiento es mejor para el desarrollo de la biopelícula de celulosa.

Tabla 8

Combinaciones de cantidad de kefirán, estabilizante CMC y plastificante para la producción de biopelículas.

N° Muestra	Masa de kefirán (g)	Masa de CMC (g)	Cantidad de glicerina (g)	Permeabilidad al vapor de agua
1	0,2	0,2	2	
2	0,2	0,4	2	
3	1	0,2	0,3	
4	0,2	0,4	4	
5	0,4	0,2	2	
6	0,4	0,4	4	

N° Muestra	Masa de kefiran (g)	Masa de CMC (g)	Cantidad de glicerina (g)	Permeabilidad al vapor de agua
7	0,4	0,2	4	
8	0,4	0,4	4	
9	0,3	0,3	3	
10	0,3	0,3	3	
11	0,3	0,3	3	
12	0,1	0,3	3	
13	0,1	0,3	3	
14	2,5	0,3	0,6	
15	2	0,3	0,6	
16	0,3	0,1	3	
17	0,3	0,5	3	
18	0,3	0,3	1	
19	1,5	0,3	5	
20	1,5	0,3	3	
21	0,3	0,3	3	
22	0,3	0,3	3	
23	0,3	0,3	3	
24	0,3	0,3	3	
25	0,3	0,3	3	

Nota. En la tabla actual, se muestra las combinaciones de composición de la biopelícula que se establecieron para su estudio, donde se emplea el polisacárido kefiran, estabilizante CMC y plastificante, las posibles combinaciones se analizan en un diseño ajustado en tres factores y una respuesta.

Rendimiento de Celulosa Microbiana

El rendimiento total (RT) de producción de celulosa seca del proceso de la fermentación, es determinado por el peso de la película seca (g/L), dividida entre la concentración de la fuente de carbono (g/L). Para el cálculo se realiza con la siguiente expresión:

Ecuación 1 Rendimiento de celulosa Microbiana

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

Por otro lado, para determinar el rendimiento diario (RD) se emplea el valor de rendimiento total de MC empleando la ecuación 1 dividido entre los días de cultivo. Para el cálculo se realiza con la siguiente expresión:

Ecuación 2 Rendimiento diario de celulosa Microbiana

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

Rendimiento de Polisacárido.

El rendimiento total (RT) de producción de polisacárido seca del proceso de fermentación, es determinado por el peso de la cantidad de polisacárido obtenido (g/L), dividida entre la concentración de la fuente de carbono (g/L). Para el cálculo se realiza con la siguiente expresión:

Ecuación 3 Rendimiento total de Polisacárido

$$RT(\%) = \frac{\text{Masa de polisacárido (g/L)}}{\text{Concentración de la fuente de carbono(g/L)}} \times 100$$

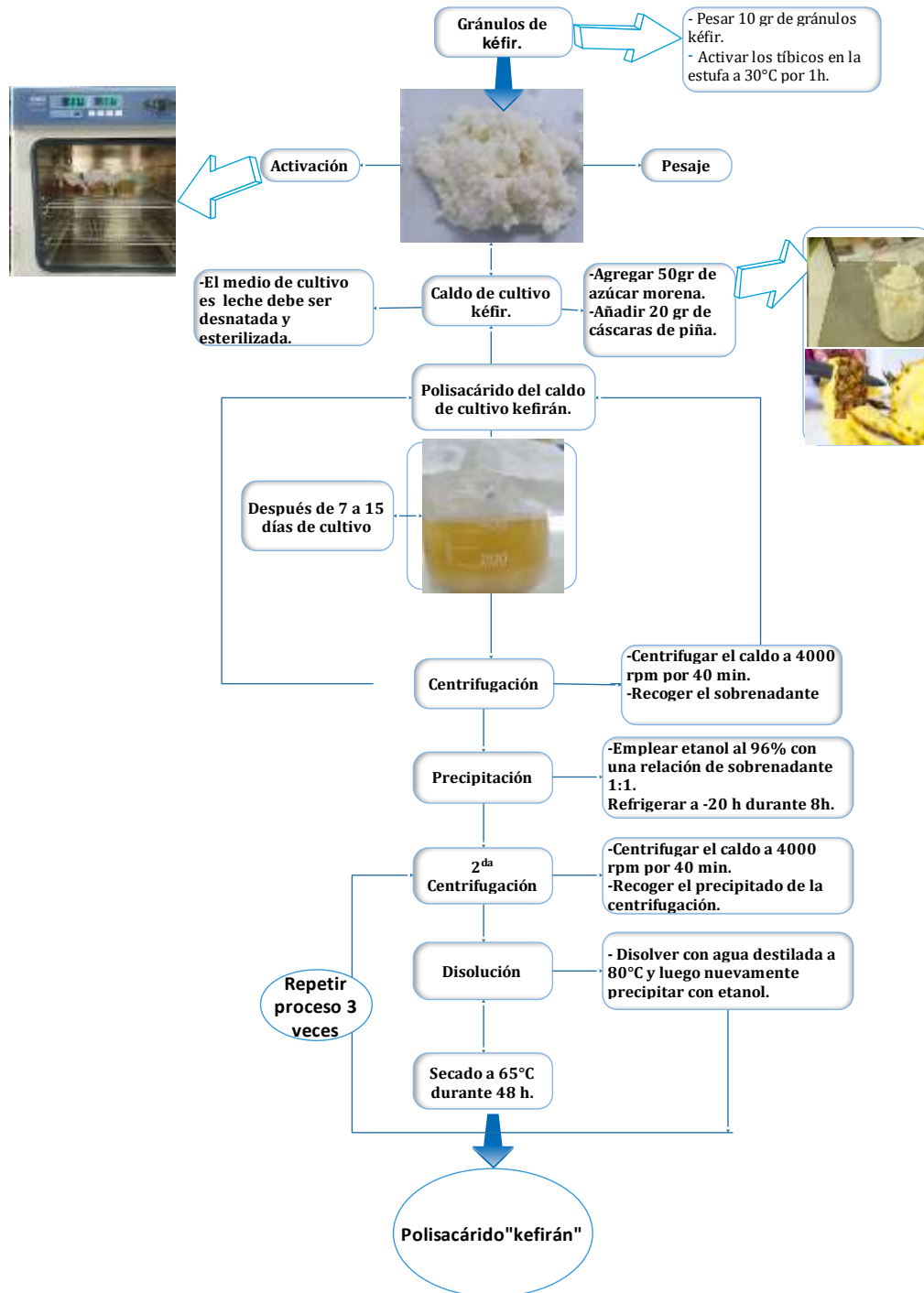
Para el caso de obtención de polisacárido se ha tomado en cuenta que se ha realizado un total de 13 cultivos.

Proceso de obtención de polisacárido de kéfir de leche

La obtención de polisacárido a partir del hongo kéfir búlgaro se ha logrado mediante el proceso de cuatro etapas: preparación de medio y gránulos, centrifugación cultivo de kéfir y recuperación de sobrenadante, precipitación con etanol, segunda centrifugación y recuperación de precipitado del proceso, proceso de tratamiento térmico con agua a 80°C, secado y finalmente obtención de polisacárido “kefiran” (Piermaria et al., 2009)

Figura 7

Proceso de obtención de polisacárido kefirán.



Nota. La figura indica el esquema de las etapas involucradas para obtener el polisacárido kefiran a partir del hongo kéfir de leche. Tomado y adaptado de (Piermaria et al., 2009).

Preparación de películas

Preparación de películas de celulosa microbiana

Al obtener la celulosa microbiana, continúa al proceso de formación de biopelículas. La celulosa se es pesada junto al aditivo aglutinante CMC que estará al (10%) del peso de celulosa, luego un vaso de precipitación se coloca 100mL de agua y se agrega las sustancias, seguido a ello se somete la mezcla a en agitación a 1200 rpm durante 45 min. La mezcla se somete a calor de 5 min en una plancha calefactora para eliminar burbujas por la agitación. Finalmente se agrega el plastificante al 20% respecto al peso de celulosa, la solución es depositada en un recipiente plástico para luego ir a la estufa de vacío durante 1h para secar la película completamente se somete a una temperatura de 50°C durante 24 h.

Las muestras tras secarse se secar se almacenan en un desecador para evitar que agentes microbianos del medio exterior las contaminen.

Preparación de películas de celulosa microbiana y polisacárido “kefiran”

Al obtener el polisacárido “kefiran”, continúa al proceso de formación de biopelículas. El polisacárido es pesado junto al aditivo aglutinante CMC que estará al (10%) del peso del kefiran, luego un vaso de precipitación se coloca 100 mL de agua y se agrega las sustancias, seguido a ello se somete la mezcla en agitación a 1200 rpm durante 45 min. La mezcla se somete a calor de 5 min en una plancha para eliminar burbujas por agitación. Finalmente se agrega el plastificante al 20% respecto del polisacárido, la solución es depositada en un recipiente plástico para luego ir a la

estufa de vacío durante 1h para secar la película completamente se somete a una temperatura de 50°C durante 24 h.

Las muestras tras secarse se almacenan en un desecador para evitar que agentes microbianos del medio exterior las contaminen.

Pruebas fisicoquímicas

Contenido de Humedad (%)

El análisis del porcentaje de humedad fue realizado en el equipo analizador de humedad HB43-S METTLER TOLEDO, el cual emplea el método termogravimétrico. El proceso se basa en la pérdida de peso de una muestra debido al calentamiento; este dispone de un analizador de humedad halógeno que emplea una unidad de calentamiento halógeno (METTER, 2008). La muestra se calienta rápidamente, lo que garantiza que los resultados estén disponibles rápidamente. El equipo puede ser configurado de acuerdo a las condiciones de análisis de un material en específico; por tanto, se estableció una temperatura de configuración de 105°C cumpliendo el pesaje de rangos aceptables entre 0,5 a 0,7 gr de muestra. Previamente la preparación de las muestras fue secar hasta que su peso no varíe y mantenerlas a una humedad relativa de 60%. El equipo de forma inicial pesa la muestra, luego calienta a la muestra por un determinado tiempo, finalmente la cantidad de agua es evaporada y el equipo muestra el valor en la pantalla principal del porcentaje del contenido de humedad.

Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA)

En el análisis de permeabilidad de vapor de agua se empleó el método gravimétrico, según la norma ASTM E-96, con ciertos cambios por McHugh. Las biopelículas formadas se cortaron en forma de discos de 45 mm de diámetro para luego colocarse en capsulas de vidrio de 40 mm de

diámetro. Se utilizó 10 mL de agua destilada, para fijar un entorno de humedad relativa del 100%. Las muestras de biofilm se fijaron en las celdas. Las cápsulas se colocaron en un desecador a 25°C y 0% de humedad relativa lo descrito se puede observar en la figura 8. Así, ocurrió permeación de vapor de agua vapor a través de la película entre las dos atmósferas con diferentes humedades relativas. La tasa de transferencia de vapor de agua fue medida por la pérdida de peso de las cápsulas, donde se han registrado mediciones cada 48 h a partir del estado de equilibrio (Shahabi-Ghahfarrokhi et al., 2015).

La permeabilidad al vapor de agua se determinó con la siguiente ecuación.

Ecuación 4 *Permeabilidad al vapor de agua*

$$WVP = \frac{WVPR \times Z}{S \times (HR_2 - HR_1)}$$

Donde:

WVP: Permeabilidad de vapor de agua ($g \times s^{-1} \times m^{-1} \times MPa^{-1}$)

WVPR: Pendiente de la curva $\left(\frac{g}{h}\right)$ en base al área expuesta de la película $\left(\frac{g}{s} \times m^2\right)$

S: Presión de vapor de agua a la temperatura de ensayo en MPa

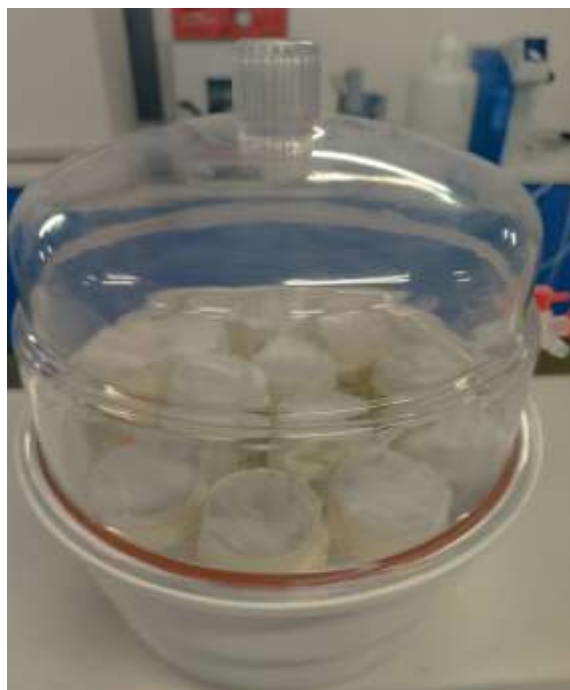
T: Temperatura de ensayo a 22°C

HR₂: Humedad relativa de la cámara (0%)

Z: espesor (m)

Figura 8

Sistema de cámara para análisis de permeabilidad al vapor de agua.

***Espesor***

En la determinación del espesor se hizo bajo 5 mediciones en diferentes posiciones en el área de la película, los valores medidos mediante el calibrador digital Stanley.

Para tomar el espesor de la celulosa microbiana obtenido por el cultivo de 15 días, la celulosa fue purificada, blanqueada y secada. Para procurar obtener más cantidad de celulosa se realiza el cultivo por triplicado.

Para la medida de espesor de las biopelículas formadas se toma mediciones de todas las muestras de los tratamientos según el diseño experimental de estudio.

