



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**Dirección de Postgrado**  
**Facultad de Ciencias Forestales**  
**Programa de Magíster en Ciencias Forestales**

**PRETRATAMIENTO QUÍMICO-ENZIMÁTICO DE PULPA KRAFT DE EUCALIPTO**  
**PARA LA PRODUCCIÓN DE NANOCELULOSA FOSFORILADA**

**Isidora Andrea Reyes González**  
**CONCEPCIÓN - CHILE**  
**2023**

**Profesor Guía: Dr. Regis Teixeira Mendonça**  
**Depto. de Manejo de Bosque y Medio Ambiente**  
**Facultad de Ciencias Forestales**  
**Universidad de Concepción**

# PRETRATAMIENTO QUÍMICO-ENZIMÁTICO DE PULPA KRAFT DE EUCALIPTO PARA LA PRODUCCIÓN DE NANOCELULOSA FOSFORILADA

## Comisión Evaluadora:

Regis Teixeira Mendonça  
(Profesor guía)  
Ingeniero Químico, Dr.

---

Isabel Carrillo Varela  
(Profesora co-guía)  
Ingeniera en Biotecnología Vegetal, Dra.

---

Angela Machuca Herrera  
(Comisión evaluación)  
Bioquímica, Dra.

---

Adriane Ferreira Milagres  
(Comisión evaluación)  
Ingeniera en Alimentos, Dra.

---

**Director de Postgrado**  
Regis Teixeira Mendonça  
Ingeniero Químico, Dr.

---

**Decano Facultad de Ciencias Forestales**  
Eugenio Sanfuentes Von Stowasser  
Ingeniero Forestal. Dr.

---

*“A Victoria González Salas y José Reyes Neira”*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi profesor guía Dr. Regis Teixeira por su constante apoyo, disponibilidad, paciencia y orientación académica. A mi co-guía Dra. Isabel Carrillo por enseñarme sus conocimientos en el área y por su ayuda a lo largo de esta tesis.

Al Proyecto Fondecyt Regular 1200504 por el financiamiento entregado para el desarrollo de esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Forestales y a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por la beca de articulación pregrado-postgrado, y financiamiento para la pasantía de investigación en la Universidad de Girona, España.

A los Dres. Quim Tarrés y Marc Delgado de la Universidad de Girona por su apoyo durante la pasantía de investigación. A todo el grupo LEPAMAP-PRODIS, especialmente a André Mazega y Roberto Aguado por su amistad y acompañamiento.

A toda mi familia, Reyes-Neira y González-Salas, especialmente a mi hermana María Victoria, mis abuelas, tías y padrinos, por siempre brindarme su apoyo y creer en mí. Mi mayor agradecimiento es a mis padres, Victoria y José, por ser los cimientos de mi vida, brindándome todo su amor, cuidado y comprensión.

A mis mejores amigas Magdalena y Valentina, por su cariño y apoyo. A mis amigos de la universidad, por los buenos momentos vividos durante todos estos años.

Gracias.

## TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Celulosa.....	2
I.2. Nanocelulosa.....	3
I.3. Enzimas hidrolíticas en la producción de nanocelulosa.....	5
I.4. Tratamientos químicos en la producción de nanocelulosa.....	6
II. HIPÓTESIS.....	10
III. OBJETIVOS.....	10
III.1. Objetivo general.....	10
III.2. Objetivos específicos.....	10
IV. METODOLOGÍA.....	11
IV.1. Pretratamiento químico-enzimático de pulpa Kraft de eucalipto blanqueada (BEKP).....	11
IV.1.1. Material de partida.....	11
IV.1.2. Tratamiento enzimático con xilanasas.....	11
IV.1.3. Extracción caustica en frio.....	11
IV.1.4. Tratamiento enzimático con endoglucanasas.....	12
IV.1.5. Solubilidad al álcali S18.....	12
IV.1.6. Viscosidad intrínseca.....	13
IV.1.7. Difracción de rayos X (XRD).....	13

IV.1.8. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	14
IV.1.9. Fosforilación química de pulpas.....	14
IV.1.10. Microscopia electrónica de barrido con sonda de rayos X de dispersión de energía (SEM-EDS).....	15
IV.1.11. Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	15
IV.1.12. Titulación conductimétrica.....	15
IV.1.13. Adsorción de azul de metileno (MB).....	16
IV.2. Producción y caracterización de nanocelulosa.....	17
IV.2.1. Preparación de nanocelulosa.....	17
IV.2.2. Preparación y caracterización de películas de nanocelulosa.....	17
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
V.1. Tratamiento con xilanasas.....	20
V.2. Pretratamiento químio-enzimático de pulpa Kraft de eucalipto blanqueada (BEKP).....	21
V.3. Fosforilación de las pulpas de celulosa.....	25
V. 4. Nanofibras de celulosa fosforilada.....	32
VII. CONCLUSIONES.....	39
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de las pulpas de celulosa.....	21
Tabla 2. Biometría de fibras de pulpas no fosforiladas y fosforiladas.....	27
Tabla 3. Contenido de carga negativa de pulpas no fosforiladas y fosforiladas... ..	30
Tabla 4. Parámetros para los modelos de isoterma de Langmuir y Freundlich de adsorción de MB en pulpas fosforiladas y no fosforiladas.....	32
Tabla 5. Caracterización de las películas de nanocelulosa.....	35
Tabla 6. Resumen de aplicaciones de nanofibras de celulosa (CNF) según sus propiedades.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Solubilidad en álcali (S18) de pulpas Kraft blanqueadas de eucalipto (BEKP) tratadas con enzima xilanasa de <i>Aspergillus oryzae</i> .....	21
Figura 2. Difractogramas XRD de ajuste de curvas. Muestras: (A) BEKP, (B) CCE15, (C) BEKP-EG y (D) CCE15-EG.....	23
Figura 3. Microscopia electrónica de barrido (SEM) a 100, 50 y 20 $\mu\text{m}$ de (A, B y C) BEKP, (D, E y F) BEKP-EG, (G, H e I) CCE15 y (J, K y L) CCE15-EG.....	25
Figura 4. Espectros ATR-FTIR de pulpa Kraft blanqueada de eucalipto (BEKP) y pulpas fosforiladas (BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P, CCE15-EG-P).....	26
Figura 5. Distribución de clases de longitud de fibra de pulpas químico-enzimáticas A. no fosforiladas y B. fosforiladas.....	28
Figura 6. Micrografías SEM y espectros de rayos X de dispersión de energía (EDS) de (A) CCE15-EG y (B) CCE15-EG-P.....	29
Figura 7. Capacidad de adsorción de azul de metileno (MB) de pulpas químico-enzimáticas (A) no fosforiladas y (B) fosforiladas.....	31
Figura 8. Suspensiones de nanofibras de celulosa no fosforilada (BEKP-EG) y fosforiladas (BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P, CCE15-EG-P).....	33
Figura 9. Películas de nanocelulosa producidas a partir de pulpa no fosforilada (BEKP-EG) y fosforiladas (BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P, CCE15-EG-P).....	33
Figura 10. Propiedades mecánicas de películas de nanocelulosa de muestras BEKP-EG, BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P y CCE15-EG-P.....	36



## LISTADO DE ABREVIATURAS

BEKP.....	Pulpa Kraft blanqueada de eucalipto ( <i>bleached eucalypt Kraft pulp</i> )
CCE15.....	Extracción caustica fría al 15% ( <i>cold caustic extraction</i> )
EG.....	Endoglucanasas
P.....	Fosforilación
CNF.....	Nanofibras de celulosa ( <i>cellulose nanofibers</i> )
CNC.....	Nanocristales de celulosa ( <i>cellulose nanocrystals</i> )
TAPPI.....	Asociación Técnica de la Industria de Celulosa y Papel, Estados Unidos ( <i>Technical Association of Pulp and Paper Industry</i> )
ISO.....	Organización Internacional de Normalización ( <i>International Organization for Standardization</i> )
TEMPO.....	2,2,6,6-tetrametil-1-piperinidiloxilo
OH.....	grupos hidroxilos
S18.....	Solubilidad en álcali al 18%
MB.....	Azul de metileno ( <i>methylene blue</i> )
WVTR.....	Tasa de transmisión de vapor de agua ( <i>water vapor transmittance rate</i> )
HR.....	Humedad relativa
BSKP.....	Pulpa Kraft blanqueada de pino ( <i>bleached softwood Kraft pulp</i> )

## RESUMEN

La pulpa Kraft de especies de *Eucalyptus* es una de las fuentes de fibra más importantes para la generación de productos a base de celulosa. Las nanofibras de celulosa (CNF) son un nanomaterial que tiene múltiples aplicaciones debido a su buen potencial para la modificación de la superficie y relativamente gran superficie específica. Estas nanocelulosas se producen por medio de pretratamientos químicos y/o enzimáticos seguidos por tratamientos mecánicos de fibrilación. En este trabajo se evaluaron pretratamientos químicos y enzimáticos para la producción de CNF utilizando pulpa Kraft blanqueada de eucalipto (BEKP). La pulpa BEKP fue sometida a tratamientos químicos-enzimáticos con xilanasa de *Aspergillus oryzae*, extracción cáustica en frío al 15% (CCE15), endoglucanasa comercial (EG) de *Trichoderma reesei* y fosforilación con urea y fosfato amónico dibásico (P), con diferentes combinaciones, previo a la homogeneización mecánica para obtención de nanofibras de celulosa (CNF). El efecto de tratamientos seleccionados en la producción de CNF se evaluó sobre algunas propiedades físico-mecánicas de películas (*films*) elaboradas por *drop-casting* desde las diferentes nanocelulosas obtenidas. Resultados preliminares indicaron que las enzimas xilanasas no fueron efectivas en la disminución del contenido de xilanos residuales en la pulpa (determinados por solubilidad al álcali 18%), por lo cual no se utilizaron en los tratamientos siguientes. De las diferentes pulpas obtenidas, solo las codificadas como BEKP-EG, BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P, CCE15-EG-P pudieron ser homogeneizadas para producir CNF, obteniendo nanocelulosas con diferentes propiedades mecánicas y apariencia. Todas las películas de CNF fosforiladas obtuvieron impermeabilidad al aire. En términos de alta transparencia de las películas (baja opacidad) se destacaron las muestras BEKP-EG, BEKP-EG-P y CCE15-P, mientras que las propiedades mecánicas de índices de resistencia a la tracción y explosión fueron superiores en la muestra BEKP-EG. En síntesis, los resultados obtenidos demostraron que, dependiendo del tipo o combinación de tratamiento químico-enzimático aplicado sobre las fibras de celulosa, se obtendrán nanocelulosas con características variadas. Esto permite generar materiales celulósicos para diferentes aplicaciones. Además, se da énfasis a la fosforilación como una alternativa de modificación química de la celulosa para producción de CNF, con o sin la utilización de enzimas hidrolíticas en el proceso.

## ABSTRACT

Kraft pulp from *Eucalyptus* species is one of the most important fiber sources for the generation of cellulose-based products. Cellulose nanofibers (CNF) are a nanomaterial that has multiple applications due to its good potential for surface modification and relatively large specific surface area. These nanocelluloses are produced by means of chemical and/or enzymatic pretreatments followed by mechanical fibrillation treatments. In this work, chemical and enzymatic pretreatments for CNF production from bleached eucalyptus Kraft pulp (BEKP) were evaluated. The BEKP pulp was subjected to chemical-enzymatic treatments with xylanase from *Aspergillus oryzae*, 15% cold caustic extraction (CCE15), commercial endoglucanase (EG) from *Trichoderma reesei* and phosphorylation with urea and dibasic ammonium phosphate (P), with different combinations, prior to mechanical homogenization to obtain cellulose nanofibers (CNF). The effect of selected treatments on the production of CNF was evaluated on some physical-mechanical properties of films made by drop-casting from the different nanocelluloses obtained. Preliminary results indicated that the xylanase enzymes were not effective in reducing the content of residual xylans in the pulp (determined by 18% alkali solubility), therefore they were not used in subsequent treatments. Of the different pulps produced, only those coded as BEKP-EG, BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P, CCE15-EG-P could be homogenized to produce CNF, obtaining nanocelluloses with different mechanical properties and appearance. All phosphorylated CNF films obtained air impermeability. In terms of high transparency of the films (low opacity), the BEKP-EG, BEKP-EG-P and CCE15-P samples stood out, while the mechanical properties of the tensile strength and explosion indexes were higher in the BEKP-EG sample. In summary, the results obtained showed that, depending on the type or combination of chemical-enzymatic treatment applied to the cellulose fibers, nanocelluloses with varied characteristics will be obtained. In addition, emphasis is given to phosphorylation as an alternative for the chemical modification of cellulose for the production of CNF, with or without the use of hydrolytic enzymes in the process.

## I. INTRODUCCIÓN

La celulosa es un material versátil que puede ser adaptado a una variedad de aplicaciones (Li *et al.* 2018). Actualmente, existen varias rutas para la producción de materiales en base a celulosa, que van desde la utilización de la celulosa en su estado natural fibroso hasta la deconstrucción de la celulosa en glucosa, pasando por la generación de derivados de celulosa (como las nanocelulosas y otros productos químicos). De esta manera las fibras de celulosa no modificadas, celulosa modificada químicamente y nanocelulosas pueden generar diferentes tipos de materiales (Ten y Vermerris 2013, Shaghaleh *et al.* 2018, Aravind *et al.* 2022).

La nanocelulosa se refiere a materiales celulósicos con al menos una dimensión en el rango nanométrico (1–100 nm) (Nechyporchuk *et al.* 2016, Klemm *et al.* 2018). Estos materiales son utilizados en muchos campos, específicamente en películas, materiales compuestos, materiales de embalaje, electrónica, aditivo en la fabricación de papeles, recubrimientos, biomedicina, entre otros. Hay cuatro grandes clases de materiales de nanocelulosas que son nanofibras de celulosa (CNF), nanocristales de celulosa (CNC), nanocelulosa bacteriana y nanocelulosa electrohilada. Las CNF son celulosas altamente fibriladas, que mantienen regiones amorfas y cristalinas, con diámetros que van desde 5 a 30 nm y longitudes que pueden acercarse a varias micras (Carter *et al.* 2021).

Las nanofibras se obtienen comúnmente mediante procesos mecánicos como la homogeneización a alta presión, la microfluidización, la molienda, el refinado o la criotrituración. Sin embargo, la estructura de las fibras es difícil de romper por lo que se necesita una gran cantidad de energía, aun así, en ocasiones no es posible obtener un producto homogéneo (Sanchez-Salvador *et al.* 2022). Con el fin de mejorar la fibrilación, reducir el consumo de energía y dar diversas propiedades a los materiales de CNF, se pueden realizar pretratamientos mecánicos, químicos y enzimáticos. Los pretratamientos más utilizados para la producción de CNF son la oxidación con 2,2,6,6-tetrametil-1-piperinidiloxilo (TEMPO), refinación mecánica, hidrólisis enzimática, entre otros, los cuales se pueden utilizar separados o combinados (Sánchez-Gutiérrez *et al.* 2020, Balea *et al.* 2021, Sanchez-Salvador *et al.* 2022).

Esta tesis evaluó combinaciones de pretratamientos químico-enzimáticos (extracción caustica fría e hidrolasas como xilanasas y endoglucanasas) seguida de fosforilación química para la posterior producción de CNF como una alternativa a los diferentes procesos actualmente utilizados para este fin. A continuación, se presentan antecedentes bibliográficos relacionados con la investigación desarrollada.

## **I.1. Celulosa**

La celulosa es un homopolisacárido que se presenta combinada con lignina y hemicelulosas en la pared celular de las plantas leñosas. Aunque en algunos casos puede estar en estado casi puro (e.g. algodón) (Sixta 2006). La estructura de la celulosa se basa en cadenas lineales de B-D-glucosa (también llamada unidad de anhidroglucosa; AGU) unidas por enlaces B-1,4-glucosídicos con un grado de polimerización que oscila entre 1000 y 15000 unidades, según el origen y tratamientos por lo cuáles pasa la celulosa (Seddiqi *et al.* 2021). La molécula de glucosa es un anillo de piranosa, contiene un grupo hidroxilo (OH) libre en los carbonos 2, 3 y 6 (C-2, C-3 y C-6, respectivamente). En ambos extremos de la cadena de celulosa encontramos dos grupos hidroxilos diferentes. El C-1 es parte de un grupo aldehído, también llamado terminal reductor. Por otro lado, en el extremo C-4 se encuentra un OH alcohólico (Sixta 2006, Granström 2009). A nivel supramolecular, la estructura de la celulosa no es uniforme y se pueden encontrar regiones cristalinas y amorfas. Las regiones cristalinas se caracterizan por formar una red rígida debido a la disposición de los enlaces de hidrógenos inter e intra-moleculares, mientras que las láminas de celulosa que se forman por efecto de estos enlaces se superponen entre sí y se unen por fuerzas de Van der Waals. Por otro lado, las regiones amorfas son zonas poco ordenadas con menor interacción entre las cadenas de celulosa (Granström 2009, Gautam *et al.* 2010).

