



TESIS DOCTORAL

**OBTENCIÓN Y ESTERIFICACIÓN SOSTENIBLE DE  
NANOCELULOSA BACTERIANA PARA USOS QUE  
REQUIEREN REGULAR LA POLARIDAD DE LAS  
NANOFIBRAS**

AUTOR

**LIC. JHON ALEJANDRO ÁVILA RAMÍREZ**

DIRECTOR DE TESIS

**DRA. MARÍA LAURA FORESTI – ITPN (UBA- CONICET)**

CODIRECTOR DE TESIS

**DRA. MARÍA INÉS ERREA- CIMA (ITBA)**

LUGAR DE TRABAJO

**CENTRO DE INGENIERÍA DE MEDIO AMBIENTE (CIMA)-  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA-INSTITUTO  
TECNOLÓGICO DE BUENOS AIRES (ITBA)**

**INSTITUTO DE TECNOLOGÍA EN POLÍMEROS Y NANOTECNOLOGÍA  
(ITPN-UBA-CONICET)**

BUENOS AIRES, MARZO DE 2019



Este Trabajo de Tesis es presentado como requisito final para optar al Grado Académico de Doctor en Ingeniería del Instituto Tecnológico de Buenos Aires. Las investigaciones realizadas se llevaron a cabo en el Centro de Ingeniería del Medio Ambiente (CIMA) del Departamento de Ingeniería Química del Instituto Tecnológico de Buenos Aires (ITBA) y en el Instituto de Tecnología en Polímeros y Nanotecnología (ITPN) dependiente de la Universidad de Buenos Aires (UBA) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el periodo comprendido entre el 1 de abril de 2014 y el 26 de marzo del 2019, bajo la dirección de la Dra. Ing. María Laura Foresti y la codirección de la Dra. María Inés Errea.



*A mi DIOS*

*A mi amada esposa Sandra Guerrero*

*A mi hija Valery Ávila*

*A mi madre Consuelo Ramírez*

*A mis hermanos Stiven, Linda Yineth, Juan David y Laura Camila.*



# Agradecimientos

A mi DIOS por el cumplimiento de una promesa más, quien me ha formado, guiado, fortalecido y dado todo lo que hoy soy y tengo. No hay ni una de sus palabras que hoy no sean realidad, será mi vida entera la forma de agradecerle.

A la Dra. María Laura Foresti por su paciencia y apoyo constante como mi directora de Tesis de doctorado. Gracias por responder mi e-mail hace 5 años y darme la oportunidad, por guiarme desde tantos kilómetros de distancia para solicitar la beca, por apoyarme de múltiples maneras para que tuviera estabilidad al comenzar, por recibirme y ayudarme a adaptarme a la Argentina, por tantas enseñanzas y consejos, por todo lo aprendido y profundizado, por acompañarme en momentos trascendentales de cambio durante el doctorado, por su ayuda constante en la escritura de papers y la Tesis, pero sobre todo por su excelente calidad profesional que permiten culminar la presente Tesis. Muchas gracias.

A mi codirectora Dra. María Inés Errea, por abrirme las puertas en su grupo de trabajo cuando más lo necesité, por el acompañamiento y el esfuerzo puesto en el tema de investigación, por las gestiones importantísimas que aportaron mucho a la Tesis, por su amplia visión química de nuestro trabajo, por sus recomendaciones permanentes en cuanto a la escritura, y sobre todo por la comprensión y el interés de formarme para la defensa de la presente Tesis.

A la Dra. Patricia Cerrutti, por toda la buena disposición para contribuir a esta Tesis, por brindarme el entrenamiento necesario para aprender a producir la nanocelulosa bacteriana y por las grandes cantidades de celulosa facilitada a lo largo de todos estos años, sin ello no hubiera sido posible desarrollar todo este trabajo.

A la Dra. Celina Bernal, por todo lo enseñado en cuanto a las propiedades mecánicas y térmicas de nuestros materiales compuestos, gracias por su

asesoramiento y trabajo constante que contribuyó ampliamente a la culminación de esta Tesis.

Al Instituto de Tecnología en Polímeros y Nanotecnología (ITPN) dirigido por la Dra. Analía Vázquez por permitirme trabajar en sus instalaciones y hacer uso sin limitación de todos los equipos de caracterización.

Al CONICET por su apoyo financiero con la asignación de la beca para estudios de doctorado comprendida entre el 1 de abril del 2014 y el 31 de marzo del 2019.

Al Instituto Tecnológico de Buenos Aires (ITBA) por ser mi casa de estudios y recibirme en sus listas académicas, siempre será un honor llevar el nombre ITBA en mi formación.

Al Dr. Juan Pablo Morales por ser un gran amigo y hermano, y por pensar en mí para recomendarme, desde allí se gestaron todos estos resultados.

A la Mg. Maribel Tupa mi compañera de Tesis de doctorado, quién siempre me acompañó desde el principio al final de la Tesis durante estos 5 años con importantes aportes. Juntos culminamos una etapa importante de muchos esfuerzos y sacrificios que llega término con la defensa de nuestras Tesis.

Al Ing. Pablo Covicchioni quien desde que llegue al ITBA se ha esmerado por apoyarme y hacer gestiones logísticas importantes para facilitar mi trabajo.

A todo el grupo del ITPN en general y en particular al grupo de Biotecnología y Biosíntesis (Maribel, Ema, Jimena, Victoria, Úrsula, Luz, y todos los becarios de grado que han pasado), por ser un excelente grupo de trabajo y estar siempre dispuestos a apoyar en los mejores y peores momentos.



Al grupo del CIMA en el ITBA dirigido por el Dr. Jorge Stripeikis (Pablo, Ezequiel, Laura, Guillermina, Vergenie, Jorge, Ivana y demás estudiantes de ingeniería) por recibirme, apoyarme y facilitar todo para poder trabajar sin que faltara nada. Gracias por el buen ambiente y el compañerismo.

A la Dra. María Luisa Piraquive quien ha sido mi maestra toda la vida, desde la edad de 12 años me ha enseñado a amar a DIOS, a ser una mejor persona y a prepararme para servir a DIOS, fruto de ello es este doctorado que culmina al defender esta tesis.

A mi amada esposa Sandra Guerrero, por llegar en el momento indicado para ser mi apoyo, ayuda, compañera, amiga, cómplice, mi complemento perfecto. Gracias por el amor diario que me alentaba a salir cada mañana a dar lo mejor de mí, a tu paciencia y comprensión, dejaste muchas cosas para estar aquí a mi lado, pero sé que tendrás grandes recompensas.

A mi hija Valery Ávila, quien llegó a mi vida para ser el motor de grandes luchas, entre ellas poder culminar este doctorado, gracias porque tu amor e inocencia llenaban cada día de estudio y ciencia, de esa tranquilidad inimaginable que transmiten tus sonrisas

A mi madre, Consuelo Ramírez quien ha dado su vida completa para sacarnos adelante demandando de ti luchas y sacrificios, pero gracias a DIOS lo lograste. Gracias por el esfuerzo, la valentía, la lucha, no fue fácil dejarte hace 5 años en Colombia para alcanzar este logro académico, pero aún desde la distancia seguiste siendo ese apoyo incondicional.

A mis hermanos Stiven, Linda Yineth, Juan David y Laura Camila, quienes también a su corta edad fueron valientes a la despedida, siempre les agradeceré su cariño constante. Mi alegría siempre será verlos triunfar durante toda la vida.



# Producción científica

## Publicaciones en revistas indexadas

**Ávila Ramírez, J. A.**, Cerrutti, P., Bernal, C., Errea, M. I., Foresti, M. L. Nanocomposites based on poly(lactic acid) and bacterial cellulose acetylated by an  $\alpha$ -hydroxy acid catalyzed route. *Journal of Polymers and the Environment*, 2019, 27, 510–520.

**Ávila Ramírez, J. A.**, Fortunati, E., Kenny, J. M., Torre, L., Foresti, M. L. Simple citric acid-catalyzed surface esterification of cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 157, 1358–1364.

**Ávila Ramírez, J. A.**, Gómez Hoyos, C., Arroyo, S., Cerrutti, P., Foresti, M. L. Acetylation of bacterial cellulose catalyzed by citric acid: Use of reaction conditions for tailoring the substitution degree. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 153, 686–695.

**Ávila Ramírez, J. A.**, Gómez Hoyos, C., Arroyo, S., Cerrutti, P., Foresti, M. L. Naturally occurring  $\alpha$ -hydroxy acids: Useful organocatalysts for the acetylation of cellulose nanofibres. *Current Organocatalysis*, 2016, 3, 161–168.

Foresti, M. L., Tupa, M. V., **Ávila Ramírez, J. A.**, Cerrutti, P., Vázquez, A. Acetilación sostenible de biopolímeros mediada por un  $\alpha$ -hidroxiácido de origen natural. *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*, 2014, 66, 65–73.

**Ávila Ramírez, J. A.**, Juan Suriano, C., Cerruti, P., Foresti, M. L. Surface esterification of cellulose nanofibers by a simple organocatalytic methodology. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 114, 416–423.

## Participación en congresos

**Ávila Ramírez, J. A.**, Cerrutti, P., Bernal, C., Errea, M. I., Foresti, M. L. Nanocomposites based on poly(lactic acid) and bacterial cellulose by an  $\alpha$ -hydroxy acid catalyzed route. *XVI Simposio Latinoamericano de Polímeros*, Mar del Plata Buenos Aires, 6 al 9 de noviembre de 2018. (PÓSTER).

Tupa, M., **Ávila Ramírez, J. A.**, Cavallo, E., Cerrutti, P., Errea, M. I., Herrera, M. L., Foresti, M. L. Esterification of polysaccharides catalyzed by naturally occurring  $\alpha$ -hydroxy acids”, *5th EPNOE International polysaccharide conference*, Jena, Alemania, 20 al 24 de agosto de 2017. (ORAL).

**Ávila Ramírez, J. A.**, Fortunati, E., Kenny, J. M., Torre, L., Errea, M. I., Foresti, M. L. Esterificación superficial de nanocristales de celulosa catalizada por ácido cítrico. *XII Simposio Argentino de Polímeros*, Córdoba, 18 al 20 de octubre de 2017. (PÓSTER).

**Ávila Ramírez, J. A.**, Cerrutti, P., Errea, M. I., Foresti, M. L. Hidrofobización organocatalítica de nanofibras de celulosa para aplicaciones en materiales compuestos biodegradables. *VII Jornadas de Ingeniería Química Sustentable*, Villa Dominico Buenos Aires, 27 al 29 de septiembre de 2017. (ORAL).

**Ávila Ramírez, J. A.**, Cerrutti, P., Errea, M. I., Foresti, M. L. Hidrofobización organocatalítica de nanofibras y nanocristales de celulosa para aplicaciones en materiales compuestos biodegradables. *6to Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales*, San Martín Buenos Aires, 17 al 18 de agosto de 2017. (PÓSTER).

Cerrutti, P., **Ávila Ramírez, J. A.**, Vázquez, A., Foresti, M. L. Nanocelulosa bacteriana: producción y derivatización. *I Workshop Italo-Argentino en Nanotecnología de Materiales Poliméricos y Compuestos*, Buenos Aires, 14 al 15 de noviembre de 2016. (ORAL).

**Ávila Ramírez, J. A.**, Gómez Hoyos, C., Cerrutti, P., Foresti, M. L. Organocatalytic esterification of bacterial cellulose nanoribbons using citric acid as catalyst. *II Workshop Polímeros Biodegradables y Biocompuestos*, Buenos Aires, 11 al 13 de noviembre de 2015. (PÓSTER).

**Ávila Ramírez, J. A.**, Gómez Hoyos, C., Arroyo, S., Cerrutti, P., Foresti, M. L. Acetilación no convencional de nanofibras de celulosa catalizado por  $\alpha$ -hidroxiácidos de origen natural. *XI Simposio Argentino de Polímeros*, Santa Fe, 20 al 23 de octubre de 2015. (PÓSTER).

**Ávila Ramírez, J. A.**, Cerrutti, P., Vázquez, A., Foresti, M. L. Production and sustainable hydrophobization of bacterial cellulose. *Second International conference on thermoplastic polymers*, San Petersburgo, Rusia, 15 al 17 de octubre de 2015. (ORAL).

Juan Suriano, C., **Ávila Ramírez, J. A.**, Cerrutti, P., Vázquez, A., Foresti, M. L. Esterificación de nanocelulosa bacteriana por vía organocatalítica. *Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales SAM-CONAMET / IBEROMAT*, Santa Fe, 21 al 24 de agosto de 2014. (PÓSTER).



# Resumen

## OBTENCIÓN Y ESTERIFICACIÓN SOSTENIBLE DE NANOCELULOSA BACTERIANA PARA USOS QUE REQUIEREN REGULAR LA POLARIDAD DE LAS NANOFIBRAS

El trabajo realizado en el marco de la presente Tesis se centró en evaluar la utilidad de una metodología novedosa de acetilación para la hidrofobización de nanofibras de celulosa bacteriana (BNC). En el curso del estudio, la ruta se extendió a otras formas de nanocelulosa, como son las membranas enteras de BNC y los nanocristales de celulosa de origen vegetal (CNC). La aplicación concreta pensada para las nanocelulosas modificadas fue su utilización como refuerzo de una matriz polimérica biodegradable hidrofóbica de interés comercial como es el ácido poliláctico (PLA). El objetivo final del trabajo fue obtener materiales compuestos biodegradables con propiedades mejoradas que dependen en gran medida de la eficacia con que se haya logrado la compatibilización entre refuerzo y matriz.

El Trabajo de Tesis se organizó de la siguiente manera:

En el **Capítulo 1 –Introducción** – se describen las características más relevantes y las fuentes de celulosa y de nanocelulosas, con especial énfasis en las propiedades y aplicaciones de la nanocelulosa de origen bacteriano. Posteriormente, se hace una breve recopilación de las diferentes metodologías que han sido propuestas para la hidrofobización de nanofibras de celulosa, particularmente mediante reacciones de esterificación. Entre ellas se describe la esterificación de celulosa mediada por  $\alpha$ -hidroxiácidos de origen natural en condiciones relativamente suaves de reacción y sin cosolventes agregados, cuya utilidad para hidrofobizar nanocelulosas es objeto de estudio en esta Tesis. El Capítulo finaliza con una introducción a los materiales poliméricos biodegradables, y una recopilación de antecedentes sobre el uso de nanocelulosas hidrofobizadas como refuerzo de matrices poliméricas biodegradables hidrofóbicas como es el PLA. Se presentan también los objetivos de la Tesis.

En el **Capítulo 2** – *Experimental* – se detallan los materiales y las metodologías utilizadas para la obtención de las nanocelulosas, su posterior acetilación organocatalítica en diferentes condiciones, y la preparación de materiales compuestos biodegradables de matriz de PLA reforzados con las nanocelulosas modificadas. Se resume también la diversidad de técnicas utilizadas a lo largo de esta Tesis para caracterizar los sustratos nanocelulósicos, las nanocelulosas modificadas y los materiales compuestos obtenidos.

En el **Capítulo 3** – *Estudio exploratorio de la acetilación de nanocelulosa bacteriana catalizada por  $\alpha$ -hidroxiácidos* – se presentan los resultados de un primer estudio exploratorio dedicado a testear la capacidad de tres ácidos orgánicos de origen natural (ácido láctico, ácido (L)-tartárico y ácido cítrico) para promover la incorporación de grupos acetilo en las nanofibras de celulosa bacteriana y reducir su polaridad. Los productos se caracterizaron por diversas técnicas que permitieron elegir el  $\alpha$ -hidroxiácido que se utilizó en los ensayos subsiguientes (ácido cítrico).

En el **Capítulo 4** – *Acetilación de BNC catalizada con ácido cítrico: Estudio de variables de proceso* – se presenta la evaluación del efecto de las diversas variables del proceso con el que se llevó adelante la acetilación de la BNC (preacondicionamiento de sustratos, condiciones de reacción seleccionadas, escala del sistema) sobre el grado de sustitución (GS) conferido a las nanofibras usando ácido cítrico como catalizador. Este estudio permitió evaluar la versatilidad de la ruta propuesta para modular las propiedades de los productos.

En vistas de los resultados obtenidos utilizando nanofibras de BNC como sustrato, en el **Capítulo 5** – *Extensión de la acetilación organocatalítica a otros sustratos nanocelulósicos* – se presentan los estudios realizados para evaluar la posibilidad de extender la ruta de acetilación a la hidrofobización de membranas enteras de BNC y nanocristales de celulosa de origen vegetal en condiciones previamente optimizadas.



Finalmente, en el **Capítulo 6** – *Nanocompuestos PLA/BNC acetilada* – se plantea el uso de las BNC acetiladas como refuerzo de una matriz de PLA, evaluándose puntualmente el efecto del nivel de acetilación conferido a la BNC y del contenido de refuerzo en propiedades seleccionadas de los materiales compuestos obtenidos.

En el **Capítulo 7** – *Conclusiones*– se resumen las conclusiones generales de la Tesis y se proponen estudios futuros derivados del presente trabajo.

# Abstract

## OBTENTION AND SUSTAINABLE ESTERIFICATION OF BACTERIAL CELLULOSE FOR USES THAT REQUIRED REGULATION OF NANOFIBERS POLARITY

The research performed in the context of the current Thesis was focused on evaluating the suitability of a novel acetylation methodology for the hydrophobization of bacterial nanocellulose (BNC). During the current study, the route was also extended to other nanocellulose forms, such as native BNC pellicles and cellulose nanocrystals of vegetable origin (CNC). The specific application thought for the modified nanocelluloses was their use as reinforcement of a biodegradable hydrophobic polymeric matrix of commercial interest such as poly(lactic acid) (PLA). The final aim of the work performed was to obtain biodegradable composite materials with improved properties which depend on a great extent on the effectiveness of the compatibilization between the reinforcement and the matrix accomplished.

The Thesis contribution was organized as it is described below:

In **Chapter 1 – Introduction** – the most relevant characteristics and the sources of cellulose and nanocelluloses are described, with special focus on the properties and applications of bacterial nanocellulose. Then, a brief revision on the different methodologies which have been proposed for nanocelluloses hydrophobization, mainly by esterification reactions, is included. Among them, the esterification of cellulose mediated by  $\alpha$ -hydroxy acids of natural origin under relatively mild reaction conditions and without cosolvents addition, whose feasibility for nanocelluloses hydrophobization is the aim of this Thesis, is described. The Chapter ends with an introduction to biodegradable polymeric materials, followed by a revision on the state of the art of the use of hydrophobized nanocelluloses as reinforcement of

biodegradable hydrophobic polymeric matrices such as PLA. The aims of the current Thesis are also presented.

In **Chapter 2 – Experimental** – the materials and methods used for the production of nanocelluloses, their organocatalytic acetylation under different conditions, and the preparation of biodegradable composite materials of PLA reinforced with the modified nanocelluloses, are detailed. The variety of techniques used during this Thesis to characterize the nanocellulosic substrates, the modified nanocelluloses, and the composite materials prepared are also summarized.

In **Chapter 3 – Screening study of the acetylation of bacterial nanocellulose catalyzed by  $\alpha$ -hydroxy acids** – the results of a screening study devoted to assay the ability of three organic acids of natural origin (lactic acid, (L)-tartaric acid and citric acid) to promote the incorporation of acetyl groups on bacterial cellulose nanofibers and reduce their polarity are summarized. Products were characterized by different techniques which allowed the selection of the  $\alpha$ -hydroxy acid to be used in the following studies (citric acid).

In **Chapter 4 – Acetylation of BNC catalyzed by citric acid: Process variables study** – the effect of different process variables of BNC acetylation (substrates preconditioning, chosen reaction conditions, system scale) on the degree of substitution (DS) conferred to cellulose nanofibers using citric acid as catalyst were analyzed. The described study allowed evaluating the versatility of the route proposed to modulate the products properties.

In view of the results obtained using BNC as substrate, in **Chapter 5 – Extension of the organocatalytic acetylation to other nanocellulosic substrates** – studies devoted to assay the feasibility of extending the acetylation route to the hydrophobization of BNC pellicles and cellulose nanocrystals of vegetable origin under previously optimized conditions are described.

Finally, in **Chapter 6** – *PLA/acetylated BNC nanocomposites* – the use of acetylated BNC as reinforcement of PLA is proposed and the effect of the acetylation extent conferred to BNC, as well as the reinforcement content on chosen properties of the composite materials, were particularly assayed.

In **Chapter 7** – *Conclusions* – general conclusions drawn from the work performed and future studies derived from it are summarized.

# Índice general

<b>1. Introducción general y objetivos .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Celulosa.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Definición y estructura química.....	3
1.1.2 Estructura cristalina .....	5
1.1.3 Organización jerárquica de la celulosa .....	8
1.1.4 Fuentes de celulosa .....	10
<b>1.2 Nanocelulosa .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Nanocristales de celulosa .....	13
1.2.2 Nanofibrillas de celulosa .....	13
<b>1.3 Nanocelulosa bacteriana .....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Obtención y propiedades .....	14
1.3.2 Aplicaciones .....	16
<b>1.4 Metodologías de hidrofobización de nanocelulosa.....</b>	<b>18</b>
1.4.1 Adsorción de surfactantes.....	18
1.4.2 Grafting .....	19
1.4.3 Reacciones de esterificación .....	21
<b>1.5 Materiales compuestos biodegradables .....</b>	<b>24</b>
1.5.1 Definición .....	25
1.5.2 Matrices poliméricas biodegradables .....	26
1.5.2.1 Ácido poliláctico (PLA) .....	27
1.5.3 Nanocompuestos de matriz polimérica de PLA .....	29
1.5.3.1 Procesamiento de nanocompuestos PLA/Nanocelulosa .....	30
1.5.3.2 Algunos ejemplos del uso de nanocelulosa como fase de refuerzo del PLA .....	31
<b>1.6 Objetivos de la Tesis .....</b>	<b>33</b>
1.6.1 Objetivo general .....	33
1.6.2 Objetivos específicos .....	33
<b>1.7 Bibliografía del Capítulo 1 .....</b>	<b>34</b>

<b>2. Experimental .....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Consideraciones generales.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2 Obtención de nanocelulosas .....</b>	<b>43</b>
2.2.1 Producción de nanocelulosa bacteriana (BNC) .....	43
2.2.2 Producción de nanocristales de celulosa de origen vegetal (CNC) .....	44
<b>2.3 Acetilación de nanocelulosa catalizada por <math>\alpha</math>-hidroxiácidos .....</b>	<b>45</b>
2.3.1 Preacondicionamiento del material para la reacción de esterificación .....	45
2.3.2 Reacción de acetilación de nanocelulosas .....	46
2.3.2.1 Acetilación de suspensiones de BNC .....	46
2.3.2.2 Acetilación de CNC .....	47
2.3.2.3 Acetilación de membranas enteras de BNC .....	47
2.3.3 Recuperación de productos .....	48
<b>2.4 Preparación de materiales compuestos biodegradables (PLA/Nanocelulosa) .....</b>	<b>48</b>
<b>2.5 Técnicas de caracterización utilizadas .....</b>	<b>49</b>
2.5.1 Determinación del grado de sustitución (GS) conferido mediante saponificación .....	49
2.5.2 Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ en estado sólido (CP/MAS- $^{13}\text{C}$ RMN) .....	50
2.5.3 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	51
2.5.4 Espectroscopía UV/Visible (UV/vis).....	51
2.5.5 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) .....	51
2.5.6 Microscopía Electrónica de Barrido con Emisión de Campo (FESEM).....	52
2.5.7 Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS) .....	52
2.5.8 Difracción de Rayos X (DRX).....	52
2.5.9 Análisis Termogravimétrico (TGA).....	53
2.5.10 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	53
2.5.11 Propiedades Mecánicas (Tracción) .....	54
2.5.12 Ángulo de contacto .....	54
2.5.13 Dispersabilidad en solventes de diferente polaridad .....	55
2.5.14 Permeabilidad al vapor de agua .....	55
<b>2.6 Bibliografía del Capítulo 2.....</b>	<b>56</b>
 <b>3. Estudio exploratorio de la acetilación de nanocelulosa bacteriana catalizada por <math>\alpha</math>-hidroxiácidos .....</b>	 <b>59</b>
<b>3.1 Introducción .....</b>	<b>61</b>
<b>3.2 Resultados y discusión.....</b>	<b>68</b>

3.2.1 Testeo de los catalizadores $\alpha$ -hidroxiácidos .....	68
3.2.2 Análisis estructural por RMN.....	70
3.2.3 Análisis estructural por FTIR .....	74
3.2.4 Estudio morfológico por FESEM .....	77
3.2.5 Estudio de cristalinidad por DRX.....	78
3.2.6 Análisis del cambio de polaridad inducido.....	82
3.2.6.1 Ángulo de contacto .....	82
3.2.6.2 Dispersabilidad en solventes .....	85
<b>3.3 Conclusiones del Capítulo 3 .....</b>	<b>86</b>
<b>3.4 Bibliografía del Capítulo 3 .....</b>	<b>87</b>
<b>4. Acetilación de BNC catalizada con ácido cítrico: Estudio de variables del proceso.....</b>	<b>93</b>
<b>4.1 Introducción .....</b>	<b>95</b>
<b>4.2 Resultados y discusión.....</b>	<b>96</b>
4.2.1 Estudio del preacondicionamiento de la BNC en el GS alcanzado .....	96
4.2.2 Evaluación de las condiciones de reacción.....	97
4.2.3 Caracterización de productos con GS variable.....	101
4.2.3.1 Análisis estructural por RMN .....	101
4.2.3.2 Análisis estructural por FTIR .....	102
4.2.3.3 Estudio morfológico por FESEM .....	103
4.2.3.4 Estudio de cristalinidad por DRX.....	106
4.2.3.5 Propiedades térmicas por TGA.....	108
4.2.4 Estudio exploratorio del escalado de la reacción .....	112
<b>4.3 Conclusiones del Capítulo 4 .....</b>	<b>114</b>
<b>4.4 Bibliografía del Capítulo 4 .....</b>	<b>115</b>
<b>5. Extensión de la esterificación organocatalítica a otros sustratos nanocelulósicos .....</b>	<b>119</b>
<b>5.1 Introducción .....</b>	<b>121</b>
5.1.1 Esterificación de membranas enteras de BNC.....	122
5.1.2 Esterificación de nanocristales de celulosa .....	124

<b>5.2 Resultados y discusión.....</b>	<b>127</b>
5.2.1 Acetilación de membranas enteras de BNC .....	127
5.2.1.1 Obtención de las membranas acetiladas .....	127
5.2.1.2 Breve caracterización estructural del producto .....	128
5.2.1.2.1 Análisis estructural por RMN .....	128
5.2.1.2.2 Análisis estructural por FTIR .....	129
5.2.1.2.3 Estudio de cristalinidad por DRX .....	130
5.2.2 Acetilación de nanocristales de celulosa vegetal.....	132
5.2.2.1 Obtención de CNC acetilados .....	132
5.2.2.2 Caracterización de productos .....	133
5.2.2.2.1 Análisis estructural por RMN .....	133
5.2.2.2.2 Análisis estructural por FTIR .....	134
5.2.2.2.3 Estudio de cristalinidad por DRX .....	135
5.2.2.2.4 Estudio morfológico por FESEM .....	139
5.2.2.2.5 Propiedades térmicas por TGA.....	140
5.2.2.2.6 Análisis del cambio de polaridad inducido .....	142
<b>5.3 Conclusiones del Capítulo 5 .....</b>	<b>143</b>
<b>5.4 Bibliografía del Capítulo 5.....</b>	<b>143</b>
<b>6. Nanocompuestos de PLA/BNC acetilada.....</b>	<b>149</b>
<b>6.1 Introducción.....</b>	<b>151</b>
<b>6.2 Resultados y discusión.....</b>	<b>153</b>
6.2.1 Nanocompuestos de PLA con BNC acetilada con diferentes GS.....	153
6.2.1.1 Obtención de los nanocompuestos.....	153
6.2.1.2 Caracterización de los nanocompuestos.....	154
6.2.1.2.1 Análisis de transparencia por UV-Visible .....	154
6.2.1.2.2 Estudio morfológico por FESEM .....	156
6.2.1.2.3 Propiedades térmicas por DSC .....	157
6.2.1.2.4 Estudio de cristalinidad por DRX .....	161
6.2.1.2.5 Propiedades mecánicas por tracción uniaxial .....	163
6.2.2 Nanocompuestos de PLA con diferente porcentaje de BNC acetilada .....	165
6.2.2.1 Obtención de los nanocompuestos.....	165
6.2.2.2 Caracterización de los nanocompuestos.....	165
6.2.2.2.1 Análisis de transparencia por UV-Visible .....	165
6.2.2.2.2 Estudio morfológico por FESEM .....	167
6.2.2.2.3 Propiedades térmicas por DSC .....	169
6.2.2.2.4 Estudio de cristalinidad por DRX .....	173



6.2.2.2.5 Propiedades mecánicas por tracción uniaxial .....	174
6.2.2.2.6 Análisis de permeabilidad al vapor de agua.....	177
<b>6.3 Conclusiones del Capítulo 6 .....</b>	<b>179</b>
<b>6.4 Bibliografía del Capítulo 6.....</b>	<b>180</b>
 <b>7. Discusión general y conclusiones.....</b>	 <b>185</b>
 <b>Nomenclatura.....</b>	 <b>189</b>
<b>Listado de figuras .....</b>	<b>191</b>
<b>Listado de tablas .....</b>	<b>199</b>



# 1. Introducción general y objetivos

*En este Capítulo se describe la estructura química de la celulosa, su estructura cristalina y morfología fibrilar, y se mencionan sus principales fuentes de obtención. Posteriormente, se detallan los diferentes tipos de nanomateriales de celulosa que existen y su nomenclatura, con un especial énfasis en las nanofibras de celulosa de origen bacteriano. Se resumen sus fuentes de obtención, sus propiedades y sus principales usos. Luego, dado que algunas aplicaciones de la nanocelulosa requieren la modulación de su polaridad, se presenta una recopilación de las metodologías más usadas para la hidrofobización de este sustrato, como la adsorción de surfactantes, el grafting y las reacciones de esterificación. Se presenta en particular una vía de esterificación de nanocelulosa catalizada por  $\alpha$ -hidroxiácidos, como una alternativa de hidrofobización no convencional poco explorada en la literatura y que es motivo de estudio en la presente Tesis. A continuación, y en el marco de la aplicación de la nanocelulosa hidrofobizada que se exploró en este Trabajo de Tesis, se introducen los materiales compuestos y se presentan las principales matrices poliméricas biodegradables de interés comercial, con particular énfasis en el ácido poliláctico (PLA) y sus propiedades. Finalmente, se presenta un breve resumen de los usos de diferentes tipos de nanocelulosa como fase de refuerzo en la preparación de nanocompuestos de matriz polimérica de PLA, como una alternativa para mejorar algunas de sus propiedades mecánicas, térmicas y de permeabilidad al vapor de agua. En la última Sección de este Capítulo se presentan los objetivos de la Tesis.*



## 1.1 Celulosa

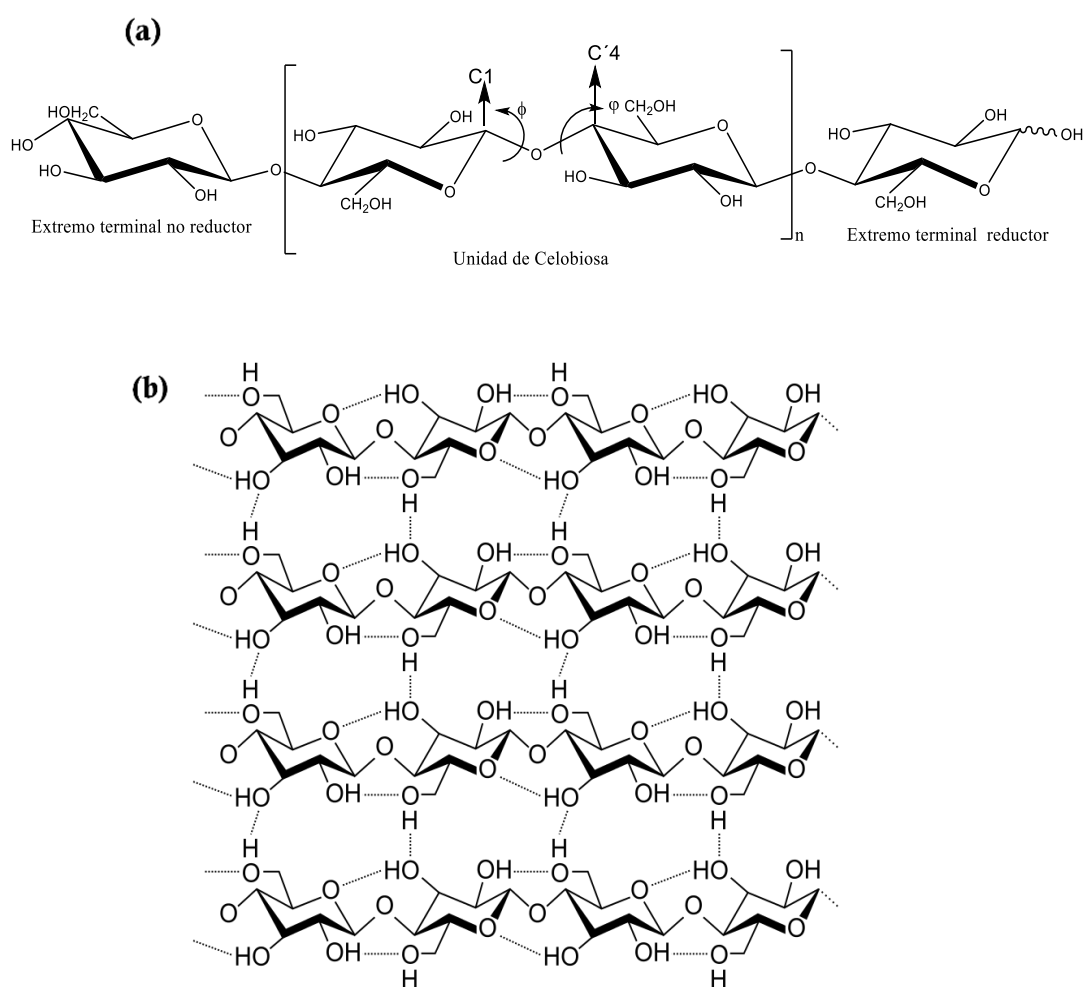
### 1.1.1 Definición y estructura química

La celulosa es el biopolímero más abundante de la Tierra. Fue aislada y nombrada por primera vez en el año 1838 por el químico francés Anselme Payen, investigador pionero en polímeros naturales y química industrial, quien la aisló de diversos tejidos vegetales **(Fisher, 1989)**.

Etimológicamente, la palabra celulosa se deriva del latín “*Cellula*” que significa pequeña celda y se usó, en este contexto, para hacer referencia al principal componente de la pared celular de las células vegetales, seguido del sufijo “*osa*” que clasifica una sustancia como un azúcar o carbohidrato.

Como se detalla en la publicación de Zugenmaier, quien realizó una revisión de los estudios estructurales de la celulosa a través del tiempo **(Zugenmaier, 2009)**, el reconocimiento de la estructura de la celulosa comienza con los aportes de Haworth en 1925 quien, en una primera contribución, determinó que la  $\beta$ -D glucosa se encontraba en el polímero formando un anillo carbonado de 6 miembros y no uno de 5 como era formalmente aceptado hasta la fecha **(Haworth, 1925)**. Posteriormente, Sponsler y Dore en 1926 construyeron por primera vez un modelo estructural de la celulosa comparando los datos obtenidos por rayos X con modelos tridimensionales de cada unidad de glucosa, construidos teniendo en cuenta las longitudes de enlaces y los ángulos teóricos promedio de las moléculas orgánicas. Sponsler y Dore concluyeron que la celulosa estaba compuesta por unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosas ordenadas de manera lineal y enlazadas por uniones (1 $\rightarrow$ 1) y (4 $\rightarrow$ 4). Concluyeron, también, que las cadenas se disponían en forma paralela y se establecían entre ellas interacciones de Van der Waals y enlaces de hidrógeno **(Sponsler & Dore, 1926)**. Finalmente, en 1928 Freudenberg y Haworth corrigieron la hipótesis de Sponsler & Dore en lo que respecta a los tipos de enlace, afirmando que la celulosa es una cadena lineal de longitud variable formada por unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosas enlazadas por uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) **(Freudenberg, 1928; Haworth, 1928)**.

La **Figura 1.1** ilustra la estructura de la celulosa aceptada actualmente. La rotación en torno a los enlaces C1-O y O-C4' está restringida para minimizar las repulsiones de Van der Waals entre las unidades de glucosa. Por ese motivo el grupo hidroximetil de la posición 6 de las unidades de anhidroglucosa (UAG) se dispone de manera alternada en posiciones opuestas, estableciéndose entonces como unidad repetitiva un dímero denominado celobiosa (**Klemm, Heublein, Fink, & Bohn, 2005**).



**Figura 1.1 (a)** Estructura de la celulosa, **(b)** ordenamiento lineal de las unidades de glucosa en las cadenas de celulosa. Interacciones vía enlaces de hidrógeno entre las cadenas

Los grupos hidroxilos ecuatoriales de las posiciones 2, 3 y 6 de cada unidad de glucosa forman enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares (**Figura 1.1**) y son los responsables de la estructura tridimensional cristalina altamente ordenada de la celulosa. El hecho que los grupos hidroxilos puedan ser transformados en una gran variedad de grupos funcionales como ésteres, éteres, carboximetiléteres, etc., hace que la celulosa sea una materia prima versátil que puede ser modificada de acuerdo con los requerimientos particulares de muy diversas aplicaciones. Además, la reactividad de todos los grupos hidroxilos no es idéntica. El hidroxilo primario del C-6 es el que está menos impedido estéricamente y, por lo tanto, reacciona preferencialmente frente a sustituyentes voluminosos, lo que permite modificar selectivamente esa posición de las unidades de glucosa que componen la celulosa (**Chen, 2014**).

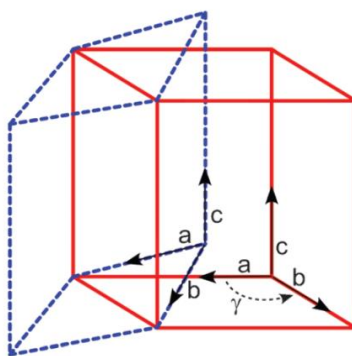
El grado de polimerización (GP) de la celulosa expresado en función del número de UAG, es muy variable. Por ejemplo, para pulpa de madera se han informado valores de entre 300 y 1700, mientras que para algodón y otras fibras vegetales los valores se encuentran entre 800 y 10000. Para celulosa de origen bacteriano se han encontrado valores de GP cercanos a 10000. Sin embargo, cabe resaltar que la medición del GP de la celulosa depende en gran medida del método utilizado para su extracción del medio natural en el que se encuentra inserta, dado que puede haber corte de cadenas durante el proceso de extracción del polímero (**Abdul Khalil, Bhat, & Yusra, 2012; Klemm et al., 2005**).

### **1.1.2 Estructura cristalina**

La estructura supramolecular de la celulosa en el estado sólido se configura a partir de dominios cristalinos y amorfos. La proporción de ambos dominios y el tipo de configuración estructural que adoptan las áreas cristalinas influye directamente sobre las propiedades de la celulosa. Por tal motivo, durante los últimos 100 años diversos grupos de investigación se dedicaron a estudiar detalladamente la estructura cristalina de la celulosa, utilizando principalmente técnicas de difracción de rayos X

(DRX), espectroscopía de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  en el estado sólido (CP/MAS- $^{13}\text{C}$  RMN) y difracción de neutrones.

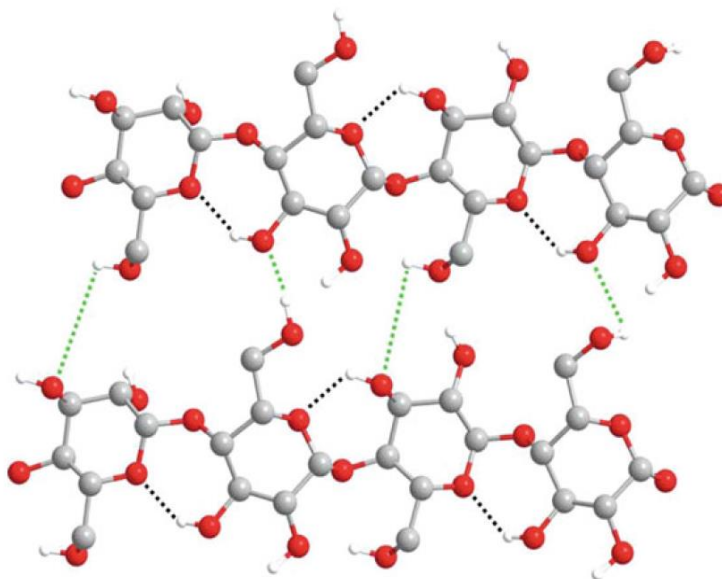
La estructura cristalina determinada para la celulosa nativa (aquella que no ha sido sometida a ningún tipo de modificación), obtenida de diversas fuentes naturales corresponde a la celulosa tipo I. Algunos estudios comparativos realizados mediante CP/MAS- $^{13}\text{C}$  RMN, demostraron que la celulosa I está presente en dos configuraciones cristalinas de su celdilla unidad, denominadas **I $\alpha$**  (Triclínica constituida por una cadena paralela) e **I $\beta$**  (Monoclínica formada por dos cadenas independientes paralelas), que coexisten en proporciones variables de acuerdo con su fuente original. Por ejemplo, la celulosa producida por bacterias, caso en que la biosíntesis es simultánea con la extensión de la red microfibrilada, la arquitectura de los agregados es mucho menos compleja con una estructura I $\alpha$  dominante. Distinto es caso de la gran mayoría de las plantas, en las cuales la estructura de la celulosa es mucho más compleja (configuración I $\beta$  dominante) y su arquitectura se encuentra limitada por la geometría de la pared celular (**Atalla & Vanderhart, 1984**).



**Figura 1.2** Configuración de la celdilla unidad de la celulosa I $\alpha$  (Triclínica, línea azul punteada) respecto a I $\beta$  (Monoclínica, línea roja continua). (Esquemas adaptados de **Moon, Martini, Nairn, Simonsen, & Youngblood, 2011**).



La **Figura 1.2** ilustra la configuración de la celda unidad para las dos estructuras polimórficas de la celulosa I y la **Tabla 1.1** resume las dimensiones determinadas por Nishiyama y colaboradores por difracción de neutrones y de rayos X usando luz sincrotrón, para cada caso (**Nishiyama, Sugiyama, Chanzy, & Langan, 2003**). En estos estudios los autores demostraron que la principal diferencia entre las configuraciones I $\alpha$  e I $\beta$  de la celulosa son los desplazamientos relativos de las cadenas paralelas de celulosa a lo largo de los planos formados por los enlaces de hidrógeno (**Moon et al., 2011**). Sin embargo, a pesar de que la presencia de estos desplazamientos modifica el patrón general de puentes de hidrógeno, los principales enlaces de hidrógeno intermoleculares (O6H---O3) e intramoleculares (O3H---O5) son comunes para ambas configuraciones cristalinas (**Figura 1.3**) (**Cherian et al., 2011**).



**Figura 1.3** Estructura supramolecular del polimorfismo de celulosa tipo I y los principales patrones de puentes de hidrógeno intermoleculares (O6H---O3 verde) e intramoleculares (O3H---O5 negro). (Esquema adaptado de **Cherian et al., 2011**).

Por otro lado, teniendo en cuenta que las diferencias mencionadas entre I $\alpha$  e I $\beta$  se relacionan directamente con la organización de las cadenas, diferentes autores demostraron que el polimorfismo I $\alpha$  puede convertirse fácilmente en I $\beta$  mediante tratamiento térmico a 270°C en medio básico o usando solventes de

diferente polaridad (Debzi, Chanzy, Sugiyama, Tekely, & Excoffier, 1991; Yamamoto, Horii, & Odani, 1989).

De igual manera, otros arreglos cristalinos se pueden lograr sometiendo a la celulosa nativa tipo I a diversos tratamientos químicos, los cuales inducen cambios en la geometría de la celda por la modificación de su sistema de enlaces de hidrógenos. Por ejemplo, la celulosa II formada por dos cadenas antiparalelas y mucho más estable termodinámicamente, puede obtenerse mediante dos caminos: un protocolo de regeneración que involucra la disolución de la celulosa y su posterior precipitación, o por mercerización que consiste en un tratamiento alcalino con NaOH concentrado y su posterior recristalización (Langan, Nishiyama & Chanzy, 1999). Asimismo, las formas polimórficas I y II de la celulosa pueden ser interconvertidas con amoníaco líquido o algunas aminas a otros arreglos cristalinos (III<sub>I</sub> y III<sub>II</sub>, respectivamente). Por último, un tratamiento térmico a 206°C en glicerol de las celulosas III<sub>I</sub> y III<sub>II</sub> conduce a otras configuraciones cristalinas, IV<sub>I</sub> y IV<sub>II</sub>, respectivamente (O'Sullivan, 1997).

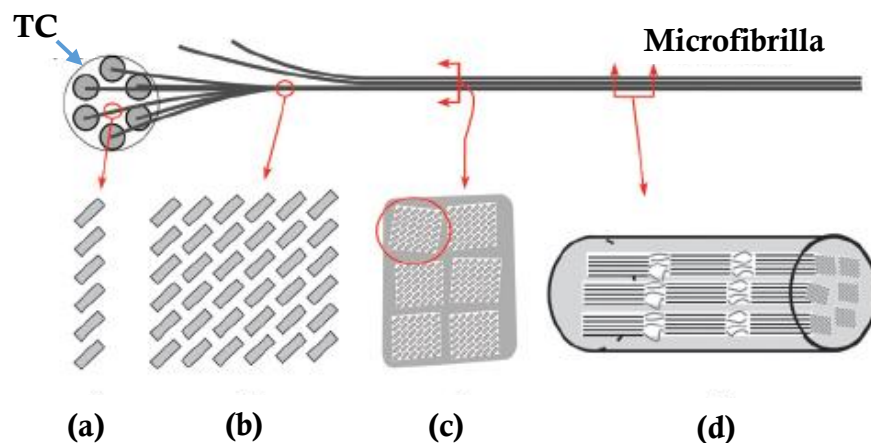
Celdilla unidad	a (nm)	b (nm)	c (nm)	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)	$\gamma$ (°)
I $\alpha$ Triclínica	0,672	0,596	1,040	118,08	114,80	80,375
I $\beta$ Monoclínica	0,778	0,820	1,038	-	-	96,5

**Tabla 1.1** Dimensiones de la celdilla unidad para las estructuras polimórficas de la celulosa.

### 1.1.3 Organización jerárquica de la celulosa

La morfología fibrilar de la celulosa, gestada desde la biosíntesis, es la responsable de las distintivas propiedades mecánicas de este polímero. En general, la celulosa es extruida por un complejo enzimático terminal (TC) de múltiples subunidades localizado en la pared celular y, según su configuración, determina la arquitectura final de las microfibras de celulosa. En primer lugar, las cadenas de

celulosa se auto-ensamblan dentro de una determinada subunidad del TC para formar un “*minisheet*” de cadenas de celulosa ordenadas (6–15 cadenas según la fuente de obtención). Luego, estos “*minisheets*” se auto-ensamblan para dar lugar a fibrillas elementales que intercalan dominios cristalinos y amorfos. La etapa final involucra el ensamblaje de estas fibrillas de celulosa en micro o macrofibrillas según el organismo que las produce (Moon et al., 2011).



TC= Complejo enzimático terminal de 6 subunidades localizado en la pared celular

**Figura 1.4** Representación esquemática de los diferentes niveles de formación de una microfibrilla de celulosa de madera, (a) sección transversal de un “*minisheet*” formado por 6 cadenas de celulosa en donde cada caja gris representa una cadena de celulosa que mira hacia abajo del eje de la cadena, (b) sección transversal de fibrillas elementales formadas por el ensamblaje de 6 “*minisheets*”, (c) sección transversal de microfibrillas compuesta por 6 fibrillas elementales, (d) sección lateral de microfibrillas que muestra la configuración en serie de regiones cristalinas y amorfas. (Esquemas adaptados de Moon et al., 2011).

A manera de ejemplo, en la **Figura 1.4** se ilustran los diferentes niveles de formación de una microfibrilla de celulosa obtenida a partir de la madera. Como se observa en la Figura, para este caso, el complejo enzimático TC está formado por 6 subunidades y se cree que cada subunidad produce un “*minisheet*” constituido por 6

cadena de celulosa. De cada TC resulta una fibrilla elemental de 36 cadenas de celulosa con sección transversal cuadrada de  $\approx 3\text{--}5$  nm. Estas fibrillas elementales a su vez se auto ensamblan para dar lugar a una larga estructura microfibrilada.

Estos manojos de celulosa o aglomerados fibrilares se encuentran en las matrices vegetales asociados a otras sustancias orgánicas como hemicelulosas, ligninas y pectinas, que configuran el esqueleto de la planta. Por lo tanto, la obtención de celulosa de origen vegetal involucra procedimientos adicionales de purificación con reactivos que en general son ambientalmente seguros. Por estas razones, es importante explorar fuentes alternativas de celulosa que permitan obtenerla sin recurrir a métodos agresivos con el medio ambiente, pero conservando su morfología fibrilar.

#### 1.1.4 Fuentes de celulosa

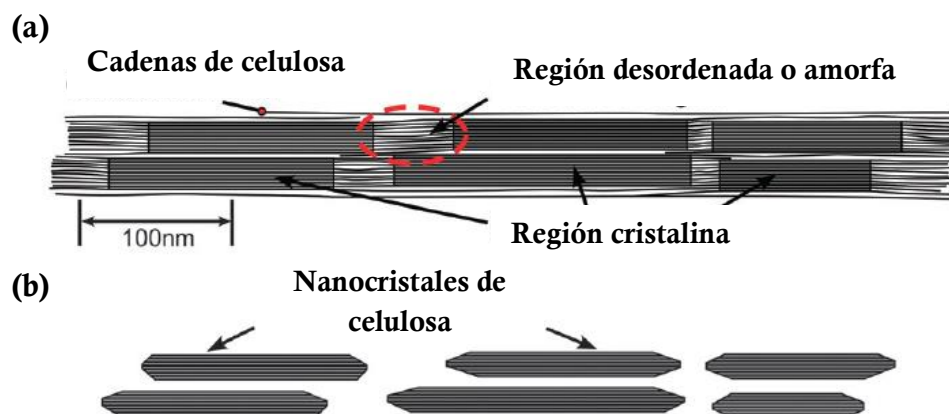
Debido a la gran disponibilidad la principal fuente de celulosa es la vegetal y, en particular, la más utilizada es la obtenida a partir de **madera**. Sin embargo, en los últimos años se han explorado como fuente de celulosa una gran variedad de **plantas** que incluyen algodón, ramio, sisal, lino, trigo, tubérculos de papa, pulpa de remolacha, soja, etc. Asimismo, se han estudiado otros organismos que tienen la capacidad de biosintetizar celulosa, tales como algunas especies de **algas** (*Micrasterias denticulata*, *Micrasterias rotate*, *Valonia*, *Caldophora* y *Boergesenia*) que producen microfibrillas de celulosa en su pared celular; algunos animales marinos llamados **tunicados** (*Halocynthia roretzi*, *Halocynthia papillosa* y *Metandrocarpa uedai*), que tienen la capacidad de producir celulosa embebida en una matriz rica en proteínas y, por último, **bacterias**, principalmente la especie *Gluconacetobacter xylinum* que, bajo condiciones adecuadas de fermentación, produce celulosa nanofibrilada pura (**Moon et al., 2011**).

### 1.2 Nanocelulosa

En el campo de la nanotecnología hay gran interés por los nanomateriales de celulosa, que se definen como aquellos que poseen alguna de sus tres dimensiones en


la nanoescala (1 nm a 100 nm). Las estrategias implementadas para su obtención incluyen por un lado metodologías top-down (“de arriba hacia abajo”) que involucran la deconstrucción mecánica, química o enzimática de microfibras/nanofibras de celulosa previamente purificadas. Por otro lado, puede obtenerse nanocelulosa por procedimientos bottom-up (“de abajo hacia arriba”) que comprenden fundamentalmente la construcción de nanocelulosa en la ruta metabólica de algunas bacterias.

El gran interés por este tipo de nano-objetos se relaciona con su mayor área superficial respecto de las macrofibras de celulosa, que conduce a un potenciamiento de sus propiedades intrínsecas y le da valor agregado a su origen natural y renovable. Las propiedades más importantes de la nanocelulosa son su abundancia, bajo costo, gran relación superficie-volumen, alta resistencia y rigidez, muy bajo coeficiente de expansión térmica, bajo peso, baja densidad, alta relación de aspecto y biodegradabilidad, entre otros (Vázquez, Foresti, Morán, & Cyras, 2014). Estos nanomateriales se pueden clasificar de manera general en **nanofibrillas** o **nanocristales de celulosa** (Figura 1.5).



**Figura 1.5** Esquema ilustrativo para (a) nanofibrillas de celulosa constituidas por dominios amorfos y cristalinos, y (b) nanocristales de celulosa después de hidrolizar los dominios amorfos de la celulosa. (Imagen adaptada de Moon et al., 2011).

Al respecto, cabe destacar que, con el auge de las nanocelulosas, se generaron confusiones en su nomenclatura, lo que a menudo dificultó su diferenciación de las partículas macro y micrométricas de celulosa (**Siró & Plackett, 2010**). Debido a lo anterior, en el año 2017 la norma ISO/TS20477 “*Nanotechnologies – Standard terms and their definition for cellulose nanomaterial*”, propuso una terminología estándar para designar los nanomateriales de celulosa, que se resume en la **Tabla 1.2**, y que es la adoptada en esta Tesis.

<b>Nanomateriales o nano-objetos de celulosa (Nanocelulosa)</b>		<b>Siglas en inglés</b>
<b>Definiciones:</b>  Materiales compuestos predominantemente de celulosa con alguna de sus dimensiones en la nanoescala.  Material con estructura interna o superficial en la nanoescala, compuesta predominantemente de celulosa.	<b>Nanocristales de celulosa</b>  Nano-objeto con estructura cristalina compuesta de celulosa con al menos una fibra elemental, que contiene predominantemente regiones cristalinas y paracristalinas  Relación de aspecto $< 50$ y $> 5$ . No presenta divisiones longitudinales, entrelazamiento entre partículas o estructuras similares a redes, y tienen 100 nm a varios $\mu\text{m}$ en longitud dependiendo de su fuente.	Celulosa nanocristalina (NCC), nanowhiskers de celulosa (CNW), nanocristales de celulosa (CNC).
	<b>Nanofibras o nanofibrillas de celulosa</b>  Nano-objeto con dos dimensiones en la nanoescala y una tercera dimensión significativamente más larga, compuesto de celulosa con al menos una fibrilla elemental, que contiene regiones cristalinas, paracristalinas y amorfas.  Relación de aspecto $> 10$ . Puede contener divisiones longitudinales, entrelazamiento entre partículas o estructuras similares a redes, y tienen una longitud típicamente superior a los 100 nm.	Celulosa nanofibrilada (NFC), nanofibras o nanofibrillas de celulosa (CNF).

**Tabla 1.2** Resumen de la norma ISO/TS 20477: 2017 “*Nanotechnologies – Standard terms and their definition for cellulose nanomaterial*”.

### 1.2.1 Nanocristales de celulosa

Los nanocristales de celulosa por sus siglas en inglés CNC, también conocidos como celulosa nanocristalina (NCC) o nanowhiskers de celulosa (CNW), están constituidos por material cristalino y tienen anchos de aproximadamente 3–50 nm y longitudes que van desde los 100 nm hasta varios micrones dependiendo de su fuente. Generalmente pueden obtenerse mediante hidrólisis ácida de macrofibras de origen vegetal, celulosa microcristalina (MCC), celulosa microfibrilada (MFC) o nanofibrilada (NFC) de diversas fuentes utilizando ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, e incluyendo en todos los casos protocolos de diálisis para la eliminación del excedente de ácido. También existen protocolos de obtención de CNC mediados por enzimas (**Filson, Dawson-Andoh, & Schwegler-Berry, 2009; George, Ramana, Bawa, & Siddaramaiah, 2011**). En estos casos, se remueven preferencialmente los dominios amorfos constitutivos de las fibras de celulosa que son más susceptibles a la hidrólisis, y quedan únicamente las regiones cristalinas en forma de agujas de sección nanométrica (**Figura 1.5b**) (**AbdulKhalil et al., 2012; Moon et al., 2011**);).

### 1.2.2 Nanofibrillas de celulosa

Las nanofibrillas de celulosa (CNF) o celulosa nanofibrilada (NFC) son nano-objetos constituidos por regiones alternadas amorfas y cristalinas que tienen dos de sus dimensiones en la escala del nanómetro (entre 5–30 nm) y una tercera dimensión en el orden de los micrones (**Figura 1.5a**). Este tipo de nanocelulosa puede extraerse convencionalmente mediante desfibrilación mecánica a partir de macrofibras de celulosa de madera y plantas, utilizando homogeneizadores de alta presión, refinadores, cryocrushing y tratamientos intensivos con ultrasonido. Con el propósito de disminuir el alto consumo energético de esta metodología, a menudo se la ha combinado con algunos pretratamientos químicos y/o enzimáticos, tales como: oxidación selectiva superficial empleando como catalizador el radical 2,2,6,6-tetrametil-piperidinil-1-oxil (TEMPO), en un proceso orientado a introducir cargas en la superficie para generar fuerzas repulsivas entre las fibras que faciliten la desfibrilación; y tratamientos enzimáticos usando celulasas, celobiohidrolasas o

endoglucanasas para inducir la desintegración del material de partida (**Siró & Plackett, 2010**).

La nanocelulosa obtenida por vía bacteriana también corresponde a una celulosa nanofibrilada y sus características se detallarán específicamente en la siguiente Sección.

## **1.3 Nanocelulosa bacteriana**

### **1.3.1 Obtención y propiedades**

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento mecánico intensivo es la metodología convencional más utilizada para obtener nanofibrillas de celulosa a partir de material vegetal, pero es un protocolo que en general implica numerosos pasos de homogeneización, conlleva una alta demanda energética, y es un proceso inestable debido al frecuente bloqueo de las cámaras del homogeneizador (**Pääkkö et al., 2007**). En los últimos años, con el objetivo de buscar alternativas más amigables con el medio ambiente, ha aumentado el interés por la obtención de nanocelulosa por vía bacteriana. En ese contexto, se han utilizado diversas bacterias de los géneros *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Salmonella* y *Sarcina*, que biosintetizan celulosa de estructura química idéntica a la obtenida a partir de fuentes vegetales convencionales. En particular, las bacterias del género *Gluconacetobacter* son las que han despertado mayores expectativas debido a su capacidad de producir celulosa a escala compatible con la producción industrial.

La obtención de nanocelulosa bacteriana (BNC por sus siglas en inglés) comprende un proceso fermentativo llevado a cabo bajo condiciones adecuadas de pH, temperatura y concentración de nutrientes, en el cual las bacterias producen como metabolito primario extracelular nanofibrillas de celulosa con sección transversal rectangular de aproximadamente 3–10 nm de espesor, 30–100 nm de ancho y 1–9 µm de longitud (**De Souza Lima & Borsali, 2004; Horikawa &**

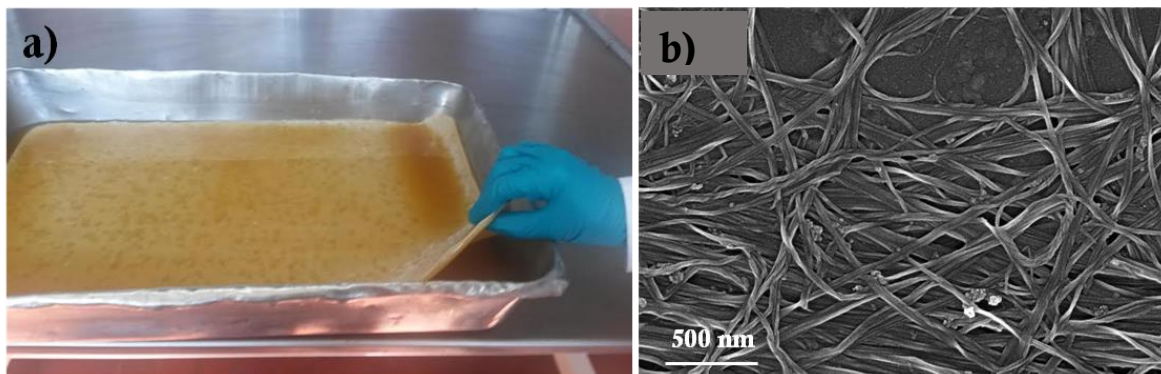


**Sugiyama, 2009**). Estas nanofibras de celulosa se entretajan formando una película gelatinosa altamente hidratada en la superficie aireada del recipiente donde ocurre la fermentación de manera estática (**Figura 1.6**). Por otra parte, cuando la fermentación procede con agitación, la síntesis de celulosa se da en forma dispersa, dando lugar a la formación de pellets o esferas irregulares.

En lo que respecta al medio de cultivo, éste puede formularse utilizando diferentes sustratos comerciales como fuente de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa, xilosa, arabinosa, manitol, arabinitol, glicerol, oligosacáridos) (**Wu & Liu, 2013**). El medio más comúnmente utilizado es el medio HS descrito por primera vez en 1954 por Hestrin y Schramm, que está formulado con glucosa, peptona, extracto de levadura, fosfato disódico anhidro y ácido cítrico (**Hestrin & Schramm, 1954**). Sin embargo, emplear este tipo de medio de cultivo para producir nanocelulosa a gran escala incrementa significativamente los costos de producción y lo hace un proceso económicamente inviable. Por tal motivo, diversos grupos de investigación han diseñado nuevos medios de fermentación formulados a menudo con desechos agroindustriales de fácil acceso o subproductos de otras industrias que abaratan el proceso y que han permitido alcanzar rendimientos de producción muy significativos. Entre ellos puede citarse por ejemplo medios en base a jugo de ananá y caña de azúcar (**Castro et al., 2011**), extracto de cáscara de granos café y macerado de maíz (este último subproducto de la industria procesadora de almidón que se usa como fuente de nitrógeno) (**Rani, Rastogi, & Appaiah, 2011**), y, más recientemente, glicerol remanente de la producción de biodiesel y bagazo de uva derivado de la producción de vino nacional combinados con macerado de maíz como fuente de nitrógeno (**Cerrutti et al., 2016; Vázquez, Foresti, Cerrutti, & Galvagno, 2013**), entre otros. En todos los casos, el tiempo de cultivo, la temperatura y la proporción de nutrientes influyen de forma directa en la producción total y en las propiedades finales de las membranas de celulosa.

