

## Caracterización fisicoquímica de biopelículas de celulosa bacteriana recubiertas con ácido poliláctico

Physicochemical characterization of bacterial cellulose biofilms coated with polylactic acid

María Guadalupe Padilla-Solís<sup>1</sup>, Jesús Rubén Rodríguez-Núñez<sup>1\*</sup>, Tomás Jesús Madera Santana<sup>2</sup>, Adán Topiltzin Morales-Vargas<sup>1</sup>, Karla Paola Barcenás-Jiménez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Ingeniería en Biotecnología, Universidad de Guanajuato. Mutualismo #303, Colonia la Suiza, Celaya, Guanajuato, 38060, México. Autor de correspondencia:

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. CTAOV, Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, NO. 46, Hermosillo, Sonora, 83304, México.

jesus.rodriguez@ugto.mx1

### Resumen

La celulosa bacteriana obtenida mediante la fermentación de kombucha posee propiedades únicas como su elevada pureza, biodegradabilidad y biocompatibilidad. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar las propiedades mecánicas y de barrera de películas biodegradables a base de celulosa de kombucha recubiertas con ácido poliláctico (PLA). Se elaboraron películas de celulosa bacteriana mediante fermentación de la cepa kombucha en té negro y se recubrieron con PLA (ácido poliláctico) para mejorar sus propiedades mecánicas. Se determinó la permeancia al vapor y velocidad de transmisión de vapor de agua (propiedades de transporte), además se evaluó el esfuerzo máximo y el módulo de elasticidad que corresponden a las propiedades mecánicas de la muestra.

**Palabras clave:** celulosa microbiana, películas biodegradables, caracterización instrumental.

### Abstract

The bacterial cellulose obtained through kombucha fermentation has unique properties such as its high purity, biodegradability, and biocompatibility. In this sense, the objective of the present work was to evaluate the mechanical and barrier properties of biodegradable films based on kombucha cellulose coated with polylactic acid (PLA). Bacterial cellulose films were made by fermenting the kombucha strain in black tea and coated with PLA (polylactic acid) to improve their mechanical properties. The vapor permeance and water vapor transmission rate (transport properties) were determined, and the maximum stress and elastic modulus that correspond to the mechanical properties of the sample were evaluated.

**Keywords:** microbial cellulose, biodegradable films, instrumental characterization.

### Introducción

En el contexto de la creciente conciencia global sobre la importancia de la sostenibilidad ambiental y el uso responsable de recursos, la búsqueda de alternativas a los materiales plásticos convencionales ha adquirido una relevancia inigualable. Los plásticos tradicionales, a menudo derivados de fuentes no renovables y caracterizados por su lenta tasa de degradación, han generado una preocupación creciente debido a su impacto negativo en los ecosistemas y en la salud humana. En respuesta a este desafío, la investigación y el desarrollo de materiales biodegradables se ha convertido en una prioridad científica y tecnológica (Montoya-Anaya, 2023).



La celulosa no es sólo el componente mayoritario de la biomasa de las plantas, sino que también la producen otros organismos como algas marinas y organismos procariotas. En los últimos años la celulosa de origen bacteriano ha ganado importancia debido a sus extraordinarias propiedades (Nguyen et al. 2023). En particular, las biopelículas de celulosa obtenidas a través de procesos de fermentación microbiana, como la fermentación del té de Kombucha, han capturado la atención de la comunidad científica y de la industria debido a sus propiedades únicas y su potencial de aplicación en diversas áreas, incluyendo la biomédica, la farmacéutica y el envasado sostenible.

El reemplazo total de los plásticos sintéticos por materiales biodegradables para la elaboración de empaques no se ha logrado hasta el presente, no obstante, si se han sustituido algunos polímeros sintéticos por otros naturales, en aplicaciones específicas (Villada et al. 2007). Tales reemplazos han permitido el desarrollo de productos con características específicas relacionadas con las propiedades de barrera, mecánicas y térmicas en determinados empaques como películas, protectores, espumas, envolturas, platos, tasas, cucharas, bolsas (Avérous y Boquillon, 2004). Los biopolímeros naturales provienen de cuatro grandes fuentes: origen animal (colágeno/gelatina), marino (quitina/quitosano), agrícola (lípidos y grasas e hidrocoloides: proteínas y polisacáridos) y microbiano (ácido poliláctico (PLA) y polihidroxialcanoatos (PHA) (Tharanathan, 2003). El objetivo del presente trabajo fue evaluar las características fisicoquímicas de películas de celulosa-PLA mediante técnicas instrumentales.