La estructura cristalina de la celulosa es un tema de importancia debido su implicancia en muchas características de la celulosa, como su insolubilidad en agua y varios solventes orgánicos (Lindman *et al.* 2010). También se relacionan con su accesibilidad a químicos y enzimas, pudiendo variar al modificar estructuralmente los cristales en distintos polimorfos llamados celulosa I, II, III y IV (Gautam *et al.* 2010). Estas alteraciones ocurren por cambios en la conformación rotacional del hidroxilo del

carbono 6, por consecuencia, se reordena la orientación molecular y la red de enlaces de hidrogeno intralaminar que caracterizan a cada tipo de celulosa (Isogai *et al.* 1989, Hasani 2010). La celulosa I es la forma de polimorfismo más abundante en las plantas y se caracteriza por cadenas empaquetadas en paralelo (Nishiyama *et al.* 2002), formando una estructura compacta y menos accesible para reactivos químicos y enzimas (Köpcke 2008). Sus puentes de hidrógenos intramoleculares se encuentran en O-3-H-(O-5') y O-2-H-(O-6'), mientras que los intermoleculares (O)-6-(O) (Gautam *et al.* 2010). La celulosa I es inestable durante los procesos de mercerización (NaOH) y recristalización, produciendo que su estructura cristalina paralela se convierta en antiparalela, conocida como celulosa II. Esta conversión es irreversible y presenta nuevos puentes de hidrógeno (Pérez y Mazeau 2005). Aunque los puentes de hidrogeno intramoleculares se encuentran en (HO)3-H-(O-5') al igual que en la celulosa I, los intermoleculares son más complejos, formándose en (OH)6-(O-2') y (OH)6-(O-3') (Gautam *et al.* 2010). Estos cambios estructurales hacen a la celulosa II menos cristalina, más accesible y reactiva que la celulosa I (Gehmayr y Sixta 2012). Sin embargo, cuando las fibras se secan y se produce la hornificación, provocando el colapso de los espacios interfibrilares y bajando la reactividad de la celulosa II (Mo *et al.* 2022).

Para la obtención de productos y materiales derivados de la celulosa, la madera es procesada generalmente por pulpaje químico, siendo más utilizado el proceso Kraft, dando como resultado una pulpa con un contenido de aproximadamente 80% de celulosa, 18% de hemicelulosas residuales y bajo contenido de lignina (Ang *et al.* 2020). En Chile, la madera de eucalipto es la más utilizada para este propósito, siendo *Eucalyptus globulus* y *E. nitens*, así como sus híbridos, las especies más utilizadas (Morales *et al.* 2015). A partir de la pulpa grado papel se pueden seguir diferentes rutas de procesamiento dependiendo del producto objetivo: biocombustibles, textiles, derivados de celulosa y nanocelulosas, entre otros (Sixta 2006). A continuación, nos centraremos en antecedentes relacionados con la producción de nanocelulosa.

## **1.2. Nanocelulosa**

Las nanocelulosas o nanofibras de celulosa (CNF) fueron introducidas como un nuevo material en 1983, presentándose como celulosa con dimensiones laterales en el rango de nanómetros producidas desde pulpa de madera blanda homogeneizada varias

veces a alta presión (Herrick *et al.* 1983, Turbak *et al.* 1983). Las CNF en solución tienen un aspecto de geles con características tixotrópicas por lo que al estar expuestas a presión pierden viscosidad por cizallamiento (Nechyporchuk *et al.* 2016). Las CNF pueden ser producidas a partir de residuos lignocelulósicos agrícolas como arroz, maíz, cebada, plátano, trigo y caña de azúcar. Sin embargo, la celulosa de maderas es la fuente más común de fibras para este proceso (Siró y Plackett 2010). Además, hay que tener en cuenta que la mejor alternativa para producir CNF es la pulpa nunca secada o *never-dry*, es decir, con un contenido de humedad relativamente alto (50-70%) debido a que la pulpa seca tendrá enlaces de hidrógeno irreversibles (proceso de hornificación) entre las nanofibrillas que dificultan el proceso de fibrilación (Nechyporchuk *et al.* 2016).

El tratamiento mecánico es el método más común para producir CNF y, dentro de los más destacados se encuentra la homogenización a alta presión, proceso por el cual la muestra diluida en agua (consistencia entre 1% - 3%) se pasa a través de una salida estrecha a alta presión. Otra técnica parecida a la homogenización es la microfluidización, que se diferencia por utilizar equipamiento sin discos giratorios móviles con espaciamiento constante, por lo que muestra se atasca menos en la salida pero requiere mayor energía porque tiene que ser pasada varias veces para alcanzar altos grados de fibrilación (Randhawa *et al.* 2022). Mayores antecedentes sobre el equipamiento utilizado para la producción de nanocelulosas a escala de laboratorio o piloto pueden ser encontrados en las publicaciones de Khalil *et al.* (2014), Blanco *et al.* (2018) y Nechyporchuk *et al.* (2016).

Procesos alternativos o combinados han considerado pretratamientos químicos y enzimáticos para debilitar la unión interna de la estructura de celulosa antes de exponerlas al tratamiento mecánico y así superar su alto requerimiento de energía. Además, estos tratamientos también ocasionan el hinchamiento y la reducción de la cristalinidad de las fibras de celulosa para mejorar la calidad de la nanocelulosa (Tao *et al.* 2019). Uno de los pretratamientos más efectivos es con el reactivo TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperinidiloxilo), el cual posibilita la introducción de grupos cargados negativamente en las fibras celulósicas para mejorar la delaminación de las nanofibrillas (Bäckström *et al.* 2012). Sin embargo, este tratamiento también es uno de los más costosos y genera residuos tóxicos (Serra *et al.* 2017), por lo que es

importante buscar alternativas para minimizar estos inconvenientes. El pretratamiento enzimático antes del tratamiento mecánico se ha convertido en un método común para la preparación de CNF, destacando la utilización de secuencias de pretratamientos con enzimas hidrolíticas, especialmente celulasas y xilanasas, para la generación de un material nanofibrilado más homogéneo y nanofibras con mejores propiedades para aplicaciones específicas (Nie *et al.* 2018, Barhoum *et al.* 2022). Algunos antecedentes de pretratamientos con enzimas hidrolíticas para la producción de CNF se describen a continuación.

### **I.3. Enzimas hidrolíticas en la producción de nanocelulosa**

Las enzimas hidrolíticas o hidrolasas son un vasto grupo de enzimas usadas comúnmente como catalizadores biológicos que utilizan agua como donante de grupos hidroxilo durante la descomposición del sustrato, catalizando la hidrólisis de un enlace químico en biopolímeros y biomoléculas. Este grupo se divide en 13 clases (EC 1–13) y varias subclases. La subclase glucosidasa hidroliza una amplia variedad de enlaces O-glucosídicos entre dos o más monosacáridos o entre un monosacárido y un residuo de otra naturaleza química, por lo que son de amplia aplicación en diferentes procesos industriales, incluyendo la textil, de detergentes y surfactantes, de alimentos, de los biocombustibles, entre otras (Ekta *et al.* 2022). En el caso de la producción de CNF las enzimas xilanasas y celulasas han sido evaluadas en diferentes estudios (Nie *et al.* 2018, Barhoum *et al.* 2022).

Xilanasas: son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos de hemicelulosas tipo xilanos (Collins *et al.* 2005). Las xilanasas son producidas por diferentes organismos vivos, como microorganismos, protozoos y moluscos, y también se encuentran en el rumen de animales superiores, pero a escala industrial son producidas por bacterias, hongos y actinomicetos (Beg *et al.* 2001, Motta *et al.* 2013, Bhardwaj *et al.* 2019). Según la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org>), las xilanasas se encuentran en las familias GH 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 y 62. Sin embargo, las familias GH 10 y 11 son las más estudiadas. Estas xilanasas generalmente tienen un mecanismo de acción de retención (Pell *et al.* 2004, Bhardwaj *et al.* 2019, Abdul *et al.* 2020). Entre todos los tipos de xilanasas, las endo-xilanasas (endo- $\beta$ -1,4 xilanasas) son las más importantes, debido a que permiten la liberación de fracciones



oligoméricas de xilano (Hutterer *et al.* 2017, Liu y Kokare 2023). Las xilanasas tienen aplicaciones biotecnológicas en diversas industrias, incluidas la industria de la celulosa, como en el proceso de bioblanqueo de pulpa kraft (Gangwar *et al.* 2014, Nagar y Gupta 2021) y también para purificar la celulosa que será utilizada para derivatización por degradación y eliminación de xilanos residuales (Yang *et al.* 2019, Ngene *et al.* 2022). Como los xilanos actúan como agentes espaciadores entre las microfibrilas y contribuyen a la retención de agua, su remoción puede reducir la accesibilidad de químicos a la celulosa por aumentar la coalescencia de las micro y nanofibrillas de celulosa (Iwamoto *et al.* 2008).

Celulasas: son enzimas sintetizadas por una gran cantidad de bacterias, protozoos, hongos, animales y plantas para la degradación de la celulosa por medio de la hidrólisis de sus enlaces glucosídicos B-1,4 (Soni *et al.* 2018, Bhardwaj *et al.* 2021). Al igual que otras enzimas hidrolíticas su modo de acción ocurre por inversión o retención, dependiendo de la distancia de los sitios catalíticos (Bhardwaj *et al.* 2021). Según la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org>), las celulasas se encuentran en las familias GHF 1,3, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51, 74, 116, and 124. Las celulasas comprenden tres grupos : las endo- $\beta$ -1,4-glucanasas, las cuales catalizan hidrólisis aleatoria de los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 de cadenas de B-glucanos, ayudando la accesibilidad de la celulosa a tratamientos químicos por reducción de su grado de polimerización, aumentando la reactividad de la pulpa; las exo- $\beta$ -1,4-glucanasas, las cuales hidrolizan los terminales reductores y no reductores de la cadena de celulosa liberando celobiosa; y las  $\beta$ -1,4-glucosidasas, que hidrolizan la celobiosa liberando monómeros de glucosa (Hutterer *et al.* 2017). Los tres tipos de enzimas son necesarios para una hidrólisis eficiente de celulosa a glucosa (sacarificación) (Juturu y Wu 2014), pero para aplicaciones en producción de nanocelulosa, las endoglucanasas son más aplicadas ya que pueden disminuir el grado de polimerización de la celulosa sin generar pérdidas significativas de rendimiento de la pulpa (Zhu *et al.* 2011, Wang *et al.* 2016, Liu *et al.* 2020).

#### **I.4. Tratamientos químicos en la producción de nanocelulosa**

Diferentes tratamientos químicos pueden ser aplicados a la pulpa celulósica previo al proceso de fibrilación para la producción de CNF. Gran parte de dichos

pretratamientos buscan incorporar grupos funcionales negativos (TEMPO, carboximetilación, sulfonación, fosforilación) o positivos (cationización) para lograr repulsión electrostática entre las fibras y que así sea más sencillo separarlas, lo que facilita el posterior proceso de homogeneización a alta presión (Blanco *et al.* 2018). Dentro de estos pretratamientos, el más conocido es TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo) el cual oxida los alcoholes a grupos carboxilato en la superficie de los carbohidratos a través de los aldehídos, destacándose por su velocidad de reacción y regioselectividad (Saito *et al.* 2007). A pesar de que los CNF oxidados con TEMPO presentan altos rendimientos de fibrilación, transparencia y ayudan a reducir el consumo de energía en el tratamiento mecánico, TEMPO es un reactivo caro, por lo que no es atractiva para la fabricación industrial dadas las otras alternativas (Serra *et al.* 2017). Dentro de estas alternativas tenemos la cationización, la cual se define por incorporar amonios cuaternarios ( $\text{NH}_4^+$ ) en la celulosa, esto se realiza utilizando Cloruro de (2,3-epoxipropil)trimetilamonio en presencia de agua, isopropanol e hidróxido de sodio, entre otros métodos (Blanco *et al.* 2018). El beneficio de los CNF catiónicos está en que la presencia de amonios cuaternarios, presentan propiedades bacteriostáticas contra las bacterias Gram positivas y pueden utilizarse para limitar la proliferación de bacterias en diversas aplicaciones, como el envasado de alimentos o medicamentos (Rol *et al.* 2019). Otra modificación que se ha presentado para generar CNF de alta calidad es la fosforilación química (Noguchi *et al.* 2017, Rol *et al.* 2020). La fosforilación de la celulosa es la introducción de grupos fosfato en los grupos hidroxilo de los carbonos 2, 3 y 6 de las unidades de anhidroglucosa (Kokol *et al.* 2015). Esta modificación se puede lograr usando reactivos derivados de fosfato (por ejemplo,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  y agua como solvente (Ghanadpour *et al.* 2015, Noguchi *et al.* 2017, Hadid *et al.* 2021). Tiene el beneficio de ser de bajo costo y no toxica (Ghanadpour *et al.* 2015). Además de tener diversas aplicaciones, como en la purificación de agua, gracias a su capacidad de absorción de contaminantes cargados positivamente, y en la obtención de materiales anti inflamables, debido a la degradación térmica y la formación temprana de carbón (Ghanadpour *et al.* 2015, Ablouh *et al.* 2021, Hadid *et al.* 2021).

Mulin *et al.* (2023) realizaron fosforilación como pretratamiento para la producción de CNF utilizando las proporciones químicas 1,0/1,2/4,9 y 1,0/2,5/10,0 ( $\text{AGU}/(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4/\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) por 5, 20 y 40 min de reacción a  $150^\circ\text{C}$ . Luego, las fibras

se trataron mecánicamente pasándolas cinco veces por un ultrarefinador a 1500 rpm. Los autores reportaron que los pretratamientos de fosforilación fueron eficaces para aumentar la resistencia térmica y reducir el consumo de energía durante la fibrilación. Sin embargo, produjeron una disminución en las propiedades de películas elaboradas con las CNF, obteniendo una resistencia a la tracción entre 69.9 a 94,9 MPa y una resistencia a la fractura entre 2.52 a 4,42%, comparadas con el control, que obtuvo 108,3 MPa y 4,53%, respectivamente. Sin embargo, se considera que la fosforilación es una alternativa viable de aplicar en combinación con tratamientos previos para la producción de CNF.

Además de los tratamientos químicos para la incorporación de grupos funcionales, existen otras estrategias para modificar la celulosa como es el tratamiento con ácido (el ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido oxálico y ácido clorhídrico) para la disminución del DP. Sin embargo, este tratamiento es corrosivo y tóxico por lo que requiere tener equipos anticorrosivos y realizar tratamientos de los efluentes, lo que aumenta los costos de producción (Mulin *et al.* 2023). Otra alternativa es un tratamiento alcalino (NaOH), el cual ocasiona la remoción de hemicelulosas residuales, hinchamiento de las fibras, cambios en la estructura de los poros, disminución del tamaño de las fibras y conversión de celulosa I a celulosa II a concentraciones de NaOH mayores al 10%. Estas características hacen que este tratamiento sea ampliamente utilizado con fines textiles pero que también ha sido aplicado en la producción CNF (Sixta 2006, Wang *et al.* 2014, Budtova y Navard 2016). A pesar de que la presencia de hemicelulosas puede ser beneficiosa para la producción de CNF, ya que sirven como barrera para la coalescencia de las microfibrillas (Iwamoto *et al.* 2008).

El uso de NaOH como pretratamiento para la producción de CNF ha sido reportado anteriormente. Wang *et al.* (2014) realizaron un tratamiento con NaOH al 17.5% (m/m) por 12 horas, seguido por varios pasos de molienda y homogenización. Las CNF obtenidas tuvieron una mejor estabilidad térmica comparados a las fibras sin tratar, pero menores propiedades mecánicas (módulo de Young de 8,6 y 11 GPa, respectivamente). Banvillet *et al.* (2021) observaron que el uso de un pretratamiento de NaOH igual o mayor al 10% (m/m) antes de un tratamiento enzimático es positivo para el aumento en la cinética y rendimiento del tratamiento con EG. Esto ocurre

debido a que a estas concentraciones de álcali la pulpa tendrá contenido de celulosa II, la cual al ser más accesible que la celulosa I, causó una mayor disminución del DP alcanzando 166 unidades en celulosa II y 340 unidades en celulosa I. Sin embargo, los nanopapeles preparados con CNF químico-enzimática presentaron una disminución importante en su resistencia mecánica, con una resistencia a la tracción de 8.94 GPa y al rasgado de 9 mN, comparado con la pulpa tratada solamente con enzimas que fueron 11.21 GPa y 31 mN, respectivamente.

Con base en los antecedentes presentados, diferentes pretratamientos y funcionalizaciones pueden proporcionar diferentes características para ser utilizadas para producir CNF. Un tratamiento alcalino puede purificar la pulpa blanqueada eliminando las hemicelulosas residuales, puede hinchar las fibras y convertir la celulosa I en celulosa II. Un tratamiento con endoglucanasas puede reducir el grado de polimerización de la celulosa. Además, la fosforilación confiere propiedades superiores a la celulosa, mayor dispersión en agua y disminuye la energía consumida en la producción de CNF. Sin embargo, ha sido poco estudiado el efecto y comparación de estos métodos como tratamientos para la producción de nanocelulosa.

En esta tesis se probaron pretratamientos enzimáticos (tratamiento con endoxilanasas y endoglucanasas) y químicos (extracción caustica fría al 15% (m/v) y tratamiento por fosforilación química) en pulpa Kraft blanqueada de eucalipto para la producción de CNF. Luego, se produjeron CNF de muestras seleccionadas por homogenización a alta presión y se elaboraron películas a partir de las CNF producidas. Las propiedades de las películas de CNF fueron determinadas y se discutieron los efectos y relevancia de los pretratamientos en la procesabilidad y propiedades de las CNF.

## **II. HIPÓTESIS**

El pretratamiento de pulpa Kraft blanqueada de eucalipto por combinación de procesos químico-enzimáticos permite generar nanofibras de celulosa con mayores propiedades de resistencia mecánica que las nanofibras obtenidas por los tratamientos realizados por separado.