Ensayos mecánicos

Resistencia a la tracción y porcentaje de elongación

El método D882-02, se emplea para evaluar la resistencia a la tracción (TS), el alargamiento a la rotura (EB) y la energía de tracción a la rotura (TEB) con la máquina de tracción del laboratorio de Mecánica de materiales de ESPE matriz. Las cintas rectangulares de 100 mm de largo por 10 mm de ancho se cortaron de las películas. Las cintas se fijaron con una separación inicial de agarre de 50 mm y se estiraron a una velocidad de 10 mm/min. Para cada espécimen de película, se realizaron tres repeticiones. Las ecuaciones se utilizaron para calcular TS, EB y TEB (Shahabi-Ghahfarrokhi et al., 2015). La resistencia a la tracción se calcula mediante la siguiente expresión:

Ecuación 5 Resistencia a la tracción

$$\sigma(MPa) = \frac{F}{A}$$

Donde:

F = Fuerza entregada por la máquina en N

A = Área trnasversal (mm^2)

La elongación se calcula mediante la siguiente expresión:

Ecuación 6 Elongación

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

Figura 9

Máquina de ensayos de tracción.



Nota. La gráfica muestra el equipo empleado el ensayo de tracción.

Técnicas de análisis térmico.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis DSC se lleva a cabo en el equipo de marca Mettler Toledo, como se muestra en la figura 9. Las muestras para el análisis fueron cortadas en segmentos pequeños para un rango de peso entre 5 mg y 10 mg; luego se coloca en bandejas de aluminio para ser que las muestras sean prensadas. Las condiciones ingresadas en el panel principal del software asociado al equipo fueron: a una velocidad de flujo de nitrógeno de 20mL/min, una velocidad de calentamiento de 10°C/min y finalmente un rango de temperatura de -40 a 220°C.

Figura 10

Equipo de análisis DSC-Mettler Toledo.



Nota. La gráfica muestra el equipo empleado para el análisis de propiedades térmicas DSC.

Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA), se realiza en el equipo de marca PerkinElmer, modelo Pyris 1 TGA. Las muestras tomadas para el análisis den ser en un rango de peso de 5 a 7 mg, a un flujo de gas nitrógeno de 20 ml/min, con una velocidad de calentamiento de 10°C/min, en rango dinámico de temperatura de 30- 700°C y un cambio de gas aire al llegar a 700°C, manteniendo las condiciones constantes durante 3 minutos (Avcioglu et al., 2021).

Figura 11

Equipo de análisis TGA-Perkin-Elmer.



Nota. La gráfica muestra el equipo empleado el análisis térmico TGA.

En el proceso para ejecutar el análisis en el equipo, la muestra se coloca en una microbalanza, se pesa la muestra luego la muestra fue colocada en el hilo de cuarzo del equipo TGA y finalmente por medio del software asociado se ejecuta previo a haber colocado las condiciones de corrida del análisis.

Características estructurales

Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR)

En el análisis FT-IR, se emplea un espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier con PerkinElmer Frontier, con el fin de evaluar la estructura de la celulosa obtenida y las biopelículas formadas a partir de la celulosa, CMC y plastificante. Los espectros obtenidos fueron corridos con

una velocidad de 0,2 entre un rango de 4000 a 500 cm^{-1} . El espectro de cada muestra permite la identificación de cada pico o banda en el diagrama correspondiente a una vibración específica de los enlaces químicos presentes en la muestra, lo que facilita el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos orgánicos e inorgánicos.

Capítulo IV

Resultados y Discusión

Análisis de Resultados

Obtención de Celulosa Microbiana

Los factores de influencia en el cultivo de kéfir, seguido del proceso de fermentación para la obtención de la celulosa microbiana donde se obtuvieron mayores rendimientos de producción a: condiciones de caldo de fermento de pH de 4 a 5, a mayor cantidad de cáscaras de piña y la relación peso 1:1 de inóculos endulzante a un periodo de cultivo de 15 días, se obtuvo mayor cantidad en gramos de celulosa.

Figura 12

Película de celulosa microbiana.



Nota. En la imagen, se observa la película de celosa formada como producto del proceso fermentativo.

La celulosa microbiana, formada a diferentes condiciones diferentes de cultivo se ha realizado por triplicado.

Formación de películas.**Figura 13**

Película de celulosa microbiana y biopelículas de celulosa y kefiran.

Películas de celulosa microbiana.



Biopelículas de celulosa microbiana.



Biopelículas de kefiran.



En la figura 13, se tiene las películas de celulosa microbiana cuyo aspecto luego de ser sometida a tratamientos de purificación y blanqueamiento, presentan homogeneidad en su estructura y opacidad baja. Las biopelículas formadas en base a la celulosa microbiana y adición de plastificante (glicerol) y CMC presentan heterogeneidad en su estructura debido a la insolubilidad de la celulosa al formar la matriz del film de forma visual presenta menor opacidad que la película del polisacárido kefiran; por otro lado, las películas de kefiran y plastificante presentan mayor opacidad visual que las mencionadas además presenta una estructura homogénea.

Cantidad de celulosa seca producida.

Tabla 9

Cantidad de celulosa microbiana seca.

Código muestras	Cantidad de CM seca (g)
CMA	1,85
CMA1	1,75
CMA2	0,9
CMA3	1
CMA4	0,7
CMA5	1,8
CMA6	0,9
CMA7	1,15
CMA8	1
CMA9	0,8

Código muestras	Cantidad de CM seca (g)
CMA10	1,55
CMA11	0,8
CMA12	1,6
CMA13	1
CMA14	1,2
CMA15	1,45
CMA16	0,9
CMA18	1,15
CMA19	1
CMA20	0,88

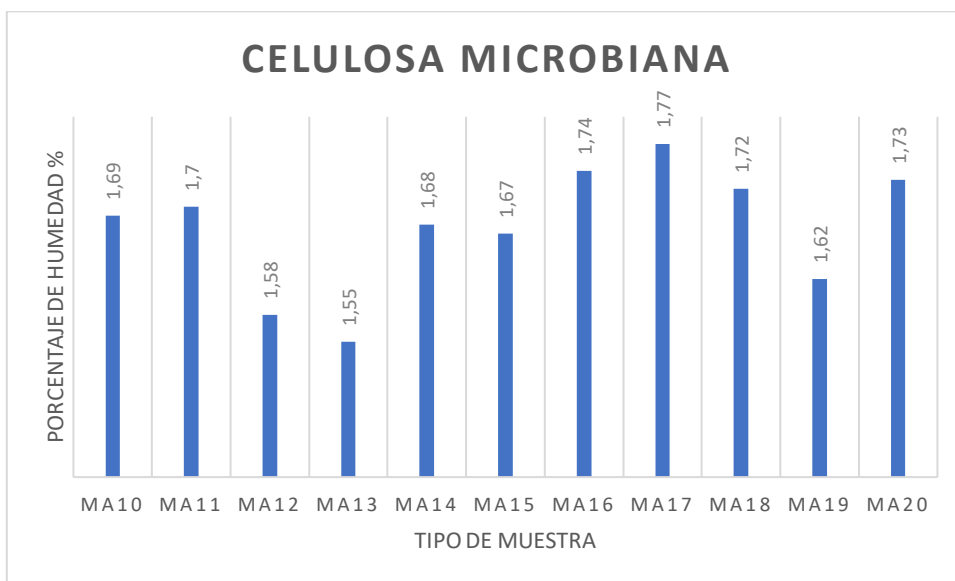
Nota. La tabla hace referencia, a la cantidad promedio de celulosa microbiana del cultivo A seca de los diferentes medios de cultivo.

El cultivo realizado denominado CMA corresponde al cultivo realizado a diferentes condiciones y cuyo peso en seco se muestra en la tabla 9, donde los cultivos de muestra MA, MA1, MA2 y MA3 muestran mayor producción en peso de celulosa.

Para la formación de las biopelículas, se realizó un cultivo por triplicado de los cultivos de mayor rendimiento en función al peso seco final obtenido.

Contenido de Humedad (%)**Figura 14**

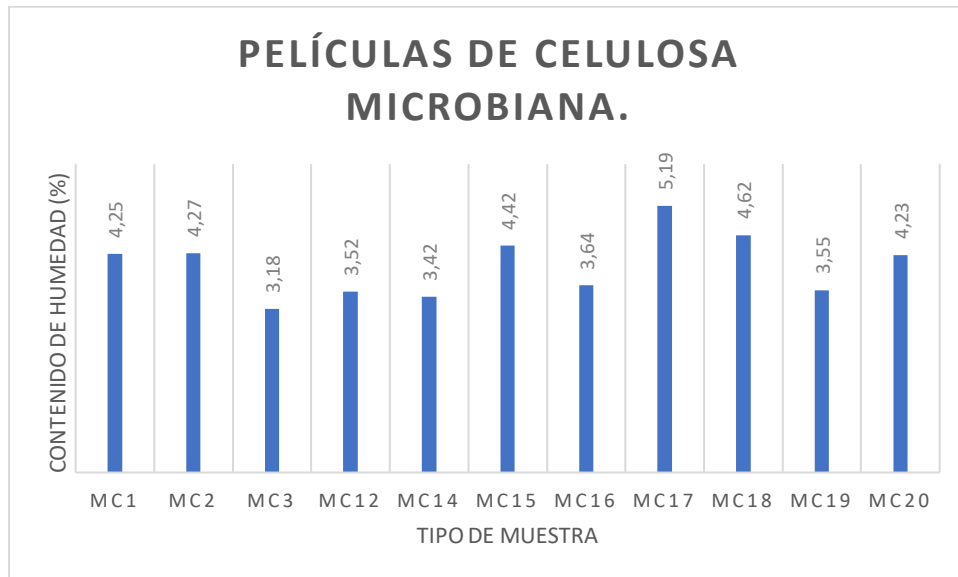
Esquema de barras del porcentaje de humedad de la película de celulosa microbiana.



Nota. En el gráfico se observa que el porcentaje de humedad se encuentra entre 1,55 a 1,77 de las muestras de celulosa.

Figura 15

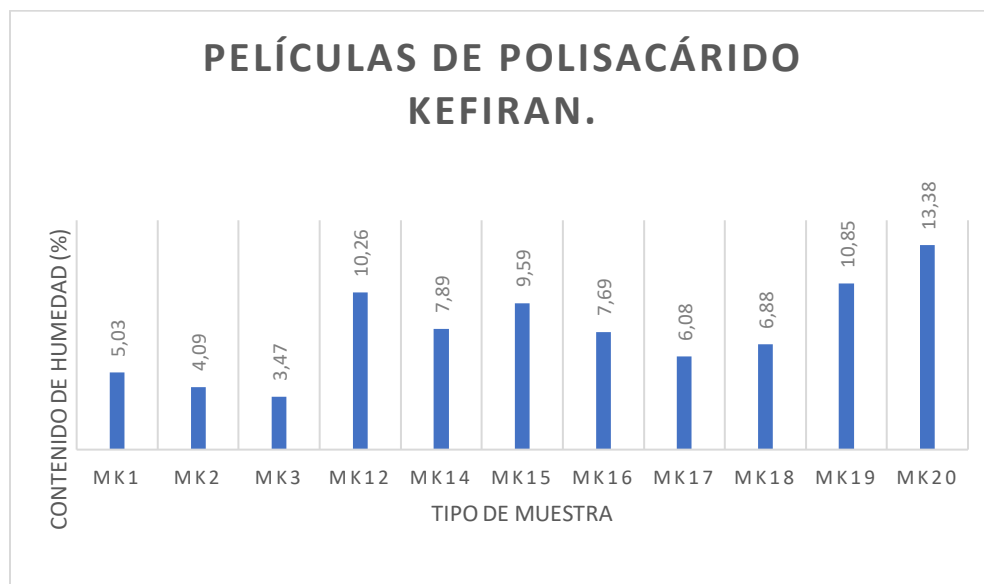
Esquema de barras del porcentaje de humedad de la biopelícula de celulosa microbiana.



Nota. En el gráfico se observa que el porcentaje de humedad se encuentra entre 3,18 a 5,19 de las biopelículas a base de celulosa.

Figura 16

Esquema de barras del porcentaje de humedad de la biopelícula de celulosa microbiana.



Nota. En el gráfico se observa que el porcentaje de humedad se encuentra entre 3,47 a 13,38 de las biopelículas a base de celulosa.

En la figura 14, 15 y 16, se muestran los diagramas de barras de las películas de celulosa; considerando que para la película de celulosa natural presenta menor porcentaje de humedad de 1,55%, por lo contrario, en relación comparativa de las biopelículas formadas a partir de celulosa y del polisacárido. Las películas de polisacárido exhiben valores mayores de humedad teniendo valores de 3,47 a 13,38 %, lo cual significa su alto grado de higroscopia. La biopelícula a base celulosa microbiana de menor contenido de humedad fue de 3,18 del tratamiento de la muestra MC3.

Permeabilidad al Vapor de Agua

En el análisis de permeabilidad al vapor de agua se ha tomado 10 muestras, selección realizada en base al diseño de películas en función al peso de las mismas; además, se ha considerado el aspecto superficial y homogeneidad de estructura de película.

Los valores de permeabilidad fueron encontrados por la relación entre la masa del recipiente en función del tiempo; por lo tanto, la técnica de análisis de los datos de interrelación ha sido la regresión lineal de los datos mencionados, que permite obtener una ecuación de primer grado para luego obtener las pendientes de cada tratamiento dato usado en la determinación de la permeabilidad.

Tabla 10

Datos del peso de las muestras tomadas en función al tiempo para la prueba de permeabilidad.