La nanocelulosa obtenida por vía bacteriana tiene algunas características particulares que la distinguen de la nanocelulosa vegetal, tales como su alta pureza química (que evita los largos pretratamientos para remover lignina y hemicelulosa), y su obtención directa como un material nanoestructurado que no involucra

procedimientos mecánicos adicionales para liberar las nanofibrillas. Por otra parte, tienen una elevada cristalinidad y un alto grado de polimerización.



**Figura 1.6 (a)** Membrana de BNC obtenida mediante fermentación estática en un medio de cultivo de 5 L, **(b)** micrografía de barrido electrónico (SEM) de BNC.

### 1.3.2 Aplicaciones

La BNC tiene las características apropiadas para ser un material de utilidad en diferentes áreas de la industria cosmética, textil, minera, extracción de petróleo, alimentaria, farmacéutica, electrónica, energética, comunicaciones, en purificación de aguas, materiales biomédicos, etc. Las aplicaciones potenciales de la BNC se resumen en la **Tabla 1.3** discriminando por área de interés. En los últimos años, la BNC se ha utilizado para la fabricación de diferentes productos comerciales que incluyen llantas, membranas acústicas, máscaras cosméticas, alimentos dietéticos, algunos productos textiles, etc. (Shah, Ul-Islama, Khattaka, & Parka, 2013).

Muchas de las aplicaciones mencionadas en el párrafo anterior aprovechan la alta hidrofilicidad de las nanofibras de celulosa asociada a su estructura rica en grupos hidroxilos. Sin embargo, cuando la aplicación de la nanocelulosa involucra medios/matrices no polares, se dificulta su utilización por temas de incompatibilidad química. Este es el caso, por ejemplo, del uso de nanocelulosa como refuerzo de matrices poliméricas hidrofóbicas de interés (como poliolefinas, poliésteres biodegradables como el ácido poliláctico, etc.), en las que la hidrofilicidad de la nanocelulosa a menudo conduce a materiales con propiedades mecánicas pobres, alta absorción de humedad que produce pérdida de resistencia del refuerzo y

deformación del material compuesto, y agregación entre las nanofibras que redundan en una pobre dispersión en la matriz polimérica (Missoum, Belgacem, & Bras, 2013; Siró & Plackett, 2010).

Área de interés	Aplicación
<b>Cosméticos</b>	Agente estabilizador de emulsiones como cremas, tónicos, acondicionadores, pulidores de uñas, máscaras faciales
<b>Minería y refinería</b>	Esponjas para recolectar fugas de aceite y materiales absorbentes de toxinas
<b>Purificación de aguas</b>	Purificación de aguas residuales urbanas, ultrafiltración de agua
<b>Comunicaciones</b>	Diafragmas para micrófonos y auriculares estéreo
<b>Industria alimentaria</b>	Celulosa comestible (nata de coco), alimentos dietéticos, modificadores de reología para alimentos
<b>Industria del papel</b>	Reemplazo artificial de madera, papeles de alta resistencia para prestaciones específicas
<b>Medicina/biomedicina</b>	Pieles artificiales temporales para quemaduras y úlceras, agentes de sostén para el crecimiento de tejidos, venas artificiales, aditivos en adhesivos óseos, componentes de implantes dentales, apósitos antibacterianos para heridas, transporte de medicamentos, excipiente de medicamentos
<b>Laboratorios</b>	Inmovilización de proteínas, técnicas cromatográficas, medios de cultivo tisulares
<b>Electrónica</b>	Materiales optoelectrónicos (pantallas de cristales líquidos)
<b>Energía</b>	Celdas de combustible de membrana
<b>Diseño de materiales</b>	Refuerzo de materiales compuestos

**Tabla 1.3** Algunas aplicaciones de la BNC en diferentes áreas. (Adaptado de Jozala et al., 2016).

Con el fin de superar las dificultades mencionadas anteriormente asociadas a la naturaleza química polar de la nanocelulosa, en los últimos años se han desarrollado múltiples alternativas para mejorar la compatibilidad de la nanocelulosa con diversas matrices hidrofóbicas, utilizando por ejemplo algunos aditivos como surfactantes y también una gran variedad de modificaciones/funcionalizaciones químicas que le dan un carácter hidrofóbico a la celulosa. Estas metodologías se resumen de manera general en la siguiente Sección.

## **1.4 Metodologías de hidrofobización de nanocelulosa**

En la bibliografía se puede encontrar una amplia variedad de metodologías orientadas a conferir un carácter hidrofóbico a la superficie de nanofibras y nanocristales de celulosa con el fin de mejorar su compatibilidad con matrices poliméricas hidrofóbicas de interés comercial. Las metodologías utilizadas convencionalmente se clasifican en tres grandes grupos que se describen a continuación.

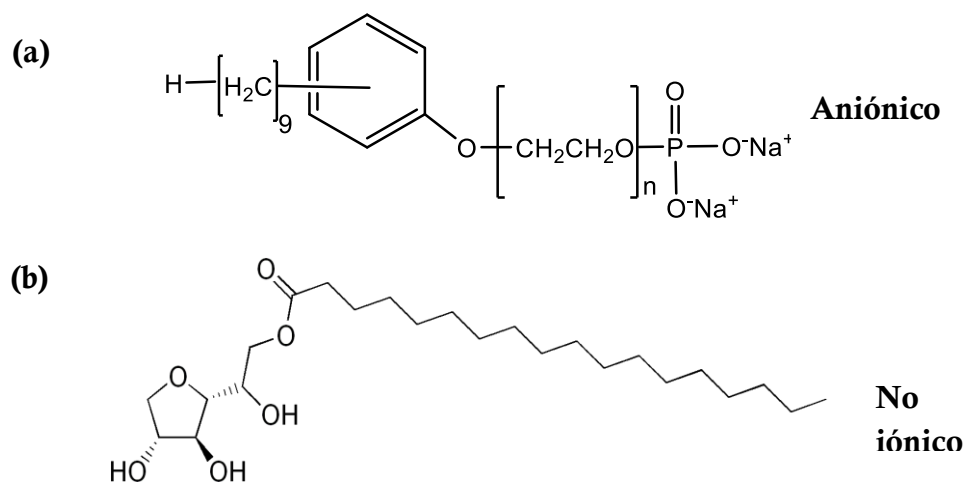
### **1.4.1 Adsorción de surfactantes**

La utilización de moléculas de naturaleza anfifílica como son los surfactantes reduce la tensión superficial entre fases y favorecen la compatibilización. Este efecto se atribuye esencialmente a fenómenos físicos sin la formación de enlaces covalentes, los cuales se relacionan fundamentalmente con una alteración de las fuerzas intermoleculares que operan entre las moléculas del medio al que se agrega el surfactante (**Hubbe, Rojas, & Lucia, 2015**).

Los surfactantes se clasifican en función de su estructura química y su forma de disociación en agua como aniónicos, catiónicos, y no iónicos. Los surfactantes de tipo aniónico se disocian en un anión anfifilo y un catión (un metal alcalino o un amonio cuaternario). Por su parte, los surfactantes catiónicos se disocian en un catión orgánico anfifilo (sales de amonio cuaternario) y comúnmente un ion haluro como contraión. Por último, los surfactantes no iónicos, que no se ionizan en solución acuosa, poseen grupos hidrofílicos como alcoholes, fenoles, éteres o amidas y su

parte hidrofóbica es un grupo alquilo, un grupo alquilbenceno o cadenas de ácidos grasos. Los surfactantes aniónicos y no iónicos son los más utilizados debido a su menor costo relativo (Myers, 2005).

En la **Figura 1.7** se ilustra, a manera de ejemplo, la estructura química de algunos surfactantes (*Beycostat A B09* y *Span-60*) comúnmente utilizados para compatibilizar nanocristales de celulosa con PLA (Bondenson & Oksman, 2007; Fortunati et al., 2014) y poliestireno (PS) (Kim et al., 2009), respectivamente.



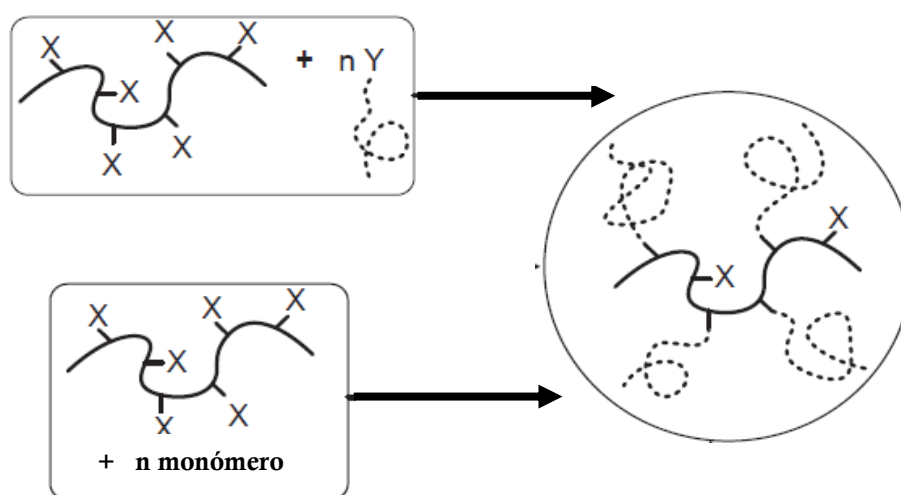
**Figura 1.7** Estructura química de surfactantes comúnmente utilizados para compatibilizar nanocelulosa y matrices poliméricas de tipo poliéster (a) Beycostat A B09, (b) Span-60.

#### 1.4.2 Grafting

El grafting (que significa injerto) busca modificar las propiedades de un polímero mediante una modificación química que consiste en unir covalentemente un oligómero u otro polímero a la cadena principal.

Las metodologías más habituales para llevar a cabo este tipo de modificaciones son: la reacción entre grupos funcionales de dos polímeros diferentes (*grafting onto*), y la reacción entre los sitios selectivamente activados de un polímero

polifuncional con monómeros presentes en el medio de reacción, para dar lugar a su posterior polimerización (*grafting from*) (**Figura 1.8**). La metodología “grafting from” es la más utilizada para injertar cadenas poliméricas a la celulosa. La activación de sitios predeterminados de la celulosa puede lograrse mediante tratamientos químicos o irradiación (**Kang, Liu, & Huang, 2015**). Sin embargo, como la polimerización de los monómeros sucede habitualmente vía radicales libres, se han descrito algunos problemas importantes relacionados con la formación de homopolímeros en el medio de reacción, con una densidad no controlada de los injertos a lo largo de la cadena de celulosa y, en algunos casos, hasta con la degradación de la celulosa. Estos inconvenientes han sido objeto de numerosos estudios que han sugerido como alternativa la implementación de polimerizaciones controladas de tipo catiónico o aniónico (**Kang et al., 2015**).



**Figura 1.8** Métodos convencionales para el grafting de cadenas poliméricas.

(Imagen adaptada de **Kang et al., 2015**).

Durante los últimos años, se han implementado una gran variedad de metodologías para sintetizar polímeros de injerto en nanomateriales de celulosa. Por ejemplo, Siqueira y colaboradores utilizaron isocianato de octadecilo ( $C_{18}H_{37}NCO$ ) como monómero para mejorar la compatibilidad de nanofibras y nanocristales de celulosa con una matriz de policaprolactona (**Siqueira, Bras, & Dufresne, 2009**). Por otra parte, en otra contribución con el mismo objetivo injertaron  $\epsilon$ -caprolactona

mediante ROP (polimerización por apertura de anillo) en nanocristales de celulosa usando como catalizador 2-etilhexanoato de estaño (II)  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  (**Goffin et al., 2011**). En la preparación de materiales compuestos con matriz polimérica de poliestireno, Lin y Dufresne carboxilaron nanocristales de celulosa para el grafting subsecuente con polietilenglicol (**Lin & Dufresne, 2013**).

#### 1.4.3 Reacciones de esterificación

Dada la alta reactividad de la celulosa debido a sus tres grupos hidroxilo en las posiciones C2, C3 y C6, muchos autores se han enfocado en la hidrofobización de nanocelulosas formando nuevos enlaces covalentes mediante reacciones típicas de sustitución nucleofílica. Entre ellas, las más exploradas han sido la sililación y la esterificación. Esta última es en la que se hará foco por ser parte importante de esta Tesis.

La formación de uniones éster por reacción entre los grupos hidroxilos de la celulosa con diferentes tipos de acilantes se ha convertido en la metodología más utilizada para derivatizar diferentes tipos de nanocelulosas. Algunas de las ventajas que han motivado su utilización son la amplia variedad de ésteres de celulosa que pueden sintetizarse según la aplicación pensada, la posibilidad de realizar la reacción en medios de reacción homogéneos o heterogéneos según cada caso, y la relativa facilidad de limitar la reacción a la superficie de la nanocelulosa, específicamente cuando se lleva a cabo en medio heterogéneo (**Wang, Wang, Xie, & Zhang, 2018**). Los ésteres de celulosa pueden ser inorgánicos (nitratos, sulfatos, fosfatos y xantatos de celulosa (**Heinze, Liebert, & Koschella, 2006**)) u orgánicos (acetatos, propionatos, etc.).

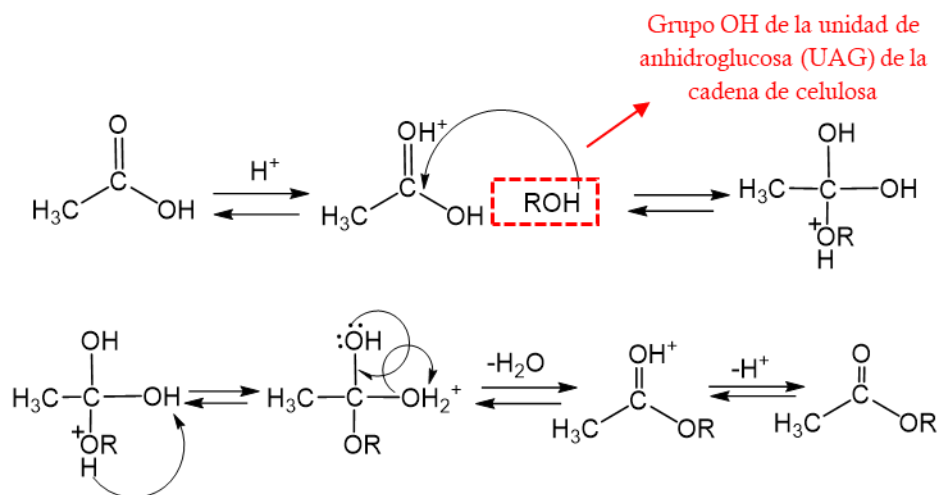
La reacción de esterificación de celulosa con moléculas orgánicas se ha llevado a cabo con ácidos orgánicos de variada longitud de cadena como acilantes (por ejemplo, ácido acético, propiónico, butírico, hexanoico, decanoico, dodecanoico, málico, malónico, etc.), y con los derivados de ácidos activados tales como anhídridos y cloruros de ácido, para mejorar la eficiencia de la reacción (**Wang et al., 2018**).

En términos cuantitativos, el nivel de modificación alcanzado se informa en términos del denominado grado de sustitución (GS), definido como el número promedio de grupos éster unidos covalentemente por unidad de anhidroglucosa (UAG). Teniendo en cuenta que cada unidad anhidroglucosa tiene 3 grupos hidroxilos disponibles para la esterificación en las posiciones C2, C3 y C6, el GS máximo que puede alcanzarse es 3. Generalmente, el GS de la celulosa esterificada se determina por saponificación con NaOH y titulación por retorno con HCl. Por otra parte, otras técnicas de caracterización, como la espectroscopía infrarroja y la resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  en estado sólido, permiten una visualización cualitativa de la modificación de la nanocelulosa por observación, en los respectivos espectros, de las señales de los carbonos alquílicos y el grupo carbonilo introducidos en la macromolécula al ser esterificada.

La esterificación de la nanocelulosa se ha llevado a cabo en presencia de distintos catalizadores, como por ejemplo, ácido clorhídrico (**Braun & Dorgan, 2009**), ácido sulfúrico (**Tomé et al., 2011a**), ácido perclórico (**Ifuku, Nogi, Abe, Handa, & Nakatsubo, 2007; Kim, Nishiyama, & Kuga, 2002**), y yodo (**Hu, Chen, Xu, & Wang, 2011**). También se han propuesto esterificaciones de nanocelulosa en medios de dimetilacetamida/cloruro de litio (**De Marco Lima, Sierakowski, Faria-Tischer, & Tischer, 2011**),  $\text{CO}_2$  en condiciones supercríticas (**Suetsugu, Kotera, & Nishino, 2009**), líquidos iónicos (**Tomé et al., 2011b**), etc. Aunque estos sistemas son eficientes para derivatizar la nanocelulosa, la mayoría de estas metodologías utilizan como catalizadores ácidos fuertes altamente corrosivos y/o involucran medios que contienen disolventes orgánicos altamente inflamables o tóxicos, como piridina o tolueno.

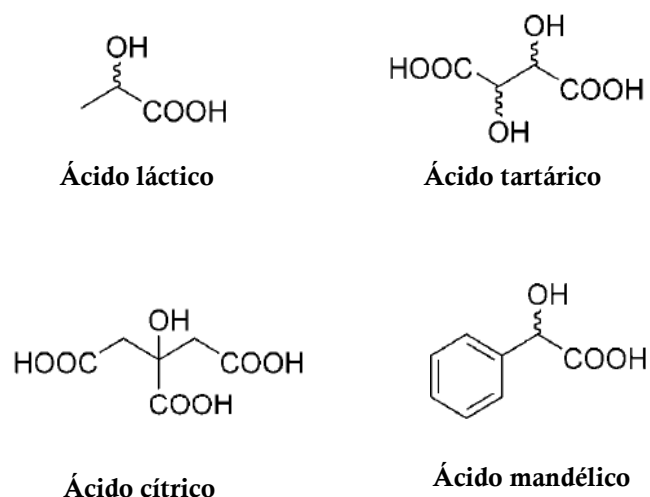
En los casos en los que la esterificación se lleva a cabo por reacción de un ácido carboxílico con el grupo hidroxilo de un alcohol (como sería el caso de los grupos hidroxilo de la celulosa), con catálisis ácida, el mecanismo propuesto por Fisher es el popularmente aceptado (**Figura 1.9**).





**Figura 1.9** Mecanismo de reacción de la esterificación de Fisher.

Como alternativa, en los últimos años ha crecido el interés por desarrollar nuevas metodologías que involucren el uso de catalizadores biodegradables, amigables con el medio ambiente, renovables y de origen natural, que permitan esterificar las nanocelulosas bajo condiciones más suaves de reacción con una reducción importante en la formación de desechos. En este sentido, en el 2005 Hafrén y Córdova exploraron la polimerización de  $\epsilon$ -caprolactona desde la celulosa, y propusieron la esterificación organocatalítica de papel de celulosa y algodón con ácidos hexadecanoico y pentinoico, utilizando en ambos casos como catalizador un  **$\alpha$ -hidroxiácido** de origen natural (ácido tartárico) en un medio de reacción sin cosolventes agregados (**Hafrén & Córdova, 2005**). Los resultados presentados en esa publicación evidenciaron que la organocatálisis con  $\alpha$ -hidroxiácidos (por ejemplo, ácido láctico, tartárico, cítrico y mandélico (**Figura 1.10**)) es una ruta prometedora que podría extenderse a la derivatización de nanocelulosa. Además de su biodegradabilidad y no toxicidad, se destaca que estos  $\alpha$ -hidroxiácidos pueden obtenerse a gran escala mediante rutas biotecnológicas fermentativas sencillas y rentables (**Domínguez de María, 2010**).



**Figura 1.10** Estructura química de algunos  $\alpha$ -hidroxiácidos de origen natural.

En cuanto a los antecedentes previos en los cuales se han utilizado los  $\alpha$ -hidroxiácidos (ácido láctico, tartárico y cítrico) como catalizadores, se informó su actividad catalítica en reacciones de polimerización por apertura de anillo (ROP) de lactonas en ausencia de solventes y usando un alcohol bencílico como iniciador (Casas, Persson, Iversen, & Córdova, 2004). El ácido láctico también se utilizó para catalizar la acilación de  $\epsilon$ -policaprolactona usando como iniciadores sacarosa o metil  $\beta$ -D-glucopiranosido (Persson, Schröder, Wickholm, Hedenström, & Iversen, 2004) y, más recientemente, nuestro grupo publicó una primera contribución en donde se comprobó la introducción de grupos éster en nanocelulosa de origen bacteriano usando ácido tartárico como catalizador y ácido acético y propiónico como agentes acilantes (Ávila Ramírez, Juan Suriano, Cerrutti, & Foresti, 2014).

En este contexto, en el curso de esta Tesis se estudió la acetilación de BNC con anhídrido acético catalizada por ácido cítrico, enfocada particularmente a la compatibilización de BNC con matrices poliméricas hidrofóbicas biodegradables.

## 1.5 Materiales compuestos biodegradables

Como se mencionó anteriormente, el objetivo principal de los diferentes protocolos de hidrofobización de nanocelulosa descriptos en la bibliografía es lograr su compatibilización con matrices poliméricas hidrofóbicas biodegradables para la

preparación de materiales compuestos y nanocompuestos biodegradables con propiedades mejoradas. En la presente Sección, se define de manera general el concepto de material compuesto, se presentan las matrices poliméricas biodegradables más comunes (con un especial énfasis en el PLA utilizado en esta Tesis), se comentan las principales metodologías para el procesamiento de nanocompuestos y, por último, se describe brevemente el estado del arte del uso de nanocelulosas como nano-refuerzo en matrices biodegradables, principalmente PLA.

### 1.5.1 Definición

El término compuesto hace referencia a dos o más materiales combinados para formar un tercer material potencialmente útil. Este material compuesto está constituido generalmente por una fase continua denominada **matriz** (polímeros, metales, cerámicos) y otra fase embebida o distribuida en ella conocida como **fase de refuerzo (Kaw, 2006)**. En algunos casos, los componentes de estos materiales pueden identificarse a simple vista, pero en la mayoría de los casos estos materiales tienen una apariencia macroscópica homogénea y sus componentes interactúan entre sí para mejorar alguna propiedad de interés. Entre ellos, la resistencia al esfuerzo, rigidez, resistencia a la corrosión y al desgaste, propiedades térmicas, conductividad, permeabilidad a distintos gases, etc. **(Hull & Clyne, 1996)**.

Los materiales compuestos convencionalmente se clasifican en materiales compuestos **fibrosos** (aquellos que contienen fibras como refuerzo de una matriz), **laminados** (conformados por láminas compactadas de varios materiales), **particulados** (que contienen partículas distribuidas en una matriz) y, por último, compuestos que pueden combinar algunos de los tres tipos mencionados anteriormente **(Jones, 1999)**. Por otra parte, cuando uno de los componentes tiene alguna de sus dimensiones en la escala nanométrica (1–100 nm), el término utilizado para referirse a estos materiales es el de **nanocompuestos (Abdul Khalil et al., 2015)**.

En cuanto a los materiales compuestos de matriz polimérica reforzados con fibras, existen múltiples estudios que han utilizado diversas fibras sintéticas (por ejemplo, fibras de carbono, vidrio y poliamidas (Kevlar)) como fase de refuerzo de matrices poliméricas como resinas de tipo poliéster, fenólicas, epoxi y acrílicas, polietileno, polipropileno, poliestireno, etc. **(Bogue, 2011)**. Algunos de estos

materiales son ampliamente utilizados, por ejemplo, en la industria aeronáutica, automovilística y en la fabricación de artículos deportivos de alto impacto (**Kaw, 2006**). Sin embargo, y a pesar de las excelentes propiedades que a menudo exhiben estos materiales compuestos, como se degradan a muy baja velocidad presentan el inconveniente de acumularse al ser desechados al finaliza su vida útil, generando un impacto ambiental negativo. Esta problemática ha motivado el desarrollo de nuevos materiales con propiedades similares, pero que tengan menor impacto sobre los ecosistemas. Por este motivo, durante los últimos años ha crecido el interés por estudiar diversas matrices poliméricas biodegradables reforzadas con polímeros biobasados, como el almidón y la celulosa (**Berglund & Peijs, 2010**).

### **1.5.2 Matrices poliméricas biodegradables**

Los polímeros biodegradables son aquellos que pueden degradarse por la acción de enzimas y/o sufrir descomposición química mediada por organismos vivos (bacterias y hongos). El mecanismo de degradación depende fuertemente de la estructura química del polímero y de las condiciones ambientales y, generalmente, ocurre en dos pasos consecutivos. Inicialmente, tiene lugar la fragmentación del polímero en especies de bajo peso molecular por procesos de oxidación, fotodegradación, hidrólisis o por la acción de microorganismos. A esta etapa sigue la bioasimilación de los fragmentos del polímero por parte de los microorganismos y su mineralización (**Vroman & Tighzert, 2009**).

Entre los polímeros biodegradables se pueden citar aquellos de origen natural y muy abundantes en nuestro planeta como la celulosa, almidón, quitosano y algunas proteínas (caseína, colágeno, etc.). También son biodegradables algunos polímeros obtenidos mediante procesos de fermentación como los poli- $\beta$ -hidroxialcanoatos (PHA), polihidroxibutirato (PHB), polihidroxibutirato-co- hidroxivalerato (PHBV), etc. Por otro lado, con igual relevancia, se encuentran los polímeros biodegradables sintéticos, los cuales poseen grupos funcionales hidrolizables de tipo éster, amida o uretano, como por ejemplo la policaprolactona (PCL) producida a partir de monómeros sintéticos y el ácido poliláctico (PLA) producido a partir de monómeros derivados de recursos renovables. Dentro de este último grupo, los poliésteres alifáticos han sido los más estudiados durante los últimos años, debido a su

versatilidad sintética y a la gran variedad de monómeros que pueden utilizarse en su preparación (Avérous & Pollet, 2012; Vroman & Tighzert, 2009).

Dentro de la gran variedad de posibles aplicaciones de estos polímeros biodegradables se pueden mencionar los materiales para el envasado y embalaje de alimentos, empaques y recubrimientos de medicamentos, implementos de fijación quirúrgica, prótesis, y dispositivos para la liberación controlada de medicamentos y pesticidas, etc. (Amass, Amass, & Tighe, 1999).

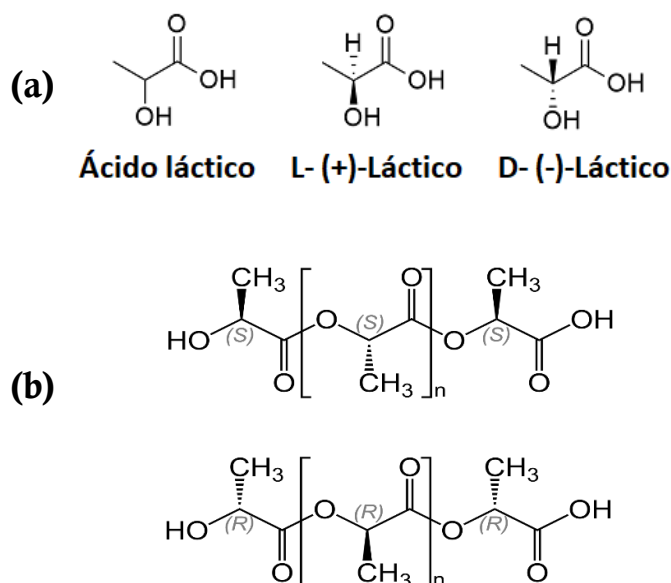
#### 1.5.2.1 Ácido poliláctico (PLA)

Cuando el objetivo es desarrollar materiales biodegradables potencialmente útiles para sustituir polímeros convencionales derivados del petróleo para, por ejemplo, aplicaciones específicas como el packaging industrial o el mercado de dispositivos médicos bioabsorbibles y biocompatibles, el PLA es uno de los polímeros que despierta mayor interés. Esto se fundamenta en su biocompatibilidad, alta resistencia y alto módulo, su carácter hidrofóbico, la versatilidad para producirlo mediante rutas sintéticas o fermentativas en base a recursos renovables, y su fácil procesamiento en equipamiento convencional de moldeo por inyección o soplado, extrusión, termoformado e hilado de fibras (Farah, Anderson, & Langer, 2016).

El monómero constitutivo del PLA es el ácido láctico o ácido 2-hidroxipropanoico, un  $\alpha$ -hidroxiácido quiral de origen natural y renovable que tiene dos enantiómeros (D y L). De acuerdo con los tipos de enantiómeros de ácido láctico que constituyen el PLA se presentan diferentes estereoisómeros, tales como el ácido poli-(L)-láctico (PLLA), ácido poli-(D)-láctico (PDLA) y ácido poli-(DL)-láctico (PDLLA) (Figura 1.11).

El PLA puede sintetizarse mediante polimerización por condensación del ácido láctico, pero conlleva a un polímero de bajo peso molecular. En cambio, cuando la polimerización se lleva a cabo por apertura de anillo de la lactida (dímero cíclico del ácido láctico) mediante deshidratación azeotrópica del monómero en presencia del catalizador, se obtiene un polímero puro de alto peso molecular (Garlotta, 2002). En la actualidad, debido a sus altos rendimientos, la

polimerización por apertura de anillo es la técnica de producción más usada industrialmente (Henton, Gruber, Lunt, & Randall, 2005).



**Figura 1.11** Estructura química de (a) enantiómeros del ácido láctico, (b) estereoisómeros de PLA.

Las propiedades físicas y mecánicas del PLA dependen fuertemente de su estereoquímica, de la temperatura utilizada en su procesamiento (históricamente térmico) y del peso molecular. Estos factores afectan particularmente la cristalinidad del PLA y pueden favorecer el crecimiento de alguna de sus 3 formas cristalinas típicas, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Durante la síntesis, el grado de cristalinidad del PLA puede controlarse usando catalizadores especiales de contenido isotáctico y sindiotáctico con diferentes unidades enantioméricas, los cuales regulan la pureza estereoquímica del polímero. Por ejemplo, cuando el PLA tiene un contenido de PLLA mayor que 90% tiende a ser un material cristalino, y a medida que el porcentaje de PLLA disminuye se hace más amorfo (Farah, Kunduru, Basu, & Domb, 2015). Para el PLA amorfo la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) determina la temperatura de uso superior para muchas aplicaciones comerciales. Por otro lado, para el PLA semicristalino la  $T_g$  ( $\approx 58^\circ\text{C}$ ) junto con el punto de fusión ( $T_m$ )  $130\text{--}230^\circ\text{C}$  (dependiendo de su estructura) son parámetros igualmente importantes para determinar la temperatura de uso en muchas aplicaciones (Henton et al., 2005).

En la actualidad existen varios tipos de PLA semicristalino comerciales que pueden utilizarse para aplicaciones de termoformado, extrusión y moldeo por inyección. Por ejemplo, el PLA comercializado por la firma *Nature Works®* de la serie 3051D que se utilizará como matriz polimérica en los estudios de la presente Tesis, tiene una gravedad específica de 1,24, una viscosidad relativa de 3,3, una temperatura de fusión cristalina de  $\approx 145\text{--}155^\circ\text{C}$  y una temperatura de transición vítrea de  $\approx 55\text{--}65^\circ\text{C}$ .

Por otro lado, a pesar de las múltiples ventajas del PLA mencionadas anteriormente, este polímero exhibe algunas propiedades que limitan su uso en ciertas aplicaciones. Por ejemplo, a pesar de tener un módulo elástico comparable con el PET (polietilentereftalato), el PLA es un material relativamente frágil con baja resistencia al impacto, presenta baja resistencia térmica, baja capacidad de cristalización y una limitada propiedad de barrera a gases como oxígeno y agua, que limita su utilización en packaging y envasado de alimentos (**Farah et al., 2015; Raquez, Habibi, Murariu & Dubois, 2013; Singh, Gupta, & Verma, 2003**).

En los últimos años se han desarrollado múltiples investigaciones dirigidas a controlar las propiedades superficiales del PLA mediante modificaciones químicas y a mejorar sus propiedades mecánicas, térmicas y de permeabilidad, preparando nanocompuestos con refuerzos o rellenos de dimensión nanométrica.

### **1.5.3 Nanocompuestos de matriz polimérica de PLA**

En el campo de los nanocompuestos de matriz polimérica de PLA se han utilizado como fase de refuerzo una gran variedad de nanomateriales de diferentes morfologías que incluyen, por ejemplo, formas esféricas y poliédricas tridimensionales (sílice, silsesquioxano poliédrico oligomérico, óxidos metálicos), nanofibras bidimensionales (nanotubos de carbono, sustratos nanocelulósicos) y láminas unidimensionales (hidróxidos dobles laminares y hojas de grafeno) (**Herron & Thorn, 1998; Raquez et al., 2013**).

En lo que respecta a los sustratos nanocelulósicos, su biodisponibilidad, renovabilidad y biodegradabilidad, han motivado en gran medida su uso frente a otros nano-refuerzos. Además, se ha informado que, una vez superada la limitación

relacionada con la hidrofiliidad de la celulosa, la compatibilización del PLA con este tipo de materiales conlleva a un mejoramiento significativo de algunas de sus propiedades, como las mecánicas, térmicas y de barrera al vapor de agua (**Raquez et al., 2013**).

#### **1.5.3.1 Procesamiento de nanocompuestos PLA/Nanocelulosa**

A continuación, se resumen las principales metodologías utilizadas en la literatura para preparar nanocompuestos de PLA con diferentes tipos de nanocelulosa.

En este contexto, la metodología de evaporación de solvente (“*solvent casting*”) es uno de los protocolos más utilizados para preparar compuestos a escala laboratorio, tanto con nanofibras como con nanocristales de celulosa. La principal ventaja de esta metodología es la posibilidad de utilizar los nanomateriales sin un proceso previo de secado, lo cual es determinante cuando se trabaja con nanofibras de celulosa, cuya agregación irreversible durante el secado (hornificación) es un problema técnico grave. También se destaca la posibilidad de utilizar equipamiento específico para evitar la agregación del refuerzo, como ultrasonificadores de punta y homogeneizadores. En el proceso de casting, la matriz de PLA se disuelve en un solvente adecuado y, para favorecer la dispersión de los refuerzos en la matriz, estos suelen suspenderse previamente en el mismo solvente de trabajo. Finalmente, después de combinar todos los componentes, se procede a la evaporación del solvente (**Raquez et al., 2013**). En el caso del PLA los solventes más frecuentemente utilizados son el diclorometano y el cloroformo.

Por otro lado, las tecnologías de procesamiento en fundido son herramientas claves cuando el objetivo es preparar materiales a gran escala. En el proceso en fundido, la nanocelulosa es dispersada en un polímero termoplástico fundido (en este caso el PLA) de manera discontinua o continua. Los procesos discontinuos o “*batch*” utilizan Brabenders o microextrusoras para el procesamiento, las cuales tienen cámaras cerradas en donde se funden y mezclan pequeñas cantidades de los materiales a compatibilizar durante tiempos considerablemente largos. Algunos de los inconvenientes del uso de estas técnicas son la decoloración y degradación del polímero o de la nanocelulosa, como consecuencia de los largos



tiempos de procesamiento. Por otra parte, en los procesos de tipo continuo, los materiales son alimentados continuamente en la unidad de procesamiento para su fundido y mezclado y, en comparación con el procesamiento en batch, son las metodologías más utilizadas para la producción a gran escala debido a su mejor mezclado y ventilación. Sin embargo, los altos requerimientos de masa de los materiales durante todas las fases de producción a menudo limitan su aplicación en el campo de la nanotecnología por la baja cantidad de material del que se suele disponer (**Oksman et al., 2016**).

Finalmente, es importante mencionar que para los procesos en fundido la liofilización de los nanocristales de celulosa facilita su utilización y ha sido frecuentemente informada en la bibliografía (**Fortunati et al., 2012; Oksman, Mathew, Bondeson, & Kvien, 2006**). Caso contrario es el de las nanofibras de celulosa que se agregan fuertemente cuando se someten a procesos de secado y no es posible obtener un polvo. Recientemente, para superar este tipo de inconvenientes, algunos investigadores han utilizado el enfoque de preparación de un “master-batch” de los compuestos PLA/celulosa nanofibrilada por casting, que se utiliza como vehículo de la nanocelulosa, seguido de su posterior dispersión en la matriz polimérica fundida (**Jonoobi, Harun, Mathew, & Oksman, 2010; Oksman et al., 2016**).

#### **1.5.3.2 Algunos ejemplos del uso de nanocelulosa como fase de refuerzo del PLA**

En los últimos años, tanto los nanocristales como las nanofibras de celulosa han sido objeto de estudio como nano-refuerzo de PLA por parte de varios grupos de investigación, debido a todas las propiedades de interés que se han descrito a lo largo de este Capítulo de la Tesis.

Brevemente, y como parte de una revisión general a profundizar en el Capítulo de compuestos, se pueden citar los trabajos de Bondeson y Oksman (**Bondeson & Oksman, 2007; Oksman et al., 2006**), en los cuales para favorecer la dispersión de los CNC en la matriz de PLA utilizaron un medio de *N,N*-dimetilacetamida/cloruro de Litio para separar los nanocristales mediante hinchamiento y un surfactante aniónico para mejorar su compatibilidad,

respectivamente. En ambos casos la dispersión mejoró considerablemente, pero causaron la degradación de los compuestos a altas temperaturas de procesamiento. Por su parte Fortunati y colaboradores, prepararon mediante extrusión bionanocompuestos multifuncionales usando CNC recubiertos por un surfactante, nanopartículas de plata y PLA, con una buena dispersión y mejoramientos significativos en las propiedades mecánicas y térmicas del material **(Fortunati et al., 2012)**. En cuanto a las nanofibrillas de celulosa como refuerzo de PLA, una de las primeras contribuciones en el tema propuso inyectar una suspensión acuosa de CNF en el PLA fundido durante la extrusión, sin resultados muy prometedores debido a la agregación causada por la incompatibilidad química **(Chakraborty, Sain & Kortschot, 2005)**. Más recientemente, Jonoobi y colaboradores prepararon por casting compuestos de CNF en PLA con alto contenido de refuerzo, que subsecuentemente se mezclaron con la matriz fundida de PLA mediante extrusión. Como resultado se obtuvo un mejoramiento relativo de la dispersión y de las propiedades mecánicas finales del material **(Jonoobi et al., 2010)**.

En cuanto a los nanocompuestos de PLA con nanocelulosa covalentemente modificada, se puede mencionar por ejemplo la preparación de nanocompuestos por extrusión reforzados con nanofibras de celulosa bacteriana esterificadas con ácidos de distintas longitudes de cadena (C2-C6 y C12), los cuales evidenciaron un mejoramiento significativo de las propiedades mecánicas del PLA **(Lee, Blaker, & Bismarck, 2009)**. Por otro lado, en la preparación de nanocompuestos por casting de PLA y CNF **(Tingaut, Zimmermann, & Lopez-Suevos, 2009)** y CNC **(Lin, Huang, Chang, Feng, & Yu, 2011)** acetilados, los autores describieron una dispersión mucho más homogénea que cuando se usaron los refuerzos sin modificar, lo que se tradujo en el mejoramiento de las propiedades mecánicas de los compuestos. En secciones posteriores de la presente Tesis, dedicadas exclusivamente a la preparación de nanocompuestos de BNC con PLA, se resume brevemente los mejoramientos en las propiedades del PLA informados en la bibliografía derivados del uso de nano-refuerzos de origen celulósico.

En este contexto, fue motivo de estudio en esta Tesis la preparación por casting de nanocompuestos de PLA reforzados con nanocelulosa bacteriana

hidrofobizada mediante un método de acetilación poco explorado en la literatura como es el que utiliza  $\alpha$ -hidroxiácidos de origen natural como catalizadores.

## **1.6 Objetivos de la Tesis**

### **1.6.1 Objetivo general**

- ✓ Desarrollar procesos sostenibles que permitan obtener derivados de biopolímeros naturales para aplicaciones tecnológicas específicas.

### **1.6.2 Objetivos específicos**

- ✓ Obtener nanocelulosa bacteriana a partir de fuentes de carbono no convencionales de bajo costo y abundantes en el país.
- ✓ Desarrollar protocolos sostenibles de modificación superficial de las nanofibrillas de celulosa que permitan su compatibilización con medios/matrices de menor polaridad. En particular, estudiar la aplicabilidad de una vía organocatalítica sostenible de esterificación de las nanofibrillas.
- ✓ Estudiar el efecto de las condiciones de reacción en el grado de sustitución conferido a la BNC.
- ✓ Caracterizar las nanofibras modificadas en términos de estructura química, morfología, cristalinidad, propiedades térmicas y polaridad.
- ✓ Utilizar las nanocelulosas modificadas como refuerzo de matrices poliméricas biodegradables hidrofóbicas, en particular el ácido poliláctico.
- ✓ Caracterizar los nanocompuestos obtenidos en términos de propiedades mecánicas, morfológicas, térmicas y de barrera.

## 1.7 Bibliografía del Capítulo 1

Abdul Khalil H. P. S., Bhat, A. H., Yusra, I. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: a review. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87, 963–979.

Abdul Khalil, H. P. S., Bhat, A. H., Abu Bakar, A., Paridah, M. T., Zaidul, I. S. M., Jawaaid, M. Cellulosic nanocomposites from natural fibers for medical applications: a review, In *Handbook of Polymer Nanocomposites. Processing, Performance and Application*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2015.

Amass, W., Amass, A., Tighe, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation Studies. *Polymer International*, 1999, 47, 89–144.

Avérous L., Pollet E. Biodegradable Polymers, In *Environmental Silicate Nano-Biocomposites. Green Energy and Technology*, Springer, London, 2012.

Atalla, R. H., Vanderhart, D. I. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science*, 1984, 223, 283–285.

Ávila Ramírez, J. A., Juan Suriano, C., Cerrutti, P., Foresti, M. L. Surface esterification of cellulose nanofibers by a simple organocatalytic methodology. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 114, 416–423.

Berglund, L. A. Peijs, T. Cellulose biocomposites- from bulk moldings to nanostructured systems. *MRS Bulletin*, 2010, 35, 201–207.

Bogue, R. Nanocomposites: a review of technology and applications. *Assembly Automation*, 2011, 31, 106–112.

Bondeson, D., Oksman, K. Dispersion and characteristics of surfactant modified cellulose whiskers nanocomposites. *Composite Interfaces*, 2007, 14, 617–630.

Braun, B., Dorgan, J. R. Single-step method for the isolation and surface functionalization of cellulosic nanowhiskers. *Biomacromolecules*, 2009, 10, 334–341.

Casas, J., Persson, P. V., Iversen, T., Córdova, A. Direct organocatalytic ring opening polymerizations of lactones. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2004, 346, 1087–1089.

Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J. L., Caro, G., Mondragon, I., Gañán, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter Swingsii* Sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84, 96–102.

Cerrutti, P., Roldán, P., Martínez García, R., Galvagno, M. A., Vázquez, A., Foresti, M. L. Production of bacterial nanocellulose from wine industry residues: importance of fermentation time on pellicle characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 2016, 133, 1–9.

Chakraborty, A., Sain, M., Kortschot, M. Cellulose microfibrils: a novel method of preparation using high shear refining and cryocrushing. *Holzforschung*, 2005, 59, 102–107.

Chen, H. Chemical composition and structure of natural lignocellulose, In *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*, Chemical Industry Press, Beijing and Springer Science C Business Media Dordrecht, 2014.

Cherian, B. M., Lopes Leao, A., Ferreira de Souza, S., Thomas, S., Pothan, L. A., Kottaisamy, M. Cellulose nanocomposites for high-performance applications, In *Cellulose Fibers: Bio- and Nano-Polymer Composites*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2011.

Debzi, E. M., Chanzy, H., Sugiyama, J., Tekely, P., Excoffier, G. The I $\alpha$   $\rightarrow$  I $\beta$  transformation of highly crystalline cellulose by annealing in various mediums. *Macromolecules*, 1991, 24, 6816–6822.

De Marco Lima, G., Sierakowski, M. R., Faria-Tischer, P. C. S., Tischer, C. A. Characterisation of bacterial cellulose partly acetylated by dimethylacetamide/lithium chloride. *Materials Science Engineering*, 2011, 31, 190–197.

De Souza Lima, M. M., Borsali, R. Rodlike cellulose microcrystals: structure, properties, and applications. *Macromolecular Rapid Communications*, 2004, 25, 771–787.

Domínguez de María, P. Minimal hydrolases: organocatalytic ring-opening polymerizations catalyzed by naturally occurring carboxylic acids. *ChemCatChem*, 2010, 2, 487–492.

Farah, S., Anderson, D. G., Langer, R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications: a comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 107, 367–392.

Farah, S., Kunduru, K. R. Basu, A., Domb. A. J. Molecular weight determination of polyethylene terephthalate, In *Poly (Ethylene Terephthalate) Based Blends, Composites and Nanocomposites*, William Andrew Publishing, 2015.

Filson, P. B., Dawson-Andoh, B. E., Schwegler-Berry, D. Enzymatic-mediated production of cellulose nanocrystals from recycled pulp. *Green Chemistry*, 2009, 11, 1808–1814.

Fisher C. H. Anselm Payen. Pioneer in natural polymers and industrial chemistry, In *Pioneers in Polymer Science. Chemists and Chemistry, Volume 10*. Springer, Dordrecht, 1989.

Fortunati, E., Armentano, I., Zhou, Q., Iannoni, A., Saino, E., Visai, L., Berglund, L. A., Kenny, J. M. Multifunctional bionanocomposite films of poly(lactic acid), cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87, 1596–1605.

Fortunati, E., Rinaldi, S., Peltzer, M., Bloise, N., Visai, L., Armentano, I., Jiménez, A., Latterini, L., Kenny, J. M. Nano-biocomposite films with modified cellulose nanocrystals and synthesized silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 101, 1122–1133.

Freudenberg, K. Nachtrag zu der mitteilung über Methylcellulose. Zugleich 6. Mitteilung über lignin und celluloses. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1928, 461, 130–131.

Garlotta, D. J. A literature review of poly(lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 2002, 9, 63–84.

George, J., Ramana, K. V., Bawa, A. S., Siddaramaiah, B. Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 48, 50–57.

Goffin, A. L., Raquez, J. M., Duquesne, E., Siqueira, G., Habibi, Y., Dufresne, A., Dubois, Ph. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) based nanocomposites reinforced by surface-grafted cellulose nanowhiskers via extrusion processing: morphology, rheology, and thermo-mechanical properties. *Polymer*, 2011, 52, 1532–1538.

Hafrén, J., Córdova, A. Direct organocatalytic polymerization from cellulose fibers. *Macromolecular Rapid Communications*, 2005, 26, 82–86.

Haworth, W. N. A Revision of the structural formula of glucose. *Nature*, 1925, 116, 430.

Haworth, W. N. The structure of carbohydrates. *Helvetica Chimica Acta*, 1928, 11, 534–548

Heinze, T., Liebert, T., Koschella, A. *Esterification of polysaccharides*. Springer Science & Business Media, Berlin, 2006.

Henton, D. E., Gruber, P., Lunt, J., Randall, J. Polylactic acid technology, In *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2005.

Herron, N., Thorn, D. L. Nanoparticles: uses and relationships to molecular cluster compounds. *Advanced Materials*, 1998, 10, 1173–1184.

Hestrin, S., Schramm, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 1954, 58, 345–352.

Horikawa, Y., Sugiyama, J. Localization of crystalline allomorphs in cellulose microfibril. *Biomacromolecules*, 2009, 10, 2235–2239.

Hu, W., Chen, S., Xu, Q., Wang, H. Solvent-free acetylation of bacterial cellulose under moderate conditions. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83, 1575–1581.

Hubbe, M. A., Rojas, O. J., Lucia, L. A. Green modification of surface characteristics of cellulosic materials at the molecular or nano scale: a review. *BioResources*, 2015, 10, 6095–6206.

Hull, D., Clyne, T. W. An introduction to composite materials. Second edition, Cambridge University Press, 1996.

Ifuku, S., Nogi, M., Abe, K., Handa, K., Nakatsubo, F., Yano, H. Surface modification of bacterial cellulose nanofibers for property enhancement of optically transparent composites: dependence on acetyl-group DS. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 1973–1978.

Jones, R. M. *Mechanics of Composite Materials*. Second edition, Taylor & Francis Group, 1999.

Jonoobi, M., Harun, J., Mathew, A. P., Oksman, K. Mechanical properties of cellulose nanofiber (CNF) reinforced polylactic acid (PLA) prepared by twin screw extrusion. *Composite Science Technology*, 2010, 70, 1742–1747.

Jozala, A. F., De Lencastre-Novaes, L. C., Lopes, A. M., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., Mazzola, P. G., Pessoa, A. Jr., Grotto, D., Gerenutti, M., Chaud, M. V. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100, 2063–2072.

Kang, H., Liu, R., Huang, Y. Graft modification of cellulose: methods, properties and applications. *Polymer*, 2015, 70, 1–16.

Kaw, K. *Mechanics of Composite Materials. An Introduction to Composite Materials*. Second edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006.

Kim, D-Y., Nishiyama, Y., Kuga, S. Surface acetylation of bacterial cellulose. *Cellulose*, 2002, 9, 361–367.

Kim, J., Montero, G., Habibi, Y., Hinestroza, J. P., Genzer, J., Argyropoulos, D. S., Rojas, O. J. Dispersion of cellulose crystallites by nonionic surfactants in a hydrophobic polymer matrix. *Polymer Engineering & Science*, 2009, 49, 2054–2061.

Klemm, F., Heublein, B., Fink, H-P., Bohn, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Chemie International Edition*, 2005, 44, 3358–3393.

Langan, P., Nishiyama, Y., Chanzy, H. Revised structure and hydrogen-bonding system in cellulose II from a neutron fiber diffraction analysis, *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121, 9940–9946.

Lee, K-Y., Blaker, J. J., Bismarck, A. Surface functionalisation of bacterial cellulose as the route to produce green polylactide nanocomposites with improved properties. *Composite Science Technology*, 2009, 69, 2724–2733.

Lin, N., Huang, J., Chang, P. R., Feng, J., Yu, J. Surface acetylation of cellulose nanocrystal and its reinforcing function in poly(lactic acid). *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83, 1834–1842

Lin, N., Dufresne, A. Physical and/or chemical compatibilization of extruded cellulose nanocrystal reinforced polystyrene nanocomposites. *Macromolecules*, 2013, 46, 5570–5583.

Missoum, K., Belgacem, M. N., Bras, J. Nanofibrillated cellulose surface modification: a review. *Materials*, 2013, 6, 1745–1766.

Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., Youngblood, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40, 3941–3994.

Myers, D. *Surfactant Science and Technology*, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., 2005.

Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., Langan, P. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I $\beta$  from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125, 14300–14306.

Oksman, K., Mathew, A. P., Bondeson, D., Kvien, I. Manufacturing process of cellulose whiskers/polylactic acid nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 2006, 66, 2776–2784.

Oksman, K., Aitomäki, Y., Mathew, A. P., Siqueira, G., Zhou, Q., Butylina, S., Tanpichai, S., Zhou, X., Hooshmand, S. Review of the recent developments in cellulose nanocomposite processing. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 2016, 83, 2–18.

O'Sullivan, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 1997, 4, 173–207.



Pääkkö, M., Ankerfors, M., Kosonen, H., Nykänen, A., Ahola, S., Österberg, M., Ruokolainen, J., Laine, J., Larsson, P. T., Ikkala, O., Lindström, T. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 1934–1941.

Persson, P. V., Schroder, J., Wickholm, K., Hedenstrom, E., Iversen, T. Selective organocatalytic ring-opening polymerization: a versatile route to carbohydrate functionalized poly( $\epsilon$ -caprolactones). *Macromolecules*, 2004, 37, 5889–5893.

Rani, M. U., Rastogi, N. K., Appaiah, K. A. Statistical optimization of medium composition for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk extractan agro-industry waste. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 21, 739–745.

Raquez, J. M., Habibi, Y., Murariu, M., Dubois, P. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. *Progress in Polymer Science*, 2013, 38, 1504–1542.

Shah, N., Ul-Islama, M., Khattaka, W. A., Parka, J. K. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98, 1585–1598.

Singh, B., Gupta, M., Verma, A. Polyester molding compounds of natural fibers and wollastonite. *Composites*, 2003, 34, 1035–1043.

Siqueira, G., Bras, J., Dufresne, A. Cellulose whiskers versus microfibrils: influence of the nature of the nanoparticle and its surface functionalization on the thermal and mechanical properties of nanocomposites. *Biomacromolecules*, 2009, 10, 425–432.

Siró, I., Plackett, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, 2010, 17, 459–494.

Sponsler, O. L., Dore, W. H. The structure of ramie cellulose as derived from X-ray data, In *Colloid Symposium Monograph Volume 4*, The Chemical Catalog Company Inc., New York, 1926.

Suetsugu, M., Kotera, M., Nishino, T. Cellulosic nanocomposite prepared by acetylation of bacterial cellulose using supercritical carbon dioxide. In *17th International Conference on Composite Materials*, 2009.

Tingaut, P., Zimmermann, T., Lopez-Suevos, F. Synthesis and characterization of bionanocomposites with tunable properties from poly(lactic acid) and acetylated microfibrillated cellulose. *Biomacromolecules*, 2009, 11, 454–464.

Tomé, L. C., Pinto, R. J. B., Trovatti, E., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D. Neto, C. P., Gandini, A. Transparent bionanocomposites with improved properties prepared from acetylated bacterial cellulose and poly(lactic acid) through a simple approach. *Green Chemistry*, 2011a, 13, 419–427.

Tomé, L. C., Freire, M. G., Rebelo, L. P. N., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Marrucho, I. M. Surface hydrophobization of bacterial and vegetable cellulose fibers using ionic liquids as solvent media and catalysts. *Green Chemistry*, 2011b, 13, 2464–2470.

Vázquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., Galvagno, M. A. Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Polymers and the Environment*, 2013, 21, 545–554.

Vázquez, A., Foresti, M. L., Morán, J. I., Cyras, V. P. Extraction and production of cellulose nanofibers, In *Handbook of Polymer Nanocomposites. Processing, Performance and Application – Volume C: Polymer Nanocomposites of Cellulose Nanoparticles*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2014.

Vroman, I., Tighzert, L. Biodegradable Polymers. *Materials*, 2009, 2, 307–344.

Wang, Y., Wang, X., Xie, Y., Zhang, K. Functional nanomaterials through esterification of cellulose: a review of chemistry and application. *Cellulose*, 2018, 25, 3703–3731.

Wu, J. M., Liu, R. H. Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery waste water. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115, 284–290.

Yamamoto, H., Horii, F., Odani, H. Structural changes of native cellulose crystals induced by annealing in aqueous alkaline and acidic solutions at high temperatures. *Macromolecules*, 1989, 22, 4130–4132.

Zugenmaier, P. Contribution to the historical development of macromolecular chemistry exemplified on cellulose. *Cellulose Chemistry and Technology*, 2009, 43, 351–378.

## **Normas consultadas**

ISO/TS20477. “Nanotechnologies – Standard terms and their definition for cellulose Nanomaterial”. 2017.

## 2. Experimental

*En este Capítulo se detallan los materiales utilizados para la obtención y modificación organocatalítica de los diferentes sustratos nanocelulósicos estudiados, así como también los necesarios para la preparación de los materiales compuestos de matriz de PLA. Con respecto a los métodos utilizados para el desarrollo experimental de la Tesis se exponen en primer lugar los concernientes a la producción biotecnológica de nanofibras de celulosa de origen bacteriano (BNC) y a la obtención de nanocristales de celulosa de origen vegetal (CNC). Posteriormente, se esquematiza el sistema experimental utilizado para la acetilación organocatalítica y se brindan los detalles metodológicos de preacondicionamiento y recuperación final de las muestras. Luego, se enumeran todas las condiciones de reacción implementadas a lo largo de la Tesis para acetilar BNC y CNC según cada caso, y se describe la metodología de saponificación utilizada para la determinación del nivel de acetilación o grado de sustitución (GS) mediante titulación por retorno.*

*En cuanto a la preparación de los nanocompuestos de matriz de PLA y nanocelulosa bacteriana acetilada, se ilustra la metodología utilizada de evaporación de solvente y se detallan los distintos materiales formulados, que incluyen el uso de nanocelulosa con GS variable y en distintos porcentajes.*

*Finalmente, se presentan las diversas técnicas de caracterización de materiales implementadas a lo largo de toda la Tesis.*



## 2.1 Consideraciones generales

Todos las drogas y solventes usados fueron comerciales y se utilizaron sin ninguna purificación previa. En todos los experimentos que requirieron sonicación se utilizó un sonicador de punta (Vibracell, 750) operado a  $\approx 300\text{W}$ . Las muestras que así lo requirieron (CNC) fueron liofilizadas a  $-50^{\circ}\text{C}$  con una presión de vacío de 0,12 mbar durante 48 h en un liofilizador Labconco FreeZone Benchtop. La recuperación por centrifugación de las suspensiones de CNC acetilados se llevó a cabo a 8500 rpm en ciclos de 30 min y a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . La homogeneización mecánica en la preparación de los nanocompuestos se llevó a cabo con un homogeneizador Ultraturrax D160 operado a 18000 rpm durante ciclos consecutivos de 10 minutos.

## 2.2 Obtención de nanocelulosas

### 2.2.1 Producción de nanocelulosa bacteriana (BNC)

La BNC se obtuvo utilizando la bacteria *Gluconacetobacter xylinus* NRRL B-42, gentilmente proporcionada por el Dr. Luis Ielpi de la Fundación Instituto Leloir (Buenos Aires, Argentina).

El inóculo de *G. xylinus* se cultivó en Erlenmeyers de 100 mL con 20 mL de medio Hestrin and Schramm (HS) (**Hestrin & Schramm, 1954**) formulado con dextrosa anhidra (2,0), peptona de carne (0,5), extracto de levadura (0,5), fosfato disódico anhidro (0,27) y ácido cítrico (0,15)% (p/v). La incubación se llevó a cabo bajo agitación orbital durante 48 h a  $28^{\circ}\text{C}$  y 200 rpm. Para la producción de la BNC, se transfirió el volumen requerido para alcanzar una concentración final del 10 % (v/v) de inóculo a bandejas de acero de 10 L que contenían 5 L de medio de fermentación compuesto por 4,0% (p/v) de glicerol y 8,0% (p/v) de macerado de maíz, y se cultivó estáticamente durante 14 días. Las películas de nanocelulosa obtenidas se lavaron con agua destilada para remover el medio de cultivo y se homogeneizaron en una licuadora con una solución de KOH al 5 % (p/v) por 4 min. Luego se dejaron en la solución de KOH durante 14 h para eliminar el material celular, y finalmente se llevaron a pH 7 con agua destilada para su posterior

utilización. El material obtenido es un hidrogel con aproximadamente 97–98 % de humedad y un 2–3 % de sólidos.

Las membranas de nanocelulosa bacteriana de 3 días de fermentación se obtuvieron de la manera descrita en el párrafo anterior en el medio HS en Erlenmeyers de 250 mL. Al cabo de este tiempo, las membranas se procesaron con KOH y lavaron sucesivamente con agua destilada hasta pH neutro como se describió previamente.

La producción de la BNC se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Patricia Cerrutti, Profesora de Microbiología Industrial de la Facultad de Ingeniería de la UBA e integrante del Instituto de Tecnología en Polímeros y Nanotecnología.

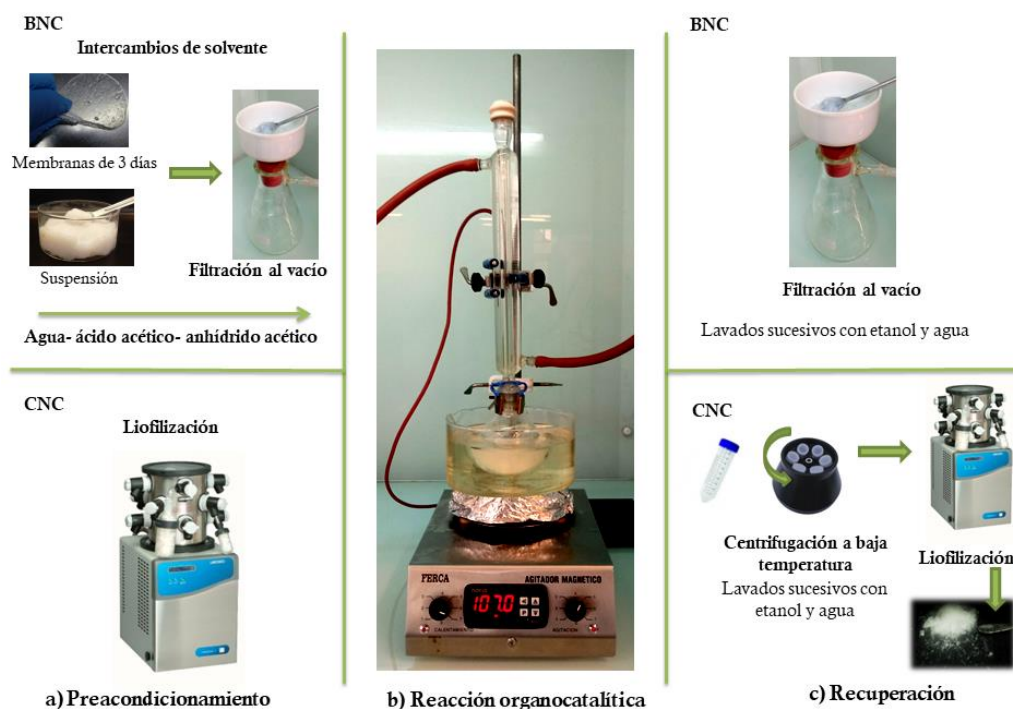
### **2.2.2 Producción de nanocristales de celulosa de origen vegetal (CNC)**

La celulosa nanocristalina fue proporcionada por la Dra. Elena Fortunati del Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental de la Universidad de Perugia – Italia, quien la obtuvo a partir de celulosa microcristalina (MCC) comercial de pulpa de madera Sigma Aldrich (dimensiones 10–15  $\mu\text{m}$ ), siguiendo protocolos de hidrólisis ácida informados en la bibliografía (Suspensión de MCC tratada en una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 64% (p/v) a 45°C por 30 min (**Cranston & Gray, 2006**)). Finalizado este tiempo la suspensión se diluyó 20 veces con agua desionizada para detener la reacción. La suspensión diluida se centrifugó a 4500 rpm durante 20 min y se decantó el sobrenadante para recuperar el sólido. Luego, el sólido obtenido se dializó contra agua corriente durante 5 días y finalmente se ultrasonizó con una amplitud de 40% ( $\approx 300$  W) durante 5 min. Las suspensiones acuosas de CNC obtenidas tuvieron una concentración de  $\approx 0,4\%$  (p/p), con un rendimiento total del 20%. Finalmente, las suspensiones de CNC se liofilizaron obteniéndose la celulosa nanocristalina en forma de polvo para su posterior acetilación.