## **III. OBJETIVOS**

### **III.1. Objetivo general**

Evaluar pretratamientos basados en enzimas hidrolíticas y reactivos químicos sobre pulpa Kraft blanqueada de eucalipto en la producción y propiedades de nanofibras de celulosa.

### **III.2. Objetivos específicos**

1. Producir y caracterizar pulpa Kraft blanqueada de eucalipto pretratada con enzimas hidrolíticas y reactivos químicos, en secuencia o en separado, para la producción de nanofibras de celulosa.
2. Producir nanofibras de celulosa por homogenización a partir de pulpas pretratadas con enzimas hidrolíticas y químicos en separado y secuenciales.
3. Evaluar el efecto de los pretratamientos químico-enzimáticos en las propiedades físicas y mecánicas de películas de nanofibras de celulosa.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **IV.1. Pretratamiento químico-enzimático de pulpa kraft de eucalipto blanqueada (BEKP)**

#### **IV.1.1. Material de partida**

Los tratamientos químico-enzimáticos se realizaron en una muestra inicial de pulpa Kraft de eucalipto blanqueada (BEKP) comercial donada por una empresa local de celulosa y papel compuesta por una mezcla de dos especies de eucalipto (80% *Eucalyptus nitens* y 20% *Eucalyptus globulus*). La pulpa recibida fue almacenada en cámara fría (4°C) y previo al uso fue acondicionada hasta temperatura ambiente.

#### **IV.1.2. Tratamiento enzimático con xilanasa**

Los tratamientos fueron realizados con xilanasa recombinante de *Aspergillus oryzae* (37278-89-0, Sigma-Aldrich, EE. UU). La actividad enzimática se determinó utilizando el protocolo descrito por Bailey *et al.* (1992) y se evaluaron dosis de 1, 5, 20, 50, 150 y 250 UI/g pulpa. Cada dosis fue añadida a agua nanopura (pH 5), para luego impregnar la pulpa hasta una consistencia del 3%. La incubación se realizó en matraces Erlenmeyer en una incubadora (Daihan Labtech Co., Ltd., Korea) con agitación de 150 rpm, temperatura de 50°C y tiempo de 60 min. Posterior a cada tratamiento, para la desnaturalización enzimática, la pulpa se filtró con agua caliente a 90°C utilizando un embudo Büchner, se mezcló con agua nanopura a 90°C y se dispuso en un baño de agua a 90°C por 20 min. Luego la pulpa fue filtrada y lavada con 1000 mL de agua nanopura. La efectividad de los tratamientos con xilanasas se midió por el método de solubilidad al álcali a 18% (S18) de acuerdo con la norma TAPPI T235 cm:2000.

#### **IV.1.3. Extracción cáustica en frío (CCE)**

La extracción caustica en frío (CCE) se realizó con el fin de extraer los xilanos residuales de la pulpa Kraft así como convertir parcialmente la celulosa I a II. El procedimiento se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Carrillo-Varela *et al.* (2019) utilizando una solución de NaOH al 15% (m/v) para tratar la pulpa al 10% (m/v)

de consistencia. El tratamiento se realizó en bolsas de polietileno sumergidas en baño de agua a 30°C durante 1 h. Una vez terminado, la pulpa se filtró y se lavó con abundante agua hasta alcanzar pH neutro, luego se drenó el exceso de agua hasta una consistencia de 30-35% (m/v). Esta muestra fue codificada como CCE15.

#### **IV.1.4. Tratamiento enzimático con endoglucanasa**

Los tratamientos fueron realizados con endoglucanasa comercial expresada en *Trichoderma reesei* (9012-54-8, Sigma-Aldrich, EE. UU.) con el fin de disminuir el grado de polimerización de la celulosa (determinado indirectamente por viscosidad intrínseca) para aumentar su reactividad. Esto se aplicó sobre las muestras de pulpa blanqueada (BEKP) y extraída con álcali (CCE15). Previamente, la actividad de la enzima se determinó por el método descrito por Tanaka y Taniguchi (1981). Se eligió una dosis de 50 UI/g (de pulpa), la cual se mezcló con agua nanopura (pH 5) hasta alcanzar una consistencia del 3% (m/v). El tratamiento enzimático se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL una incubadora (Daihan Labtech Co., Ltd., Korea) agitando a 120 rpm durante 1 h a 50°C. Una vez finalizado el tratamiento se filtró y se añadió agua nanopura a 90°C y se colocó en baño de agua a 90°C durante 20 min para su desnaturalización. Finalmente, la pulpa se filtró y se realizó un lavado con abundante agua, y se eliminó el exceso hasta alcanzar una consistencia cercana al 30%. Las muestras se codificaron como CCE15-EG y BEKP-EG.

#### **IV.1.5. Solubilidad en álcali (S18)**

Las pulpas pretratadas con xilanasas, extracción alcalina y endoglucanasas se caracterizaron por el método de solubilidad en álcali al 18% o S18 de acuerdo con la norma TAPPI T235 cm:2000, para determinar el porcentaje de carbohidratos de bajo peso molecular presentes en las pulpas (hemicelulosas y celulosa). Este procedimiento se basa en tratar la pulpa con una solución de NaOH al 18% (m/m) a 25°C durante 1 h. Para luego filtrar la pulpa y usar el filtrado para hacer una oxidación con dicromato de potasio y titulación con sulfato de amonio ferroso. Todas las muestras se realizaron por duplicado.

#### IV.1.6. Viscosidad intrínseca

La viscosidad intrínseca de la pulpa se determinó de acuerdo con la norma ISO 5352:2010 (E) que consiste en disolver 0,1 g de pulpa en una solución de cuprietilendiamina (Supelco, Inc., EE.UU.) 0,5 M. Luego se vertió parte de la solución en un viscosímetro capilar del tipo "Ostwald" y se anotó el tiempo que tarda la muestra en pasar de una línea superior a otra inferior en el viscosímetro. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

#### IV.1.7. Difracción de rayos X (XRD)

El efecto de los tratamientos en la estructura supramolecular de la celulosa (cristalinidad y tamaño de cristal) se determinó por difracción de rayos X (XRD). Las muestras se prepararon presionando 50 mg de fibras liofilizadas en una prensa hidráulica para formar pellets. Los pellets se colocaron en un porta-muestras y los difractogramas se recolectaron en un difractómetro de rayos X D4 Endeavor (Bruker AXS GmbH, Alemania) con radiación monocromática Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 0,154$  nm) a 40 kV y 20 mA. Las intensidades se midieron en el rango de  $5^\circ < 2\theta < 45^\circ$ , con pasos de exploración de  $0,02^\circ$ . El ajuste de la curva se realizó con el software PeakFit (Systat Software Inc., EE. UU.) y el software OriginPro 2023 (OriginLab Co., EE. UU.) para identificar picos individuales. En todos los casos, el  $r^2 < 0,95$ . El índice de cristalinidad XRD aparente (CrI) de las muestras se calculó a partir de deconvolución de áreas a través de la Ecuación (1) (Park *et al.* 2010).

$$(1) \text{ CrI (\%)} = \frac{A_{\text{Cristales}}}{A_{\text{Total}}} \times 100$$

donde  $A_{\text{Cristales}}$  es la suma de las áreas de bandas cristalinas y  $A_{\text{Total}}$  es el área total bajo el difractograma.

A partir de la suma del área de los picos del mismo sistema cristalino ( $\Sigma_{\text{ACI}}$  para celulosa I y  $\Sigma_{\text{ACII}}$  para celulosa II), se calcularon los porcentajes de celulosa I y celulosa II utilizando las Ecuaciones (2) y (3) (Carrillo-Varela *et al.* 2018).



$$(2) \text{ Cellulose I (\%)} = \frac{\sum A_{CI}}{\sum A_{ACI+ACII}} \times CrI$$

$$(3) \text{ Cellulose II (\%)} = \frac{\sum A_{CII}}{\sum A_{ACI+ACII}} \times CrI$$

El tamaño del cristalito lateral ( $L_{(200)}$ ) se calculó a partir de la Ecuación de Scherrer (4) (Scherrer 1918).

$$(4) L_{(200)} = \frac{k \times \lambda}{\beta \times \cos \theta}$$

donde  $L$  es el tamaño del cristalito (nm),  $k$  es la constante de Scherrer (0,96),  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X,  $\beta$  es la mitad del máximo de ancho completo (FWHM) de la reflexión (200) en radianes, y  $\theta$  es el ángulo de Bragg correspondiente al plano (200).

#### **IV.1.8. Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

Fracciones de las pulpas provenientes de los diferentes ensayos fueron liofilizadas y, posteriormente, se montaron en porta-muestras para aplicar un recubrimiento conductor utilizando un metalizador (SPI-MODULE sputter, EE. UU.). El recubrimiento de oro se realizó durante 60 s. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6380LV, Japón) para la captura de imágenes. Se obtuvieron micrografías SEM a niveles de aumento de 20  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ .

#### **IV.1.9. Fosforilación química de pulpas**

La fosforilación se realizó sumergiendo las pulpas químico-enzimáticas en una solución de relación molar 1,0/0,6/8,0 de AGU/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (unidad anhidro glucosa/fosfato diamónico/urea). La suspensión se mezcló, se dejó reposar durante 20 min y luego se secó a 60°C en estufa durante 16 h. La reacción de fosforilación se realiza en estufa a 150°C durante 1 h. La celulosa modificada obtenida se lavó con abundante agua nanopura. Finalmente, se drenó a aproximadamente 20% de consistencia y se almacenó en frío a 4°C.

#### **IV.1.10. Microscopia electrónica de barrido con sonda de rayos X de dispersión de energía (SEM-EDS)**

Como análisis semicuantitativo de los elementos fósforo, carbono y oxígeno se realizó microscopia electrónica de barrido (JEOL JSM-6380LV, Japón) detallada en la sección IV.1.8., pero esta vez utilizando la sonda de rayos X de dispersión de energía (EDS) incorporada. El SEM-EDS fue conectado a una computadora personal para la captura de imágenes.

#### **IV.1.11. Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)**

Las muestras liofilizadas se analizaron en un espectrofotómetro FTIR IRAffinity-1S con reflectancia total atenuada (ATR) (Shimadzu Co., Japón). Los espectros se registraron en la región de 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ . Luego fueron normalizados (0,1) y tratados con el filtro de Savitzky–Golay (22 pts) en el software OriginPro 2023 (OriginLab Co. EE. UU.).

#### **IV.1.12. Titulación conductimétrica**

Los experimentos se realizaron para determinar el contenido de carga negativa, siguiendo el método descrito por Saito y Isogai (2004), que consistió en disponer 0,3 g de pulpa en 50 mL de agua nanopura y agregar 5 mL de NaCl (0,01 M) mientras se agita durante 5 min hasta obtener una mezcla homogénea. A partir de ese momento se empezó a añadir HCl (0,1 M) hasta alcanzar un pH cercano a 2,5-3 sin dejar de agitar la suspensión. Luego, se agregó NaOH (0,01 M) en dosis de 1 mL en pulpas fosforiladas y 250  $\mu\text{L}$  en pulpas sin fosforilar mientras se anotaba la conductividad y el pH hasta llegar a pH 11. El contenido de carga superficial negativa en la pulpa se calculó con la Ecuación (5).

$$(5) \text{ Contenido de carga superficial negativa} = \frac{C_{\text{NaOH}} \cdot (V_2 - V_1)}{M_{\text{Celulosa}}}$$

Donde  $C_{\text{NaOH}}$  es la concentración de NaOH (0,01 M),  $V_1$  es el volumen que ocupó hasta llegar al punto de inflexión 1 donde se consume por completo el ácido fuerte (HCl) y

comienza el consumo del ácido débil,  $V_2$  es el volumen donde se produjo el exceso de NaOH (punto de inflexión 2) y  $M_{\text{Celulosa}}$  es la masa de la celulosa (0,3 g).

#### IV.1.13. Adsorción de azul de metileno (MB)

La capacidad absorbente de colorantes catiónicos de la celulosa sin fosforilar y fosforilada se investigó siguiendo el método descrito por Carrillo-Varela et al. (2022) por duplicado. Se adicionaron 20 mL de azul de metileno (MB) en un rango de concentración de 10 a 120 mg/L, en el caso de pulpa no fosforilada y, de 250 a 1250 mg/L, para pulpa fosforilada, en tubos Falcon con 15 mg (peso seco) de pulpa nunca seca (humedad de 20% aproximadamente). Los tubos se colocaron en un agitador-incubador orbital (Edmund Bühler, Alemania) a temperatura ambiente y con agitación a 100 rpm durante 24 h. La concentración de MB en solución se midió utilizando un espectrofotómetro UV-Vis-1280 (Shimadzu Co., Japón). Los datos se recogieron a 664 nm (el *peak* máximo de absorbancia observado para MB). La capacidad de adsorción de MB de pulpas de celulosa fosforiladas y no fosforiladas nunca secadas se calculó utilizando la Ecuación (6).

$$(6) q_e = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{m}$$

donde  $C_0$  y  $C_e$  son las concentraciones iniciales y de equilibrio de MB (mg/L), respectivamente,  $V$  es el volumen de solución de MB (L) y  $m$  es la masa en peso seco de la pulpa de celulosa (g).

Los modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich se estudiaron utilizando las funciones de ajuste de curvas del software OriginPro 2023 (OriginLab Co., EE. UU.). La expresión no lineal del modelo de isoterma de Langmuir viene dada por la Ecuación (7) (Langmuir 1916).

$$(7) q_e = q_{\max} K_L \frac{C_e}{1 + K_L C_e}$$

donde  $q_e$  y  $q_{\max}$  son la capacidad de adsorción en equilibrio y la capacidad máxima de adsorción (mg/g), respectivamente,  $C_e$  es la concentración de solución de MB en la

etapa de equilibrio (mg/L), y  $K_L$  es la constante de Langmuir (L/mg), que se relaciona con la energía libre y la afinidad de adsorción.

La expresión no lineal del modelo de isoterma de Freundlich viene dada por la Ecuación (8) (Freundlich 1906).

$$(8) q_e = K_F C_e^{1/n}$$

donde  $K_F$  y  $n$  son constantes relacionadas con la capacidad de adsorción (L/mg) y la intensidad de adsorción del hidrogel, respectivamente. Los parámetros de Langmuir y Freundlich se estimaron utilizando las funciones de ajuste de curvas del software OriginPro 2023 (OriginLab Co., EE. UU.).

## **IV. 2. Nanocelulosas**

### **IV. 2. 1. Preparación de nanocelulosas**

Las muestras utilizadas para la preparación de nanocelulosa fueron las muestras BEKP-EG, BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P y CCE15-EG-P. Las nanocelulosas se prepararon al 1% de consistencia en un homogeneizador de alta presión NS1001 PANDA 2 K-GEA (GEA Group AG, Alemania) donde la suspensión de fibras fue sometida 9 veces a presión creciente siendo 3 veces a 300 bar, 3 veces a 600 bar y 3 veces a 900 bar. Posteriormente, fueron conservadas en botellas de plástico a 8°C hasta su utilización en la producción de películas de nanocelulosa.

### **IV. 2. 2. Preparación y caracterización de películas de nanocelulosa**

Las películas se prepararon mediante *drop-casting* vertiendo el equivalente a 20 g/m<sup>2</sup> de nanocelulosa en una placa de Petri de plástico (9 cm de diámetro), dejándose evaporar el agua a temperatura ambiente por aproximadamente 48 h. La caracterización de las películas de nanocelulosa consistió en determinar las siguientes propiedades:

**Opacidad:** representa el nivel de transparencia de las películas y se midió en un espectrocolorímetro portátil CAPSURE (X-Rite Inc., EE. UU.) utilizando la función "comprobación de opacidad", la cual consiste en la captura de imagen de 8 mm de la película contra un fondo blanco y uno negro por 1.8 s con una iluminación de 25 LED (8 longitudes de onda visibles, 1 UV) en una cámara monocromática. Se realizaron las mediciones de las muestras en duplicado.

**Tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR):** se cuantificó por el método *dry cup* (norma TAPPI T448:1997). Para ello, las películas de nanocelulosa se colocaron en vasos impermeables de mismas dimensiones que contenían gel de sílice. Los vasos se sellaron con un O-ring y se mantuvieron en una sala acondicionada a 23°C y 50% de humedad relativa por 8 h. Durante este periodo, el peso de las películas fue registrado en balanza analítica (Kern & Sohn GmbH, Alemania) cada 1 h por 8 h. Se realizó la prueba en duplicado y el WVTR se calculó utilizando la Ecuación (9).

$$(9) \text{ WVTR} = \frac{\Delta w}{A \times t}$$

donde  $\Delta w$  es el incremento de peso hasta el tiempo  $t$  y  $A$  es el área de transmisión.

**Espesor:** consistió en medir el espesor de cada película de CNF usando un micrómetro digital D-2000 (Electromatic Equipment Co., Inc. EE. UU.) provisto de dos superficies de presión circular plana y paralela entre sí (norma ISO 534:2005). Se realizó en triplicado.

**Porosidad Gurley:** consistió en determinar la permeabilidad al aire de las películas de CNF utilizando el aparato Gurley (Kumagai Riki Kogyo Co., Ltd., Japón), midiendo el tiempo (s) que tarda en pasar 100 mL de volumen de aire a través de la película en una superficie de 642 mm<sup>2</sup> a 1,22 kPa de presión (norma ISO 5636-5:2013). Se repitió la prueba 5 veces por muestra.