Muestras (Kg)	WVTR ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{MPa}^{-1}$)
<i>Tratamientos celulosa microbiana.</i>	
MA1	1,506780E-10
MA2	1,53680E-10
MA3	1,663685E-10
<i>Tratamientos biopelículas de celulosa microbiana.</i>	
MC14	5,689540E-09

Muestras (Kg)	WVTR ($\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$)
<i>Tratamientos biopelículas de celulosa microbiana.</i>	
<i>Tratamientos celulosa microbiana.</i>	5,74895E-09
MC19	6,739540E-09
<i>Tratamientos biopelículas de polisacárido kefiran.</i>	
MK14	6,891120E-09
MK15	7,289420E-09
MK19	7,995120E-09

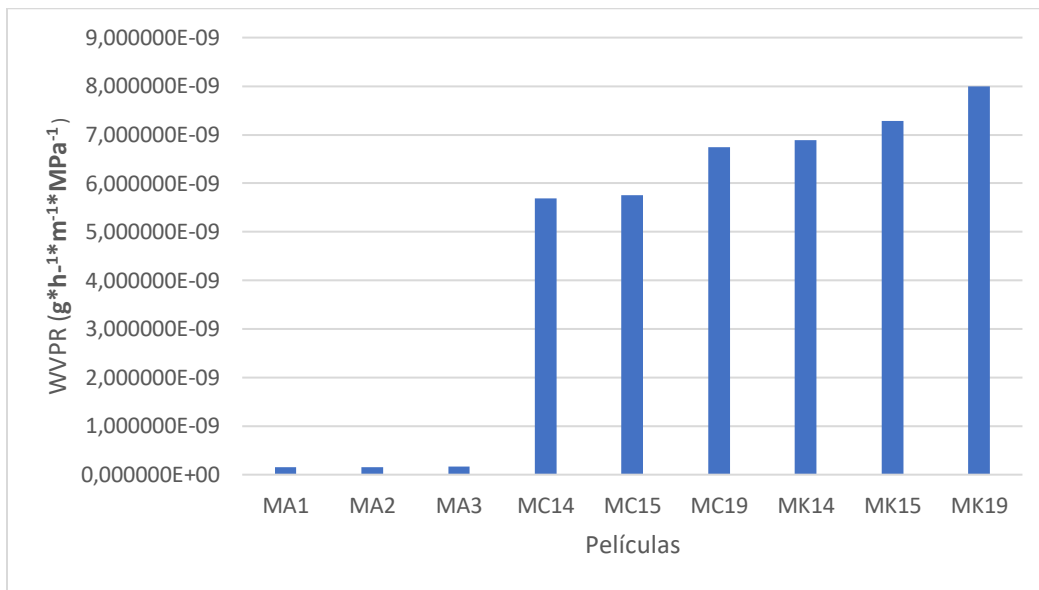
Nota. La tabla 10 muestra los valores del peso de los frascos y películas en relación a los tiempos de ensayo.

La prueba de permeabilidad realizado en función de las humedades relativas controladas de 100% y 0% configuradas en el sistema de ensayo sobre las películas de celulosa y kefiran. En la tabla 10 se muestran los valores y en la figura 14 la representación gráfica; por lo tanto en base a lo obtenido se tiene que las películas de celulosa natural presentan menor permeabilidad que las biopelículas de celulosa y kefiran ; esto se debe a la formación estructural compacta que presenta la celulosa microbiana en relación a las biopelículas obtenidas debido a que presentan

estructuras conformacionales donde las unidades constitutivas se encuentran a mayores distancias por la adición de plastificantes y agentes agregados.

Figura 17

Esquema de barras del porcentaje de humedad de la biopelícula de celulosa microbiana.



En función de los resultados observados en la figura 17, se tiene que la película MA1 presenta menor permeabilidad es decir absorbe menor cantidad de vapor de agua; por otro lado, las películas MC19 y MK19 presentan mayor valor de permeabilidad, lo cual sugiere una tasa de absorción de agua superior, finalmente la barrera efectiva contra la humedad se tendrá en la celulosa microbiana MA1.

Espesor

Espesor de Celulosa Microbiana.

Para el espesor de la celulosa microbiana se ha tomado las películas de celulosa espesor promedio cuyos valores se muestran en la tabla 11; las muestras han sido tomados de los cultivos realizados.

Tabla 11

Películas de celulosa respecto a los cultivos.

Cultivos	Espesor (mm)	Desviación estándar relativa (%)
Cultivo madre A	0,376±0,057	6,10
Cultivo madre A₁	0,402±0,051	5,54
Cultivo madre A₂	0,386±0,046	5,0299

Nota. Las películas de celulosa formadas por los cultivos, muestra espesores y la desviación estándar respectiva a cada muestra cultivo.

Los resultados del espesor de las películas no presentan valores con diferencia representativa en relación a los cultivos realizados. El valor de espesor de película podría variar su valor debido a: las condiciones de cultivo, los tratamientos de purificación y blanqueamiento; además de la temperatura y tiempo de secado.

Espesor de Biopelícula a base de celulosa Microbiana.

Tabla 12

Espesor de Películas biodegradables con celulosa microbiana.

Tratamientos	Espesor (mm)	Desviación estándar relativa (%)
MC1	0,38±0,123	12,747
MC2	0,294±0,025	2,880
MC3	0,326±0,075	7,893
MC4	0,336±0,087	9,044
MC5	0,266±0,055	5,813
MC6	0,352±0,019	2,280

Tratamientos	Espesor (mm)	Desviación estándar relativa (%)
MC7	0,398±0,066	7,085
MC8	0,316±0,032	3,577
MC9	0,362±0,113	11,734
MC10	0,404±0,090	9,502
MC11	0,288±0,039	4,266
MC12	0,37±0,068	7,176
MC13	0,322±0,087	9,121
MC14	0,416±0,106	11,104
MC15	0,32±0,053	5,656
MC16	0,414±0,042	4,615
MC17	0,436±0,026	3,130
MC18	0,30±0,126	12,922
MC19	0,358±0,117	12,070
MC20	0,388±0,123	12,716
MC21	0,332±0,060	8,408
MC22	0,284±0,075	7,797
MC23	0,322±0,114	11,819
MC24	0,296±0,106	10,990
MC25	0,244±0,096	9,914

Nota. La tabla 12 muestra, los valores de espesores de la biopelícula de celulosa, tomados a los diferentes tratamientos y la desviación estándar encontrada.

Tabla 13

Espesor de Películas biodegradables con polisacárido kefiran.

Tratamientos	Espesor (mm)	Desviación estándar relativa (%)
MK1	0,380±0,123	3,781
MK2	0,284±0,025	2,607
MK3	0,296±0,075	2,607

Tratamientos	Espesor (mm)	Desviación estándar relativa (%)
MK4	0,286±0,087	2,280
MK5	0,272±0,055	1,303
MK6	0,348±0,019	1,483
MK7	0,368±0,066	1,923
MK8	0,314±0,032	3,435
MK9	0,328±0,113	3,563
MK10	0,36±0,090	2,121
MK11	0,288±0,039	4,266
MK12	0,338±0,068	4,764
MK13	0,342±0,0879	1,788
MK14	0,452±0,106	2,588
MK15	0,292±0,533	1,095
MK16	0,388±0,042	6,180
MK17	0,426±0,026	2,509
MK18	0,248±0,126	1,788
MK19	0,302±0,103	4,969
MK20	0,38±0,123	4,527
MK21	0,298±0,08	6,379
MK22	0,248±0,075	3,492
MK23	0,26±0,114	3,741
MK24	0,251±0,106	2,049
MK25	0,214±0,096	1,140

Nota. La tabla 13 muestra, los valores de espesores de la biopelícula de kefirán, tomados a los diferentes tratamientos y la desviación estándar encontrada.

Los resultados de la tabla 13 respecto al valor de espesor obtenido de las biopelículas de celulosa, no muestran diferencias significativas en función a los diferentes tratamientos en cada muestra. La tabla 9 muestra el valor de espesor obtenido de las biopelículas del polisacárido de

kefiran, no muestran diferencias significativas en función a los diferentes tratamientos; sin embargo, los valores de espesor presentan menor desviación, es decir las películas presentan mayor uniformidad que las películas de celulosa debido a que el kefiran es soluble y se dispersa de forma homogénea en la matriz de composición polimérica.

Rendimiento de celulosa.

Tabla 14

Rendimiento total y diario de la celulosa microbiana.

Código muestras	Cantidad de CM seca (g)	Rendimiento total de celulosa.	Rendimiento diario celulosa.
CMA	1,85	2,3125	0,09635417
CMA1	1,75	2,1875	0,09114583
CMA2	0,9	1,125	0,046875
CMA3	1	1,25	0,05208333
CMA4	0,7	0,875	0,03645833
CMA5	1,8	2,25	0,09375
CMA6	0,9	1,125	0,046875
CMA7	1,15	1,4375	0,05989583
CMA8	1	1,25	0,05208333
CMA9	0,8	1	0,04166667
CMA10	1,55	1,9375	0,08072917
CMA11	0,8	1	0,04166667
CMA12	1,6	2	0,08333333
CMA13	1	1,25	0,05208333
CMA14	1,2	1,5	0,0625
CMA15	1,45	1,8125	0,07552083
CMA16	0,9	1,125	0,046875
CMA18	1,15	1,4375	0,05989583
CMA19	1	1,25	0,05208333
CMA20	0,88	1,1	0,04583333

Nota. La tabla 14 muestra, el rendimiento diario y el rendimiento total alcanzado en la producción de celulosa microbiana.

El rendimiento mayor alcanzado se puede observar en la tabla 14, corresponde al cultivo CMA con un rendimiento total de 2,3125 %, lo cual demuestra un rendimiento bajo por lo cual se hizo varios cultivos para alcanzar la mayor cantidad de celulosa para elaboración de biopelículas.

Rendimiento de polisacárido kefiran.

Tabla 15

Rendimiento total de polisacárido kefiran.

Código muestras	Rendimiento total de polisacárido
MKP1	90,25
MKP2	84
MKP3	83,75
MKP4	85,55
Código muestras	Rendimiento total de polisacárido
MKP5	93,60
MKP6	82,50
MKP7	89,43
MKP8	90
MKP9	98,28
MKP10	91,07
MKP11	93,06
MKP12	92,33
MKP13	96,25
PROMEDIO	90,00

Nota. La tabla 15 muestra, y el rendimiento total alcanzado en la producción polisacárido kefiran.

Para la obtención del polisacárido kefiran del hongo búlgaro, se alcanzó con altos rendimientos lo que significó una alta producción del polisacárido kefiran para el desarrollo de biopelículas.

Análisis de diseño experimental

El diseño experimental, para determinar el mayor rendimiento de celulosa microbiana seca, parte del análisis de la significancia de los factores identificados en los tratamientos en un análisis de varianza. La interpretación de los valores obtenidos para un valor de p menor que 0,05

corresponde a que los factores de estudio son significantes; sin embargo, para factores cuyo valor es mayor a 0,05 no son significantes.

Para el diseño experimental, se ha fijado la variable objetivo correspondiente a la permeabilidad al vapor de agua; por tanto, se ha de interpretar la varianza de los efectos significativos y los efectos principales característicos de cada factor en función a la variable de influencia.

Rendimiento de celulosa.

Tabla 16

Rendimiento de producción de celulosa microbiana evaluado con ANOVA.

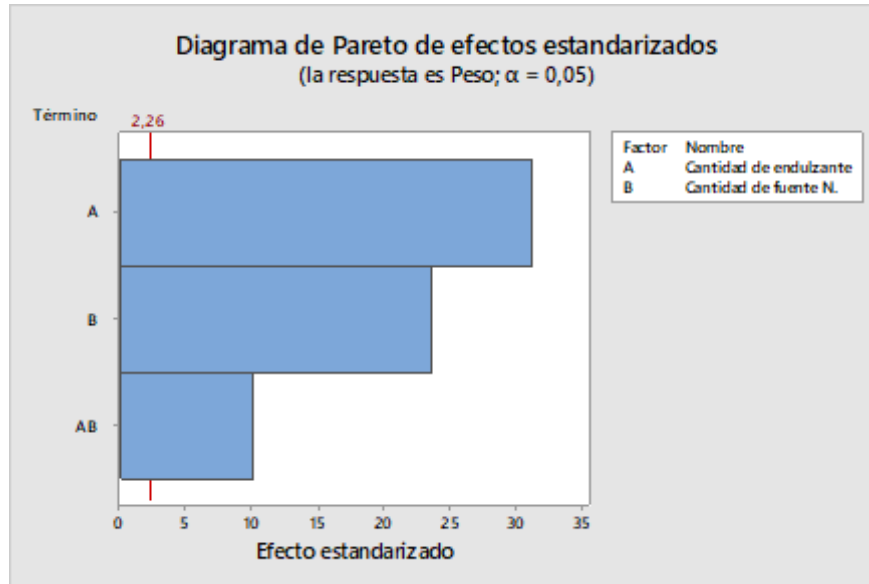
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	2,22361	0,277951	285,89	0,000
Lineal	4	2,02222	0,505556	520,00	0,000
Cantidad de endulzante	2	1,28528	0,642639	661,00	0,000
Cantidad de fuente de N.	2	0,73964	0,368472	379	0,000
Interacción de 2 términos	4	0,20139	0,050347	51,79	0,000
Cantidad de endulzante *Cantidad de fuente de N.	4	0,20139	0,050347	51,79	0,000
Error	9	0,00875	0,000972		
Total	17	2,23236			

Nota. La tabla muestra, el nivel de significancia de los factores y la interacción en referencia al rendimiento de la película de celulosa microbiana.

En la tabla 16 se muestra el valor de p, que nos permite identificar los factores significativos del modelo aplicado. Los factores de análisis como lo son: la cantidad de endulzante y la cantidad de fuente de N, presenta un valor de p inferior a 0,05; por lo tanto, se consideran factores significativos que inciden en el rendimiento de la producción de celulosa microbiana.

Figura 18

Diagrama de Pareto de la celulosa microbiana.



Nota. El diagrama de Pareto muestra el valor absoluto de los efectos, señala el nivel de significancia de los factores y la interacción en referencia al rendimiento de la película de celulosa microbiana.

En la figura 18, se presenta el diagrama de Pareto donde se indica el factor de mayor incidencia en el modelo de estudio. La evaluación parte de los factores de influencia A (Cantidad de endulzante), B (Cantidad de fuente de nitrógeno) y la interacción de AB. Los resultados obtenidos por el software Minitab 18, muestran que los factores que cruzan la línea de referencia hallada en el valor de 2,26. Los factores A, B y su interacción son estadísticamente significativos para el rendimiento del cultivo en el presente de estudio de producción de celulosa microbiana.

Tabla 17

Test de Tukey de celulosa microbiana.