## 2.3 Acetilación de nanocelulosa catalizada por $\alpha$ -hidroxiácidos

### 2.3.1 Preacondicionamiento del material para la reacción de esterificación

Previo a la reacción de esterificación es necesario eliminar el agua contenida en la BNC licuada y en las membranas para evitar la hidrólisis del agente acilante. Y la reversión de la reacción. En vista de las limitaciones asociadas a la hornificación (agregación irreversible) de la BNC durante el secado (**Fernandes Diniz, Gil, & Castro, 2004**), la remoción de agua se realizó por intercambio de solvente (agua  $\rightarrow$  ácido acético (2 x 40 mL)  $\rightarrow$  anhídrido acético (2 x 40 mL)). Durante el desarrollo de la presente Tesis para algunos estudios específicos los intercambios de solvente se llevaron solamente hasta ácido acético (ver detalle más adelante). En todos los casos, las muestras de BNC se pusieron en contacto con el correspondiente solvente y el sistema se mantuvo con agitación magnética constante durante 10 min y luego se filtró al vacío.



**Figura 2.1** Protocolo de esterificación organocatalítica para nanocelulosa bacteriana y nanocrisales de celulosa vegetal. **(a)** Preacondicionamiento, **(b)** acetilación organocatalítica, **(c)** recuperación.

### 2.3.2 Reacción de acetilación de nanocelulosas

Para la acetilación de BNC y CNC se utilizaron como catalizadores los siguientes  $\alpha$ -hidroxiácidos: ácido láctico, ácido (L)-tartárico y ácido cítrico. El agente acilante empleado fue en todos los casos el anhídrido acético.

La reacción se llevó a cabo en un balón (de 100 o 1000 mL según el caso) donde se contactaron la nanocelulosa (BNC o CNC), el acilante (anhídrido acético) y el catalizador  $\alpha$ -hidroxiácido. Al balón se acopló un condensador de reflujo (**Figura 2.1**), y se operó a temperatura controlada entre 90°C–140°C en un baño termostático de aceite, con o sin agitación magnética durante el tiempo de reacción previsto. Las reacciones de acetilación se llevaron a cabo sobre suspensiones de BNC (membranas licuadas) (**Capítulos 3 y 4**), membranas enteras de BNC de 3 días de fermentación (**Capítulo 5**) y los CNC de origen vegetal (**Capítulo 5**), según se detalla a continuación.

#### 2.3.2.1 Acetilación de suspensiones de BNC

Para la acetilación de la BNC en forma de suspensión de nanofibras se adicionaron al balón todos los reactantes al mismo tiempo a temperatura ambiente, y se calentó el sistema hasta llegar a la temperatura de reacción elegida. A partir de ese momento se contabilizó el tiempo de reacción, manteniendo la mezcla con agitación magnética permanente. Para este sustrato se trabajó en todos los casos con 0,5 g de masa seca de BNC (3,087 mmol UAG) y 50 mL de anhídrido acético (0,53 mol) como acilante.

En el testeo los tres catalizadores de tipo  $\alpha$ -hidroxiácido (ácidos láctico, (L)-tartárico y cítrico, **Capítulo 3**), la reacción de acetilación de la BNC en suspensión intercambiada a ácido acético se llevó a cabo en balones de 100 mL empleando una carga de catalizador de 1,01 mmol ácido  $\alpha$ -hidroxiácido/mmol UAG y fijando un tiempo de reacción de 7 h y una temperatura de 120°C.

El estudio de la influencia de las diferentes variables de reacción en el grado de acetilación del producto se llevó a cabo usando ácido cítrico como catalizador. Inicialmente se evaluó el efecto de la cantidad de catalizador usando entre 0,08–1,01



mmol ácido cítrico/mmol UAG durante 3 h de reacción y a 120°C. Posteriormente se seleccionó una menor carga de catalizador (0,34 mmol ácido cítrico/mmol UAG) para estudiar el efecto de la temperatura en un intervalo comprendido entre 90 y 140°C a un tiempo fijo de 3 h. Luego se estudió el efecto del tiempo de reacción entre 0,5 y 7 h a 120°C, con una carga de catalizador de 0,34 mmol/mmol.

Finalmente, la reacción de escalado se realizó en condiciones de temperatura, tiempo y carga de catalizador fijas, multiplicando 5 veces las cantidades de BNC y acilante utilizadas anteriormente.

En todos los casos se realizó un blanco sin catalizador con el fin de estimar el aporte de la reacción no catalizada al grado de acetilación del producto final.

#### **2.3.2.2 Acetilación de CNC**

La acetilación de los CNC liofilizados (**Capítulo 5**) se llevó a cabo en forma análoga a la de la BNC en suspensión usando 0,7 g de peso seco (4,32 mmol UAG) de muestra, 50 mL (0,53 mol) de anhídrido acético y dos cargas diferentes de catalizador para modular el GS (0,06 y 0,6 mmol ácido cítrico/mmol UAG), en balones de 100 mL a una temperatura de 120°C durante 3 h.

#### **2.3.2.3 Acetilación de membranas enteras de BNC**

Teniendo en cuenta los ensayos realizados con BNC en suspensión (**Capítulos 3 y 4**), se exploró la acetilación organocatalítica sobre membranas enteras de BNC de 3 días de fermentación (**Capítulo 5**), con una masa seca de 0,06 g (0,37 mmol UAG), utilizando una carga de catalizador de 0,14 mmol ácido cítrico/mmol UAG, 35 mL (0,37 mol) de anhídrido acético como acilante, y operando a una temperatura de 120°C durante 3 h. La reacción se llevó a cabo de la misma manera que para BNC en suspensión, con la diferencia que para este caso primero se disolvió el catalizador en el acilante a 110°C y luego se agregó la membrana de BNC a acetilar. En estos ensayos se operó sin agitación para evitar el plegado de la membrana.

### 2.3.3 Recuperación de productos

Al concluir el tiempo de reacción, en el caso de la BNC en suspensión y de las membranas de BNC, se desacopló el balón del condensador y se dejó enfriando hasta alcanzar la temperatura ambiente. El producto sólido se separó mediante filtración al vacío y se lavó con etanol (3 x 40 mL) y agua (4 x 40 mL) hasta neutralidad de las aguas de lavado, y el producto se conservó como pellet húmedo hasta su utilización. En el caso de los CNC, luego de cada lavado el producto se separó por centrifugación (8500 rpm, 30 minutos) y, finalmente, la suspensión resultante de nanocristales acetilados se liofilizó como se indicó en la **Sección 2.1**.

## 2.4 Preparación de materiales compuestos biodegradables (PLA/Nanocelulosa)

Como matriz de los nanocompuestos se utilizó ácido poliláctico (PLA) comercial Nature Works® 3051D con un peso molecular ( $M_n$ ) de  $1,42 \times 10^4$  g/mol, una gravedad específica de 1,24 y un índice de flujo de fusión (MFI) de 7,75 g/10 min (210°C, 2,16 kg), disuelto en cloroformo.

Para la preparación de los nanocompuestos se usó la metodología de evaporación de solvente disolviendo el PLA en cloroformo. El estudio del efecto de la BNC como nano-refuerzo se realizó inicialmente utilizando BNC en suspensión con tres GS diferentes a un igual porcentaje en masa respecto a la matriz del 3% (p/p). Posteriormente, se seleccionó un valor de GS para evaluar el efecto del porcentaje de refuerzo (3, 5, 10 % (p/p)) en la matriz.

Las muestras de BNC en suspensión (nativa y acetiladas) se sometieron a intercambio de solvente agua (2x20 mL)→acetona (2x20 mL)→cloroformo (2x20 mL) con homogeneización intermedia durante 10 minutos a 18000 rpm.

Para la preparación de la película de PLA blanco usado como control se disolvieron 2g de PLA (pellets) en 65 mL de cloroformo con agitación magnética (1000 rpm) a temperatura ambiente durante 3h. Luego, la solución de PLA se vertió sobre cápsulas de Petri de 90 mm de diámetro y se dejó secar por 48h a temperatura ambiente. Para las películas de los nanocompuestos la solución de PLA previamente

preparada se mezcló con la BNC dispersada en cloroformo para tener un contenido final de nano-refuerzo del 3, 5, 10% (p/p) según el caso. Las mezclas se homogeneizaron a 18000 rpm durante 15 min y luego se dejaron evaporar por 48 h, siguiendo el mismo protocolo usado para las películas del PLA blanco. Finalizado este tiempo, todas las películas se secaron en estufa de vacío a 40°C durante 4 semanas con el fin de garantizar la remoción del cloroformo remanente de las muestras.

## 2.5 Técnicas de caracterización utilizadas

### 2.5.1 Determinación del grado de sustitución (GS) conferido mediante saponificación

El porcentaje de acetilación (% acetilo) y GS de las muestras se determinó por saponificación heterogénea con NaOH 0,1 N y titulación por retorno con HCl 0,1 N. La metodología comprende la hidrólisis básica de los grupos éster presentes en la celulosa y la titulación del exceso de NaOH con HCl. La técnica se adaptó de la norma **ASTM D817-12 “Standard Test Methods of Testing Cellulose Acetate”**, desarrollada para acetato de celulosa. Brevemente, en Erlenmeyers de 50 mL se añadieron aproximadamente 0,1 g de muestra previamente secada a 110 °C durante 2 h y 10 mL de alcohol etílico (75%). La mezcla se calentó a 55 °C durante 30 min. Finalizado el tiempo de calentamiento se agregó NaOH 0,1 N a las suspensiones hasta viraje de fenolftaleína (1 o 2 gotas) con el fin de neutralizar posibles trazas ácidas que hubieran quedado en la muestra luego del proceso de acetilación. A continuación, se añadieron 10 mL de NaOH 0,1N y se calentaron nuevamente las suspensiones a 55 °C durante 15 min. Finalmente, los matraces se dejaron de forma estática a temperatura ambiente durante 48 h. Transcurrido el tiempo de hidrólisis, el exceso de NaOH se valoró con una solución 0,1 N de HCl usando fenolftaleína como indicador. Para cada grupo de muestras se preparó un blanco de nanocelulosa no derivatizada en las mismas condiciones. Las soluciones de NaOH y HCl se estandarizaron utilizando biftalato de potasio y carbonato de sodio, respectivamente, previamente secados durante 2 h a 110 °C. El contenido de grupos acetilos se calculó mediante la ecuación (1):

$$\%Acetilo = \frac{[(V_B - V_S) * N_{HCl} * 43]}{W} * 100 \quad (1)$$

Donde  $V_B$  (mL) es el volumen de HCl requerido para la titulación del blanco,  $V_S$  (mL) es el volumen de HCl requerido para valorar la muestra,  $N_{HCl}$  es la normalidad de la solución de HCl, y  $W$  (mg) es la masa de la muestra seca utilizada en la determinación. El peso molecular del grupo acetilo para muestras acetiladas corresponde a 43 g/mol.

Como se definió en el **Capítulo 1**, el GS se define como el valor promedio de grupos hidroxilo (OH) sustituidos por unidad de anhidroglucosa de celulosa. Teniendo en cuenta que cada unidad de anhidroglucosa posee tres grupos hidroxilos reactivos, el valor máximo de GS que puede alcanzarse es de 3 (45% grupos acetilo). El GS de todas las muestras derivatizadas se calculó usando la ecuación (2):

$$GS = \frac{(162 * \%Acetilo)}{[4300 - (42 * \%Acetilo)]} \quad (2)$$

Donde 162 corresponde al peso molecular de la unidad de anhidroglucosa.

### 2.5.2 Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ en estado sólido (CP/MAS- $^{13}\text{C}$ RMN)

Los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN en el estado sólido de las muestras se realizaron en un resonador Bruker Advance II-300 equipado con un cabezal de 4 mm apto para Rotación de Angulo Mágico disponible en la Facultad de Matemática, Astronomía y Física de la Universidad Nacional de Córdoba. El equipo se operó a una frecuencia de 300,13 MHz para protones y 75,46 MHz para carbonos. Se utilizó glicina como espectro de referencia externa para  $^{13}\text{C}$ , y para ajustar las condiciones de Hartmann-Hahn para los experimentos de polarización cruzada (CP). El tiempo de reciclaje varió de 5 a 6 s según la muestra y el tiempo de contacto durante la CP fue de 2 ms.

Para el desacople heteronuclear durante la adquisición se utilizó la secuencia SPINAL64 con un campo de protón de  $^1\text{H}$  cumpliéndose que  $\omega_{^1\text{H}}/2\pi = \nu_{^1\text{H}} = 62 \text{ kHz}$ . Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente y la rotación del ángulo mágico fue de 10 kHz.

### **2.5.3 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)**

Los espectros de las muestras nativas y acetiladas se adquirieron en un espectrofotómetro Affinity-1 Shimadzu con Transformada de Fourier en modo de absorción usando ventanas de KBr. Para tal fin, las muestras (12,5 mg) se secaron a 110°C durante 1h, se mezclaron con KBr previamente seco (130°C, 16 h) en una proporción de 1:20, y se prensaron. Las pastillas se secaron nuevamente durante toda la noche a 110°C. Los espectros se midieron con 40 escaneos y una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  en un rango de número de onda de 4000–700  $\text{cm}^{-1}$ . Para el análisis comparativo de las bandas se corrigió la línea de base de los espectros y se normalizaron respecto a la intensidad de la absorción a 1165  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la flexión del enlace (C–O–C) de la celulosa según bibliografía (Ilharco, Gracia, da Silva, & Ferreira, 1997; Lee et al., 2011).

### **2.5.4 Espectroscopía UV/Visible (UV/vis)**

La transparencia de las películas de los nanocompuestos se evaluó por espectroscopía UV/visible. Con este fin se adquirieron espectros de la matriz pura de PLA y de los nanocompuestos con BNC en modo de transmitancia en el rango de 200–800 nm usando un espectrofotómetro Shimadzu UV/visible modelo (UV-1650pc). Para cada muestra se adquirieron hasta 5 espectros en diferentes posiciones de la película con el fin de evaluar posibles variaciones en la transparencia relacionadas con la variabilidad del espesor de las películas o la distribución del refuerzo.

### **2.5.5 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

Se observaron muestras de BNC nativa usando un microscopio electrónico de transmisión TEM Philips EM 301 operado a un voltaje de aceleración de 40 Kv. El estudio se realizó en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA) de la Facultad de

Ciencias Exactas y Naturales-UBA. Para ello se prepararon suspensiones acuosas de BNC (0,2% (p/v)) que se depositaron en rejillas de TEM y se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2% (p/v). Las mediciones de los anchos de las nanofibras se realizaron usando el programa Image J.

#### **2.5.6 Microscopía Electrónica de Barrido con Emisión de Campo (FESEM)**

Las imágenes de FESEM de las muestras se obtuvieron en un microscopio electrónico de barrido con emisión de campo Carl Zeiss NTS, modelo Supra 40 provisto de un detector de electrones secundarios de presión variable y operado a un voltaje de aceleración de 3 kV. El estudio se realizó en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA. Las muestras nativas y acetiladas se sembraron como suspensiones en agua al 0,2% (p/v) en vidrios de microscopía que luego se secaron a 100°C durante 5 min. Se realizaron mediciones del ancho de las nanofibras y nanocristales usando el programa Image J. En el caso de las películas de los nanocompuestos, se observó la superficie de las secciones transversales crio fracturadas con nitrógeno líquido. Todas las muestras se metalizaron con oro para una mejor calidad de la imagen.

#### **2.5.7 Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)**

Los espectros EDS se adquirieron para inferir la composición elemental de las muestras en un microscopio electrónico de barrido Phenom World ProX, operado a 15 kV y equipado con un detector Silicon Drift .

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

Los estudios de estructura cristalina de todas las muestras se realizaron en un difractómetro de rayos X Rigaku D/Max-C con goniómetro vertical disponible en el laboratorio de Sólidos Amorfo de la FIUBA. Este difractómetro tiene un diseño que satisface las condiciones de enfoque de Bragg-Bentano y tiene un monocromador de cristal único (GRAPHITE). Las hendiduras utilizadas fueron: 1,0 DS (hendidura de divergencia) - 1,0 SS (hendidura de dispersión) - 0,6 mm-0,8 mm. Los difractogramas

se adquirieron en el rango de  $2\theta$  de 10 a  $45^\circ$  con un paso de  $0,02^\circ$ . La longitud de onda de la fuente de radiación de Cu/ $K\alpha$  fue de 0,154 nm, con una intensidad de 30 mA y un voltaje de 40 kV. El índice de cristalinidad de las muestras de BNC y CNC se calculó usando el método empírico de Segal (**Segal, Creely, Martin, & Conrad, 1959**). Este método empírico relaciona la intensidad máxima del difractograma ( $I_{002}$ ) y la intensidad asociada a la contribución amorfa ( $I_{am}$ ), esta última ubicada en un ángulo de  $2\theta=18^\circ$  (Ecuación 3).

$$ICr = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} * 100 \quad (3)$$

La fracción cristalina de las películas de los nanocompuestos (%X) se determinó relacionando las áreas de los picos cristalinos y el área total del difractograma.

### 2.5.9 Análisis Termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica de las muestras se estudió utilizando un equipo TGA-50 Shimadzu en el intervalo de temperatura de 25–800 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Los ensayos se realizaron en atmósfera de nitrógeno (30 mL/min) para prevenir la degradación termo-oxidativa de las muestras. Éstas se preacondicionaron mediante secado a 110°C durante 2h. Los parámetros térmicos evaluados fueron la temperatura máxima de descomposición ( $T_{max}$ ), la  $T_{onset}$  determinada como la temperatura en el punto de intersección del valor extrapolado de pre-descomposición y la línea tangencial a la curva principal de pérdida de peso, y la  $T_{10\%}$  que corresponde a la temperatura en la cual el material perdió un 10% de su masa.

### 2.5.10 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las propiedades térmicas del PLA y los nanocompuestos con BNC se analizaron en un calorímetro diferencial de barrido Shimadzu DSC- 60.

Inicialmente, se realizó un primer calentamiento a 10 °C/min de 25°C a 200°C y se mantuvo la temperatura a 200 °C durante 2 min con el fin de borrar el historial térmico de las muestras. Luego las mismas se enfriaron a 10 °C/min hasta -25°C y, finalmente, se efectuó un segundo calentamiento a 10 °C/min hasta 200 °C. Las temperaturas de cristalización en frío ( $T_c$ ) y de fusión ( $T_m$ ) se determinaron como el valor máximo del pico exotérmico y endotérmico, respectivamente. La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) se obtuvo del escaneo de enfriamiento. El grado de cristalinidad de las películas se calculó del primer calentamiento usando la Ecuación 4, en donde  $W_{PLA}$  es la fracción en peso de PLA en la muestra,  $\Delta H_m$  es la entalpía de fusión de la muestra y  $\Delta H_{m0}$  es la entalpía de fusión para una muestra de PLA 100 % cristalino que corresponde a 93,6 J/g, (Turner, Riga, O'Connor, Zhang, & Collis, 2004).

$$\%X = \frac{1}{W_{PLA}} * \left( \frac{\Delta H_m}{\Delta H_{m0}} \right) * 100 \quad (4)$$

#### 2.5.11 Propiedades Mecánicas (Tracción)

Los ensayos de tracción uniaxial para la caracterización mecánica de los nanocompuestos se realizaron sobre probetas tipo IV según la norma ASTM D638. El equipo utilizado para las mediciones fue una máquina de ensayos universales INSTRON 5982, operada a una velocidad de la cruceta de 1 mm/min. De las mediciones se obtuvieron las curvas de tensión vs deformación y se determinaron parámetros mecánicos tales como el módulo de Young, resistencia a la tracción y deformación a la rotura. Las mediciones se efectuaron a temperatura ambiente y se midieron hasta 5 muestras para cada sistema. Los valores que se informan en la sección de resultados corresponden a los valores promedio y sus respectivas desviaciones.

#### 2.5.12 Ángulo de contacto

Para evaluar la eficacia de la hidrofobización conferida a la BNC se realizaron determinaciones de ángulo de contacto. Las películas de BNC requeridas para las determinaciones se prepararon extendiendo la muestra (200 mg peso seco) entre



vidrios de microscopía recubiertos con cinta de teflón, que fueron posteriormente prensados y secados a 110°C durante 12 h. Los ángulos de contacto en el equilibrio se midieron usando un goniómetro (OCA15LHT Plus photo-microscope, Dataphysics). Para cada película se realizaron 5 mediciones a temperatura ambiente con gotas de agua destilada de 30 y 50  $\mu\text{L}$  durante 60 s y 180 s. Con las mediciones obtenidas en el período de tiempo establecido se determinó una media aritmética del ángulo de contacto en el equilibrio. Las imágenes se procesaron usando el programa SCA20.

### **2.5.13 Dispersabilidad en solventes de diferente polaridad**

Como análisis complementario para evidenciar la variación de la polaridad de las muestras acetiladas, se hicieron ensayos de dispersabilidad en solventes de diferente polaridad; agua, acetona, diclorometano, cloroformo y éter de petróleo. Para tal fin, la BNC se sometió a intercambios sucesivos de solvente en escala de polaridad descendente. Con todos los solventes se realizaron tres intercambios utilizando 5 mL de solvente y manteniendo el sistema en agitación durante 10 minutos (1000 rpm). Finalmente, las muestras se sonicaron en un baño ultrasónico de 80W durante 15 min. Se inspeccionó la estabilidad de las dispersiones a temperatura ambiente durante 3 días. La realización de los ensayos para CNC liofilizados requirió de sonicación con 80W de potencia durante 3h y se realizó el seguimiento de la estabilidad de las dispersiones por un período de 30 min.

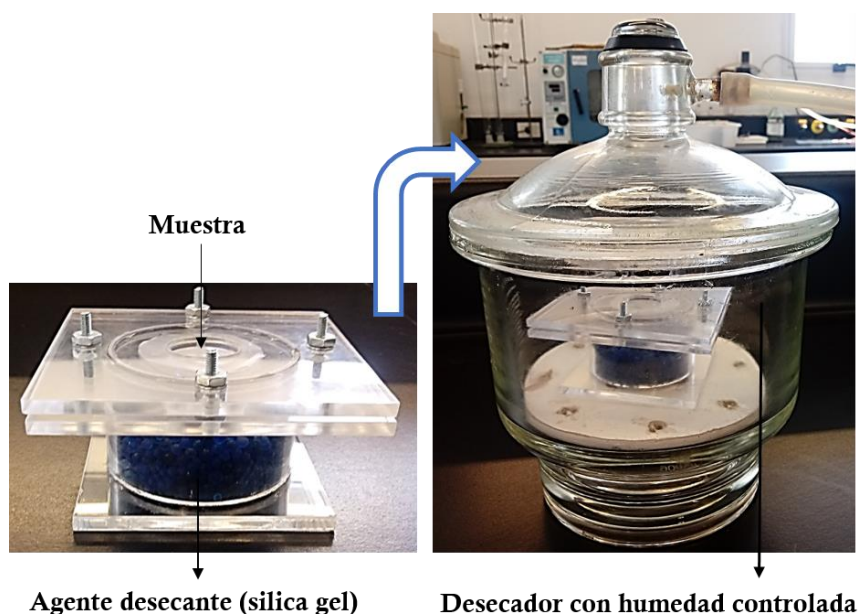
### **2.5.14 Permeabilidad al vapor de agua**

Los ensayos de permeabilidad al vapor de agua de todos los materiales compuestos se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de la norma ASTM-E96-00 (1996), y utilizando dispositivos como el que se muestra en la **Figura 2.2**. Los dispositivos de acrílico tienen una cámara interna que se rellenó con un agente desecante (sílica gel 0% HR). Las películas se ubicaron en la parte superior de dichas cámaras en un orificio de diámetro estandarizado de  $4 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ . Todos los dispositivos se colocaron en un desecador previamente acondicionado con una humedad relativa de  $\approx 53\%$  conteniendo una solución saturada de nitrato de magnesio. La diferencia de

presión parcial de vapor de agua existente a ambos lados de la película proporciona la fuerza impulsora para el flujo de vapor. El flujo se determinó midiendo la masa de cada uno de los dispositivos durante 10 días consecutivos. Mediante regresión lineal por cuadrados mínimos se calculó la pendiente de los gráficos para determinar la tasa de transmisión del vapor de agua a través de la muestra hacia el desecante, y con ese valor se calculó la permeabilidad al vapor de agua (PVA) (Kg /ms Pa), utilizando la ecuación 5.

$$PVA = \left( \frac{WVTR}{P * RH} \right) * d \quad (5)$$

En donde **P** es la presión de vapor de saturación del agua (Pa), **RH** es la humedad relativa en el desecador, **d** es el espesor de la película (m) y WVTR es la velocidad de transmisión de vapor de agua calculada como la relación entre la pendiente de la recta del gráfico peso en función del tiempo (kg/s) y la superficie de la celda (m<sup>2</sup>).



**Figura 2.2** Celdas de acrílico utilizadas para las mediciones de la permeabilidad al vapor de agua de los nanocompuestos.

## 2.6 Bibliografía del Capítulo 2

Cranston, E. D., Gray, D. G. Morphological and optical characterization of polyelectrolyte multilayers incorporating nanocrystalline cellulose. *Biomacromolecules*, 2006, 7, 2522–2530.

Fernandes Diniz, J. M. B., Gil, M. H., Castro, J. A. A. M. Hornification—its origin and interpretation in wood pulps. *Wood Science Technology*, 2004, 37, 489–494.

Hestrin, S., Schramm, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 1954, 58, 345–352.

Ilharco, L. M., García, R. R., Da Silva, J. L., Ferreira, L. F. V. Infrared approach to the study of adsorption on cellulose: influence of cellulose crystallinity on the adsorption of benzophenone. *Langmuir*, 1997, 13, 4126–4132.

Lee, K-Y., Quero, F., Blaker, J. J., Hill, C. A. S., Eichhorn, S. J., Bismarck, A. Surface only modification of bacterial cellulose nanofibres with organic acids. *Cellulose*, 2011, 18, 595–605.

Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., Conrad, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, 1959, 29, 786–794.

Turner, A., Riga, A., O'Connor, J., Zhang, J., Collis, J. Characterization of drawn and undrawn poly-L-lactide films by differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2004, 75, 257–268.

## **Normas consultadas**

ASTM-E96-00. “Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials”. 1996.

ASTM D638. “Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics”. 2010.

ASTM D817. “Standard Test Methods of Testing Cellulose Acetate”. 2012.



### **3. Estudio exploratorio de la acetilación de nanocelulosa bacteriana catalizada por $\alpha$ -hidroxiácidos**

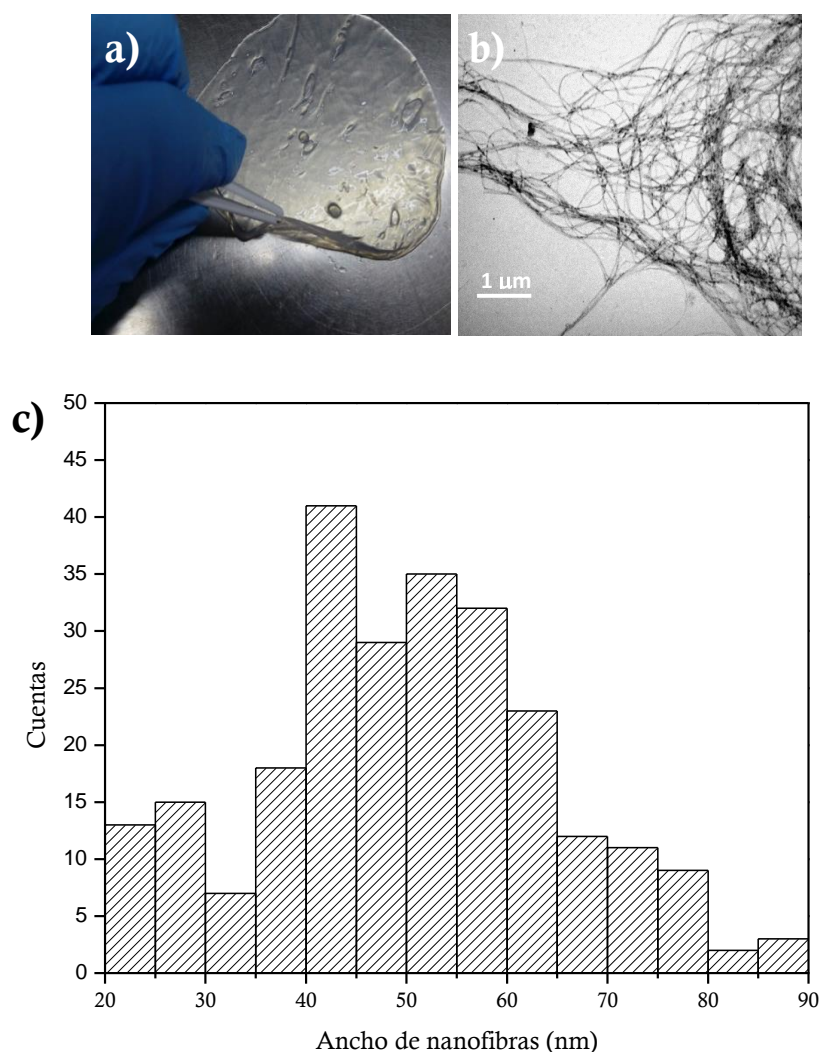
*Existen en la literatura algunos ejemplos que dan cuenta de la efectividad de ciertos  $\alpha$ -hidroxiácidos como catalizadores de reacciones de esterificación de celulosa. Sin embargo, su uso para derivatizar nanofibras de celulosa bacteriana, al menos hasta el comienzo de este Trabajo de Tesis, no había sido explorado. Considerando las ventajas de esta ruta descritas en la Introducción general, en el presente Capítulo se resumen los resultados de un estudio exploratorio sobre el uso de tres  $\alpha$ -hidroxiácidos diferentes (ácido láctico, (L)-tartárico y cítrico) como catalizadores de la reacción de acetilación de nanocelulosa bacteriana utilizando anhídrido acético como agente acilante. Con este fin, se evalúa comparativamente su efecto en el GS conferido a la BNC a un tiempo fijo de reacción, y se caracterizan los productos acetilados con los diferentes catalizadores en términos de estructura química, morfología, cristalinidad y polaridad.*



### 3.1 Introducción

Como se mencionó en la Introducción general, los polímeros de origen natural han despertado gran interés en el campo de la ingeniería de materiales por pertenecer a la biomasa renovable, ser biodegradables, no tóxicos y abundantes. En particular, la celulosa es el biopolímero más abundante en la Tierra y tiene excelentes propiedades mecánicas que se atribuyen a su estructura semicristalina y a su perfecta organización jerárquica, que tiene como elementos constitutivos a las nanofibras de celulosa. En conjunto, las propiedades de la celulosa son las responsables de proporcionar a la madera y a otros materiales lignocelulósicos una elevada resistencia mecánica, alta relación resistencia/peso, y al mismo tiempo dotarlos de la flexibilidad necesaria para contrarrestar cambios dimensionales debidos al hinchamiento y encogimiento (Dufresne, 2013).

El aislamiento de las nanofibras responsables de las propiedades mecánicas de la celulosa se lleva adelante convencionalmente a partir de matrices vegetales, mediante protocolos extensos de desfibrilación mecánica y de purificación para separar hemicelulosas, ligninas y pectinas. Este proceso implica un alto consumo energético y, en muchos casos, requiere del uso de reactivos perjudiciales para el medio ambiente. Como contraparte, la producción biotecnológica de nanofibras de celulosa con bacterias del género *Gluconacetobacter* en medios de fermentación formulados con desechos agroindustriales o subproductos industriales permite obtener, directamente del medio de cultivo, celulosa nanofibrilada pura y con propiedades similares a las de la nanocelulosa fibrilada de origen vegetal. En la **Figura 3.1a** se muestra una membrana de BNC húmeda, tal cual se la obtiene del medio de fermentación. En la **Figura 3.1b**, se muestran las nanofibras de celulosa que componen la membrana. La imagen de TEM ilustra la morfología nanofibrilar descrita previamente para la BNC. En la **Figura 3.1c** se presenta la distribución de anchos de las nanofibras, en el rango de 20 a 80 nm en concordancia con otros autores (Hirai, Tsuji, Yamamoto, & Horii, 1998).



**Figura 3.1** (a) Membrana húmeda de BNC, (b) imagen TEM de las nanofibras liberadas de la membrana, (c) histograma de anchos de las nanofibras.

La BNC se caracteriza por una alta cristalinidad ( $\approx 90\%$ ) (Czaja, Romanovicz, & Brown Malcolm, 2004), la cual incide directamente en sus propiedades mecánicas. Se ha informado para nanofibras de BNC un módulo de Young de 114 GPa y un módulo de Young teórico determinado mediante espectroscopía Raman entre 130 y 145 GPa (Hsieh, Yano, Nogi, & Eichhorn, 2008). Estos valores de módulo de Young resultan atractivos dado que, si se comparan con los valores ya informados para algunas fibras naturales como algodón (12,6 GPa), yute (26,5 GPa), lino (27,6 GPa) y sisal (22 GPa), o fibras sintéticas como vidrio (70 GPa) y aramida (67 GPa), los valores correspondientes a las nanofibras de BNC son significativamente superiores y exceden los valores convencionales



teniendo en cuenta su baja densidad ( $1,25 \text{ g/cm}^3$ ) (**Bismarck, Mishra, & Lampke, 2005; Lee et al., 2009**). Además, la BNC tiene una alta área superficial relacionada con sus dimensiones nanométricas que oscila en  $\approx 37 \text{ m}^2/\text{g}$  (**Kim et al., 2002**).

Como se mencionó previamente en la **Sección 1.3.2**, la BNC es muy versátil en cuanto a sus posibles aplicaciones (**Tabla 1.3**) y, en la mayoría de ellas, la hidrofiliidad de la nanocelulosa no representa una limitación. Diferente es la situación cuando la BNC debe compatibilizarse con un entorno no polar. Este es el caso, por ejemplo, de la preparación de materiales compuestos de matrices poliméricas hidrofóbicas de interés comercial como el ácido poliláctico o la policaprolactona. En estos sistemas la incompatibilidad química debida a la hidrofiliidad de la celulosa conlleva a una pobre dispersión de las nanofibras en la matriz hidrofóbica y puede inducir un empobrecimiento significativo de las propiedades mecánicas de la matriz (**Missoum et al., 2013; Siró & Plackett, 2010**). Por lo tanto, modular la polaridad de las nanofibras de celulosa es fundamental para aprovechar las propiedades de la nanocelulosa para reforzar y dotar de mejores propiedades a este tipo de materiales hidrofóbicos.

En este contexto, la adsorción física de surfactantes y un cambio en la funcionalización de la nanocelulosa mediante transformaciones químicas son las estrategias de compatibilización más utilizadas a lo largo de los años (**Hubbe et al., 2015**). La gran cantidad de grupos hidroxilos disponibles en la superficie de las cadenas de celulosa posibilita transformaciones químicas muy diversas. En particular, las reacciones de esterificación son las más utilizadas para hidrofobizar la superficie de la nanocelulosa, debido a la variedad de restos orgánicos que pueden injertarse bajo condiciones de reacción relativamente fáciles de operar. Por ejemplo, Huang y colaboradores esterificaron nanofibras de celulosa de origen vegetal mediante una metodología mecánico-química de un sólo paso, que consiste en desfibrilar la celulosa de partida en un disolvente orgánico no acuoso (DMSO) cargado con dos agentes esterificantes diferentes (anhídrido *n*-dodecil succínico y anhídrido succínico), alcanzando grados de sustitución (GS) de 0,31 y 0,23, respectivamente (**Huang, Zhao, Kuga, Wu, & Huang, 2016**). En otras contribuciones se obtuvieron ésteres con diferente estructura del resto hidrocarbonado (acetilo, miristoílo (C14), benzoílo y pivaloílo) de BNC y CNF

extraída de pulpa de madera. Se alcanzaron GS de 0,4 y 1,1 en un sistema de reacción de cloruro de acilo/piridina, utilizando como agente dispersante *N*-metil 2-pirrolidona en un rango de temperatura de 50–60°C (**Agustín, Nakatsubo, & Yano, 2016; Agustín, Nakatsubo, & Yano, 2017**). Otros autores informaron la esterificación superficial heterogénea de CNF obtenida a partir de madera utilizando líquidos iónicos como catalizadores y, como acilantes, diferentes anhídridos de variada longitud de cadena como anhídrido acético, isobutírico y hexanoico. Operando a 100°C durante 2 h lograron valores de GS entre 0,2 y 0,3 (**Missoum et al., 2013**). Por otro lado, Schaqui y colaboradores esterificaron sin catalizador películas de CNF utilizando diferentes anhídridos como acético, butírico, hexanoico y (2-dodecen-1-il) succínico, mediante prensado de las películas entre discos metálicos porosos y llevando la reacción a cabo en estufa a 80°C durante 2 h hasta alcanzar GS de entre 0,1 y 0,38 (**Schaqui, Zimmermann, & Tingaut, 2014**). Por otra parte, Tomé y colaboradores esterificaron membranas liofilizadas de BNC con cloruro de hexanoílo en un medio de reacción con tolueno y utilizando piridina como catalizador, a una temperatura de 115°C durante 0,8 h hasta lograr un GS de 0,44 (**Tomé et al., 2010**). El mismo grupo informó la esterificación de BNC triturada con los ácidos acético, butírico, hexanoico, y alquenil succínico catalizada con ácido sulfúrico en un medio de reacción formulado con líquidos iónicos. Luego de tiempos comprendidos entre 6 y 264 h de reacción a una temperatura de 30°C se lograron valores de GS en el rango de 0,04 a 0,24 (**Tomé et al., 2011b**). En otros trabajos, Lee y colaboradores informaron la derivatizaron de BNC con los ácidos acético, hexanoico y dodecanoico como agentes esterificantes y cloruro de *p*-toluensulfónico como catalizador, en un medio de reacción con piridina a 50°C durante 2 h. Los autores informaron valores de GS entre 0,36 y 1,87 (**Lee, Blaker, & Bismarck, 2012**).

Entre todos los protocolos de esterificación mencionados, la acetilación ha sido la metodología más explorada en el campo de la derivatización de nanofibras de celulosa de origen bacteriano. Entre las principales contribuciones se encuentran la informada por Nogi y colaboradores quienes acetilaron membranas de BNC en anhídrido acético sin catalizador a una temperatura de 120°C durante 21 h de reacción, alcanzando un GS de 0,17 (**Nogi, Handa, Nakatsubo, Ifuku, & Yano, 2006**). Se informó también la acetilación de membranas de BNC empleando como agente acilante anhídrido acético en un medio de reacción formulado con ácido

acético/tolueno/anhídrido acético y utilizando ácido perclórico como catalizador. Operando a temperatura ambiente durante 1 h de reacción se lograron valores de GS comprendidos en el rango de 0,04 a 2,77 (**Kim et al., 2002**). Posteriormente, Ifuku y colaboradores derivatizaron membranas de BNC intercambiadas de solvente a acetona usando la misma metodología implementada por Kim y colaboradores, y operada bajo las mismas condiciones informando un GS de 1,76 (**Ifuku et al., 2007**). La misma metodología fue utilizada también más recientemente por Gonçalves y colaboradores (**Gonçalves et al., 2015 y Gonçalves et al., 2017**). Por otra parte, Yamamoto y colaboradores acetilaron una suspensión liofilizada de BNC en un sistema catalizado con ácido perclórico utilizando como agentes acilantes anhídrido acético y acetato de amilo en una proporción 50/50. A una temperatura de 20°C y dos tiempos fijos se obtuvieron valores de GS de 0,58 y 2,76 a 0,5 h y 3h de reacción, respectivamente (**Yamamoto, Horii, & Hirai, 2006**). Otros autores acetilaron BNC en condiciones supercríticas utilizando vapor de cloruro de palmitoílo (C16) como medio de reacción y agente acilante, a temperaturas entre 170 y 190°C, y durante períodos de tiempo que variaron entre 2 y 13 h. Los autores operaron en CO<sub>2</sub> y lograron valores de GS de 1,47 y 2,7 (**Berlitz, Molina-Boisseau, Nishiyama, & Heux, 2009**). Suetsugu y colaboradores informaron la acetilación de membranas de BNC en cloruro de zinc acuoso usando CO<sub>2</sub> supercrítico con anhídrido acético como acilante y a 70°C durante 5 h de reacción, pero no se informó el GS del producto (**Suetsugu et al., 2009**). De Marco Lima y colaboradores informaron la acetilación de membranas de BNC disueltas en dimetilacetamida/cloruro de litio con anhídrido acético como acilante (**De Marco Lima et al., 2011**). La temperatura empleada fue de 110°C durante 3 h y los autores informaron valores de GS entre 1,91 y 2,66. Hu y colaboradores derivatizaron membranas secas de BNC en un medio de anhídrido acético utilizando yodo como catalizador (60–100°C, 0,25–2 h) hasta lograr valores de GS entre 0,23 y 1,98 (**Hu et al., 2011**). Tomé y colaboradores por su parte, acetilaron una suspensión de BNC intercambiada de solvente con etanol a acetona, en un medio de anhídrido acético utilizando ácido sulfúrico como catalizador a una temperatura de 30°C por 4 h, logrando un GS de 0,02 (**Tomé et al., 2011a**). Cunha y colaboradores utilizaron anhídrido acético como acilante y ácido sulfúrico como catalizador para acetilar películas de BNC secados mediante liofilización y en CO<sub>2</sub> supercrítico. En este caso el medio de reacción fue tolueno y se operó a temperatura

ambiente durante 0,5 h hasta alcanzar valores de GS comprendidos en el rango de 0,04 a 0,12 **(Cunha, Zhou, Larsson, & Berglund, 2014)**.

Si bien varias de estas metodologías permitieron conferir a la BNC valores de GS compatibles con una hidrofobización superficial, muchas de ellas involucran ácidos altamente corrosivos como catalizadores (por ejemplo, ácido perclórico o sulfúrico), y/o involucran medios que contienen disolventes orgánicos altamente inflamables o tóxicos, como piridina o tolueno.

Alternativamente, Hafrén y Córdova propusieron el uso de catalizadores biodegradables de origen natural del tipo  $\alpha$ -hidroxiácidos para la esterificación de celulosa en un medio sin cosolventes agregados **(Hafrén & Córdova, 2005)**. En su publicación desarrollaron la polimerización por apertura de anillo de  $\epsilon$ -caprolactona usando ácido tartárico como catalizador y celulosa procedente del algodón y del papel como iniciador. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 120°C durante un período de tiempo de 6 h. Paralelamente, los autores aplicaron la misma ruta para esterificar fibras de algodón y papel con ácido hexadecanoico y pentanoico utilizando ácido tartárico como catalizador **(Hafrén & Córdova, 2005)**. Posteriormente, los mismos autores publicaron una patente que comprende la utilización de los  $\alpha$ -hidroxiácidos como catalizadores en la modificación de grupos aminos y alcoholes de diversos compuestos, tales como polisacáridos (almidón y celulosa), oligosacáridos, sílica, alcoholes, aminas alifáticas y aromáticas, proteínas, péptidos, dendrímeros, fulerenos, poli, oligo y mononucleótidos, polímeros alifáticos y aromáticos, oligómeros, y compuestos inorgánicos con lactonas, ésteres, poliésteres, carbonatos, policarbonatos, lactidas, glicólidos, anhídridos, ácidos y tioésteres **(US 2009/0111980 A1, Hafrén & Córdova, 2009)**.

En 2010 Domínguez de María publicó un trabajo de revisión en el cual presenta a los  $\alpha$ -hidroxiácidos como el ácido láctico, tartárico, cítrico y mandélico como una alternativa novedosa y atractiva para catalizar polimerizaciones de apertura de anillo y transesterificaciones para sintetizar y modificar biopolímeros como la celulosa. En el trabajo se destacan con especial énfasis las principales ventajas de estos  $\alpha$ -hidroxiácidos que son su origen natural y renovable, su carácter no tóxico, y la posibilidad de obtenerlos mediante rutas biotecnológicas fermentativas **(Domínguez de María, 2010)**.

Teniendo en cuenta las ventajas de los  $\alpha$ -hidroxiácidos mencionadas en el párrafo anterior, nuestro grupo realizó una primera adaptación al método de Hafrén & Córdova (2005), orientada a esterificar nanocelulosa de origen bacteriano utilizando ácido acético y propiónico como agentes esterificantes y ácido tartárico como catalizador. Este catalizador se seleccionó en función de la mayor actividad catalítica informada por dichos autores respecto a los demás  $\alpha$ -hidroxiácidos estudiados (ácido láctico y cítrico). En las condiciones elegidas se evaluó el GS alcanzado en tiempos de reacción comprendidos entre 1 y 8 h obteniéndose valores de GS en el rango de 0,02 a 0,45 (**Ávila Ramírez et al., 2014**). Estos resultados fueron prometedores y evidenciaron que era posible derivatizar nanofibras de celulosa de origen bacteriano utilizando un método que procede en condiciones relativamente suaves de reacción, sin cosolventes agregados y con catalizadores de origen natural. Además, los GS alcanzados fueron similares a los obtenidos por otros autores por otras rutas, y se confirmó que los mismos resultaron adecuados para disminuir significativamente la polaridad de la BNC.

En función del estudio inicial descripto, este primer Capítulo resume un análisis exploratorio de la actividad catalítica de los tres catalizadores utilizados oportunamente por Hafrén & Córdova (2005) (**ácido láctico, tartárico y cítrico**) en la acetilación de BNC usando, en este caso, anhídrido acético como acilante.

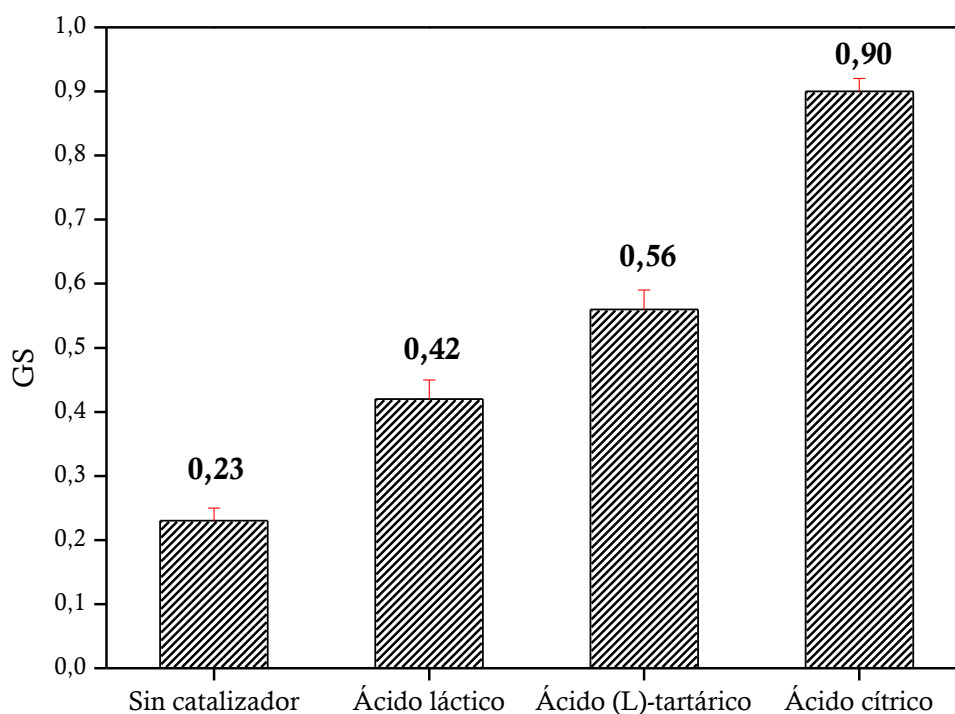
Las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear  $^{13}\text{C}$  en el estado sólido (CP/MAS-  $^{13}\text{C}$  RMN) y de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) se utilizaron cualitativamente para evaluar el progreso de la acetilación. Se analizaron cambios en la cristalinidad y la morfología de las nanofibras mediante difracción de rayos X (DRX) y microscopía de barrido electrónico (FESEM), respectivamente. Se describen también en este Capítulo los resultados de las mediciones del ángulo de contacto y de dispersabilidad en solventes orgánicos de diferente polaridad de la BNC modificada.

## 3.2 Resultados y discusión

### 3.2.1 Testeo de los catalizadores $\alpha$ -hidroxiácidos

Las condiciones de reacción que se describieron en la **Sección 2.3.2.1**, establecidas para el estudio comparativo de los tres catalizadores son las mismas que, con anterioridad, utilizó nuestro grupo para esterificar BNC usando ácido acético y ácido propiónico como acilantes (**Ávila Ramírez et al., 2014**). En este caso, sin embargo, se introdujo un cambio en la metodología con respecto a las condiciones publicadas, que consistió en reemplazar el ácido acético por anhídrido acético, dada la reconocida diferencia de reactividad de este último. En todos los casos se utilizó la misma masa de BNC (0,5 g, 3,087 mmol UAG), la misma relación molar entre el catalizador y las UAG (1,01 mmol/mmol UAG) y el mismo volumen de acilante (0,53 mol). Las muestras se preconditionaron por intercambio de solventes, tal como se describió en el **Capítulo 2** de esta Tesis.

En la **Figura 3.2** se comparan los grados de sustitución alcanzados con cada uno de los catalizadores a un tiempo fijo de 7 h. En todos los casos, los GS de las reacciones catalizadas fueron significativamente superiores a los obtenidos en la reacción no catalizada ( $0,20 \pm 0,02$  –  $0,23 \pm 0,01$ ). El menor grado de sustitución se observó cuando se utilizó ácido láctico como catalizador ( $GS = 0,42 \pm 0,03$ ). Este resultado no resultó sorprendente considerando que, según el mecanismo de Fisher, el paso lento de la reacción de acetilación es el ataque de un grupo hidroxilo de la celulosa al grupo carbonilo del anhídrido acético. Cuanto mayor es la densidad de carga positiva del carbonilo más rápida se espera que sea la reacción, y la densidad de carga positiva aumenta cuando el oxígeno del grupo carbonilo se protona. De los tres ácidos investigados el ácido láctico es el que tiene la menor constante de acidez ( $pK_a = 3,86$ ), por lo tanto, resulta razonable que sea el catalizador menos eficiente.

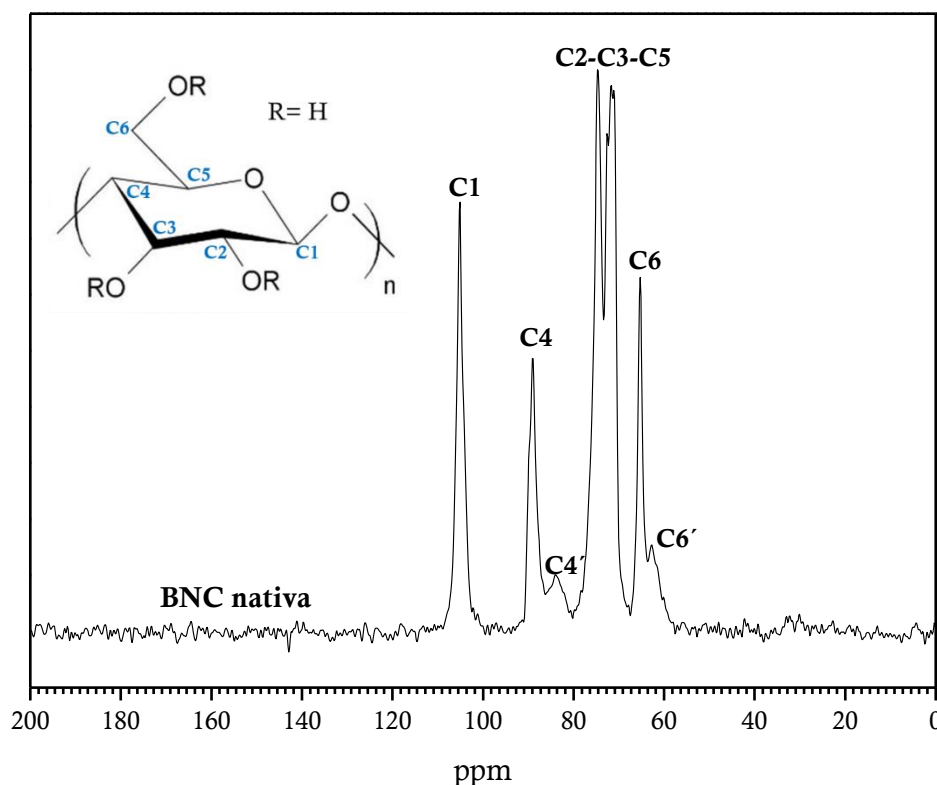


**Figura 3.2** Efecto del  $\alpha$ -hidroxiácido utilizado como catalizador sobre el GS conferido a la BNC (1,01 mmol/mmol UAG, 120°C, 7 h).

En base a la discusión anterior, y teniendo en cuenta que los ácidos (L)-tartárico y cítrico tienen constantes de acidez similares ( $pK_a$ : 3,08 y 3,03, respectivamente), si la catálisis estuviera relacionada únicamente con la fuerza del ácido, se esperaría que los productos obtenidos al utilizar estos ácidos como catalizadores tuvieran un GS similar y superior al obtenido usando ácido láctico. Efectivamente, en ambos casos, el GS fue superior al alcanzado con ácido láctico; pero al utilizar ácido cítrico como catalizador el GS fue significativamente superior al obtenido cuando se utilizó ácido (L)-tartárico ( $0,90 \pm 0,02$  y  $0,56 \pm 0,03$ , respectivamente). Este resultado requería descartar que, en el caso del ácido cítrico, hubieran ocurrido reacciones laterales que contribuyeran a aumentar el valor del GS, como la esterificación de la celulosa con el mismo ácido cítrico o incluso que el ácido cítrico hubiera actuado como agente entrecruzante de las cadenas de celulosa (De Cuadro et al., 2015; Spinella et al., 2016; Yang, Wang, & Kang, 1997).

### 3.2.2 Análisis estructural por RMN

Con el fin de investigar si habían tenido lugar reacciones laterales a la de acetilación cuando se utilizó ácido cítrico como catalizador, tanto la BNC nativa como los productos de reacción obtenidos en presencia de ácido cítrico se analizaron por RMN de  $^{13}\text{C}$  en el estado sólido.



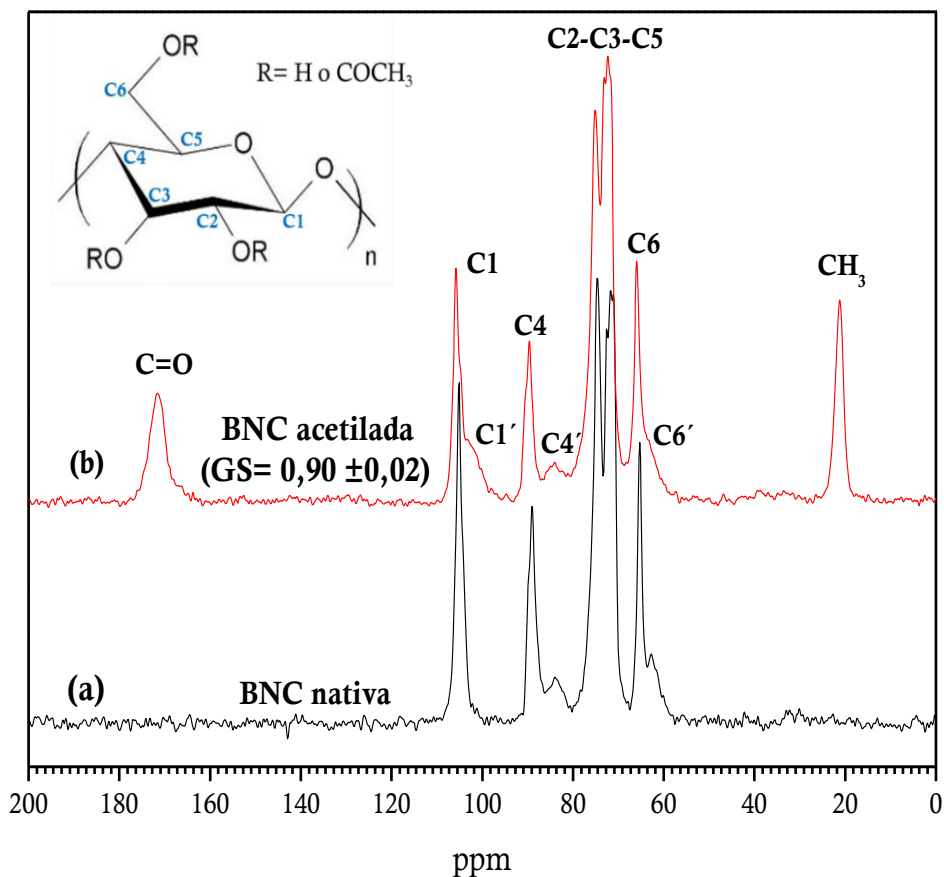
**Figura 3.3** Espectro de CP/MAS- $^{13}\text{C}$  RMN de BNC nativa.

La **Figura 3.3** muestra el espectro de la BNC nativa en el cual se observan las señales características de los carbonos de la celulosa tipo I:  $\text{C}_1$  (105,1 ppm),  $\text{C}_4$  (89,1 ppm), carbonos  $\text{C}_2 - \text{C}_3 - \text{C}_5$  (80–69 ppm, señales superpuestas) y  $\text{C}_6$  (65,3 ppm) (Jandura, Kokta, & Riedl, 2000; Yamamoto et al., 2006). Por otra parte, las señales asignadas como  $\text{C}_4'$  (84,1 ppm) y  $\text{C}_6'$  (62,7 ppm), se asignaron a los carbonos de los componentes amorfos o desordenados de la celulosa que aparecen a campos más altos que los carbonos correspondientes a la forma cristalina ( $\text{C}_4$  y  $\text{C}_6$ ) (Atalla & VanderHart, 1999; Park, Baker, Himmel, Parilla, & Johnson, 2010).

En la **Figura 3.4** se comparan los espectros de la BNC nativa y la BNC acetilada en presencia de ácido cítrico como catalizador ( $\text{GS} = 0,90 \pm 0,02$ ). Además

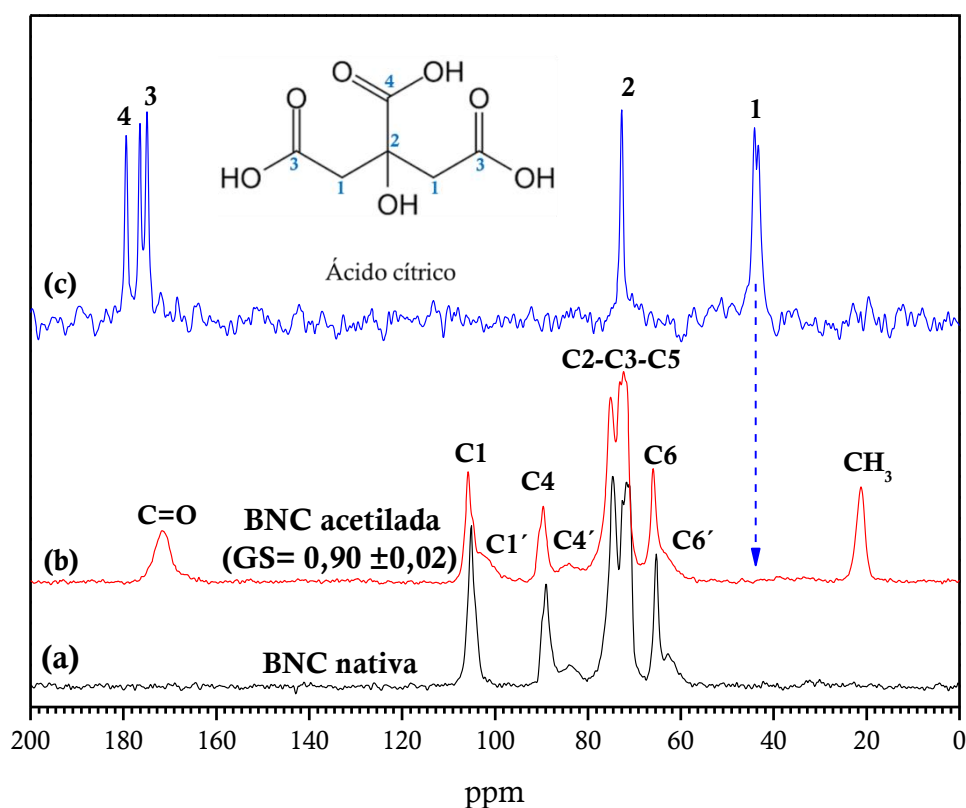


de las señales provenientes de la celulosa, se observan señales intensas alrededor de 20 ppm que fueron asignadas a los carbonos de los grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ) de los acetilos, y señales entre 171 y 173 ppm asignadas a los grupos carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) de dichos grupos. Estas señales evidencian que, efectivamente, la acetilación tuvo lugar. Comparativamente, otros autores observaron idénticas señales cuando acetilaron BNC mediante otras metodologías. Por ejemplo, Hu y colaboradores obtuvieron un espectro muy similar para la BNC acetilada, y asignaron las señales centradas en 21,1 y 171,4 ppm, a los grupos metilo y carbonilo de los grupos ésteres introducidos en la celulosa, respectivamente (Hu et al., 2011).



