



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO PARA CUANTIFICAR GRUPOS HIDROXILO LIBRES EN CELULOSA
PARA SU POSTERIOR MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN QUE
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QUÍMICO DE ALIMENTOS IVÁN MARTÍNEZ TÉLLEZ

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS
MARÍA DE LOS ÁNGELES VALDIVIA LÓPEZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MAYO DE 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO PARA CUANTIFICAR GRUPOS HIDROXILO LIBRES EN CELULOSA
PARA SU POSTERIOR MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.A. IVÁN MARTÍNEZ TÉLLEZ

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS MARÍA DE LOS ÁNGELES VALDIVIA
LÓPEZ
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

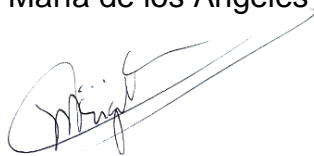


Ciudad de México, mayo de 2022.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorios 322 y 323, Conjunto E, Facultad de Química, Dpto. Alimentos y biotecnología. Ciudad Universitaria

Asesor del tema: M en C María de los Ángeles Valdivia López



Agradecimientos.

Quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y al pueblo de México por permitirme continuar con mi formación académica y seguir progresando en distintas áreas de mi vida.

A la M. en C. María de los Ángeles Valdivia López asesora del presente trabajo; por darme la oportunidad y confianza para desarrollar el trabajo experimental con total libertad y por su guía durante el proceso.

Al Conacyt y al departamento de becas, No. de becario: 956907, ya que sin el apoyo económico no sería posible continuar con mis estudios de posgrado.

También quiero agradecer a mi familia por el apoyo que me han dado a lo largo de mi formación académica, siempre han sido un gran soporte y motivación para seguir adelante.

Un agradecimiento especial a los sinodales que se tomaron el tiempo para la revisión del informe de trabajo experimental. Finalmente, quiero agradecer a la coordinación del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, al Dr. Luis Emilio Orgaz Baqué y a la secretaria técnica Josefina Tenopala García por el apoyo y por resolver las dudas que surgieron durante el proceso de obtención de grado.

CONTENIDO

I. ANTECEDENTES	6
I.I Polisacáridos	6
I.II Celulosa	8
I.II.I Composición y estructura química de celulosa	8
I.II.II Reactividad y modificación química de la celulosa	10
I.III Modificación superficial de fibras naturales	14
I.IV Polímeros antioxidantes	15
II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	16
III. OBJETIVOS	17
IV. METODOLOGÍA	17
Método de Fock	18
Oxidación con $K_2Cr_2O_7$ (reactivo de Jones)	18
Método colorimétrico usando azul reactivo 19	19
Análisis estadístico	20
V. Resultados y discusión	20
Método de Fock	20
Oxidación con $K_2Cr_2O_7$	24
Método colorimétrico con azul reactivo 19	28
Efecto de la hidratación sobre la disponibilidad de grupos hidroxilo...	34
VI. CONCLUSIONES	36
VII. REFERENCIAS	37

I. ANTECEDENTES

I.I Polisacáridos

Los polisacáridos son macromoléculas naturales presentes mayormente en el reino vegetal y en algunas bacterias. Su función principal es el de soporte, como puede ser la celulosa, la pectina y la quitina; o bien como reserva de energía, ejemplos de esto último son el almidón y el glucógeno.

La mayoría de los polisacáridos están conformados por cadenas altamente organizadas, aunque pueden presentar zonas con estructuras amorfas, por lo que no se consideran estructuras completamente cristalinas. Las propiedades físicas de cada polisacárido dependen del monosacárido que lo conforma, así como de la orientación y la forma que toma en la estructura del polímero. Por mencionar un ejemplo, la amilopectina es un polisacárido formado por unidades de glucosa con enlaces α 1-4, altamente ramificado, por lo que idealmente no debería ser una estructura cristalina, sin embargo, adopta una forma semicristalina (Olatunji, 2016).

Los polisacáridos se conforman por una unidad de monosacárido común en la mayoría de los casos, sin embargo, la forma en la que se unen entre sí afecta directamente las características y propiedades de cada polímero. Dentro de los polisacáridos con mayor potencial de uso se encuentran: la celulosa, la hemicelulosa, el almidón, las pectinas, el agar, la quitina, los alginatos, y las gomas como xantana, guar, carrageninas, entre otros. Estos polisacáridos tienen aplicaciones en la industria de alimentos como estabilizantes, modificadores de textura, como materia prima en la elaboración de empaques biodegradables y/o funcionales. En la industria farmacéutica como excipientes, en la formulación de cosméticos, también son usados como implantes o como matrices extracelulares para la regeneración de tejidos (Olatunji, 2016).

Como ya se mencionó, las propiedades físicas de los polímeros dependen en mayor medida de su estructura. Los polímeros lineales y reticulares forman zonas rigurosamente ordenadas, lo que se conoce como estructuras cristalinas. Los polímeros ramificados poseen menos interacciones intermoleculares con las

cadena adyacentes, por lo que no presentan una estructura ordenada, generando zonas amorfas. La presencia de zonas cristalinas aumenta la resistencia mecánica, la dureza y estabilidad térmica (van Krevelen and te Nijenhuis, 2009)

Para fabricar fibras se desea que los polímeros sean lo más cristalinos posibles, ya que la cristalinidad hace que los materiales sean resistentes. Sin embargo, no existen polímeros completamente cristalinos. Un polímero con alto grado de cristalinidad posee en realidad dos componentes, la porción cristalina conocida como lamella y una porción amorfa que se encuentra fuera de la lamella. Las zonas amorfas confieren ductibilidad a los polímeros (van Krevelen and te Nijenhuis, 2009).

El estudio y las aplicaciones de los polímeros naturales es un área de interés renovado dentro de la ciencia de polímeros. El estudio de fibras naturales ha adquirido un interés particular debido a que son materiales de baja densidad, alta disponibilidad, en algunos casos poseen estructuras altamente cristalinas como la celulosa (Thygesen, *et al.*, 2005). Además, tienen la ventaja de ser biodegradables y renovables, biocompatibles y se pueden extraer sin alterar o con cambios mínimos en su estructura química (Olatunji, 2016). En algunos casos es posible aprovechar la cristalinidad de los polisacáridos para incrementar las propiedades mecánicas. Lohrasbi *et al.*, (2020), incorporaron fibras de celulosa a hidrogeles de colágeno demostrando que la adición de celulosa aumenta la resistencia mecánica, la prueba de resistencia a la compresión indicó que los geles de colágeno con celulosa al 8% presentan una resistencia de compresión de 156 ± 5 kPa y una tensión de fractura de 23.06 ± 1.3 %, en comparación los geles de colágeno sin modificar que presentan una resistencia de compresión de 57 ± 6 kPa y una tensión de fractura de 16.30 ± 1.3 %.

Sin embargo, la incompatibilidad con matrices hidrofóbicas, la baja solubilidad en solventes acuosos de algunas fibras naturales, la tendencia a formar agregados durante el procesamiento reduce enormemente el potencial de uso de estos polímeros como materiales para reforzar las propiedades mecánicas de polímeros. Por ello, es necesario caracterizar y estudiar las propiedades estructurales y

funcionales de los polisacáridos, y en algunos casos, modificar químicamente su estructura para poder explotar su funcionalidad y ser utilizados como posibles reemplazos de los polímeros de síntesis.

I.II Celulosa

La madera es el material que se obtiene del tronco y ramas de algunos árboles, y constituye el componente estructural de los mismos. En cuanto a la composición de la madera, se sabe que está conformada por celulosa, hemicelulosa, ligninas, pectinas y polifenoles. La celulosa es el componente principal, aunque la proporción con respecto a otros componentes puede variar de especie a especie. La abundancia de las hemicelulosas y las ligninas depende del tipo de madera de la que provengan. Las maderas “suaves” son ricas en hemicelulosas, mientras que las maderas “duras” lo son en ligninas. El componente minoritario que se puede encontrar en las maderas son los polifenoles.

I.II.I Composición y estructura química de la celulosa

Como se cita en Pérez and Mazeau (2005) en 1913 Willstätter y Zechmeister establecieron la fórmula básica de la molécula de la celulosa. En 1928 el trabajo de Freudenberg y Braun demostró que los átomos de carbono en las posiciones 2,3 y 6 son susceptibles a ser reactivos debido a la presencia de grupos hidroxilos libres, esto último se comprobó mediante la obtención de 2,3,6-trimetilglucosa, producto resultante de la metilación y la subsecuente hidrólisis de la celulosa. Complementariamente a estas investigaciones mediante técnicas cristalográficas se pudo establecer que la celulosa es un homopolímero lineal de residuos de D-glucosa unidos mediante enlaces glucosídicos β -(1-4).