## Métodos y materiales

### Obtención de películas de celulosa-PLA

La celulosa bacteriana fue obtenida a partir de fermentaciones de Kombucha inoculadas con el consorcio microbiano SCOBY. Específicamente, se hirvieron 5 litros de agua con té negro como fuente de nitrógeno (25 g/L) y se añadieron 60 g/L de sacarosa como fuente de carbono, paso seguido se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se añadieron 50 ml de inóculo SCOBY recuperado de fermentaciones previas, se ajustó el pH a 4 con ácido acético al 5% y se mantuvo la fermentación durante 30 días a temperatura ambiente. La fermentación se realizó en recipientes de plástico de 45 x 29 cm y la celulosa se acumuló en la superficie de la fermentación, esta se recuperó y se trató con NaOH 0.1 M, se secó a 80 °C, se blanqueó con hipoclorito de sodio al 1% por 30 min, se plastificó con glicerol al 2% durante 24 h y finalmente se secó de nuevo a 80 °C en un horno convencional. Las biopelículas de celulosa fueron recubiertas con ácido poliláctico (PLA) disolviendo el PLA en cloroformo (1 g/10 ml) y se secaron a 80 °C en un horno convencional (Gowri et al. 2022).

### Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectrometría de energía dispersiva (EDS)

El examen morfológico de la superficie de la película de celulosa se realizó a niveles de aumento de 100X y 5000X utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM). Previo a la captura de imágenes, se aplicó una capa fina de Au-Pd sobre la película mediante un procedimiento de pulverización catódica. Esta etapa de cobertura fue llevada a cabo con el propósito de elevar el nivel de calidad de las imágenes obtenidas. El enfoque morfológico empleado en el análisis de la película de celulosa-PLA tuvo como objetivo primordial el estudio de sus dimensiones y estructuras. Además, la composición elemental de las muestras se evaluó utilizando un detector de espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (PHILIPS ESEM XL30) (Montoya-Anaya, 2023).

### Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)

Se utilizó la técnica de Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS) usando un equipo Thermo fisher scientific K-ALPHA, con 400um FG (400 µm). Se le hizo una erosión de 15 segundos a la muestra para tener un análisis más eficaz, además de un Survey y Scans de los elementos que se encontraron en la película (Gowri et al. 2022).



## Difracción de rayos X (DRX)

Para determinar la estructura cristalina de la biopelícula, se colocó una muestra de esta en un porta muestras para difracción de rayos X. Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron utilizando un difractómetro Bruker D8-Advance Bragg (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.) con geometría Bragg Brentano y radiación  $\text{CuK}\alpha$  monocromática ( $\lambda = 1.541 \text{ \AA}$ ), operado a 40 kV y 30 mA. Los patrones de difracción de Rayos X se registraron en modo reflexión en un rango angular de  $5^\circ$  a  $60^\circ$  ( $2\theta$ ), con un tiempo de paso de 0,5 s y un tamaño de paso de  $0.02^\circ$  (Montoya-Anaya, 2023).

## Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojos de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) de la biopelícula se obtuvieron a temperatura ambiente utilizando un espectrómetro Thermo Nicolet modelo Nexus 670-FTIR (Madison, WI). Las muestras se analizaron en el rango de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ , con resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$  y 64 barridos, para la obtención de los resultados se utilizó el software OMNIC (Madera-Santana et al., 2016).

## Resultados y discusión

### Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los resultados de las micrografías de SEM se muestran en la figura 1. Los resultados demuestran que las superficies y morfología de las biopelículas son rugosas, sin poros y se distinguen regiones con fases discontinuas atribuidas al PLA, debido a que no hay reacción química alguna entre la celulosa y el PLA, además, se observa buena compatibilidad entre la celulosa y el PLA dando como resultados películas biodegradables, utilizando la tecnología de doble capa para mejorar las propiedades fisicoquímicas de los materiales. La superficie de la celulosa obtenida resultó similar a la reportada por Gowri et al. (2022) quienes señalan que la celulosa recuperada de la fermentación de kombucha muestra una superficie compacta y sin poros debido a la interacción celulosa-agua-celulosa.