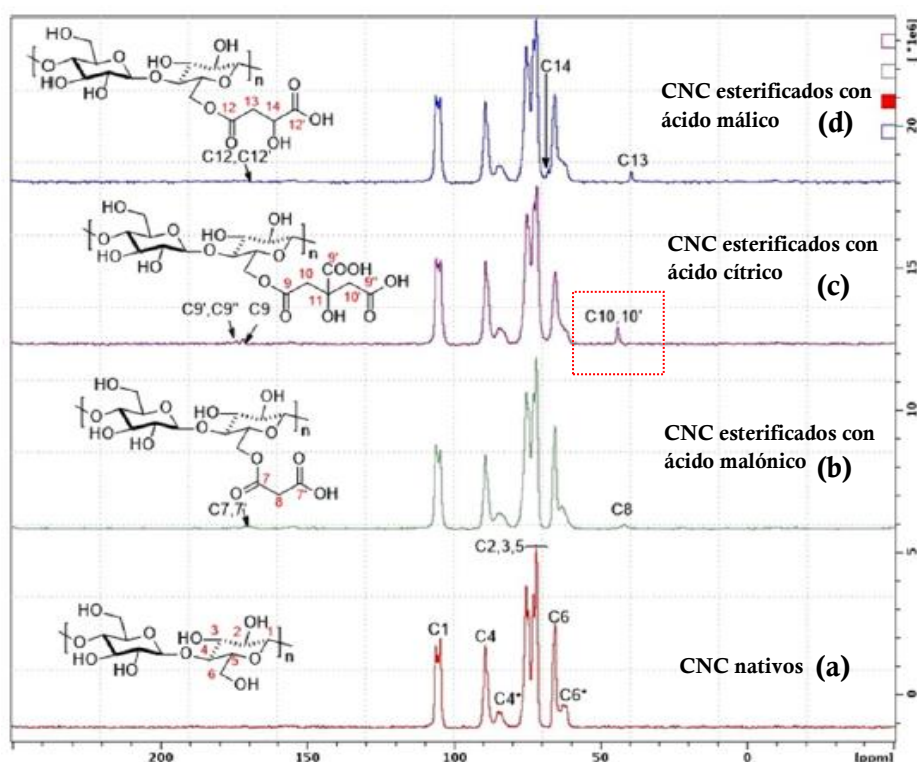
**Figura 3.4** Espectros de CP/MAS-  $^{13}\text{C}$  RMN de **(a)** BNC nativa, **(b)** BNC acetilada en presencia de ácido cítrico como catalizador ( $\text{GS} = 0,90 \pm 0,02$ ).

En el caso que el ácido cítrico se hubiera unido covalentemente a la celulosa en algún porcentaje significativo formado un éster de citrato o mediante reacciones de entrecruzamiento, en el espectro de  $^{13}\text{C}$ - RMN deberían haberse observado las señales de los grupos metilenos del ácido cítrico. En la **Figura 3.5** se compara el espectro de  $^{13}\text{C}$ - RMN del ácido cítrico con los espectros de la BNC nativa y BNC acetilada por la metodología usada en esta Tesis (curva (a) y (b), respectivamente). En el espectro del ácido cítrico se observan claramente en la región de 180–185 ppm los tres grupos carbonilo del ácido, y en 72,5 ppm aparece la señal correspondiente al carbono cuaternario del ácido cítrico. Además, en la región entre 45 y 48 ppm se observan las señales de los dos carbonos de los grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) del ácido cítrico. De la comparación con el espectro de la BNC surge que, si hubiera citratos o entrecruzamientos de cadena en proporciones significativas en la BNC acetilada, deberían observarse señales adicionales en la región entre 45 y 48 ppm del espectro de la BNC acetilada (**Fisher, Merwin, & Nissan, 1995**) y, como se puede observar en la Figura (**Figura 3.5b**), no se registran señales en esta zona.



**Figura 3.5** Espectros de CP/MAS-  $^{13}\text{C}$  RMN de (a) BNC nativa, (b) BNC acetilada en presencia de ácido cítrico como catalizador ( $\text{GS} = 0,90 \pm 0,02$ ), (c) ácido cítrico.

Estas conclusiones se refuerzan con los resultados de Spinella y colaboradores, quienes modificaron nanocristales de celulosa con ácidos di y tricarbónicos (ácido málico (GS= 0,16), malónico (GS= 0,22) y cítrico (GS= 0,18)) mediante esterificación de Fisher, bajo condiciones que pueden promover el entrecruzamiento de la celulosa (Spinella et al., 2016). En el trabajo citado, los autores mediante un análisis exhaustivo comprobaron que el ácido cítrico estaba unido covalentemente a la celulosa y, en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN, se observó claramente la presencia de nuevas señales provenientes de los carbonos metilénicos en la región de 45–48 ppm que, como se mencionó antes, es una zona limpia del espectro de la celulosa nativa y de la BNC acetilada en presencia de ácido cítrico como catalizador (Figura 3.6). En el trabajo de Spinella y colaboradores (2016), aunque el GS alcanzado con ácido cítrico fue de 0,18, un valor relativamente bajo, las señales fueron lo suficientemente intensas como para ser evidentes en el espectro RMN (Figura 3.6c).



**Figura 3.6** Espectros de CP/MAS-  $^{13}\text{C}$  RMN de (a) CNC nativos, (b) CNC esterificados con ácido malónico, (c) CNC esterificados con ácido cítrico, (d) CNC esterificados con ácido málico, mediante esterificación de Fisher catalizada con HCl (Spinella et al., 2016).

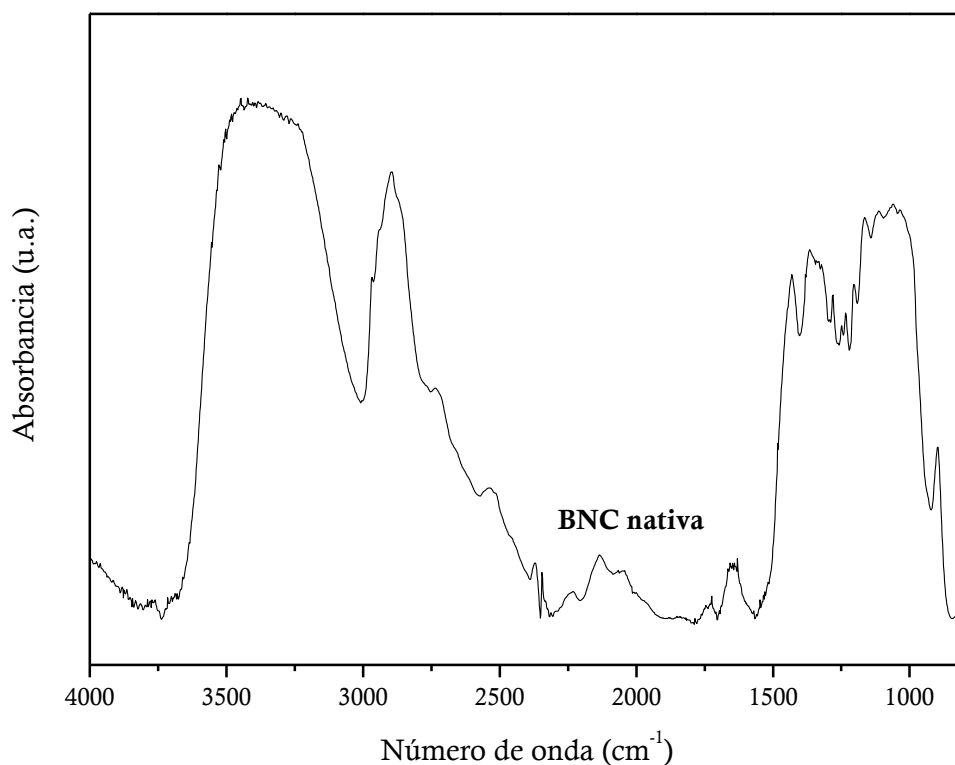
De acuerdo con la discusión anterior, dado que el espectro de la BNC acetilada en presencia de ácido cítrico ( $GS = 0,90 \pm 0,02$ ) no presenta señales en la zona de los carbonos metilénicos, puede inferirse que, bajo las condiciones aplicadas en esta Tesis, tuvo lugar primordialmente la acetilación de la BNC catalizada por el ácido cítrico, descartando la presencia de algún subproducto que pudiera afectar de manera significativa el GS.

Por consiguiente, la mayor actividad catalítica del ácido cítrico con respecto al tartárico que, como se mencionó al comienzo del Capítulo tienen constantes de acidez similares, no se puede justificar asumiendo que la reacción de acetilación ocurre únicamente por el mecanismo de Fisher. La justificación de esa observación requiere de un estudio profundo del mecanismo de esa reacción que supera los alcances de este trabajo de Tesis. Pero, de todas maneras, dado que el ácido cítrico fue indiscutiblemente el que demostró mayor actividad catalítica, se seleccionó como catalizador para todos los estudios subsecuentes plasmados en el **Capítulo 4**.

En las secciones que siguen se presenta la caracterización de los productos de reacción obtenidos con los tres catalizadores ensayados en este Capítulo con el fin de evidenciar el efecto de la acetilación sobre las principales propiedades de la BNC que son determinantes para la preparación de materiales compuestos con matrices poliméricas hidrofóbicas.

### 3.2.3 Análisis estructural por FTIR

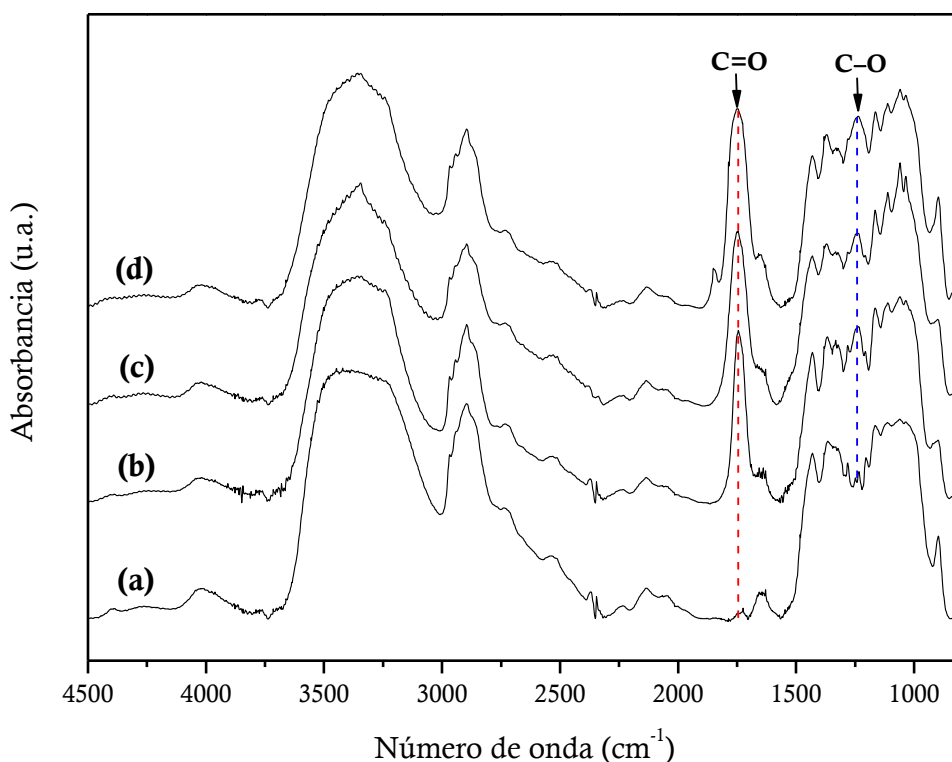
El espectro de FTIR de la BNC nativa se presenta en la **Figura 3.7**. En el espectro se observan las señales características de la celulosa: estiramiento del enlace O–H de los grupos hidroxilo (banda ancha en la región de  $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ ), estiramiento del enlace C–H ( $2895\text{ cm}^{-1}$ ), flexión simétrica del enlace  $\text{CH}_2$  ( $1430\text{ cm}^{-1}$ ), flexión del enlace C–H ( $1368\text{ cm}^{-1}$ ), flexión en el plano de los grupos OH ( $1333\text{ cm}^{-1}$ ), flexión tijera correspondiente a la unión C–O–C del enlace glicosídico ( $1170\text{--}1060\text{ cm}^{-1}$ ) y la banda típica de polímeros de glucosa con enlace tipo  $\beta$  ( $898\text{ cm}^{-1}$ ). Por último, la señal observada a  $1645\text{ cm}^{-1}$ , se asignó a la flexión de los enlaces H–O–H del agua absorbida del ambiente por la celulosa (**Castro et al., 2011; Cerrutti et al., 2016; Rani et al., 2011; Vázquez et al., 2013**).



**Figura 3.7** Espectro FTIR de BNC nativa.

La **Figura 3.8** muestra comparativamente los espectros de la BNC nativa y de la BNC acetilada con cada uno de los catalizadores ensayados. Como se observa en la Figura, los espectros de las BNC derivatizadas presentaron las señales características de los grupos éster (estiramientos del grupo carbonilo C=O y del enlace carbono  $S_{p2}$  -O,  $1741\text{ cm}^{-1}$  y  $1236\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente), confirmando que la reacción de acetilación ocurrió, en concordancia con los espectros de RMN presentados en la Sección anterior. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores que acetilaron nanofibras de celulosa mediante otras metodologías, en las cuales informaron estas mismas bandas aproximadamente entre  $1750\text{ cm}^{-1}$ – $1740\text{ cm}^{-1}$  para el C=O y  $1240\text{ cm}^{-1}$ – $1235\text{ cm}^{-1}$  para el carbono  $S_{p2}$  -O (C–O) (**Ashori, Babaee, Jonoobi, & Hamzed, 2014; Kim et al, 2002; Li et al., 2009; Zhou et al., 2016**). Por otra parte, en el espectro de la BNC acetilada con ácido cítrico (**Figura 3.8d**) se observa una pequeña banda adicional en  $\approx 1852\text{ cm}^{-1}$ , que puede relacionarse con la presencia de pequeñas cantidades de algún anhídrido cíclico de ácido cítrico que haya quedado adsorbido en el producto de reacción (**Yang & Wang, 1996**). La

baja absorbancia de esas señales y el hecho que no se hayan observado las señales características del cítrico en los espectros de RMN presentados en la Sección anterior, demuestra que la cantidad de anhídrido presente debe ser muy pequeña y, por lo tanto, se descarta que pueda influir en las propiedades de la BNC acetilada.



**Figura 3.8** Espectros FTIR de **(a)** BNC nativa, **(b)** BNC acetilada con ácido láctico ( $GS = 0,42 \pm 0,03$ ), **(c)** BNC acetilada con ácido (L)-tartárico ( $GS = 0,56 \pm 0,03$ ), **(d)** BNC acetilada con ácido cítrico ( $GS = 0,90 \pm 0,02$ ).

Las señales características del producto acetilado ( $1741$  y  $1236 \text{ cm}^{-1}$ ) se observaron claramente en todos los espectros de la BNC acetilada con los diferentes catalizadores. Sin embargo, la intensidad de esas señales no aumentó proporcionalmente al aumento del GS y, por este motivo, el estudio se utilizó solo como evidencia cualitativa de la acetilación. Debido a la fuerte agregación que sufre la BNC durante el secado después de un proceso extensivo de molienda, sólo se

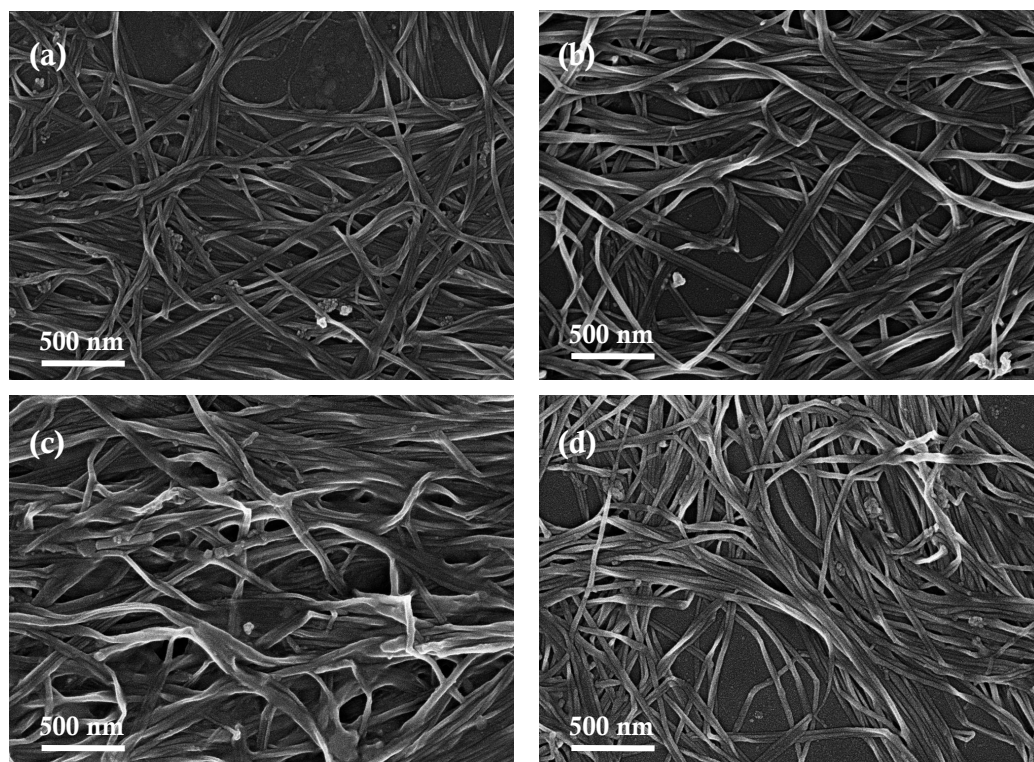
pueden llevar las muestras a pequeñas escamas apreciables a simple vista en las pastillas de KBr. La heterogeneidad de las pastillas de KBr utilizadas en la medida muy probablemente sea el motivo por el cual las determinaciones no tienen validez para un análisis cuantitativo.

### 3.2.4 Estudio morfológico por FESEM

Una vez confirmada la acetilación de la BNC se evaluó la apariencia de las nanofibras mediante micrografías de FESEM. Las imágenes tomadas para la BNC nativa (**Figura 3.9a**) evidenciaron nanofibras continuas con forma de cinta de sección transversal rectangular y que tienden a retorcerse sobre sí mismas. Estas cintas tienen anchos comprendidos entre 40–60 nm y son de longitud micrométrica en acuerdo a la bibliografía (**Hirai et al., 1998**). Como se observa, las nanofibras tienden a agregarse debido a la alta densidad de grupos hidroxilos superficiales. En la misma Figura, se presentan comparativamente las imágenes de la BNC acetilada con los tres catalizadores  $\alpha$ -hidroxiácidos.

Al evaluar las imágenes de FESEM de todas las muestras derivatizadas (**Figura 3.9b-d**), se evidenció que la estructura fibrosa de las nanofibras y su apariencia lisa se preservaron satisfactoriamente durante el tratamiento, aún a pesar de haber llevado a cabo la reacción en un tiempo considerable de 7h. No se evidenciaron tampoco diferencias significativas en el aspecto de las nanofibras acetiladas con los diferentes catalizadores ensayados. Otros autores han observado resultados similares para GS cercanos a los aquí medidos utilizando otras metodologías de acetilación. Por ejemplo, Ifuku y colaboradores informaron que en la acetilación de BNC con anhídrido acético hasta GS cercanos a 0,45, la apariencia de las nanofibras era similar a la de la BNC nativa (**Ifuku et al., 2007**). Sin embargo, para GS mucho más altos como 1,55, había un incremento notorio en el volumen de las nanofibras que los autores asociaron con la introducción de los grupos éster en el interior de las nanofibras y no sólo en su superficie. Por otro lado, en la acetilación con anhídrido acético catalizada con yodo llevada a cabo por Hu y colaboradores, cuando el GS fue superior a 0,63 los autores observaron ligeras rugosidades en las nanocintas que aumentaban con el GS, y que adjudicaron a cambios estructurales

relacionados con grupos acetilo incorporados más allá de la superficie de la celulosa (Hu et al., 2011).



**Figura 3.9** Micrografías de (a) BNC nativa, (b) BNC acetilada con ácido láctico ( $GS= 0,42\pm0,03$ ), (c) BNC acetilada con ácido (L)-tartárico ( $GS= 0,56\pm0,03$ ), (d) BNC acetilada con ácido cítrico ( $GS= 0,90\pm0,02$ ).

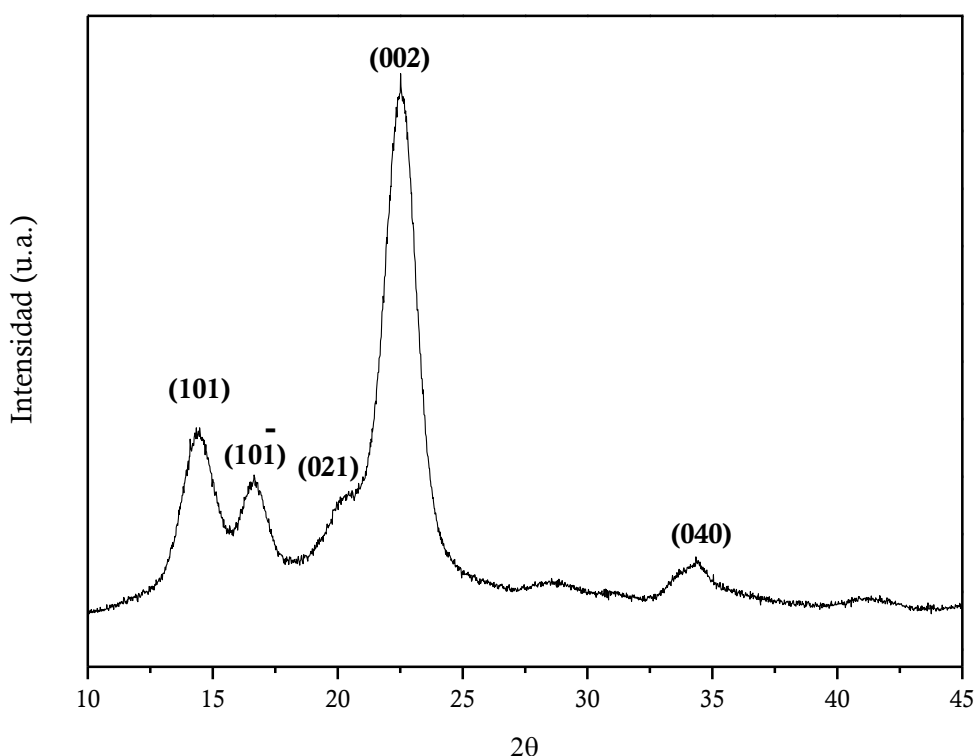
### 3.2.5 Estudio de cristalinidad por DRX

La BNC se caracteriza por su elevada resistencia y rigidez, lo que la vuelve un sustrato que reviste gran interés para su uso como refuerzo de matrices poliméricas. En este contexto, cuando se requiere derivatizar la BNC para mejorar, por ejemplo, su compatibilidad con una matriz hidrofóbica, se espera no modificar la estructura cristalina de la celulosa con el fin de no afectar sus destacadas propiedades mecánicas intrínsecas. En este sentido, se evalúan en esta Sección los posibles cambios en la cristalinidad de la BNC como consecuencia de la acetilación en presencia de los diferentes  $\alpha$ -hidroxiácidos ensayados como catalizadores.

Inicialmente, se adquirió el patrón de difracción de rayos X de la BNC nativa (**Figura 3.10**). Como se observa, el patrón corresponde al polimorfismo tipo  $I\alpha$  de la

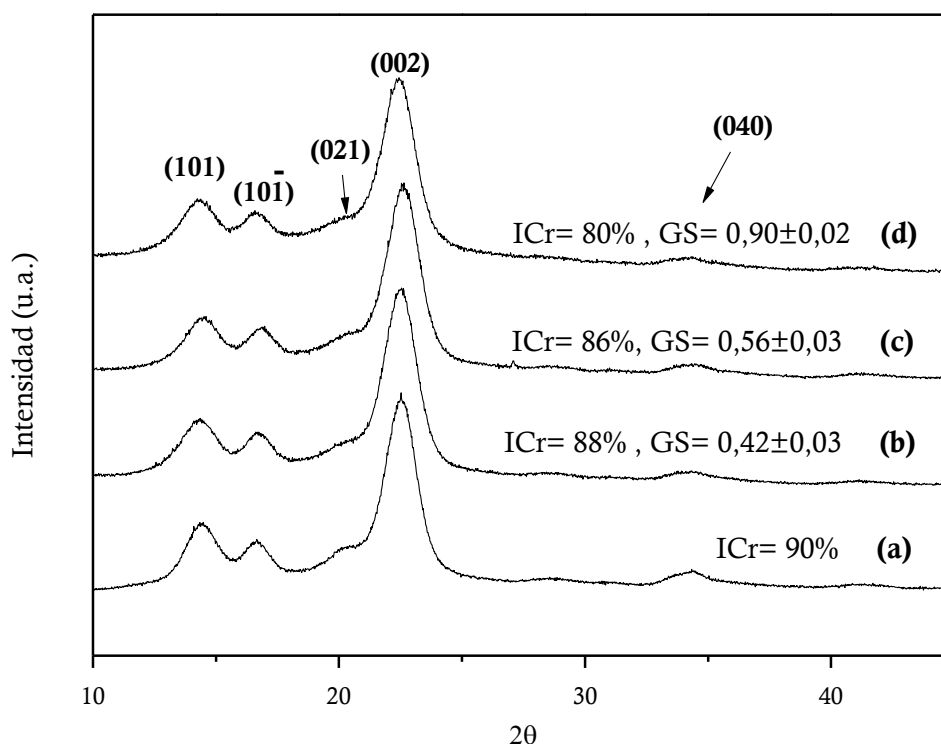


celulosa que, como se mencionó en la **Sección 1.1.2**, es la configuración cristalina típica producida naturalmente por bacterias y que corresponde a una estructura triclinica dominante (**Moon et al., 2011**). Las señales observadas se centraron en  $2\theta = 14,4^\circ$  (101),  $16,7^\circ$  (10 $\bar{1}$ ),  $20,1^\circ$  (021),  $22,5^\circ$  (002), y  $34,4^\circ$  (040), habiéndose indicado entre paréntesis el plano cristalino correspondiente para celulosa I (**Johnson Ford, Mendon, Thames, & Rawlins, 2010**).



**Figura 3.10** Patrón de DRX de BNC nativa.

En la **Figura 3.11** se comparan los difractogramas de la BNC acetilada con los tres  $\alpha$ -hidroxiácidos evaluados con el correspondiente a la BNC nativa. Como se observa, todos los patrones de difracción de las muestras acetiladas son similares al del polímero nativo, no observándose picos adicionales ni corrimientos significativos de ninguno de los picos o variaciones significativas en su intensidad. Lo anterior sugiere cualitativamente que no hubo una alteración significativa de la estructura cristalina de la BNC producto de la acetilación.



**Figura 3.11** Patrones de DRX de **(a)** BNC nativa, **(b)** BNC acetilada con ácido láctico ( $GS = 0,42 \pm 0,03$ ), **(c)** BNC acetilada con ácido (L)-tartárico ( $GS = 0,56 \pm 0,03$ ), **(d)** BNC acetilada con ácido cítrico ( $GS = 0,90 \pm 0,02$ ).

En la bibliografía pueden hallarse diferentes métodos para estimar un índice de cristalinidad de la BNC a partir de su difractograma de rayos X (**Park et al., 2010**). Uno de los métodos más utilizados es el método empírico de Segal descrito en la **Sección 2.5.8 (Segal et al., 1959)**. Éste es un método empírico muy sencillo y rápido que se utiliza con frecuencia para comparar diferencias relativas entre muestras de celulosa tipo I. El mismo relaciona únicamente la intensidad máxima del principal plano cristalino ( $I_{002}$ ) y un valor de  $2\theta$  asociado por Segal al área amorfa ( $I_{AM}$ ). Las limitaciones del método están asociadas a la falta de patrones de celulosa apropiados para calibrar la medición, la falta de certeza para estimar el punto máximo del área amorfa y la exclusión en la determinación de otras contribuciones cristalinas (**Park et al, 2010**). Sin embargo, el método es muy útil para realizar comparaciones y es el

procedimiento más ampliamente utilizado para BNC. Los ICr calculados se incluyeron en los difractogramas de las muestras.

Como se observa en la **Figura 3.11**, la BNC nativa tiene una alta proporción de dominios cristalinos que, de acuerdo con la ecuación de Segal, corresponden a un ICr de 90%. Este valor elevado es característico de la nanocelulosa de origen bacteriano y superior al de otros tipos de nanocelulosas. Por otra parte, los valores de ICr obtenidos para la BNC acetilada con ácido láctico y ácido (L)-tartárico fueron de 88 y 86% respectivamente, indicando que no hubo una alteración significativa de la cristalinidad en la acetilación con estos catalizadores. Por otra parte, para la muestra acetilada con ácido cítrico el ICr calculado fue un poco menor (80%), aunque en ninguno de los casos, la reducción de cristalinidad superó el 10%.

Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones elegidas y dentro del intervalo de tiempo de reacción estudiado, la acetilación involucró esencialmente los grupos hidroxilo expuestos en la superficie de las nanocintas y/o los que se encuentran en las regiones amorfas de la BNC, sin afectar la ultraestructura de las nanofibras. Estos resultados son congruentes con la apariencia morfológica de las nanofibras que se estudió previamente mediante FESEM en la **Sección 3.2.4**.

Estudios previos de otros autores que acetilaron BNC por otras metodologías hasta GS similares a los alcanzados en esta Sección, también confirmaron el carácter predominantemente superficial de la acetilación. Por ejemplo, Yamamoto y colaboradores, informaron que los patrones de difracción de la BNC acetilada usando ácido perclórico como catalizador en un medio de reacción de anhídrido acético/acetato de amilo, sugerían alteraciones significativas en la cristalinidad de la BNC a partir de un GS de 1,0; mientras que por debajo de este valor de GS la acetilación fue preferentemente superficial (**Yamamoto et al., 2006**). En otro sistema también catalizado con ácido perclórico, pero en un medio de reacción de ácido acético/tolueno/anhídrido acético, los autores demostraron que el patrón de difracción de la muestra de BNC con GS de 0,45 fue similar al obtenido para la BNC nativa, lo que se atribuyó a una acetilación preferencialmente superficial de la celulosa. En cambio, para GS superiores (0,95 y 1,55) los resultados de estos autores evidenciaron cambios significativos en los difractogramas que fueron asociados con cambios de la estructura cristalina de la celulosa (**Ifuku et al., 2007**). Por otra parte,

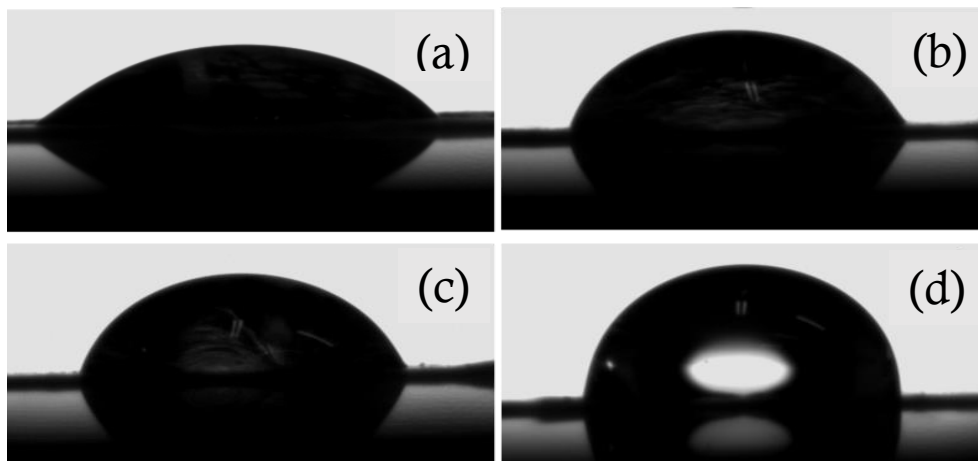
en la acetilación de BNC con ácido acético catalizada con cloruro *p*-toluensulfónico desarrollada por Lee y colaboradores, los autores informaron un ICr determinado mediante la ecuación de Segal para la BNC acetilada de 83,2 % respecto a un 90,2% para la BNC nativa (Lee et al., 2011). Los autores consideraron que esta disminución en el ICr no fue lo suficientemente significativa y que la acetilación fue superficial. Por último, en la acetilación de BNC con anhídrido acético catalizada con yodo implementada por Hu y colaboradores, se informó que las muestras obtenidas con GS 0,45 y 0,65 mantuvieron su estructura cristalina después de la acetilación (Hu et al., 2011). Sin embargo, cuando se alcanzaron valores de GS de 1,75 y 1,98, la acetilación ya no fue solamente un fenómeno superficial ya que se evidenciaron cambios significativos en los patrones de difracción de rayos X de los productos.

El carácter preferentemente superficial de la acetilación de BNC alcanzado con la ruta propuesta en esta Tesis bajo las condiciones estudiadas utilizando los diferentes catalizadores  $\alpha$ -hidroxiácidos resulta interesante en vista del uso de las nanofibras como refuerzo de materiales compuestos.

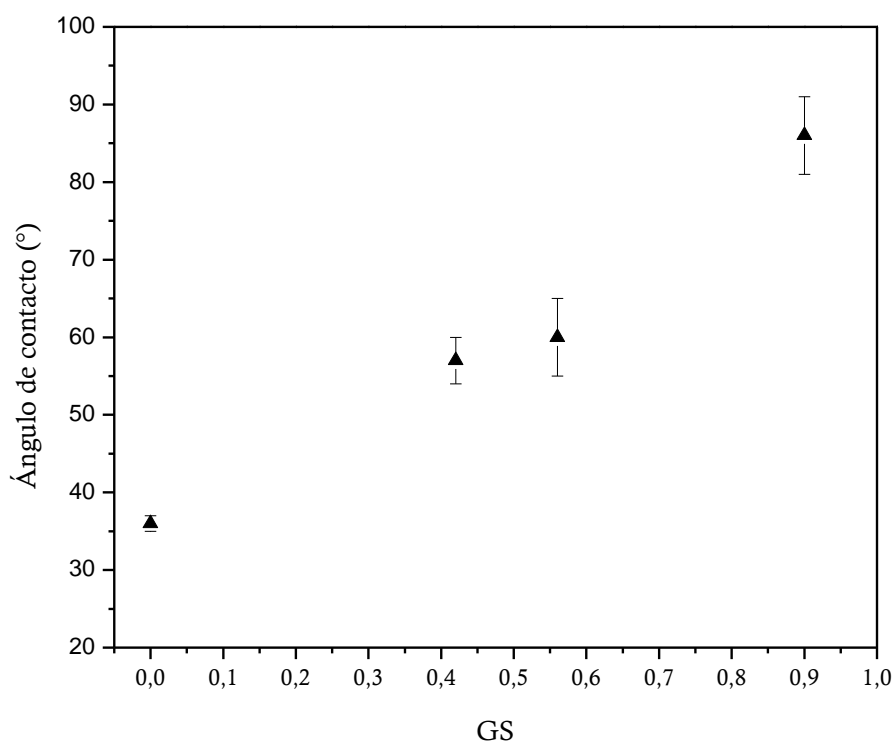
### **3.2.6 Análisis del cambio de polaridad inducido**

#### **3.2.6.1 Ángulo de contacto**

Como un indicador del cambio en la hidrofiliidad de las nanofibras de celulosa bacteriana como consecuencia de la acetilación, se realizaron mediciones del ángulo de contacto en equilibrio sobre películas secas de BNC con distinto GS. Las imágenes de las muestras utilizadas para determinar el ángulo de contacto a los 60 s se muestran en la **Figura 3.12**.



**Figura 3.12** Imágenes de gotas de agua usadas para determinar el ángulo de contacto en el equilibrio a los 60 s de: **(a)** BNC nativa, **(b)** BNC acetilada con ácido láctico ( $GS= 0,42\pm0,03$ ), **(c)** BNC acetilada con ácido (L)-tartárico ( $GS= 0,56\pm0,03$ ), **(d)** BNC acetilada con ácido cítrico ( $GS= 0,90\pm0,02$ ).



**Figura 3.13** Evolución del ángulo de contacto en el equilibrio a los 60 s en función del grado de sustitución de BNC.

Como se puede observar en la **Figura 3.13**, el ángulo de contacto promedio varió significativamente en función del grado de sustitución de la BNC. Para la BNC nativa el ángulo de contacto fue de  $36^{\circ}\pm 1$ , un valor relativamente bajo debido a su reconocida hidrofiliidad. Por el contrario, como una clara evidencia de la disminución de la polaridad de la BNC como consecuencia de la acetilación, los ángulos de contacto para las muestras acetiladas con GS comprendidos entre  $0,42\pm 0,03$  y  $0,90\pm 0,02$ , aumentaron significativamente ( $57^{\circ}\pm 3$  y  $86^{\circ}\pm 5$  respectivamente) con respecto al observado para BNC nativa.

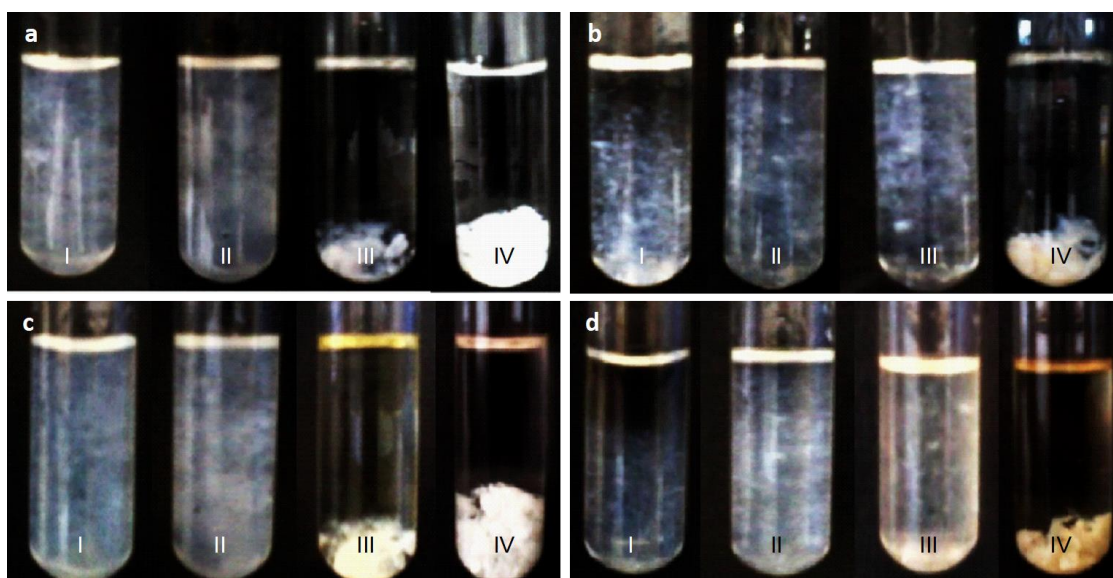
Como evidencia cualitativa adicional del incremento de la reducción de polaridad de las BNC acetiladas obtenidas, se midió el tiempo requerido para la absorción completa de una gota de agua en películas de nanocelulosa con diferentes GS. Como se observa en la **Tabla 3.1**, se observó un aumento significativo entre la celulosa nativa y la acetilada, observándose luego pequeños aumentos del tiempo con el aumento del GS.

GS	Tiempo (min)
0 (nativa)	$25\pm 5$
$0,42\pm 0,03$	$70\pm 8$
$0,56\pm 0,03$	$74\pm 8$
$0,90\pm 0,02$	$83\pm 9$

**Tabla 3.1** Resultados del ensayo de absorción de agua para BNC nativa y BNC acetilada con ácido láctico (GS=  $0,42\pm 0,03$ ), con ácido (L)–tartárico (GS=  $0,56\pm 0,03$ ) y con ácido cítrico (GS=  $0,90\pm 0,02$ ).

### 3.2.6.2 Dispersabilidad en solventes

La alta hidrofiliidad de la celulosa limita no solo su uso en materiales compuestos de matriz hidrofóbica, sino también su dispersión en medios líquidos no polares. Por tal motivo, como un ensayo adicional orientado a confirmar el cambio en la hidrofiliidad de las nanofibras al ser acetiladas, se prepararon dispersiones en solventes de polaridad decreciente como se describió en la **Sección 2.5.13**, y se evaluó la dispersabilidad de la BNC nativa y la BNC acetilada con el menor GS ( $0,42\pm0,03$ ) en cada uno de ellos. Los solventes utilizados en escala descendente de polaridad fueron: Agua (IP: 10,2), acetona (IP: 5,1), diclorometano (IP: 3,1) y éter de petróleo (IP: 0,1); donde IP es el índice de polaridad.



**Figura 3.14** Dispersabilidad en diferentes solventes al tiempo inicial y luego de 72 h en reposo para BNC nativa y acetilada (GS=  $0,42\pm0,03$ ). **(a)** BNC nativa, 0 h; **(b)** BNC acetilada, 0 h; **(c)** BNC nativa, 72 h; **(d)** BNC acetilada, 72 h. (I: agua, II: acetona, III: diclorometano, IV: éter de petróleo).

En la **Figura 3.14** se ilustra la apariencia inicial y después de transcurridas 72 h de las dispersiones de BNC nativa y acetilada con GS=  $0,42\pm0,03$ . Como se muestra en la **Figura 3.14a**, la BNC nativa se dispersó fácilmente en agua y acetona,

mientras que en diclorometano y en éter de petróleo tuvo lugar una rápida sedimentación de la BNC. Por el contrario, la BNC acetilada sedimentó lentamente en agua, y se dispersó significativamente en acetona y diclorometano (**Figura 3.14b**). En cuanto a las dispersiones en éter de petróleo, tanto la BNC nativa como la acetilada mostraron el mismo patrón de incompatibilidad, dada la extremadamente baja polaridad del medio. Por último, la inspección ocular de todas las suspensiones luego de 72 h en reposo (**Figuras 3.14c-d**) demostró la estabilidad de las suspensiones y confirmó el cambio en la polaridad de las nanofibras de celulosa como consecuencia de la acetilación.

### 3.3 Conclusiones del Capítulo 3

En este Capítulo se exploró la reacción de acetilación de nanocelulosa de origen bacteriano catalizada por tres catalizadores  $\alpha$ -hidroxiácidos de origen natural (ácidos, láctico, (L)-tartárico y cítrico), bajo condiciones libres de cosolventes y a presión atmosférica. Los tres catalizadores resultaron activos obteniéndose a las 7 h de reacción productos con GS comprendidos en el rango de  $0,42 \pm 0,03$  a  $0,90 \pm 0,02$ .

Las técnicas de caracterización de  $^{13}\text{C}$  RMN y FTIR confirmaron la acetilación. Los ensayos de DRX y FESEM demostraron que la cristalinidad y la morfología de las nanofibras no presentaron cambios significativos, lo que se consideró una evidencia de que la modificación fue mayoritariamente superficial. Finalmente, la medición de los ángulos de contacto y los estudios de dispersión en solventes orgánicos de las nanofibras derivatizadas permitieron corroborar que el grado de acetilación obtenido fue suficiente para lograr una reducción significativa de la polaridad de la BNC.

Estos resultados alentaron un estudio más profundo de las oportunidades que ofrece la ruta para modular la polaridad de la BNC para aplicaciones que así lo requieran. Debido a que el ácido cítrico fue el  $\alpha$ -hidroxiácido con el que se alcanzó el valor de sustitución más alto de la BNC al tiempo fijo elegido, se seleccionó este catalizador para continuar los ensayos que se describen en los posteriores Capítulos.



### 3.4 Bibliografía del Capítulo 3

Agustín, M. B., Nakatsubo, F., Yano, H. Products of low-temperature pyrolysis of nanocellulose esters and implications for the mechanism of thermal stabilization. *Cellulose*, 2016, 23, 2887–2903.

Agustín, M. B., Nakatsubo, F., Yano, H. Improved resistance of chemically modified nanocellulose against thermally-induced depolymerization. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 164, 1–7.

Ashori, A., Babae, M., Jonoobi, M., Hamzed, Y. Solvent-free acetylation of cellulose nanofibers for improving compatibility and dispersion. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 102, 369–375.

Atalla, R. H., VanderHart, D. L. The role of solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 1999, 15, 1–19.

Ávila Ramírez, J. A., Juan Suriano, C., Cerrutti, P., Foresti, M. L. Surface esterification of cellulose nanofibers by a simple organocatalytic methodology. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 114, 416–423.

Berlitz, S., Molina-Boisseau, S., Nishiyama, Y., Heux, L. Gas-phase surface esterification of cellulose microfibrils and whiskers. *Biomacromolecules*, 2009, 10, 2144–2151.

Bismarck, A., Mishra, S., Lampke, T. Plant fibers as reinforcement for green composites, In *Natural fibers, biopolymers and biocomposites*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2005.

Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J. L., Caroa, G., Mondragon, I., Gañan, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84, 96–102.

Cerrutti, P., Roldán, P., Martínez García, R., Galvagno, M. A., Vázquez, A., Foresti, M. L. Production of bacterial nanocellulose from wine industry residues: importance of fermentation time on pellicle characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 2016, 133, 1–9.

Cunha, A. G., Zhou, Q., Larsson, P. T., Berglund, L. A. Topochemical acetylation of cellulose nanopaper structures for biocomposites: mechanisms for reduced water vapour sorption. *Cellulose*, 2014, 21, 2773–2787.

Czaja, W., Romanovicz, D., Brown Malcolm, R. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, 2004, 11, 403–411.

De Cuadro, P., Belt, T., Kontturi, K. S., Reza, M., Kontturi, E., Vuorinen, T., Hughes, M. Cross-linking of cellulose and poly(ethylene glycol) with citric acid. *Reactive and Functional Polymers*, 2015, 90, 21–24.

De Marco Lima, G., Sierakowski, M.-R., Faria-Tischer, P. C. S., Tischer, C. A. Characterisation of bacterial cellulose partly acetylated by dimethylacetamide/lithium chloride. *Materials Science and Engineering*, 2011, 31, 190–197.

Domínguez de María, P. Minimal hydrolases: organocatalytic ring-opening polymerizations catalyzed by naturally occurring carboxylic acids. *ChemCatChem*, 2010, 2, 487–492.

Dufresne, A. Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. *Materials today*, 2013, 16, 220–227.

Fischer, J. W., Merwin, L. H., Nissan, R. A. NMR investigation of the thermolysis of citric acid. *Applied Spectroscopy*, 1995, 49, 120–126.

Gonçalves, S., Padrao, J., Rodrigues, I. P., Silva, J. P., Sencadas, V., Lanceros-Mendez, S., Girão, H., Dourado, F., Rodrigues, I. R. Bacterial cellulose as a support for the growth of retinal pigment epithelium. *Biomacromolecules*, 2015, 16, 1341–1351.

Gonçalves, S., Padrao, J., Rodrigues, I. P., Silva, J. P., Sencadas, V., Lanceros-Mendez, S., Girão, H., Gama, F. M. Acetylated bacterial cellulose coated with urinary bladder matrix as a substrate for retinal pigment epithelium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 139, 1–9.

Hafrén, J., Córdova, A. Direct organocatalytic polymerization from cellulose fibers. *Macromolecular Rapid Communications*, 2005, 26, 82–86.

Hafrén, J., Córdova, A. Patent: modification of amines and alcohols, 2009. US 2009/0111980 A1.

Hirai, A., Tsuji, M., Yamamoto, H., Horii, F. In situ crystallization of bacterial cellulose III. Influences of different polymeric additives on the formation of microfibrils as revealed by transmission electron microscopy. *Cellulose*, 1998, 5, 201–213.

Hsieh, Y. C., Yano, H., Nogi, M., Eichhorn, S. J. An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments. *Cellulose*, 2008, 15, 507–513.

Hu, W., Chen, S., Xu, Q., Wang, H. Solvent-free acetylation of bacterial cellulose under moderate conditions. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83, 1575–1581.

Hubbe, M. A., Rojas, O. J., Lucia, L. A. Green modification of surface characteristics of cellulosic materials at the molecular or nanoscale: a review. *BioResources*, 2015, 10, 6095–6206.

Huang, P., Zhao, Y., Kuga, S., Wu, M., Huang, Y. A. Versatile method for producing functionalized cellulose nanofibers and their application. *Nanoscale*, 2016, 8, 3753–3759.

Ifuku, S., Nogi, M., Abe, K., Handa, K., Nakatsubo, F., Yano, H. Surface modification of bacterial cellulose nanofibers for property enhancement of optically transparent composites: dependence on acetyl-group DS. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 1973–1978.

Jandura, P., Kokta, B. V., Riedl, B. Fibrous long-chain organic acid cellulose esters and their characterization by diffuse reflectance FTIR spectroscopy, solid-state CP/MAS<sup>13</sup>C-NMR, and W-ray diffraction. *Journal of Applied Polymer Science*, 2000, 78, 1354–1365.

Johnson Ford, E. N., Mendon, S. K., Thames, S. F., Rawlins, J. W. X-ray diffraction of cotton treated with neutralized vegetable oil-based macromolecular crosslinkers. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 2010, 5, 10–20.

Kim, D-Y., Nishiyama, Y., Kuga, S. Surface acetylation of bacterial cellulose. *Cellulose*, 2002, 9, 361–367.

Lee, K-Y., Blaker, J. J., Bismarck, A. Surface functionalisation of bacterial cellulose as the route to produce green polylactide nanocomposites with improved properties. *Composite Science Technology*, 2009, 69, 2724–2733.

Lee, K-Y., Quero, F., Blaker, J. J., Hill, C. A. S., Eichhorn, S. J., Bismarck, A. Surface only modification of bacterial cellulose nanofibres with organic acids. *Cellulose*, 2011, 18, 595–605.

Lee, K-Y., Blaker, J. J., Bismarck, A. Susceptibility of never-dried and freeze-dried bacterial cellulose towards esterification with organic acid. *Cellulose*, 2012, 19, 891–900.

Li, J., Zhang, L-P., Peng, F., Bian, J., Yuan, T-O., Xu, F., Sun, R-C. Microwave-assisted solvent-free acetylation of cellulose with acetic anhydride in the presence of iodine as a catalyst. *Molecules*, 2009, 14, 3551–3566.

Missoum, K., Belgacem, M. N., Bras, J. Nanofibrillated cellulose surface modification: a review. *Materials*, 2013, 6, 1745–1766.

Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., Youngblood, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40, 3941–3994.

Nogi, M., Handa, K., Nakatsubo, F., Ifuku, S., Yano, H. Property enhancement of optically transparent bionanofiber composites by acetylation. *Applied Physics Letters*, 2006, 89, 233123.

Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., Johnson, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulose performance. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3, 1–10.

Rani, M. U., Rastogi, N. K., Appaiah, K. A. Statistical optimization of medium composition for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk extract an agro-industry waste. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 21, 739–745.

Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., Conrad, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, 1959, 29, 786–794.

Sehaqui, H., Zimmermann, T., Tingaut, P. Hydrophobic cellulose nanopaper through a mild esterification procedure. *Cellulose*, 2014, 21, 367–382.

Siró, I., Plackett, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, 2010, 17, 459–494.

Spinella, S., Maiorana, A., Qian, Q., Dawson, N. J., Hepworth, V., McCallum, S. A., Ganesh, M., Singer, K. D., Gross, R. A. Concurrent cellulose hydrolysis and esterification to prepare a surface-modified cellulose nanocrystals decorated with carboxylic acid moieties. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2016, 4, 1538–1550.

Suetsugu, M., Kotera, M., Nishino, T. Cellulosic nanocomposite prepared by acetylation of bacterial cellulose using supercritical carbon dioxide. In *17<sup>th</sup> International Conference on Composite Materials*, 2009, Edinburgh, UK.

Tomé, L. C., Brandao, L., Mendes, A. M., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C., Gandini, A., Freire, C. S. R., Marrucho, I. M. Preparation and characterization of bacterial cellulose membranes with tailored surface and barrier properties. *Cellulose*, 2010, 17, 1203–1211.

Tomé, L. C. Pinto, R. J. B., Trovatti, E., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C., Gandini, A. Transparent bionanocomposites with improved properties prepared from acetylated bacterial cellulose and poly(lactic acid) through a simple approach. *Green Chemistry*, 2011a, 13, 419–427.

Tomé, L. C., Freire, M. G., Rebelo, L. P. N., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C., Marrucho, I. M., Freire, C. S. R. Surface hydrophobization of bacterial and vegetable cellulose fibers using ionic liquids as solvent media and catalysts. *Green Chemistry*, 2011b, 13, 2464–2470.

Vázquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., Galvagno, M. A. Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Polymers and the Environment*, 2013, 21, 545–554.

Yamamoto, H., Horii, F., Hirai, A. Structural studies of bacterial cellulose through the solid-phase nitration and acetylation by CP/MAS<sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Cellulose*, 2006, 13, 327–342.

Yang, C. Q., Wang, X., Kang, I-S. Ester crosslinking of cotton fabric by polymeric carboxylic acids and citric acid. *Textile Research Journal*, 1997, 67, 334–342.

Yang, C. Q., Wang, X. Formation of cyclic anhydride intermediates and esterification of cotton cellulose by multifunctional carboxylic acids: an infrared spectroscopy study. *Textile Research Journal*, 1996, 66, 595–603.

Zhou, X., Lin, X., White, K. L., Lin, S., Wu, H., Cao, S., Huang, L., Chen, L. Effect of the degree of substitution on the hydrophobicity of acetylated cellulose for production of liquid marbles. *Cellulose*, 2016, 23, 811–821.



## 4. Acetilación de BNC catalizada con ácido cítrico: Estudio de variables del proceso

*A partir del estudio exploratorio realizado en el Capítulo anterior, y habiendo confirmado que el método de acetilación catalizado con  $\alpha$ -hidroxiácidos adaptado de la bibliografía efectivamente permite acetilar nanocelulosa bacteriana sin presencia significativa de productos secundarios, en el presente Capítulo se estudia cómo las condiciones de reacción (carga de catalizador, temperatura y tiempo) pueden variarse para modular el nivel de GS conferido a la BNC. Además, se evalúa el impacto de las etapas de preacondicionamiento de la BNC en el GS conferido al producto final. Finalmente, se propone también una primera etapa de escalado del sistema a fines de aumentar la producción de BNC acetilada que será utilizada en el Capítulo 6 como refuerzo del PLA.*

*Los materiales obtenidos con GS variable se caracterizaron mediante las técnicas ya descritas en el Capítulo 3.*





## 4.1 Introducción

Cuando la nanocelulosa se derivatiza mediante reacciones de esterificación, el grado de sustitución (GS) y la estructura del resto hidrocarbonado de los grupos éster determinan las propiedades del producto. Como se mencionó en el Capítulo anterior, la esterificación, además de modificar la polaridad del material, puede afectar su cristalinidad y estabilidad térmica, entre otras propiedades que son clave cuando la nanocelulosa va a ser usada como refuerzo de matrices poliméricas. Como se discutió previamente, el grado de cristalinidad del refuerzo condiciona las propiedades mecánicas del producto final, mientras que su estabilidad térmica condiciona tanto el procesamiento al que puede ser sometido el material compuesto como sus posibles aplicaciones (**Berglund & Peijs, 2010**).

En el **Capítulo 3** se comparó la utilidad de tres hidroxiaácidos diferentes como catalizadores de la acetilación sin cosolventes agregados de BNC, comprobándose que el ácido cítrico era el que presentaba mayor actividad sin evidencias de la presencia de productos secundarios. Por estos motivos, se seleccionó el ácido cítrico para todos los posteriores estudios.

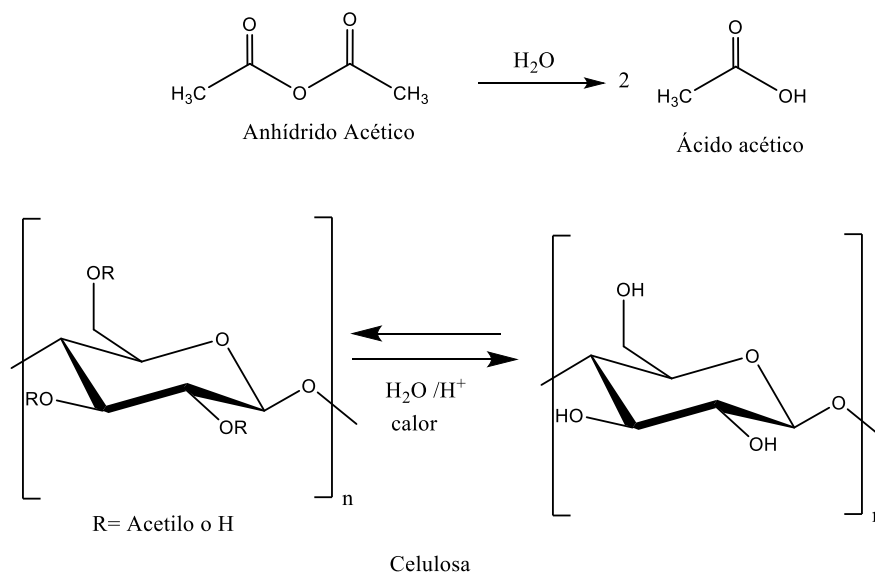
En este Capítulo de la Tesis se presenta un estudio del efecto de las variables de reacción (tiempo, temperatura y carga del catalizador) sobre el GS conferido a la BNC, con el objetivo de evaluar la versatilidad de la ruta y determinar cómo puede manipularse el nivel de modificación conferido a la BNC en función del requerimiento de cada aplicación. También se presenta un primer escalado de la reacción de esterificación catalizada por ácido cítrico con la combinación de variables de reacción seleccionada en base al estudio de variables realizado.

## 4.2 Resultados y discusión

### 4.2.1 Estudio del preacondicionamiento de la BNC en el GS alcanzado

Como se detalló en la Introducción general, la estructura química de la celulosa tiene tres grupos hidroxilo por cada unidad de anhidroglucosa (UAG), lo que la hace altamente hidrofílica y promueve la formación de numerosos puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. Esta es la razón por la que, cuando se deshidrata la celulosa, puede promoverse su hornificación, término que hace referencia a su agregación irreversible (Fernandes Diniz et al., 2004).

Sin embargo, para la esterificación de la BNC que proviene de un medio acuoso (ver **Sección 1.3.1**), resulta imprescindible remover el agua remanente en la suspensión de nanofibras, ya que la misma hidrolizaría el anhídrido acético (que es el agente acilante) a su ácido correspondiente (**Figura 4.1**). Además, los grupos acetatos formados en el proceso de acetilación de la celulosa podrían hidrolizarse en presencia de agua revirtiendo total o parcialmente la reacción (**Figura 4.1**).



**Figura 4.1** Hidrólisis del anhídrido acético y de la celulosa esterificada en presencia de agua.

Para la remoción del agua de la suspensión de BNC el secado por calor y la liofilización no son buenas opciones por inducir la agregación irreversible de las nanofibras, mientras que el secado por el método del punto supercrítico (CO<sub>2</sub>) (Cunha et al., 2014) requiere de equipamiento costoso y de difícil acceso. Por el contrario, el desplazamiento del agua con otros solventes miscibles sin necesidad de secar la nanocelulosa es una alternativa sencilla, factible de ser implementada y una de las estrategias de remoción del agua de la celulosa más habitualmente utilizadas (Kim et al., 2002; Lee et al., 2009).

La **Tabla 4.1** resume el efecto del preacondicionamiento de la BNC por intercambios de solvente sobre el GS alcanzado a las 3 h de reacción, en las condiciones explicitadas en el pie de la Tabla. Analizando los datos de la Tabla, resulta obvia la relevancia del intercambio de solventes para el éxito de la reacción de esterificación. Dado que los mejores resultados se obtuvieron cuando el intercambio de solventes se realizó hasta el anhídrido acético, se adoptó este procedimiento para todos los estudios posteriores que se presentan en esta Tesis.

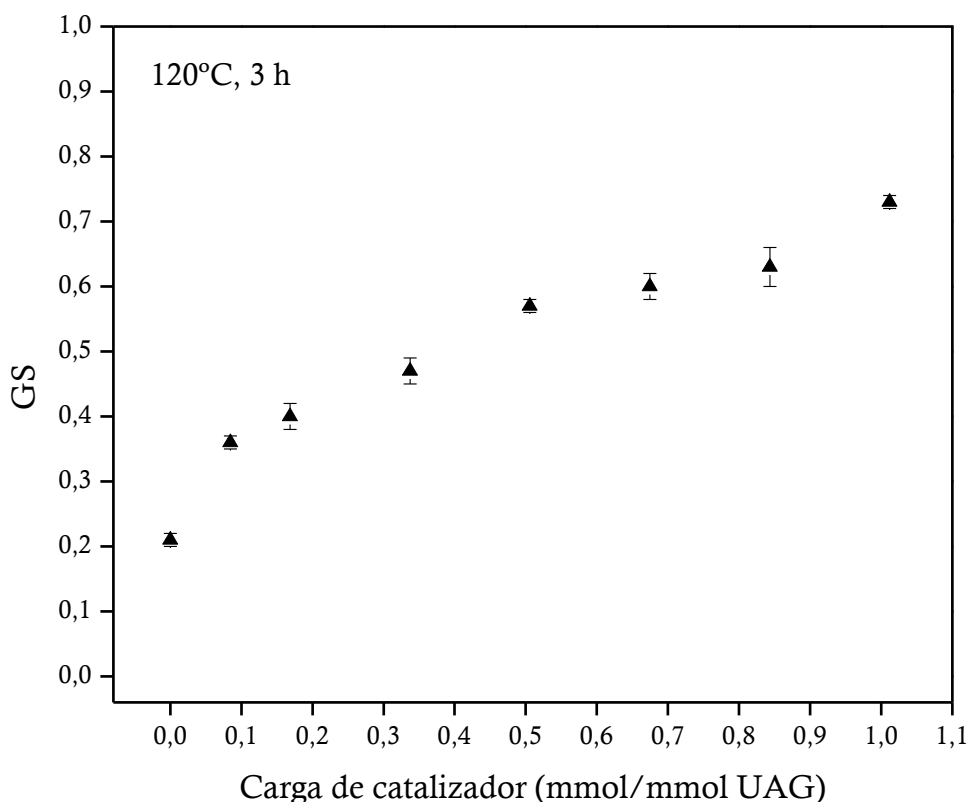
Intercambios de solvente	GS
Sin intercambios	0
2 intercambios a ácido acético (40 mL, 10 min). <b>(Capítulo 3)</b>	0,40±0,02
2 intercambios a ácido acético (40 mL, 10 min) y 2 intercambios a anhídrido acético (40 mL, 10 min).	0,73±0,01

**Tabla 4.1** Efecto de los intercambios de solvente sobre el GS de la BNC acetilada (1,01 mmol ácido cítrico/mmol UAG, 120°C y 3 h).

#### 4.2.2 Evaluación de las condiciones de reacción

A los efectos de evaluar el efecto de la carga de catalizador en el GS conferido a la BNC, la carga de ácido cítrico se varió en el rango de 0,08 a 1,01 mmol de ácido

cítrico/mmol de UAG. En la **Figura 4.2** se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar en la Figura, variando la cantidad de catalizador se puede modular el GS de la BNC en el rango de  $0,36\pm0,01$  a  $0,73\pm0,01$ . Los valores del GS fueron siempre superiores a la reacción no catalizada ( $GS = 0,21\pm0,01$ ).