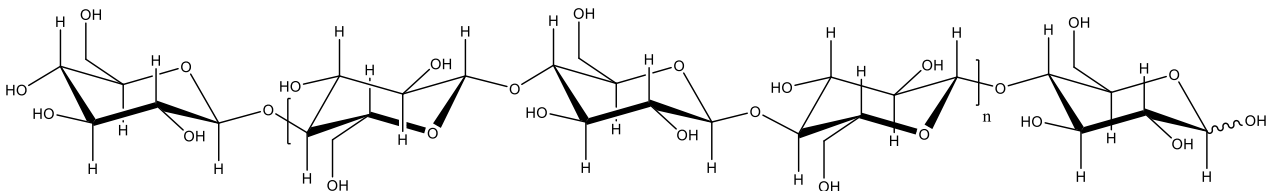


Figura 1. Representación esquemática de la estructura lineal de celulosa.

Los extremos terminales de la celulosa son químicamente diferentes. En la Figura 1 se observa que uno de los extremos terminales posee una unidad de D-glucopiranososa en el cual el carbono anomérico está involucrado en el enlace glucosídico, mientras que el otro extremo posee una unidad de D-glucopiranososa donde el carbono anomérico se encuentra libre formando un hemiacetal cíclico; este último se encuentra en equilibrio con una pequeña proporción de su aldehído, lo que le confiere propiedades reductoras a este extremo de la cadena por lo que la celulosa es una macromolécula polar.

La presencia de grupos hidroxilo a lo largo de la cadena de celulosa origina una red de interacciones intra e intermoleculares por puente de hidrógeno. Adicionalmente a este tipo de interacciones están las de van der Waals entre cadenas adyacentes, lo que da como resultado un ordenamiento altamente cristalino. Sin embargo, también existen zonas amorfas en la celulosa. Los puentes de hidrógeno intramoleculares ocurren entre el hidrógeno del grupo hidroxilo en la posición C3 de un anillo de glucosa y el oxígeno O5 del anillo adyacente, así como entre el hidrógeno del hidroxilo primario en la posición C6 y el oxígeno en la posición C2 del anillo contiguo como se muestra en la Figura 2. Las interacciones intermoleculares ocurren entre el hidrógeno del grupo hidroxilo primario, C6, y el oxígeno en la posición C3 de un anillo de glucosa presente en una cadena de glucosa cercana (Dufresne, 2013).

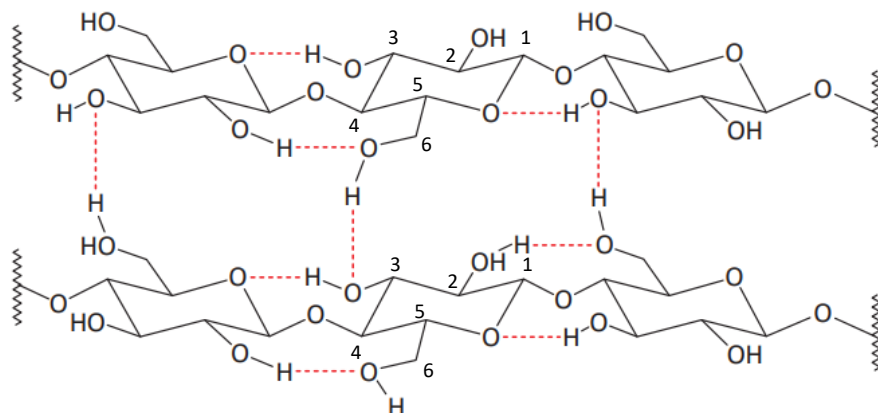


Figura 2. Representación esquemática de interacciones por puentes de hidrógeno inter e intramoleculares (Dufresne, 2013).

Por medio de patrones característicos de difracción de rayos X se han identificado cuatro alomorfos de la celulosa, clasificados como I, II, III y IV, y dentro de estas familias también existen subgrupos de alomorfos. La forma natural de la celulosa y la forma más abundante es la celulosa I o celulosa nativa, se sabe que coexisten 2 formas cristalinas de esta celulosa, conocidas como celulosa I α y celulosa I β , la primera se encuentra en algas y bacterias, mientras que la segunda en organismos vegetales (Pérez and Mazeau, 2005).

La celulosa nativa puede sufrir una transición irreversible a celulosa II, que es una estructura cristalina estable también conocida como celulosa regenerada, mediante dos procesos: regeneración y mercerización. La regeneración consiste en preparar una solución de celulosa en un solvente apropiado o generar un intermediario soluble seguido de un proceso de coagulación y recristalización. El proceso de mercerización involucra hidratar celulosa en soluciones concentradas de NaOH acuoso seguido de lavados y recristalizado.

I.II.II Reactividad y modificación química de la celulosa

Se pueden obtener distintos materiales celulósicos después de modificar a la celulosa mecánica y químicamente. Entre las principales reacciones de modificación química se encuentran las de esterificación, formación de éteres, acetilación, oxidación y formación de radicales.

La celulosa posee tres grupos hidroxilo libres en las posiciones C2, C3 y C6 por unidad de anhidroglucosa que son susceptibles a ser modificados químicamente, Figura 3. Sin embargo, no todas las posiciones presentan la misma reactividad; los grupos -OH en las posiciones C3 y C6 son menos reactivos que el hidroxilo en C2, en especial en las reacciones de formación de éteres (Pérez and Mazeau, 2005).

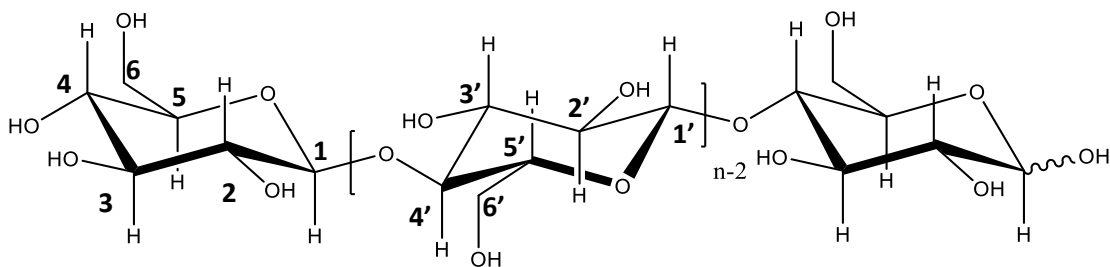


Figura 3. Grupos hidroxilo libres de la celulosa en las posiciones C2, C3 y C6. Los grupos OH en las posiciones C1 y C4 están libres solo en la unidad de D-glucopiranososa terminal de cada extremo. Adaptada de Kondo (2005).

Como se observa en la Figura 3, el hidroxilo en la posición C6 es un alcohol primario, mientras que los hidroxilos en las posiciones 2 y 3 son alcoholes secundarios. Este hecho implica que la polaridad de cada grupo sea distinta lo que contribuye a formar diferentes interacciones inter- e intramoleculares, así como a presentar diferente reactividad.

Para la reacción de formación de metilcelulosa el orden de la reactividad relativa de los grupos hidroxilos de la unidad de anhidroglucosa es $\text{OH-2} > \text{OH-6} > \text{OH-3}$ correspondiente a las posiciones C2, C6 y C3, respectivamente. Se ha postulado que la gran reactividad del OH-2 se debe a su alta acidez que se ve reforzada por la proximidad del carbono anomérico, C1 (Kondo, 2005).

Alan Haines (1976), reportó que en algunas reacciones de esterificación el hidroxilo en la posición C6 reacciona diez veces más rápido en comparación con los otros grupos; el autor atribuye esta gran reactividad a la isomerización que presenta por ser un alcohol primario. A su vez el hidroxilo en la posición C2 posee una reactividad mayor que el hidroxilo en C3.

La reactividad de los grupos hidroxilos también depende de otros factores como el impedimento estérico, los hidroxilos secundarios *endocíclicos*, es decir, los que se encuentran dentro del ciclo en forma de piranosa o furanosa, son menos reactivos que los hidroxilos secundarios *exocíclicos*. La diferencia en la reactividad entre los grupos hidroxilos endocíclicos está controlado por factores estereoelectrónicos y por la habilidad de cada hidroxilo de formar puentes de hidrógeno intramoleculares con otros hidroxilos vecinos o con los alcóxidos del oxígeno. Finalmente, la

reactividad del grupo hidroxilo depende de su configuración en el anillo de piranosa, es decir, si se encuentra en posición ecuatorial o axial (Miljkovic´, 2009).

La modificación superficial por inserción o grafting de la celulosa, es un método que permite unir covalentemente segmentos de polímero o moléculas específicas a lo largo de la superficie de la celulosa, con la finalidad de obtener una macromolécula funcional. La modificación superficial de la celulosa permite obtener materiales novedosos que se pueden usar como elementos de refuerzo en resinas, aditivos en alimentos o aplicaciones farmacéuticos, remplazos de fibras de vidrio, agentes quelantes de contaminantes orgánicos del agua, materiales conductores y fotoluminiscentes para dispositivos electrónicos, entre otros (Gandini and Belgacem, 2008).