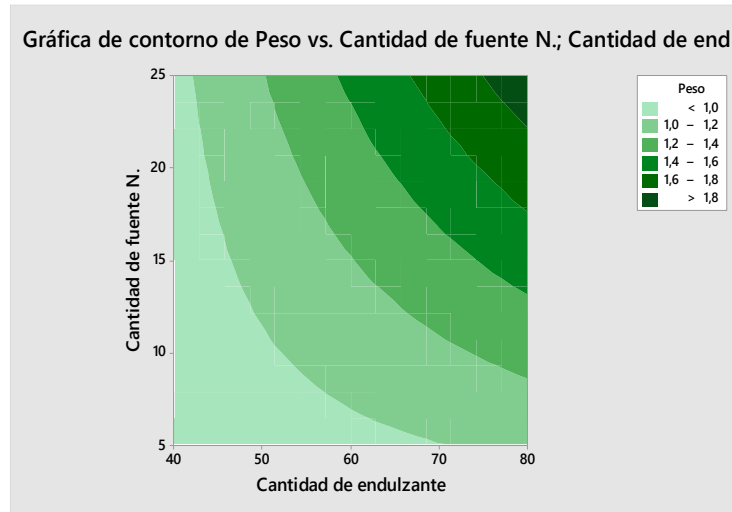
Fuente	N	Media	Agrupación
Cantidad de endulzante *Fuente de N	6		A
80 5	6	1,450	A
60 15	6	1,258	B
40 25	6	0,875	B
80 25	6	1,545	A

Nota. La tabla 17 representa las comparaciones de los tratamientos, en relación a una agrupación de mostrada por el test de Tukey.

Los resultados obtenidos, mediante este test Tukey al 95% de confianza me permite analizar cual tratamiento/s son significativamente iguales; es decir, el tratamiento sugiere un cultivo con 80 gr de sacarosa y 25 gr de cáscaras de piña para un mejor rendimiento de peso en celulosa.

Figura 19

Gráfica de contorno del peso de celulosa y los factores de influencia.



Nota. La gráfica de contornos de la correlación de los factores en el cultivo y la respuesta en peso seco de celulosa microbiana.

En la figura 19 se observa que para optimizar el proceso de cultivo con el inóculo en fermentación en base a los factores de influencia se tiene que para el mejor resultado es, realizar el cultivo con una cantidad de 80 gr de endulzante y cantidad de fuente nitrógeno de 25 gr para lograr mayor rendimiento de producción; esto se evidencia en la zona gráfica de verde más oscuro.

ANOVA con respecto a la permeabilidad al vapor de agua en biopelículas de celulosa.

Diseño para películas de celulosa.

Tabla 18

Análisis ANOVA respecto a las respuestas de peso y permeabilidad al vapor de agua.

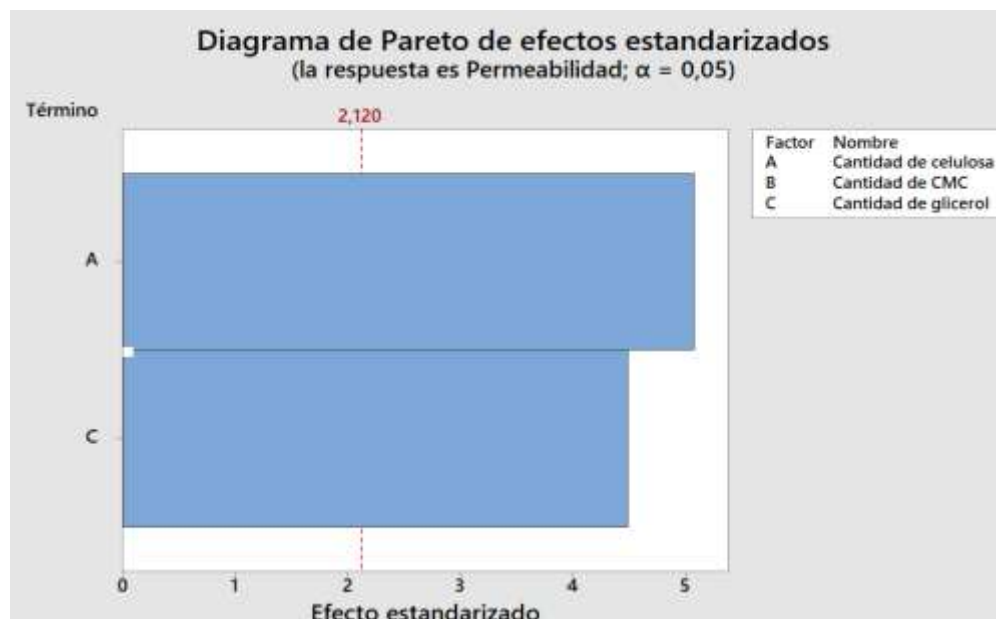
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	18,2700	2,60999	1,25	0,033
Lineal	3	5,0964	1,69880	0,81	0,005
Cantidad de celulosa	1	0,1630	0,16300	0,08	0,00784
Cantidad de CMC	1	4,7311	4,73112	2,26	0,0690
Cantidad de glicerol	3	0,000	0,00004	0,00	0,0011
Interacción de 2 términos	1	14,7100	5,79557	2,34	0,0115
Cantidad de celulosa* Cantidad de CMC	1	5,7956	5,05028	2,77	0,0013
Cantidad de celulosa *Cantidad de glicerol	1	5,0503	1,30518	2,41	0,0441
Cantidad de CMC *Cantidad de glicerol	1	1,3052	0,41963	2,77	0,0660
Interacción de 3 términos	1	0,4196	0,41963	2,41	0,0660
Error	17	0,4196	2,09499	0,62	
Error puro	9	35,6148	3,010553	0,20	
Total	24	53,8848	1,28118		

Nota. La tabla 18 muestra, el nivel de significancia de los factores y la interacción en referencia a la formación de la biopelícula de celulosa microbiana.

En la tabla 18 se muestra el valor de p, que nos permite identificar los factores significativos del modelo aplicado. Los factores de análisis como lo son: la cantidad de celulosa, cantidad de CMC y la cantidad de plastificante, presenta un valor de p inferior a 0,05 para los factores de cantidad de celulosa y cantidad de glicerol; es decir estos factores muestran influencia significativa en el estudio; sin embargo, el factor de cantidad de CMC, se consideran un factor que no presentan grado de significancia sobre el estudio.

Figura 20

Diagrama de Pareto de la biopelícula de celulosa.

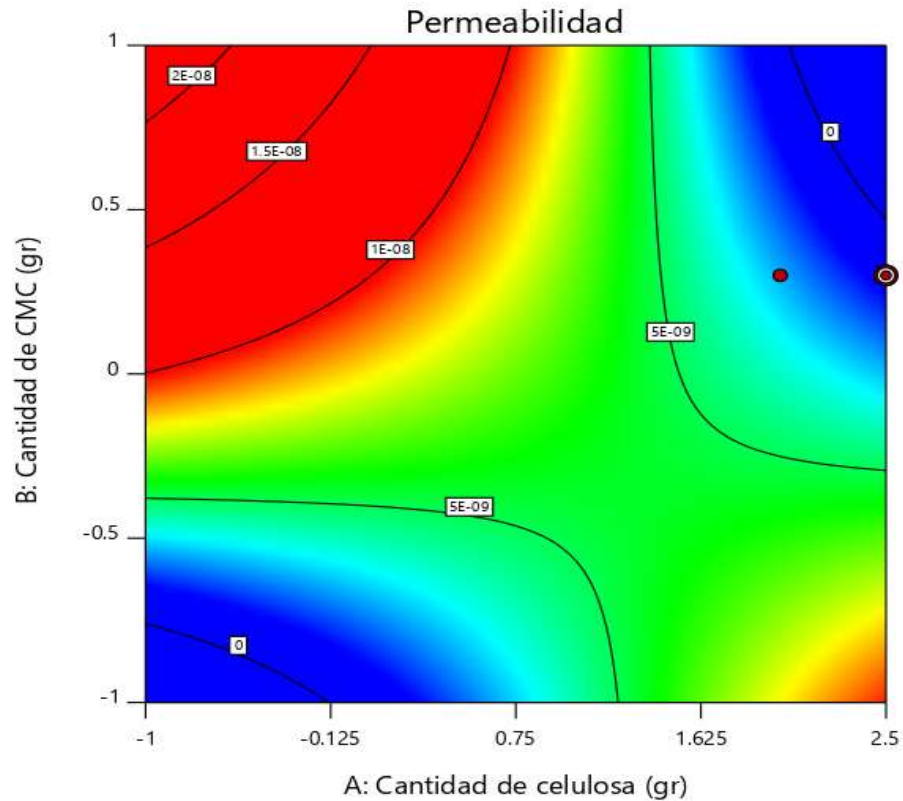


Nota. En la figura se muestra el diagrama de Pareto, indica el valor absoluto de los efectos, señala el nivel de significancia de los factores y la interacción en referencia al rendimiento de la película de celulosa microbiana.

En la figura 20, se presenta el diagrama de Pareto indica los factores que presentan mayor incidencia en el modelo de estudio. La evaluación parte de los factores de influencia A (Cantidad de celulosa) y B (Cantidad de glicerol). Los resultados obtenidos por el software Minitab 18, muestran que los factores que cruzan la línea de referencia en el valor de 2,12 tienen gran influencia y muestran ser estadísticamente significativos para la variable de respuesta permeabilidad al vapor de agua.

Figura 21

Diagrama de contorno de la biopelícula de celulosa.



Nota. La gráfica de contornos de la correlación de los factores en el cultivo y la respuesta en peso seco de celulosa microbiana.

En la Figura 21 se puede apreciar la figura de contorno de los factores de cantidad de celulosa, cantidad de CMC y cantidad de glicerol además incluye valores de la variable de respuesta (permeabilidad). La variable de respuesta se encuentra en influencia de los factores mencionados, donde los tratamientos de mejor condicionamiento son: MC14 2,5 gr de celulosa, 0,3 gr CMC y 0.6 mL de glicerol correspondiente y M15 2 gr de celulosa y 0,3 gr de CMC y 0.6 mL de plastificante.

Los análisis mecánicos y estructurales se realizarán en base a las películas MC14 y MC15 en base a los análisis de diseño y ensayos experimentales.

Diseño para películas de kefirán

Tabla 19

Análisis ANOVA respecto a las respuestas de peso y permeabilidad al vapor de agua.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	18,2700	2,60999	1,25	0,037
Lineal	3	5,0964	1,69880	0,81	0,00952
Cantidad de kefirán	1	0,1630	0,16300	0,0028	0,0232
Cantidad de CMC	1	4,7311	4,73112	1,62	0,06976
Cantidad de glicerol	3	0,000	0,00004	0,2811	0,0051
Interacción de 2 términos	1	14,7100	5,79557	0,3439	0,0576
Cantidad de kefirán* Cantidad de CMC	1	5,7956	5,05028	0,2992	0,0241
Cantidad de kefirán*Cantidad de glicerol	1	5,0503	1,30518	0,6084	0,0441
Cantidad de CMC *Cantidad de glicerol	1	1,3052	0,41963	4,40	0,0062
Interacción de 3 términos	1	0,4196	0,41963	2,07	0,01806
Error	17	0,4196	2,09499	0,0082	
Error puro	9	35,6148	3,010553		
Total	24	53,8848	1,28118		

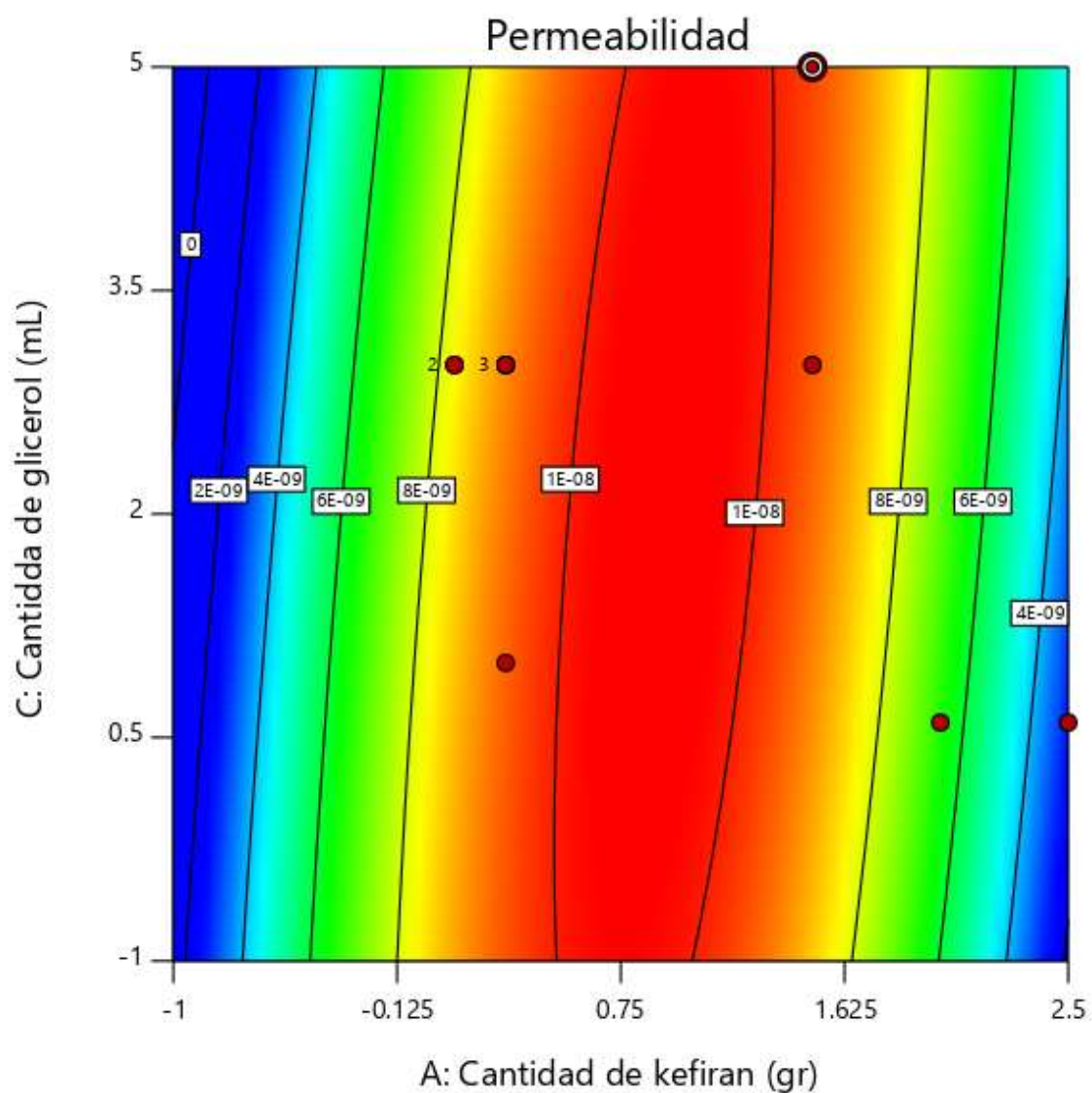
Nota. La tabla 19 muestra, el nivel de significancia de los factores y la interacción en referencia a la formación de la biopelícula de celulosa microbiana.