**Índice de resistencia a la tracción:** se determinó en una máquina universal de ensayos Instron TM 1122 (Instron, EE. UU.) de acuerdo con la norma ISO 1924:2008. El ensayo consistió en montar las muestras de 15 cm de largo y 15 mm de ancho en el equipo y medir la elongación a una velocidad constante de 20 mm/min hasta la fractura del material. Se realizó el ensayo en triplicado.

**Índice de resistencia a la explosión:** se determinó con un sistema hidráulico digital EM-50 (IDM Instruments Pty Ltd, Australia) de acuerdo con la norma ISO 2758:2001. El ensayo consistió de dejar sujeta la película de CNF al diafragma del sistema hidráulico para medición de la presión ejercida (tasa de bombeo de 95 mL/min) sobre un área circular de 30.5 mm de diámetro hasta la explosión del material. Se realizó el ensayo por triplicado.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1. Tratamiento con xilanasas

La Figura 1 muestra los resultados de la solubilidad en álcali al 18% de las pulpas tratadas con xilanasas de *Aspergillus oryzae*. Las dosis probadas (1, 5, 20, 50, 150 y 250 UI/g) presentaron valores de S18 entre 8,37%-9,37%. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre las diferentes dosis aplicadas y el control, las pulpas presentan contenidos similares de polisacáridos extraíbles (hemicelulosas y celulosa de baja masa molecular) en las condiciones ensayadas.

Almlöf (2013) también reportó este fenómeno utilizando tratamiento de 50 UI/g de xilanasas Pulpzyme HC de especies de *Bacillus* modificadas genéticamente (Novozymes AS, Denmark). En los resultados de S18 obtuvo valores de 6,8% para la pulpa tratada con xilanasas mientras que el control fue 2.1%. El autor también estimó la composición de carbohidratos siguiendo el estándar SCAN-CM 71:2009, basado en un tratamiento de hidrólisis ácida para la obtención de monosacáridos y su cuantificación mediante cromatografía iónica. Utilizando este método el porcentaje de celulosas fue de 97% y de hemicelulosas fue de un 3%, tanto en la pulpa tratada con xilanasas como en el control.

Por otro lado, autores como Köpcke (2008) y Ibarra *et al.* (2010) han propuesto agregar una etapa de extracción alcalina al 9% luego del tratamiento con xilanasas como una alternativa para bajar la carga química necesaria para extraer los xilanos, esto sería contraproducente teniendo en cuenta que se ha reportado que un tratamiento alcalino de extracción caustica fría al 10% NaOH es adecuado para obtener pulpas Kraft de eucalipto con menos del 2% de xilanos residuales (Carrillo-Varela *et al.* 2019). Dado los resultados obtenidos, se decidió no utilizar el pretratamiento con xilanasas como parte del trabajo experimental realizado en las siguientes etapas de esta tesis.

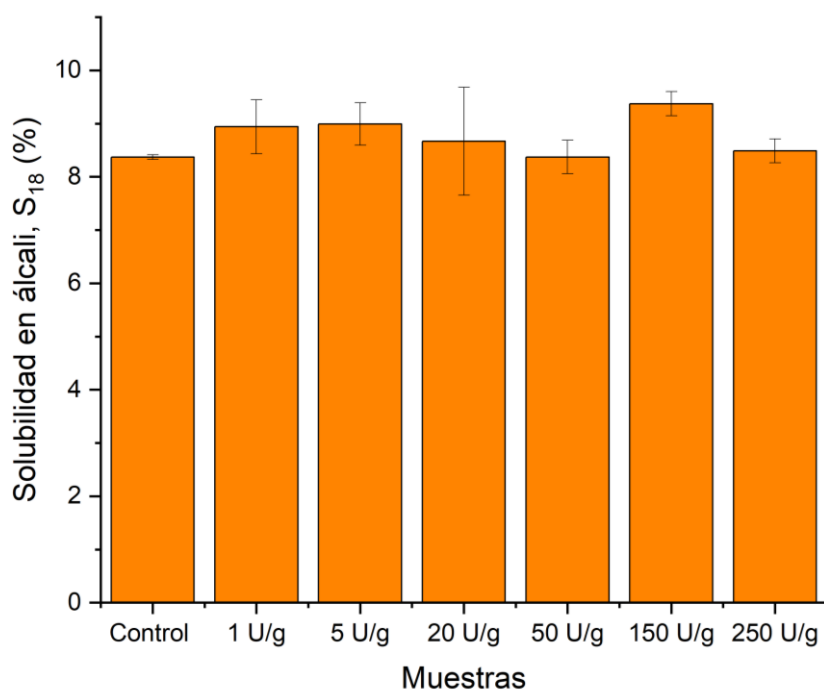


Figura 1. Solubilidad en álcali (S18) de pulpas Kraft blanqueadas de eucalipto (BEKP) tratadas con enzima xilanasa de *Aspergillus oryzae*.

## V.2. Pretratamiento químico-enzimático de pulpa Kraft de eucalipto blanqueada (BEKP)

El pretratamiento químico enzimático utilizado en la pulpa Kraft blanqueada de eucalipto (BEKP) fue la extracción alcalina con NaOH al 15% (CCE15) para remoción de xilanos residuales (en reemplazo de la xilanasa) y el uso de endoglucanasa (EG) de *T. reesei* para reducir la viscosidad intrínseca de la celulosa. La síntesis de resultados obtenidos en la caracterización de las diferentes muestras se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización de las pulpas de celulosa.

Muestra	S18 (%)	Viscosidad intrínseca (mL/g)	CrI (%)	CI (%)	CII (%)	L <sub>200</sub> (nm)
BEKP	8,57 ± 0,24	729 ± 27	60,2	60,2	-	4,2
BEKP-EG	11,10 ± 0,41	578 ± 8	69,0	69,0	-	4,4
CCE15	1,98 ± 0,18	502 ± 15	58,6	17,7	41,0	4,6
CCE15-EG	1,46 ± 0,16	457 ± 11	61,5	20,9	40,5	3,9



El método de solubilidad en álcali S18 permitió determinar el contenido de xilanos residuales y celulosa de baja masa molar que fueron disueltos en álcali a esta concentración (Sixta 2006, Carrillo-Varela *et al.* 2018). La pulpa blanqueada (BEKP) presentó un S18 de 8,57%, este porcentaje disminuye en las pulpas tratadas con álcali al 15%, llegando a un 1,98% y 1,46%, en las muestras CCE15 y CCE15-EG, respectivamente. Estos resultados eran esperables debido a que a estas concentraciones de álcali la fibra está más hinchada lo que favorece la remoción de hemicelulosas (Carrillo-Varela *et al.* 2019). La muestra BEKP-EG presentó un incremento de 2,57% comparado a BEKP debido al tratamiento enzimático, el cual produjo un mayor contenido de celulosa de bajo peso molecular que se disolvió junto con los xilanos (Kaur *et al.* 2021).

Por otro lado, la viscosidad intrínseca también se vio afectada por los tratamientos químico-enzimáticos (Tabla 1). La muestra BEKP presentó una viscosidad intrínseca de 729 mL/g, al ser tratada con CCE15% disminuyó a 502 mL/g. Carrillo-Varela *et al.* (2022b) atribuyeron este fenómeno a que los tratamientos con NaOH a altas concentraciones (17,5%) son capaces de hidrolizar enlaces glucosídicos y solubilizar cadenas de baja masa molar. El tratamiento EG también disminuyó la viscosidad intrínseca, presentando 578 mL/g en la muestra BEKP-EG. Mientras que la muestra con la viscosidad más baja fue la tratada con álcali y endoglucanasa (CCE15%-EG) con valor de 457 mL/g, demostrando un efecto de los dos tratamientos sobre la celulosa residual.

El efecto de los tratamientos químico-enzimáticos en la estructura supramolecular de la celulosa se pueden visualizar en los difractogramas de rayos X (XRD) después de la deconvolución de *peaks* (Figura 2). Los patrones de difracción observados en las muestras de BEKP son consistentes con la estructura de la celulosa I (Figura 2A y 2C). Estos difractogramas mostraron *peaks* a  $14,8^\circ$ ,  $16,5^\circ$  y  $22,3^\circ$   $2\theta$ , asignados a los planos cristalográficos (1-10), (110) y (200), respectivamente, y la reflexión de  $34,5^\circ$   $2\theta$  se asignó al plano (004) de celulosa I (Carrillo-Varela *et al.* 2019). Sin embargo, para la muestra tratada con NaOH al 15%, la reflexión de  $22,3^\circ$   $2\theta$  disminuye y, las reflexiones en las posiciones de  $2\theta$   $12^\circ$ ,  $20^\circ$  y  $21,6^\circ$ , son consistentes con la estructura de la celulosa II (Figura 2B y 2D). Estas reflexiones se asignan a los índices de Miller de (1-10), (110) y (020), respectivamente, además de la reflexión a  $34,5^\circ$   $2\theta$ , asignada al

plano (004) de la celulosa II (Carrillo-Varela *et al.* 2019). Con respecto a los difractogramas de las muestras tratadas con EG (Figura 2C y 2D), muestran que la enzima no tuvo efecto en la estructura de los polimorfos, como era esperado.

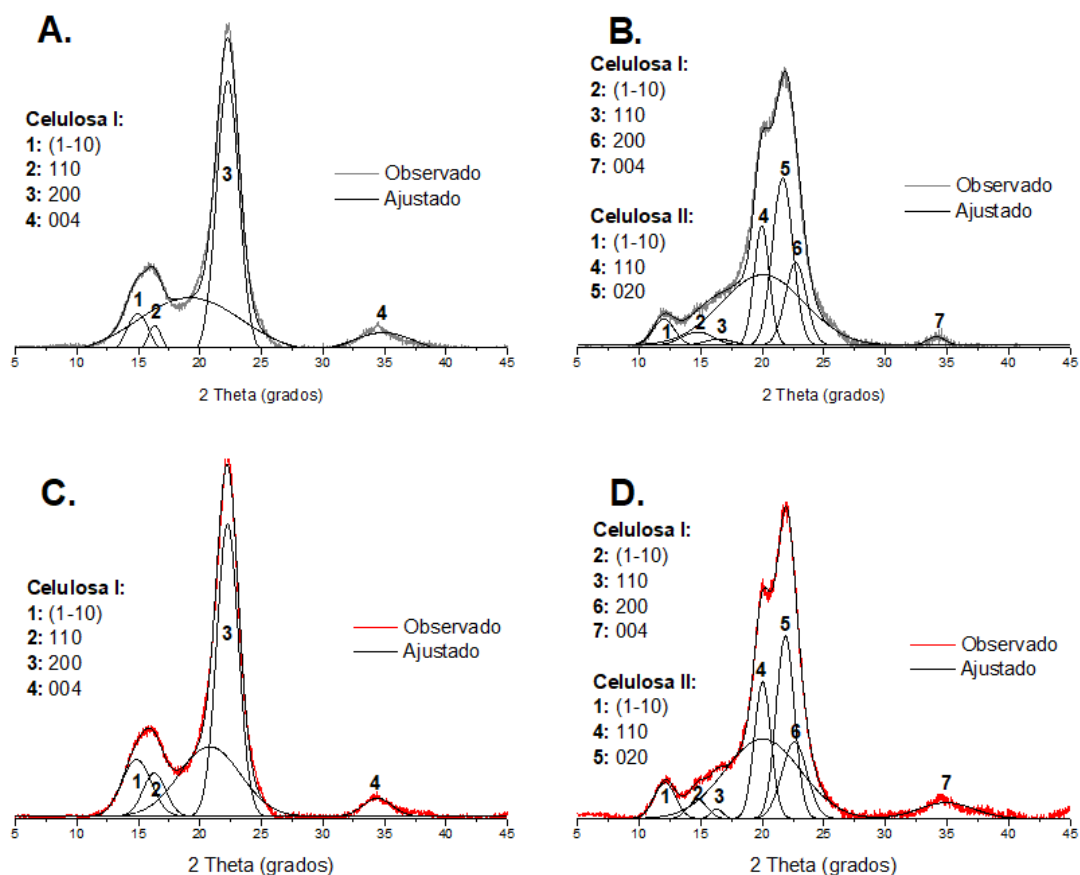


Figura 2. Difractogramas XRD de ajuste de curvas. Muestras: (A) BEKP, (B) CCE15, (C) BEKP-EG y (D) CCE15-EG.

En la Tabla 1 se muestran los valores de cristalinidad (Crl) y proporciones de celulosa I (CI) y celulosa II (CII) en las muestras. El tratamiento con NaOH al 15% provocó una disminución del grado de cristalinidad, donde BEKP tuvo un 60,2% del Crl mientras que CCE15 presentó un 58,6%. Oudiani *et al.* (2011) reportaron una disminución considerable del Crl a concentraciones de NaOH superiores al 2% atribuido a la mercerización, que conduce a un reordenamiento de las cadenas de celulosa. El tratamiento EG influyó en el incremento del Crl de 60,2% en BEKP a un 69% en BEKP-EG y de 58,6% en CCE15% a un 61,5% en CCE15%-EG. Esto ocurre porque las enzimas degradan las cadenas amorfas de celulosa, facilitando su extracción posterior y aumentando proporcionalmente el contenido de celulosa cristalina (Beyene *et al.* 2018, Tonoli *et al.* 2021). La Tabla 1 también muestra el contenido de celulosa I (CI) y

de celulosa II (CII), revelando que la estructura cristalina del polimorfo de celulosa II predomina en todas las pulpas tratadas con NaOH al 15%. Durante este proceso, el álcali penetra en las fibras de celulosa, causando su hinchamiento, luego, las cadenas de celulosa se reorganizan convirtiendo la celulosa nativa I (cadenas alineadas en paralelo) a celulosa II (antiparalela) (Oudiani *et al.* 2011, Carrillo-Varela *et al.* 2019).

Los resultados del tamaño lateral del cristalito de celulosa I (200) ( $L_{(200)}$ ) muestran que el tratamiento con NaOH al 15% provocó un incremento del  $L_{(200)}$  de 4,2 nm en BEKP a 4,6 nm en CCE15. Explicaciones para este incremento se relacionan por la unión o coalescencia de dos o más cristales que forman un cristal más grande, causada por hornificación o unión irreversible de sitios hidrofóbicos en la microfibrilla (Newman 2004, Daicho *et al.* 2021, Solhi *et al.* 2023), una reorganización de las cadenas de celulosa después de la remoción de las hemicelulosas, por aumento de los enlaces intermoleculares de hidrógeno (Carrillo-Varela *et al.* 2018). El tratamiento EG tuvo un efecto en el  $L_{(200)}$  en las muestras BEKP y CCE15, presentando en BEKP-EG un incremento de 0,2 nm, atribuido a la degradación de las regiones amorfas, produciendo un incremento de celulosa cristalina (Verma *et al.* 2016, Tonoli *et al.* 2021). Por otro lado, cuando el tratamiento EG se realiza en celulosa II (CCE15-EG), la  $L_{(200)}$  disminuyó 0.7 nm. Lo que puede estar asociado al cambio en el orden de la estructura cristalina, aumentando la accesibilidad de la enzima (Ferro *et al.* 2020, Tonoli *et al.* 2021).

La apariencia a nivel microscópico de las fibras de la pulpa blanqueada (BEKP) y pulpas tratadas con enzimas químicas se pueden observar en las imágenes SEM presentadas en la Figura 3. Las imágenes de BEKP (Figura 3A, 3B y 3C) muestran que el espacio entre las fibras era estrecho y que eran rugosas en la superficie. La muestra BEKP-EG (Figura 3D, 3E y 3F) presentó fibras más delgadas que BEKP, pero la misma rugosidad superficial. Por otro lado, las fibras de la muestra CCE15 (Figura 3G, 3H e 3I) estaban hinchadas y también mostraron un mayor adelgazamiento de fibras comparado a BEKP, debido a un aumento del área de superficie causada por la mercerización (Kunusa *et al.* 2018). La muestra de CCE15-EG (Figura 3J, 3K y 3L) es visiblemente diferente de todas las demás pulpas, porque conserva algo de la hinchazón causada por el tratamiento CCE15, pero su superficie está rugosa por el tratamiento enzimático.