La modificación superficial de la celulosa depende de varios factores tales como: estructura química de los sustituyentes introducidos, el grado de sustitución o número de sustituyentes por unidad de glucosa, la distribución de los sustituyentes, y el grado de polimerización y su distribución.

Los grupos funcionales mayoritarios y por lo tanto los responsables de las propiedades fisicoquímicas y, de la mayoría de las modificaciones químicas de la celulosa son los grupos hidroxilo, -OH, y su transformación se ha explotado para modificar las propiedades superficiales y de bulto mediante procesos tradicionales como la síntesis de ésteres y éteres, así como en la preparación de nuevos derivados.

La estructura microcristalina rígida de la celulosa, debido a las fuertes interacciones por puentes de hidrógeno, hace que sea un material polimérico con poca solubilidad en la mayoría de los disolventes acuosos, por lo que es frecuente emplear suspensiones de celulosa para llevar a cabo la mayoría de las reacciones, esto implica que las reacciones se realicen bajo condiciones heterogéneas, y que la accesibilidad a los grupos hidroxilo para reaccionar se vea afectada directamente por impedimentos estéricos de los reactivos y del grado de dispersión de la celulosa (Dufresne, 2013).

El grado de sustitución, DS, es un parámetro importante para conocer la eficiencia de la reacción en la modificación de la celulosa. Este parámetro indica el número de grupos hidroxilo que se encuentran sustituidos después de la reacción por unidad de anhidroglucosa, el grado de sustitución se encuentra en un intervalo de 0-3, con un valor máximo de 3 el cual indica que los tres grupos hidroxilos libres se encuentran sustituidos (Dufresne, 2013).

En lugar de expresar el grado de sustitución por cada unidad de anhidroglucosa así como el total de unidades en la celulosa, es preferible expresar la fracción de grupos hidroxilo sustituidos del total de grupos hidroxilo disponibles para reaccionar, que son los grupos hidroxilo libres en la superficie de la celulosa. La fracción de grupos hidroxilo libres para reaccionar no es algo sencillo de determinar, pero se puede estimar mediante el área superficial específica de la fibra/nanopartícula, Trejo-O'Reilly, Cavallé and Gandini (1997), reportan un intervalo de 1-3% de grupos hidroxilos libres y por tanto susceptibles de ser modificados químicamente en la superficie; estos porcentajes varían en función del tamaño de las moléculas ancladas a la superficie de la celulosa en consecuencia de impedimentos estéricos principalmente.

La determinación del área superficial específica, la accesibilidad y la reactividad de la superficie de fibras de celulosa supone un reto mayor cuando se usan técnicas clásicas de análisis estructural. Ello se debe a la poca solubilidad de la celulosa y porque durante el secado de fibras se produce un fenómeno de agregación de partículas, lo que provoca que se subestime el área superficial específica. Lo anterior resalta la importancia de considerar la geometría de las fibras a partir de observaciones con microscopía. Se puede estimar mediante cristalografía de rayos X el número de cadenas de celulosa en la red cristalina.

Se puede obtener una mayor reactividad de las fibras de celulosa y un grado de sustitución con una distribución de sustituyentes más homogénea usando diferentes tratamientos de activación (Roy, Semsarilar, Guthrie and Perrier, 2009). Estos tratamientos incluyen: apertura de cánulas, poros internos, cavidades e intersticios interfibrilares, interrupción de agregados fibrilares con la intención de obtener mayor

área superficial, perturbación del orden cristalino, alterando la modificación cristalina; ya que de esta forma se cambia el esquema de interacciones por puentes de hidrógeno y la disponibilidad relativa de los grupos hidroxilo (Dufresne, 2013).

El método que se usa con mayor frecuencia para aumentar la disponibilidad de los grupos hidroxilo consiste en hidratar a la celulosa en soluciones ácidas, alcalinas, iónicas y en algunos solventes orgánicos (Roy et al., 2009) en procesos como la mercerización.

I.III Modificación superficial de fibras naturales

En la literatura se puede encontrar el uso de lacasas para el injerto de distintos compuestos en superficies de fibras naturales, típicamente por un acoplamiento vía radicales entre la superficie de ligninas y los compuestos fenólicos. Mediante la modificación superficial de fibras asistida por enzimas es posible obtener materiales con propiedades antimicrobianas, con distinta carga superficial a la del material original y fibras más hidrofóbicas que pueden ser utilizadas en distintos sectores.

En los últimos años se ha explorado la posibilidad de la modificación superficial mediante polimerización iniciada por radicales como método para obtener fibras funcionales. Zhang, Chen, Zang, Chen y Ling (2013), lograron obtener una celulosa modificada que inhibe la tasa de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en un 99.43% y en un 99.45% para *Escherichia coli*, gracias a la inclusión de nanopartículas de plata mediante la oxidación de celulosa con periodato de sodio.

La polimerización por radicales libres iniciada con enzimas es una alternativa “verde” ya que es amigable con el medio ambiente debido a que se evita el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos, y es un método eficiente para obtener materiales poliméricos. Attieh, Zhao, Elkak, Falcimaigne y Haupt (2017) emplearon peroxidasa de rábano picante (HRP) para iniciar la polimerización y el entrecruzamiento de metacrilatos para obtener nanopartículas de polímeros impresos molecularmente o NP-MIPS, estas nanopartículas son polímeros

funcionales con propiedades de reconocimiento molecular específicas, generalmente con un tamaño entre 50-300 nm.

Liu et al. (2015) modificaron enzimáticamente la superficie de fibras ricas en ligninas con acrilamida empleando peroxidasa (HRP) con el propósito de aumentar las propiedades hidrofóbicas de las fibras de yute, el proceso consistió en una copolimerización entre la acrilamida y los grupos fenólicos de la lignina, empleando un radical libre de acetilacetona generado por la peroxidasa como iniciador. Se analizaron las fibras por cromatografía de permeación en gel, espectrometría de masas y espectroscopía infrarroja, para corroborar la unión de la acrilamida a la superficie.

I.IV Polímeros antioxidantes

Los antioxidantes generalmente son usados para retardar las reacciones entre materiales orgánicos y especies reactivas de oxígeno. Dichas reacciones pueden causar la degradación de polímeros alterando varias de sus propiedades físicas; en los alimentos producen la pérdida de sabores y olores, pérdida de valor biológico de proteínas y carbohidratos, así como la rancidez de los mismos; en el caso de los lubricantes aumentan la viscosidad, acidez y se forman productos insolubles, por mencionar algunos ejemplos.

Los antioxidantes poliméricos poseen una actividad antioxidante y farmacocinética mayor en comparación con los antioxidantes de bajo peso molecular; por lo general, se obtienen de la polimerización de moléculas antioxidantes o de la conjugación con polímeros sintéticos o naturales. En los últimos años se ha reportado el uso de polímeros antioxidantes en distintos sectores y en particular en la industria de alimentos como suplementos alimenticios y como aditivos para preservar la calidad de los alimentos (Hashemi and Niakousari, 2017).

Se ha demostrado que algunos polisacáridos naturales como los quitosanos, la quitina y algunos alginatos, así como sus derivados, actúan como materiales antioxidantes debido a los grupos hidroxilos y aminos presentes en estos

biopolímeros, adicionalmente pueden actuar como agentes quelantes de metales (Zalloum H. and Mubarak M., 2013).

Con la modificación de quitosanos y dextranos es posible obtener materiales con actividad antioxidante, antibacterial, antifúngica, antiinflamatoria, entre otros; y con posibles aplicaciones alimentarias, farmacéuticas, biomédicas o de empaques (Hashemi and Niakousari, 2017).

II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

De análisis previos realizados por el departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química, UNAM, se sabe que las muestras de celulosas empleadas en el presente trabajo contienen regiones poco cristalinas y mayormente amorfas. Estas características permiten suponer que los grupos hidroxilos se encuentran disponibles lo que la hace atractiva para modificarla.

Recientemente se ha explorado la posibilidad de acoplar químicamente o enzimáticamente diversos compuestos a la estructura de la celulosa con la finalidad de obtener una macromolécula con propiedades adicionales sin comprometer la funcionalidad de la misma.

La modificación y polimerización superficial de la celulosa se ha reportado en la literatura por vía enzimática al usar peróxidasas/ H_2O_2 y Lacasas/catecol, lo que permite visualizar la incorporación de fenoles en la celulosa mediante el uso de enzimas llevando a cabo un acoplamiento covalente.

El ácido cafeico es un antioxidante natural usado en la industria de alimentos para prevenir el envejecimiento de los mismos, además es una molécula sencilla que se puede oxidar enzimáticamente y reaccionar con otras moléculas para formar redes poliméricas (Strauss and Gibson, 2004).