En la tabla 19 se muestra el valor de p, que nos permite identificar los factores significativos del modelo aplicado. Los factores de análisis como lo son: la cantidad de celulosa, cantidad de CMC y la cantidad de plastificante, presenta un valor de p inferior a 0,05 para los

factores de cantidad de celulosa y cantidad de glicerol; es decir estos factores muestran influencia significativa en el estudio.

Figura 22

Diagrama de contorno de la biopelícula de kefiran.



Nota. La gráfica de contornos de la correlación de los factores en el cultivo y la respuesta en peso seco de celulosa microbiana.

En la Figura 22 se puede apreciar la figura de contorno de los factores de cantidad de celulosa, cantidad de CMC y cantidad de glicerol además incluye valores de la variable de respuesta (permeabilidad). La variable de respuesta se encuentra en influencia de los factores mencionados, donde los tratamientos de mejor condicionamiento son: MK14 2,5 gr de celulosa, 0,3 gr CMC y 0,3 mL de glicerol correspondiente y MK15 2 gr de celulosa y 0,3 gr de CMC y 0.6 mL de plastificante.

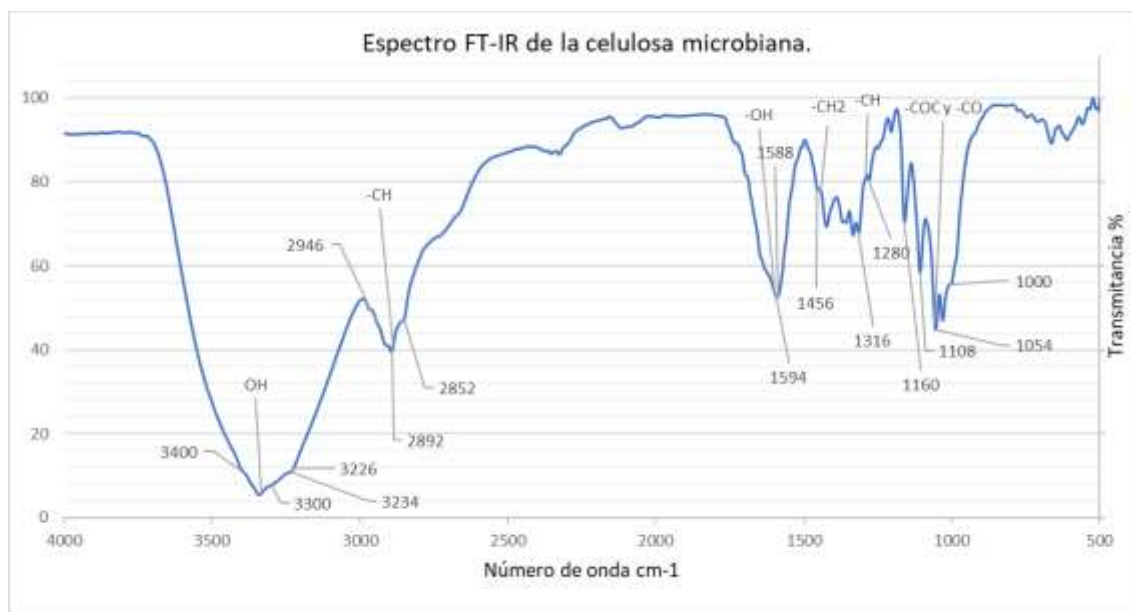
Los análisis mecánicos y estructurales se realizarán en base a las películas MK14 y MK15 en base a los análisis de diseño y ensayos experimentales.

Características estructurales

Espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR)

Figura 23

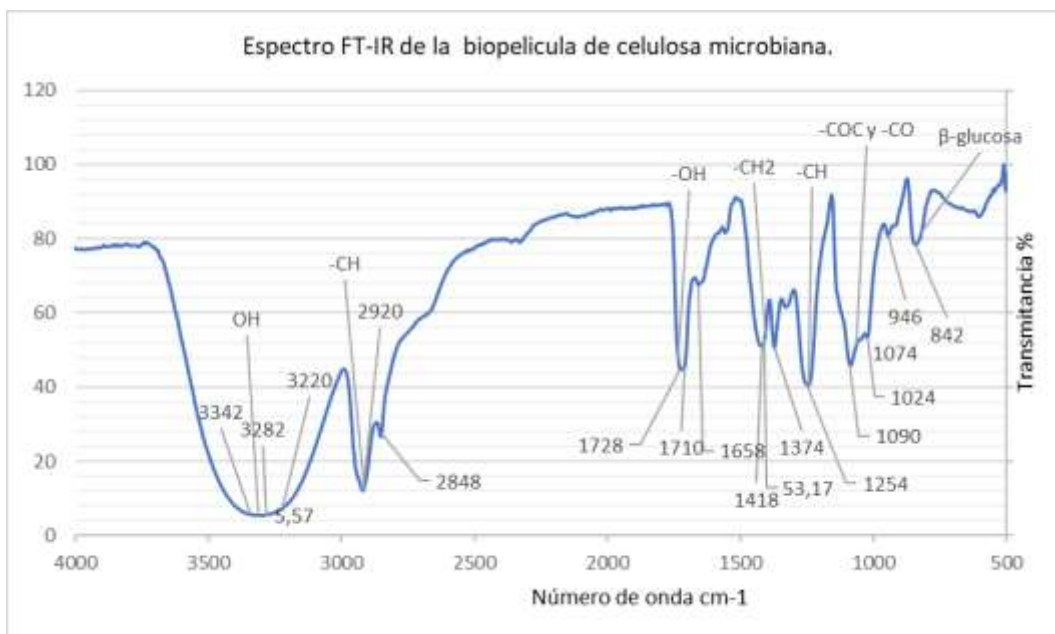
Espectro FT-IR de la celulosa microbiana del hongo kéfir.



En el análisis FTIR, se ha identificado los principales grupos funcionales de la estructura de la celosa microbiana presentan gran similitud del estudio realizado según (Avcioglu et al., 2021. ;Dima et al., 2017). Las bandas de absorción infrarroja a 3400 cm^{-1} , 3300 cm^{-1} y 3234 cm^{-1} se describen como picos característicos de la celulosa microbiana e indican vibraciones de estiramiento OH. Las bandas a 2846 cm^{-1} , 2892 cm^{-1} y 2945.74 cm^{-1} corresponde a la presencia de -CH de estiramiento y la banda a 1594 se refiere a -OH flexión, hace referencia al agua absorbida (Gopu & Govindan, 2018; Kumar et al., 2019a; Pacheco et al., 2017). La banda de infrarroja de $1456,74\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a la presencia de flexión -CH₂. Las regiones en torno a 1316 y 1280 cm^{-1} corresponden a la flexión -CH. Los picos a 1160 cm^{-1} , 1108 cm^{-1} , 1108 cm^{-1} , 1054 cm^{-1} y 1000 cm^{-1} se refiere a monómeros de carbohidratos conectados en un polímero con las bandas de estiramiento -COC y -CO (E. A. Hassan et al., 2015; Kumar et al., 2019b). Finalmente, las bandas pequeñas siguientes, podrían asociarse a bandas β -glicosídicas entre las unidades de azúcar de la composición de la estructura.

Figura 24

Espectro FT-IR de la biopelícula de celulosa microbiana del hongo kéfir.



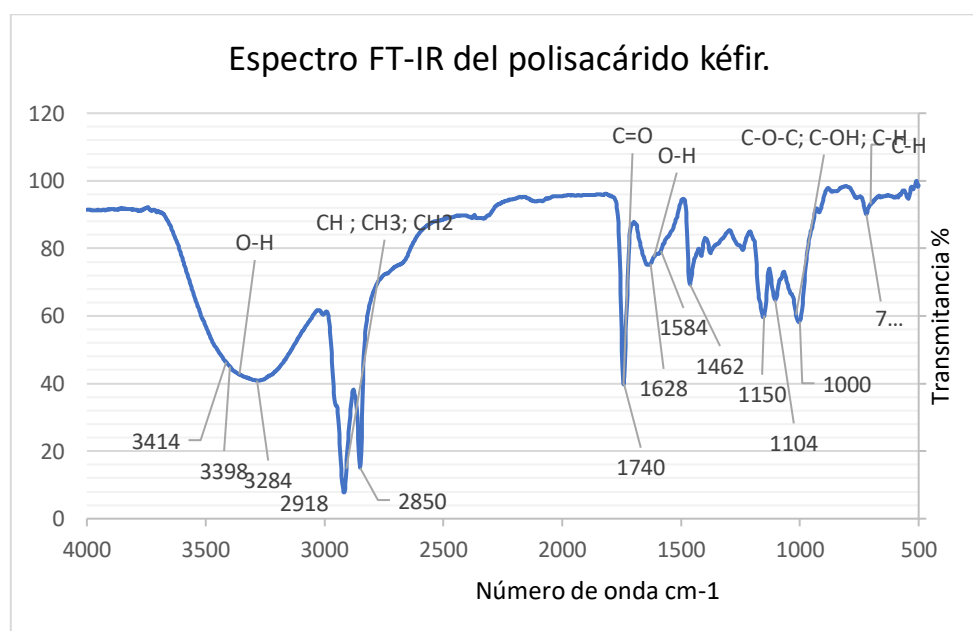
En el análisis FTIR, se ha identificado los principales grupos funcionales de la estructura de la biopelícula de celosa microbiana con glicerol, presenta bandas de absorción infrarroja a 3342 cm^{-1} , 3282 cm^{-1} y 3220 cm^{-1} se describen como picos característicos de la celulosa microbiana e indican vibraciones de estiramiento OH. Las bandas a 2920 cm^{-1} y 2848 cm^{-1} corresponde a la presencia de -CH de estiramiento y la banda a $1720, 1710$ y 1658 se refiere a -OH flexión, hace referencia al agua absorbida (Gopu & Govindan, 2018; Kumar et al., 2019a; Pacheco et al., 2017). La banda de infrarroja de $1456,74\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a la presencia de flexión -CH₂. Las regiones en torno a 1374 y 1254 cm^{-1} corresponden a la flexión -CH. Los picos a 1090 cm^{-1} , 1074 cm^{-1} , 1024 cm^{-1} se refiere a monómeros de carbohidratos conectados en un polímero con las bandas de estiramiento -COC y -CO (E. A. Hassan et al., 2015; Kumar et al., 2019b). Finalmente, las bandas pequeñas 946 cm^{-1}

siguientes, podrían asociarse a bandas β -glicosídicas entre las unidades de azúcar de la composición de la estructura.

En una evaluación comparativa, se denota que el pico en el espectro de la celulosa microbiana pura en relación al espectro de la biopelícula de celulosa presenta un desplazamiento de pico a longitudes de onda ligeramente inferiores. Los picos más pronunciados (agudos) y el incremento en la cantidad de energía absorbida, pueden atribuirse al aumento en los grupos -OH. Esta ampliación de los grupos hidroxilo es resultado de la presencia de glicerol en la matriz estructural de la celulosa microbiana coligada (Vázquez et al., 2021).

Figura 25

Espectro FT-IR del polisacárido kefiran.



En el análisis FTIR, se ha identificado los principales grupos funcionales de la estructura del polisacárido kefiran, presenta bandas de absorción infrarroja evidenciando un pico amplio a 3414 cm^{-1} a 3284 cm^{-1} se describen como una señal, correspondiente a la vibración intramolecular a

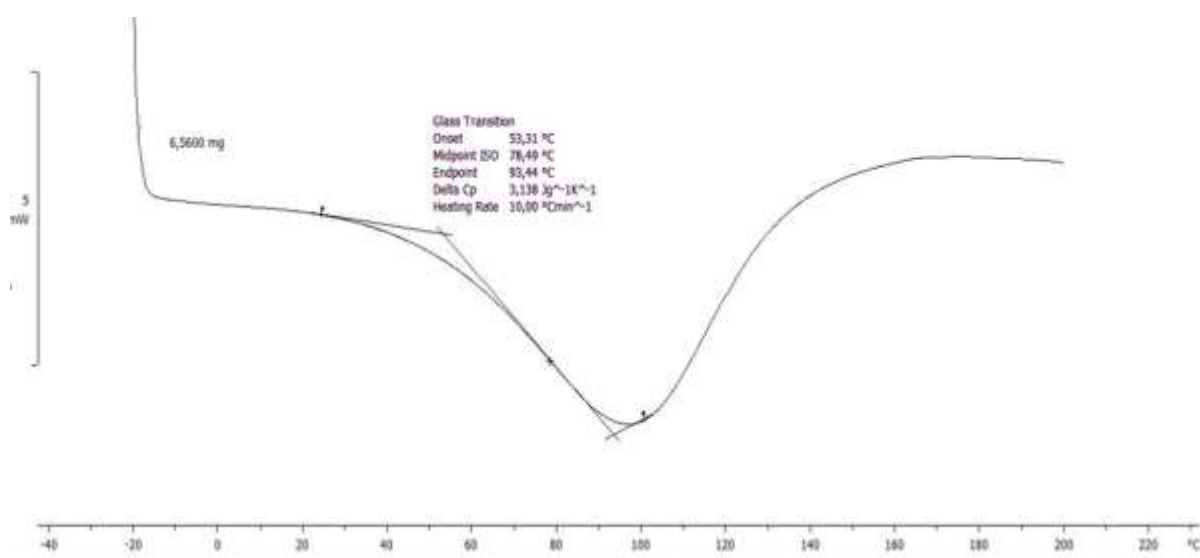
modos de estiramiento hidroxilo (OH) o enlace de hidrógeno intermolecular del polisacárido (Shahabi-Ghahfarrokhi et al., 2015). Las bandas a 2918 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} corresponde a los modos de estiramiento simétrico y antisimétrico de CH en grupos funcionales CH_3 y CH_2 de la cadena de azúcar. La banda a 1740 se refiere al estiramiento de $\text{C}=\text{O}$. La banda de infrarroja de 1628 cm^{-1} a 1584 cm^{-1} asignado al modo de flexión de OH, identificadas de moléculas de agua. Las regiones en torno a 1150 y 1000 cm^{-1} corresponde a secciones C-O-C y grupos alcohólicos en carbohidratos -COC y -CO. Finalmente, las bandas pequeñas 900 cm^{-1} a 720 cm^{-1} indican la configuración a bandas β -glicosídicas entre las unidades de azúcar de la composición de la estructura y modos de vibración de glucosa y galactosa (Marangoni Júnior et al., 2020a).