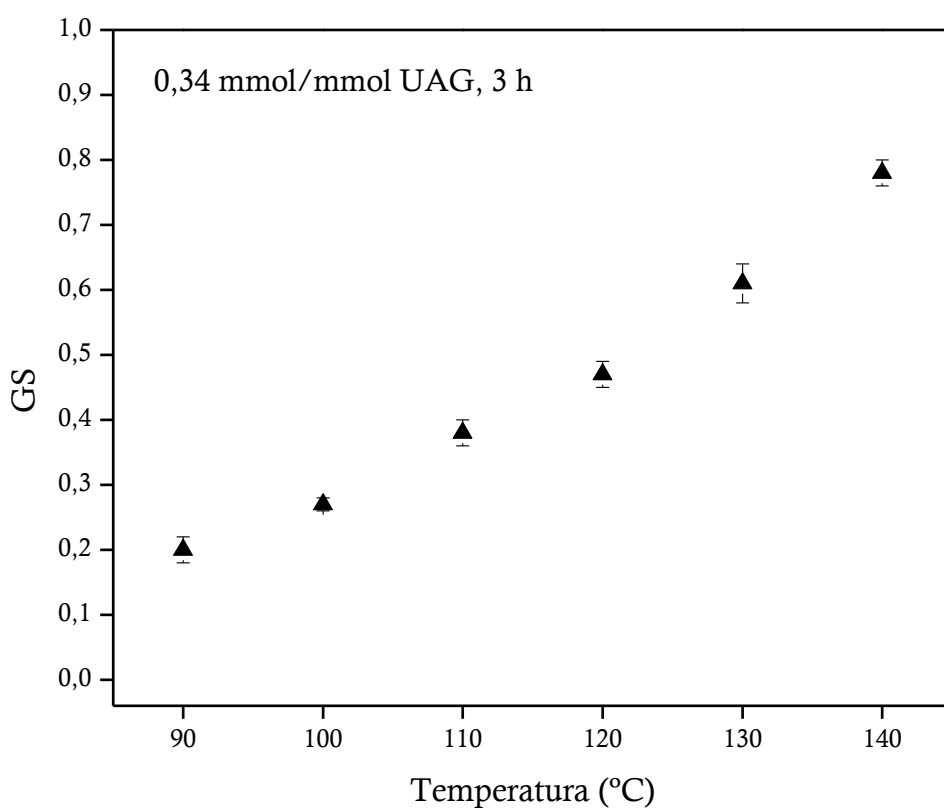


**Figura 4.2** Efecto de la carga de catalizador (120°C, 3 h).

En función de los resultados obtenidos, e interesados en disminuir la carga de catalizador para reducir el costo del proceso, se seleccionó una carga de catalizador intermedia de 0,34 mmol ácido cítrico/mmol UAG para evaluar el efecto de la temperatura (**Figura 4.3**) y el tiempo de reacción (**Figura 4.4**).

Otra variable importante que impacta directamente en el consumo energético y, por lo tanto, en el costo del proceso, es la temperatura. En la **Figura 4.3** se resume el estudio del efecto de la temperatura sobre el GS conferido a la BNC, usando una carga de catalizador de 0,34 mmol ácido cítrico/mmol UAG y fijando el tiempo de reacción en 3h. El rango de temperatura estudiado abarcó el intervalo entre 90 y 140°C.

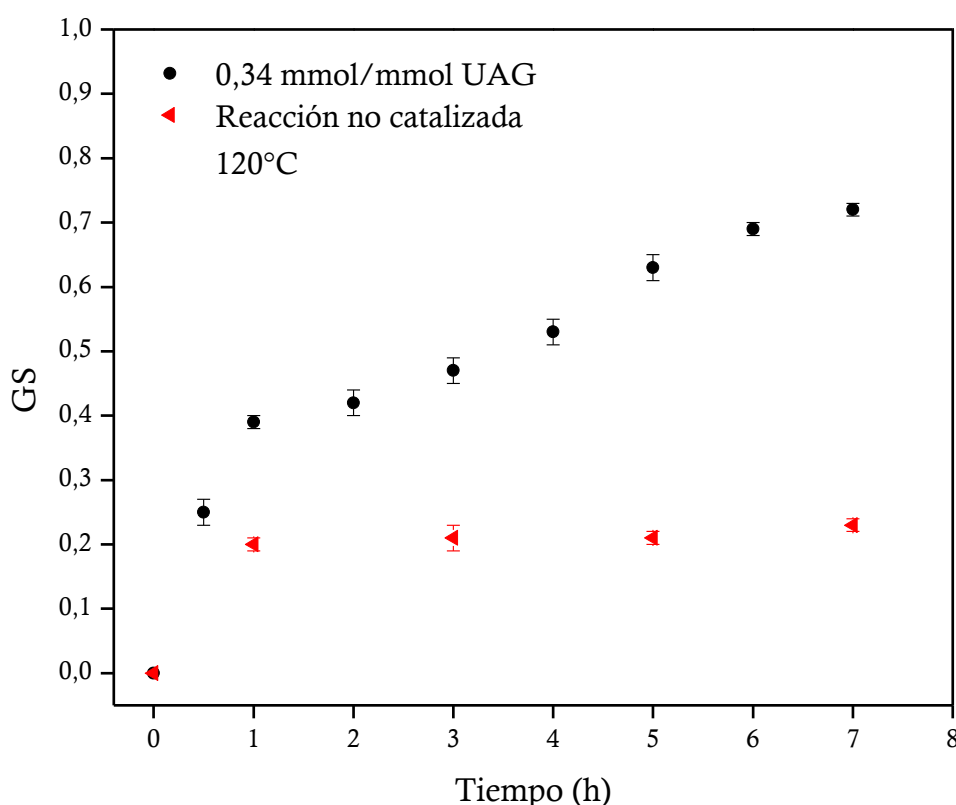
Como se puede observar en la Figura, la variación de la temperatura permitió modular el GS en un rango entre  $0,20 \pm 0,02$  y  $0,78 \pm 0,02$ . A  $140^\circ\text{C}$  se obtuvo un producto con un GS de  $0,78 \pm 0,02$ , similar al GS obtenido cuando la carga del catalizador fue de  $1,01 \text{ mmol ácido cítrico/mmole UAG}$ , en vez de  $0,34$  como en este caso. De este modo, el aumento de  $20^\circ\text{C}$  en la temperatura compensó la menor cantidad de catalizador utilizada. Este resultado muestra la versatilidad de la metodología propuesta que permite obtener resultados similares utilizando diferentes combinaciones de parámetros de acuerdo con la conveniencia del caso.



**Figura 4.3** Efecto de la temperatura de reacción ( $0,34 \text{ mmol ácido cítrico/mmole UAG}$ ,  $3 \text{ h}$ ).

Para evaluar el efecto del tiempo de reacción en la evolución del GS de la BNC, se estableció una temperatura de trabajo de  $120^\circ\text{C}$  y se varió el tiempo de reacción entre  $0,5$  y  $7 \text{ h}$ . Los resultados se resumen en la **Figura 4.4**. Los valores de GS obtenidos para el intervalo de tiempo en estudio estuvieron comprendidos entre  $0,25 \pm 0,02$  y  $0,72 \pm 0,03$ . Los resultados muestran que para compensar una

disminución de la temperatura de 20° C (de 140 a 120°C) se requirió aumentar el tiempo de reacción en 4 h, dado que a 140° C se obtuvo celulosa acetilada con un GS de  $0,78 \pm 0,02$  a las 3 h; mientras que, a 120°C, ese valor aproximado de GS se alcanzó recién a las 7 h de reacción. En el caso de la reacción no catalizada no se observó variación del GS ( $\approx 0,21 \pm 0,01$ ) luego de la primera hora de reacción.



**Figura 4.4** Efecto del tiempo de reacción (0,34 mmol ácido cítrico/mmole UAG, 120°C).

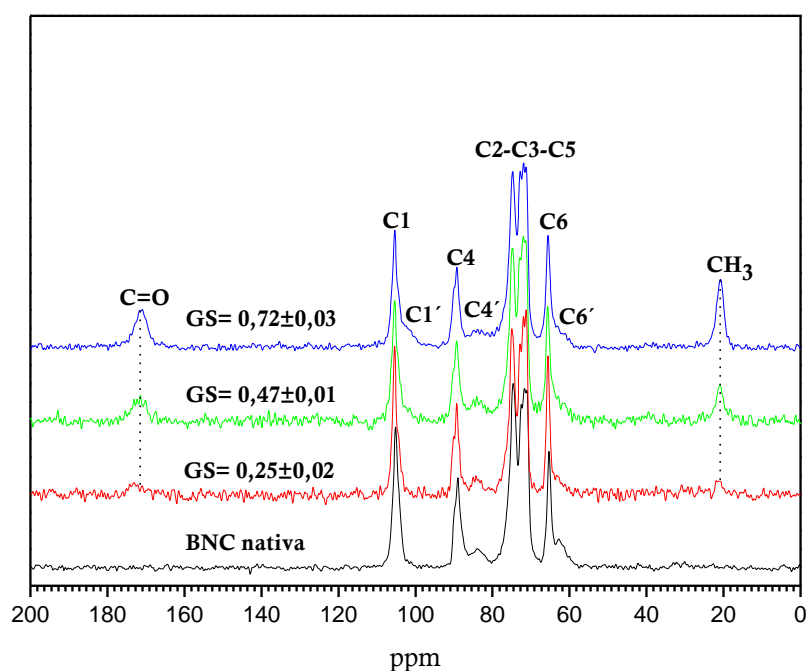
En conclusión, los resultados obtenidos que se resumen en las **Figuras 4.2 a 4.4**, dejan en evidencia que la ruta catalizada por ácido cítrico es lo suficientemente flexible para modular el GS de la BNC en el intervalo de  $\approx 0,2$  a  $0,8$  con variadas combinaciones de tiempo, temperatura y carga del catalizador. Es importante destacar que, como se describió previamente, este intervalo de GS es el que se pretende alcanzar para que la acetilación de las nanofibras sea prioritariamente superficial (Agustín et al., 2016; Agustín et al., 2017; Ávila Ramírez et al., 2014; Ifuku et al., 2007; Kim et al., 2002).

### 4.2.3 Caracterización de productos con GS variable

La modulación de las condiciones de reacción permitió regular el GS de la BNC en el rango de interés. Una vez obtenidas las muestras de BNC acetiladas se utilizaron las técnicas de  $^{13}\text{C}$  RMN en estado sólido y FTIR para comprobar el éxito de la reacción de acetilación. Por otra parte, para evaluar el impacto de la modificación sobre las propiedades de la BNC, se analizó la morfología, la cristalinidad y la estabilidad térmica de las nanofibras mediante FESEM, DRX y TGA, respectivamente.

#### 4.2.3.1 Análisis estructural por RMN

Se compararon los espectros de RMN de la BNC nativa y de tres muestras de BNC acetilada de diferentes GS (GS=  $0,25\pm0,02$ ;  $0,47\pm0,01$ ;  $0,72\pm0,03$ ) (**Figura 4.5**).



**Figura 4.5** Espectros de CP/MAS- $^{13}\text{C}$  RMN de BNC nativa y acetiladas con GS variable.

En el espectro de la BNC nativa se observaron las señales características de los carbonos de la celulosa, que se detallaron anteriormente en la **Sección 3.2.2**. Por otra parte, en los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN de las muestras derivatizadas, se observaron

las señales a 21 ppm y a 171–173 ppm correspondientes a los carbonos de los grupos metilos CH<sub>3</sub> y al grupo carbonilo C=O de los acetatos (**Tabla 4.2**), respectivamente, que confirmaron la acetilación de las muestras analizadas. Se observó también un crecimiento paulatino de la intensidad de estas señales a medida que aumentaba el GS, y no hubo evidencia de la presencia en la muestra de ácido cítrico o sus ésteres. Además, en los espectros de las muestras acetiladas se observó la presencia de un hombro en la señal asignada al C-1 de la celulosa a  $\approx 101,2$  ppm (C1'), cuya intensidad se incrementó con el aumento del GS. Esta señal se hizo mucho más evidente en el espectro de la muestra con GS de  $0,72 \pm 0,03$ , y fue atribuida a un leve corrimiento del desplazamiento químico del carbono anomérico (C1), debido a la acetilación de los grupos hidroxilos vecinos en las posiciones C2 y C6 que modifican su sistema de puentes de hidrógeno. Algunos autores han relacionado la observación de esta señal con un mayor contenido de componente amorfo (**Berlioz et al., 2009; Jandura et al., 2000; Uschanov, Johansson, Mannu, & Laine, 2011**).

Muestra	C=O	C1	C1'	C4	C4'	Clúster C2-C3-C5	C6	C6'	CH <sub>3</sub>
BNC nativa	-----	105,1	-----	89,1	84,1	79,7– 68,5	65,3	62,7	-----
GS= $0,25 \pm 0,02$	173,1	105,5	102,2	89,3	84,3	79,7 – 69,3	65,6	63,3	21,2
GS= $0,47 \pm 0,01$	171,5	105,4	101,4	89,3	84,0	79,6 – 69,3	65,7	61,8	21,0
GS= $0,72 \pm 0,03$	171,0	105,4	101,4	89,2	83,8	79,5 – 68,5	65,6	61,2	20,8

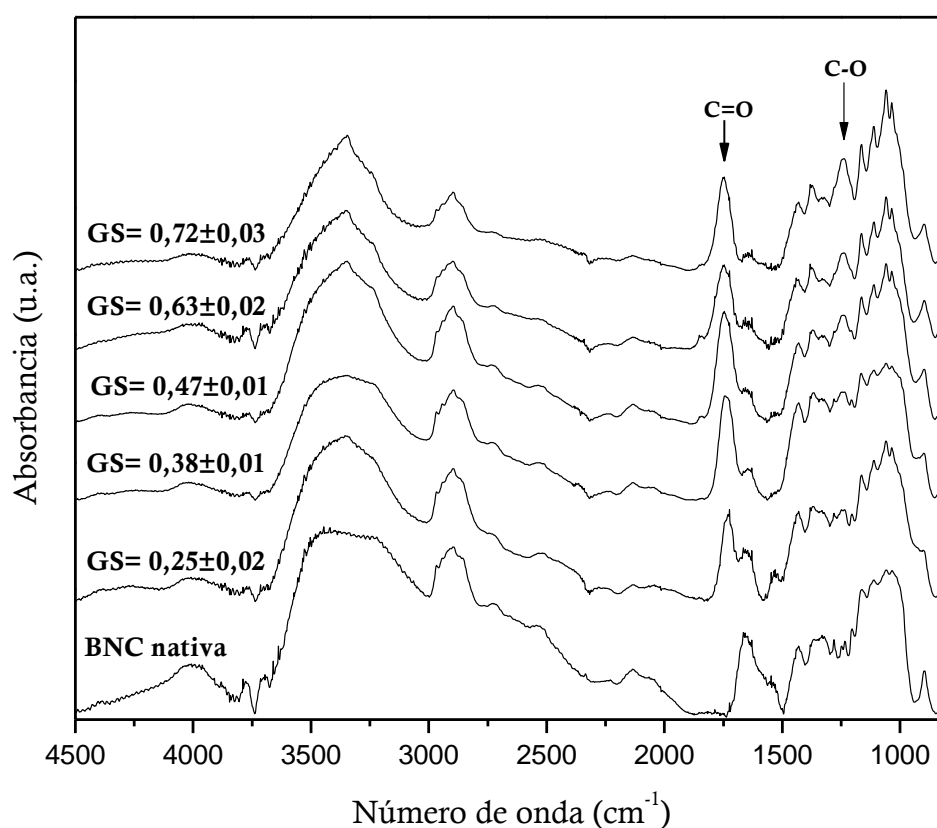
**Tabla 4.2** Asignaciones de los espectros de CP/MAS-<sup>13</sup>C RMN de BNC nativa y acetiladas con GS variable.

#### 4.2.3.2 Análisis estructural por FTIR

En la **Figura 4.6** se muestran los espectros FTIR de la BNC nativa y acetilada con distintos grados de sustitución. Las muestras analizadas fueron seleccionadas del



estudio del efecto del tiempo en el GS alcanzado. En todos los espectros se observaron las señales características de la celulosa nativa (ver **Sección 3.2.3**), y en el caso de las muestras acetiladas se observaron también las dos nuevas señales correspondientes a los grupos éster introducidos ( $1745\text{ cm}^{-1}$  asociada al estiramiento del grupo carbonilo  $\text{C}=\text{O}$ , y  $1243\text{ cm}^{-1}$  atribuida al estiramiento del carbono  $\text{S}_{\text{p}}2\text{-O}$  del grupo acetato).



**Figura 4.6** Espectro FTIR de BNC nativa y acetiladas con GS variable.

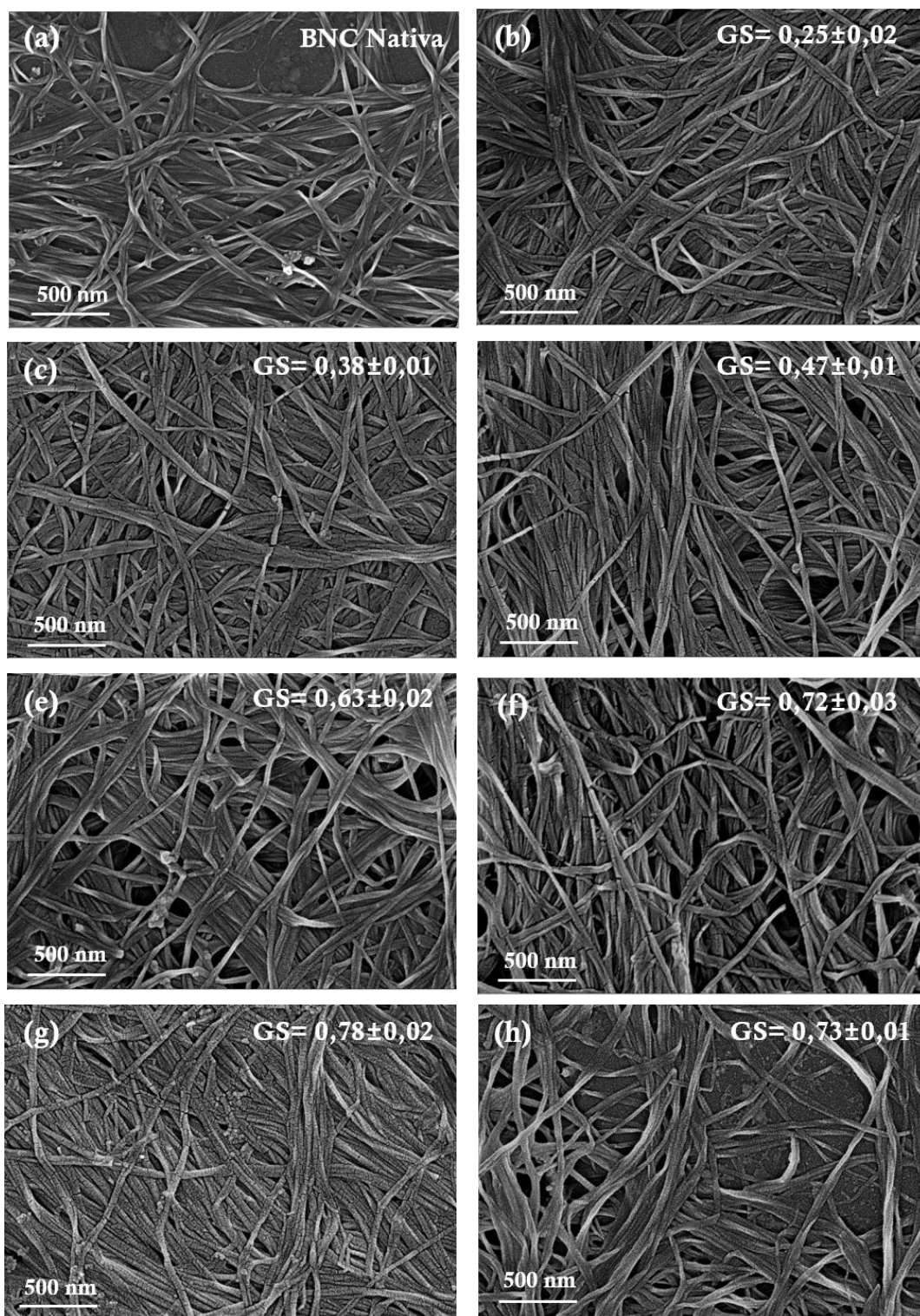
#### 4.2.3.3 Estudio morfológico por FESEM

Para el análisis morfológico de las nanofibras se seleccionaron muestras de BNC acetilada bajo las diferentes condiciones de reacción evaluadas (tiempo, carga de catalizador y temperatura) y se compararon con la micrografía de la BNC nativa para evidenciar posibles cambios. Las micrografías de FESEM de las BNC nativa y

acetiladas en un rango de GS de entre  $0,25\pm0,02$  y  $0,78\pm0,02$ , se reúnen en la **Figura 4.7**.

Como se detalló en la **Sección 3.2.4**, la BNC nativa (**Figura 4.7a**) muestra una apariencia típica de una red de nanocintas entrelazadas, con anchos comprendidos entre 20–80 nm y longitudes que en bibliografía se indican entre 1–9  $\mu\text{m}$  (**Hirai et al., 1998**). Por otra parte, en las muestras acetiladas en el rango de GS de entre  $0,25\pm0,02$  y  $0,72\pm0,03$  (**Figura 4.7b-f**) la morfología y las dimensiones de las nanofibras se conservaron significativamente. Por ejemplo, el ancho promedio obtenido a partir de 40 mediciones para la BNC nativa fue de  $33\pm3$  nm, y para la BNC acetilada con un GS de  $0,72\pm0,03$  fue de  $33\pm2$  nm. Al comparar las micrografías no se evidenciaron daños visibles en la superficie fibrilar, preservándose la sección transversal rectangular y la estructura fibrosa típica de la BNC.

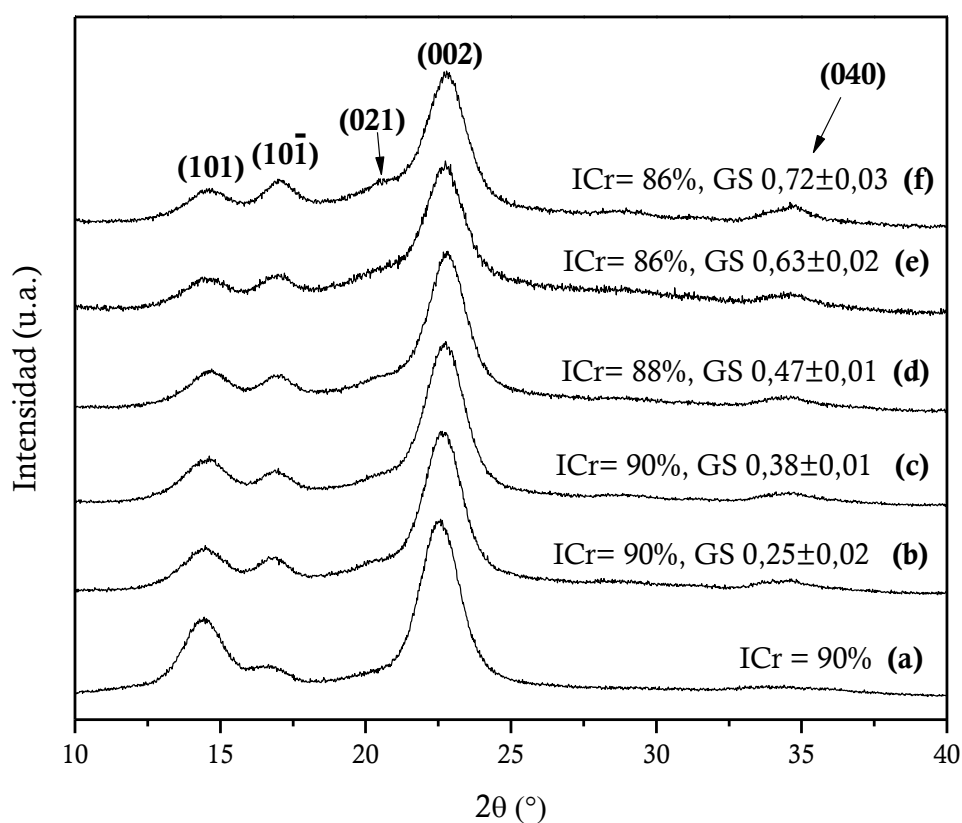
Adicionalmente, se tomaron micrografías de la BNC acetilada con la máxima carga de catalizador (1,01 mmol/mmol UAG) (**Figura 4.7g**), y a la mayor temperatura de reacción ( $140^{\circ}\text{C}$ ) (**Figura 4.7h**), con GS de  $0,73\pm0,01$  y  $0,78\pm0,02$ , respectivamente. Al comparar estas micrografías con la obtenida para BNC acetilada durante 7h de reacción (GS=  $0,72\pm0,03$ ) con menor carga de catalizador y a menor temperatura (**Figura 4.7f**) se observó que en estas condiciones la morfología de las nanofibras de celulosa también se conservó significativamente.



**Figura 4.7** Micrografías de BNC (a) nativa, (b-h) acetiladas con GS variable.

#### 4.2.3.4 Estudio de cristalinidad por DRX

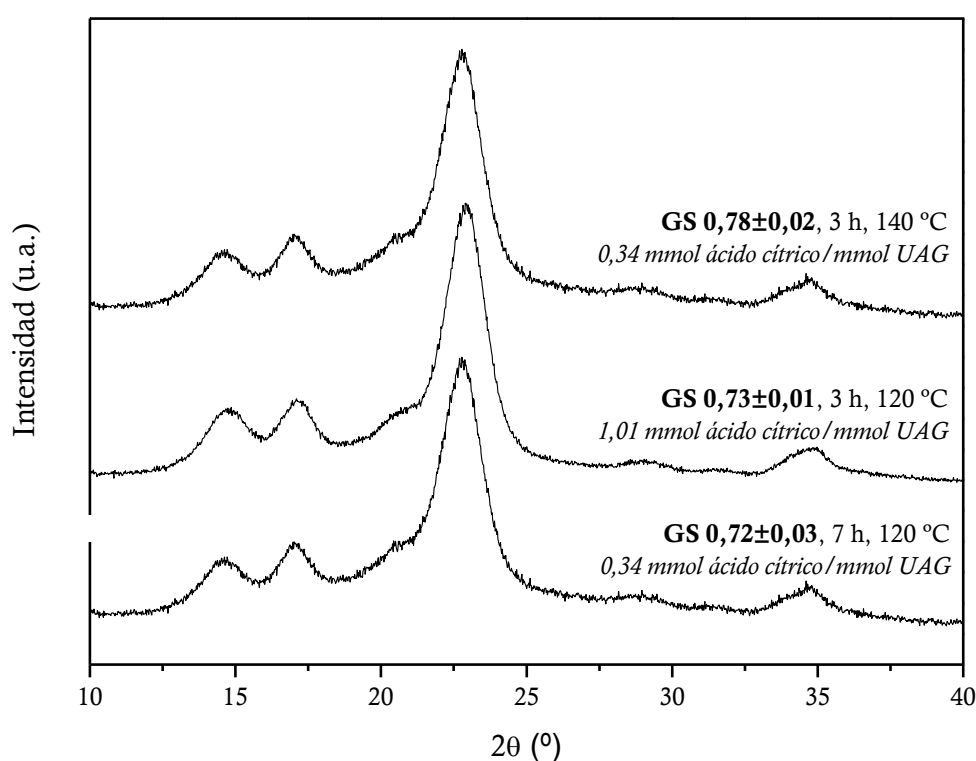
Se estudió mediante difracción de rayos X la cristalinidad de las muestras acetiladas en presencia de ácido cítrico y con GS creciente como consecuencia de la variación del tiempo de reacción (**Figura 4.8**). La BNC nativa, como ya se detalló en secciones previas, tiene una estructura típica de celulosa tipo I con planos de difracción bien definidos centrados a  $2\theta = 14,4^\circ$  (101),  $16,7^\circ$  (10-1),  $20,1^\circ$  (021),  $22,5^\circ$  (002), y  $34,4^\circ$  (040) (**Johnson Ford et al., 2010**). Después de la acetilación, los difractogramas de la BNC evidenciaron los mismos picos distintivos de la BNC nativa sin cambios significativos.



**Figura 4.8** Patrones de DRX de (a) BNC nativa, (b-f) BNC acetiladas con GS variable.

En términos cuantitativos, se determinó el índice de cristalinidad relativo (ICr) mediante el método empírico de Segal (**Segal et al., 1959**) (**Sección 2.6.8**). Los valores de ICr obtenidos indicaron que, al igual que se observó en el ensayo

exploratorio con los diferentes catalizadores  $\alpha$ -hidroxiácidos, en las muestras obtenidas no hubo una reducción significativa en la cristalinidad de las nanofibras. Para BNC acetilada con un GS de  $0,47\pm0,01$  (ICr= 88%) la reducción del ICr fue solamente del  $\approx 2\%$  respecto a la BNC nativa (ICr= 90%), y para muestras con GS mucho más altos ( $0,63\pm0,02$  y  $0,72\pm0,03$ ) (ICr= 86%) la reducción máxima fue del 5%. Esta ligera variación de los ICr con la acetilación confirmó nuevamente que la derivatización hasta un GS de  $0,72\pm0,03$  incluyó fundamentalmente los grupos OH superficiales o los dominios desordenados de la BNC, y no afectó significativamente su ultraestructura.



**Figura 4.9** Patrones de DRX de muestras de BNC acetiladas con GS similares utilizando mediante diferentes condiciones de reacción.

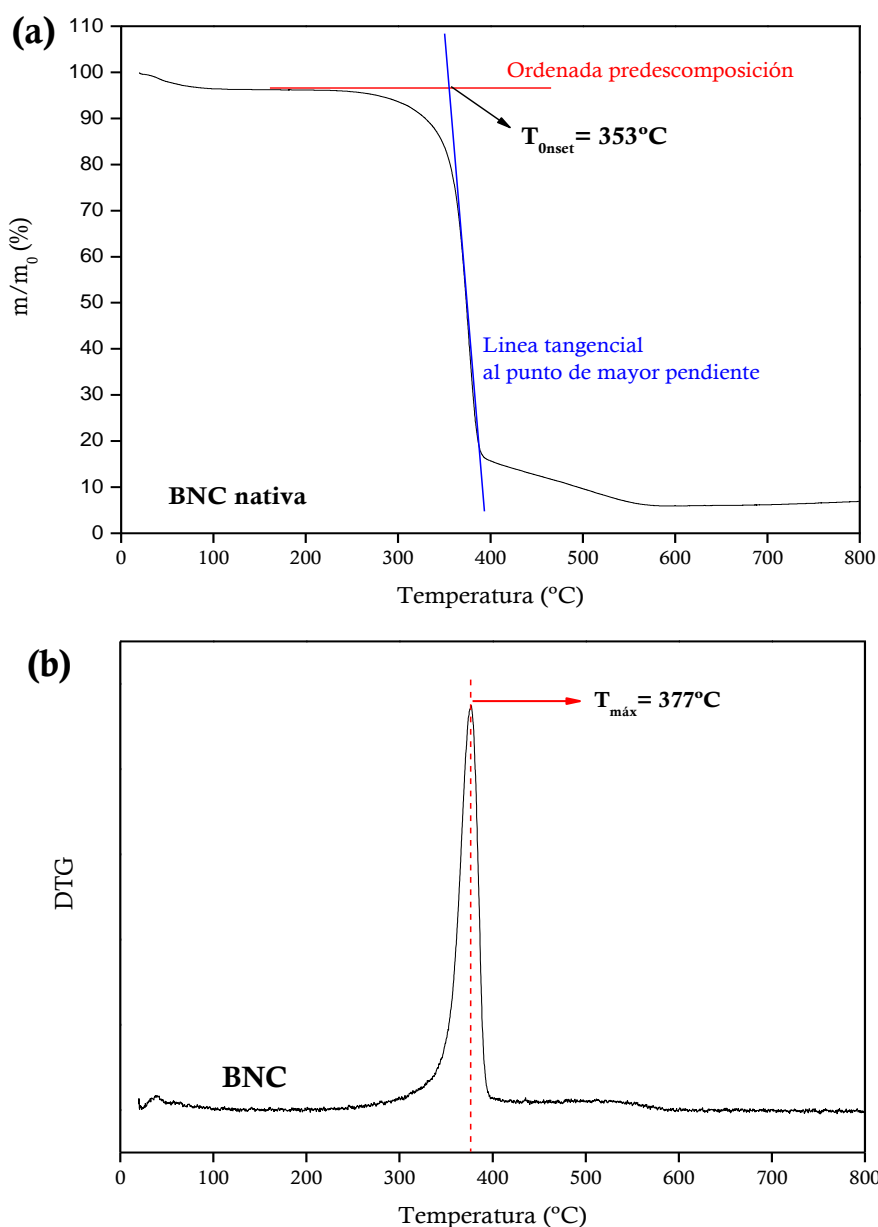
Finalmente, en forma análoga al estudio morfológico realizado previamente mediante FESEM para muestras acetiladas con los mayores GS en distintas condiciones de reacción, se determinaron los patrones de difracción de rayos X de las muestras acetiladas a la máxima temperatura y carga de catalizador ensayadas

(GS=  $0,73\pm0,01$  y  $0,78\pm0,02$ , respectivamente). En la **Figura 4.9** se comparan sus patrones con el de la BNC acetilada por mayor tiempo de reacción con GS similar (7 h, GS=  $0,72\pm0,03$ ) (**Figura 4.9**). Los resultados no evidenciaron cambios significativos en los patrones de difracción relacionados con la variable de reacción utilizada para modular el GS, y las condiciones de esterificación utilizadas.

#### 4.2.3.5 Propiedades térmicas por TGA

El impacto de la acetilación sobre la estabilidad térmica de la BNC se evaluó mediante termogravimetría. En primer lugar, se ilustra como referencia la determinación de los parámetros térmicos característicos para la BNC nativa ( $T_{\text{máx}}$  y  $T_{\text{onset}}$ ).

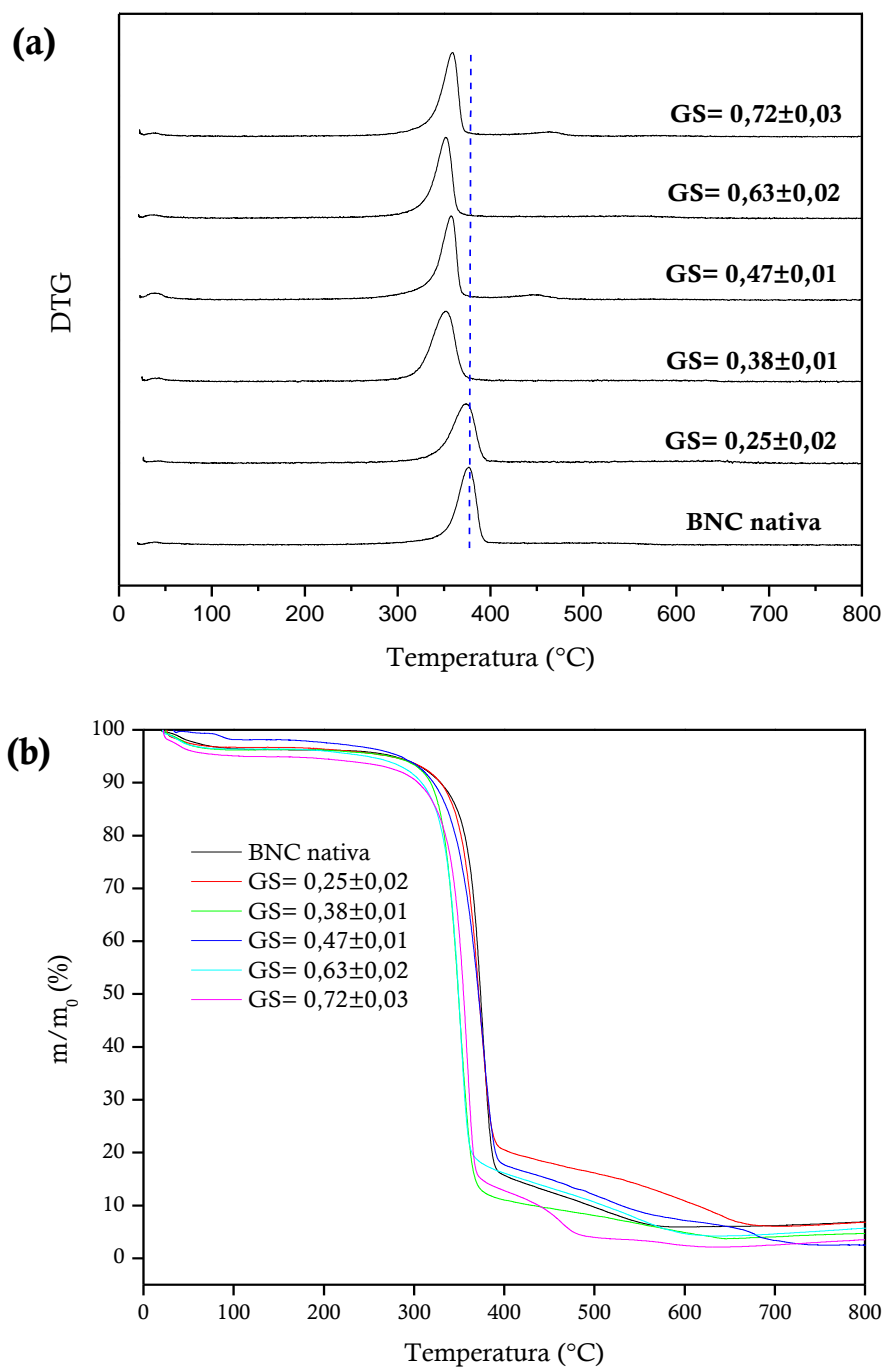
Las curvas de pérdida de masa en función de la temperatura (TG) y su correspondiente curva de DTG (primera derivada de la curva de TG) evidenciaron dos pérdidas de peso significativas para la BNC nativa (**Figura 4.10**). Las mismas se tradujeron en picos en los gráficos de DTG atribuibles a la deshidratación inicial de las muestras (pequeña pérdida de masa observada entre la temperatura ambiente y  $\approx 130^{\circ}\text{C}$ ) y a la descomposición de la celulosa. La temperatura de velocidad máxima de descomposición ( $T_{\text{máx}}$ ) de la celulosa se obtuvo como el valor máximo del pico en la curva de DTG y fue de  $377^{\circ}\text{C}$  (**Figura 4.10b**). Por su parte la  $T_{\text{onset}}$  de la BNC nativa calculada como la intersección del valor extrapolado de la ordenada de pre-descomposición y una línea tangencial dibujada hasta el punto de mayor pendiente de la curva de pérdida de peso en la región de descomposición, fue de  $353^{\circ}\text{C}$  (**Figura 4.11a**).



**Figura 4.10** Curvas de **(a)** TG, **(b)** DTG de la BNC nativa.

Las muestras acetiladas empleadas para la caracterización térmica fueron las obtenidas a partir del estudio de la evolución de la reacción en el tiempo (GS de  $0,25 \pm 0,02$  a  $0,72 \pm 0,03$ ). Al comparar las curvas de TG y DTG obtenidas para todos los derivados acetilados, se observó que al igual que con la BNC nativa las curvas describieron una sola etapa de descomposición de la celulosa en el intervalo de  $\approx 300$ – $400^\circ\text{C}$  (**Figura 4.12**). Como las muestras se preconditionaron a  $110^\circ\text{C}$  durante 2h

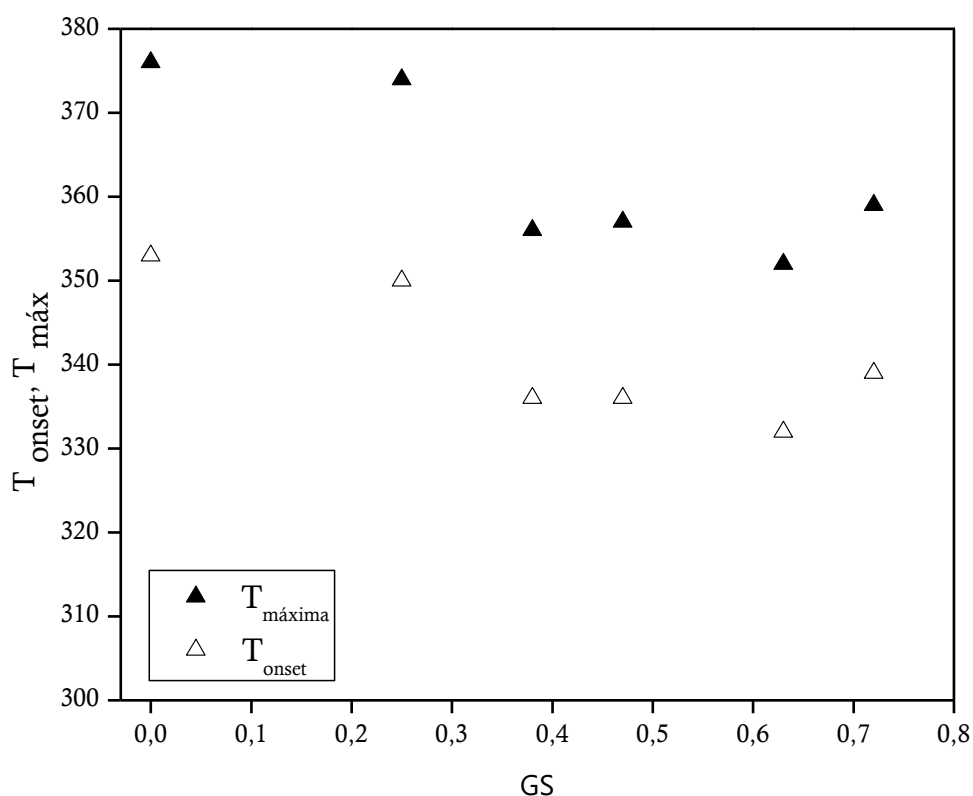
antes de la medición, la humedad removida en la primera pérdida de peso en todos los casos fue solamente del 3 a 5 %



**Figura 4.11** Curvas de **(a)** DTG para BNC nativa y acetiladas con GS variable, **(b)** TG para BNC nativa y acetiladas con GS variable.



La **Figura 4.12** muestra que cuando la BNC es acetilada hasta un GS de  $0,25 \pm 0,02$ , las  $T_{\text{onset}}$  y  $T_{\text{max}}$  características de la BNC nativa ( $353^{\circ}\text{C}$  and  $376^{\circ}\text{C}$ , respectivamente) se preservaron mayoritariamente, detectándose sólo una ligera reducción de entre 2 y  $3^{\circ}\text{C}$ . Por otra parte, para mayores niveles de acetilación, los correspondientes valores de  $T_{\text{onset}}$  y  $T_{\text{max}}$  fueron  $\approx 15\text{--}20^{\circ}\text{C}$  más bajos que los determinados para BNC nativa. Esta disminución en la estabilidad térmica de fibras y nanofibras de celulosa modificadas superficialmente ya ha sido informada previamente por otros autores utilizando diferentes protocolos de acetilación (**Freire, Silvestre, Neto, Belgacem, & Gandini, 2006; Freire et al., 2008; Tomé et al., 2011b**).



**Figura 4.12** Evolución los parámetros termogravimétricos ( $T_{\text{onset}}$  y  $T_{\text{max}}$ ) en función del GS.

A menudo una disminución de la estabilidad térmica de la celulosa se asocia con una disminución en la cristalinidad de las muestras. Para el caso de la acetilación

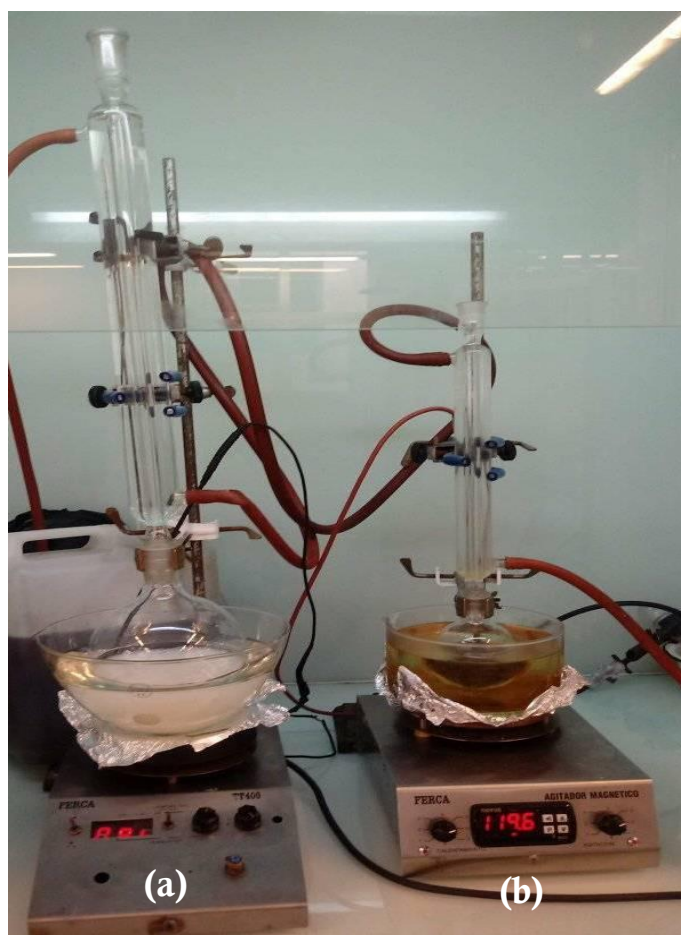
con ácido cítrico estudiada en la presente Tesis, sin embargo, se observó una disminución de la estabilidad térmica de las nanofibras sin haberse hallado evidencias de una pérdida significativa de cristalinidad. Otros autores han justificado una menor estabilidad térmica de la nanocelulosa acetilada en base a la labilidad de los grupos éster introducidos en la molécula de celulosa, y al menor número de enlaces de hidrógeno que pueden establecerse entre las cadenas de celulosa como consecuencia de la esterificación (Lee et al., 2011; Tomé et al., 2010, 2011a; Uschanov et al., 2011).

#### 4.2.4 Estudio exploratorio del escalado de la reacción

En función de los resultados obtenidos hasta el momento que confirman la viabilidad de la ruta catalizada por ácido cítrico para llevar adelante la acetilación de BNC con GS variable modulable ajustando las condiciones de reacción, en esta Sección se presenta un primer estudio de escalado del sistema multiplicando todas las cantidades utilizadas por un factor de 5. Esto fue necesario para el desarrollo del **Capítulo 6** de este Trabajo de Tesis, en el cual se requieren mayores cantidades de muestra para la preparación y caracterización de los materiales compuestos.

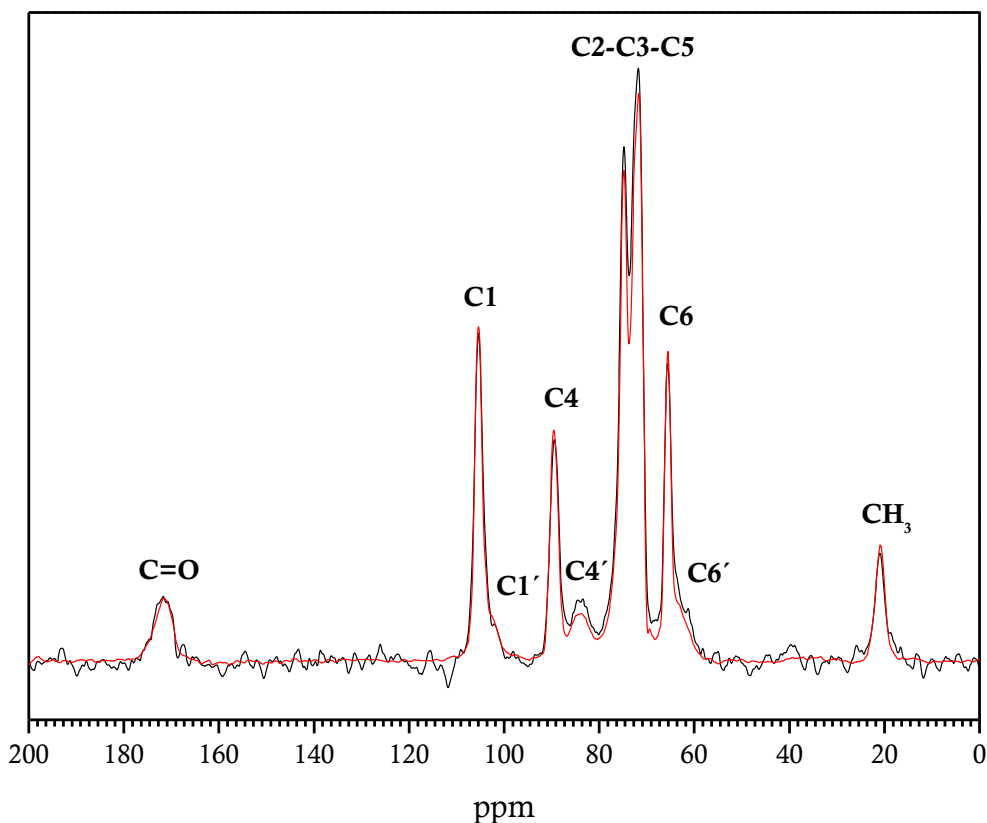
Las condiciones de reacción se seleccionaron en función de los resultados obtenidos en la **Sección 4.2.2** (0,34 mmol ácido cítrico/mmol UAG, 250 mL de anhídrido acético, 120°C, 3 h (GS=  $0,47 \pm 0,01$ )), pero en este caso la reacción se llevó a cabo utilizando 2,5 g de BNC (peso seco) y 250 mL de agente acilante (anhídrido acético). La **Figura 4.13** muestra comparativamente el sistema de reacción utilizado para acetilar BNC a las diferentes escalas evaluadas.

La reacción en la mayor escala permitió obtener BNC con un GS de 0,49, valor similar al obtenido trabajando a menor escala (0,47), teniendo en cuenta que las diferencias en el GS se encuentran dentro del error de la determinación.



**Figura 4.13** Sistema de reacción empleado para la reacción catalizada con  $\alpha$ -hidroxiácidos a **(a)** escala mayor (2,5g de BNC), **(b)** escala menor (0,5g de BNC).

En la **Figura 4.14** se muestran comparativamente los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de la BNC acetilada en las dos escalas ensayadas bajo las mismas condiciones de reacción. La superposición de los espectros confirmó la reproducibilidad de la acetilación al escalar la reacción.



**Figura 4.14** Espectros de CP/MAS- $^{13}\text{C}$  RMN de BNC acetilada. Reacción a menor escala (0,5g de BNC) ( $\text{GS} = 0,47 \pm 0,01$ ) (espectro en negro) y reacción a escala mayor (2,5g de BNC) ( $\text{GS} = 0,49 \pm 0,03$ ) (espectro en rojo). (0,34 mmol ácido cítrico/mmol UAG,  $120^\circ\text{C}$ , 3 h).

### 4.3 Conclusiones del Capítulo 4

El **Capítulo 4** se centró en el estudio de las condiciones de reacción para modular el GS de la BNC usando ácido cítrico como catalizador de acuerdo con los resultados previos obtenidos en el **Capítulo 3**. Inicialmente, se estudió el efecto sobre el GS de los intercambios de solvente realizados para incorporar la BNC al medio de reacción, y se puso de manifiesto la ventaja de incorporar la BNC al medio de reacción como suspensión en anhídrido acético minimizando su contenido de agua.

El estudio de la variación de las condiciones de reacción (carga de catalizador, temperatura y tiempo) demostró que es posible modular convenientemente el GS de la BNC en el rango de  $\approx 0,2$  a  $0,8$  modificando adecuadamente cualquiera de las variables estudiadas según la conveniencia del caso.

Los resultados de caracterización indicaron que en todos los casos estudiados la acetilación ocurrió predominantemente en la superficie y/o en las regiones amorfas de la BNC, sin afectar ni su ultraestructura cristalina ni su morfología. Por otra parte, se observó una leve reducción en la estabilidad térmica de los materiales derivatizados que se relacionó con la labilidad de los grupos acetilo y la disminución de los enlaces de hidrógeno como consecuencia de la acetilación.

Finalmente, se realizó con éxito un primer escalado de la reacción obteniéndose un material con el mismo GS que el obtenido utilizando la escala original. El éxito del escalado aseguró la disponibilidad de material suficiente para los estudios que se presentan en el **Capítulo 6**.

#### 4.4 Bibliografía del Capítulo 4

Agustín, M. B., Nakatsubo, F., Yano, H. Products of low-temperature pyrolysis of nanocellulose esters and implications for the mechanism of thermal stabilization. *Cellulose*, 2016, 23, 2887–2903.

Agustín, M. B., Nakatsubo, F., Yano, H. Improved resistance of chemically modified nanocellulose against thermally-induced depolymerization. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 164, 1–7.

Ávila Ramírez, J. A., Juan Suriano, C., Cerrutti, P., Foresti, M. L. Surface esterification of cellulose nanofibers by a simple organocatalytic methodology. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 114, 416–423.

Berglund, L. A., Peijs, T. Cellulose biocomposites from bulk moldings to nanostructured systems. *MRS Bulletin*, 2010, 35, 201–207.

Berlitz, S., Molina-Boisseau, S., Nishiyama, Y., Heux, L. Gas-phase surface esterification of cellulose microfibrils and whiskers. *Biomacromolecules*, 2009, 10, 2144–2151.

Cunha, A. G., Zhou, Q., Larsson, P. T., Berglund, L. A. Topochemical acetylation of cellulose nanopaper structures for biocomposites: mechanisms for reduced water vapour sorption. *Cellulose*, 2014, 21, 2773–2787.

Fernandes Diniz, J. M. B., Gil, M. H., Castro, J. A. A. M. Hornification—its origin and interpretation in wood pulps. *Wood Science Technology*, 2004, 37, 489–494.

Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., Belgacem, M. N., Gandini, A. Controlled heterogeneous modification of cellulose fibers with fatty acids: effect

of reaction conditions on the extent of esterification and fiber properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, 100, 1093–1102.

Freire, C. S., Silvestre, A. J., Neto, C. P., Gandini, A., Martin, L., Mondragon, I. Composites based on acylated cellulose fibers and low-density polyethylene: effect of the fiber content, degree of substitution and fatty acid chain length on final properties. *Composites Science and Technology*, 2008, 68, 3358–3364.

Hirai, A., Tsuji, M., Yamamoto, H., Horii, F. In situ crystallization of bacterial cellulose III. Influences of different polymeric additives on the formation of microfibrils as revealed by transmission electron microscopy. *Cellulose*, 1998, 5, 201–213.

Ifuku, S., Nogi, M., Abe, K., Handa, K., Nakatsubo, F., Yano, H. Surface modification of bacterial cellulose nanofibers for property enhancement of optically transparent composites: dependence on acetyl-group DS. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 1973–1978.

Jandura, P., Kokta, B. V., Riedl, B. Fibrous long-chain organic acid cellulose esters and their characterization by diffuse reflectance FTIR spectroscopy, solid-state CP/MAS<sup>13</sup>C-NMR, and X-ray diffraction. *Journal of Applied Polymer Science*, 2000, 78, 1354–1365.

Johnson Ford, E. N., Mendon, S. K., Thames, S. F., Rawlins, J. W. X-ray diffraction of cotton treated with neutralized vegetable oil-based macromolecular crosslinkers. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 2010, 5, 10–20.

Kim, D-Y., Nishiyama, Y., Kuga, S. Surface acetylation of bacterial cellulose. *Cellulose*, 2002, 9, 361–367.

Lee, K-Y., Blaker, J. J., Bismarck, A. Surface functionalisation of bacterial cellulose as the route to produce green polylactide nanocomposites with improved properties. *Composite Science Technology*, 2009, 69, 2724–2733.

Lee, K-Y., Quero, F., Blaker, J. J., Hill, C. A. S., Eichhorn, S. J., Bismarck, A. Surface only modification of bacterial cellulose nanofibres with organic acids. *Cellulose*, 2011, 18, 595–605.

Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., Conrad, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, 1959, 29, 786–794.

Tomé, L. C., Brandao, L., Mendes, A. M., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C., Gandini, A., Freire, C. S. R., Marrucho, I. M. Preparation and characterization of bacterial cellulose membranes with tailored surface and barrier properties. *Cellulose*, 2010, 17, 1203–1211.

Tomé, L. C., Pinto, R. J. B., Trovatti, E., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C., Gandini, A. Transparent bionanocomposites with improved properties prepared from acetylated bacterial cellulose and poly(lactic acid) through a simple approach. *Green Chemistry*, 2011a, 13, 419–427.

Tomé, L. C., Freire, M. G., Rebelo, L. P. N., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C., Marrucho, I. M., Freire, C. S. R. Surface hydrophobization of bacterial and vegetable cellulose fibers using ionic liquids as solvent media and catalysts. *Green Chemistry*, 2011b, 13, 2464–2470.

Uschanov, P., Johansson, L. S., Maunu, S. L., Laine, J. Heterogeneous modification of various celluloses with fatty acids. *Cellulose*, 2011, 18, 393–404.





## **5. Extensión de la esterificación organocatalítica a otros sustratos nanocelulósicos**

*En los Capítulos 3 y 4 se demostró la utilidad de la acetilación catalizada por  $\alpha$ -hidroxiácidos para acetilar superficialmente nanofibras de celulosa bacteriana en suspensión, con valores de GS que pudieron modularse con la manipulación de las condiciones de reacción. Motivados por estos resultados, surgió el interés por extender la metodología a la hidrofobización de la superficie de otros sustratos nanocelulósicos que también encuentran aplicación como nano-refuerzo de materiales compuestos de matriz polimérica hidrofóbica. En este marco, en el presente Capítulo se presentan brevemente los resultados obtenidos al extender la acetilación catalizada con ácido cítrico a membranas enteras de nanocelulosa bacteriana y a nanocristales de celulosa de origen vegetal.*



## 5.1 Introducción

Como ya se ha mencionado, las distintas formas de nanocelulosa son reconocidas como candidatos ideales para reforzar matrices poliméricas biodegradables. Sin embargo, y como se explicó en detalle previamente, el uso de nanocelulosas como refuerzo de matrices hidrofóbicas se ve limitado por su naturaleza hidrofílica, y se requiere de la modificación superficial de las nanofibras para disminuir su polaridad y mejorar su compatibilidad química con este tipo de matrices (**Siró & Plackett, 2010**).

En los **Capítulos 3 y 4** se demostró la posibilidad de utilizar la metodología descrita para hidrofobizar la superficie de nanofibras de BNC que se agregaron al medio de reacción en forma de suspensión, a partir de homogeneización de las membranas originales. El tratamiento mecánico realizado permitió liberar las nanofibrillas de BNC de la red tridimensional estable en las que se encuentran inmersas en las membranas originales, facilitando así el acceso de reactivos durante la reacción de derivatización, y su posterior distribución y dispersión en un medio continuo como podría ser una matriz polimérica a reforzar.

Sin embargo, existen varios antecedentes en la literatura en los que la BNC se utiliza como refuerzo de matrices poliméricas en forma de membrana, tal como se la obtiene del medio de cultivo sin agitación. En este contexto, surge el interés en este Capítulo por ensayar la utilidad de la ruta de acetilación antes descrita en la modificación de membranas enteras de BNC. En la **Sección 5.1.1** se brindan más detalles que resumen los antecedentes en el tema.

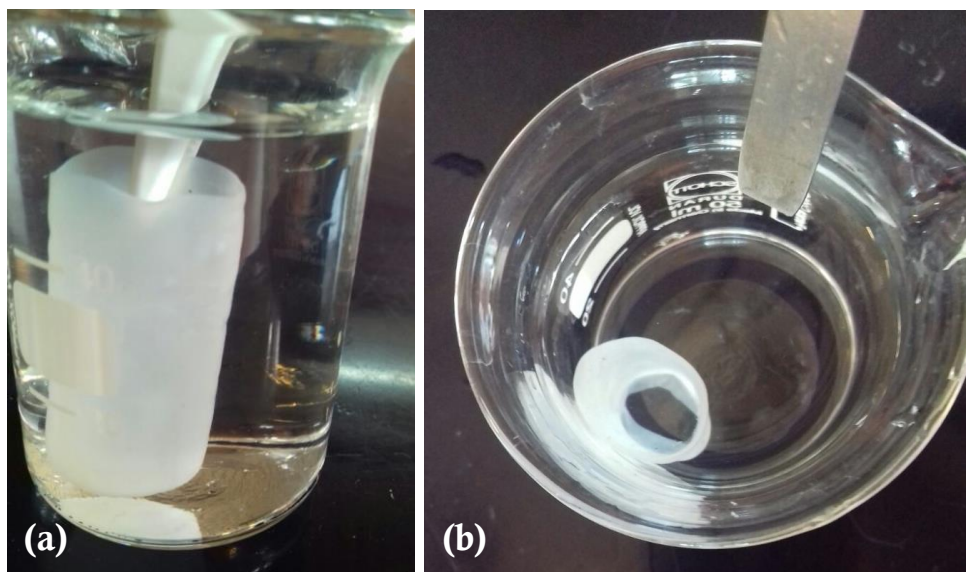
Por otra parte, es bien conocida la utilidad de los nanocristales de celulosa (CNC) como refuerzo de distintas matrices poliméricas, tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. En el último caso las limitaciones asociadas a la diferencia de polaridad descritas en los Capítulos anteriores se aplican totalmente a los CNC, por lo que la segunda parte de este Capítulo se centra en evaluar la utilidad de la acetilación mediada por ácido cítrico para hidrofobizar su superficie (ver detalles y antecedentes en **Sección 5.1.2**).

A continuación, se presenta una breve revisión bibliográfica de los antecedentes de reacciones de esterificación implementadas sobre membranas

enteras de BNC y sobre CNC, enfocadas particularmente a su potencial aplicación como nano-refuerzo de matrices poliméricas hidrofóbicas.

### 5.1.1 Esterificación de membranas enteras de BNC

En la **Sección 1.3** de esta Tesis se detallaron los aspectos relacionados a la obtención, propiedades y aplicaciones de la BNC. Como se describió, en cultivo estático la BNC se obtiene en forma de películas o membranas que crecen en la superficie aireada del medio de cultivo, adoptando su forma (**Cerrutti et al., 2016; Czaja et al., 2004**). De esta manera pueden obtenerse desde membranas de espesor variable con la forma de la sección del vial de cultivo, hasta estructuras tridimensionales para aplicaciones particulares, como por ejemplo venas artificiales, implantes de cartílagos, implantes dentales, etc. (**Shah et al., 2013**). La **Figura 5.1** muestra un tubo de BNC obtenido directamente del medio de cultivo, con potencial aplicación como reemplazo de vasos sanguíneos.



**Figura 5.1** Tubos de BNC (a) vista lateral, (b) vista superior. Imágenes gentilmente cedidas de la Tesis de grado de la Srta. Danna Corzo, FIUBA (datos no publicados).