En esta propuesta se plantea como propósito esencial, obtener una celulosa modificada anclando covalentemente, por vía enzimática, ácido cafeico y

compuestos antioxidantes provenientes de la semilla de chía, para lograr una celulosa con capacidad antioxidante y uso alimentario.

Como objetivo complementario se propuso establecer un método analítico que permita cuantificar la cantidad de -OH disponibles y monitorear los cambios de los mismos durante la modificación enzimática. Debido a que éste es un parámetro fundamental para determinar las condiciones experimentales óptimas que permitan la inclusión, por enlace covalente, de moléculas antioxidantes a la celulosa y para que de esta forma la celulosa contenga una funcionalidad.

La primera parte del trabajo experimental consistió en establecer un método analítico cuantitativo con mayor reproducibilidad y repetibilidad.

III. OBJETIVOS

-Obtener celulosa con actividad antioxidante a partir de la modificación enzimática superficial por vía radicales libres usando un sistema peroxidasa de rábano picante (HRP)/H₂O₂ y ácido cafeico para su posible aplicación en matrices alimentarias como conservante.

-Establecer un método cuantitativo que permita conocer la disponibilidad de grupos hidroxilos libres para su posterior modificación.

IV. METODOLOGÍA

Muestras de celulosa empleadas para el análisis

Se utilizó 3 tipos de celulosa empleados como materiales de referencia.

Celulosa de algodón (Grupo petroquímico Beta S.A. de C.V.)

β-celulosa (Grupo petroquímico Beta S.A. de C.V.)

Celulosa microcristalina

Se analizó celulosa de materiales lignocelulósicos, libres de lignina y hemicelulosa de la especie Teca (*Tectona grandis*) y de olote de maíz. Esta celulosa se obtuvo por un proceso de deconstrucción en un reactor de 5 litros en fase gas/líquido realizado por el departamento de Ingeniería química de la Facultad de Química de la UNAM.

042419TKGrR5Ca: celulosa de Teca obtenida con un tratamiento con calcio.

042419TKGrR5 alcalina: celulosa de Teca obtenida con un tratamiento con NaOH.

0321719TKR3: celulosa de Teca sin blanquear.

092419OLR3SB: celulosa de olote sin blanquear.

092419OLR3B: celulosa de olote después de un tratamiento de blanqueo.

091019TKR3SB: celulosa de Teca sin blanquear.

091019TKR3B: celulosa de Teca después de un tratamiento de blanqueo.

Cuantificación de grupos hidroxilo libres

Método de Fock

Se usó el test de Fock (1959) Se disolvió 0.5 g de pulpa de celulosa en 50 mL de NaOH al 9% y se agregó 1.3 mL de CS₂ (Merck®). Se agitó por 4 h a temperatura ambiente, posteriormente se diluyó a 100 mL con agua destilada; se dejó reposar la mezcla por 2 h para que la celulosa no disuelta precipitara. Transcurrido ese tiempo, se tomó una alícuota de 10 mL del sobrenadante y se neutralizó (pH =7±0.5 medido con potenciómetro) con H₂SO₄ al 20% y se dejó reposar 15 h. A la mezcla anterior se añadió 20 mL de H₂SO₄ al 68% y se agitó en campana de extracción por 1 h. Posteriormente, se diluyó con 50 mL de agua destilada y se agregó 10 mL de K₂Cr₂O₇ 1/6 M, la mezcla resultante se agitó y calentó a una temperatura de 60°C por 1 h. Finalmente, se aforó a 100 mL con agua destilada. Para la valoración se tomó una alícuota de 40 mL de la solución final, se agregó 0.5 g de KI y se valoró con Na₂S₂O₄ 0.1 N previamente normalizado.

Oxidación con K₂Cr₂O₇ (reactivo de Jones)

Se utilizó el método de Padilha de Paula y colaboradores (2008) con algunas modificaciones, para ello se pesó 40 mg de celulosa y se agregó 1 mL de K₂Cr₂O₇

1/6 M y 2 mL de H₂SO₄ al 68%, se llevó a cabo la reacción por 5 min y se dejó enfriar, una vez alcanzado la temperatura ambiente se agregó 10 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 583 nm en un espectrofotómetro (BECKMAN DU®65)

Para corroborar la reducción del dicromato a Cr³⁺ y establecer lo longitud de máxima absorción del ion Cr³⁺, se realizó un barrido espectroscópico con una sal de cromo (III), sulfato de cromo y potasio, con la finalidad de comparar y determinar la presencia del cromo (III) en la reacción de oxido-reducción con celulosa.

Para cuantificar la cantidad de cromo (III) se realizó una curva patrón con sulfato de cromo y potasio en un rango de 20-300 mg/mL a una λ de 583 nm

Método colorimétrico usando azul reactivo 19

Se pesó 0.200 g de celulosa y se añadió 2 mL de solución de azul reactivo 19 en una concentración de 6% para asegurar que todos los grupos OH disponibles reaccionaran y se mezcló con 2 mL de NaOH 0.02M y 2 mL de NaH₂PO₄ 0.06M, se agitó por 30 min a temperatura ambiente y después se añadió Na₂CO₃ al 1% (m/v) como catalizador, posteriormente se calentó en un baño de agua a una temperatura de 70°C por 1 hora. Pasado el tiempo de reacción, la solución se filtró, el sólido se sumergió en agua en una relación 1:200 (m/v) para enjuagar y eliminar el colorante que no se haya unido a la celulosa y se agitó por 1 hora a temperatura ambiente.

Para calcular el porcentaje de agotamiento del colorante, el porcentaje de fijación y la cantidad de colorante unido a la celulosa se midió la concentración inicial y final a una longitud de onda de máxima absorción (λ) de 594 nm, para ello se empleó una curva patrón de azul reactivo 19 en un rango de concentraciones de 20-150 μ g/mL.

$$\% \text{ Agotamiento: } \left(\frac{C_0 - C_1}{C_0} \right) \times 100$$

$$\% \text{ Fijación: } \left(\frac{C_0 - C_1 - C_2}{C_0} \right) \times 100$$

$$\text{Cantidad de colorante unido (mg/g celulosa): } \left(\frac{C \times V \times F}{m} \right)$$

Donde C_0 y C_1 es la concentración de la solución del colorante antes y después del proceso de coloración, C_2 es la concentración del colorante en solución de enjuague y lavado.

C es la concentración inicial del colorante y V el volumen total de la solución, F es la relación de fijación de colorante y m la masa de celulosa.

Análisis estadístico

Para el método de Fock se realizaron 3 réplicas por cada muestra. Para los métodos de oxidación con $K_2Cr_2O_7$ y colorimétrico con azul reactivo 19, se realizaron 9 réplicas para cada muestra analizada. Los resultados se expresaron como el valor promedio \pm intervalo de confianza a un 95% de probabilidad.

Se realizó un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA), con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Para comparar si existía diferencia entre muestras, las medias fueron evaluadas mediante el análisis de diferencia mínima significativa (LSD) de Fischer, con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Los datos fueron procesados en una hoja de cálculo usando el programa *Microsoft Excel*[®] 2019.

Los gráficos se realizaron mediante el programa *OriginLab*[®] 2022.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método de Fock

Se usa la prueba de Fock para determinar la reactividad de pulpas solubles. Es un método a microescala del proceso viscoso para generar rayón; se basa en una reacción de esterificación con C_2S en medio básico, conocida como reacción de xantación, generando un derivado soluble de celulosa. Se agrega H_2SO_4 para regenerar a la celulosa seguido de una oxidación con ácido crómico y, finalmente, una valoración por retroceso del dicromato de potasio excedente que no reaccionó con la celulosa, (ver Figuras 4 y 5). Este método es sensible ante varios factores como la humedad de la muestra, el tiempo de la reacción de xantación, la concentración de C_2S agregada a la mezcla de reacción, la concentración de $NaOH$ y el punto final de la titulación, el cual es difícil de identificar (Tian et. al., 2013). Lo

anterior provoca poca precisión y varias fuentes de error estadístico que se ven reflejadas esencialmente en la dispersión de los datos. Sin embargo, este método es una primera aproximación acerca de la disponibilidad de los grupos hidroxilo en distintas fuentes de celulosa.