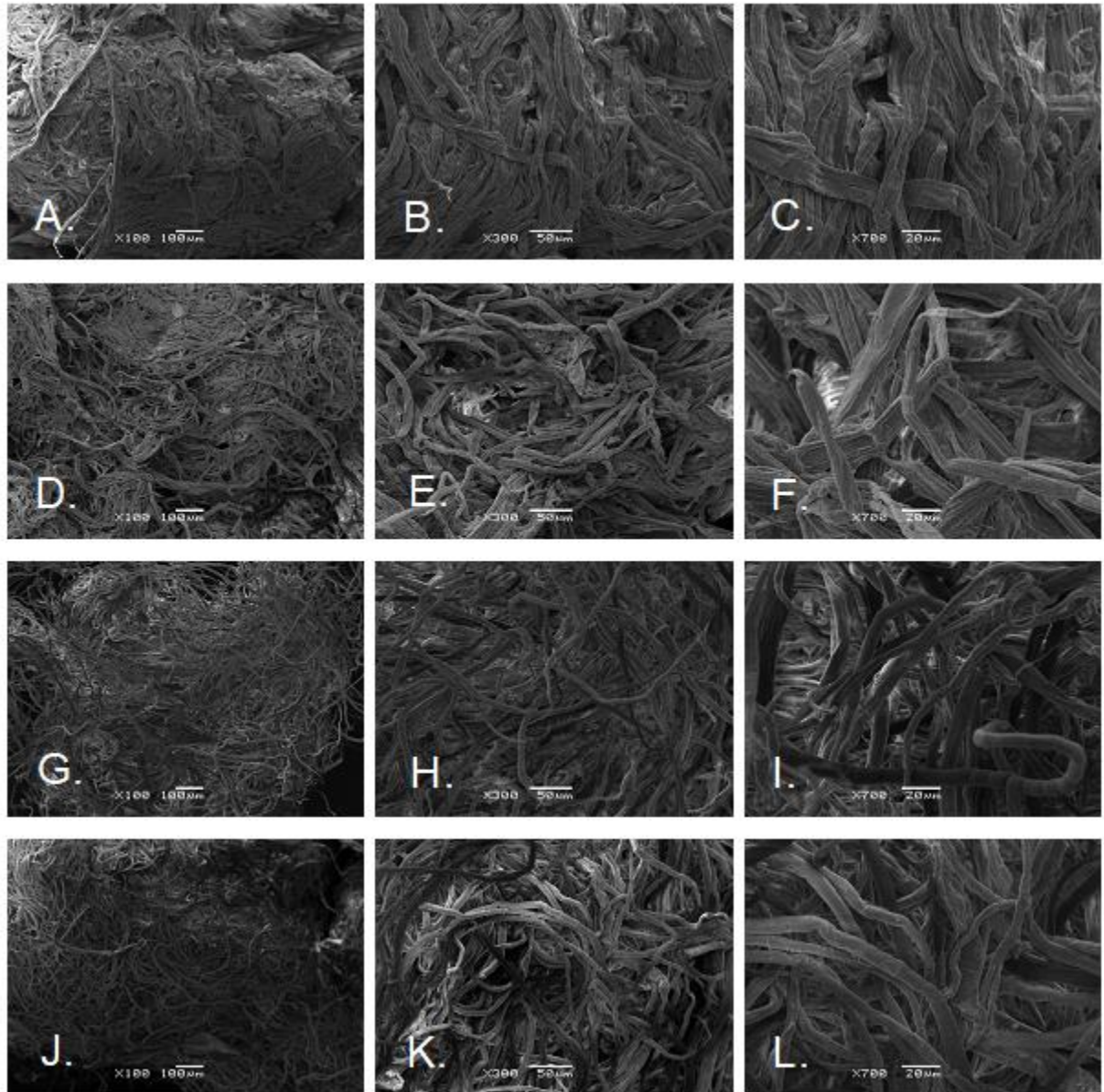


Figura 3. Microscopia electrónica de barrido (SEM) a 100, 50 y 20  $\mu\text{m}$  de (A, B y C) BEKP, (D, E y F) BEKP-EG, (G, H e I) CCE15 y (J, K y L) CCE15-EG.

### V.3. Fosforilación de las pulpas de celulosa

Los espectros FTIR-ATR de pulpas fosforiladas y no fosforiladas son mostrados en la Figura 4. Este análisis se utilizó para verificar la presencia de grupos funcionales asociados a fósforo, indicando que la fosforilación ocurrió en la celulosa. Las vibraciones en longitud de onda  $3340\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los grupos O-H, en la longitud  $2890\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los grupos C-H. En el caso de las muestras fosforiladas, se observó la aparición de señales correspondientes a los grupos C=O en la longitud de onda  $1730\text{ cm}^{-1}$ , grupos P=O en  $1230\text{ cm}^{-1}$ , grupos P-OH en  $920\text{ cm}^{-1}$  y

grupos P-O-C en  $830\text{ cm}^{-1}$  (Lehtonen *et al.* 2020, Hadid *et al.* 2021). La presencia del grupo C=O indica que ocurrió oxidación de las fibras por causa de la fosforilación, ha sido reportado que este fenómeno aumenta al realizar un mayor tiempo de reacción (Ghanadpour *et al.* 2015).

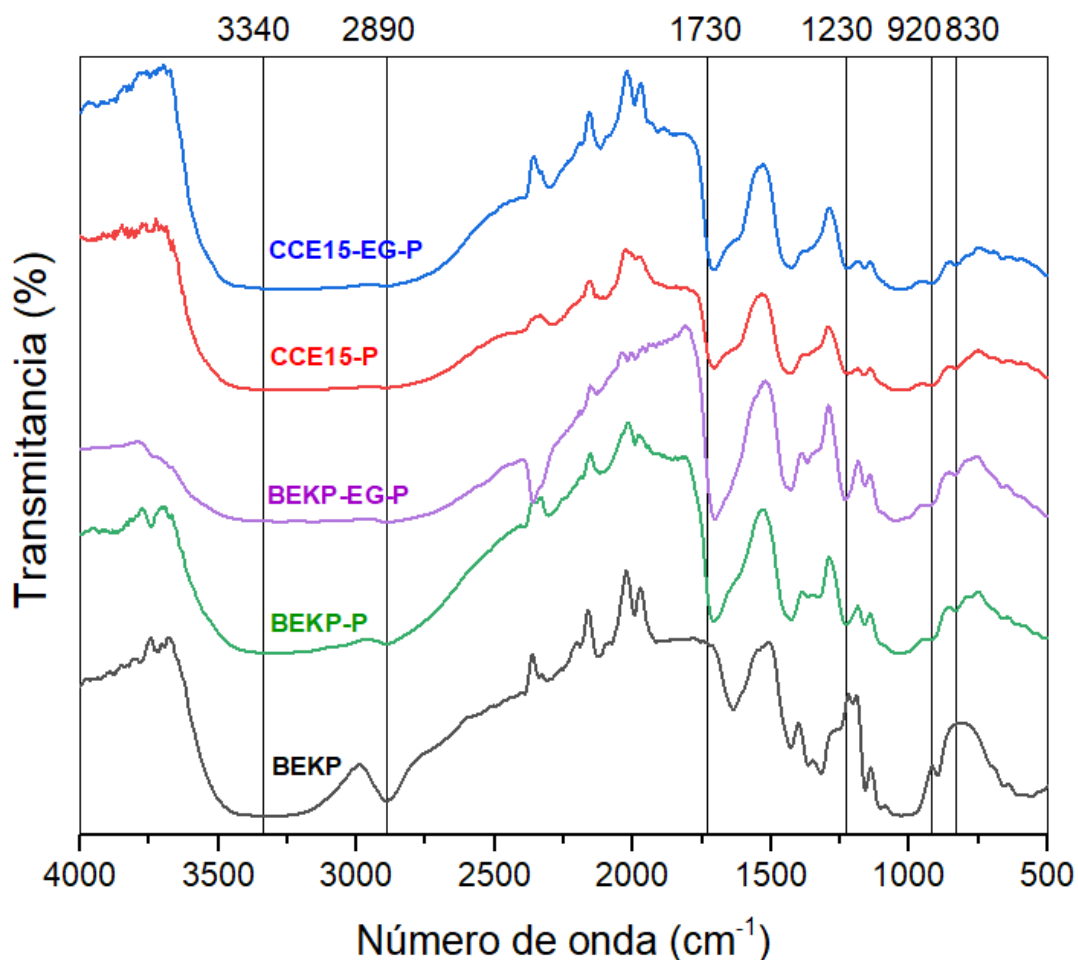


Figura 4. Espectros ATR-FTIR de pulpa Kraft blanqueada de eucalipto (BEKP) y pulpas fosforiladas (BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P, CCE15-EG-P).

El efecto de los tratamientos químicos-enzimáticos en la biometría de las fibras de las pulpas no fosforiladas y fosforiladas se presentan en la Tabla 2. La muestra BEKP presentó fibras con una longitud promedio de 0,715 mm, luego cuando la pulpa fue tratada con EG este valor disminuyó levemente a 0,699 mm. Las fibras de las muestras de CCE15 tenían una longitud mucho menor (0,535 mm) que las otras muestras mencionadas provocada por la hidrólisis parcial de la celulosa en condiciones alcalinas (Ji *et al.* 2018). Sin embargo, en la muestra CCE15-EG el valor se eleva a 0,551 mm, debido a que las fibras más cortas fueron hidrolizadas, aumentando la proporción de

fibras largas. La fosforilación no provocó efectos en la biometría de las fibras de la muestra BEKP, pero sí en las pulpas químico-enzimáticas, disminuyendo su diámetro, aumentando su ancho y generando más finos. El acortamiento de las fibras y el aumento del contenido de finos es habitual en tratamientos de fosforilación tan prolongados. Mientras que el ancho aumentó debido a la presencia de grupos fosfato, ya que al ser hidrofílicos provocan un mayor hinchamiento de las fibras (Hou *et al.* 2022).

Tabla 2. Biometría de fibras de pulpas no fosforiladas y fosforiladas.

Muestras	Longitud (mm)	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Finos (%)
BEKP	0,715 $\pm$ 0,004	18,6 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,1
BEKP-EG	0,699 $\pm$ 0,001	17,8 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,4
CCE15	0,535 $\pm$ 0,006	17,7 $\pm$ 0,5	6,7 $\pm$ 0,6
CCE15-EG	0,551 $\pm$ 0,006	17 $\pm$ 0	6,2 $\pm$ 0,8
BEKP-P	0,697 $\pm$ 0,003	19 $\pm$ 0	4,4 $\pm$ 0,3
BEKP-EG-P	0,525 $\pm$ 0,004	25,4 $\pm$ 0,1	24 $\pm$ 4
CCE15-P	0,54 $\pm$ 0,07	21,9 $\pm$ 0,9	22 $\pm$ 3
CCE15-EG-P	0,61 $\pm$ 0,02	26,5 $\pm$ 0,4	8,35 $\pm$ 0,07

La Figura 5 presenta las distribuciones (por clase de tamaño) de las pulpas no fosforiladas (Figura 5. A) y fosforiladas (Figura 5. B). Con respecto a las muestras no fosforiladas, CCE15 y CCE15-EG presentan una mayor proporción (0,51 y 0,49, respectivamente) de fibras cortas (0,2-0,5 mm) que las muestras BEKP y BEKP-EG (0,23 y 0,25, respectivamente). Mientras que estos últimos tienen un mayor contenido de fibra entre 0,7 a 4 mm. Confirmándose la influencia del tratamiento alcalino sobre el tamaño de las fibras, mientras que el efecto del tratamiento con EG es mínimo. Otra tendencia se observa en las pulpas fosforiladas. Aunque las fibras BEKP-P no son diferentes a las fibras BEKP, las fibras de la muestra BEKP-EG-P presentaron un alto porcentaje de fibras cortas (0,57%), demostrando la influencia del pretratamiento con EG y fosforilación, por acortamiento de fibras. Sin embargo, este valor disminuye en las muestras de CCE15, probablemente debido a la disolución o pérdida de fibras cortas y finos durante la fosforilación.

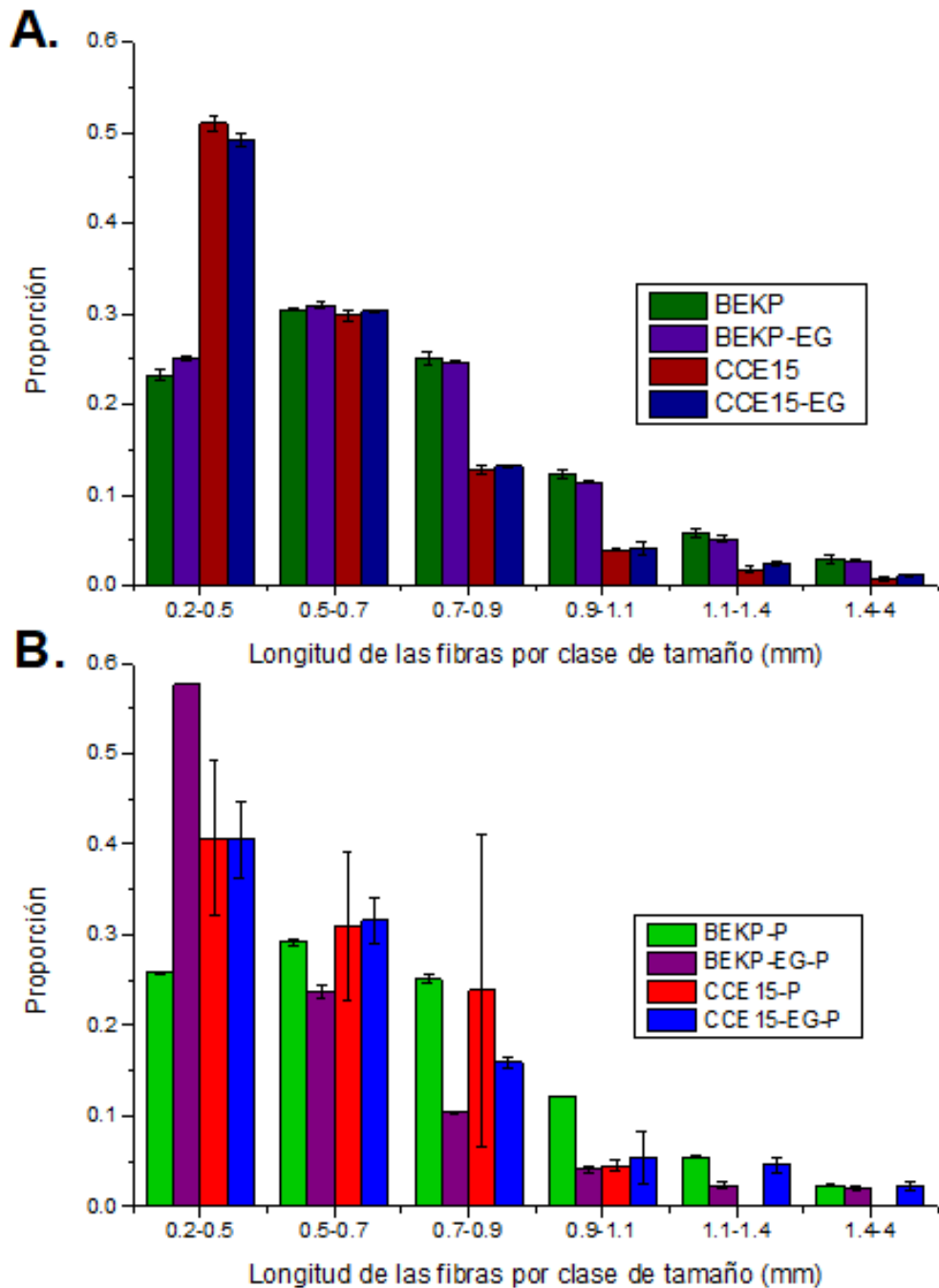


Figura 5. Distribución de clases de longitud de fibra de pulpas químico-enzimáticas A. no fosforiladas y B. fosforiladas.

Las muestras CCE15-EG y CCE15-EG-P fueron seleccionadas para la realización de SEM-EDS (Figura 6). En ellas no se observan cambios morfológicos aparentes debido a la fosforilación. Se utilizó EDS como análisis semicuantitativo para comparar los porcentajes de elementos presentes en la superficie de pulpas fosforiladas y no fosforiladas. Los espectros EDS muestran la presencia de elementos de carbono y oxígeno en sus energías de enlace correspondientes alrededor de 0,2 y 0,5 keV.

CCE15-EG-P tiene la presencia de un peak adicional del elemento fósforo en torno a 2 keV, que corresponde a un 2,98 % (% en masa) de contenido de fósforo en la muestra.

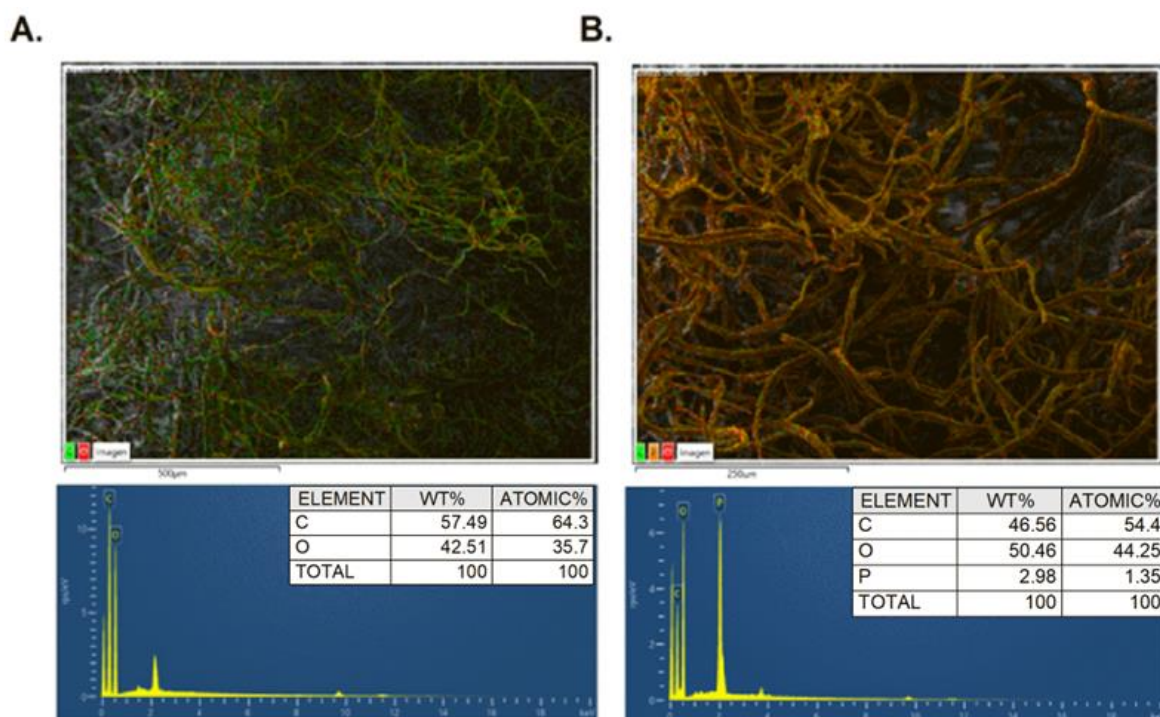


Figura 6. Micrografías SEM y espectros de rayos X de dispersión de energía (EDS) de (A) CCE15-EG y (B) CCE15-EG-P.