Técnicas de análisis térmico

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Figura 26

DSC de la celulosa microbiana.

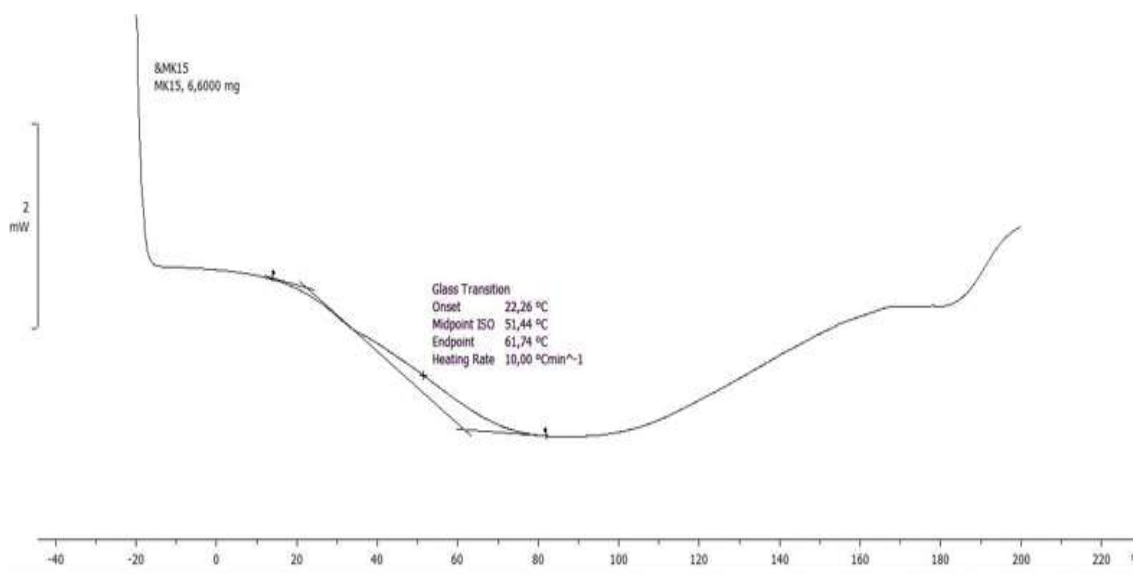


Nota. La figura 26 muestra los resultados del análisis DSC con respecto a la celulosa microbiana.

El análisis DSC de la película de celulosa microbiana del cultivo excretado, evidencia una temperatura de transición vítrea (T_g) con un valor de $93,44\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un ΔC_p de $3,138\text{ J/g} \times K$. No se registran picos en función a la temperatura de fusión cristalina (T_m) en el rango de análisis de -40 a $220\text{ }^{\circ}\text{C}$. Según (Salazar, 2021) la levada estabilidad térmica de una película de celulosa se debe a la ausencia de picos en la temperatura de fusión cristalina; es decir la cristalinidad de la cadena en la matriz polimérica conformacional se encuentra de forma compacta.

Figura 27

DSC de la biopelícula de celulosa microbiana.



Nota. La figura 27 muestra los resultados del análisis DSC con respecto a la biopelícula de celulosa microbiana MC15.

El análisis DSC de la biopelícula de celulosa microbiana, evidencia una temperatura de transición vítrea (T_g) con un valor de $61,44\text{ }^{\circ}\text{C}$. No se registran picos en función a la temperatura de fusión cristalina (T_m) en el rango de análisis de -40 a $220\text{ }^{\circ}\text{C}$. El desplazamiento de la

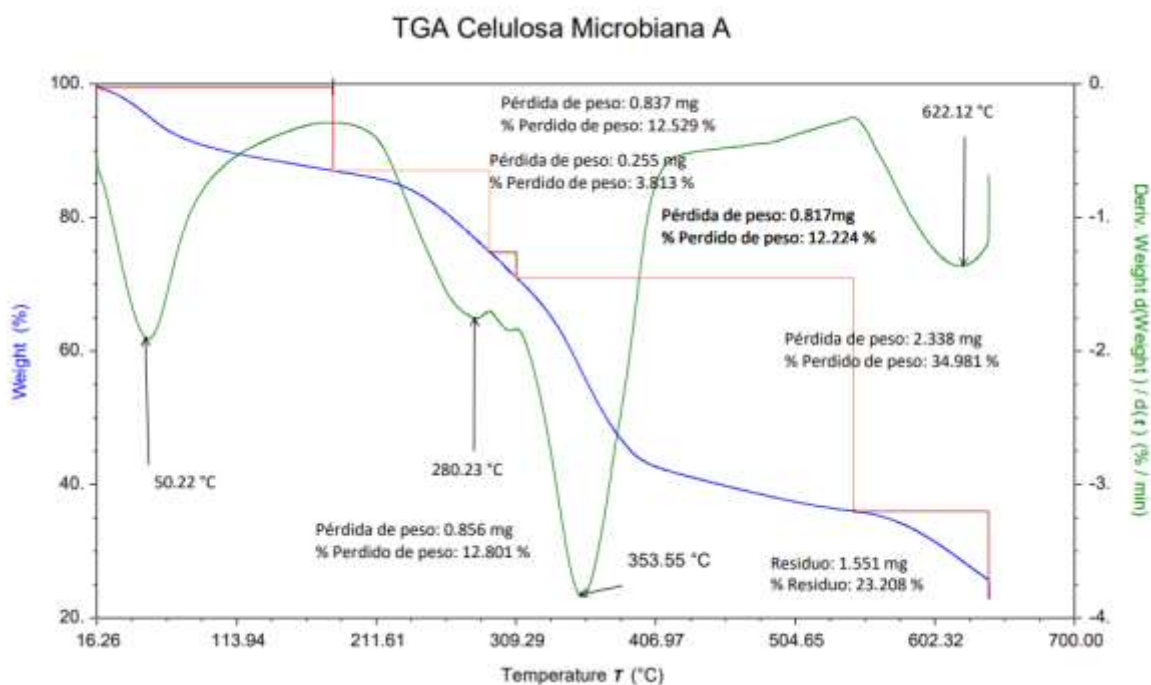
temperatura se debe a la estructura matriz del polímero debido a las interacciones entre los componentes de adición para la formación de la misma (Corsello, 2015).

Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis TGA, permite evaluar la capacidad de retención de agua y el comportamiento de descomposición térmica de la celulosa microbiana. El comportamiento de degradación térmica se encuentra afectado debido al peso molecular, la cristalinidad y orientación de las fibras de la estructura polimérica (Du et al., 2018).

Figura 28

Termograma de película de celulosa microbiana A.

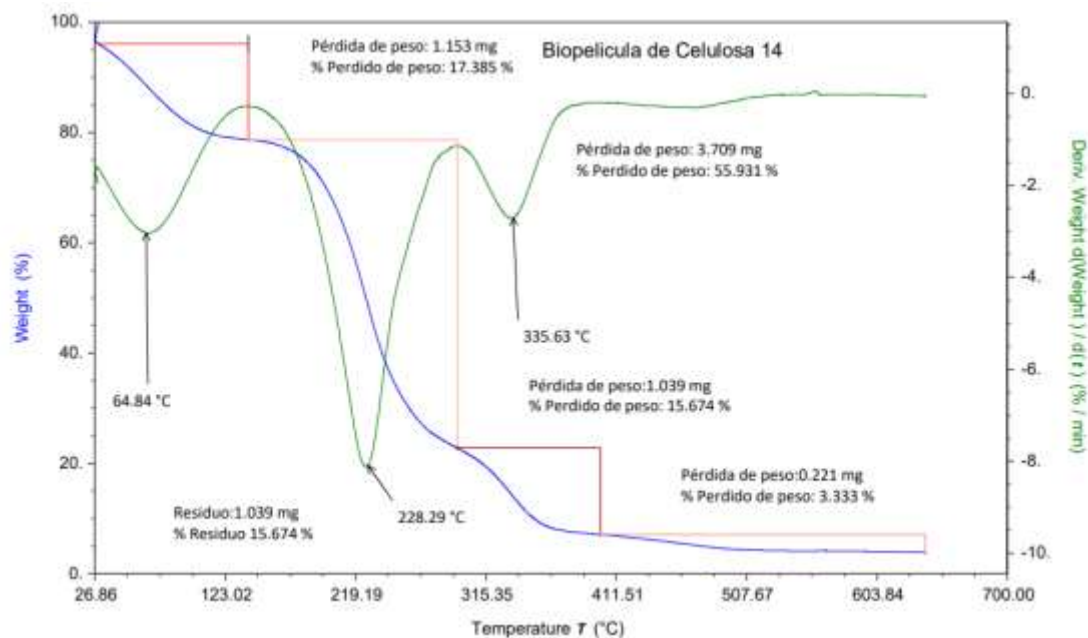


Nota. La figura presenta la gráfica TGA de la muestra de celulosa microbiana, en rango de temperatura de 16.26 °C a 700°C.

En la figura 28, se evidencian cinco etapas de degradación donde las tres primeras etapas representadas registran un porcentaje de cambio de peso del 12,529%, 3,813% y 12,224% de 16,26°C a 309,29°C corresponde a la deshidratación y evaporación del agua superficial de la película absorbida a la estructura, de tal forma perdiendo un peso inicial total de 28,566%. La cuarta etapa 34,981% de 309,29°C a 553,49°C, se atribuye a la degradación térmica a 353,55 °C, se atribuye a la despolimerización, deshidratación, descomposición de enlaces de glucosa, reordenamiento y formación de grupos carbonilo y carboxilo. Por último, la quinta etapa 12,801% de 553,49°C a 650°C, hace referencia la volatilización y oxidación de carbono (Avcioglu et al., 2021). La pérdida de peso fue de 76,348%.

Figura 29

Termograma de la biopelícula de celulosa microbiana MC14

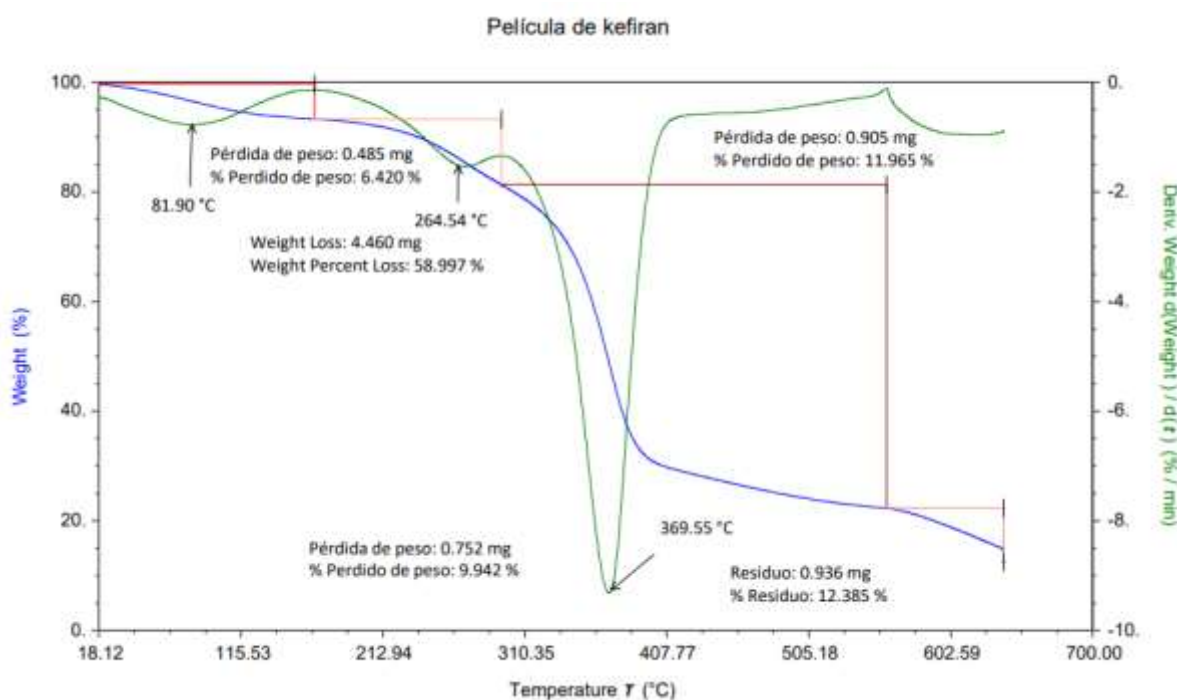


En la figura 29, se evidencian cuatro etapas de degradación, donde la primera y segunda etapa representadas registra un porcentaje de cambio de peso de 17,385% y 55,931% a 68,84°C a

228,29°C ocurriendo estas etapas 26,86°C a 309,29°C corresponde a la deshidratación y evaporación del agua superficial de la película absorbida a la estructura y glicerol. La tercera etapa 15,674% pérdida de peso de 309,29°C a 400°C, se atribuye a la despolimerización, deshidratación, descomposición de enlaces de glucosa, reordenamiento y formación de grupos carbonilo y carboxilo. Por último, la cuarta etapa 3,333% de 400°C a 650°C, hace referencia la volatilización y oxidación de carbono (Avcioglu et al., 2021).

Figura 30

Termograma de la biopelícula del polisacárido kefiran.



Nota. La figura 30 presenta la gráfica TGA de la biopelícula plastificada de kefiran, en rango de temperatura de 16.26 °C a 700°C.