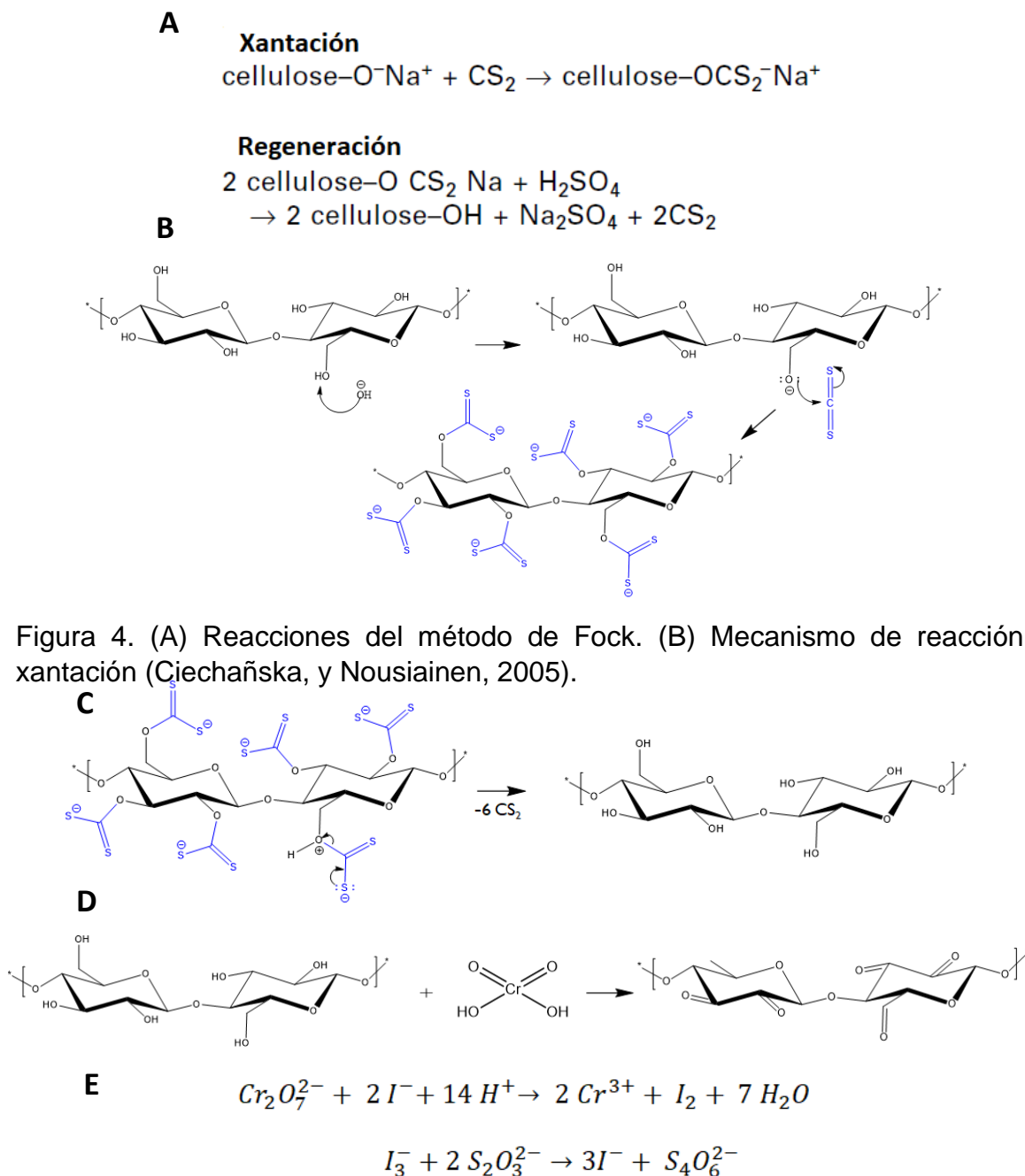


Figura 5 (C) Mecanismo de regeneración de celulosa (D) Reacción de oxidación de celulosa con ácido crómico (E) Reacciones de valoración de dicromato con yodo.

En el Cuadro1 se muestran los resultados de celulosa reactiva obtenidos por el método de Fock.

Cuadro 1. Contenido de celulosa reactiva promedio (%) determinada por el método de Fock.

Muestra	% Celulosa reactiva	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
β Celulosa ^a	31.69	7.13	22.49
Algodón ^a	34.35	1.98	5.78
04-24-19TKGr5Ca ^a	33.06	5.23	15.81
04-24-19TKGrR5 alcalina ^b	9.55	6.25	65.47
0321719TKR3 ^c	44.79	5.67	12.65
TECA ^a	30.23	6.23	20.60
Celulosa microcristalina ^d	24.23	4.86	20.05

Letras diferentes indican que existe diferencia significativa a un $\alpha = 0.05$, $c > a > d > b$

El porcentaje de celulosa soluble es equivalente a la cantidad de grupos hidroxilo que reaccionaron para dar una forma soluble de celulosa. La diferencia de resultados entre las distintas celulosas evaluadas se puede deber a cambios estructurales en las muestras debido a los tratamientos previos, así como a los fenómenos de mercerización y xantación, que ocurren durante el proceso de análisis. En disoluciones alcalinas se forma un complejo denominado celulosa alcalina (Figura 6), los iones de NaOH son capaces de romper las interacciones por puente de hidrógeno entre las cadenas de celulosa, alterando la estructura de esta, las moléculas de NaOH interactúan primeramente con las zonas amorfas y después con las zonas cristalinas (Sayyed, Deshmukh, and Pinjari, 2019). El efecto neto es un rearrreglo estructural de las zonas cristalinas y amorfas lo que afecta directamente la disponibilidad de hidroxilos libres que posteriormente van a reaccionar con el CS₂.

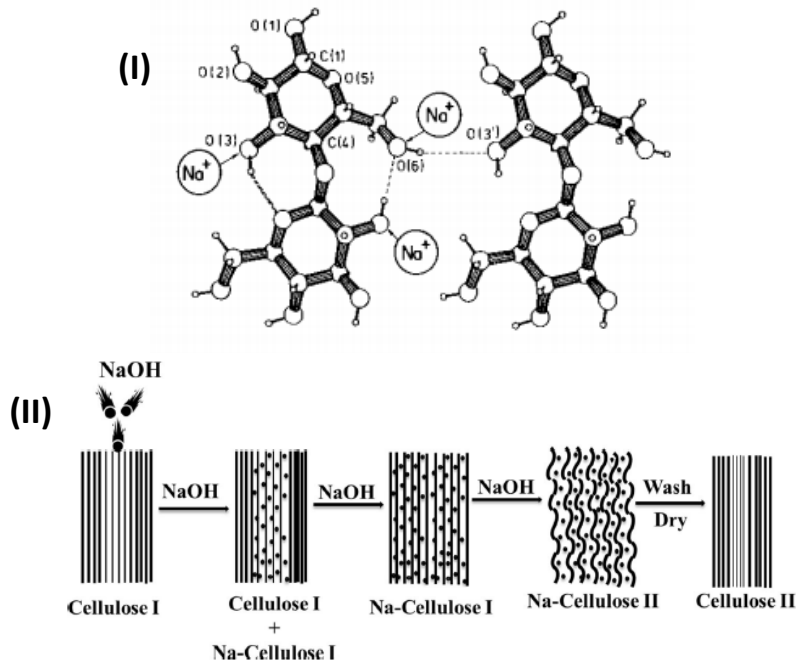


Figura 6. (I) Posible interacción entre iones de Na^+ y moléculas de celulosa (Fink et al., 1995). (II) Representación esquemática del proceso de mercerización (Okano y Sarko, 1985).

De los materiales que se utilizaron como materiales de referencia, la celulosa microcristalina presentó el menor porcentaje de celulosa reactiva posiblemente porque posee mayormente zonas cristalinas que son más resistentes a los cambios estructurales y por tanto no se afecta la disponibilidad de OH. En contraste, la celulosa de algodón y la β -celulosa no presentan diferencia significativa en el contenido (%) de celulosa reactiva, pero es mayor en comparación con la microcristalina. En cuanto a las muestras de celulosa analizadas, la muestra 04-24-19TKGrR5 alcalina presenta el menor valor de celulosa reactiva. Sin embargo, para las muestras restantes de teca se obtuvo un valor de celulosa reactiva estadísticamente similar a los materiales de referencia. Lo anterior representa que los tratamientos permitieron aumentar la disponibilidad de grupos OH, sin embargo, no se puede concluir con certeza ya que el método carece de repetibilidad debido a que es un método con muchas fuentes de error lo cual se ve reflejado en el coeficiente de variación. Esto se atribuye a la variación de parámetros, principalmente en la etapa de la formación del derivado, debido principalmente a

que la reacción de xantación es susceptible a la temperatura, el tipo de agitación, la concentración de CS₂ añadida, la concentración de NaOH y a la presión generada durante la agitación (Sayyed, et al., 2019). De manera adicional la reacción de xantación es exotérmica y genera gases altamente corrosivos como H₂S, SO₂ y OCS (sulfuro de carbonilo) lo que dificulta la optimización de los parámetros.