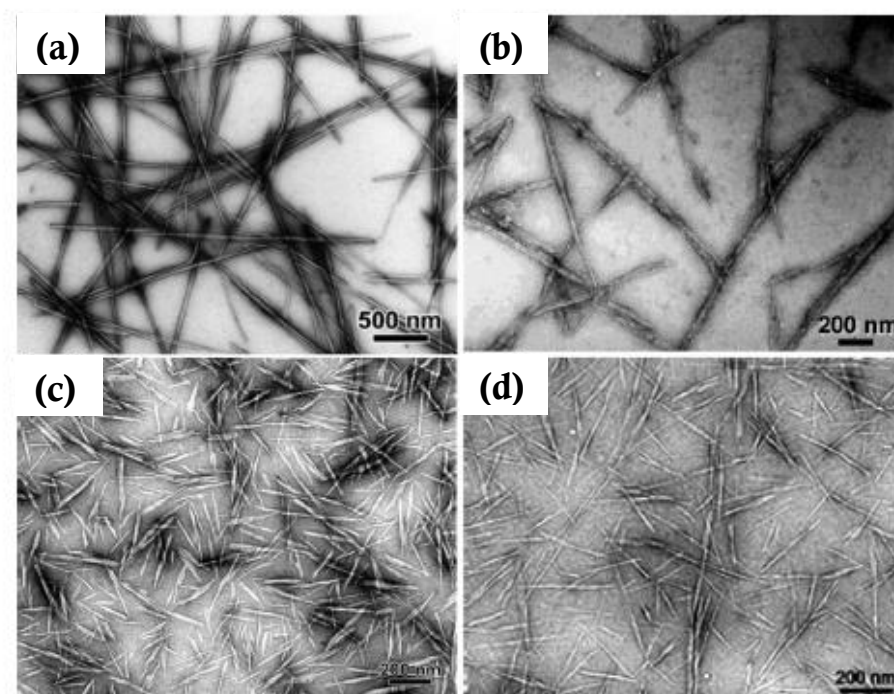
Generalmente, cuando se requiere modificar químicamente la BNC, se busca que la derivatización proceda en forma homogénea en la totalidad de las nanofibras que conforman las membranas. Con este fin, las películas compactas de BNC obtenidas del biorreactor, habitualmente se desintegran por licuado y/o homogeneización para liberar y exponer las nanofibras a utilizar como sustrato. Sin embargo, durante los últimos años se han informado en la literatura aplicaciones que utilizan las membranas de BNC enteras, para las cuales se han propuesto protocolos de esterificación implementados directamente sobre las membranas.

Una de las primeras contribuciones en este sentido fue la acetilación de membranas de BNC (cortadas en trozos de 10 cm x 10 cm x 1 cm y previamente intercambiadas de solvente de agua a ácido acético) en un medio de reacción sin agitación formulado con tolueno y anhídrido acético, y utilizando ácido perclórico como catalizador. Los autores lograron modular el GS de las membranas enteras de BNC en un rango de 0,04 a 2,77 (**Kim et al., 2002**). Posteriormente, Nogi y colaboradores acetilaron membranas de BNC de 10 mm de espesor, previamente prensadas para extraer el volumen de agua contenido en su interior (**Nogi et al., 2006**). Los autores llevaron a cabo la acetilación sin agitación en un medio de anhídrido acético durante 21 h hasta alcanzar un GS de 0,17. En el mismo trabajo los autores utilizaron la membrana de BNC acetilada para preparar nanocompuestos con una resina acrílica con diferentes porcentajes de BNC. En el compuesto con la BNC acetilada los autores informaron una reducción significativa de la absorción de humedad, una mejora en la resistencia térmica y una conservada transparencia respecto a la matriz polimérica original. En otra contribución, Ifuku y colaboradores acetilaron mediante el protocolo propuesto por Kim y colaboradores membranas de BNC en un rango de GS de 0 a 1,76 (**Ifuku et al., 2007**). Las membranas con GS variable fueron usadas como refuerzo de la resina acrílica informando como óptimo para el mejoramiento de las propiedades del nanocompuesto un GS de  $\approx 0,74$ . Por otra parte, Suetsugu y colaboradores acetilaron membranas de BNC secas en una solución acuosa de  $\text{ZnCl}_2$  y anhídrido acético en un reactor de alta presión con  $\text{CO}_2$  (10 MPa) (**Suetsugu et al., 2009**). Posteriormente, los autores prepararon materiales compuestos usando una matriz de acetato de celulosa mediante la técnica de moldeo por compresión, y obtuvieron materiales compuestos con propiedades ópticas, mecánicas y térmicas mejoradas. Por otro lado, Hu y colaboradores acetilaron

membranas secas de BNC utilizando yodo como catalizador en un medio de anhídrido acético. Variando las condiciones de reacción los autores lograron modular el GS de las membranas entre 0,23 y 1,98 (Hu et al., 2011).

### 5.1.2 Esterificación de nanocristales de celulosa

Como se explicó en la Introducción general (Sección 1.2.1), las nanofibras de celulosa contienen dominios amorfos y cristalinos alternados a lo largo de su eje principal. Los dominios amorfos pueden ser hidrolizados con mayor facilidad para dar origen a los CNC. Los CNC son reconocidos por tener una estructura cristalina constituida predominantemente por regiones cristalinas y paracristalinas, una relación de aspecto de entre 5 y 50, y por no presentar divisiones longitudinales ni entrelazamiento entre partículas o estructuras similares a redes (Norma ISO/TS 20477: 2017). En general, los CNC tienen anchos de entre 3 a 50 nm y largos que van desde 100 nm a varios  $\mu\text{m}$  dependiendo de la fuente de la celulosa (ver imágenes en la Figura 5.2).



**Figura 5.2** Imágenes TEM de CNC obtenidos a partir de diferentes fuentes: (a) tunicados, (b) bacterias, (c) ramio, (d) sisal. (Imagen tomada de Habibi, Lucia, & Rojas, 2010).

Los CNC son de gran interés como nano-refuerzo de materiales compuestos debido a su alta rigidez, baja densidad ( $\approx 1,57 \text{ g/cm}^3$ ) y alto modulo elástico ( $\approx 150 \text{ GPa}$ ) (**Brinchi, Cotana, Fortunati, & Kenny, 2013**). En la bibliografía se han informado numerosas publicaciones avocadas al uso de los CNC como fase de refuerzo de diversas matrices poliméricas como, por ejemplo, polisiloxanos, polisulfonatos, policaprolactona, polietilenglicol, poli (estireno-co-butil acrilato), carboximetilcelulosa, alcohol polivinílico, poli (vinil acetato), poli (etileno–vinil acetato), epóxidos, polietileno, polipropileno, poliuretano, quitosano, almidón, ácido poliláctico, polihidroxialcanoatos, polihidroxibutiratos, etc. (**Brinchi et al., 2013; Fortunati et al., 2016; Habibi et al., 2010**).

Sin embargo, de manera similar a la BNC, por su gran área superficial y naturaleza hidrofílica, los CNC tienen una pobre dispersabilidad y compatibilidad con matrices poliméricas hidrofóbicas, lo que resulta en materiales compuestos en los que las fuerzas repulsivas a menudo conducen a la agregación del refuerzo y a un pobre contacto interfacial. Para superar esta limitación múltiples autores se han enfocado en modificar la superficie de este tipo de nano-objetos de celulosa utilizando surfactantes y diversas modificaciones químicas que incluyen por ejemplo esterificación, amidación y silinización (**Eyley & Thielemans, 2014; Habibi, 2014; Heux, Chauve, & Bonini, 2000**). En este contexto, las reacciones de esterificación nuevamente aparecen como la alternativa más utilizada para hidrofobizar la superficie de los CNC.

En las metodologías utilizadas con este fin, uno de los catalizadores más utilizados es el ácido sulfúrico. Por ejemplo, Tang y colaboradores acetilaron CNC utilizando ácido acético y ácido sulfúrico como catalizador (1,5% (v/v)), operando a una temperatura de  $80^\circ\text{C}$  durante 3–7 h, hasta lograr conferir a los CNC niveles de GS entre 0,22 y 0,47 (**Tang et al., 2013**). Wang y colaboradores llevaron a cabo la acetilación de CNC en un medio de reacción de anhídrido acético/alcohol isopropílico usando ácido sulfúrico como catalizador (los autores no informaron la cantidad utilizada), y operando a  $40^\circ\text{C}$  por 3 h hasta alcanzar un GS de 0,031 (**Wang, Ding, & Cheng, 2007**). Por otro lado, se han informado metodologías de esterificación de CNC catalizadas con ácido clorhídrico. Entre ellas se puede citar la esterificación de CNC con ácido acético y ácido butírico usando ácido clorhídrico

como catalizador (0,027 M), y trabajando a 105°C durante tiempos comprendidos entre 4 y 25 min, hasta lograr valores de GS superficiales de 0,25–1,49 (**Braun & Dorgan, 2009**). Spinella y colaboradores esterificaron CNC con ácidos acético y láctico usando ácido clorhídrico como catalizador (1,8 mL de HCl 12 M) durante 3 h a 150°C, hasta alcanzar valores de GS en el rango de 0,12–0,13 (**Spinella et al., 2016**). Alternativamente, también se ha utilizado yodo como catalizador de la esterificación de CNC. Por ejemplo, en un medio de reacción con anhídrido butírico a 110°C y durante 0,5 h, usando yodo (0,0012 g/mL) como catalizador Abraham y colaboradores informaron haber obtenido CNC con un GS de 2,1 (**Abraham et al., 2016**). En otra contribución se indicó la utilización de carbonato de potasio como catalizador (0,7 mmol) de la esterificación de CNC llevada adelante en un medio de dimetilformamida y acetato de vinilo durante 1 a 24 h a 94°C. Los autores no informaron el GS obtenido (**Cetin et al., 2009**). En otro trabajo se informó la utilización de trietilamina como catalizador de la esterificación de CNC en un sistema de reflujo con tolueno con diferentes cloruros de acilo (hexanoílo, lauroílo, estearoílo) como agentes esterificantes. Luego de 4 h de reacción se alcanzaron valores de GS entre 0,31 y 0,68 (**De Menezes, Siqueira, Curvelo, & Dufresne, 2009**). También se han informado reacciones de esterificación de CNC en un medio de piridina. Uschanov y colaboradores utilizaron cloruro de *p*-toluensulfónico como catalizador y tres ácidos grasos (oleico, decanoico, linoleico) como acilantes, y luego de 1 h a 50°C alcanzaron GS en el rango de 0,46 a 1,20 (**Uschanov et al., 2011**). Otros autores acetilaron CNC con anhídrido acético a 80°C durante 5 h (**Lin et al., 2011; Zhang, Ma, & Zhang, 2016**). Pueden citarse además esterificaciones de CNC con vapor de cloruro de palmitoílo (160 y 190°C, 2–13 h, GS 0,15–1,17 (**Berlioz et al., 2009**)), y (150°C, 2–6 h, GS 0,07–1,91 (**Fumagalli, Sanchez, Molina-Boisseau, & Heux, 2013**)), así como la esterificación de CNC realizada en una emulsión acuosa de anhídrido isooctadecanoicosuccínico/anhídrido *n*-succínicotetradecanoico en intervalos de hasta 2 h a 105°C que redundó en CNC con GS  $\approx$ 0,02 (**Yuan, Nishiyama, Wada, & Kuga, 2006**).

La recopilación anterior intenta ilustrar los distintos enfoques informados en la literatura para hidrofobizar la superficie de CNC mediante reacciones de esterificación. Sin embargo, de manera general tanto para los CNC como para las membranas enteras de BNC descritas previamente, no existen antecedentes del uso



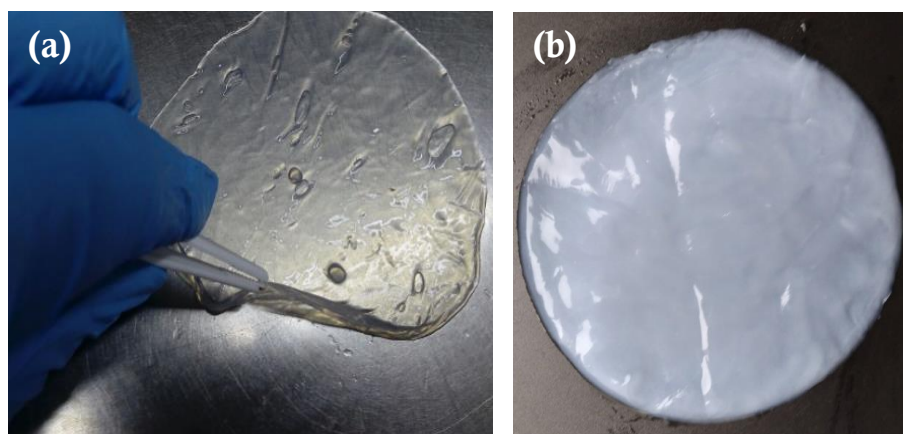
de ácido cítrico como catalizador de su acetilación. En este Capítulo, y en vista de los resultados previos, se explora la utilidad de la ruta sobre ambos sustratos nanocelulósicos, y se caracterizan brevemente los productos.

## 5.2 Resultados y discusión

### 5.2.1 Acetilación de membranas enteras de BNC

#### 5.2.1.1 Obtención de las membranas acetiladas

Para llevar adelante la acetilación de las membranas de BNC (**Figura 5.1**) y de la misma forma como se procedió con la BNC en suspensión, fue necesario primeramente desplazar el agua contenida en el interior de las membranas mediante intercambios sucesivos de solvente (**Sección 4.2.1**). Al respecto, el espesor y lo compacto de las membranas obtenidas luego de 12 días de fermentación limitó la efectividad de los intercambios y, finalizado el intervalo de reacción seleccionado, conllevó a un GS cercano a cero. Se decidió utilizar entonces como sustrato membranas de BNC de 3 días de fermentación, mucho más finas y con una red de nanocintas más abierta y porosa (**Cerrutti et al., 2016**). Para estas membranas los intercambios de solvente destinados a desplazar el agua y embeber las membranas en anhídrido acético resultaron efectivos.



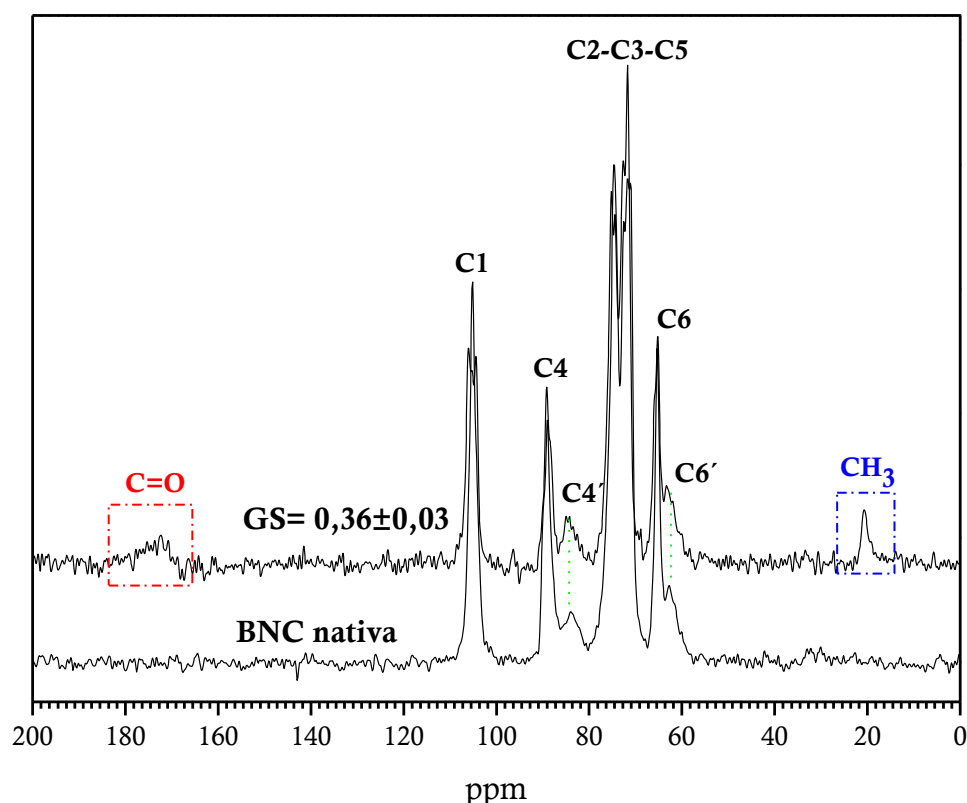
**Figura 5.3** Membrana entera de BNC obtenida a **(a)** 3 días de fermentación, **(b)** 12 días de fermentación en cultivo estático.

Las condiciones de reacción utilizadas (0,14 mmol ácido cítrico/mmol UAG, 35 mL de anhídrido acético, 120°C, 3 h) se adaptaron de los ensayos previos para BNC en suspensión, teniendo en cuenta i) la masa seca de celulosa aportada por cada membrana, y ii) que las películas quedaran completamente cubiertas por el acilante. En forma análoga a lo descrito en la generalidad de las metodologías enumeradas en 5.5.1, el sistema no se agitó para evitar el plegado de las membranas y/o que alguna parte de las mismas superara el nivel de acilante y no tuviera buen contacto con el reactivo y el catalizador disuelto. En estas condiciones, los resultados de saponificación indicaron que se alcanzó un GS de  $0,36 \pm 0,03$ .

#### **5.2.1.2 Breve caracterización estructural del producto**

##### **5.2.1.2.1 Análisis estructural por RMN**

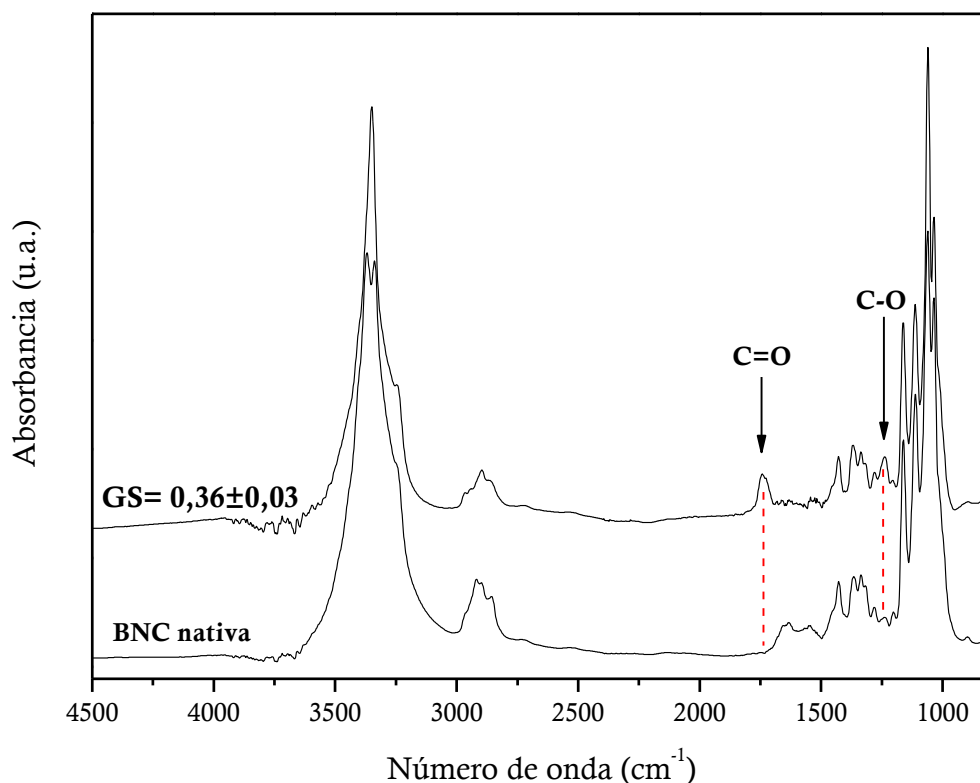
Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  en estado sólido para las membranas de BNC enteras nativa y acetilada con un GS de  $0,36 \pm 0,03$  se muestran en la **Figura 5.4**. Como se observa, el espectro de la BNC nativa exhibe las señales típicas de la celulosa nativa detalladas en la **Sección 3.2.2** de esta Tesis ( $\text{C}_1$  105,1 ppm;  $\text{C}_4$  89,1 ppm,  $\text{C}_4'$  a 84,1 ppm;  $\text{C}_2$  -  $\text{C}_3$  -  $\text{C}_5$  80 – 69 ppm;  $\text{C}_6$  65,3 ppm y  $\text{C}_6'$  62,7 ppm). En el espectro de la BNC acetilada se evidenciaron además dos nuevas señales correspondientes a los grupos acetilo introducidos en la molécula ( $\text{CH}_3$  21 ppm, y  $\text{C=O}$  171–173 ppm), las cuales confirmaron la acetilación de las membranas de BNC. Una vez más, dentro de la sensibilidad de la técnica, no se observaron señales asignables a la presencia significativa de ácido cítrico o sus ésteres.



**Figura 5.4** Espectros de CP/MAS- $^{13}\text{C}$  RMN de membranas de BNC nativa y BNC acetilada ( $\text{GS} = 0,36 \pm 0,03$ ).

#### 5.2.1.2.2 Análisis estructural por FTIR

Los espectros FTIR de las membranas secas de BNC nativa y acetilada confirmaron el éxito de la derivatización a partir de las señales correspondientes a los grupos éster introducidos en la molécula de celulosa (estiramiento a  $1741\text{ cm}^{-1}$  del grupo carbonilo y a  $1236\text{ cm}^{-1}$  del enlace carbono  $\text{S}_{\text{p}2}$  -O del grupo acetilo) (**Figura 5.5**). De igual forma, las señales características de la celulosa nativa se registraron en ambos espectros a los números de onda ya descriptos previamente ( $3345$ ,  $2895$ ,  $1432$ ,  $1278$ ,  $1165$ ,  $1109$ ,  $1059$  y  $897\text{ cm}^{-1}$ ) (**Sección 3.2.3**) (**Castro et al., 2011**; **Cerrutti et al., 2016**; **Rani et al., 2011**; **Vázquez et al., 2013**). En este caso los espectros se adquirieron directamente sobre las películas en transmisión, no haciendo falta la preparación de pastillas con KBr.

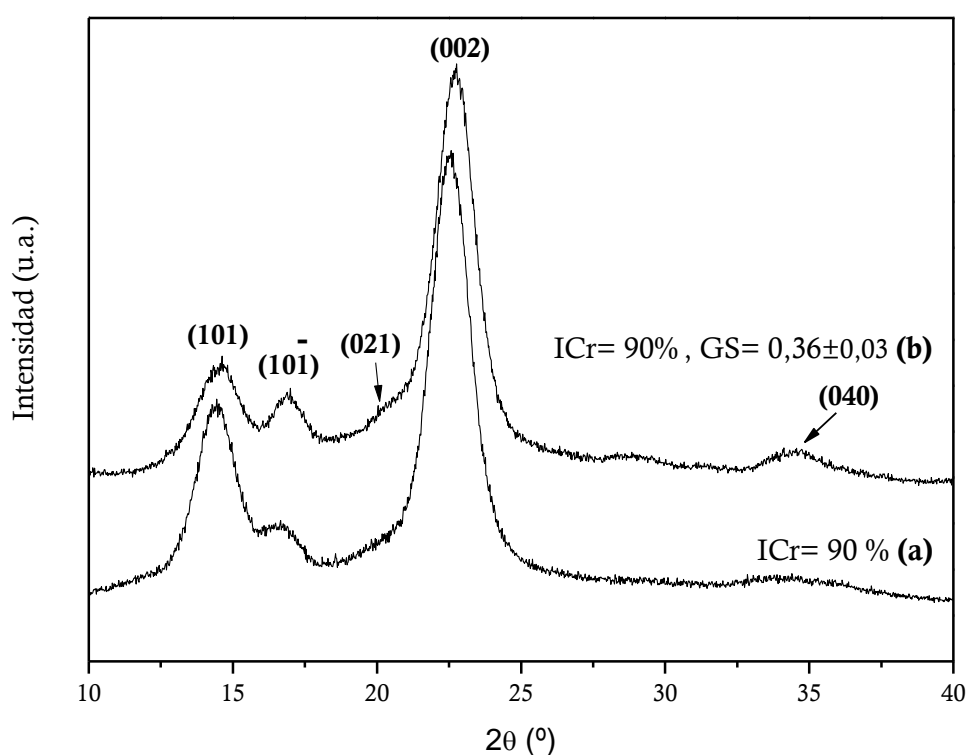


**Figura 5.5** Espectros FTIR de membranas de BNC nativa y BNC acetilada ( $GS=0,36\pm0,03$ ).

#### 5.2.1.2.3 Estudio de cristalinidad por DRX

En la **Figura 5.6** se muestran los difractogramas de rayos X de las membranas de BNC nativa y acetilada con un  $GS$  de  $0,36\pm0,03$ . Como ya se ha detallado previamente, las señales en el difractograma de la BNC nativa se ubicaron en  $2\theta=14,4^\circ$  (101),  $16,7^\circ$  (10-1),  $20,1^\circ$  (021),  $22,5^\circ$  (002), y  $34,4^\circ$  (040), todos ellas propias de celulosa I (**Sección 3.2.5**) (**Johnson Ford et al. 2010**). El difractograma de la muestra acetilada no presentó señales adicionales o algún desplazamiento que pudiera suponer algún cambio estructural. Como una medida de la cristalinidad se calcularon los índices de cristalinidad relativos (ICr) de las muestras por el método de Segal (**Sección 2.5.8**). Los valores que se muestran en los difractogramas indican que no hubo cambios significativos en la cristalinidad de las membranas producto de la acetilación, pudiéndose confirmar que la reacción tuvo lugar principalmente en las regiones amorfas y/o en la superficie de las nanofibras que conforman la membrana, sin afectar sustancialmente su ultraestructura. Conclusiones similares fueron

informadas por Kim y colaboradores para una membrana de BNC acetilada con un GS de 0,37; mientras que para valores de GS a partir de 1,44 los autores observaron cambios significativos en la cristalinidad de las nanofibras (**Kim et al., 2002**). Por su parte **Ifuku et al. (2007)** informaron que a partir de un GS de 0,95 las nanofibras de las membranas denotaron un patrón de difracción alterado, asociado a una reducción importante en la cristalinidad. Por otro lado, **Hu et al. (2011)** informaron que para valores de GS de 0,45 y 0,65 no se alteró la estructura cristalina de las membranas de BNC acetiladas, mientras que para películas con GS de 1,75 y 1,98 la disminución de la cristalinidad fue notable.



**Figura 5.6** Difractogramas de rayos X de membranas de **(a)** BNC nativa, **(b)** BNC acetilada (GS=  $0,36 \pm 0,03$ ).

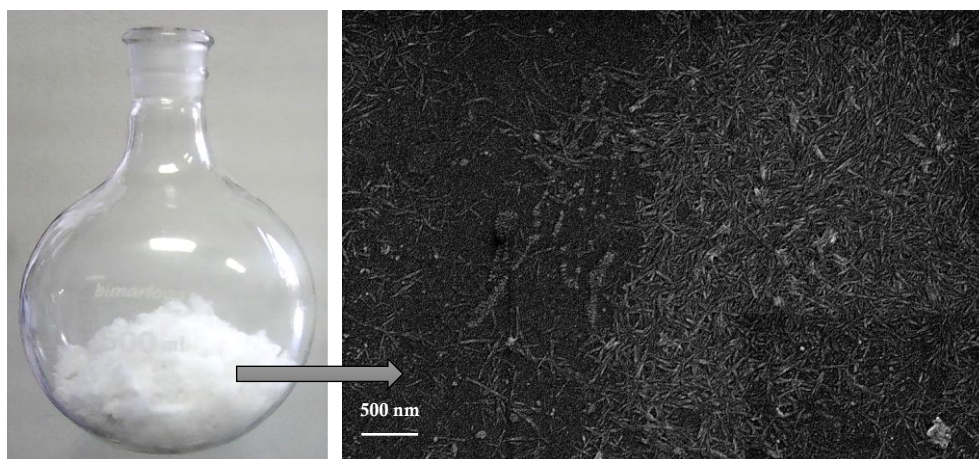
## 5.2.2 Acetilación de nanocristales de celulosa vegetal

### 5.2.2.1 Obtención de CNC acetilados

La extensión de la ruta catalizada por ácido cítrico para acetilar CNC se llevó a cabo utilizando una masa seca total de CNC de 0,7 g (4,32 mmol UAG), obtenidos de acuerdo con el protocolo descrito en la **Sección 2.2.2**. La **Figura 5.7** muestra la apariencia original de los CNC nativos liofilizados como polvo previo a la reacción de acetilación, y la micrografía SEM correspondiente. En la imagen se aprecia la morfología típica de los CNC con dimensiones comprendidas en  $\approx 10\text{--}20$  nm de ancho y entre 100 a 200 nm de longitud. Estos valores son coincidentes con lo informado por otros autores para CNC extraídos de celulosa microcristalina (**Habibi et al., 2010; Moon et al., 2011**).

El GS conferido a los CNC se varió utilizando dos cargas diferentes de catalizador (0,06 y 0,6 mmol ácido cítrico/mmol UAG), en reacciones llevadas a cabo a  $120^{\circ}\text{C}$  durante 3 h de reacción. Los GS alcanzados fueron de  $0,18\pm 0,03$  y  $0,34\pm 0,02$  para la menor y mayor carga de catalizador utilizadas, respectivamente.

Al comparar los GS alcanzados en los CNC con cada carga de catalizador usada (0,06 (GS=  $0,18\pm 0,03$ ) y 0,6 (GS=  $0,34\pm 0,02$ ) mmol ácido cítrico/mmol UAG) con los GS obtenidos previamente para BNC en suspensión utilizando cargas de catalizadores similares (0,08 (GS=  $0,36\pm 0,01$ ) y 0,67 (GS=  $0,60\pm 0,02$ ) mmol ácido cítrico/mmol UAG) (**Figura 4.2**), se puede inferir que los CNC son menos susceptibles a la reacción de acetilación. Esto se explica en términos de la estructura de los CNC, en los que se removieron los dominios amorfos que son los mayoritariamente involucrados en la reacción. En el mismo sentido se destaca que al evaluar el avance de la reacción no catalizada para los CNC, el GS alcanzado fue cercano a cero (GS=  $0,03\pm 0,02$ ), un valor significativamente inferior al obtenido para la acetilación no catalizada de BNC en idénticas condiciones (GS=  $0,21\pm 0,01$ ).

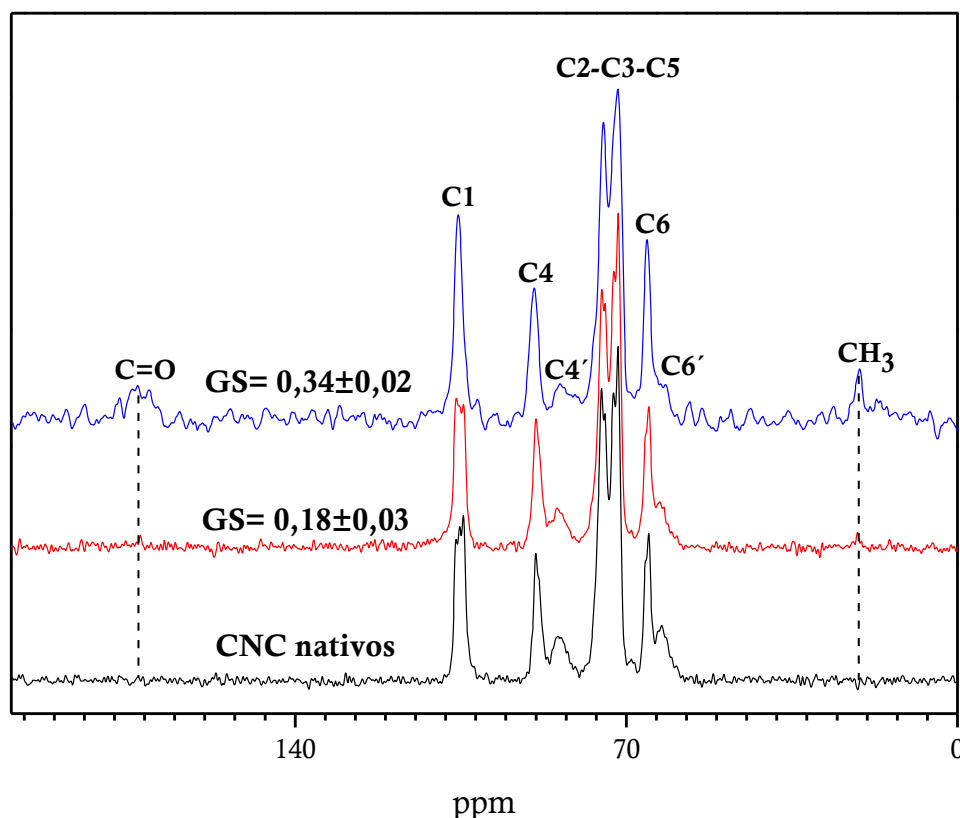


**Figura 5.7** Fotografía de los nanocristales de celulosa de origen vegetal liofilizados y su respectiva micrografía.

## 5.2.2.2 Caracterización de productos

### 5.2.2.2.1 Análisis estructural por RMN

La **Figura 5.8** muestra los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN en estado sólido de los CNC nativos y acetilados. De igual forma que para BNC, el espectro de los CNC nativos muestra las señales típicas de la celulosa, asignadas a  $\text{C}_1$  (105,2 ppm),  $\text{C}_4$  (89,1 ppm),  $\text{C}_4'$  (84,4 ppm), las señales agrupadas de los carbonos  $\text{C}_2$ - $\text{C}_3$ - $\text{C}_5$  (68,5 – 79,7 ppm),  $\text{C}_6$  (65,3 ppm) y  $\text{C}_6'$  (62,5 ppm). Al comparar los espectros de los CNC acetilados con los de la muestra nativa, se observaron las nuevas señales características de los grupos éster introducidos que confirmaron el éxito de la acetilación (173 y 21 ppm correspondientes a los grupos  $\text{C}=\text{O}$  y  $\text{CH}_3$ , respectivamente). Por otro lado, la ausencia de señales alrededor de 44 ppm relacionadas a los grupos metileno del ácido cítrico y/o ésteres citrato sugirió nuevamente que los grupos mayoritariamente introducidos fueron acetilos, y que no hubo una reacción directa significativa del ácido cítrico con los grupos hidroxilos de la celulosa.

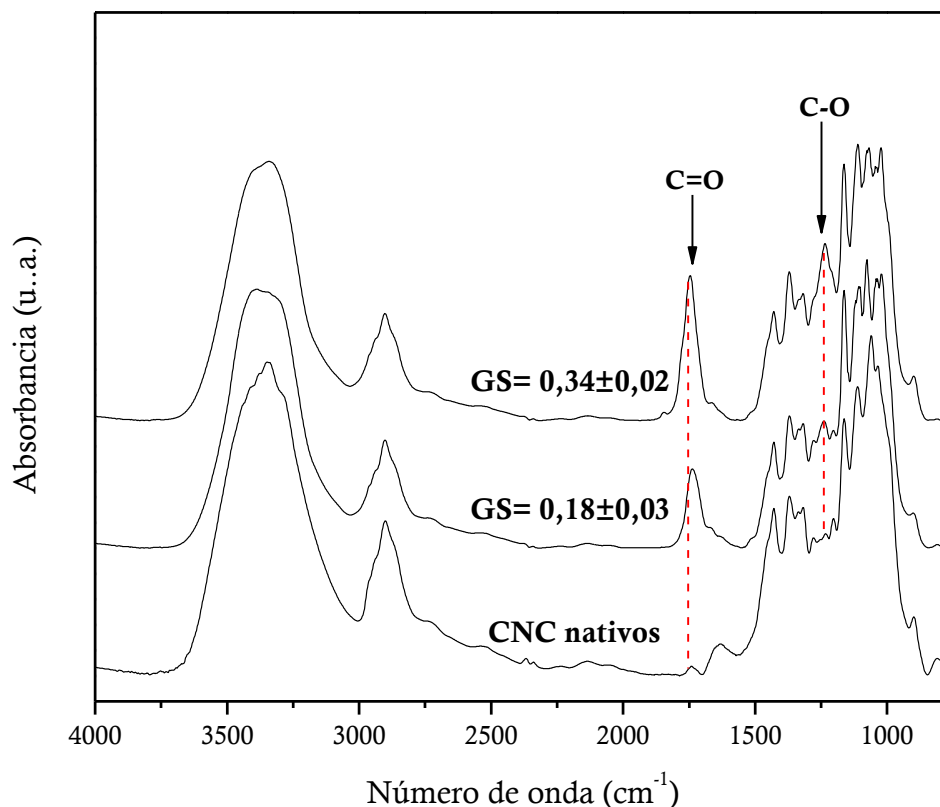


**Figura 5.8** Espectros de CP/MAS- $^{13}\text{C}$  RMN de CNC nativos y acetilados ( $\text{GS} = 0,18 \pm 0,03$  y  $0,34 \pm 0,02$ ).

#### 5.2.2.2.2 Análisis estructural por FTIR

De manera similar a lo descrito para BNC en suspensión y en membrana, en los espectros de los CNC nativos (**Figura 5.9**) se aprecian las señales típicas de la celulosa nativa. Por su parte, la acetilación de los CNC redundó en la aparición de dos nuevas señales asignadas a los grupos éster, correspondientes al estiramiento de los enlaces  $\text{C}=\text{O}$  en  $1737\text{ cm}^{-1}$  y la del carbonilo  $\text{S}_{\text{p}}2$  del grupo acetato en  $1235\text{ cm}^{-1}$ .





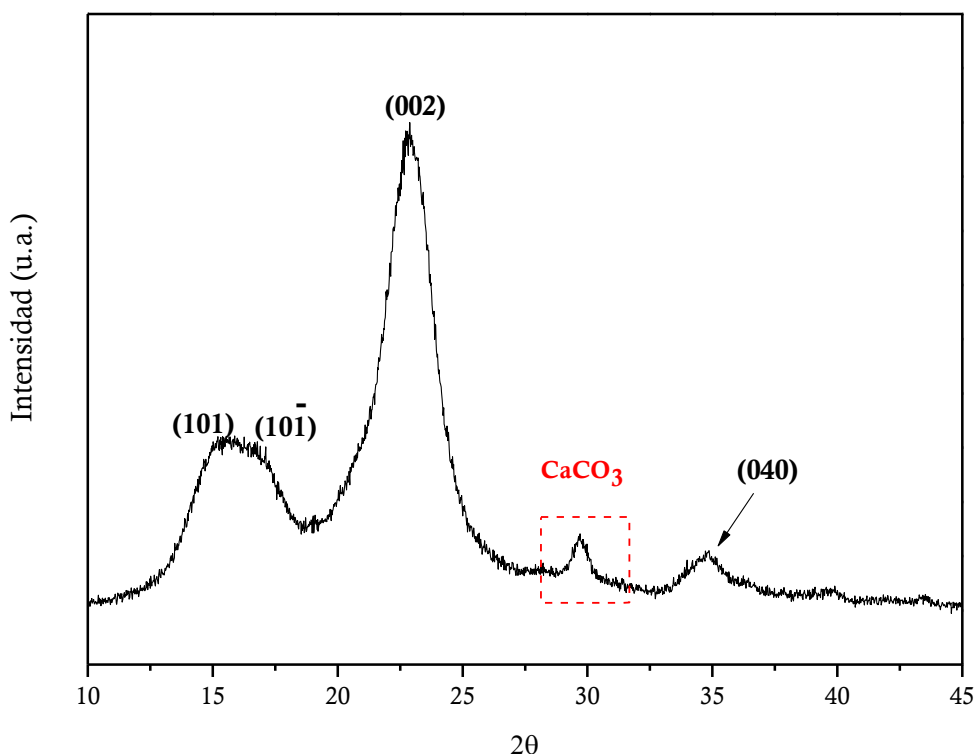
**Figura 5.9** Espectros FTIR de los CNC nativos y acetilados ( $GS= 0,18\pm0,03$  y  $0,34\pm0,02$ ).

Para el caso de los CNC, que pueden obtenerse en forma de polvo fino homogéneo después de la liofilización, las pastillas de KBr quedaron mucho más homogéneas en comparación con las obtenidas previamente para BNC, en las que la BNC seca luego de la molienda se reduce únicamente a escamas de no menos de 2–4 mm. Por tal motivo, en los CNC acetilados sí se logró observar un claro incremento del área de las bandas asociadas a los grupos éster introducidos con el aumento del GS.

#### 5.2.2.2.3 Estudio de cristalinidad por DRX

Para estudiar el impacto de la acetilación catalizada por ácido cítrico sobre la cristalinidad de los CNC se adquirieron los patrones de difracción de rayos X para las muestras nativa y acetiladas.

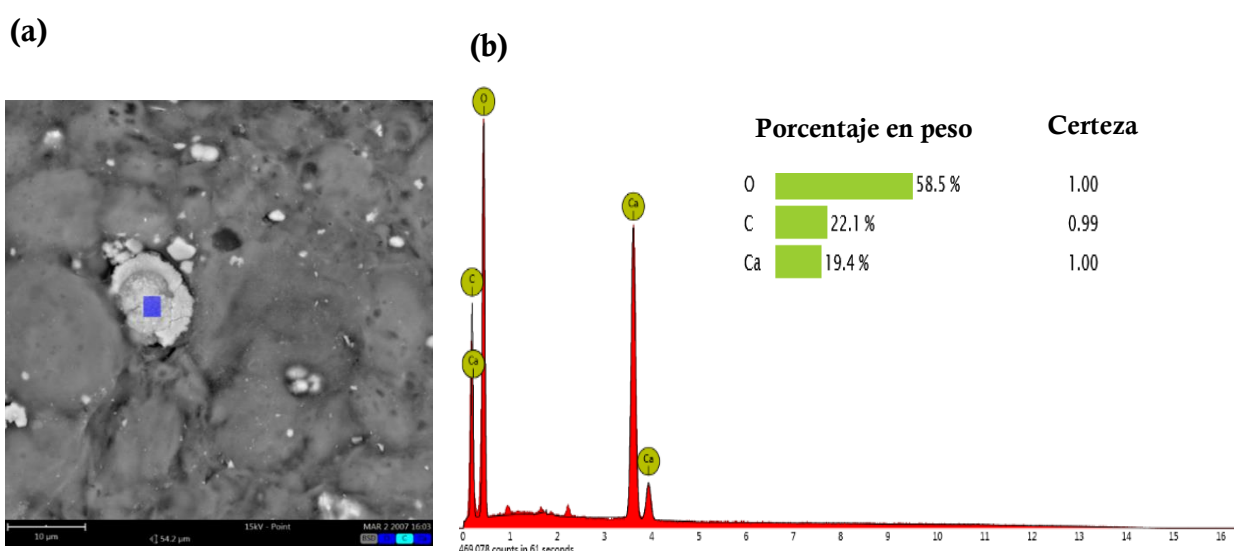
En primer lugar, en la **Figura 5.10** se muestra el difractograma para los CNC nativos, el cual describe los picos típicos de los dominios cristalinos de la celulosa tipo I centrados en los ángulos  $2\theta$  de  $14,4^\circ$ ,  $16,7^\circ$ ,  $22,5^\circ$  y  $34,4^\circ$ , asignados a los planos de difracción (101), (10 $\bar{1}$ ), (002) y (040), respectivamente (Johnson Ford et al., 2010; Park et al., 2010).



**Figura 5.10** Patrón de DRX de los CNC nativos.

Por otro lado, según se observa en la **Figura 5.10**, los CNC mostraron un pico adicional en  $29,6^\circ$  relacionado con la presencia de otras configuraciones cristalinas diferentes a las que son características de los cristales de celulosa. La muestra se observó al SEM y se notó la presencia de impurezas en forma de agregados de cristales que se analizaron por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS). En la **Figura 5.11a** se muestra una micrografía de la muestra de CNC en donde se enfoca uno de los agregados descritos. El espectro EDS adquirido (**Figura 5.11b**) mostró señales asignables a calcio, carbono y oxígeno, en una relación porcentual de 19,4, 22,1, 58,5%, por lo que se identificó a la impureza como cristales

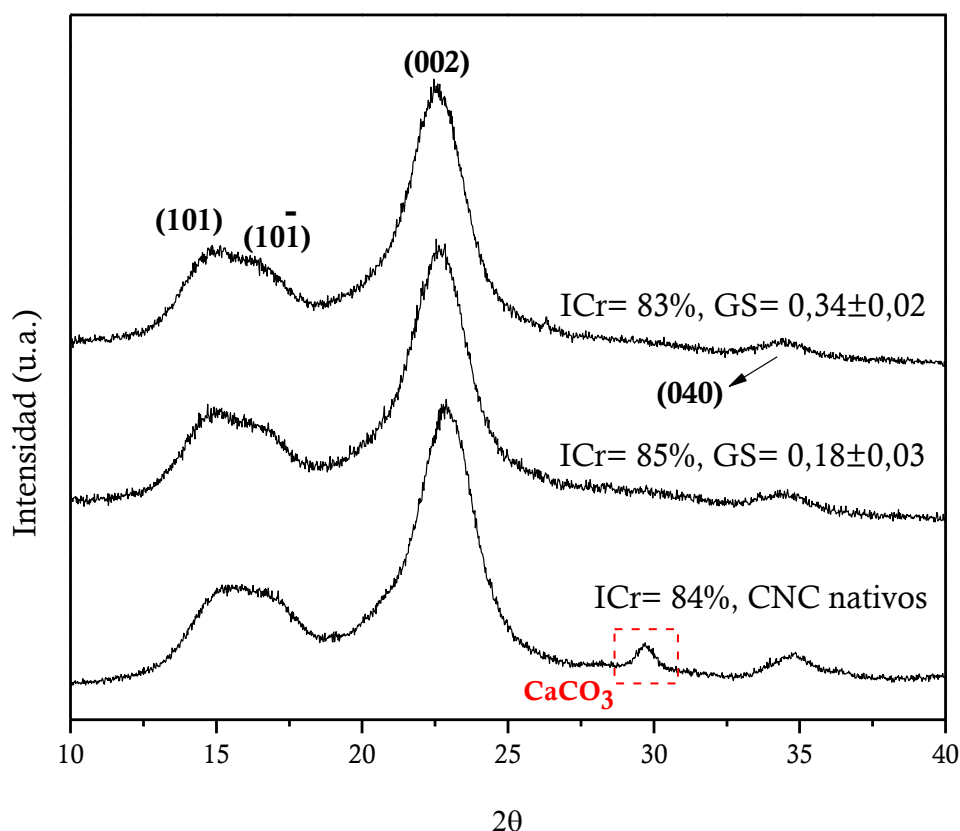
de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Finalmente, se consultó el patrón de rayos X del  $\text{CaCO}_3$ , y se confirmó que este compuesto presenta una reflexión asignada al plano (104) centrada en un ángulo  $2\theta$  de  $29,5^\circ$  (Kontoyannis & Vagenas, 2000; Santomauro, Baier, Huang, Pezold, & Bill, 2012), tal como se identificó en el difractograma de los CNC originales (Figura 5.10). El origen de estos depósitos de  $\text{CaCO}_3$  presentes en los CNC nativos se asoció al proceso de diálisis realizado para eliminar el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  usado en la hidrólisis de la fuente de celulosa que, según fue informado por los colegas que proveyeron los CNC, se llevó a cabo con agua de red no desmineralizada.



**Figura 5.11** (a) Micrografía de depósitos identificados en la suspensión de CNC, (b) espectro EDS correspondiente.

Una vez identificado el origen de la señal en  $2\theta = 29,5^\circ$  en el difractograma de los CNC nativos, se analizó el efecto de la acetilación en su cristalinidad. En la Figura 5.12 se presentan comparativamente los espectros de los CNC nativos y acetilados ( $\text{GS} = 0,18 \pm 0,03$  y  $0,34 \pm 0,02$ ). Como se observa, los patrones de difracción de los CNC permanecieron sin cambios significativos después de la derivatización. Las determinaciones de los índices de cristalinidad relativos (ICr) de las muestras mediante el método empírico de Segal (Sección 2.5.7) (Park et al., 2010; Segal et

al.,1959), confirmaron que la estructura cristalina interna de los nanocristales se mantuvo intacta después de la acetilación, con valores de ICr para los CNC nativos de 84%, de 85% para los CNC acetilados con menor GS ( $GS = 0,18 \pm 0,03$ ), y de 83% para los CNC con mayor GS ( $GS = 0,34 \pm 0,02$ ). Resultados similares fueron obtenidos previamente para CNC acetilados con valores de GS de entre 0,02 y 0,47 (Tang et al., 2013; Wang et al., 2007; Yuan et al., 2006).

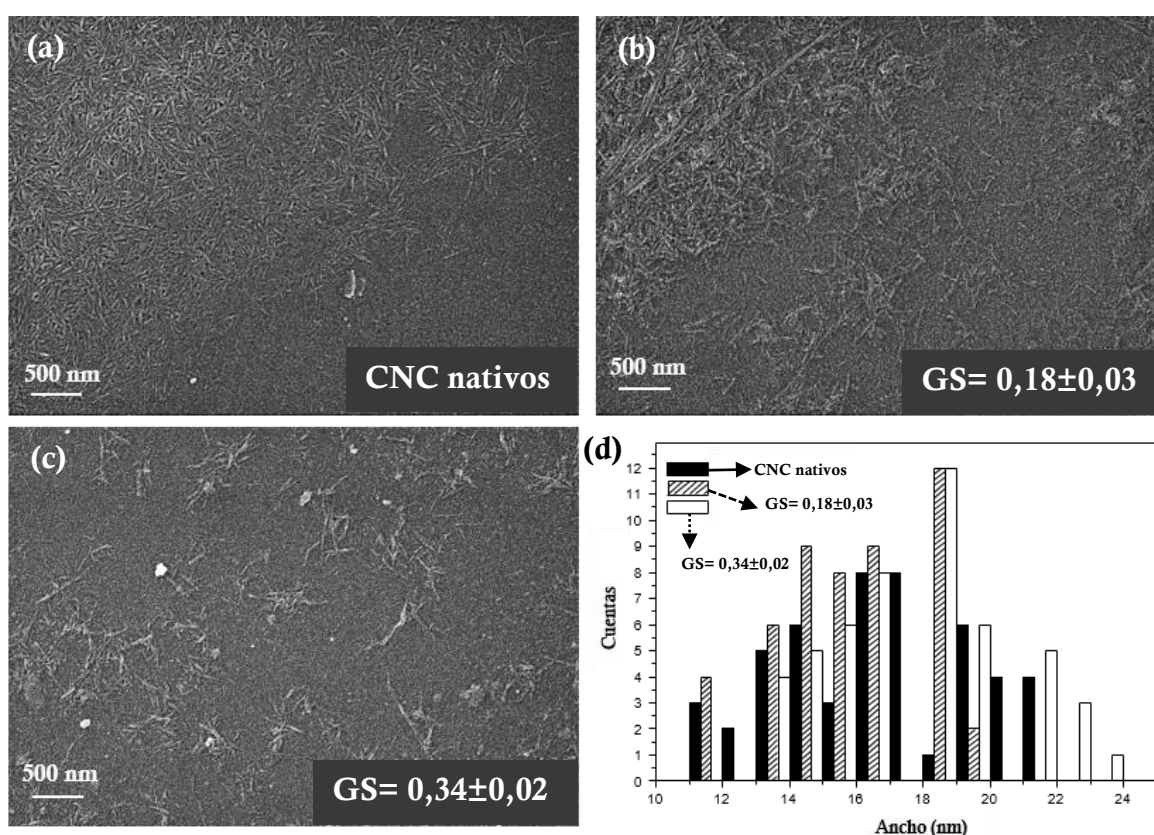


**Figura 5.12** Patrones de DRX de los CNC nativos y acetilados ( $GS = 0,18 \pm 0,03$  y  $0,34 \pm 0,02$ ).

Finalmente, cabe destacar que en los difractogramas de las muestras acetiladas no se observó el pico proveniente de las contribuciones cristalinas del  $CaCO_3$ , probablemente como consecuencia de su solubilización en el medio ácido de reacción.

#### 5.2.2.2.4 Estudio morfológico por FESEM

En la **Figura 5.13** se muestran las micrografías de FESEM de los CNC nativos y acetilados. Como se observa, la morfología y dimensiones de los nanocristales no se vieron afectadas para los GS alcanzados, y sus dimensiones se conservaron significativamente (ver histograma en la **Figura 5.13d**). Estos resultados confirmaron el carácter suave de la acetilación y son congruentes con los resultados obtenidos por otros autores para valores similares de GS (**Cetin et al., 2009; Lin et al., 2011; Yuan et al., 2006**).



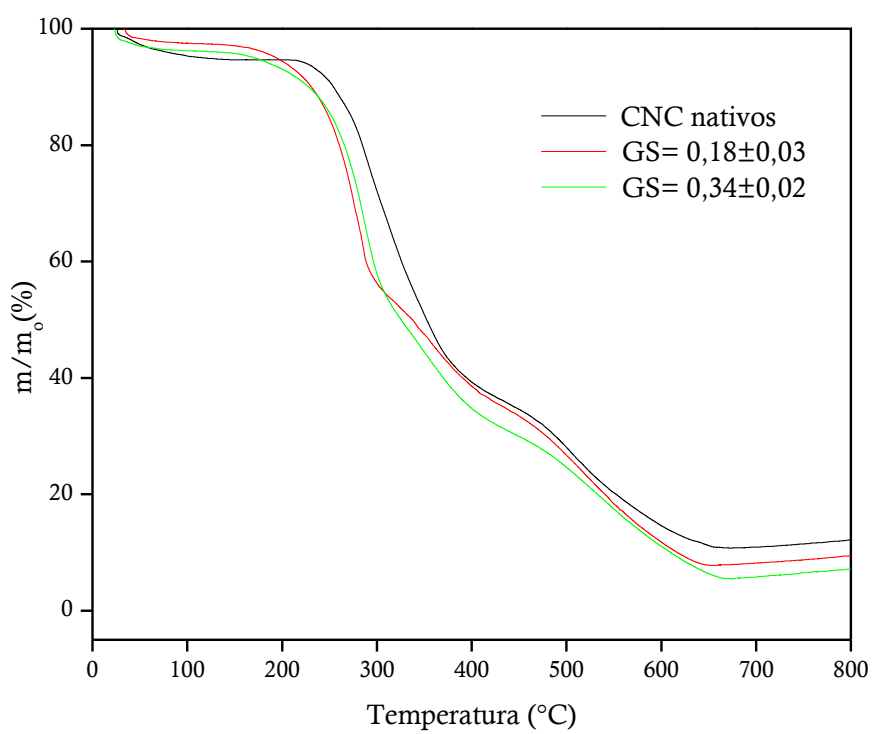
**Figura 5.13** Micrografía de CNC (a) nativos, (b) acetilados (GS = 0,18±0,03), (c) acetilados (GS = 0,34±0,02), (d) distribución de anchos de CNC (nm).

#### 5.2.2.2.5 Propiedades térmicas por TGA

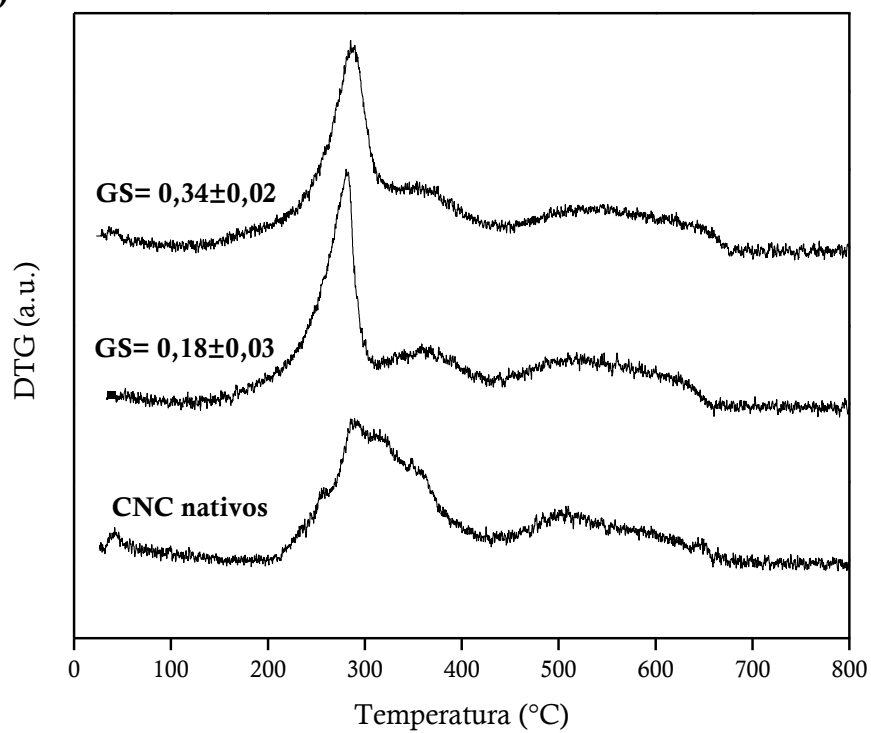
Al igual que para las nanofibras de celulosa, otro factor importante que influye en el uso potencial de los nanocristales de celulosa como refuerzo de matrices poliméricas es su estabilidad térmica, sobre todo en vistas de su procesamiento a escala industrial que requerirá que los CNC soporten temperaturas compatibles con procesamiento de la matriz (por ejemplo, la extrusión del PLA en general requiere temperaturas en torno a 180°C (**Fortunati et al., 2012; Oksman et al, 2006**). Las curvas de TG y DTG (primera derivada de los datos de TG) de los CNC nativos y acetilados se reúnen en la **Figura 5.14**.

Para los CNC nativos la temperatura de velocidad máxima de descomposición ( $T_{\text{máx}}$ ) se registró en  $\approx 300^\circ\text{C}$ ; mientras que para los CNC acetilados la misma se dio a  $282^\circ\text{C}$  y  $286^\circ\text{C}$  para los CNC con  $\text{GS} = 0,18 \pm 0,03$  y  $0,34 \pm 0,02$ , respectivamente. Por otra parte, la temperatura de inicio de la descomposición evaluada en este caso como aquella para la que se registró un 10% de pérdida de masa, se redujo  $\approx 25^\circ\text{C}$ , obteniéndose valores de  $254^\circ\text{C}$  para los CNC nativos frente a  $230^\circ\text{C}$  y  $227^\circ\text{C}$  para los CNC acetilados con  $\text{GS} = 0,18 \pm 0,03$  y  $0,34 \pm 0,02$ , respectivamente. Como se mencionó en Capítulos previos para BNC (**Sección 4.2.3.5**), la menor estabilidad térmica de los productos acetilados podría atribuirse a la labilidad de los grupos éster introducidos en la molécula de celulosa, y al menor número de enlaces de hidrógeno intermoleculares que pueden establecerse como consecuencia de la esterificación (**Uschanov et al., 2011**). Sin embargo, vale destacar que la reducción en la temperatura de inicio de la descomposición de los CNC acetilados no resultó restrictiva para su uso como refuerzo de matrices poliméricas típicas en procesos en fundido (**Arrieta et al., 2014**).

**(a)**



**(b)**

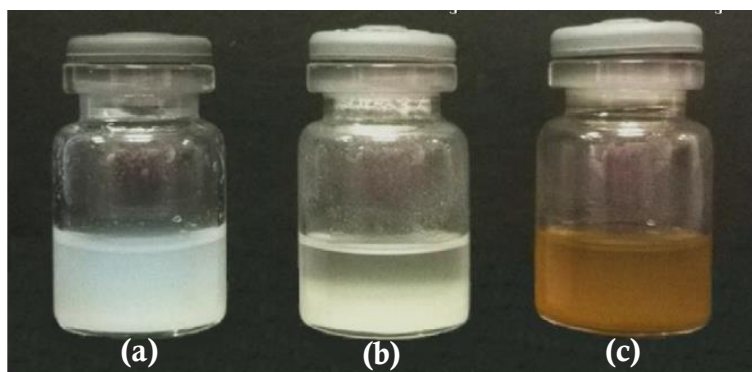


**Figura 5.14** Curvas **(a)** TG, **(b)** DTG de CNC nativos y acetilados ( $GS = 0,18 \pm 0,03$  y  $0,34 \pm 0,02$ ).

#### 5.2.2.2.6 Análisis del cambio de polaridad inducido

Para completar el estudio se evaluó la eficacia de la ruta de acetilación para lograr la hidrofobización de los CNC a partir de su dispersabilidad en solventes orgánicos de diferente polaridad. Este es un ensayo sencillo típico para llevar adelante un análisis cualitativo del cambio de polaridad inducido en reacciones de esterificación (Abraham et al., 2016; Braun & Dorgan, 2009; Cetin et al., 2009; De Menezes et al., 2009; Fumagalli et al., 2013; Lin et al., 2011; Wang et al., 2007; Yuan et al., 2006).

En la **Figura 5.15** se reúnen como ejemplo fotografías de las suspensiones de los CNC nativos y acetilados con un GS de  $0,34 \pm 0,02$  en agua y en cloroformo luego de su leve sonicación a 80W durante 3h. El volumen final de las suspensiones fue de 5 mL, con un contenido de CNC liofilizados del 1,7% (p/v). Las muestras se dejaron reposar durante 25 minutos antes de tomar las fotografías.



**Figura 5.15** Fotografías representativas de suspensiones de **(a)** CNC nativos en agua, **(b)** CNC nativos en cloroformo, **(c)** CNC acetilados (GS=  $0,34 \pm 0,02$ ) en cloroformo. Fotografías tomadas 25 min después de sonicar las suspensiones.

Los CNC nativos en agua dieron lugar a suspensiones estables (**Figura 5.15a**), mientras que en cloroformo sedimentaron rápidamente (**Figura 5.15b**). Por otro lado, la disminución de la polaridad de los CNC luego de la acetilación (GS=  $0,34 \pm 0,02$ ) se tradujo en su mejor dispersión en cloroformo, tal como se ilustra en la **Figura 5.15c**. Con el transcurso del tiempo la decantación de los CNC modificados también tuvo lugar, pero en mucha menor medida que en la suspensión de CNC



nativos en cloroformo. Estos resultados demuestran que la ruta organocatalítica de acetilación de CNC aplicada resultó capaz de reducir significativamente su polaridad.

### 5.3 Conclusiones del Capítulo 5

En el presente Capítulo se extendió con éxito la ruta de acetilación a membranas enteras de BNC y CNC de origen vegetal. Los ensayos de caracterización confirmaron la introducción de grupos acetilo en ambos sustratos y que la derivatización no afectó su estructura cristalina. En el caso de los CNC, si bien se redujo su estabilidad térmica, este efecto no restringiría su uso en la preparación de compuestos con matrices poliméricas típicas procesados por extrusión. Por otro lado, si bien la derivatización de los CNC se llevó a cabo sobre un polvo liofilizado donde los CNC conservaron cierto grado de agregación durante la reacción (limitando así la efectividad de la hidrofobización a la superficie de los agregados); se pudo comprobar cualitativamente la reducción de la polaridad de los CNC acetilados que se dispersaron mucho más fácilmente que su contraparte nativa en un solvente orgánico de baja polaridad como es el cloroformo.