En la figura 30, se identifica un evento de degradación térmica, en la primera etapa se caracteriza por una pérdida de masa del 6,420% a una temperatura de 81.90°C. Esta pérdida es

probablemente corresponde a la eliminación de agua adsorbida y ligada en la muestra (deshidratación de la muestra). En la segunda etapa ocurre la pérdida de 11,965% a 264,54°C, podría atribuirse a la degradación de la molécula de glicerol. En la tercera etapa se evidencia la caída abrupta en el peso de la muestra a 278,08 a 570,32°C la máxima descomposición 58,997% de peso ocurre a 369,55°C, tal evidente evento podría atribuirse a la degradación térmica del polisacárido kefiran. Por último, la cuarta etapa de 9,942% de 570,49°C a 650°C, hace referencia la como la deshidratación del sacárido y la despolimerización (Moradi et al., 2019).

En el análisis termogravimétrico (TGA), de la película de kefiran con plastificante glicerol presenta degradación térmica a temperaturas más reducidas que las muestras no plastificadas. La presencia de glicerol en la matriz de la película incrementa la movilidad de las cadenas; por lo cual las cadenas poliméricas sufren aún más la degradación térmica. En las muestras plastificadas con glicerol, exhiben valores de retención de agua bajos lo cual representa que la adición de plastificante reduce la fuerza de unión del agua a la estructura matriz de la película (Coma et al., 2019)

Ensayos mecánicos

Resistencia a la tracción y porcentaje de elongación

En el ensayo de tracción se desarrolló por duplicado, de tal forma se tomó únicamente las películas que presentaron el menor valor de barrera, es decir en base estudio de la permeabilidad de vapor de agua de las películas. Las películas seleccionadas para el caso de la celulosa microbiana secretada fue MA, para las biopelículas de celulosa es MK15 por último de las biopelículas de celulosa se ha tomado MK14.

Figura 31

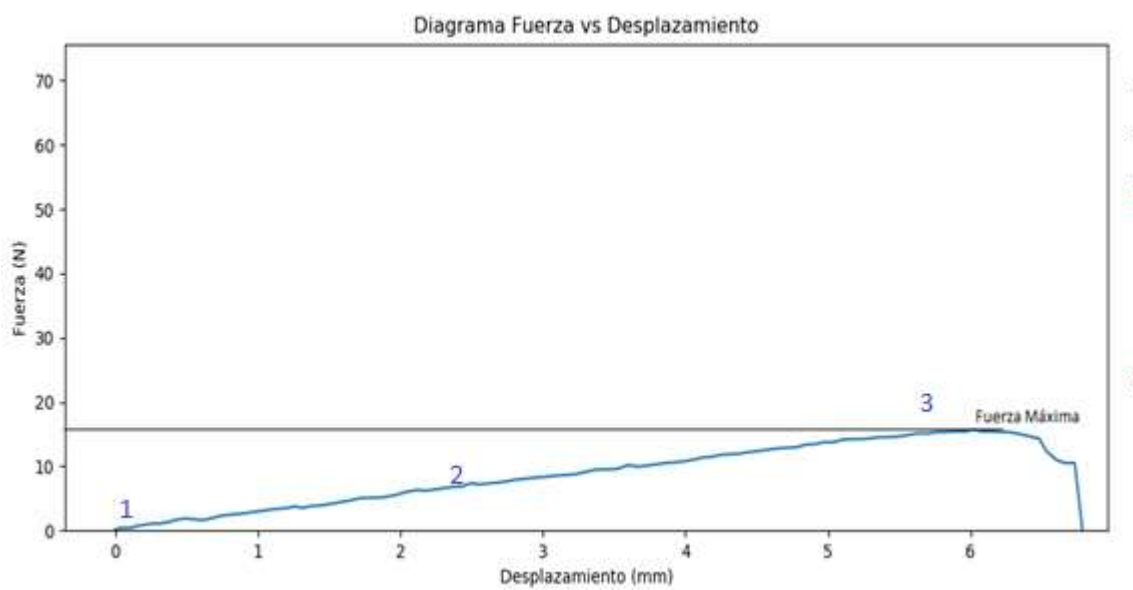
Película MC15 después del ensayo de tracción.



Nota. Ensayo de tracción para la película en la máquina universal, en función a la fuerza ejercida y desplazamiento.

Figura 32

Gráfica de resistencia a la tracción de la película MA.

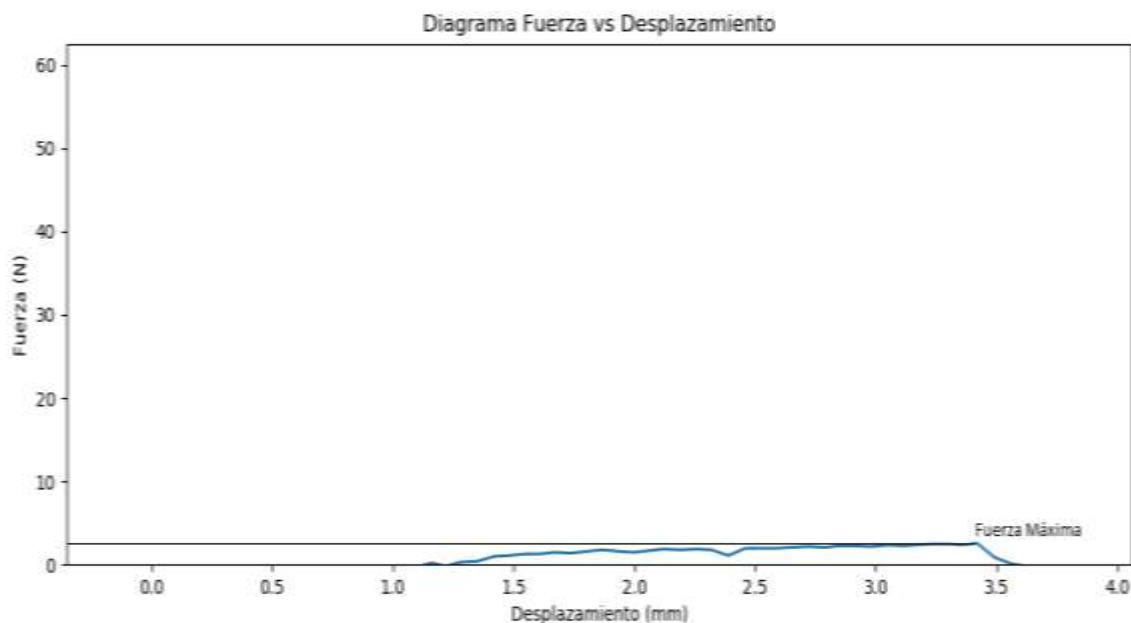


Nota. Ensayo de tracción para la película MA, en función a la fuerza ejercida y desplazamiento.

En la figura 32, se observa que la región marcada como 1 hace referencia a la deformación elástica esta sección se rige por el módulo de elasticidad de Young; en la sección 2, se produce la deformación abrupta de la probeta con la carga aplicada; en la región 3 ocurre la deformación plástica, donde al retirar la carga aplicada la probeta no vuelve a su estado inicial, es decir en este punto presenta deformación. El punto de fractura ocurre a una fuerza de 14.17 N.

Figura 33

Gráfica de resistencia a la tracción de la película MC15.



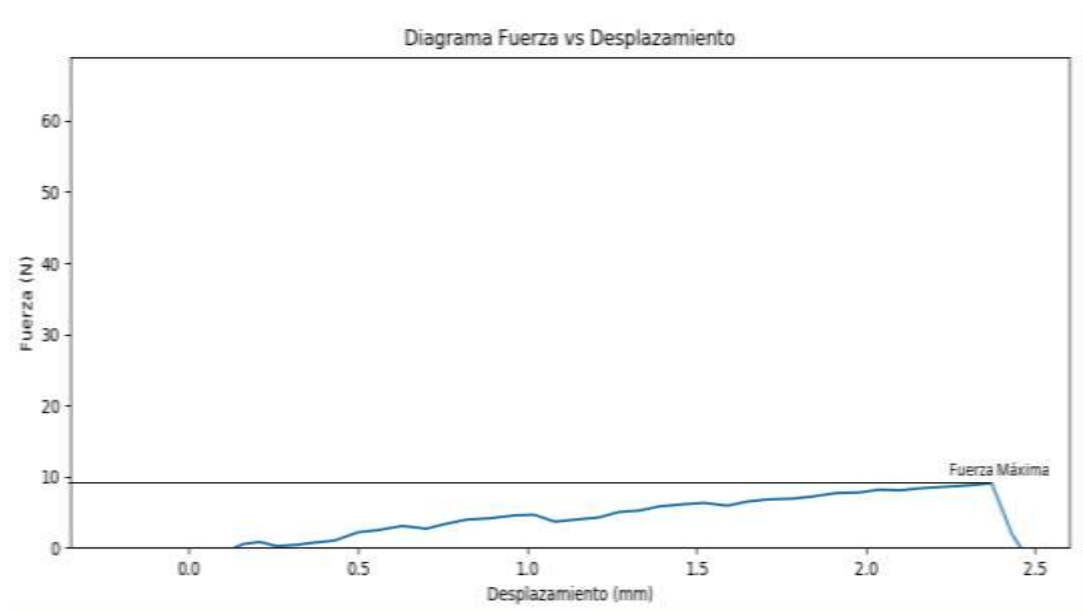
Nota. Ensayo de tracción para la película MC15 en función a la fuerza ejercida y desplazamiento.

En la figura 33, se observa que la región desplazamiento es menor en comparación a la anterior película presenta; es decir la región de endurecimiento es corta y el punto de fractura

ocurre a una fuerza aplicada de 3,69 N, la adición de CMC brindó a la película mayor elasticidad, lo cual se justifica debido a la interacción molecular entre la celulosa, CMC y glicerol.

Figura 34

Gráfica de resistencia a la tracción de la película MK15.



Nota. Ensayo de tracción para la película MK15 en función a la fuerza ejercida y desplazamiento.

En la figura 34, se observa que la región desplazamiento es menor en comparación a la anterior película MA y mayor para la película MK15; además se observa que a región de endurecimiento es corta y el punto de fractura ocurre a una fuerza aplicada de 10,57 N, la adición de kefirán y CMC brindó a la película mayor elasticidad, lo cual se justifica debido a la interacción molecular entre el kefirán, CMC y glicerol.

Tabla 20 Resultados de las pruebas mecánicas de las películas.

Código	Fuerza(N)	Elongación (%)
MA	14,17	10,1%
MC15	3,69	13,5%
MK15	10,57	11,10%

Nota. En la tabla 20, se muestra la fuerza aplicada y el porcentaje de elongación de las películas de celulosa microbiana y polisacárido kefiran.

Capítulo V

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

- Los cultivos realizados a una temperatura de 25°C con 80 gr de sacarosa en un medio de 800 mL y 25 gr cáscaras de piña que fue la fuente nitrógeno, se obtuvo valores mayores en peso de celulosa microbiana seca con un valor promedio de 1,85 g y un rendimiento total de proceso de 2,3125 %, revelando una producción baja en función al tiempo de fermentación del caldo de cultivo.
- La cantidad excreción de la celulosa en el cultivo, conserva una relación directamente proporcional con la cantidad de sacarosa y cáscaras de pinas agregadas; es decir que en cultivos con cantidades bajas de azúcar se logró cosechar cantidades insignificantes de celulosa microbiana.
- En la elaboración de las biopelículas al añadir el plastificante y el agente estabilizador CMC, incidieron en la estructura conformacional del polímero afectando sus propiedades mecánicas en una reducción de la resistencia en la rotura e incremento porcentual en la elongación, esto se debe a la reducción de enlaces de hidrógeno en las cadenas del polímero afectando la matriz inicial. Las muestras con menor cantidad de aglutinante resultaron poseer mayor tracción y menor elongación; al aplicar mayores cantidades se obtuvo un efecto inversamente proporcional a lo referenciado.
- En el análisis de espectroscopia infrarroja IR, permitió identificar los picos característicos de los componentes conformacionales de la estructura de CM evidenciando bandas típica de absorción infrarroja a 3400 cm⁻¹ , 3300 cm⁻¹ y 3234 cm⁻¹ indican picos característicos de la celulosa microbiana e indican vibraciones de estiramiento OH .Las bandas a 2846 cm-

1 , 2892 cm^{-1} y 2945.74 cm^{-1} corresponde a la presencia de CH de estiramiento y la banda a 1594 se refiere a - OH flexión, hace referencia al agua absorbida La banda de infrarrojo de 1456,74 cm^{-1} se atribuye a la presencia de flexión - CH₂. Las regiones a 1316 y 1280 cm^{-1} corresponden a la flexión - CH. Los picos a 1160 cm^{-1} , 1108 cm^{-1} , 1108 cm^{-1} , 1054 cm^{-1} y 1000 cm^{-1} se refiere a monómeros de carbohidratos conectados en un polímero con las bandas de estiramiento.

- Los parámetros característicos evaluados como el contenido de humedad y permeabilidad al vapor de agua muestran que las películas naturales de celulosa microbiana presentan menor contenido de humedad y permeabilidad que las biopelículas formadas al adicionar el plastificante y estabilizante. En el proceso de la formación de biopelículas al agregar los aditivos a la matriz de celulosa mejora en gran medida la propiedad elástica, útil para ser evaluada a aplicaciones como: recubrimiento de alimentos de humedad alta, apósitos para quemaduras debido a su alto potencial de retención de agua.
- El diseño experimental desarrollado en función del análisis de varianza para el proceso de obtención de celulosa microbiana y biopelículas, posibilita la identificación de los tratamientos deseables en función a los valores comparativos de pruebas físicas, mecánicas y estructurales.
- La búsqueda de fuentes alternativas marca una necesidad regente de la demanda de biomateriales, a partir de ello se desglosan una variedad de aplicaciones entre las más interesantes y viables partiendo de la celulosa microbiana es en el área alimenticia en el empaque de alimentos que requieran la conservación de sus características de calidad para ser ingeridas. Las fuentes renovables para la elaboración a escala industrial de

productos, significa una ganancia evidente por el impacto positivo hacia el medio ambiente y al desarrollo de nuevas vías que incluyen avances tecnológicos.