Oxidación con K₂Cr₂O₇

El segundo método analítico que se utilizó, para cuantificar la cantidad de grupos hidroxilo libres, fue la oxidación de los alcoholes secundarios a aldehídos, empleando el reactivo de Jones. Esta oxidación es la misma que se usa en la última parte del método de Fock, con la diferencia que se analiza a la celulosa en su totalidad y no solo la parte soluble. Como se observa en la Figura 7, el dicromato de potasio en medio ácido produce ácido crómico que al reaccionar con los hidroxilos de la celulosa es reducido de Cr(VI) a Cr(IV). El cromo (IV) es un cromóforo de color azul que se puede medir espectrofotométricamente. Las condiciones experimentales para generar el reactivo de Jones y que se puedan oxidar los alcoholes secundarios a grupos carbonílicos requieren de condiciones altamente ácidas, $\text{pH} \cong 1$, por lo que es fácil que ocurra la ruptura hidrolítica del enlace glucosídico de las unidades de glucosa de la celulosa, aumentando así la cantidad de OH que puede reaccionar y, por tanto, sobrestimando la cantidad de -OH susceptibles a ser modificados. Como se observa en la Figura 8, la especie reducida de Cr(IV) no es la única que se puede formar durante la oxidación también es posible obtener especies de Cr(III) y Cr(V). Existen distintos métodos para oxidar a la celulosa y formar derivados con propiedades ácido-base u oxido-reductoras que permiten realizar determinaciones volumétricas, para conocer el grado de sustitución en la celulosa, sin embargo, son métodos indirectos que introducen error estadístico aumentando la incertidumbre, son tardados o bien se emplean disolventes corrosivos o tóxicos. La oxidación con K₂Cr₂O₇ se eligió como posible método de análisis ya que tiene la ventaja de ser un método directo, rápido y con poco error estadístico, pero no es recomendable como método por las desventajas ya mencionadas.

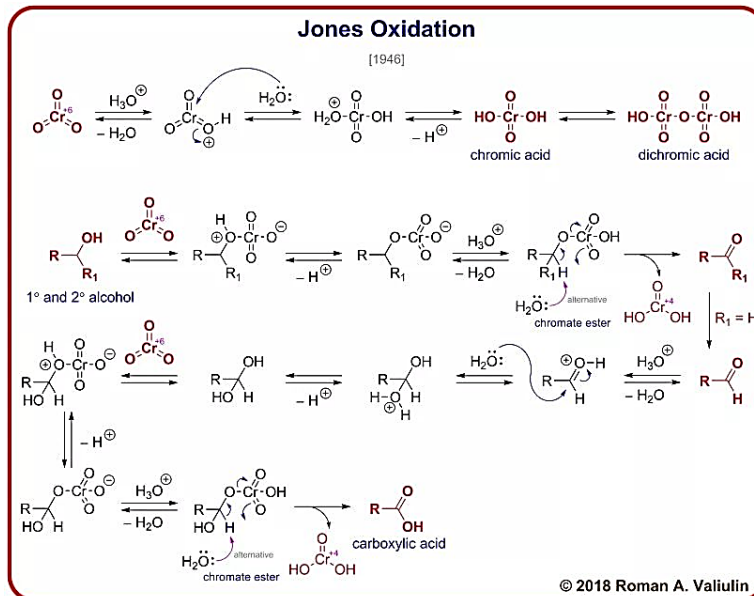


Figura 7. Mecanismo general de oxidación de Jones (Valiulin, 2020).

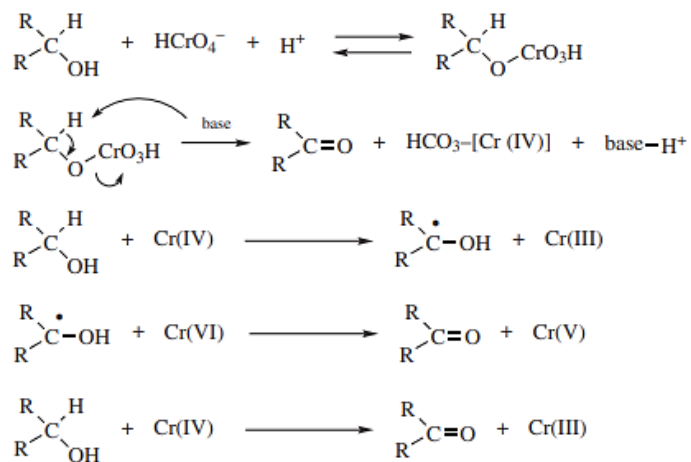


Figura 8. Reacciones colaterales en la oxidación de Jones donde se observa la formación de las especies de Cr (III) y (V) (Smith y March, 2007).

Cuadro 2. Contenido promedio (%) de OH disponibles determinado mediante el método colorimétrico empleando $K_2Cr_2O_7$.

Muestra	OH disponibles (%)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
04-24-19TKGrR5Ca	53.71	11.78	21.93
04-24-19TKGrR5alcalina	85.55	9.90	11.58
032719TKR3	92.40	8.65	9.37
04-24-19TKGrR5Ca	35.56	7.21	20.27
04-24-19TKGrR5alcalina	80.78	7.89	9.77
032719TKR3	96.81	1.60	1.65
04-24-19TKGrR5Ca	69.08**	2.85	4.13
04-24-19TKGrR5alcalina	82.22	5.19	6.31
0321719TKR3	86.79	3.32	3.82
β Celulosa	74.85	4.06	5.43
04-24-19TKGrR5Ca	59.69 ^A	3.01	5.05
04-24-19TKGrR5Ca	52.71 ^B	5.22	9.91
04-24-19TKGrR5alcalina	82.01	1.03	1.26
0321719TKR3	96	1.61	1.68
β Celulosa	92.69	5.99	6.46

**Porcentaje de OH disponibles después de 24 horas de secado. (A)% de OH disponibles después de dializar por 48 horas. (B)% OH después de secar por 24 horas sin dializar.

El Cuadro 2 muestra los resultados obtenidos expresados como porcentaje de grupos -OH libres determinados mediante la oxidación de celulosa con ácido crómico.

Los resultados obtenidos por este método indican que la disponibilidad de -OH en las muestras de celulosas es mayor en comparación con los resultados que se obtuvieron por el método de Fock. Esto es probable que se explique principalmente

por una sobrestimación de grupos hidroxilos por la ruptura de los enlaces glucosídicos debido a las condiciones de reacción. Por otro lado, en la Figura 8 se muestran las reacciones colaterales que producen especies de Cr (III) y (IV) que son capaces de seguir oxidando, a los hidroxilos de la celulosa, por lo que la reacción es difícil de controlar.

El Cuadro 3 muestra las medias de OHs para las muestras de celulosa estudiadas. El análisis de varianza indica que no existe diferencia significativa entre la muestra 04-24-19TKGrR5 alcalina y la β -celulosa, la muestra 04-24-19TKGrR5Ca presenta una disponibilidad de -OH menor que la muestra alcalina lo que indica claramente que el proceso para obtener celulosa usando calcio afecta la estructura de la celulosa.

Cuadro 3. Contenido (%) de grupos OH disponibles de las celulosas.

Muestra	β -celulosa	042419TKGrR5 Ca	042419TKGrR5 alcalina	0321719TKR3
% OH	84.67 \pm 9.06 ^a	54.29 \pm 2.11 ^b	83.26 \pm 1.99 ^a	95.07 \pm 2.35 ^c

Letras diferentes indican que existe diferencia significativa a un valor de significancia, $\alpha=0.05$.

El tratamiento de blanqueamiento para obtener celulosas poco cristalinas libres de hemicelulosas y ligninas, llevado a cabo por un grupo multidisciplinario de la Facultad de Química, UNAM, indica que la disponibilidad de los grupos -OH aumenta con este tratamiento. El Cuadro 4 muestra el porcentaje de -OH de dos muestras de celulosas antes y después del tratamiento de blanqueamiento. La muestra 091019TKR3B no presenta diferencia significativa en el porcentaje de -OH lo que indica que el blanqueamiento no afectó la disponibilidad de -OH para esta muestra. Sin embargo, la muestra 092419OLR3 presenta un aumento de 7% después del blanqueo, este aumento se podría deber a una modificación de la estructura debido al proceso de blanqueo.

A pesar de que este método presenta buena repetibilidad, carece de exactitud, ya que no es posible conocer el valor verdadero en el %OH debido, como se mencionó anteriormente, a que la reacción de oxidación es difícil de controlar y existe también una sobrestimación de los datos.

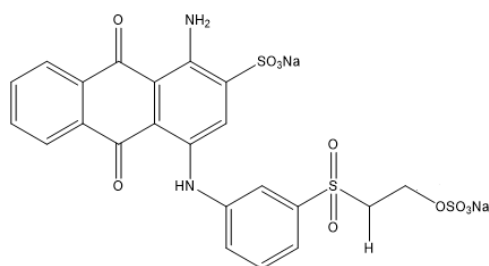
Cuadro 4. Efecto del tratamiento de blanqueo sobre la disponibilidad de los grupos -OH.