Para conocer el contenido de carga superficial negativa en las fibras y dar una idea de la cantidad de fosfato en la pulpa se ha utilizado el método de titulación conductimétrica. La primera región corresponde al consumo de protones libres fuertes ( $H^+$ ) presentes en solución, lo que conduce a una importante disminución de la conductividad debido a la adición de NaOH. La segunda región está relacionada con la neutralización de los ácidos débiles ( $COOH$  y  $P-OH$ ) presentes en la superficie de la celulosa que nos permiten determinar el contenido de carga total, y la región final se asigna al exceso de NaOH agregado ( $-OH$ ) (Ablouh *et al.* 2021, Ait *et al.* 2021). En la tabla 3 se encuentran la determinación de la carga superficial negativa (mmol/g), las pulpas no fosforiladas oscilaron entre 0,0596 y 0,08 mmol/g. Por otro lado, las pulpas fosforiladas tuvieron valores entre 2.87 a 3.83 mmol/g, estas diferencias son por el carácter polianiónico del fosfato (Ablouh *et al.* 2021). El contenido de carga superficial negativa no presentó una tendencia clara respecto de los pretratamientos probados mediante el método de titulación conductimétrica. A pesar de ello, la pulpa con un mayor contenido de cargas



negativas superficiales fue la realizada a partir de la muestra CCE15-EG con 3,83 mmol/g.

Tabla 3. Contenido de carga negativa de pulpas no fosforiladas y fosforiladas.

Muestras	Pulpas no fosforiladas (mmol/g)	Pulpas fosforiladas (mmol/g)
BEKP	0.080 ± 0.002	3.13 ± 0.07
BEKP-EG	0.0596 ± 0.0009	2.87 ± 0.08
CCE15	0.0736 ± 0.0008	3.21 ± 0.25
CCE15-EG	0.070 ± 0.002	3.83 ± 0.34

La Figura 7 muestra experimentos de adsorción realizados a diferentes concentraciones de azul de metileno (MB) en el rango de 50 a 1500 mg/L para pulpas fosforiladas (Figura 7B) y de 5 a 80 mg/L en el caso de pulpas no fosforiladas (Figura 7A). Estos experimentos se basan en la evolución de la adsorción de MB, para determinar la concentración remanente en solución en equilibrio (Hadid *et al.* 2021). Los modelos de isoterma de Langmuir y Freundlich se utilizan para describir el mecanismo de adsorción, donde el modelo de Langmuir asume que la adsorción ocurre en la superficie en forma homogénea sin interacción entre las moléculas adsorbidas y el modelo de Freundlich asume que la adsorción ocurre en la superficie en forma heterogénea con interacción entre las moléculas adsorbidas por adsorción escalonada en multicapa, lo que significa que la capacidad de adsorción aumenta infinitamente con el aumento de la concentración inicial del adsorbato (Li *et al.* 2019, Carrillo-Varela *et al.* 2022a).

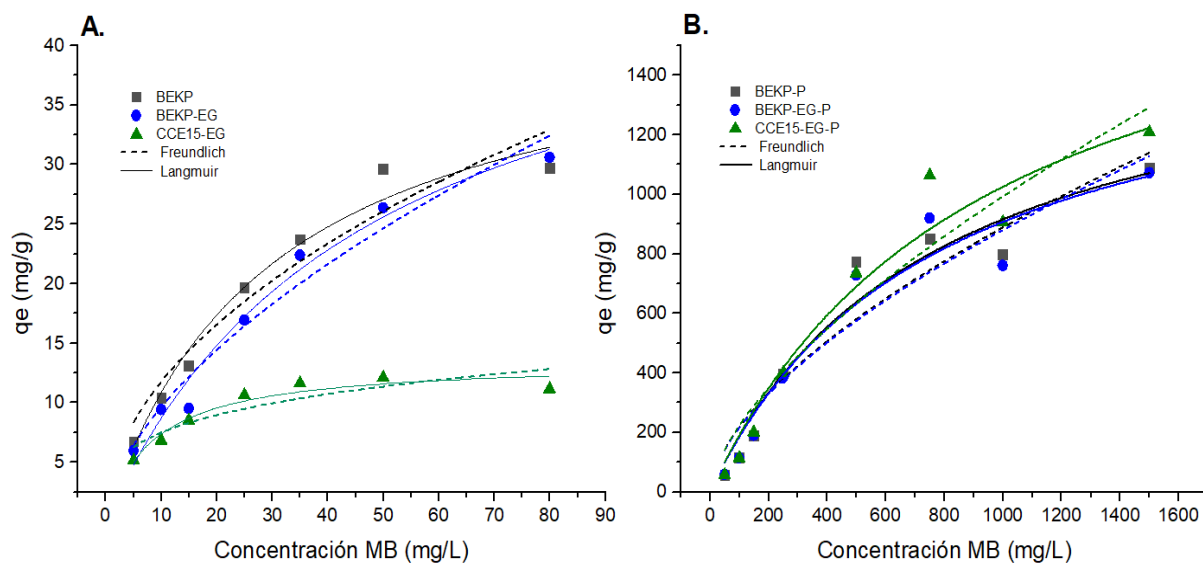


Figura 7. Capacidad de adsorción de azul de metileno (MB) de pulpas químico-enzimáticas (A) no fosforiladas y (B) fosforiladas.

La isoterma de Langmuir se ajustó mejor a los datos experimentales de adsorción y mostró valores de  $R^2$  más altos (Tabla 4). En el caso de experimentos no fosforilados (Figura 7A) las muestras BEKP y BEKP-EG tienen una mayor capacidad de absorción, con 43 y 50 mg/g, respectivamente (Tabla 4). Posiblemente por la mayor cantidad de xilanos en las muestras BEKP en comparación con la pulpa CCE15-EG (Tabla 1). Los xilanos son hidrofílicos, por lo que un aumento en su contenido provocará una mayor adsorción de agua (Zhang *et al.* 2011, Kulasinski *et al.* 2015). Por lo tanto, parte del azul de metileno podría haber sido adsorbido junto con el agua. Sin embargo, en comparación con la pulpa fosforilada la absorción de las muestras no fosforiladas es muy baja debido a la ausencia de grupos fosfatos. En el caso de las pulpas fosforiladas la muestra CCE15-EG-P se constató como la más alta en contenido de fosfato debido a su  $Q_{max}$  de 1994 mg/L (Tabla 4) y contenido de carga negativa de 3,83 mmol/g (Tabla 3).

Tabla 4. Parámetros para los modelos de isoterma de Langmuir y Freundlich de adsorción de MB en pulpas fosforiladas y no fosforiladas.

Muestras	Modelo Langmuir			Modelo Freundlich		
	$Q_{max}$ (mg/g)	$K_L$ (L/mg)	$R^2$	$K_F$ (L/mg)	$n$	$R^2$
BEKP	43	0,034	0,97	4	0,49	0,92
BEKP-EG	50	0,021	0,98	3	0,58	0,96
CCE15%-EG	13	0,121	0,93	4	0,26	0,78
BEKP-P	1621	0,001	0,95	13	1,63	0,91
BEKP-EG-P	1606	0,001	0,94	13	1,63	0,89
CCE15%-EG-P	1988	0,001	0,95	11	1,54	0,91

#### V. 4. Nanofibras de celulosa fosforilada

Se evaluaron las siguientes muestras para la producción de nanofibras de celulosa por homogeneización a alta presión: BEKP, CCE15, CCE15-EG, BEKP-EG, BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P y CCE15-EG-P. Las muestras BEKP, CCE15 y CCE15-EG, no se pudieron procesar, una vez que no pasaban por el equipo, obstruyendo el orificio de salida del homogeneizador. La única pulpa no fosforilada que se pudo homogeneizar fue la muestra BEKP-EG, lo que demuestra la importancia del pretratamiento enzimático para la producción de CNF. La no procesabilidad de CCE15 y CCE15-EG indica que la remoción de xilanos puede haber sido un factor determinante dado que actúan como “espaciadores” entre las cadenas de celulosa, además de contribuir a la absorción de agua durante el proceso (Zhang *et al.* 2011, Kulasinski *et al.* 2015).

Todas las pulpas que pasaron por el proceso de fosforilación pudieron ser homogeneizadas, explicado por repulsión electrostática de los grupos fosfato cargados aniónicamente en la superficie de las fibras de celulosa, que permiten su mejor dispersión en agua durante el tratamiento mecánico (Noguchi *et al.* 2017, Patoary *et al.* 2023). Una foto representativa de las suspensiones de CNF obtenidas se muestra en la Figura 8.

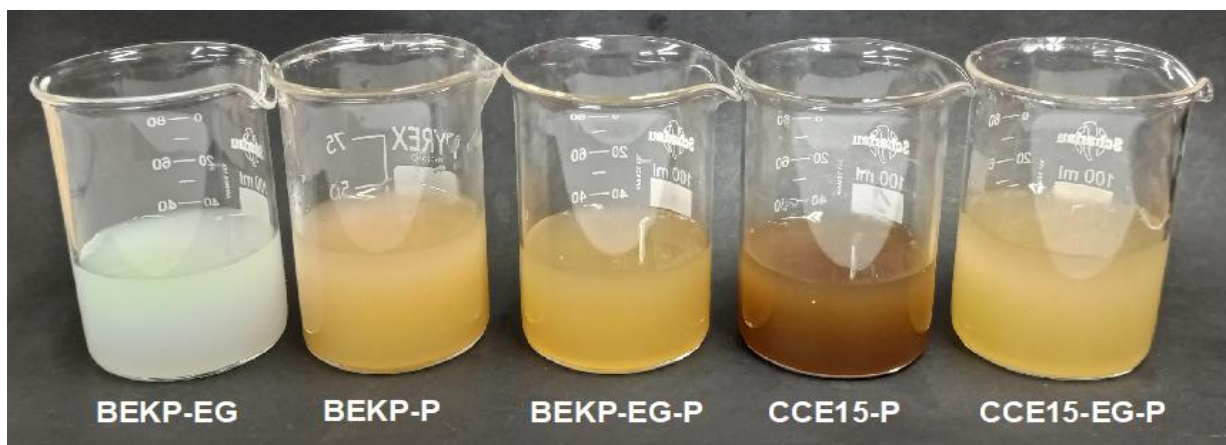


Figura 8. Suspensiones de nanofibras de celulosa no fosforilada (BEKP-EG) y fosforiladas (BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P, CCE15-EG-P).

Las muestras de nanocelulosa producidas a partir de las pulpas BEKP-EG, BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P y CCE15-EG-P fueron utilizadas para la producción de películas de nanocelulosa (Figura 9) para determinar algunas sus propiedades físico-mecánicas (Tabla 5 y Figura 10).

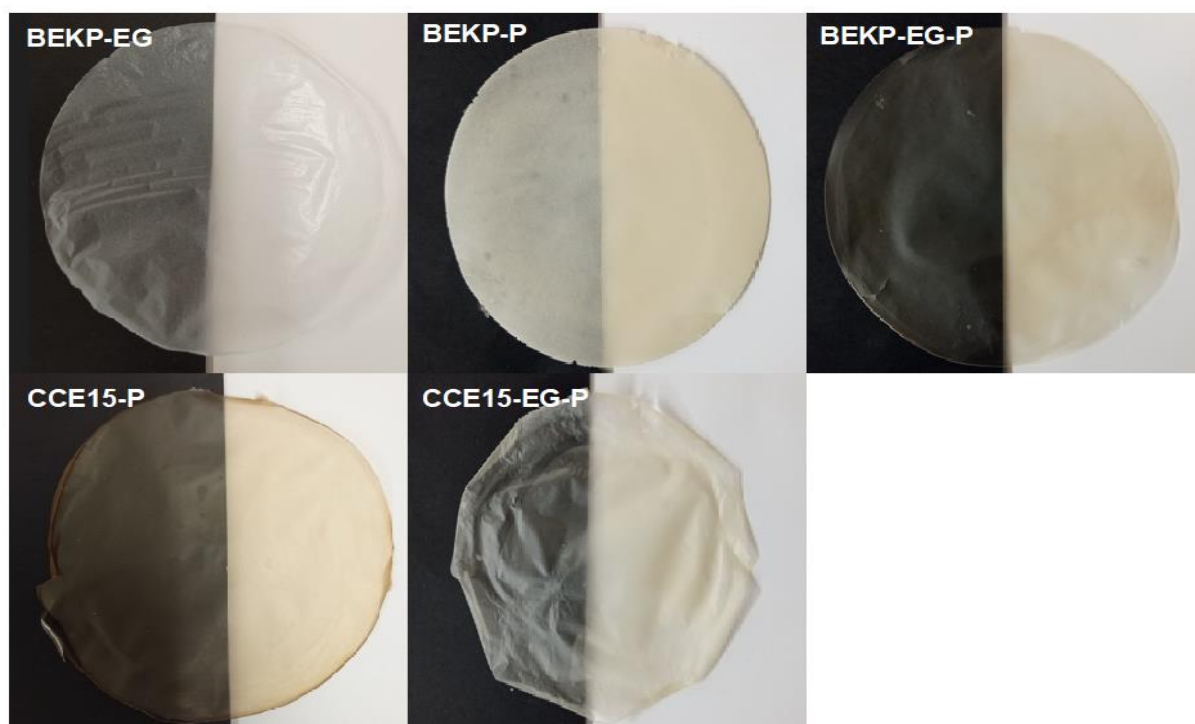


Figura 9. Películas de nanocelulosa producidas a partir de pulpa no fosforilada (BEKP-EG) y fosforiladas (BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P, CCE15-EG-P).

La película BEKP-P presentó una opacidad del 67,1% y es visiblemente menos transparente que las demás. La segunda muestra con mayor opacidad fue CCE15%-EG-P con un 21,1%. Las películas con menor opacidad fueron BEKP-EG con un 15,25%, BEKP-EG-P con un 14,05% y CCE15%-P con un 13,55%. Además de la mayor opacidad, la muestra BEKP-P también tuvo el mayor espesor, con 0,026 mm, y presentó una textura similar al papel, estas características se atribuyen a estar menos fibrilada (Figura 3A, 3B y 3C), con mayor contenido de hemicelulosa (Tabla 1), y mayor viscosidad (Tabla 1). El espesor disminuye en las muestras BEKP-EG, BEKP-EG-P y CCE15%-P, con un rango de 0,020-0,021 mm, finalizando con CCE15%-EG-P, la cual obtuvo 0,018 mm.

Un resultado destacable fue que las películas desde CNF fosforiladas no presentaron permeabilidad al aire dentro del periodo de tiempo del ensayo (Tabla 5). El método está diseñado para durar máximo 1 hora en ensayos con papel y cartón (norma ISO 5636-5). Con estas películas, el procedimiento se realizó por 2 horas sin observar resultados significativos. Es relevante mencionar que cada análisis se realiza con 5 películas distintas y que los resultados en la Tabla 5 indican el rango de valores obtenidos. Las películas que no presentan permeabilidad al aire serían buenas candidatas para aplicaciones en embalajes, por ejemplo, que requieran materiales como barrera de oxígeno. La hornificación y la cocrystalización generadas por los procesos químico-enzimáticos ocasionaría una disminución de la porosidad de la celulosa y, en consecuencia, una conformación de película más compacta y con menor permeabilidad al aire (Chen *et al.* 2016).

La tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) también se realizó para verificar la permeabilidad de la película frente a la humedad (Tabla 5). Las películas más permeables, es decir, con mayor WVTR, fueron BEKP-P con 306 g/m<sup>2</sup>·día y CCE15%-EG-P con 322 g/m<sup>2</sup>·día. Por otro lado, las películas con mejor desempeño como barrera al vapor de agua fueron BEKP-EG con 163 g/m<sup>2</sup>·día, BEKP-EG-P con 194 g/m<sup>2</sup>·día y CCE15%-P con 197 g/m<sup>2</sup>·día. Sin embargo, no se puede considerar que estas películas tengan propiedades de barrera contra la humedad, porque los valores son superiores a 5 g/m<sup>2</sup>·día (a 25°C, 50% HR, 25 µm de espesor) de acuerdo a Aulin y Ström (2013), reportado como valor indicativo de esta resistencia en *composites* de CNF pero no específica para películas de nanocelulosa. Este efecto parece ser menor en las

películas de celulosa regenerada, donde una película hecha de pulpa blanqueada Kraft disuelta en una mezcla de LiOH/urea/H<sub>2</sub>O (relación de peso: 5/15/80) con un espesor de 55  $\mu\text{m}$  (78,5  $\text{g}/\text{m}^2$ ), obtuvo una WVTR de 44  $\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{día}$ , mientras que una película hecha de CNF-TEMPO con un espesor de 35  $\mu\text{m}$  (51  $\text{g}/\text{m}^2$ ) obtuvo un WVTR de 132  $\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{día}$ , ambos experimentos ensayados a 25°C y 50% HR (Bedane *et al.* 2015). Esto ocurre probablemente debido a que al disolver la celulosa y luego regenerarla, las cadenas van a cambiar su conformación e interacción formando una red más solidificada (Balkissoon *et al.* 2022). Esto es diferente para las CNF, las cuales se caracterizan por ser higroscópicas, es decir, tiene una alta capacidad de absorción de humedad ambiental (Solhi *et al.* 2023).