Recomendaciones

- Se recomienda activar los inóculos de kéfir, para que el cultivo inicie con éxito y se logre la secreción de la celulosa microbiana en la superficie del caldo de fermentación.
- Realizar el cultivo a una temperatura constante de 30°C, debido a que a tal temperatura el proceso de fermentación se acelera permitiendo la formación de celulosa microbiana en menor tiempo.
- Especificar las cantidades de fuente de carbono y fuente de nitrógeno para asegurar un mayor rendimiento en peso de celulosa.
- Para la formación de películas no usar cantidades excesivas de estabilizante CMC, ya que causa la reducción de parámetros de barrera al vapor de agua y propiedades mecánicas.
- Es aconsejable realizar pruebas de microscopía electrónica de barrido, con el fin de evidenciar y analizar las cualidades estructurales de la estructura de la celulosa microbiana.

Bibliografía

- Amorim, L. F. A., Mouro, C., Riool, M., & Gouveia, I. C. (2022). Antimicrobial Food Packaging Based on Prodigiosin-Incorporated Double-Layered Bacterial Cellulose and Chitosan Composites. *Polymers*, *14*(2). <https://doi.org/10.3390/POLYM14020315>
- Arbeláez, J., & Sánchez, A. (2023). *Producción de celulosa microbiana a partir de Kombucha para uso potencial en la fabricación de apósitos.*
- 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>
- Brown, E. E., & Laborie, M. P. G. (2007). Bioengineering bacterial cellulose/poly(ethylene oxide) nanocomposites. *Biomacromolecules*, *8*(10), 3074–3081. <https://doi.org/10.1021/BM700448X/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BM700448XN00001.GIF>
- Calderon, V. (2022). *Producción de celulosa por Komagataeibacter sp. SU12 usando extracto de Mangifera indica (mango) para su potencial aplicación biotecnológica.* <https://hdl.handle.net/20.500.12672/17780>
- Capa, M., Seminario Graduación, S. DE, Integrada La Calidad, G. DE, Medio Ambiente, E., & Empresarial De Proyectos En La Industria De Alimentos, A. Y. (2007). *“GESTIÓN INTEGRADA DE LA CALIDAD, EL MEDIO AMBIENTE, AMBITO EMPRESARIAL Y DE PROYECTOS EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS.”* <http://www.micip.gov.ec/utepi/Pina.pdf>,

- Chiralt, A., Menzel, C., Hernandez-García, E., Collazo, S., & Gonzalez-Martinez, C. (2020). Use of by-products in edible coatings and biodegradable packaging materials for food preservation. *Sustainability of the Food System: Sovereignty, Waste, and Nutrients Bioavailability*, 101–127. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818293-2.00006-9>
- Chulde, M. (2020). *Elaboración de una película plástica biodegradable a partir de almidón extraído de residuos de dos diferentes variedades de papas industrializadas*. <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/12058/1/UDLA-EC-TIAM-2020-11.pdf>
- Coma, M. E., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., & Salvay, A. G. (2019). Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *European Polymer Journal*, 120. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109234>
- Corsello, F. A. (2015). *“Preparación y Caracterización de Películas de Quitosano Modificadas con Nanocristales de Celulosa”* [Universidad Nacional de la Plata]. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/75371/Documento_completo.pdf-PDFA2u.pdf?sequence=1
- Cottet, C., Ramirez-Tapias, Y. A., Delgado, J. F., la Osa, O. De, Salvay, A. G., & Peltzer, M. A. (2020). Biobased materials from microbial biomass and its derivatives. *Materials*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/ma13061263>
- Cuahuizo-Huitzil, G., Santacruz-Vázquez, C., & Santacruz-Vázquez, V. (2021). A review on electrospinning technologies and their potential use in the Biomedical Industry. In *CIERMMI Women in Science Engineering and Technology TXV* (pp. 112–124). ECORFAN. <https://doi.org/10.35429/h.2021.6.112.124>

- De Moraes, J. O., Scheibe, A. S., Sereno, A., & Laurindo, J. B. (2013). Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. *Journal of Food Engineering*, 119(4), 800–808. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2013.07.009>
- Dima, S. O., Panaitescu, D. M., Orban, C., Ghiurea, M., Doncea, S. M., Fierascu, R. C., Nistor, C. L., Alexandrescu, E., Nicolae, C. A., Trica, B., Moraru, A., & Oancea, F. (2017). Bacterial Nanocellulose from Side-Streams of Kombucha Beverages Production: Preparation and Physical-Chemical Properties. *Polymers 2017, Vol. 9, Page 374, 9(8)*, 374. <https://doi.org/10.3390/POLYM9080374>
- Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients 2019, Vol. 11, Page 1806, 11(8)*, 1806. <https://doi.org/10.3390/NU11081806>
- Du, R., Zhao, F., Peng, Q., Zhou, Z., & Han, Y. (2018). Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar. *Carbohydrate Polymers*, 194, 200–207. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.04.041>
- Escobar, J. (2020). “*Elaboración y caracterización de biopelículas elaboradas con quitosano y adicionadas con partículas de almidón*” [Universidad Autónoma del estado de México]. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/109321>
- Espitia, P. J. P., Du, W. X., Avena-Bustillos, R. de J., Soares, N. de F. F., & McHugh, T. H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*, 35, 287–296. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2013.06.005>

- Farag, M. A., Jomaa, S. A., El-wahed, A. A., & El-seedi, H. R. (2020). The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 346, 12(2), 346.
<https://doi.org/10.3390/NU12020346>
- Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018a). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers*, 189, 296–303.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.02.037>
- Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018b). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers*, 189, 296–303.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.02.037>
- Gamba, R. (2015). *Estudio del potencial del kéfir como agente antifúngico*.
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/45479>
- Ganiari, S., Choulitoudi, E., & Oreopoulou, V. (2017). Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 70–82. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.08.009>
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68(4), 639–652.
<https://doi.org/10.1017/S0022029901005210>
- George, A., Sanjay, M. R., Srisuk, R., Parameswaranpillai, J., & Siengchin, S. (2020). A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their

composites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 329–338.

<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.03.120>

Gopu, G., & Govindan, S. (2018). Production of bacterial cellulose from *Komagataeibacter saccharivorans* strain BC1 isolated from rotten green grapes.

Https://Doi.Org/10.1080/10826068.2018.1513032, 48(9), 842–852.

<https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1513032>

Gorgieva, S., & Trček, J. (2019). Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/NANO9101352>

Gupta, P. K., Raghunath, S. S., Prasanna, D. V., Venkat, P., Shree, V., Chithananthan, C., Choudhary, S., Surender, K., Geetha, K., Gupta, P. K., Raghunath, S. S., Prasanna, D. V., Venkat, P., Shree, V., Chithananthan, C., Choudhary, S., Surender, K., & Geetha, K. (2019). An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. *Cellulose*.

<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.84727>

Hamburg, G. (2018). *Métodos de ensayo mecánicos Ensayo de materiales*.

Han, X., Zhang, L. J., Wu, H. Y., Wu, Y. F., & Zhao, S. N. (2018). Investigation of microorganisms involved in kefir biofilm formation. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 111(12), 2361–2370. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1125-6>

Hassan, B., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Zia, K. M., & Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International*

Journal of Biological Macromolecules, 109, 1095–1107.

<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.11.097>

Hassan, E. A., Abdelhady, H. M., Abd El-Salam, S. S., Abdullah, S. M., & Upadhyay, A. K. (2015). The Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* and *Komgataeibacter saccharovorans* under Optimized Fermentation Conditions. *Microbiology Research Journal International*, 9(3), 1–13. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/18223>

Kaewkod, T., Bovonsombut, S., & Tragoolpua, Y. (2019). Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. *Microorganisms* 2019, Vol. 7, Page 700, 7(12), 700. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7120700>

Koh, W. Y., Utra, U., Ahmad, R., Rather, I. A., & Park, Y. H. (2018). Evaluation of probiotic potential and anti-hyperglycemic properties of a novel *Lactobacillus* strain isolated from water kefir grains. *Food Science and Biotechnology*, 27(5), 1369–1376. <https://doi.org/10.1007/S10068-018-0360-Y/METRICS>

Kumar, V., Sharma, D. K., Bansal, V., Mehta, D., Sangwan, R. S., & Yadav, S. K. (2019a). Efficient and economic process for the production of bacterial cellulose from isolated strain of *Acetobacter pasteurianus* of RSV-4 bacterium. *Bioresource Technology*, 275, 430–433. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.12.042>

Kumar, V., Sharma, D. K., Bansal, V., Mehta, D., Sangwan, R. S., & Yadav, S. K. (2019b). Efficient and economic process for the production of bacterial cellulose from isolated strain of *Acetobacter pasteurianus* of RSV-4 bacterium. *Bioresource Technology*, 275, 430–433. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.12.042>

Lei, W., Jin, D., Liu, H., Tong, Z., & Zhang, H. (2020). An Overview of Bacterial Cellulose in Flexible Electrochemical Energy Storage. *ChemSusChem*, 13(15), 3731–3753.

<https://doi.org/10.1002/CSSC.202001019>

Ma, L., Bi, Z., Xue, Y., Zhang, W., Huang, Q., Zhang, L., & Huang, Y. (2020). Bacterial cellulose: An encouraging eco-friendly nano-candidate for energy storage and energy conversion. *Journal of Materials Chemistry A*, 8(12), 5812–5842. <https://doi.org/10.1039/C9TA12536A>

Marangoni Júnior, L., Vieira, R. P., & Anjos, C. A. R. (2020a). Kefiran-based films: Fundamental concepts, formulation strategies and properties. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 246). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116609>

Marangoni Júnior, L., Vieira, R. P., & Anjos, C. A. R. (2020b). Kefiran-based films: Fundamental concepts, formulation strategies and properties. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 246). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116609>

METTER, T. (2008). *Métodos de aplicación Analizador de humedad HB43-S*.

https://www.mt.com/mt_ext_files/Editorial/Generic/4/HB43_S_Application_Methods_Operating_instruction_Editorial-Generic_1175244336873_files/HB43-S-Methoden-BA-sp-11780981.pdf

Molina, A. B., & Flórez-Castillo, J. M. (2020). *Biopolímeros como sistemas de bioencapsulación*. 14–16. <https://doi.org/DOI: 10.13140/RG.2.2.19521.17767/1>

Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., & Ramírez-Cárdenas, L. (2014). Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. *ACI Avances En Ciencias e Ingenierías*, 6(1). <https://doi.org/10.18272/ACI.V6I1.160>

- Moradi, Z., Esmaili, M., & Almasi, H. (2019). Development and characterization of kefiran - Al₂O₃ nanocomposite films: Morphological, physical and mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *122*, 603–609. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.10.193>
- Naz, S., Ali, J. S., & Zia, M. (2019). Nanocellulose isolation characterization and applications: a journey from non-remedial to biomedical claims. *Bio-Design and Manufacturing*, *2*(3), 187–212. <https://doi.org/10.1007/S42242-019-00049-4>
- Neera, Ramana, K. V., & Batra, H. V. (2015). Occurrence of Cellulose-Producing Gluconacetobacter spp. in Fruit Samples and Kombucha Tea, and Production of the Biopolymer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *176*(4), 1162–1173. <https://doi.org/10.1007/S12010-015-1637-8>
- Nielsen, S. S. (2010). *Determination of Moisture Content*. 17–27. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_3
- Nozaka, S., Furukawa, S., Sasaki, M., Hirayama, S., Ogihara, H., & Morinaga, Y. (2013). *Manganese Ion Increases LAB-yeast Mixed-species Biofilm Formation*.
- Pacheco, G., Nogueira, C. R., Meneguim, A. B., Trovatti, E., Silva, M. C. C., Machado, R. T. A., Ribeiro, S. J. L., da Silva Filho, E. C., & da S. Barud, H. (2017). Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source. *Industrial Crops and Products*, *107*, 13–19. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.05.026>

- Paucar, L., & Gabriela, A. (2020). *Evaluación del potencial probiótico de un suplemento alimenticio de Kombucha (Manchurian fungus) y Kéfir en la tasa de crecimiento y salud intestinal de pollos Broiler*. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/22796/1/T-ESPE-043998.pdf>
- Piermaria, J. A., Pinotti, A., Garcia, M. A., & Abraham, A. G. (2009). Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 684–690. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.05.003>
- Ramírez Tapias, Y. A., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., & Salvay, A. G. (2020). Kombucha Tea By-product as Source of Novel Materials: Formulation and Characterization of Films. *Food and Bioprocess Technology*, 13(7), 1166–1180. <https://doi.org/10.1007/S11947-020-02471-4>
- Rimada, P. S., & Abraham, A. G. (2001). Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, 68(4), 653–661. <https://doi.org/10.1017/S0022029901005131>
- Salazar, D. (2021a). *Caracterización del proceso de polimerización de a resina DGEBA utilizando análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)* [Universidad de Pamplona]. http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/bitstream/20.500.12744/5476/1/Salazar_2021_TG.pdf
- Salazar, D. (2021b). *CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE POLIMERIZACIÓN DE LA RESINA DGEBA UTILIZANDO ANÁLISIS TERMOGRAVIMETRICO (TGA) Y CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)* [Universidad de Pamplona]. http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/bitstream/20.500.12744/5476/1/Salazar_2021_TG.pdf

- Shahabi-Ghahfarrokhi, I., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Yousefi, H. (2015). Effect of γ -irradiation on the physical and mechanical properties of kefiran biopolymer film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.038>
- Sorrentino, A., Gorrasi, G., & Vittoria, V. (2007). Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 18, Issue 2, pp. 84–95). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.004>
- Trejo, V., Aragón, N., & Miranda, P. (2001). Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán. *Revista de La Sociedad Química de México*, 45(1), 1–5.
- 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(7), 14832–14849. <https://doi.org/10.3390/ijms160714832>
- Ullah, M. W., Manan, S., Kiprono, S. J., Ul-Islam, M., & Yang, G. (2019). Synthesis, structure, and properties of bacterial cellulose. *Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Materials*, 81–113. <https://doi.org/10.1002/9783527807437.CH4>
- Zhong, C. (2020). Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>

Anexos