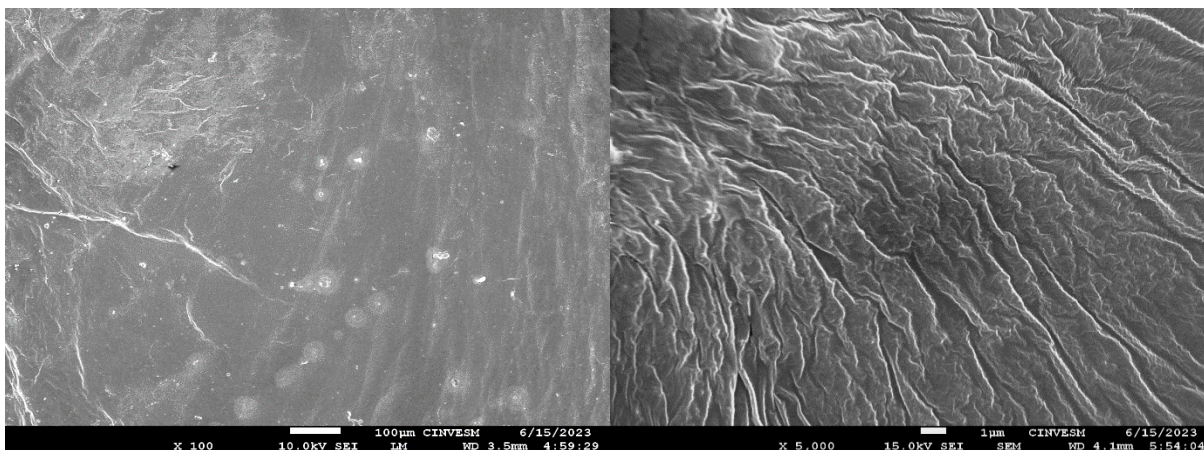


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de la biopelícula de celulosa microbiana. a) ampliación a 100X b) ampliación a 5000X.  
Fuente: elaboración propia.



## Espectrometría de energía dispersiva (EDS)

La composición elemental de las películas de celulosa-PLA se presentan en la tabla 1. Los resultados muestran la pureza de la celulosa microbiana demostrada por la alta concentración de carbono y oxígeno relacionado con la estructura química de los carbohidratos (anillo de piranosa), mientras que la presencia de magnesio y silicio se relaciona con residuos propios del proceso de fermentación, sin embargo, estos minerales no representan riesgo alguno de contaminación para las películas obtenidas.

**Tabla 1.** Composición elemental por espectrometría de energía dispersiva (EDS).

Elemento	Weight (%)	Atomic (%)
C <sub>k</sub>	87.97	90.69
O <sub>k</sub>	12.03	9.31
Mg <sub>k</sub>	1.11	0.60
Si <sub>k</sub>	0.93	0.43

Fuente: elaboración propia.

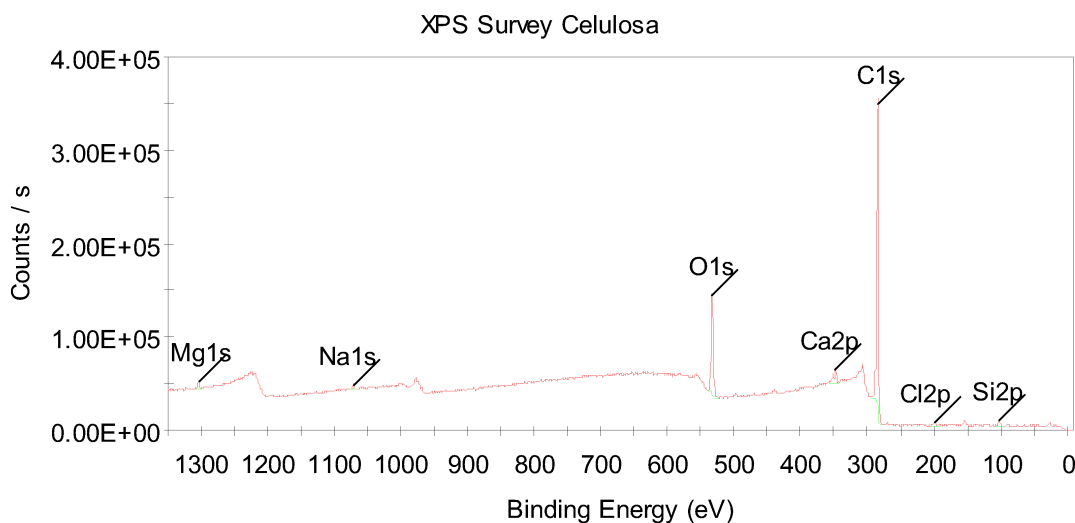


Figura 2. Composición elemental por XPS de la biopelícula de celulosa-PLA.  
 Difracción de Rayos X (DRX).  
 Fuente: elaboración propia

## Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)

Los resultados de la composición elemental por XPS se muestran en la figura 2. Es posible observar la presencia carbono en mayor concentración, seguida del oxígeno y menos concentración de magnesio y silicio, estos elementos encontrados concuerdan con el estudio por EDS, afirmando la pureza de la celulosa microbiana obtenida, libre de contaminantes o residuos como la lignina o metales pesados. Gowri et al. (2022) reportaron la presencia de carbono (76%) y oxígeno (23%) como elementos predominantes por XPS en celulosa bacteriana obtenida de fermentaciones de Kombucha, además, el oxígeno y el carbono se observaron en el mismo rango de energía (C1s y O1s a 300 y 550 eV), siendo un resultado similar al reportado en el presente trabajo.



La figura 3 muestra los resultados de DRX. El difractograma muestra los patrones de difracción típicos de la celulosa con dos picos del plano atómico que muestran la cristalinidad de la celulosa a  $2\theta = 15^\circ$  y  $23^\circ$  para los planos (1 0 0) y (2 0 0), estos resultados son similares a los reportados por Nguyen et al. (2023) quienes reportan dos picos en  $2\theta = 14.5^\circ$  y  $22.7^\circ$  para celulosa bacteriana obtenida del reciclado de papel en los mismos planos.

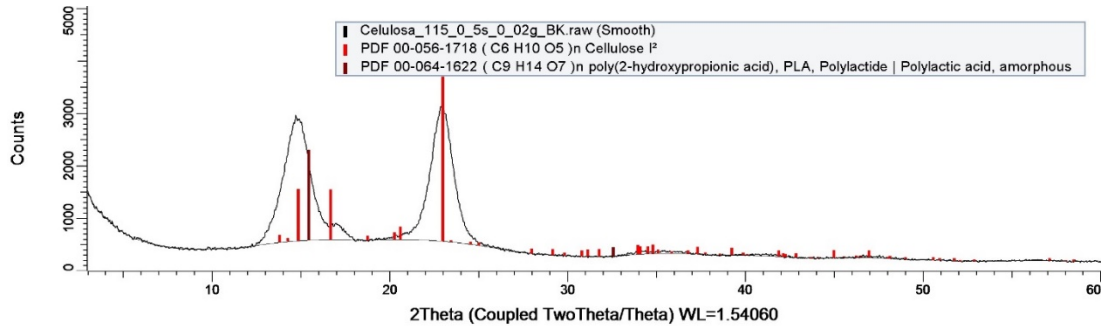


Figura 3. Espectros de difracción de rayos X (DRX) de biopelículas de celulosa microbiana.  
Fuente: elaboración propia.

### Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los resultados de FTIR-ATR para la identificación de grupos funcionales se muestra en la figura 4. Las regiones entre los 900 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  están relacionados con las vibraciones de estiramiento de los enlaces -C-O- y -C-C-, específicamente el pico a 1145  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a las vibraciones asimétricas de estiramiento de -C-O-C- (éteres), estos enlaces son típicos de los anillos de piranosa de la celulosa, así como de los enlaces éteres producidos por las cadenas poliméricas. El pico ancho detectado a 3337  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a los grupos funcionales hidroxilos (-OH) propios de moléculas de agua y de la estructura propia de la celulosa. En este sentido, Gowri et al. (2022) reportaron picos en las mismas regiones entre 900 y 1200  $\text{cm}^{-1}$  y los grupos hidroxilos se reportaron a 1500  $\text{cm}^{-1}$  para celulosa bacteriana. Con respecto a PLA esta fue detectada con el pico a 1750  $\text{cm}^{-1}$  vibración por estiramiento por estiramiento que se atribuye al grupo carbonilo (C=O) propio de la molécula de ácido poliláctico debido a la presencia de grupos carboxilos, además los enlaces ésteres formados en la molécula de PLA se empalman con los -C-O-C- a 1145  $\text{cm}^{-1}$  (Rodríguez-Núñez et al. 2017).