Tabla 5. Caracterización de las películas de nanocelulosa.

Muestra	Opacidad (%)	Espesor (mm)	Permeabilidad al aire (min/100 $\text{cm}^3$ ) Rango de valores observado	Tasa de transmisión de vapor de agua WVTR ( $\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{día}$ )
BEKP-EG	15 $\pm$ 1	0,021 $\pm$ 0,002	28 min – 720 min	163 $\pm$ 4
BEKP-P	67 $\pm$ 2	0,026 $\pm$ 0,002	186 min – Ind.*	306 $\pm$ 20
BEKP-EG-P	14 $\pm$ 1	0,020 $\pm$ 0,001	Ind.*	194 $\pm$ 13
CCE15-P	14 $\pm$ 2	0,020 $\pm$ 0,003	Ind.*	197 $\pm$ 27
CCE15-EG-P	21 $\pm$ 2	0,018 $\pm$ 0,002	Ind.*	322 $\pm$ 24

\*Indefinido: 2 h sin movimiento

La Figura 10 muestra los resultados del índice de resistencia a la explosión y el índice de resistencia a la tracción. En cuanto a los resultados del índice de resistencia a la explosión, BEKP-P obtuvo un valor de 1,76  $\text{kPa}\cdot\text{m}^2/\text{g}$ , valor más bajo y único con diferencia significativa respecto a las otras películas, que proporcionaron índice de resistencia a la explosión entre 3,09-3,34  $\text{kPa}\cdot\text{m}^2/\text{g}$ . En base a estos resultados, se observa que la fosforilación no tiene efecto en el índice de resistencia a la explosión,

por lo que la diferencia se atribuye principalmente a los pretratamientos por CCE15 y/o EG.

La figura 10 también muestra que BEKP-EG fue la película con el índice de resistencia a la tracción más alto, con 94,16 N·m/g. Por otro lado, el valor más bajo fue de CCE15-EG-P con 9,04 N·m/g, por lo que es probable que tratamientos muy severos, como la fosforilación, produzcan un efecto negativo en este índice. Zeng *et al.* (2021) produjeron películas CNF hechas con distintas combinaciones: BSKP (Pulpa Kraft blanqueada de pino) (15 mg/g) tratada con 20 mg/g de EG durante 2 h y molienda; molienda y microfluidización; o TEMPO y molienda. Todas estas películas obtenidas en dicha investigación tuvieron un índice de resistencia a la explosión y tracción entre 1,1-1,8 kPa·m<sup>2</sup>/g y 15-28 N·m/g, respectivamente. Ambos intervalos son bajos en comparación con algunas películas obtenidas en este trabajo, especialmente la película sin fosforilación BEKP-EG, indicando de forma general, que los tratamientos aplicados en este trabajo, pueden generar CNF con algunas propiedades físico-mecánicas superiores a otros trabajos de la literatura.

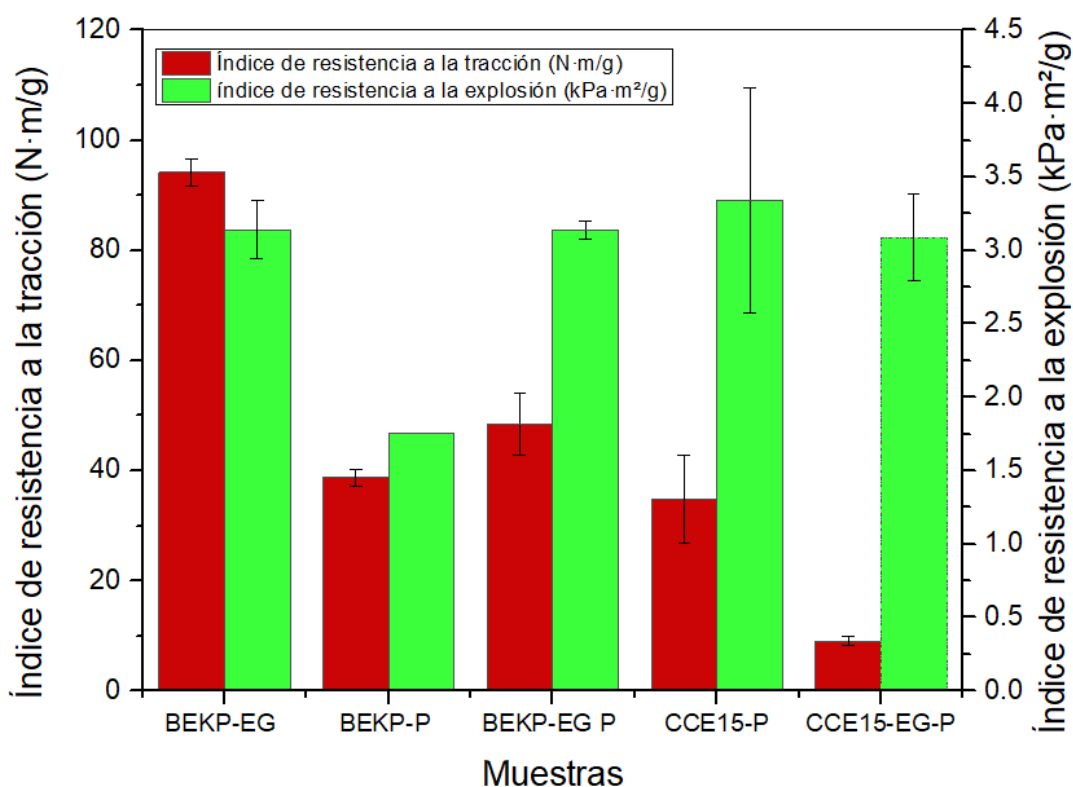


Figura 10. Propiedades mecánicas de películas de nanocelulosa de muestras BEKP-EG, BEKP-P, BEKP-EG-P, CCE15-P y CCE15-EG-P.

La Tabla 6 muestra posibles aplicaciones de la CNF producida en este trabajo en comparación con otros trabajos publicados. BEKP-EG es una nanocelulosa libre de fosfatos con propiedades de alta resistencia por lo que podría usarse para múltiples aplicaciones, por ejemplo, como aditivo o recubrimiento de papeles. En cuanto a la muestra BEKP-P, esta no presentó propiedades de alta resistencia pero es una opción de nanocelulosa de menor costo, teniendo en cuenta que la fosforilación es un tratamiento considerado de bajo costo (Ghanadpour *et al.* 2015, Mulin *et al.* 2023), comparado a un tratamiento enzimático o TEMPO (Serra *et al.* 2017), por lo que podría ser utilizada como aditivo a materiales compuestos para aprovechar su contenido de fosfato, como también puede ser una buena opción su uso como absorbente de contaminantes catiónicos, principalmente iones de metales pesados y colorantes (Hadid *et al.* 2021), para productos comerciales de control de derrames de algunos químicos, o biomateriales ignífugos (Ghanadpour *et al.* 2015). Las muestras BEKP-EG-P y CCE15-P tienen propiedades similares, como alta resistencia a la explosión, transparencia e impermeabilidad al aire. Estas características se buscan en la industria del embalaje, para compuestos y recubrimientos ignífugos (Ghanadpour *et al.* 2015, Mishra *et al.* 2018). Por otro lado, las CNF de pulpa CCE15-EG-P, se elaboró con todos los 3 tipos de tratamientos y, por los valores de S18 y viscosidad (Tabla 1) se puede considerar una pulpa grado soluble, las cuales son utilizadas principalmente en textiles y derivados de celulosa (Balkissoon *et al.* 2022). Si bien el tratamiento de fosforilación desempeña el papel de pretratamiento en la producción de nanofibras, las CNF en suspensión se pueden desfosforilar por medio de un tratamiento a altas temperaturas (80°C) por 8 días, de esta forma se liberará sal de fosfato, la cual se puede extraer con resinas de intercambio iónico, de esta manera se pueden regenerar los hidroxilos libres de la celulosa (Noguchi *et al.* 2020). Las CNF puras se pueden usar como aditivos para mejorar las propiedades mecánicas en materiales papeleros y celulosa regenerada (Xue *et al.* 2021).



Tabla 6. Resumen de aplicaciones de nanofibras de celulosa (CNF) según sus propiedades.

Muestras	Características destacadas	Ejemplos de aplicación	Referencia
BEKP-EG	Propiedades de alta resistencia	Películas para envases, aditivo y agente para <i>composites</i> .	(Mishra <i>et al.</i> 2018)
BEKP-P	Adsorbente catiónico de bajo costo, retardante de llama.	Agente para <i>composites</i> .	(Hadid <i>et al.</i> 2021)
BEKP-EG-P	Propiedades de alta resistencia, retardante de llama, impermeabilidad al aire, transparencia.	Recubrimientos anti inflamables.	(Ghanadpour <i>et al.</i> 2015)
CCE15-P	Propiedades de alta resistencia, retardante de llama, impermeabilidad al aire, transparencia.	Recubrimientos anti inflamables.	(Ghanadpour <i>et al.</i> 2015)
CCE15-EG-P	Grado de pulpa soluble, retardante de llama, adsorbente de matriz catiónico.	Agente para derivados de celulosa de alta pureza.	(Xue <i>et al.</i> 2021)

## VI. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró la importancia de evaluar y aplicar pretratamientos a la pulpa celulósica antes de la producción de nanofibras de celulosa o nanocelulosa. En lo que se refiere a la hipótesis, esta ha sido rechazada, debido a que la pulpa con solo un pretratamiento enzimático obtuvo mayores propiedades de resistencia mecánica que las nanofibras hechas por la combinación de procesos químico-enzimáticos. Dado lo anterior, se resalta que esta tesis no buscó optimizar los procesos químico-enzimáticos aplicados o generar algún tipo de producto final específico, ya que las películas elaboradas sirvieron para determinar propiedades de la nanocelulosas. Sin embargo, se demuestra que, dependiendo del tipo de tratamiento o combinaciones de tratamientos aplicados sobre la celulosa para la generación de CNF, productos con diferentes características pueden ser obtenidos, lo que abre perspectivas de generar nuevas investigaciones dando énfasis a la fosforilación como una alternativa de modificación química de la celulosa, con o sin la presencia de enzimas hidrolíticas. En síntesis, las principales conclusiones de esta investigación fueron:

1. En las condiciones y dosis ensayadas los tratamientos con xilanasas no fueron efectivos en reducir el contenido de xilanos residuales en la pulpa, determinado por solubilidad en álcali S18.
2. Los tratamientos químico-enzimáticos causaron diversos cambios en la morfología y estructura de la fibra. El tratamiento CCE15 removió la mayor cantidad de hemicelulosas residuales, provocó una disminución del tamaño e hinchamiento de las fibras, disminuyó la viscosidad, convirtió la celulosa I en celulosa II e incrementó el tamaño lateral de los cristales; mientras que el tratamiento EG causó disminución en la viscosidad y aumento en la cristalinidad de la celulosa.
3. Todas las pulpas tratadas químico-enzimáticamente fueron fosforiladas en valores de cerca de 3 mmol/g pulpa siendo la muestra CCE15-EG-P con mayor grado de fosforilación (3,8 mmol/g pulpa).
4. La homogenización de las pulpas no fosforiladas para la generación de CNF solo pudo ser lograda con la pulpa BEKP-EG. En el caso de las pulpas fosforiladas, todas fueron capaces de ser homogeneizadas para la obtención de CNF.

5. Las películas elaboradas con las diferentes CNF mostraron distintas características dependiendo del pretratamiento realizado.
  - a. Con respecto a la transparencia de las películas, las más destacadas fueron BEKP-EG, BEKP-EG-P y CCE15-P.
  - b. Todas las películas fosforiladas presentaron una alta impermeabilidad al aire.
  - c. El tratamiento (P) produce una disminución de la resistencia a la tracción independientemente del tipo de pulpa químico-enzimática utilizada.
  - d. La muestra BEKP-EG fue la CNF con mayor resistencia mecánica.
  - e. Las CNF fosforiladas tienen diversas ventajas por presentar grupos fosfato, siendo de gran utilidad en compuestos retardantes de llama y purificadores de agua, por ejemplo, indicando una posible aplicación de este biomaterial.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdul B., J. Wei, R. Kashif. 2020. Xylanase and its industrial applications. pp. 293-314. En: *Biotechnological Applications of Biomass*, IntechOpen. Rijeka.
2. Ablouh E.-H., F. Brouillette, M. Taourirte, H. Sehaqui, M. El Achaby, A. Belfkira. 2021. A highly efficient chemical approach to producing green phosphorylated cellulosic macromolecules. *RSC Advances* 11(39): 24206-24216.
3. Ait A., Z. Kassab, M. Nadifiyine, M.H. Salim, H. Sehaqui, A. Moubarik, M. El Achaby. 2021. Extraction, characterization and chemical functionalization of phosphorylated cellulose derivatives from Giant Reed Plant. *Cellulose* 28(8): 4625-4642.
4. Almlöf H. 2013. *Mergerization and Enzymatic Pretreatment of Cellulose in Dissolving Pulps* [Doctoral]. Karlstads universitet.
5. Ang S., V. Haritos, W. Batchelor. 2020. Cellulose nanofibers from recycled and virgin wood pulp: A comparative study of fiber development. *Carbohydrate Polymers* 234: 115900.
6. Aravind T., M.S. Ashraf, R. A. S, N. Ahalya, M.S. Rawat, B. Uma, R. Sharma, R. Subbiah, S. Sida. 2022. Study of progress on nanocrystalline cellulose and natural fiber reinforcement biocomposites. *Journal of Nanomaterials* 2022: 16.
7. Aulin C., G.r. Ström. 2013. Multilayered alkyd resin/nanocellulose coatings for use in renewable packaging solutions with a high level of moisture resistance. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 52(7): 2582-2589.
8. Bäckström M., S. Bolivar, J. Paltakari. 2012. Effect of ionic form on fibrillation and the development of the fibre network strength during the refining of the kraft pulps. *O Papel* 73(7): 57-65.
9. Bailey M.J., P. Biely, K. Poutanen. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of biotechnology* 23(3): 257-270.
10. Balea A., E. Fuente, Q. Tarrés, M.À. Pèlach, P. Mutjé, M. Delgado-Aguilar, A. Blanco, C. Negro. 2021. Influence of pretreatment and mechanical nanofibrillation energy on properties of nanofibers from Aspen cellulose. *Cellulose* 28(14): 9187-9206.
11. Balkissoon S., J. Andrew, B. Sithole. 2022. Dissolving wood pulp production: a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*: 1-36.
12. Banvillet G., G. Depres, N. Belgacem, J. Bras. 2021. Alkaline treatment combined with enzymatic hydrolysis for efficient cellulose nanofibrils production. *Carbohydrate Polymers* 255: 117383.
13. Barhoum A., V.K. Rastogi, B.K. Mahur, A. Rastogi, F.M. Abdel-Haleem, P. Samyn. 2022. Nanocelluloses as new generation materials: Natural resources, structure-related properties, engineering nanostructures, and technical challenges. *Materials Today Chemistry* 26: 101247.
14. Bedane A.H., M. Eić, M. Farmahini-Farahani, H. Xiao. 2015. Water vapor transport properties of regenerated cellulose and nanofibrillated cellulose films. *Journal of Membrane Science* 493: 46-57.
15. Beg Q.K., M. Kapoor, L. Mahajan, G.S. Hoondal. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56(3-4): 326-338.
16. Bhardwaj N., B. Kumar, K. Agrawal, P. Verma. 2021. Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. *Bioresources and Bioprocessing* 8(1): 95.

17. Bhardwaj N., B. Kumar, P. Verma. 2019. A detailed overview of xylanases: An emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing* 6(1): 40.
18. Blanco A., M.C. Monte, C. Campano, A. Balea, N. Merayo, C. Negro. 2018. Nanocellulose for industrial use: cellulose nanofibers (CNF), cellulose nanocrystals (CNC), and bacterial cellulose (BC). pp. 74-126. En: *Handbook of nanomaterials for industrial applications*, Elsevier.
19. Budtova T., P. Navard. 2016. Cellulose in NaOH–water based solvents: a review. *Cellulose* 23(1): 5-55.
20. Carrillo-Varela I., R.T. Mendonça, M. Pereira, P. Reyes-Contreras, D. Contreras. 2022a. Methylene blue adsorption onto hydrogels made from different Eucalyptus dissolving pulps. *Cellulose* 29(1): 445-468.
21. Carrillo-Varela I., M. Pereira, R.T. Mendonça. 2018. Determination of polymorphic changes in cellulose from Eucalyptus spp. fibres after alkalization. *Cellulose* 25(12): 6831-6845.
22. Carrillo-Varela I., R. Retamal, M. Pereira, R.T. Mendonça. 2019. Structure and reactivity of cellulose from bleached kraft pulps of different Eucalyptus species upgraded to dissolving pulp. *Cellulose* 26(9): 5731-5744.
23. Carrillo-Varela I., C. Vidal, S. Vidaurre, C. Parra, Á. Machuca, R. Briones, R.T. Mendonça. 2022b. Alkalization of kraft pulps from pine and eucalyptus and its effect on enzymatic saccharification and viscosity control of cellulose. *Polymers* 14(15): 3127.
24. Carter N., I. Grant, M. Dewey, M. Bourque, D.J. Neivandt. 2021. Production and characterization of cellulose nanofiber slurries and sheets for biomedical applications. *Frontiers in Nanotechnology*: 86.
25. Chen C., R. Xu, X. Chen, J. Xie, F. Zhang, Y. Yang, C. Lei. 2016. Influence of cocrystallization behavior on structure and properties of HDPE/LLDPE microporous membrane. *Journal of Polymer Research* 23(3): 46.
26. Collins T., C. Gerday, G. Feller. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29(1): 3-23.
27. Daicho K., K. Kobayashi, S. Fujisawa, T. Saito. 2021. Recovery of the irreversible crystallinity of nanocellulose by crystallite fusion: A strategy for achieving efficient energy transfers in sustainable biopolymer skeletons. *Angewandte Chemie International Edition* 60(46): 24630-24636.
28. Ekta S., D.B. Ameya, M.G. Sushama. 2022. Hydrolases: the most diverse class of enzymes. pp. 1-13. En: *Hydrolases*, IntechOpen. Rijeka.
29. Ferro M., A. Mannu, W. Panzeri, C.H.J. Theeuwen, A. Mele. 2020. An integrated approach to optimizing cellulose mercerization. *Polymers* 12(7): 1559.
30. Freundlich H. 1906. Over the adsorption in solution. *Journal of Physical Chemistry* 57(385471): 1100-1107.
31. Gangwar A.K., N.T. Prakash, R. Prakash. 2014. Applicability of microbial xylanases in paper pulp bleaching: a review. *BioResources* 9(2).
32. Gautam S., P. Bundela, A. Pandey, J. Jamaluddin, M. Awasthi, S. Sarsaiya. 2010. A review on systematic study of cellulose. *Journal of Applied and Natural Science* 2(2): 330-343.
33. Gehmayr V., H. Sixta. 2012. Pulp properties and their influence on enzymatic degradability. *Biomacromolecules* 13(3): 645-651.
34. Ghanadpour M., F. Carosio, P.T. Larsson, L. Wågberg. 2015. Phosphorylated cellulose nanofibrils: A renewable nanomaterial for the preparation of intrinsically flame-retardant materials. *Biomacromolecules* 16(10): 3399-3410.