Muestra		% OH	Desviación estándar	Coefficiente de variación. (%)
092419OLR3	SB*	23.12	2.56	3.66
	B	30.58	1.36	5.90
091019TKR3	SB	49.68^a	1.83	3.68
	B	45.05^a	2.29	5.09
	B	48.23^a	2.02	4.18

Las muestras se analizaron por triplicado y se realizó una repetición de la muestra 091010TKR3B, (*) SB: muestra sin blanquear, B: muestra blanqueada, (a) no se encontró diferencia significativa entre el tiempo 0 y después del tratamiento.

Método colorimétrico (Azul reactivo 19)

Este método está basado en los cambios de concentración del colorante azul reactivo 19 en disolución (Figura 9). El decremento en la absorbancia es directamente proporcional a la disminución en la concentración del colorante en la disolución. Lo anterior, debido a que el colorante se une a la celulosa mediante una reacción de formación de un éter entre los grupos hidroxilo de la celulosa con un grupo vinilsulfónico del colorante azul reactivo 19 en medio básico, Figura 10.



Azul reactivo 19

Figura 9. Estructura química del azul reactivo 19.

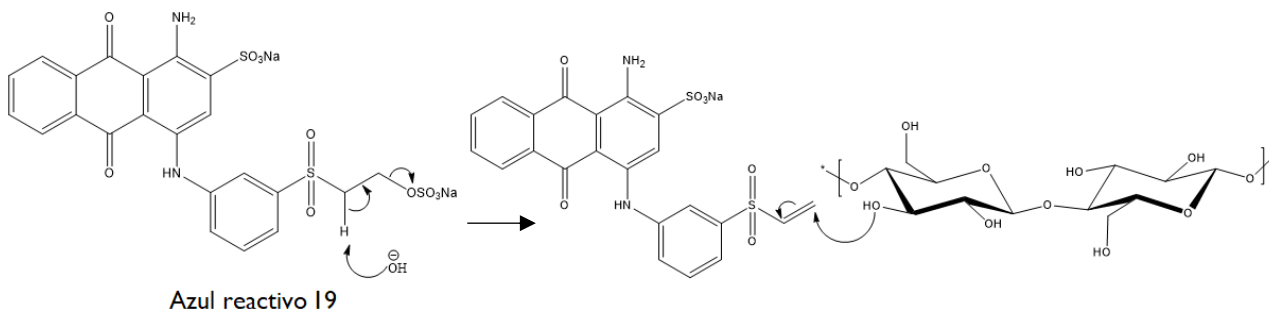


Figura 10. Mecanismo de reacción entre la celulosa y azul reactivo

Este método tiene la ventaja de ser menos agresivo y evita la ruptura de los enlaces glucosídicos, es un método rápido y con una dispersión menor al método de Fock. La estequiometría de la reacción es 1:1 y al conocer la cantidad del colorante unido a la celulosa, se puede conocer la cantidad exacta de grupos -OH que reaccionaron y por tanto la cantidad de -OH disponibles. El colorante azul reactivo 19 es una molécula voluminosa, por lo que reactividad se ve limitada por factores estéricos y los OH que reaccionan son los que no presentan este impedimento; este método no permite conocer la reactividad de los grupos hidroxilos que pudieran reaccionar con moléculas más pequeñas.

La Figura 11, muestra el barrido espectrofotométrico en UV-Vis del azul reactivo 19 en disolución, en un intervalo de 200-700 nm. En el barrido se puede observar que existen dos máximos de absorción, es decir en 594 nm y en 200-300 nm. El máximo correspondiente a la región visible se debe al grupo cromóforo del colorante, mientras que el máximo en la región UV se debe a los dobles enlaces conjugados de la antraquinona. De los dos máximos de absorción que presenta el colorante azul reactivo 19, se decidió trabajar con la región visible ya que el máximo de absorción en 200-300 nm presenta ruido instrumental que interfiere con las determinaciones. La Figura 12, muestra los barridos espectrofotométricos y los cambios en las absorbancias de disoluciones de azul reactivo 19 debido a la reacción de esterificación. La absorbancia inicial, A_0 , corresponde a la cantidad de colorante antes de la reacción. La absorbancia remanente, A_1 , es la absorbancia de la disolución de colorante después de la reacción y la absorbancia A_2 , corresponde a la absorbancia del colorante obtenido de los lavados de la celulosa que quedaron adsorbidos en la superficie de la celulosa.

La reacción de acoplamiento entre el colorante azul reactivo 19 y la celulosa disminuye la concentración del colorante en disolución, de tal manera que es posible conocer la concentración de azul reactivo antes y después de la reacción. Esto permite conocer la cantidad de colorante que se ha unido a la celulosa, se puede comprobar en la Figura 12, que se observa un cambio en la absorbancia de la disolución de azul reactivo debido a la disminución del colorante en disolución y que corresponde a la cantidad de colorante que se ha unido a la celulosa.

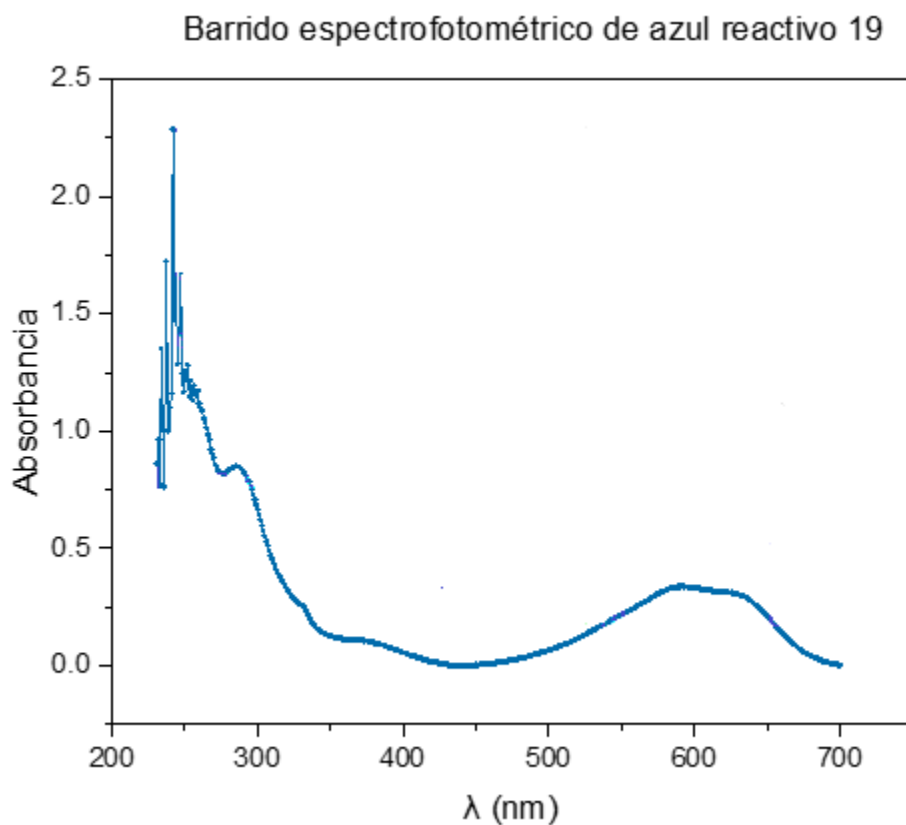


Figura 11. Barrido en UV-Vis de colorante azul reactivo 19 y zonas de máxima absorción en 594 nm y 200-300 nm.

Espectro de absorción de soluciones de azul reactivo 19

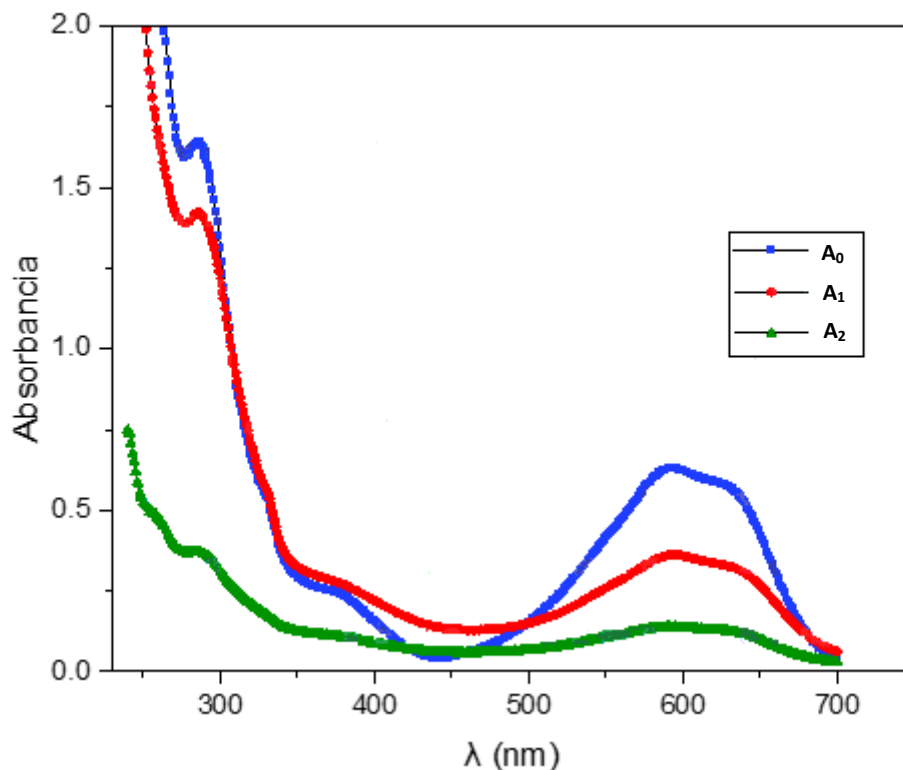


Figura 12. Cambios en la absorbancia de soluciones de azul reactivo 19 debido a la reacción de esterificación. A₀, absorbancia inicial. A₁, absorbancia remanente. A₂, absorbancia de soluciones de lavados.