### 5.4 Bibliografía del Capítulo 5

Abraham, E., Nevo, Y., Slattegard, R., Attias, N., Sharon, S., Lapidot, S., Shoseyov, O. Highly hydrophobic thermally stable liquid crystalline cellulosic nanomaterials. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, 4, 1338–1346.

Arrieta, M. P., Fortunati, E., Dominici, F., Rayón, E., López, J., Kenny, J. M. Multifunctional PLA-PHB/cellulose nanocrystal films: processing, structural and thermal properties. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 107, 16–24.

Berlitz, S., Molina-Boisseau, S., Nishiyama, Y., Heux, L. Gas-phase surface esterification of cellulose microfibrils and whiskers. *Biomacromolecules*, 2009, 10, 2144–2151.

Braun, B., Dorgan, J. R. Single-step method for the isolation and surface functionalization of cellulosic nanowhiskers. *Biomacromolecules*, 2009, 334–341.

Brinchi, L., Cotana, F., Fortunati, E., Kenny, J. M. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: technology and applications. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 94, 154–169.

Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J. L., Caroa, G., Mondragon, I., Gañan, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84, 96–102.

Cerrutti, P., Roldán, P., Martínez García, R., Galvagno, M. A., Vázquez, A., Foresti, M. L. Production of bacterial nanocellulose from wine industry residues: Importance of fermentation time on pellicle characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 2016, 133, 43109–43117.

Cetin, N. S., Tingaut, P., Özmen, N., Henry, N., Harper, D., Dadmun, M., Sebe, G. Acetylation of cellulose nanowhiskers with vinyl acetate under moderate conditions. *Macromolecular Bioscience*, 2009, 9, 997–1003.

Czaja, W., Romanovicz, D., Brown Malcolm, R. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, 2004, 11, 403–411.

De Menezes, A. J., Siqueira, G., Curvelo, A. A. S., Dufresne, A. Extrusion and characterization of functionalized cellulose whiskers reinforced polyethylene nanocomposites. *Polymer*, 2009, 50, 4552–4563.

Eyley, S., Thielemans, W. Surface modification of cellulose nanocrystals. *Nanoscale*, 2014, 6, 7764–7779.

Fortunati, E., Armentano, I., Zhou, Q., Iannoni, A., Saino, E., Visai, L., Berglund, L. A., Kenny, J. M. Multifunctional bionanocomposite films of poly(lactic acid), cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87, 1596–1605.

Fortunati, E., Yang, W., Luzi, F., Kenny, J., Torre, L., Puglia, D. Lignocellulosic nanostructures as reinforcement in extruded and solvent casted polymeric nanocomposites: An overview. *European Polymer Journal*, 2016, 80, 295–316.

Fumagalli, M., Sanchez, F., Molina Boisseau, S., Heux, L. Gas-phase esterification of cellulose nanocrystal aerogels for colloidal dispersion in apolar solvents. *Soft Matter*, 2013, 9, 11309–11317.

Habibi, Y., Lucia, L. A., Rojas, O. J. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembling and applications. *Chemical Reviews*, 2010, 110, 3479–3500.

Habibi, Y. Key advances in the chemical modification of nanocelluloses. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43, 1519–1542.

Heux, L., Chauve, G., Bonini, C. Nonflocculating and chiral-nematic self-ordering of cellulose microcrystals suspensions in nonpolar solvents. *Langmuir*, 2000, 16, 8210–8212.

Hu, W., Chen, S., Xu, Q., Wang, H. Solvent-free acetylation of bacterial cellulose under moderate conditions. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83, 1575–1581.

Ifuku, S., Nogi, M., Abe, K., Handa, K., Nakatsubo, F., Yano, H. Surface modification of bacterial cellulose nanofibers for property enhancement of optically transparent composites: dependence on acetyl-group DS. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 1973–1978.

Johnson Ford, E. N., Mendon, S. K., Thames, S. F., Rawlins, J. W. X-ray diffraction of cotton treated with neutralized vegetable oil-based macromolecular crosslinkers. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 2010, 5, 10–20.

Kim, D-Y., Nishiyama, Y., Kuga, S. Surface acetylation of bacterial cellulose. *Cellulose*, 2002, 9, 361–367.

Kontoyannis, C. G., Vanegas, N. V. Calcium carbonate phase analysis using XRD and FT-Raman spectroscopy. *Analyst*, 2000, 125, 251–255.

Lin, N., Huang, J., Chang, P. R., Feng, J., Yu, J. Surface acetylation of cellulose nanocrystal and its reinforcing function in poly(lactic acid). *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83, 1834–1842.

Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., Youngblood, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40, 3941–3994.

Nogi, M., Handa, K., Nakatsubo, F., Ifuku, S., Yano, H. Property enhancement of optically transparent bionanofiber composites by acetylation. *Applied Physics Letters*, 2006, 89, 233123.

Oksman, K., Mathew, A. P., Bondeson, D., Kvien, I. Manufacturing process of cellulose whiskers/poly(lactic acid) nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 2006, 66, 2776–2784.

Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., Johnson, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulose performance. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3, 1–10.

Rani, M. U., Rastogi, N. K., Appaiah, K. A. Statistical optimization of medium composition for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii*

UAC09 using coffee cherry husk extract an agro-industry waste. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 21, 739–745.

Santomauro, G., Baier, J., Huang, W., Pezold, S., Bill, J. Formation of calcium carbonate polymorphs induced by living microalgae. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2012, 3, 413–420.

Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., Conrad, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, 1959, 29, 786–794.

Shah, N., Ul-Islama, M., Khattaka, W. A., Parka, J. K. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98, 1585–1598.

Siró, I., Plackett, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, 2010, 17, 459–494.

Spinella, S., Maiorana, A., Qian, Q., Dawson, N. J., Hepworth, V., McCallum, S. A., Ganesh, M., Singer, K. D., Gross, R. A. Concurrent cellulose hydrolysis and esterification to prepare a surface-modified cellulose nanocrystal decorated with carboxylic acid moieties. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2016, 4, 1538–1550.

Suetsugu, M., Kotera, M., & Nishino, T. Cellulosic nanocomposite prepared by acetylation of bacterial cellulose using supercritical carbon dioxide. In *17<sup>th</sup> International Conference on Composite Materials*, Edinburgh, UK, 2009.

Tang, L., Huang, B., Lu, Q., Wang, S., Ou, W., Lin, W., Chen, X. Ultrasonication-assisted manufacture of cellulose nanocrystals esterified with acetic acid. *Bioresource Technology*, 2013, 127, 100–105.

Uschanov, P., Johansson, L. S., Maunu, S. L., Laine, J. Heterogeneous modification of various celluloses with fatty acids. *Cellulose*, 2011, 18, 393–404.

Vázquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., Galvagno, M. A. Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Polymers and the Environment*, 2013, 21, 545–554.

Wang, N., Ding, E., Cheng, R. Surface modification of cellulose nanocrystals. *Frontiers of Chemical Engineering in China*, 2007, 1, 228–232.

Yuan, H., Nishiyama, Y., Wada, M., Kuga, S. Surface acylation of cellulose whiskers by drying aqueous emulsion. *Biomacromolecules*, 2006, 7, 696–700.

Zhang, X., Ma, P., Zhang, Y. Structure and properties of surface-acetylated cellulose nanocrystal/poly(butylene adipate-co-terephthalate) composites. *Polymer Bulletin*, 2016, 73, 2073–2085.

## **Normas consultadas**

ISO/TS20477. “Nanotechnologies – Standard terms and their definition for cellulose Nanomaterial”. 2017



## 6. Nanocompuestos de PLA/BNC acetilada

*En los Capítulos 4 y 5 se demostró que por la ruta propuesta y manipulando las condiciones de reacción es posible acetilar todos los sustratos nanocelulósicos ensayados (nanofibras de BNC, membranas enteras de BNC y CNC) y lograr la hidrofobización requerida sin afectar su ultraestructura. En función de estos resultados, el objetivo final de la Tesis fue utilizar las nanocelulosas modificadas como refuerzo de una matriz de PLA. Si bien se prepararon compuestos con todos los sustratos nanocelulósicos acetilados durante el desarrollo de este Trabajo de Tesis, en este Capítulo se resumen únicamente los resultados obtenidos para los compuestos de nanofibras de BNC y PLA. A lo largo del Capítulo se muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto del GS de la BNC y del porcentaje de refuerzo sobre las principales propiedades de los materiales compuestos preparados.*





## 6.1 Introducción

Algunas de las matrices poliméricas comerciales habitualmente utilizadas para la preparación de materiales compuestos son las resinas de tipo poliéster, fenólicas, epoxi y acrílicas, así como también el polietileno, polipropileno y poliestireno. Estos materiales suelen estar reforzados con fibras sintéticas como fibras de carbono, vidrio y algunas poliamidas (**Bogue 2011; Jones 1999**).

En las últimas décadas, y en el contexto de la creciente concientización de la sociedad en lo que respecta al cuidado del medio ambiente, y en particular al daño ambiental asociado a la disposición final de los polímeros tradicionales, ha crecido el interés por el desarrollo de materiales biodegradables con propiedades comparables a las de los materiales convencionales. Dentro de este grupo de materiales se pueden mencionar algunos polímeros tales como los polihidroxicanoatos, polihidroxitiratos, ácido poliglicólico, policaprolactona, succinato de polibutileno y ácido poliláctico; que en distinta medida se han ido posicionado como candidatos para sustituir los polímeros no biodegradables usados convencionalmente. Sin embargo, aunque la biodegradabilidad de estos materiales representa una ventaja importante, algunas de las propiedades necesarias para su utilización en diversas aplicaciones no son del todo satisfactorias (**Mohantya, Misraa, & Hinrichsen, 2000**). En este sentido, en los últimos años se han publicado numerosos artículos enfocados en mejorar las propiedades de los polímeros biodegradables preparando materiales compuestos que, por ejemplo, utilicen como refuerzo fibras de origen natural (**Berglund & Peijs, 2010; Mohantya et al., 2000**).

Según se detalló oportunamente en la Introducción general, una de las matrices poliméricas biodegradables más estudiadas en los últimos años es el PLA, un poliéster alifático, termoplástico, biocompatible y bioabsorbible, de alta resistencia y alto módulo que puede producirse a partir de recursos renovables. Además, el PLA puede procesarse con el equipamiento habitualmente usado para polímeros termoplásticos convencionales (**Farah et al., 2016**).

A pesar de las múltiples ventajas mencionadas, el PLA es un material relativamente frágil, con baja resistencia al impacto, baja resistencia térmica, baja capacidad de cristalización, y una reducida propiedad de barrera a gases como

oxígeno y vapor de agua, que limitan alguna de sus aplicaciones **(Farah et al., 2015; Raquez et al., 2013; Singh et al., 2003)**.

Como se mencionó anteriormente, una de las estrategias más comúnmente usadas para mejorar las propiedades de los polímeros biodegradables es el refuerzo con fibras de origen natural. En particular, en el caso del PLA hay numerosos informes de la preparación de compuestos de PLA con fibras de celulosa de sección nanométrica, debido a las interesantes propiedades mecánicas y térmicas de la nanocelulosa, además de su biodisponibilidad, renovabilidad y biodegradabilidad **(Raquez et al., 2013)**. Sin embargo, y, en base a la ya descrita incompatibilidad química de estos sustratos nanocelulósicos altamente hidrofílicos con las matrices hidrofóbicas como el PLA, sus materiales compuestos se deben preparar en presencia de surfactantes o requieren de la hidrofobización previa de la celulosa para facilitar la dispersión en la matriz.

En este sentido, una de las herramientas más comúnmente usada para hidrofobizar nanocelulosas a compatibilizar con el PLA es la esterificación y, particularmente, la acetilación **(Almasi, Ghanbarzadeh, Dehghannya, & Entezami, 2015; Lee et al., 2009; Tomé et al., 2011; Zhang, Li, Lin, & Rong, 2013)**.

En lo que respecta a la preparación de nanocompuestos de PLA con celulosa nanofibrilada acetilada de origen vegetal, se puede citar el trabajo de Trifol y colaboradores, quienes prepararon por casting compuestos de PLA y CNF acetiladas, y evaluaron el efecto del porcentaje de refuerzo (1, 3 y 5% (p/p)). Los autores observaron una disminución importante en la permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua, y una mejora en las propiedades termomecánicas del material **(Trifol et al., 2016)**.

En este contexto, se puede citar también el trabajo de Tingaut y colaboradores quienes prepararon por casting compuestos de PLA y CNF acetiladas con distintos GS, y evaluaron el efecto del porcentaje de refuerzo (5, 10 y 17% (p/p)). Los autores informaron una mejor dispersión de las CNF a medida que aumentaba el porcentaje de acetilación para todos los porcentajes de refuerzo utilizados. Además, observaron una mejora significativa en las propiedades viscoelásticas de los nanocompuestos cuando utilizaron CNF derivatizadas **(Tingaut et al., 2010)**.

En cuanto al uso de la BNC acetilada en la preparación de nanocompuestos de matriz de PLA, uno de los trabajos que se puede mencionar es el de Tomé y colaboradores, quienes prepararon nanocompuestos de PLA con BNC acetilada (GS 0,02) en diferentes porcentajes de refuerzo (1, 4, 6% (p/p)). El material acetilado mostró una mayor compatibilidad con la matriz que su contraparte nativa, hecho que se manifestó en un aumento de la transmitancia de las películas obtenidas. En todos los casos las propiedades mecánicas de los compuestos que involucraron BNC acetilada (módulo de Young y la resistencia a la tracción), fueron superiores a las de la matriz de PLA y también a las del compuesto con BNC sin modificar; y se incrementaron con el porcentaje de refuerzo (Tomé et al., 2011).

En este contexto, en este Capítulo se presentan los resultados obtenidos al preparar por casting y caracterizar nanocompuestos de PLA y BNC derivatizada por la ruta de acetilación propuesta. Se muestra también el efecto del GS de la BNC y del porcentaje de refuerzo en las propiedades de los materiales obtenidos.

## **6.2 Resultados y discusión**

### **6.2.1 Nanocompuestos de PLA con BNC acetilada con diferentes GS**

#### **6.2.1.1 Obtención de los nanocompuestos**

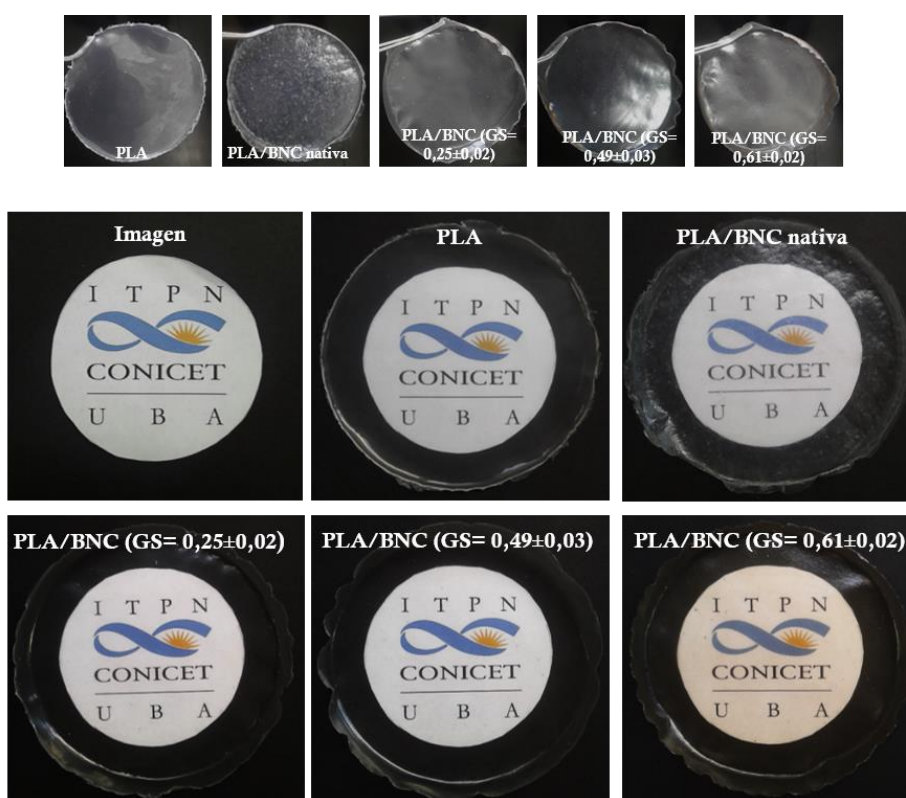
Los nanocompuestos se prepararon por casting siguiendo el protocolo descrito en la **Sección 2.4**. En todos los casos se utilizó un porcentaje de refuerzo del 3% (p/p) y se evaluó la influencia de la variación del GS ( $0,25 \pm 0,02$ ;  $0,49 \pm 0,03$ ;  $0,61 \pm 0,02$ ) en las propiedades de los materiales obtenidos.

Durante la preparación de los nanocompuestos (**Figura 6.1**) fue necesario intercambiar el solvente de la suspensión de BNC desde agua hasta cloroformo. En todos los casos, para la BNC acetilada las suspensiones fueron estables y permitieron durante todos los pasos de homogeneización conservar las nanofibras de BNC dispersas en el solvente de trabajo. Por el contrario, para la BNC nativa, dada su alta hidrofiliidad, la agregación de las nanofibras en el cloroformo fue uno de los mayores inconvenientes a la hora de preparar los nanocompuestos.

## 6.2.1.2 Caracterización de los nanocompuestos

### 6.2.1.2.1 Análisis de transparencia por UV-Visible

En la **Figura 6.1** se muestran fotografías de las películas obtenidas después de la evaporación del solvente. Como se observa, la película de la matriz de PLA pura es transparente, mientras que en el caso del nanocompuesto preparado con BNC nativa se observan múltiples agregados debido a la incompatibilidad química de la celulosa con la matriz hidrofóbica de PLA, que disminuyen su transparencia. Observaciones similares fueron informadas por Tingaut y colaboradores, cuyos nanocompuestos de PLA y celulosa nanofibrilada vegetal presentaron un color blancuzco como resultado de la formación de agregados del refuerzo (**Tingaut et. al, 2010**).

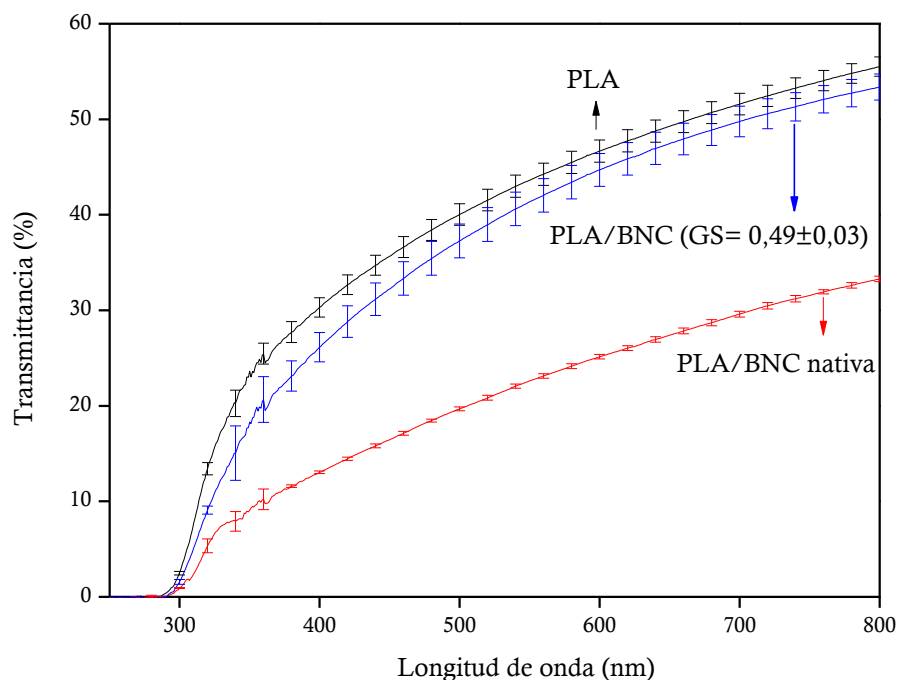


**Figura 6.1** Fotografías de las películas del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas ( $GS = 0,25 \pm 0,02$ ;  $0,49 \pm 0,03$ ;  $0,61 \pm 0,02$ ).

Por otro lado, en todos los casos las películas de los nanocompuestos con BNC acetilada presentaron un aspecto homogéneo a simple vista, que confirmó la

mejor dispersión de la nanocelulosa acetilada en la matriz. Es de destacar que no se apreciaron diferencias significativas entre las películas con BNC de diferente GS.

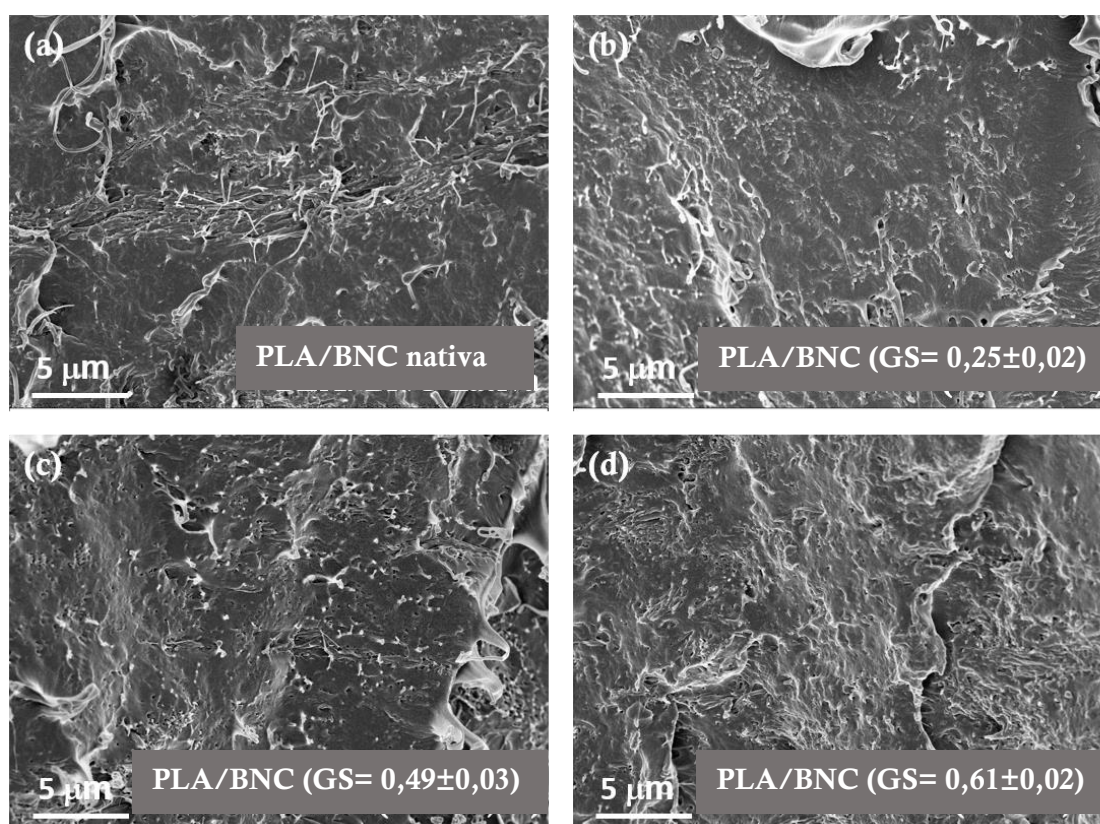
Además, se adquirieron los espectros UV-visible (**Figura 6.2**) de la matriz de PLA pura como referencia de la transparencia inicial del material, y de los nanocompuestos de PLA/BNC nativa y acetilada con un GS intermedio de  $0,49 \pm 0,03$ . Las curvas de transmitancia se adquirieron en varios puntos de cada una de las muestras, con el fin de contemplar la posible variabilidad en el espesor de la película. En concordancia con las fotografías incluidas en la **Figura 6.1**, el espectro de la película que contenía la BNC acetilada fue muy similar al del PLA puro, lo que confirmó la mejor dispersión de las nanofibras acetiladas en la matriz. Contrariamente, el espectro del nanocompuesto de PLA y BNC nativa mostró valores de transmitancia muy inferiores a los de la matriz de PLA. Otros autores obtuvieron resultados similares a los presentados en este Capítulo como consecuencia de la compatibilización entre las nanofibras de celulosa y la matriz de PLA inducida por la derivatización del refuerzo (**Kim et al., 2009; Tomé et al., 2011**).



**Figura 6.2** Espectro UV-visible del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetilada ( $GS = 0,49 \pm 0,03$ ).

#### 6.2.1.2.2 Estudio morfológico por FESEM

La **Figura 6.3** reúne las micrografías de FESEM de las superficies criofracturadas de la matriz de PLA y de los diferentes nanocompuestos. En concordancia con los resultados obtenidos al estudiar la transparencia de las películas, en la **Figura 6.3a** se observan los agregados de la BNC nativa en la matriz de PLA. Por otra parte, en los nanocompuestos que contenían BNC acetilada, se observaron nanofibras mucho mejor dispersas en la matriz debido al aumento de la compatibilidad química por la derivatización (**Figura 6.3b-d**).



**Figura 6.3** Micrografías de las superficies criofracturadas de los nanocompuestos con (a) BNC nativa, (b) acetilada (GS 0,25±0,02), (c) acetilada (GS 0,49±0,03), (d) acetilada (GS 0,61±0,02).

En la bibliografía del tema, otros autores también observaron comportamientos similares en lo que respecta a la interacción de las nanofibras acetiladas con la matriz. Por ejemplo, en los trabajos de Tomé y Zhang, los autores

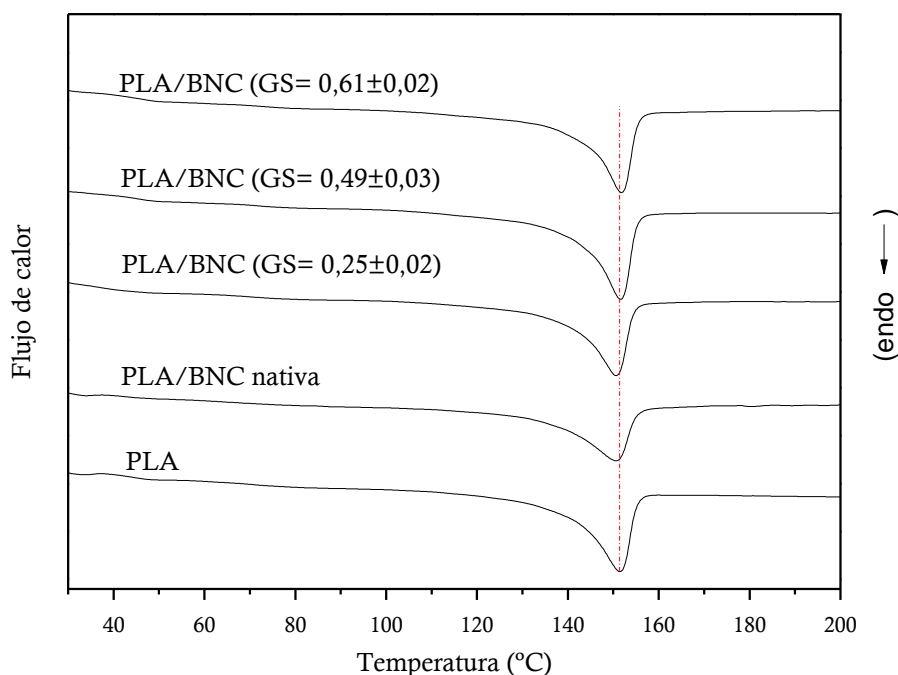
informaron que en las micrografías de los nanocompuestos con nanofibras acetiladas de BNC no se lograron distinguir las nanofibras en la superficie crio fracturada de la matriz de PLA, y atribuyeron tal observación a la mejorada compatibilidad y al mejor contacto interfacial entre las dos fases (Tomé et al., 2011; Zhang et al., 2013).

Por otro lado, al comparar las micrografías de los nanocompuestos con la BNC acetilada con diferentes GS (Figura 6.3b-d), aunque en todos los casos la dispersión de la BNC fue mucho mejor en comparación con la de la BNC nativa, no se observaron diferencias significativas en función del GS en los casos estudiados.

#### 6.2.1.2.3 Propiedades térmicas por DSC

Las propiedades térmicas de la matriz de PLA y de los diferentes nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas ( $GS = 0,25 \pm 0,02$ ;  $0,49 \pm 0,03$  y  $0,61 \pm 0,02$ ) se evaluaron por DSC.

En la Figura 6.4 se reúnen los termogramas obtenidos después del primer escaneo de calentamiento ( $T_{\text{ambiente}} \rightarrow 200^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ).



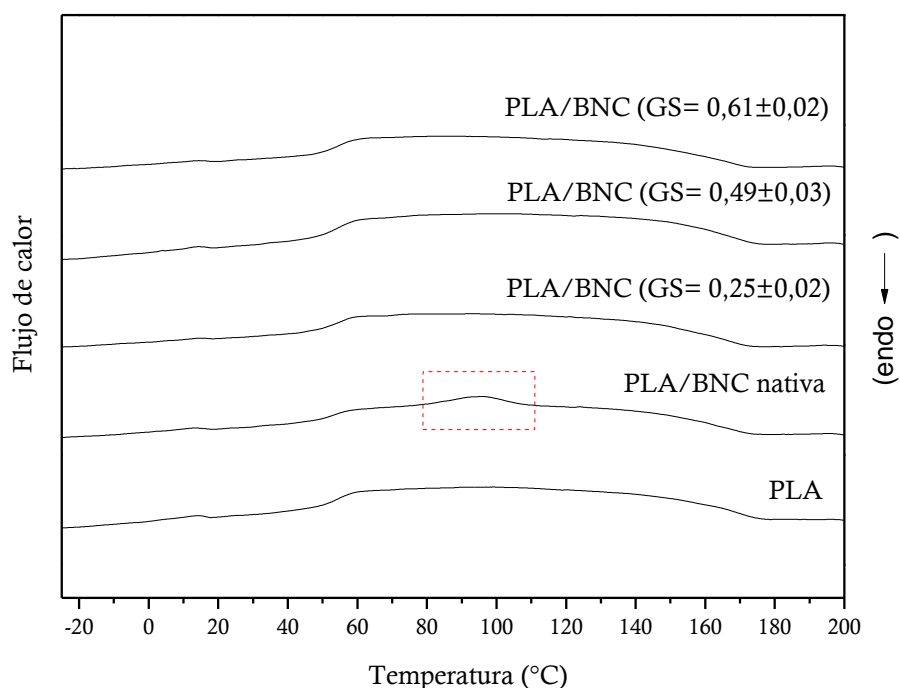
**Figura 6.4** Termogramas del primer calentamiento del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas ( $GS = 0,25 \pm 0,02$ ;  $0,49 \pm 0,03$ ;  $0,61 \pm 0,02$ ).



Al igual que la matriz de PLA, todos los nanocompuestos presentaron un único pico endotérmico ( $T_m$ ) centrado entre 151 y 152°C, dependiendo de la muestra, correspondiente a la fusión de la fase cristalina del PLA presente en los compuestos (**Tabla 6.1**). A partir de los valores obtenidos de  $\Delta H_m$ , que en todas las muestras estuvo entre 32 y 34 J/g, se determinó el grado de cristalinidad de las películas, que estuvo entre 35 y 37%.

Estos valores indicaron que en los sistemas estudiados la presencia de las nanofibras de celulosa no tiene un efecto significativo sobre la cristalinidad del PLA en concordancia con otros datos bibliográficos (**Lee et al., 2009**).

En la **Figura 6.5** se muestran los termogramas del escaneo de enfriamiento realizado para todas las muestras (200°C → -25°C, 10°C/min).



**Figura 6.5** Termogramas del enfriamiento del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas (GS= 0,25±0,02; 0,49±0,03; 0,61±0,02).

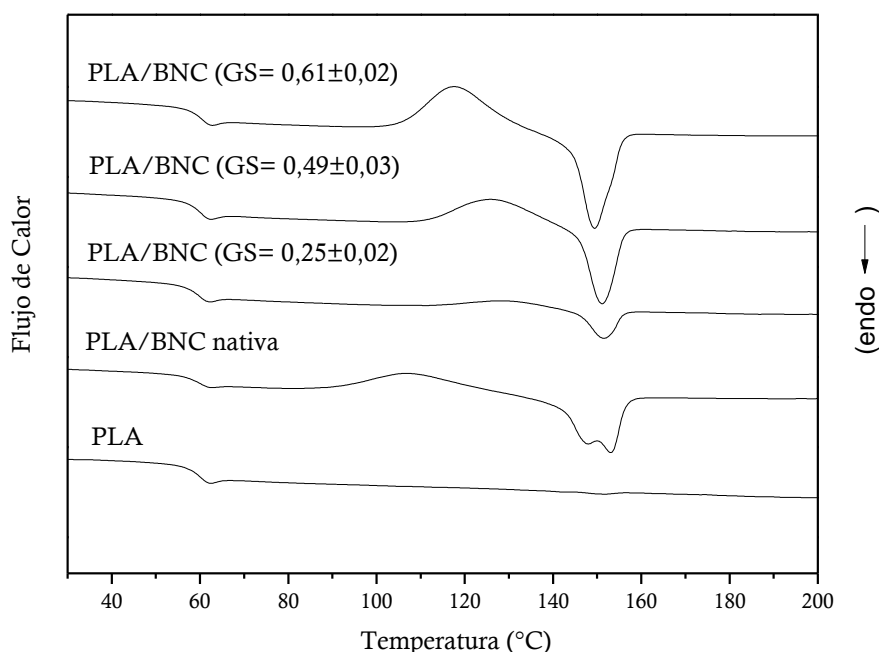


Durante el enfriamiento con la velocidad utilizada (10°C/min) no se observaron picos de cristalización ( $T_c$ ) ni para la matriz de PLA ni para los nanocompuestos con BNC acetilada con diferentes GS. Lo anterior se puede atribuir a la lenta cristalización del PLA descrita en la literatura (**Quero et al., 2010**). Por el contrario, cuando se usó como refuerzo la BNC nativa, se observó un pequeño pico de cristalización centrado en 96°C. La presencia de este nuevo pico en los nanocompuestos con BNC nativa puso de manifiesto la capacidad de la nanocelulosa sin derivatizar para inducir parcialmente la cristalización del PLA, incluso a velocidades de enfriamiento relativamente altas. Por otro lado, en todos los casos, la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) se observó a una misma temperatura de 59°C, tal como se informa en la literatura para este polímero (**Farah et al., 2016**).

	Primer calentamiento			Enfriamiento			Segundo calentamiento			
Muestra	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	X (%)	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_{cc}$ (°C)	$\Delta H_{cc}$ (J/g)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)
PLA	151	32	35	59	-		-	-	-	-
PLA/BNC nativa	151	34	36	59	96	5.4	107	14	149 y 153	21
PLA/BNC (GS= 0,25±0,02)	151	33	36	59	-		129	5	152	6
PLA/BNC (GS= 0,49±0,03)	152	34	37	59	-		127	16	151	17
PLA/BC (GS= 0,61±0,02)	152	34	37	59	-		117	23	150	25

**Tabla 6.1** Propiedades térmicas del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas (GS= 0,25±0,02; 0,49±0,03; 0,61±0,02).

Finalmente, durante el segundo escaneo de calentamiento ( $-25^{\circ}\text{C} \rightarrow 200^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) (**Figura 6.6**) en todos los termogramas se observó la  $T_g$  a la temperatura esperada. Por otro lado, para la matriz de PLA, no se observó ningún pico exotérmico de cristalización en frío ni su correspondiente fusión. Por el contrario, en el termograma del nanocompuesto con BNC nativa, se observó un pico exotérmico de cristalización y un doble pico endotérmico de fusión (cuyo origen se discutirá más adelante en detalle), que confirmaron el efecto nucleante de la BNC nativa sobre la matriz de PLA como ha sido informado previamente por otros autores (**Ganß, Nechwatal, Frankenfeld, & Schlufte, 2012; Lee et al., 2009; Ludde, Pivsa-Art, Sirisansaneeyakul, & Pechyen, 2014; Panaitescu et al., 2017**). Por otra parte, durante el segundo calentamiento el nanocompuesto con la BNC con menor grado de acetilación ( $\text{GS}=0,25 \pm 0,02$ ), mostró picos de cristalización y fusión mucho menos intensos y a una mayor temperatura de cristalización en frío. La magnitud de ambos picos se incrementó con el nivel de acetilación conferido a la BNC. Además, a medida que se usaron refuerzos con mayor GS se observaron menores temperaturas de cristalización de los compuestos, aunque siempre superiores a las de la BNC nativa. Evidentemente, la naturaleza química de la superficie de la BNC, y por ende su dispersabilidad y compatibilidad relativa con la matriz hidrofóbica de PLA, jugó un rol fundamental en controlar la posibilidad de cristalización del poliéster. Lo anterior es, probablemente, una consecuencia de fenómenos contrapuestos asociados a i) la difusión y plegado de las cadenas de PLA que se ven parcialmente impedidos como consecuencia de la compatibilización (**Cyras, D' Amico, & Manfredi, 2017**), y ii) los efectos de nucleación inducidos por la dispersión relativa de los refuerzos.



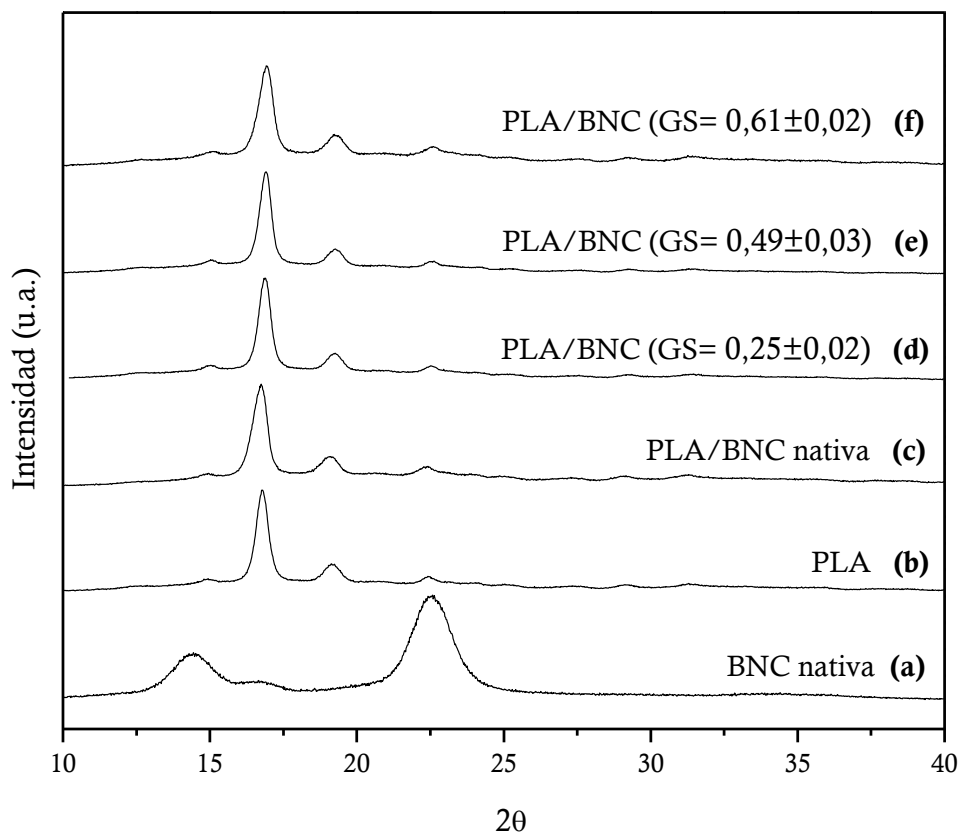
**Figura 6.6** Termogramas del segundo calentamiento del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas (GS=  $0,25\pm0,02$ ;  $0,49\pm0,03$ ;  $0,61\pm0,02$ ).

#### 6.2.1.2.4 Estudio de cristalinidad por DRX

Los patrones de difracción de rayos X de la matriz de PLA y los diferentes nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas se presentan en la **Figura 6.7**. El difractograma del PLA (**Figura 6.7b**) mostró dos picos de mayor intensidad a valores de  $2\theta = 16,8^\circ$  y  $19,2^\circ$  en concordancia con los difractogramas de otros PLA semicristalinos (Dai, Cao, & Wang, 2016; Teixeira et al., 2014). También se observaron picos de menor intensidad en  $2\theta = 15,0^\circ$  y  $22,4^\circ$ .

Con el fin de identificar posibles contribuciones cristalinas en los nanocompuestos provenientes de la BNC, se presenta en la misma Figura el patrón de difracción de rayos X de la BNC nativa (**Figura 6.7a**). Como ya se ha detallado en profundidad en los Capítulos previos de esta Tesis, tanto la nanocelulosa nativa como las acetiladas presentan picos de difracción típicos de la celulosa I centrados en  $2\theta = 14,4^\circ$  (101),  $16,7^\circ$  (10-1),  $20,1^\circ$  (021),  $22,5^\circ$  (002), y  $34,4^\circ$  (040) (Johnson Ford et al., 2010). Como se puede observar en la **Figura 6.7**, en los difractogramas de los nanocompuestos no se observó una contribución significativa de los picos

característicos de la celulosa (**Figura 6.7 c-f**). Estos resultados difieren de los informados por otros autores, en los cuales la naturaleza más amorfa del PLA que utilizaron permitió observar la aparición de los picos cristalinos de la BNC, especialmente cuando se utilizaron altos porcentajes de refuerzo (**Frone, Berlioz, Chailan, & Panaitescu, 2013; Xu, Wu, & Wang, 2017**).



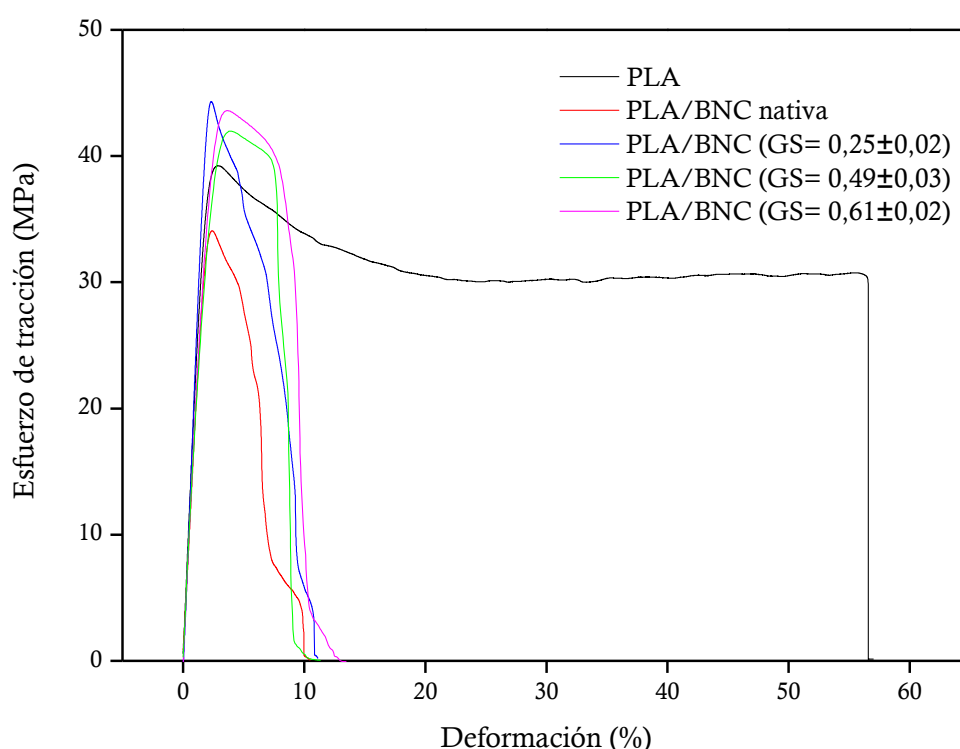
**Figura 6.7** Patrones de DRX de (a) BNC nativa, (b) PLA, (c) PLA/BNC nativa, (d) PLA/BNC acetilada (GS  $0,25 \pm 0,02$ ), (e) PLA/BNC acetilada (GS  $0,49 \pm 0,03$ ), (f) PLA/BNC acetilada (GS  $0,61 \pm 0,02$ ).

Con respecto al grado de cristalinidad de las películas y, de acuerdo con los resultados previos de calorimetría, ni la BNC nativa ni la acetilada tuvieron efectos significativos sobre la cristalinidad de los nanocompuestos, con valores en un intervalo de 36–41% para todas las muestras. Además, al comparar los patrones de DRX de los nanocompuestos y el PLA, no se evidenciaron cambios en los picos o en

sus posiciones que pudieran suponer cambios en la estructura cristalina del PLA asociados con la incorporación del refuerzo.

#### 6.2.1.2.5 Propiedades mecánicas por tracción uniaxial

El estudio de las propiedades mecánicas de los materiales se llevó a cabo mediante ensayos de tracción uniaxial. Las curvas típicas de tensión-deformación para todas las películas (PLA y sus nanocompuestos) se resumen en la **Figura 6.8**.



**Figura 6.8** Curvas de esfuerzo de tracción vs deformación del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas (GS= 0,25±0,02; 0,49±0,03; 0,61±0,02).

Como se observa en la Figura, la matriz de PLA presentó un comportamiento completamente dúctil, caracterizado por la presencia de un punto de fluencia, seguido de un ablandamiento por deformación y una meseta significativa antes de la fractura final (**Young & Lovell, 1991**). Por otra parte, los nanocompuestos

mostraron un comportamiento más frágil y fallaron después de una deformación plástica limitada.

De las curvas presentadas en la **Figura 6.8** se obtuvieron los diferentes parámetros de tracción utilizados para caracterizar mecánicamente todos los materiales (módulo de Young, resistencia a la tracción, porcentaje de deformación), los cuales se presentan en la **Tabla 6.2**, con sus desviaciones estándar.

Muestras	Módulo de Young (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Deformación (%)
PLA	2221±174	40±1	51±17
PLA/BNC nativa	1932±124	35±2	12±7
PLA/BNC (GS= 0,25±0,02)	2480±139	45±4	11±4
PLA/BNC (GS= 0,49±0,03)	2323±135	40±2	10±5
PLA/BNC (GS= 0,61±0,02)	2542±133	46±1	9±4

**Tabla 6.2** Parámetros de tracción del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas (GS= 0,25±0,02; 0,49±0,03; 0,61±0,02).

A pesar de la reconocida resistencia y rigidez de la BNC nativa, su incorporación en la matriz de PLA fue perjudicial para el comportamiento mecánico del material, lo cual se atribuyó a la agregación de las nanofibras de BNC nativa dentro de la matriz hidrofóbica, que restringió la adhesión interfacial y transferencia de carga apropiadas.

Por otro lado, la mejor dispersión e interacción de la BNC acetilada con la matriz hidrofóbica de PLA condujo a un ligero mejoramiento de la rigidez (módulo de Young) y de la resistencia a la tracción. Estos mejoramientos son similares a los informados por otros autores para nanocompuestos de PLA/BNC preparados con el mismo porcentaje de refuerzo (Lee et al., 2009; Lee & Bismarck, 2016; Panaitescu, Frone, & Chiulan, 2016). En cuanto a la ductilidad de los nanocompuestos, caracterizada por la deformación a la rotura, se vio que era significativamente menor respecto a la matriz pura de PLA como consecuencia de la incorporación de un relleno más rígido en la matriz dúctil (Pérez, Famá, Pardo, Abad, & Bernal, 2012).

Sin embargo, y en concordancia con los resultados previos hasta aquí mostrados, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de tracción al utilizar como refuerzo BNC acetilada con los diferentes GS conferidos (**Tabla 6.2**).

Una vez analizado el efecto de la modificación del refuerzo en las propiedades de los compuestos (para un contenido fijo de BNC), en la siguiente Sección se evalúa el efecto de aumentar el porcentaje de refuerzo para un GS definido.

## **6.2.2 Nanocompuestos de PLA con diferente porcentaje de BNC acetilada**

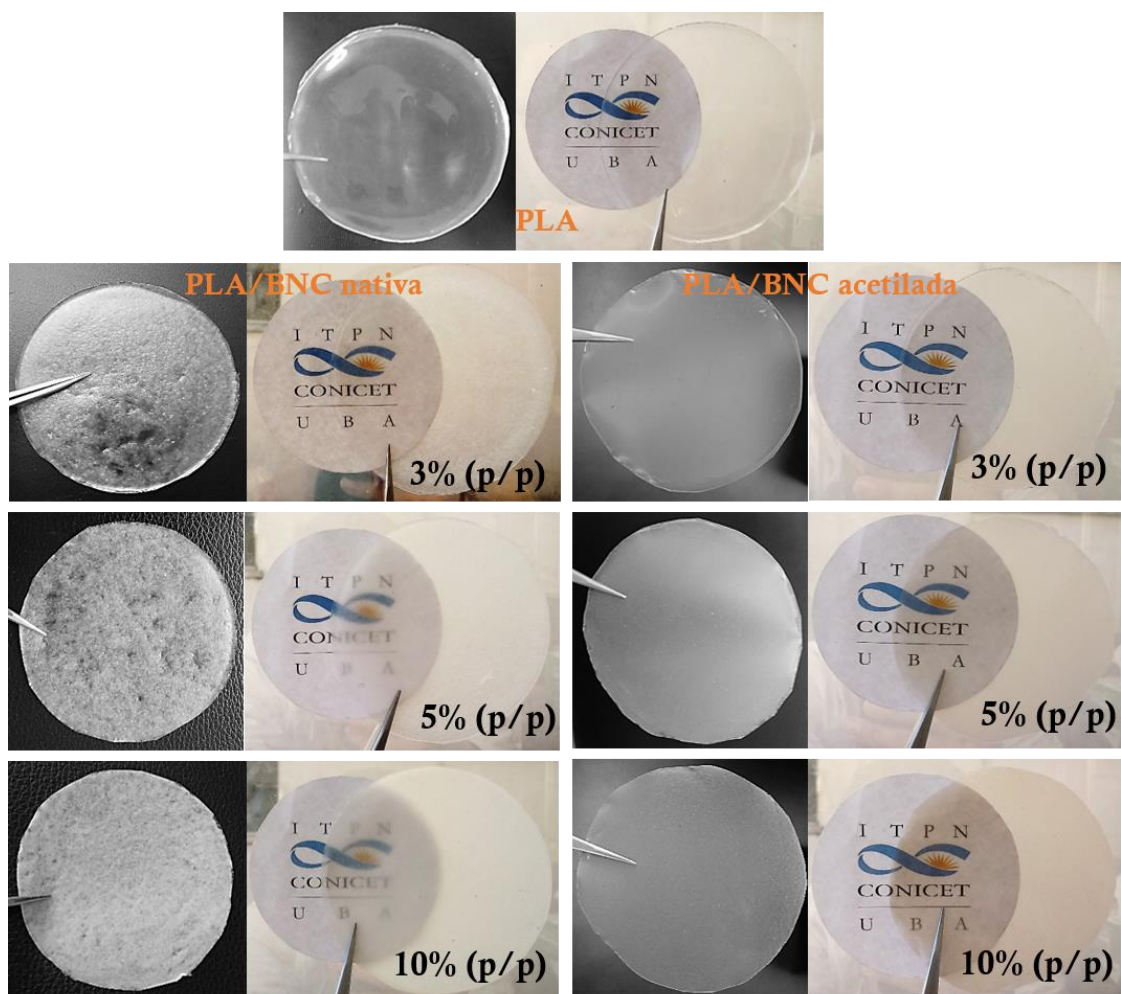
### **6.2.2.1 Obtención de los nanocompuestos**

Para el estudio de la influencia del porcentaje de refuerzo sobre las propiedades de los nanocompuestos, las películas se prepararon en las condiciones experimentales descritas anteriormente. Para este análisis se utilizó BNC acetilada con un GS intermedio entre los utilizados en la Sección anterior ( $0,49 \pm 0,03$ ) y se definieron porcentajes de refuerzo de 3, 5 y 10% (p/p).

### **6.2.2.2 Caracterización de los nanocompuestos**

#### **6.2.2.2.1 Análisis de transparencia por UV-Visible**

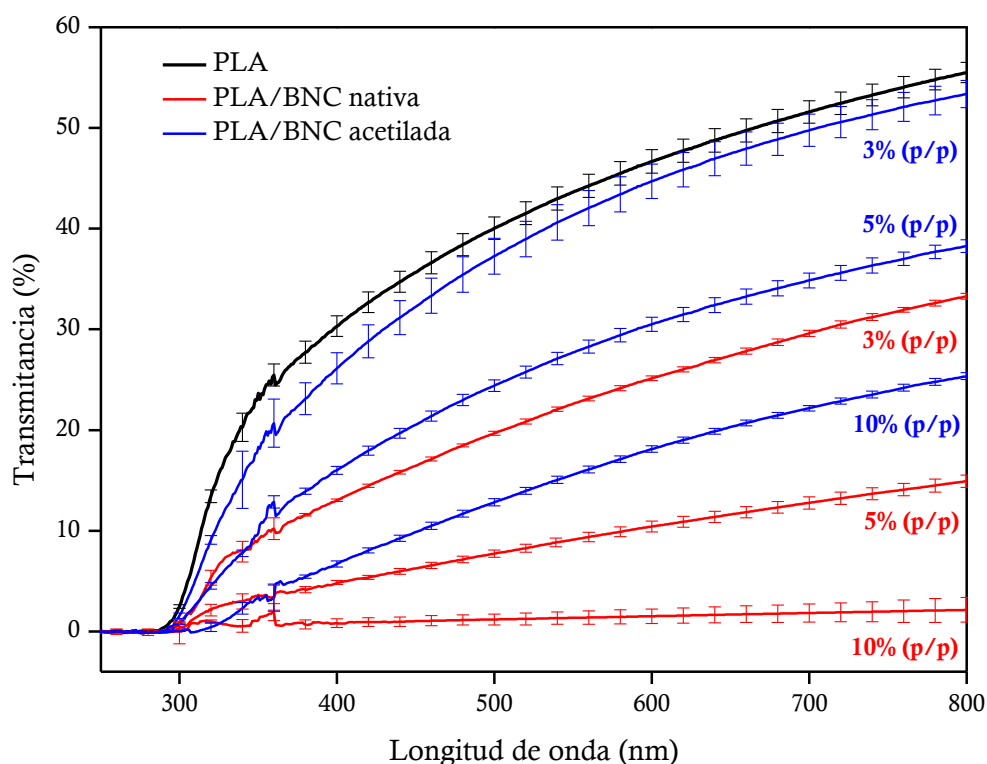
Análogamente al estudio realizado en la Sección anterior, se realizó una inspección visual de las películas y se adquirieron sus espectros UV-visible para evaluar la dispersión de los refuerzos en la matriz. La transparencia de las películas está relacionada con la eficacia de la dispersión de los refuerzos en la matriz de PLA, dado que si el refuerzo no está en la nanoescala (nanofibras agregadas), la transmitancia a la luz del material se reduce debido a un aumento en la dispersión de la luz (**Kim et al., 2009**). Al igual que en la Sección anterior, la acetilación de la nanocelulosa permitió obtener películas mucho más transparentes que en el caso de la celulosa nativa. Adicionalmente, de la **Figura 6.9** se desprende que la adición de mayores porcentajes de BNC nativa conlleva a la reducción gradual de la transparencia de las películas.



**Figura 6.9** Fotografías de las películas del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada ( $GS=0,49\pm0,03$ ).

Estas observaciones cualitativas son consistentes con los espectros UV-visible de las muestras analizadas (**Figura 6.10**) que ilustran la progresiva reducción de la transmitancia en todo el rango de longitud de onda analizado con el aumento del porcentaje de BNC nativa en las películas. Si bien se observó un fenómeno similar para los compuestos reforzados con BNC acetilada, en este último caso fue posible incorporar una mayor proporción de refuerzo con una disminución equivalente en la transparencia.



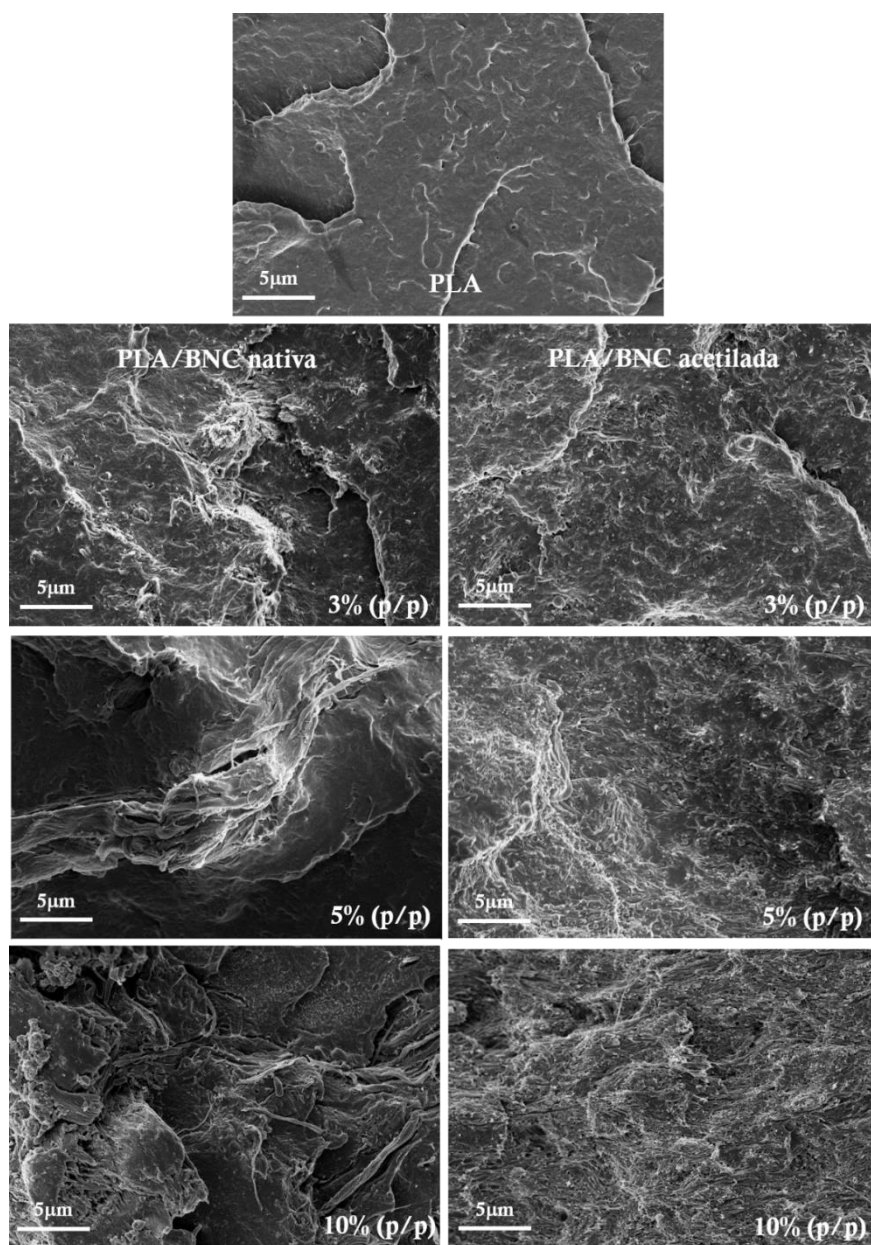


**Figura 6.10** Espectros UV-visible del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

#### 6.2.2.2.2 Estudio morfológico por FESEM

Las micrografías SEM de la superficie de fractura de los distintos nanocompuestos se muestran en la **Figura 6.11**. Independientemente del contenido de relleno, las imágenes indican que las películas que contienen las nanofibras acetiladas presentaron superficies de fractura más uniformes y con menor evidencia de agregación de las nanocintas de celulosa que en el caso de las películas con BNC nativa. En este último caso, en las superficies de fractura se pudo observar la presencia de huecos alrededor de los agregados de mayor tamaño, así como numerosos agujeros en la matriz de PLA. Observaciones similares fueron informadas por Mathew y colaboradores para matrices de PLA reforzadas con celulosa microcristalina sin derivatizar (Mathew, A. P., Oksman, K., & Sain, M., 2005). La morfología más homogénea observada en los nanocompuestos con BNC acetilada (es decir, la mejor dispersión del refuerzo) pone una vez más en evidencia la mayor compatibilidad entre refuerzo y matriz inducida por la acetilación de las

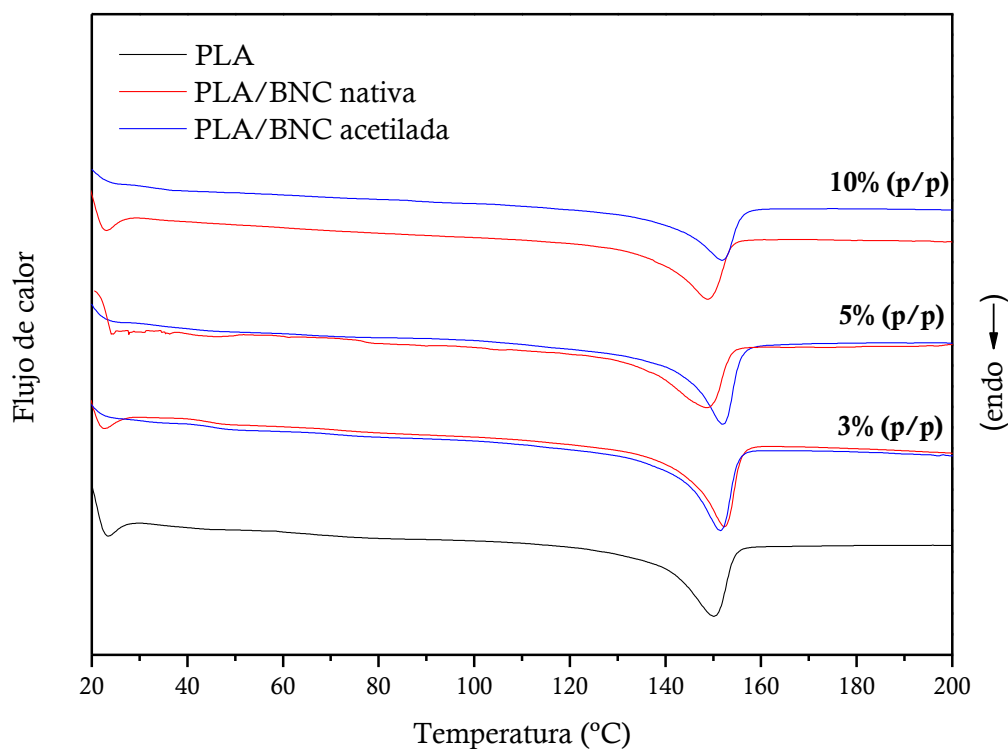
nanofibras. Resultados similares fueron informados por otros autores para sistemas en los que la nanocelulosa usada como refuerzo del PLA fue previamente hidrofobizada (Tomé et al., 2011).