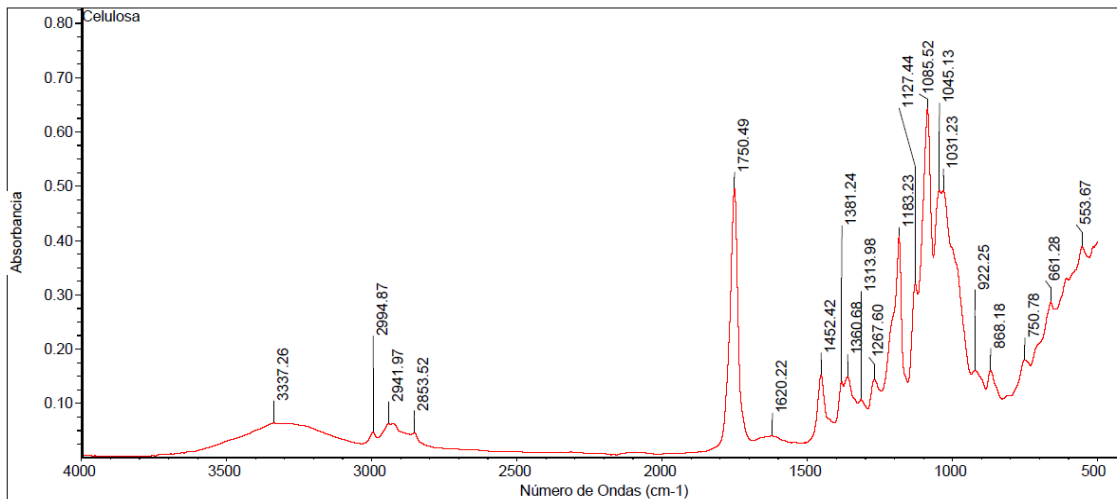


Figura 4. Espectros FTIR-ATR de biopelículas de celulosa-PLA.  
Fuente: elaboración propia.



## Conclusiones

Las películas de celulosa obtenidas por fermentación de kombucha resultaron con alta pureza demostrada por los estudios de EDS y XPS que señalaron la presencia de carbono y oxígeno como elementos prioritarios sin la presencia de impurezas. El análisis de FTIR-ART demuestra la presencia del PLA recubierto en las películas de celulosa y el estudio de SEM lo comprueba ya que se muestran restos de PLA en fase discontinua. El presente trabajo demuestra que es posible utilizar la técnica de doble capa con celulosa bacteriana y PLA para la obtención de una película biodegradable que puede ser aplicada como empaque alimentario.

## Referencias

Avérous, L. y Boquillon N. (2004). Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate Polymer*, 56:111-112. DOI: 10.1016/j.carbpol.2003.11.015

Gowri, A.V., Shivaji, V.S., Bose, S., Sampath, S., Das, S.K., Samanta, D. y Baran, M.A. (2022). Incorporations of gold, silver and carbon nanomaterials to kombucha-derived bacterial cellulose: Development of antibacterial leather-like materials. *Journal of the Indian Chemical Society*, 100278. DOI: 10.1016/j.jics.2021.100278

Madera-Santana, T.J., Meléndrez, R., González-García, G., Quintana-Owen, P. y Pillai, S.D. (2016). Effect of gamma irradiation on physicochemical properties of commercial poly(lactic acid) clamshell for food packaging. *Radiation Physics and Chemistry*, 123: 6-13. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2016.02.001

Montoya-Anaya, D.G.M., Madera-Santana, T.J., Aguirre-Mancilla, C.L., Grijalva-Verdugo, C.P., González-García, G., Núñez-Colín, C.A., y Rodríguez-Núñez, J. R. (2023). Physicochemical characterization of residual potato (*Solanum tuberosum*) starch recovered from the potato chips industry in Mexico: Physicochemical characterization of residual potato. *Biotecnica*, 25(2), 60-72. DOI: 10.18633/biotecnica.v25i2.1880

Nguyen, N.T.T., Phan, T.H., Le, M.T., Le, T.N.T., Huynh, Q., Trang, P.T.P., Hoang, M., Phat, V. y Quan, N.D. (2023). Producing bacterial cellulose from industrial recycling paper waste sludge. *Heliyon*, e17663.

Rodríguez-Núñez, J.R., Domínguez-López, A., Domínguez-López, C., Quintana-Owen, P., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I., Rodríguez-Félix, D.E., Plasencia-Jatomea, M., Peña-Caballero, V., Madera-Santana, T.M. (2017). Evaluation of Physicochemical and Antifungal Properties of Polylactic Acid–Thermoplastic Starch–Chitosan Biocomposites. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 56:44-54. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e17663.

Tharanathan, R. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Critical Review in Food Science and Technology*, 14:71-78. DOI: 10.1016/S0924-2244(02)00280-7

Villada, H.S., Acosta, H., y Velasco, R. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas agrarios*, 12(2), 5-13. <https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/temasagrarios/article/view/652>