35. Granström M. 2009. Cellulose derivatives: synthesis, properties and applications [Doctoral]. Helsinki University Printing House. 1-120.
36. Hadid M., H. Noukrati, A. Barroug, H. Sehaqui. 2021. Phosphorylated cellulose for water purification: a promising material with outstanding adsorption capacity towards methylene blue. *Cellulose* 28(12): 7893-7908.
37. Hasani M. 2010. Chemical Modification of Cellulose: New Possibilities of Some Classical Routes [Doctoral]. Chalmers Tekniska Hogskola (Sweden).
38. Herrick F.W., R.L. Casebier, J.K. Hamilton, K.R. Sandberg. 1983. Microfibrillated cellulose: morphology and accessibility. pp. 797-813. *Journal of applied polymer science. Applied polymer symposium*.
39. Hou G., S. Zhao, L. Peng, Z. Fang, A. Isogai. 2022. A systematic study for the structures and properties of phosphorylated pulp fibers prepared under various conditions. *Cellulose* 29(13): 7365-7376.
40. Hutterer C., G. Kliba, M. Punz, K. Fackler, A. Potthast. 2017. Enzymatic pulp upgrade for producing high-value cellulose out of a Kraft paper pulp. *Enzyme and microbial technology* 102: 67-73.
41. Ibarra D., V. Köpcke, M. Ek. 2010. Behavior of different monocomponent endoglucanases on the accessibility and reactivity of dissolving-grade pulps for viscose process. *Enzyme and microbial technology* 47(7): 355-362.
42. Isogai A., M. Usuda, T. Kato, T. Uryu, R.H. Atalla. 1989. Solid-state CP/MAS carbon-13 NMR study of cellulose polymorphs. *Macromolecules* 22(7): 3168-3172.
43. Iwamoto S., K. Abe, H. Yano. 2008. The effect of hemicelluloses on wood pulp nanofibrillation and nanofiber network characteristics. *Biomacromolecules* 9(3): 1022-1026.
44. Ji Y., Y. Peng, A. Strand, S. Fu, A. Sundberg, E.A. Retulainen. 2018. Fiber evolution during alkaline treatment and its impact on handsheet properties. *BioResources* 13(4): 7310-7324.
45. Juturu V., J.C. Wu. 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33: 188-203.
46. Kaur P., N.K. Bhardwaj, J. Sharma. 2021. A study elucidating the relation between cellulose dissolution and crystallinity after cellulase treatment at different doses. *3 Biotech* 11(8): 371.
47. Khalil H.A., Y. Davoudpour, M.N. Islam, A. Mustapha, K. Sudesh, R. Dungani, M. Jawaid. 2014. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: a review. *Carbohydrate Polymers* 99: 649-665.
48. Klemm D., E.D. Cranston, D. Fischer, M. Gama, S.A. Kedzior, D. Kralisch, F. Kramer, T. Kondo, T. Lindström, S. Nietzsche, K. Petzold-Welcke, F. Rauchfuß. 2018. Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state. *Materials Today* 21(7): 720-748.
49. Kokol V., M. Božič, R. Vogrinčič, A.P. Mathew. 2015. Characterisation and properties of homo- and heterogenously phosphorylated nanocellulose. *Carbohydrate Polymers* 125: 301-313.
50. Köpcke V. 2008. Improvement on cellulose accessibility and reactivity of different wood pulps [Doctoral]. KTH Royal Institute of Technology.
51. Kulasinski K., R. Guyer, D. Derome, J. Carmeliet. 2015. Water adsorption in wood microfibril-hemicellulose system: Role of the crystalline–amorphous interface. *Biomacromolecules* 16(9): 2972-2978.
52. Kunusa W.R., I. Isa, L.A. Laliyo, H. Iyabu. 2018. FTIR, XRD and SEM analysis of microcrystalline cellulose (MCC) fibers from corncorbs in alkaline treatment. pp. 012199. In: *Proceedings of the Journal of Physics: Conference Series*, Vol. 1028. IOP Publishing.

53. Lehtonen J., J. Hassinen, A.A. Kumar, L.-S. Johansson, R. Mäenpää, N. Pahimanolis, T. Pradeep, O. Ikkala, O.J. Rojas. 2020. Phosphorylated cellulose nanofibers exhibit exceptional capacity for uranium capture. *Cellulose* 27(18): 10719-10732.
54. Li B., Y. Pan, Q. Zhang, Z. Huang, J. Liu, H. Xiao. 2019. Porous cellulose beads reconstituted from ionic liquid for adsorption of heavy metal ions from aqueous solutions. *Cellulose* 26(17): 9163-9178.
55. Li Y.-Y., B. Wang, M.-G. Ma, B. Wang. 2018. Review of recent development on preparation, properties, and applications of cellulose-based functional materials. *International Journal of Polymer Science* 2018: 8973643.
56. Lindman B., G. Karlström, L. Stigsson. 2010. On the mechanism of dissolution of cellulose. *Journal of Molecular Liquids* 156(1): 76-81.
57. Liu X., Y. Jiang, L. Wang, X. Song, C. Qin, S. Wang. 2020. Tuning of size and properties of cellulose nanofibers isolated from sugarcane bagasse by endoglucanase-assisted mechanical grinding. *Industrial Crops and Products* 146: 112201.
58. Liu X., C. Kokare. 2023. Chapter 17 - Microbial enzymes of use in industry. pp. 405-444. En: *Biotechnology of Microbial Enzymes (Second Edition)*, (Brahmachari G., ed) Academic Press.
59. Mishra R.K., A. Sabu, S.K. Tiwari. 2018. Materials chemistry and the futurist eco-friendly applications of nanocellulose: Status and prospect. *Journal of Saudi Chemical Society* 22(8): 949-978.
60. Mo W., K. Chen, X. Yang, F. Kong, J. Liu, B. Li. 2022. Elucidating the hornification mechanism of cellulosic fibers during the process of thermal drying. *Carbohydrate Polymers* 289: 119434.
61. Morales M., G. Aroca, R. Rubilar, E. Acuña, B. Mola-Yudego, S. González-García. 2015. Cradle-to-gate life cycle assessment of *Eucalyptus globulus* short rotation plantations in Chile. *Journal of Cleaner Production* 99: 239-249.
62. Motta F., C. Andrade, M. Santana. 2013. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization* 1: 251-276.
63. Mulin L.B., C.C.N. Martins, M.C. Dias, A.d.A. dos Santos, A.R.P. Mascarenhas, D. Profeti, M.P. Oliveira, G.H.D. Tonoli, J.C. Moulin. 2023. Effect of phosphorylation on the production of cellulose nanofibrils from *Eucalyptus* sp. *Industrial Crops and Products* 193: 116173.
64. Nagar S., V.K. Gupta. 2021. Hyper Production and Eco-Friendly Bleaching of Kraft Pulp by Xylanase From *Bacillus pumilus* SV-205 Using Agro Waste Material. *Waste and Biomass Valorization* 12(7): 4019-4031.
65. Nechyporchuk O., M.N. Belgacem, J. Bras. 2016. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Industrial Crops and Products* 93: 2-25.
66. Newman R.H. 2004. Carbon-13 NMR evidence for cocrystallization of cellulose as a mechanism for hornification of bleached kraft pulp. *Cellulose* 11(1): 45-52.
67. Ngene G.I., J.-C. Roux, D. Lachenal. 2022. Xylan extraction strategies and the performance of the resulting high purity cellulose fiber to swelling and dissolution. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 3: 100196.
68. Nie S., K. Zhang, X. Lin, C. Zhang, D. Yan, H. Liang, S. Wang. 2018. Enzymatic pretreatment for the improvement of dispersion and film properties of cellulose nanofibrils. *Carbohydrate Polymers* 181: 1136-1142.

69. Nishiyama Y., P. Langan, H. Chanzy. 2002. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I $\beta$  from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American chemical society* 124(31): 9074-9082.
70. Noguchi Y., I. Homma, Y. Matsubara. 2017. Complete nanofibrillation of cellulose prepared by phosphorylation. *Cellulose* 24(3): 1295-1305.
71. Noguchi Y., I. Homma, T. Watanabe. 2020. Properties of phosphorylated cellulose nanofiber dispersions under various conditions. *Cellulose* 27(4): 2029-2040.
72. Oudiani A.E., Y. Chaabouni, S. Msahli, F. Sakli. 2011. Crystal transition from cellulose I to cellulose II in NaOH treated *Agave americana* L. fibre. *Carbohydrate Polymers* 86(3): 1221-1229.
73. Park S., J.O. Baker, M.E. Himmel, P.A. Parilla, D.K. Johnson. 2010. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for biofuels* 3: 1-10.
74. Patoary M.K., S.R. Islam, A. Farooq, M.A. Rashid, S. Sarker, M.Y. Hossain, M.A.N. Rakib, M. Al-Amin, L. Liu. 2023. Phosphorylation of nanocellulose: State of the art and prospects. *Industrial Crops and Products* 201: 116965.
75. Pell G., L. Szabo, S.J. Charnock, H. Xie, T.M. Gloster, G.J. Davies, H.J. Gilbert. 2004. Structural and biochemical analysis of *cellvibrio japonicus* xylanase 10C. *Journal of Biological Chemistry* 279(12): 11777-11788.
76. Pérez S., K. Mazeau. 2005. Conformations, structures, and morphologies of celluloses. *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility* 2: 41-68.
77. Randhawa A., S.D. Dutta, K. Ganguly, T.V. Patil, D.K. Patel, K.-T. Lim. 2022. A review of properties of nanocellulose, its synthesis, and potential in biomedical applications. *Applied Sciences* 12(14): 7090.
78. Rol F., S. Saini, V. Meyer, M. Petit-Conil, J. Bras. 2019. Production of cationic nanofibrils of cellulose by twin-screw extrusion. *Industrial Crops and Products* 137: 81-88.
79. Rol F., C. Sillard, M. Bardet, J.R. Yarava, L. Emsley, C. Gablin, D. Léonard, N. Belgacem, J. Bras. 2020. Cellulose phosphorylation comparison and analysis of phosphate position on cellulose fibers. *Carbohydrate Polymers* 229: 115294.
80. Saito T., A. Isogai. 2004. TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the water-insoluble fractions. *Biomacromolecules* 5(5): 1983-1989.
81. Saito T., S. Kimura, Y. Nishiyama, A. Isogai. 2007. Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules* 8(8): 2485-2491.
82. Sánchez-Gutiérrez M., E. Espinosa, I. Bascón-Villegas, F. Pérez-Rodríguez, E. Carrasco, A. Rodríguez. 2020. Production of cellulose nanofibers from olive tree harvest: A residue with wide applications. *Agronomy* 10(5): 696.
83. Sanchez-Salvador J.L., C. Campano, A. Balea, Q. Tarrés, M. Delgado-Aguilar, P. Mutjé, A. Blanco, C. Negro. 2022. Critical comparison of the properties of cellulose nanofibers produced from softwood and hardwood through enzymatic, chemical and mechanical processes. *International Journal of Biological Macromolecules* 205: 220-230.
84. Scherrer P. 1918. Bestimmung der grösse und der inneren struktur von kolloidteilchen mittels röntgenstrahlen. *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen, mathematisch-physikalische Klasse* 1918: 98-100.
85. Seddiqi H., E. Oliaei, H. Honarkar, J. Jin, L.C. Geonzon, R.G. Bacabac, J. Klein-Nulend. 2021. Cellulose and its derivatives: towards biomedical applications. *Cellulose* 28(4): 1893-1931.



86. Serra A., I. González, H. Oliver-Ortega, Q. Tarrès, M. Delgado-Aguilar, P. Mutjé. 2017. Reducing the Amount of Catalyst in TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibers: Effect on Properties and Cost. *Polymers* 9(11): 557.
87. Shaghaleh H., X. Xu, S. Wang. 2018. Current progress in production of biopolymeric materials based on cellulose, cellulose nanofibers, and cellulose derivatives. *RSC Advances* 8(2): 825-842.
88. Siró I., D. Plackett. 2010. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose* 17(3): 459-494.
89. Sixta H. 2006. *Handbook of pulp*. Wiley-VCH Verlag. Germany. 1-30, 59, 933, 1230 p.
90. Solhi L., V. Guccini, K. Heise, I. Solala, E. Niinivaara, W. Xu, K. Mihhels, M. Kröger, Z. Meng, J. Wohler, H. Tao, E.D. Cranston, E. Kontturi. 2023. Understanding Nanocellulose–Water Interactions: Turning a Detriment into an Asset. *Chemical Reviews* 123(5): 1925-2015.
91. Soni S.K., A. Sharma, R. Soni. 2018. Cellulases: Role in lignocellulosic biomass utilization. pp. 3-23. En: *Cellulases: Methods and Protocols*, (Lübeck M., ed) Springer New York. New York, NY.
92. Tanaka M., M. Taniguchi. 1981. Purification and properties of cellulases from *Eupencillium javanicum*: studies on the re-utilization of cellulosic resources (VII). *Journal of Fermentation Technology* 59(3): 177-183.
93. Tao P., Y. Zhang, Z. Wu, X. Liao, S. Nie. 2019. Enzymatic pretreatment for cellulose nanofibrils isolation from bagasse pulp: Transition of cellulose crystal structure. *Carbohydrate Polymers* 214: 1-7.
94. Ten E., W. Vermerris. 2013. Functionalized polymers from lignocellulosic biomass: state of the art. *Polymers* 5(2): 600-642.
95. Tonoli G.H.D., L.E. Silva, D. Wood, L. Torres, T. Williams, J.E. Oliveira, A.S. Fonseca, A. Klamczynski, G. Glenn, W. Orts. 2021. Changes on structural characteristics of cellulose pulp fiber incubated for different times in anaerobic digestate. *Cerne* 27: e-102647.
96. Turbak A.F., F.W. Snyder, K.R. Sandberg. 1983. Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential. pp. 815-827. *Journal of applied polymer science*. Applied polymer symposium.
97. Verma P.K., N.K. Bhardwaj, S.P. Singh. 2016. Improving the material efficiency of recycled furnish for papermaking through enzyme modifications. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 94(3): 430-438.
98. Wang H., D. Li, H. Yano, K. Abe. 2014. Preparation of tough cellulose II nanofibers with high thermal stability from wood. *Cellulose* 21: 1505-1515.
99. Wang W., M.D. Mozuch, R.C. Sabo, P. Kersten, J.Y. Zhu, Y. Jin. 2016. Endoglucanase post-milling treatment for producing cellulose nanofibers from bleached eucalyptus fibers by a supermasscolloider. *Cellulose* 23(3): 1859-1870.
100. Xue Y., L. Qi, Z. Lin, G. Yang, M. He, J. Chen. 2021. High-strength regenerated cellulose fiber reinforced with cellulose nanofibril and nanosilica. *Nanomaterials* 11(10): 2664.
101. Yang S., B. Yang, C. Duan, D.A. Fuller, X. Wang, S.P. Chowdhury, J. Stavik, H. Zhang, Y. Ni. 2019. Applications of enzymatic technologies to the production of high-quality dissolving pulp: A review. *Bioresource Technology* 281: 440-448.
102. Zeng J., Z. Zeng, Z. Cheng, Y. Wang, X. Wang, B. Wang, W. Gao. 2021. Cellulose nanofibrils manufactured by various methods with application as paper strength additives. *Scientific Reports* 11(1): 11918.

103. Zhang Y., O. Hosseinaei, S. Wang, Z. Zhou. 2011. Influence of hemicellulose extraction on water uptake behavior of wood strands. *Wood and Fiber Science*: 244-250.
104. Zhu J.Y., R. Sabo, X. Luo. 2011. Integrated production of nano-fibrillated cellulose and cellulosic biofuel (ethanol) by enzymatic fractionation of wood fibers. *Green Chemistry* 13(5): 1339-1344.