**Figura 6.11** Micrografías de las superficies crio fracturadas del PLA, y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

### 6.2.2.2.3 Propiedades térmicas por DSC

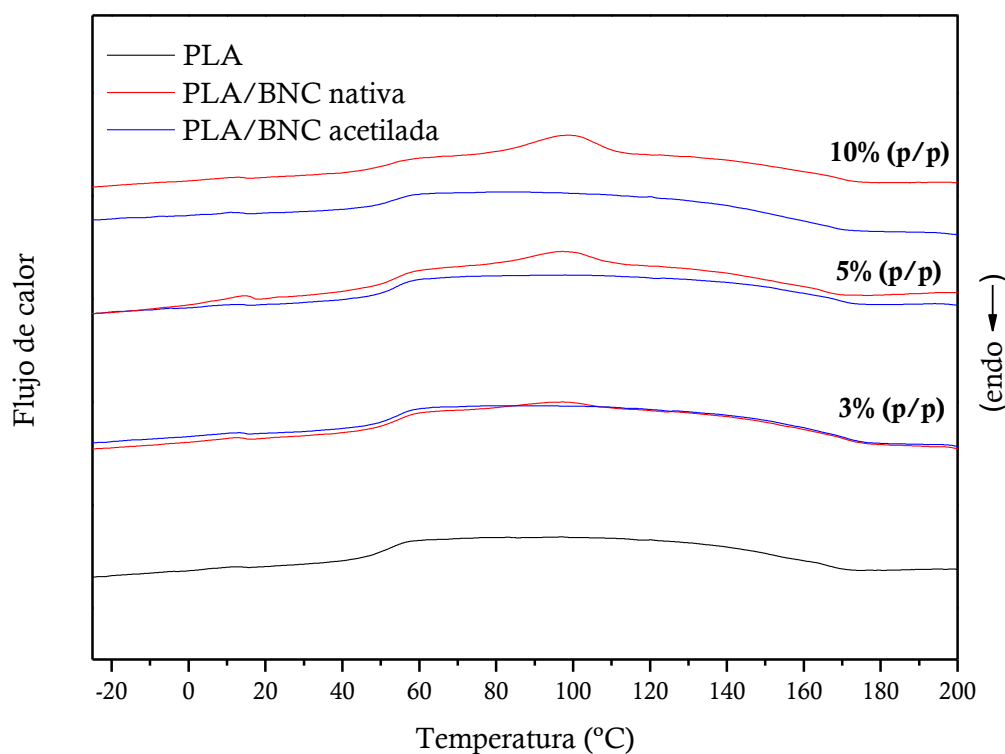
En la **Figura 6.12** se presentan las curvas del primer calentamiento para el PLA y los nanocompuestos preparados con los diferentes porcentajes de BNC nativa y acetilada (3, 5, 10% (p/p)). En todos los casos los nanocompuestos exhibieron un comportamiento térmico similar al del PLA, independientemente del porcentaje de refuerzo incorporado y de si el mismo estaba derivatizado o no.



**Figura 6.12** Termogramas del primer calentamiento del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

La  $T_m$  en todas las muestras se observó en el rango de 149 a 152°C , y los grados de cristalinidad calculados a partir de las entalpías de fusión estuvieron entre 32 y 36%. Además, se vió que el grado de cristalinidad del PLA no se vio afectado por los refuerzos, ni siquiera cuando se utilizaron altos porcentajes de nanofibras (10% (p/p)) (**Tabla 6.3**).

Las curvas de enfriamiento se reúnen en la **Figura 6.13**. Como se mencionó anteriormente, la velocidad de enfriamiento utilizada no fue lo suficientemente lenta para inducir la cristalización del PLA (**Quero et al., 2010**). El mismo resultado se obtuvo para los nanocompuestos reforzados con BNC acetilada, independientemente del porcentaje de refuerzo utilizado. Por el contrario, los nanocompuestos preparados con BNC nativa, que presentaron cantidades importantes de aglomerados, mostraron un pico de cristalización durante el enfriamiento centrado a 96°C. En este último caso, se observó un incremento paulatino de la entalpía de cristalización en función del porcentaje de BNC nativa utilizado (**Tabla 6.3**). En todos los casos la  $T_g$  se observó entre 58 y 59°C.

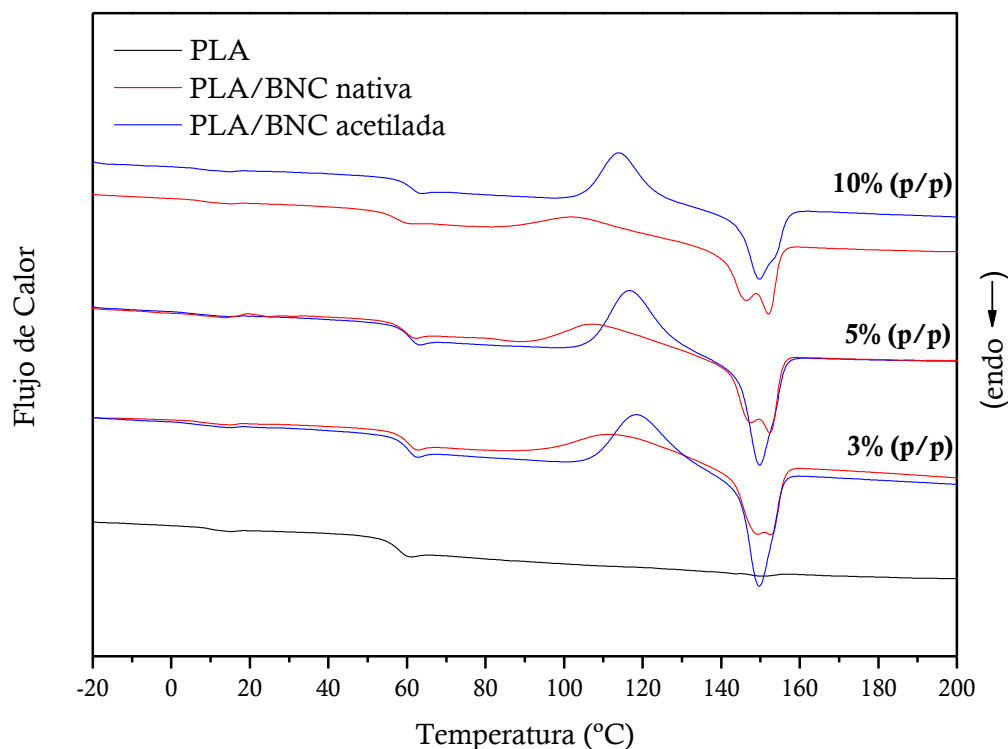


**Figura 6.13** Termogramas de enfriamiento del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

Muestra	Primer calentamiento			Enfriamiento			Segundo calentamiento			
	T <sub>m</sub>	ΔH <sub>m</sub>	X	T <sub>g</sub>	T <sub>c</sub>	ΔH <sub>c</sub>	T <sub>cc</sub>	ΔH <sub>cc</sub>	T <sub>m</sub>	ΔH <sub>m</sub>
	(°C)	(J/g)	(%)	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(J/g)	(°C)	(J/g)
PLA	150	30	32	58	-		-		-	
PLA/BNC nativa 3% (p/p)	152	31	34	59	96	3	111	16	149 y 153	20
PLA/BNC nativa 5% (p/p)	149	32	36	59	96	6	108	13	147 y 152	23
PLA/BNC nativa 10% (p/p)	149	29	35	58	98	9	102	10	147 y 152	22
PLA/BNC acetilada 3% (p/p)	152	32	35	59	-	-	118	22	150	24
PLA/BNC acetilada 5% (p/p)	152	30	35	59	-	-	117	23	150	24
PLA /BNC acetilada 10% (p/p)	152	29	34	58	-	-	114	16	150	19

**Tabla 6.3** Propiedades térmicas del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

Por otra parte, en el segundo calentamiento se observó que la adición de nanofibrillas de BNC, tanto nativas como derivatizadas, tuvieron un profundo impacto en la cristalización del PLA (**Figura 6.14**). Mientras que para la película de PLA se observó únicamente la T<sub>g</sub> del polímero, para los nanocompuestos se observó también la presencia de un pico de cristalización seguido del pico de fusión de los cristales, sugiriendo nuevamente el rol de los refuerzos como agentes nucleantes.

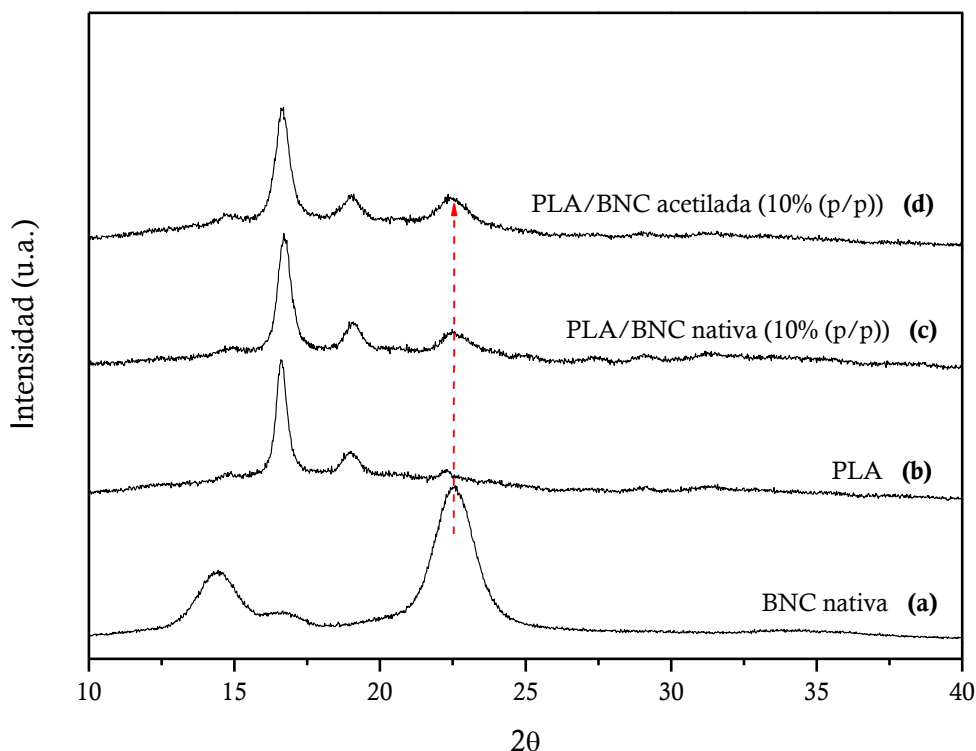


**Figura 6.14** Termogramas del segundo calentamiento del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

En el caso de los compuestos con BNC nativa la cristalización en frío se dio a menores temperaturas y con menor  $\Delta H_{cc}$  que en el caso sus contrapartes acetiladas. Además, otra diferencia significativa en los termogramas como consecuencia de la acetilación de la BNC, es el doble pico de fusión que muestran los compuestos con la BNC nativa, en contraposición con el pico único de fusión de los compuestos con la BNC derivatizada. Este comportamiento con un doble pico de fusión ha sido previamente atribuido a la presencia de cristales pequeños e imperfectos (**Arrieta et al., 2014; Bitinis et al., 2013; Fortunati et al., 2015**). Estos cristales imperfectos se transformarían luego en cristales más estables por fundido y recrystalización a bajas temperaturas de calentamiento. La existencia de ese doble pico únicamente en los nanocompuestos con BNC nativa es una prueba más de la mayor habilidad para recrystalizar del PLA derivada de la mayor movilidad molecular del polímero en presencia de un relleno incompatible. Por el contrario, las mayores temperaturas de cristalización en frío y la fusión en una sola etapa observada en los nanocompuestos PLA/BNC acetilada puede atribuirse a la movilidad restringida de las cadenas de polímero inducida por la mayor compatibilidad entre el PLA y la BNC acetilada.

#### 6.2.2.2.4 Estudio de cristalinidad por DRX

Los patrones de DRX de la matriz de PLA y los nanocompuestos con un 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada se presentan en la **Figura 6.15**.



**Figura 6.15** Patrones de DRX para (a) BNC nativa, (b) PLA, (c) PLA/BNC nativa 10% (p/p), (d) PLA/BNC acetilada 10% (p/p).

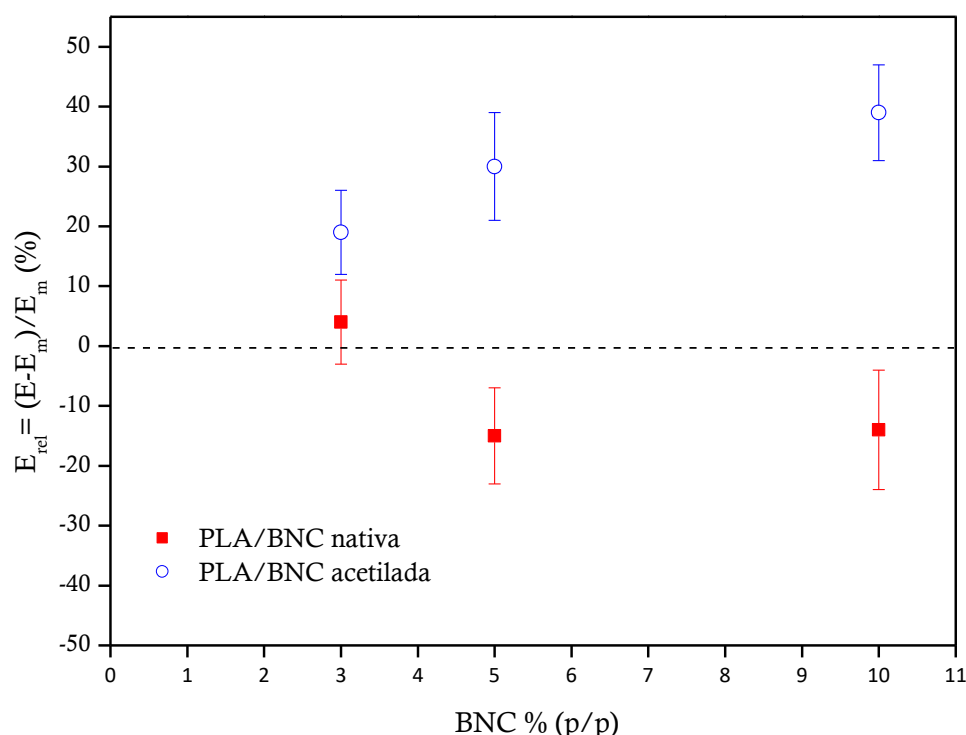
Para este contenido de refuerzo fue posible observar en los difractogramas la presencia de los picos típicos de la celulosa. En este sentido, además de los picos cristalinos centrados en  $2\theta = 16,8^\circ$  y el pico menos intenso en  $2\theta = 19,2^\circ$  típicos de un PLA semicristalino (Dai et al., 2013; Tábi, Sajó, Szabó, Luyt, & Kovács, 2010; Wang, Funari, & Mano, 2006), se observa en los difractogramas presentados en la **Figura 6.15c-d** la presencia de un pico cristalino en  $2\theta = 22,5^\circ$  asociado con el plano (002) de la celulosa bacteriana. Si bien el PLA tiene un pico menor centrado en  $2\theta = 22,4^\circ$ , el marcado incremento de su intensidad en los nanocompuestos con 10% (p/p) de BNC nativa o acetilada es claro. Debido al solapamiento de las señales del

PLA utilizado en esta Tesis y de la celulosa, los picos típicos de la BNC no pudieron ser observados cuando los contenidos de refuerzo fueron del 3% (**Figura 6.7**).

A partir de los datos de rayos X se calculó también la cristalinidad de las películas que estuvo en torno al 37- 39%. Estos valores de grado de cristalinidad son congruentes con los valores obtenidos a partir del primer escaneo de calentamiento en el DSC, que estuvieron en el rango de 32 a 36 % para las mismas muestras.

#### 6.2.2.2.5 Propiedades mecánicas por tracción uniaxial

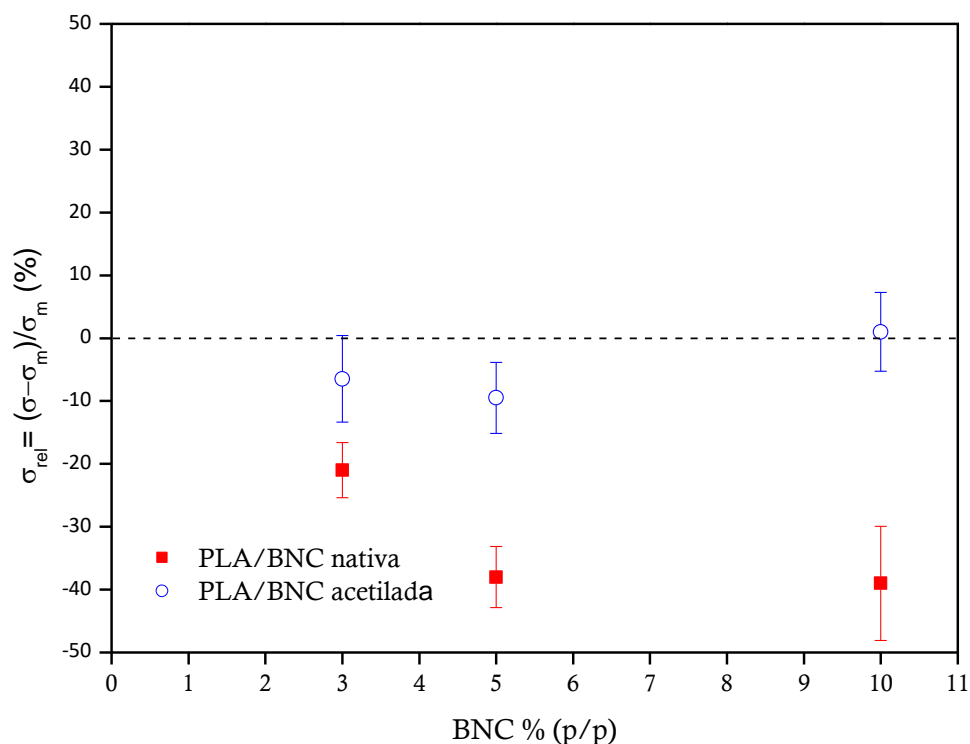
En lo que refiere a las propiedades mecánicas de los materiales compuestos preparados en este Capítulo, en el ensayo de tracción uniaxial la película de PLA mostró un comportamiento dúctil; mientras que todos los nanocompuestos resultaron mucho más frágiles, en concordancia con las observaciones previas (**Sección 6.2.1.2.5**). Los valores de los parámetros de tracción se presentan en las **Figuras 6.16 a 6.18** como valores relativos respecto de la matriz de PLA.



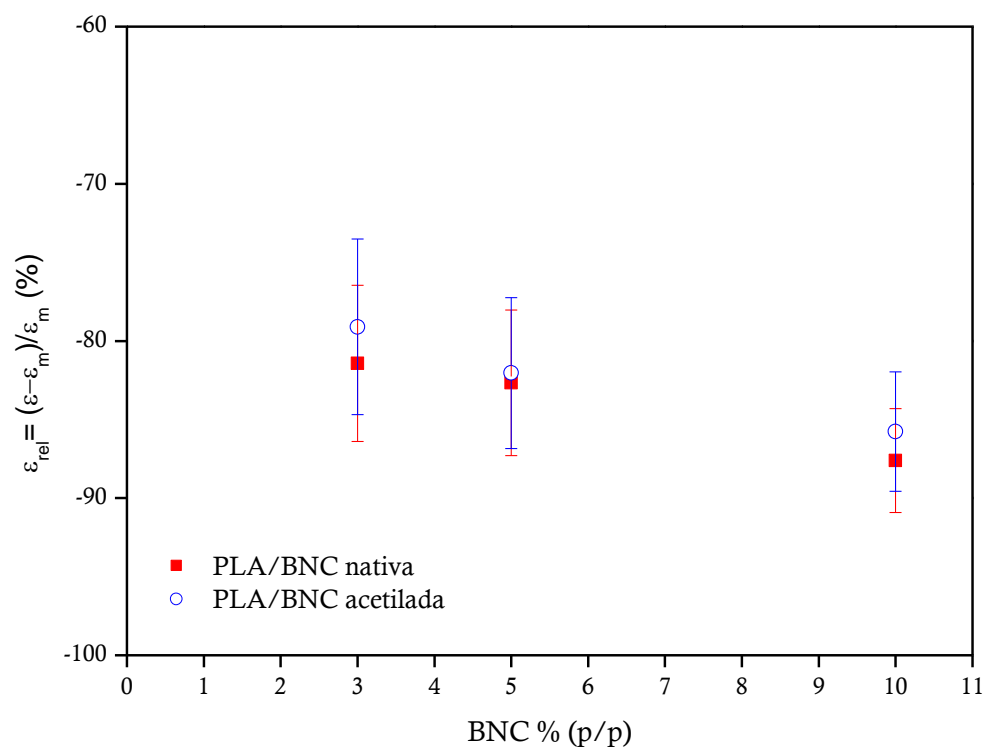
**Figura 6.16** Valores de módulo de Young de los nanocompuestos de PLA/BNC con 3, 5 y 10 % (p/p) de BNC nativa y acetilada. (Valores relativizados respecto de la matriz pura de PLA ( $E_m$ )).



Como se puede observar en estas Figuras, e independientemente del contenido de relleno, la incorporación de la BNC nativa en la matriz de PLA conllevó a una reducción en la rigidez y en la resistencia de los compuestos como resultado de la agregación y la dispersión deficiente de las nanocintas hidrofílicas de celulosa en la matriz de PLA de mucha menor polaridad. Además, se infiere que la pobre adhesión interfacial entre los componentes del compuesto redujo la habilidad para la transferencia de esfuerzos de la matriz al refuerzo, limitando así la resistencia en tracción de los nanocompuestos (**Oksman, Skrifvars, Sellin, & 2003**).



**Figura 6.17** Valores de resistencia a la tracción de los nanocompuestos de PLA/BNC con 3, 5 y 10 % (p/p) de BNC nativa y acetilada. (Valores relativizados respecto de la matriz pura de PLA ( $\sigma_m$ )).



**Figura 6.18** Valores de deformación de los nanocompuestos de PLA/BNC con 3, 5 y 10 % (p/p) de BNC nativa y acetilada. (Valores relativizados respecto de la matriz pura de PLA ( $\epsilon_m$ )).

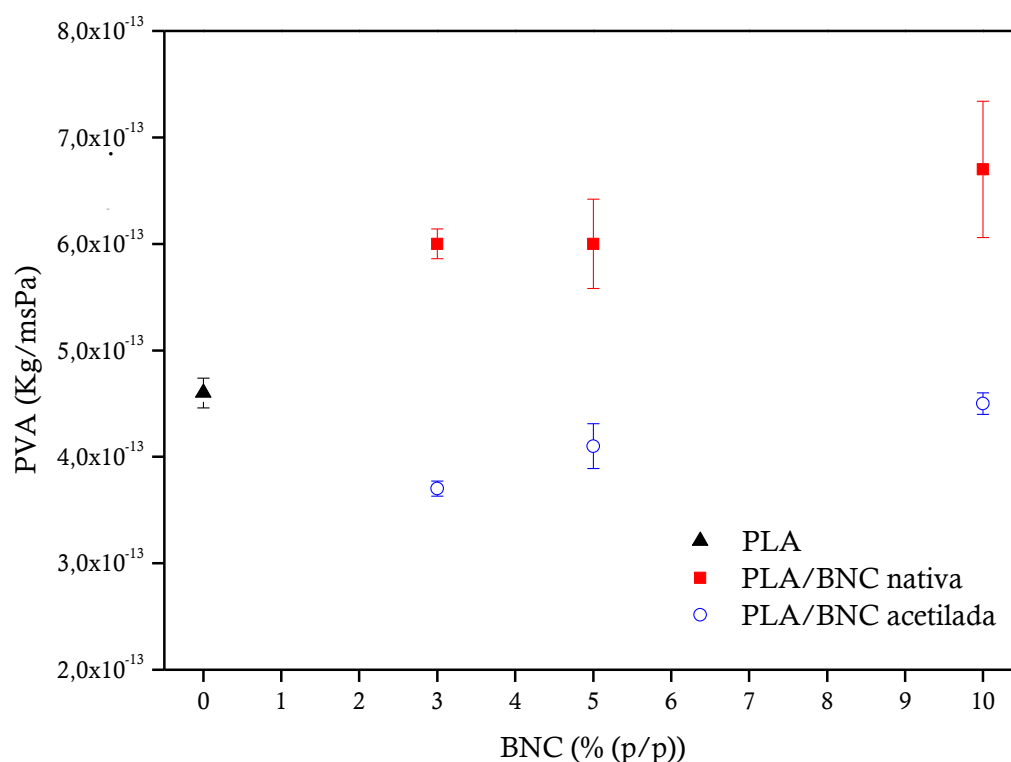
Por el contrario, la acetilación de la BNC se tradujo en una significativa mejoría en la dispersión de las nanofibras y en la interacción matriz/relleno. Como resultado, la rigidez de las películas se incrementó en forma notable, mientras que se conservó la resistencia original del PLA.

Con el aumento de la carga de BNC acetilada en los compuestos se observó un progresivo aumento en la rigidez de los materiales, sugiriendo que incluso para el mayor contenido de refuerzo utilizado (10% (p/p)) la BNC acetilada quedó bien dispersa en la matriz de PLA.

Por otro lado, e independientemente de la modificación de la BNC y su contenido en las películas, la ductilidad de los nanocompuestos se vio significativamente reducida con respecto a la matriz de PLA. Este comportamiento está asociado a la introducción en una matriz dúctil como el PLA de un relleno rígido (Pérez et al., 2012).

#### 6.2.2.2.6 Análisis de permeabilidad al vapor de agua

Los resultados obtenidos de las mediciones de permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas del PLA puro y de sus nanocompuestos con un 3, 5 y 10 % (p/p) de BNC nativa y acetilada, se presentan comparativamente en la **Figura 6.19** y en la **Tabla 6.4** . Bajo las condiciones del ensayo (**Sección 2.5.14**), para la película de PLA se obtuvo un valor de PVA de  $4,6 \times 10^{-13} \pm 1,4 \times 10^{-14}$  (Kg/msPa). Los resultados del ensayo de permeabilidad son muy susceptibles a las condiciones en las que el ensayo se realizó. Este hecho, sumado a la variedad de ácidos polilácticos disponibles en el mercado, trae como consecuencia que en la bibliografía se encuentren informados valores bastante disímiles para la permeabilidad al vapor de agua del PLA (**Abdulkhani, Hosseinzadeh, Ashori, Dadashi, & Takzare, 2014; Ludde et al., 2014**)



**Figura 6.19** Permeabilidad al vapor de agua del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

No obstante, el dato de interés del ensayo es la comparación de los valores de PVA del PLA puro con los de los compuestos de PLA/BNC y PLA/BNC acetilada, y esa comparación es válida dada que los tres ensayos se realizaron en idénticas condiciones

Al comparar los valores de PVA de los nanocompuestos con BNC nativa y la matriz de PLA se observó que, para el sistema de PLA/BNC nativa, los valores de PVA fueron superiores al del PLA para todos los porcentajes de refuerzo ensayados, con cambios en el orden de los informados en la bibliografía **(Tabla 6.4) (Abdulkhani et al., 2014; Almasi et al., 2015)**. Este resultado se puede explicar en base a la hidrofiliidad de la BNC nativa que redundo en una muy pobre adhesión interfacial que promueve la transmisión de vapor a través de la película.

Muestra	(PVA) (Kg /m s Pa)
PLA	$4,6 \times 10^{-13} \pm 1,4 \times 10^{-14}$
PLA/BNC nativa 3% (p/p)	$6,0 \times 10^{-13} \pm 1,4 \times 10^{-14}$
PLA/BNC nativa 5% (p/p)	$6,0 \times 10^{-13} \pm 4,2 \times 10^{-14}$
PLA/BNC nativa 10% (p/p)	$6,7 \times 10^{-13} \pm 6,4 \times 10^{-14}$
PLA/BNC acetilada 3% (p/p)	$3,7 \times 10^{-13} \pm 7,1 \times 10^{-15}$
PLA/BNC acetilada 5% (p/p)	$4,2 \times 10^{-13} \pm 2,1 \times 10^{-14}$
PLA/BNC acetilada 10% (p/p)	$4,5 \times 10^{-13} \pm 1,0 \times 10^{-14}$

**Tabla 6.4** Permeabilidad al vapor de agua obtenidos para el PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10 % (p/p) de BNC nativa y acetilada.

Por el contrario, para los nanocompuestos de PLA/BNC acetilada con un porcentaje de refuerzo del 3% (p/p) los valores de PVA disminuyeron respecto al valor obtenido para la matriz de PLA. Este resultado se podría atribuir a una apropiada dispersión del refuerzo que genera un camino tortuoso para las moléculas de agua **(Figura 6.19, Tabla 6.4)**. Sin embargo, a porcentajes de refuerzo mayores o

iguales al 5 % el valor de PVA fue similar al de la matriz pura. En función de los datos bibliográficos, lo anterior podría explicarse en términos de cierto grado de agregación que podría tener lugar al aumentar el contenido de refuerzo lo que redundaría en una menor dificultad de las moléculas de agua para atravesar la película (Almasi et al., 2015; Song, Xiao, & Zhao, 2014).

Por último, el análisis conjunto de todos los resultados deja nuevamente en evidencia la mejor dispersión del refuerzo en la matriz como consecuencia de su hidrofobización.

### 6.3 Conclusiones del Capítulo 6

En el presente Capítulo se resumieron los resultados de la preparación de materiales compuestos de matriz de PLA utilizando BNC nativa y acetilada como relleno. Los estudios realizados se enmarcaron en el objetivo final de esta Tesis, que se centró en evaluar si la acetilación de las nanocelulosas por la ruta no convencional implementada efectivamente resultaba eficaz para mejorar la compatibilidad entre el PLA y las nanofibras de celulosa. Con este fin, se prepararon por casting películas compuestas en las que se evaluó i) el efecto del GS de la nanocelulosa utilizando BNC con tres niveles de GS seleccionados, y ii) el efecto del porcentaje de refuerzo acetilado incorporado en la matriz polimérica en tres niveles elegidos. Los materiales se caracterizaron en términos de transparencia, morfología de la superficie de fractura, propiedades térmicas, cristalinidad, propiedades mecánicas en tracción y propiedades de barrera al vapor de agua.

Los resultados obtenidos pusieron en absoluta evidencia la clara mejora en la compatibilidad entre refuerzo y matriz inducida por la acetilación del refuerzo. Esta mejora en la compatibilidad se evidenció en los ensayos de transparencia y morfología, en los cuales la dispersión de la BNC acetilada en la matriz de PLA fue *siempre* (es decir, para todo GS y para todo porcentaje de refuerzo) notablemente superior a la de sus contrapartes con BNC nativa.

La mejor dispersión del refuerzo hidrofobizado se tradujo a su vez en i) una mayor dificultad para cristalizar de los compuestos PLA/BNC acetilada, ii) mayor rigidez de las películas, y iii) menor permeabilidad al vapor de agua que los compuestos PLA/BNC nativa .

En cuanto a las formulaciones evaluadas, el GS del refuerzo acetilado en el rango estudiado no resultó una variable determinante para el conjunto de propiedades analizadas en esta Tesis. Esto no implica de ningún modo que, en otras matrices poliméricas hidrofóbicas o en aplicaciones que involucren medios líquidos de baja polaridad, las diferencias en el GS conferido a la nanocelulosa puedan resultar determinantes. Por otro lado, el estudio del contenido de refuerzo indicó que el aumento de la carga de nanofibras acetiladas en el rango de 3 a 10% (p/p) redundó en incrementos graduales en la rigidez de los compuestos, sin pérdida de resistencia ni de permeabilidad.

## 6.4 Bibliografía del Capítulo 6

Abdulkhani, A., Hosseinzadeh, J., Ashori, A., Dadashi, S., Takzare, Z. Preparation and characterization of modified cellulose nanofibers reinforced polylactic acid nanocomposite. *Polymer Testing*, 2014, 35, 73–79.

Almasi, H., Ghanbarzadeh, B., Dehghannya, J., Entezami, A. A., Khosrowshahi, A. Novel nanocomposites based on fatty acid modified cellulose nanofibers/poly(lactic acid): morphological and physical properties. *Food Packaging and Shelf Life*, 2015, 5, 21–31.

Arrieta, M. P., Fortunati, E., Dominici, F., Rayón, E., López, J., Kenny, J. M. Multifunctional PLA-PHB/cellulose nanocrystal films: processing, structural and thermal properties. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 107, 16–24.

Berglund, L. A. Peijs, T. Cellulose biocomposites from bulk moldings to nanostructured systems. *MRS Bulletin*, 2010, 35, 201–207.

Bitinis, N., Verdejo, R., Bras, J., Fortunati, E., Kenny, J. M., Torre, L., López-Machado, M. A. Poly(lactic acid)/natural rubber/cellulose nanocrystal bionanocomposites part. I. Processing and morphology. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 2, 611–620.

Bogue, R. Nanocomposites: a review of technology and applications. *Assembly Automation*, 2011, 31, 106–112.

Cyras, V. P., D' Amico, D. A., Manfredi, L. B. Crystallization behavior of polymer nanocomposites. In *Crystallization in Multi-phase Polymer Systems*, Elsevier, 2017.

Dai, X., Cao, Y., Wang, X. Mon-isothermal crystallization kinetics, thermal degradation behavior and mechanical properties of poly(lactic acid)/MOF composites prepared by melt-blending methods. *RSC Advances*, 2016, 6, 71461–71471.

Farah, S., Anderson, D. G., Langer, R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications: a comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 107, 367–392.

Farah, S., Kunduru, K. R. Basu, A., Domb, A. J. Molecular weight determination of polyethylene terephthalate, In *Poly (Ethylene Terephthalate) Based Blends, Composites and Nanocomposites*, William Andrew Publishing, 2015.

Frone, A. N., Berlioz, S., Chailan, J-F., Panaitescu, D. Morphology and thermal properties of PLA-cellulose nanofibers composites. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 91, 377–384.

Fortunati, E., Luzi, F., Puglia, D., Petrucci, R., Kenny, J. M., Torre, L. Processing of PLA nanocomposites with cellulose nanocrystals extracted from *Posidonia oceanica* waste: Innovative reuse of coastal plant. *Industrial Crops and Products*, 2015, 67, 439–447.

Ganß, K., Nechwatal, A., Frankenfeld, K., Schluffer, K. Difficulties in the use of ground bacterial cellulose (BC) as reinforcement of polylactic acid (PLA) using melt-mixing and extrusion technologies. *Open Journal of Composite Materials*, 2012, 2, 97–103.

Johnson Ford, E. N., Mendon, S. K., Thames, S. F., Rawlins, J. W. X-ray diffraction of cotton treated with neutralized vegetable oil-based macromolecular crosslinkers. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 2010, 5, 10–20.

Jones, R. M. *Mechanics of Composite Materials*. Second edition, Taylor & Francis Group, 1999.

Kim, J., Montero, G., Habibi, Y., Hinestroza, J. P., Genzer, J., Argyropoulos, D. S., Rojas, O. J. Dispersion of cellulose crystallites by nonionic surfactants in a hydrophobic polymer matrix. *Polymer Engineering & Science*, 2009, 49, 2054–2061.

Lee, K-Y., Blaker, J. J., Bismarck, A. Surface functionalisation of bacterial cellulose as the route to produce green polylactide nanocomposites with improved properties. *Composite Science Technology*, 2009, 69, 2724–2733.

Lee, K-Y. Bismarck, A. Bacterial nanocellulose as reinforcement for polymer matrices, In *Bacterial Nanocellulose From Biotechnology to Bio-Economy*, Elsevier, Chenai, 2016.

Ludde, M., Pivsa-Art, S., Sirisansaneeyakul, S., Pechyen, C. Particle size of ground bacterial cellulose affecting mechanical, thermal, and moisture barrier properties of PLA/BC biocomposites. *Energy Procedia*, 2014, 56, 211–218.

Mathew, A. P., Oksman, K., Sain, M. Mechanical properties of biodegradable composites from poly lactic acid (PLA) and microcrystalline cellulose (MCC). *Journal of Applied Polymer Science*, 2005, 97, 2014–2025.

Mohantya, A. K., Misraa, M., Hinrichsen, G. Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2000, 276, 1–24.

Oksman, K., Skrifvars, M., Sellin, J-F. Natural fibres as reinforcement in polylactic acid (PLA) composites. *Composites Science and Technology*, 63, 1317-1324.

Panaitescu, D. M., Frone, A. N., Chiulan, I. Nanostructured biocomposites from aliphatic polyesters and bacterial cellulose. *Industrial Crops and Products*, 2016, 93, 251–266.

Panaitescu, D. M., Frone, A. N., Chiulan, I., Gabor, A., Spataur, C., Casarica, A. Biocomposites from polylactic acid and bacterial cellulose nanofibers obtained by mechanical treatment. *BioResources*, 2017, 12, 662–672.

Pérez, E., Famá, L., Pardo, S. G., Abad, M. J., Bernal, C. Tensile and fracture behaviour of PP/wood flour composites. *Composites Part B*, 2012, 43, 2795–2800.

Quero, F., Nogi, M., Yano, H., Abdulsalami, K., Holmes, S. M., Skakini, B. h., Eichhorn, S. J. Optimization of the mechanical performance of bacterial cellulose/poly(L-lactic) acid composites. *Journal Applied Materials and Interfaces*, 2010, 2, 321–330.

Raquez, J. M., Habibi, Y., Murariu, M., Dubois, P. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. *Progress in Polymer Science*, 2013, 38, 1504–1542.

Singh, B., Gupta, M., Verma, A. Polyester molding compounds of natural fibers and wollastonite. *Composites*, 2003, 34, 1035–1043.

Song, Z., Xiao, H., Zhao, Y. Hydrophobic-modified nanocellulose fiber/PLA biodegradable composites for lowering water vapor transmission rate (WVTR) of paper. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 111, 442–448.



Tábi, T., Sajó, I. E., Szabó, F., Luyt, A. S., Kovács, J. G. Crystalline structure of annealed polylactic acid and its relation to processing. *Express Polymer Letters*, 2010, 4, 659–668.

Teixeira, E., de Campos, A., Marconcini, J. M., Bondancia, T. J. Wood, D., Klamczynski, A., Mattoso, L. H. C., Glenn, G. M. Starch/fiber/poly(lactic acid) foam and compressed foam composites. *RSC Advances*, 2014, 4, 6616–6623.

Tingaut, P., Zimmermann, T., Lopez-Suevos, F. Synthesis and characterization of bionanocomposites with tunable properties from poly(lactic acid) and acetylated microfibrillated cellulose. *Biomacromolecules*, 2010, 11, 454–464.

Tomé, L. C., Pinto, R. J. B., Trovatti, E., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D. Neto, C. P., Gandini, A. Transparent bionanocomposites with improved properties prepared from acetylated bacterial cellulose and poly(lactic acid) through a simple approach. *Green Chemistry*, 2011, 13, 419–427.

Trifol, J., Plackett, D., Sillard, C., Hassager, O., Daugaard, A. E., Bras, J., Szabo, P. A comparison of partially acetylated nanocellulose, nanocrystalline cellulose, and nanoclay as fillers for high-performance polylactide nanocomposites *Journal Applied of Polymer Science*, 2016, 133, 43257–43268.

Wang, Y., Funari, S. S., Mano, J. F. Influence of semicrystalline morphology on the glass transition of poly(L-lactic acid). *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2006, 207, 1262–1271.

Xu, Ch., Wu, Lv., Wang, Z. Polylactide/cellulose nanocrystal composites: a comparative study on cold and melt crystallization. *Cellulose*, 2017, 24, 2163–2175.

Young, R.J. and Lovell, P.A. *Introduction to Polymers*. Chapman & Hall, London, 1991.

Zhang, X., Li, W., Ye, B., Lin, Z., Rong, J. Studies on confined crystallization behavior of nanobiocomposites consisting of acetylated bacterial cellulose and poly(lactic acid). *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 2013, 26, 346–361.



## 7. Discusión general y conclusiones

En la última década las nanofibras y nanocristales de celulosa han atraído gran atención tanto académica como industrial, lo que se plasmó recientemente en que la producción a escala comercial de nanocelulosa se convirtiera en realidad. Las aplicaciones principales de la nanocelulosa se dan en el área de ciencia de los materiales e ingeniería biomédica, donde la biocompatibilidad, la elevada área superficial y sus reconocidas propiedades mecánicas, vuelven a los sustratos nanocelulósicos candidatos ideales para numerosos usos. En este sentido, la preparación de materiales compuestos de matriz polimérica usando nanocelulosas como refuerzo es un campo en creciente desarrollo. Sin embargo, las nanocelulosas también muestran algunas desventajas que en general están asociadas a una superficie altamente hidrofílica, que promueve la absorción de agua y redundante en una pobre compatibilidad con matrices poliméricas hidrofóbicas.

Es en este contexto que se sustenta el interés por poder modular la polaridad de las nanocelulosas y lograr así ampliar sus usos y potenciar sus oportunidades. Sin embargo, el proceso de hidrofobización de las nanofibras y nanocristales de celulosa debe garantizar que no se vea alterada su ultraestructura, para que sus propiedades mecánicas intrínsecas no se vean afectadas. En el curso de la presente Tesis se presentó una metodología de acetilación de nanocelulosas basada en el uso como catalizadores de ácidos orgánicos de origen natural, no tóxicos y biodegradables como son los  $\alpha$ -hidroxiácidos. El protocolo utilizado no requiere del agregado de cosolventes orgánicos, y procede a presión atmosférica y temperaturas compatibles con otros procesos industriales.

Los resultados obtenidos en este Trabajo permitieron demostrar la utilidad de la ruta para acetilar tanto suspensiones de nanofibras de celulosa, como membranas enteras de nanocelulosa bacteriana, y nanocristales de celulosa de origen vegetal, utilizando específicamente ácido cítrico como catalizador. La evaluación de las variables que afectan el proceso químico permitió ganar conocimiento sobre cómo modular el nivel de acetilación conferido a los sustratos y demostrar la versatilidad

de la ruta propuesta. Las diversas técnicas de caracterización utilizadas permitieron determinar los efectos de la modificación en la estructura química, morfología, propiedades térmicas y cristalinidad de los productos. En particular, se confirmó que la acetilación tuvo lugar sin pérdida de cristalinidad de los sustratos. Por otra parte, los estudios realizados enfocados a estimar el impacto de la derivatización en la polaridad de las nanocelulosas confirmaron que, efectivamente, se logró su hidrofobización gradual en función del nivel de modificación alcanzado.

En este contexto, y en el marco del objetivo final de esta Tesis, las nanocelulosas derivatizadas se utilizaron en la preparación de materiales compuestos de matriz polimérica hidrofóbica, seleccionando a tal fin el ácido poliláctico por su creciente aceptación en los mercados del mundo. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto el aumento sustancial en la compatibilidad entre refuerzo y matriz inducido por la acetilación del refuerzo. Esta mejora en la compatibilidad química se evidenció en los ensayos de transparencia y morfología, en los cuales la dispersión de la BNC acetilada en la matriz de PLA fue *siempre* (es decir, para todo GS y para todo porcentaje de refuerzo) notablemente superior a la de sus contrapartes con BNC nativa. Por otro lado, la mejor dispersión del refuerzo hidrofobizado se tradujo en una mayor rigidez y una menor permeabilidad al vapor de agua de los nanocompuestos de PLA/BNC acetilada.

Del trabajo de Tesis realizado surgieron derivaciones que será de interés abordar en un futuro cercano, como son completar la caracterización de los compuestos PLA/BNC acetilada en función de otras propiedades de interés para aplicaciones específicas. Por ejemplo, para usos en packaging sería importante analizar color, migración y permeabilidad al oxígeno de las películas.

Además, para la producción de este tipo de compuestos a una escala compatible con un uso comercial, la técnica de evaporación por solvente no resulta factible; por lo que habría que adaptar el sistema, por ejemplo, para el procesamiento en extrusora, lo que implica un gran desafío por sí mismo debido a la dificultad de remover el agua contenida en la nanocelulosa sin inducir su hornificación.

Por otra parte, en lo que respecta a la reacción de esterificación, sería relevante evaluar si es posible utilizar la ruta propuesta para incorporar otros grupos acilo con diferentes restos hidrocarbonados de interés.



## Nomenclatura

<b><i>BNC</i></b>	Nanocelulosa bacteriana
<b><i>CNC</i></b>	Nanocristales de celulosa vegetal
<b><i>CNF</i></b>	Nanofibras o nanofibrillas de celulosa
<b><i>CNW</i></b>	Nanowhiskers de celulosa
<b><i>GS</i></b>	Grado de sustitución
<b><i>NCC</i></b>	Celulosa nanocristalina
<b><i>NFC</i></b>	Celulosa nanofibrilada
<b><i>PLA</i></b>	Ácido poliláctico
<b><i>T<sub>cc</sub></i></b>	Temperatura de cristalización en frío
<b><i>T<sub>g</sub></i></b>	Temperatura de transición vítrea.
<b><i>T<sub>m</sub></i></b>	Temperatura de fusión
<b><i>UAG</i></b>	Unidad de anhidroglucosa
<b><i>W<sub>PLA</sub></i></b>	Fracción en peso de PLA en el compuesto
<b><i>%Acilo</i></b>	Porcentaje de grupos acilo introducidos en la molécula de celulosa
<b><i>ΔH<sub>m</sub></i></b>	Entalpía de fusión de la muestra





# Listado de figuras

## Capítulo 1

**Figura 1.1 (a)** Estructura de la celulosa, **(b)** ordenamiento lineal de las unidades de glucosa en las cadenas de celulosa. Interacciones vía enlaces de hidrógeno entre las cadenas

**Figura 1.2** Configuración de la celdilla unidad de la celulosa  $I\alpha$  (Triclínica, línea azul punteada) respecto a  $I\beta$  (Monoclínica, línea roja continua). (Esquemas adaptados de Moon, Martini, Nairn, Simonsen, & Youngblood, 2011).

**Figura 1.3** Estructura supramolecular del polimorfismo de celulosa tipo I y los principales patrones de puentes de hidrógeno intermoleculares ( $O6H\cdots O3$  verde) e intramoleculares ( $O3H\cdots O5$  negro). (Esquema adaptado de Cherian et al., 2011).

**Figura 1.4** Representación esquemática de los diferentes niveles de formación de una microfibrila de celulosa de madera, **(a)** sección transversal de un “*minisheet*” formado por 6 cadenas de celulosa en donde cada caja gris representa una cadena de celulosa que mira hacia abajo del eje de la cadena, **(b)** sección transversal de fibrillas elementales formadas por el ensamblaje de 6 “*minisheets*”, **(c)** sección transversal de microfibrillas compuesta por 6 fibrillas elementales, **(d)** sección lateral de microfibrillas que muestra la configuración en serie de regiones cristalinas y amorfas. (Esquemas adaptados de Moon et al., 2011).

**Figura 1.5** Esquema ilustrativo para **(a)** nanofibrillas de celulosa constituidas por dominios amorfos y cristalinos, y **(b)** nanocristales de celulosa después de hidrolizar los dominios amorfos de la celulosa. (Imagen adaptada de Moon et al., 2011).

**Figura 1.6 (a)** Membrana de BNC obtenida mediante fermentación estática en un medio de cultivo de 5 L, **(b)** micrografía de barrido electrónico (SEM) de BNC.

**Figura 1.7** Estructura química de surfactantes comúnmente utilizados para compatibilizar nanocelulosa y matrices poliméricas de tipo poliéster **(a)** Beycostat A B09, **(b)** Span-60.

**Figura 1.8** Métodos convencionales para el grafting de cadenas poliméricas. (Imagen adaptada de **Kang et al., 2015**).

**Figura 1.9** Mecanismo de reacción de la esterificación de Fisher.

**Figura 1.10** Estructura química de algunos  $\alpha$ -hidroxiácidos de origen natural.

**Figura 1.11** Estructura química de **(a)** enantiómeros del ácido láctico, **(b)** estereoisómeros de PLA.

## Capítulo 2

**Figura 2.1** Protocolo de esterificación organocatalítica para nanocelulosa bacteriana y nanocristales de celulosa vegetal. **(a)** Preacondicionamiento, **(b)** acetilación organocatalítica, **(c)** recuperación.

**Figura 2.2** Celdas de acrílico utilizadas para las mediciones de la permeabilidad al vapor de agua de los nanocompuestos.

## Capítulo 3

**Figura 3.1** **(a)** Membrana húmeda de BNC, **(b)** imagen TEM de las nanofibras liberadas de la membrana, **(c)** histograma de anchos de las nanofibras.

**Figura 3.2** Efecto del  $\alpha$ -hidroxiácido utilizado como catalizador sobre el GS conferido a la BNC (1,01 mmol/mmol UAG, 120°C, 7 h).

**Figura 3.3** Espectro de CP/MAS-  $^{13}\text{C}$  RMN de BNC nativa.

**Figura 3.4** Espectros de CP/MAS-  $^{13}\text{C}$  RMN de **(a)** BNC nativa, **(b)** BNC acetilada en presencia de ácido cítrico como catalizador (GS= 0,90 $\pm$ 0,02).

**Figura 3.5** Espectros de CP/MAS-  $^{13}\text{C}$  RMN de **(a)** BNC nativa, **(b)** BNC acetilada en presencia de ácido cítrico como catalizador (GS= 0,90 $\pm$ 0,02), **(c)** ácido cítrico.

**Figura 3.6** Espectros de CP/MAS-  $^{13}\text{C}$  RMN de **(a)** CNC nativos, **(b)** CNC esterificados con ácido malónico, **(c)** CNC esterificados con ácido cítrico, **(d)** CNC

esterificados con ácido málico, mediante esterificación de Fisher catalizada con HCl (Spinella et al., 2016).

**Figura 3.7** Espectro FTIR de BNC nativa.

**Figura 3.8** Espectros FTIR de **(a)** BNC nativa, **(b)** BNC acetilada con ácido láctico (GS=  $0,42 \pm 0,03$ ), **(c)** BNC acetilada con ácido (L)-tartárico (GS=  $0,56 \pm 0,03$ ), **(d)** BNC acetilada con ácido cítrico (GS=  $0,90 \pm 0,02$ ).

**Figura 3.9** Micrografías de **(a)** BNC nativa, **(b)** BNC acetilada con ácido láctico (GS=  $0,42 \pm 0,03$ ), **(c)** BNC acetilada con ácido (L)-tartárico (GS=  $0,56 \pm 0,03$ ), **(d)** BNC acetilada con ácido cítrico (GS=  $0,90 \pm 0,02$ ).

**Figura 3.10** Patrón de DRX de BNC nativa.

**Figura 3.11** Patrones de DRX de **(a)** BNC nativa, **(b)** BNC acetilada con ácido láctico (GS=  $0,42 \pm 0,03$ ), **(c)** BNC acetilada con ácido (L)-tartárico (GS=  $0,56 \pm 0,03$ ), **(d)** BNC acetilada con ácido cítrico (GS=  $0,90 \pm 0,02$ ).

**Figura 3.12** Imágenes de gotas de agua usadas para determinar el ángulo de contacto en el equilibrio a los 60 s de: **(a)** BNC nativa, **(b)** BNC acetilada con ácido láctico (GS=  $0,42 \pm 0,03$ ), **(c)** BNC acetilada con ácido (L)-tartárico (GS=  $0,56 \pm 0,03$ ), **(d)** BNC acetilada con ácido cítrico (GS=  $0,90 \pm 0,02$ ).

**Figura 3.13** Evolución del ángulo de contacto en el equilibrio a los 60 s en función del grado de sustitución de BNC.

**Figura 3.14** Dispersabilidad en diferentes solventes al tiempo inicial y luego de 72 h en reposo para BNC nativa y acetilada (GS=  $0,42 \pm 0,03$ ). **(a)** BNC nativa, 0 h; **(b)** BNC acetilada, 0 h; **(c)** BNC nativa, 72 h; **(d)** BNC acetilada, 72 h. (I: agua, II: acetona, III: diclorometano, IV: éter de petróleo).

## Capítulo 4

**Figura 4.1** Hidrólisis del anhídrido acético y de la celulosa esterificada en presencia de agua.

**Figura 4.2** Efecto de la carga de catalizador (120°C, 3 h).

**Figura 4.3** Efecto de la temperatura de reacción (0,34 mmol ácido cítrico/mmol UAG, 3 h).

**Figura 4.4** Efecto del tiempo de reacción (0,34 mmol ácido cítrico/mmol UAG, 120°C).

**Figura 4.5** Espectros de CP/MAS-<sup>13</sup>C RMN de BNC nativa y acetiladas con GS variable.

**Figura 4.6** Espectro FTIR de BNC nativa y acetiladas con GS variable.

**Figura 4.7** Micrografías de BNC **(a)** nativa, **(b-h)** acetiladas con GS variable.

**Figura 4.8** Patrones de DRX de **(a)** BNC nativa, **(b-f)** BNC acetiladas con GS variable.

**Figura 4.9** Patrones de DRX de muestras de BNC acetiladas con GS similares utilizando mediante diferentes condiciones de reacción.

**Figura 4.10** Curvas de **(a)** TG, **(b)** DTG de la BNC nativa.

**Figura 4.11** Curvas de **(a)** DTG para BNC nativa y acetiladas con GS variable, **(b)** TG para BNC nativa y acetiladas con GS variable.

**Figura 4.12** Evolución los parámetros termogravimétricos ( $T_{\text{onset}}$  y  $T_{\text{max}}$ ) en función del GS.

**Figura 4.13** Sistema de reacción empleado para la reacción catalizada con  $\alpha$ -hidroxiácidos a **(a)** escala mayor (2,5g de BNC), **(b)** escala menor (0,5g de BNC).

**Figura 4.14** Espectros de CP/MAS- $^{13}\text{C}$  RMN de BNC acetilada. Reacción a menor escala (0,5g de BNC) ( $\text{GS} = 0,47 \pm 0,01$ ) (espectro en negro) y reacción a escala mayor (2,5g de BNC) ( $\text{GS} = 0,49 \pm 0,03$ ) (espectro en rojo). (0,34 mmol ácido cítrico/mmol UAG,  $120^\circ\text{C}$ , 3 h).

## Capítulo 5

**Figura 5.1** Tubos de BNC **(a)** vista lateral, **(b)** vista superior. Imágenes gentilmente cedidas de la Tesis de grado de la Srta. Danna Corzo, FIUBA (datos no publicados).

**Figura 5.2** Imágenes TEM de CNC obtenidos a partir de diferentes fuentes: **(a)** tunicados, **(b)** bacterias, **(c)** ramio, **(d)** sisal. (Imagen tomada de **Habibi, Lucia, & Rojas, 2010**).

**Figura 5.3** Membrana entera de BNC obtenida a **(a)** 3 días de fermentación, **(b)** 12 días de fermentación en cultivo estático.

**Figura 5.4** Espectros de CP/MAS- $^{13}\text{C}$  RMN de membranas de BNC nativa y BNC acetilada ( $\text{GS} = 0,36 \pm 0,03$ ).

**Figura 5.5** Espectros FTIR de membranas de BNC nativa y BNC acetilada ( $\text{GS} = 0,36 \pm 0,03$ ).

**Figura 5.6** Difractogramas de rayos X de membranas de **(a)** BNC nativa, **(b)** BNC acetilada ( $\text{GS} = 0,36 \pm 0,03$ ).

**Figura 5.7** Fotografía de los nanocristales de celulosa de origen vegetal liofilizados y su respectiva micrografía.

**Figura 5.8** Espectros de CP/MAS- $^{13}\text{C}$  RMN de CNC nativos y acetilados ( $\text{GS} = 0,18 \pm 0,03$  y  $0,34 \pm 0,02$ ).

**Figura 5.9** Espectros FTIR de los CNC nativos y acetilados ( $\text{GS} = 0,18 \pm 0,03$  y  $0,34 \pm 0,02$ ).

**Figura 5.10** Patrón de DRX de los CNC nativos.

**Figura 5.11 (a)** Micrografía de depósitos identificados en la suspensión de CNC, **(b)** espectro EDS correspondiente.

**Figura 5.12** Patrones de DRX de los CNC nativos y acetilados ( $GS = 0,18 \pm 0,03$  y  $0,34 \pm 0,02$ ).

**Figura 5.13** Micrografía de CNC **(a)** nativos, **(b)** acetilados ( $GS = 0,18 \pm 0,03$ ), **(c)** acetilados con ( $GS = 0,34 \pm 0,02$ ), **(d)** distribución de anchos de CNC (nm).

**Figura 5.14** Curvas **(a)** TG, **(b)** DTG de CNC nativos y acetilados ( $GS = 0,18 \pm 0,03$  y  $0,34 \pm 0,02$ ).

**Figura 5.15** Fotografías representativas de suspensiones de **(a)** CNC nativos en agua, **(b)** CNC nativos en cloroformo, **(c)** CNC acetilados ( $GS = 0,34 \pm 0,02$ ) en cloroformo. Fotografías tomadas 25 min después de sonicar las suspensiones.

## Capítulo 6

**Figura 6.1** Fotografías de las películas del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas ( $GS = 0,25 \pm 0,02$ ;  $0,49 \pm 0,03$ ;  $0,61 \pm 0,02$ ).

**Figura 6.2** Espectro UV-visible del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetilada ( $GS = 0,49 \pm 0,03$ ).

**Figura 6.3** Micrografías de las superficies criofracturadas de los nanocompuestos con **(a)** BNC nativa, **(b)** acetilada ( $GS = 0,25 \pm 0,02$ ), **(c)** acetilada ( $GS = 0,49 \pm 0,03$ ), **(d)** acetilada ( $GS = 0,61 \pm 0,02$ ).

**Figura 6.4** Termogramas del primer calentamiento del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas ( $GS = 0,25 \pm 0,02$ ;  $0,49 \pm 0,03$ ;  $0,61 \pm 0,02$ ).

**Figura 6.5** Termogramas del enfriamiento del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas ( $GS = 0,25 \pm 0,02$ ;  $0,49 \pm 0,03$ ;  $0,61 \pm 0,02$ ).

**Figura 6.6** Termogramas del segundo calentamiento del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas ( $GS = 0,25 \pm 0,02$ ;  $0,49 \pm 0,03$ ;  $0,61 \pm 0,02$ ).

**Figura 6.7** Patrones de DRX de **(a)** BNC nativa, **(b)** PLA, **(c)** PLA/BNC nativa, **(d)** PLA/BNC acetilada (GS  $0,25\pm0,02$ ), **(e)** PLA/BNC acetilada (GS  $0,49\pm0,03$ ), **(f)** PLA/BNC acetilada (GS  $0,61\pm0,02$ ).

**Figura 6.8** Curvas de esfuerzo de tracción vs deformación del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas (GS=  $0,25\pm0,02$ ;  $0,49\pm0,03$ ;  $0,61\pm0,02$ ).

**Figura 6.9** Fotografías de las películas del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada (GS= $0,49\pm0,03$ ).

**Figura 6.10** Espectros UV-visible del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

**Figura 6.11** Micrografías de las superficies crio fracturadas del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

**Figura 6.12** Termogramas del primer calentamiento del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

**Figura 6.13** Termogramas del enfriamiento del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

**Figura 6.14** Termogramas del segundo calentamiento del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

**Figura 6.15** Patrones de DRX para **(a)** BNC nativa, **(b)** PLA, **(c)** PLA/BNC nativa 10% (p/p), **(d)** BNC acetilada 10% (p/p).

**Figura 6.16** Valores de módulo de Young de los nanocompuestos de PLA/BNC con 3, 5 y 10 % (p/p) de BNC nativa o acetilada. (Valores relativizados respecto de la matriz pura de PLA).

**Figura 6.17** Valores de resistencia a la tracción de los nanocompuestos de PLA/BNC con 3, 5 y 10 % (p/p) de BNC nativa o acetilada. (Valores relativizados respecto de la matriz pura de PLA).

**Figura 6.18** Valores de deformación de los nanocompuestos de PLA/BNC con 3, 5 y 10 % (p/p) de BNC nativa o acetilada. (Valores relativizados respecto de matriz pura de PLA).

**Figura 6.19** Permeabilidad al vapor de agua del PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.



## Listado de tablas

**Tabla 1.1** Dimensiones de la celdilla unidad para las estructuras polimórficas de la celulosa.

**Tabla 1.2** Resumen de la norma ISO/TS 20477: 2017 “*Nanotechnologies – Standard terms and their definition for cellulose nanomaterial*”.

**Tabla 1.3** Algunas aplicaciones de la BNC en diferentes áreas (adaptado de **Jozala et al., 2016**).

**Tabla 3.1** Resultados del ensayo de absorción de agua para BNC nativa y BNC acetilada con ácido láctico (GS=  $0,42 \pm 0,03$ ), con ácido (L)–tartárico (GS=  $0,56 \pm 0,03$ ) y con ácido cítrico (GS=  $0,90 \pm 0,02$ ).

**Tabla 4.1** Efecto de los intercambios de solvente sobre el GS de la BNC acetilada (1,01 mmol ácido cítrico/mmol UAG, 120°C y 3 h).

**Tabla 4.2** Asignaciones de los espectros de CP/MAS- $^{13}\text{C}$  RMN de BNC nativa y acetiladas con GS variable.

**Tabla 6.1** Propiedades térmicas del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas (GS=  $0,25 \pm 0,02$ ;  $0,49 \pm 0,03$ ;  $0,61 \pm 0,02$ ).

**Tabla 6.2** Parámetros de tracción del PLA y sus nanocompuestos con BNC nativa y acetiladas (GS=  $0,25 \pm 0,02$ ;  $0,49 \pm 0,03$ ;  $0,61 \pm 0,02$ ).

**Tabla 6.3** Propiedades térmicas del PLA, y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10% (p/p) de BNC nativa y acetilada.

**Tabla 6.4** Valores de permeabilidad al vapor de agua obtenidos para el PLA y sus nanocompuestos con 3, 5 y 10 % (p/p) de BNC nativa y acetilada.