La estequiometría de la reacción es 1:1, es decir 1 mol de azul reactivo 19 reacciona con 1 mol de OH, al conocer la cantidad del colorante unido a la celulosa se puede conocer la cantidad exacta de grupos -OH que reaccionaron y por tanto la cantidad de -OH disponibles.

El Cuadro 5 muestra la concentración (mg de OH/ g de celulosa); al hacer un comparativo, los resultados reportados con este método son similares a los obtenidos con el método de Fock, pero con una menor dispersión, la celulosa de algodón presenta la mayor disponibilidad de las muestras analizadas debido a su arreglo estructural. Una ventaja que ofrece este método es que no existe la posibilidad de rearrreglos estructurales por mercerización ya que las condiciones de reacción son ligeramente básicas, pH=9, sin embargo, la hidratación de las

muestras si tiene un efecto sobre la disponibilidad de OH como se explica más adelante.

Este último método tiene la ventaja de ser menos agresivo, evita la ruptura de los enlaces glucosídicos, es rápido y presenta una dispersión menor de datos en comparación con los dos métodos anteriores.

Cuadro 5. Contenido (%) de -OH disponibles usando azul reactivo 19.

Muestra	Agotamiento (%)	Fijación (%)	Fijación en celulosa (mmol Azul/g celulosa)	OH disponibles (%) (mg OH/g celulosa)
0327TKR3	15.04	12.03	14.94	25.93 ± 2.34
042419TKGrR5Ca	20.28	14.99	22.23	37.78 ± 3.62
04-24-19TKGrR5alcalina	21.45	13.76	20.98	35.32 ± 4.98
β celulosa	20.17	13.50	16.89	28.72 ± 4.81
Celulosa de Algodón	19.25	14.20	23.56	39.32 ± 4.02
Celulosa microcristalina	15.35	12.56	12.54	23.34 ± 4.69

Repetibilidad del método

Se utilizó celulosa de algodón y β-celulosa como materiales de referencia para establecer la repetibilidad del método y para establecer la disponibilidad de grupos OH en materiales prístinos. Los Cuadros 6 y 7, muestran los resultados del contenido (%) de OH de celulosa de algodón y β-celulosa respectivamente. Las muestras se analizaron por triplicado. Con la finalidad de determinar la repetibilidad del método, se realizó un análisis de varianza de un solo factor comparando los resultados obtenidos de tres días distintos.

Los resultados indican que no existe diferencia significativa entre los días de tratamiento para la celulosa de algodón y β-celulosa; es decir, el método es repetible ya que existe coincidencia en los datos para el mismo analista e instrumentalización;

en cuanto a la desviación estándar relativa o coeficiente de variación, los Cuadros 6 y 7 muestran que el CV se encuentra dentro del intervalo aceptable, por lo que podemos concluir que el método colorimétrico para determinar OH es un método preciso y por tanto posee repetibilidad.

Cuadro 6. Contenido (%) de -OH libres de celulosa de algodón determinados en tres días distintos.

Día	1	2	3
% OH (mg OH /g celulosa)	24.4741	26.3354	26.2566
	25.2140	25.0302	25.2929
	24.2148	25.6194	25.6155
Media	24.6343 ^a	25.6617 ^a	25.7217 ^a
SD	0.5185	0.6536	0.4905
CV (%)	2.1049	2.5471	1.9070

*Letras iguales indican que no existe diferencia significativa en los resultados obtenidos en distintos días, a un $\alpha=0.05$.

Cuadro 7. Contenido (%) de OH libres de β -celulosa en tres días distintos.

Día	1	2	3
% OH (mg OH /g celulosa)	24.4515	23.1638	24.0227
	22.5650	23.9089	25.9276
	23.0691	21.3895	23.1839
Media	23.3619 ^b	22.8207 ^b	24.3781 ^b
SD	0.9768	1.2942	1.4060
CV (%)	4.1810	5.6713	5.7674

*Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre los resultados a un $\alpha=0.05$

Una vez establecido que el método colorimétrico empleando azul reactivo 19 para determinar OH libres es un método preciso, se procedió a determinar el porcentaje de grupos hidroxilos libres en materiales sin modificar. En el Cuadro 8 se muestra el comparativo de los resultados del análisis de celulosa de algodón, β -celulosa y celulosa microcristalina. De acuerdo con el análisis de varianza y al método de

diferencia mínima significativa (LSD), el % de OH libres para cada tipo de celulosa es diferente. Esta diferencia se puede atribuir al arreglo estructural de cada tipo de celulosa. La β -celulosa es la fracción soluble en disoluciones de hidróxido a una concentración de 9.45 y 17.5%, y que precipita en disoluciones ácidas (TAPPI, 1999). Mientras que la celulosa microcristalina es un derivado de la α -celulosa parcialmente despolimerizada; la α -celulosa es la parte no soluble en disoluciones de hidróxido a una concentración de 9.45 y 17.5% (Fernández y Fernández, 1992).

La β -celulosa al ser la parte soluble posee menos interacciones por puente de hidrógeno intermoleculares y por tanto más grupos OH libres en la superficie en comparación con la microcristalina, ya que a esta se le atribuye poca solubilidad debido a la gran cantidad de puentes de hidrógeno y en consecuencia menos disponibilidad de hidroxilos lo que correspondería con los datos obtenidos en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Contenido (%) de OH libres para distintas muestras de celulosa.

Tipo de celulosa	Algodón	β -celulosa	microcristalina
% OH (mg OH/ g celulosa)	25.3392 \pm 0.4686 ^a	23.5202 \pm 0.8316 ^b	12.9720 \pm 0.5901 ^c

*El intervalo de confianza de los datos se calculó al 95% de confianza y con n=9. Letras distintas indican que existe diferencia significativa a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, $a > b > c$.

Efecto de la hidratación sobre la disponibilidad de grupos hidroxilo

Las interacciones por puentes de hidrógeno en la celulosa hacen que la disponibilidad de los OH en la superficie sea relativamente baja. Para aumentar la exposición de grupos hidroxilos es necesario desestabilizar la estructura altamente cristalina mediante métodos como la mercerización con ácidos y álcalis.

Hill, et al. (2010), reportan cambios durante el secado de celulosa de madera, los autores determinaron que existe una disminución en la distancia de las cadenas de celulosa, es decir, un mayor empaquetamiento y por tanto mayor número de interacciones. Estos efectos son parcialmente reversibles cuando las fibras son

hidratadas, estos cambios son atribuidos principalmente a las interacciones por puente de hidrógeno intermoleculares que se forman en la superficie de la celulosa deshidratada. Con la premisa de que pueden ocurrir cambios en las interacciones en el proceso de rehidratación, se evaluó el tiempo de hidratación en celulosa de madera de Teca, 07319TKR5, como posible factor en el aumento de la disponibilidad de OH en la superficie. La celulosa de Teca se hidrató por 6, 12 y 24 h. La Figura 13 muestra la gráfica en el aumento del porcentaje de OH en función del tiempo de hidratación.

La gráfica muestra un aumento en el porcentaje de hidroxilos libres conforme aumenta el tiempo de hidratación. El Cuadro 9 muestra los datos para el porcentaje de grupos hidroxilos en función del tiempo de hidratación. El análisis estadístico indica que existe diferencia significativa entre tratamientos, es decir, que el tiempo de hidratación aumenta la disponibilidad de los OH disponibles en la superficie. Esto último se atribuye a la capacidad de retención de agua de la celulosa, la celulosa al ser rehidratada se hincha ya que las moléculas de agua pueden penetrar los intersticios superficiales disminuyendo las interacciones por puentes de hidrogeno entre las cadenas de celulosa aumentando de esta forma la disponibilidad de los grupos hidroxilo, sin embargo, esto se tiene que corroborar con estudios estructurales.

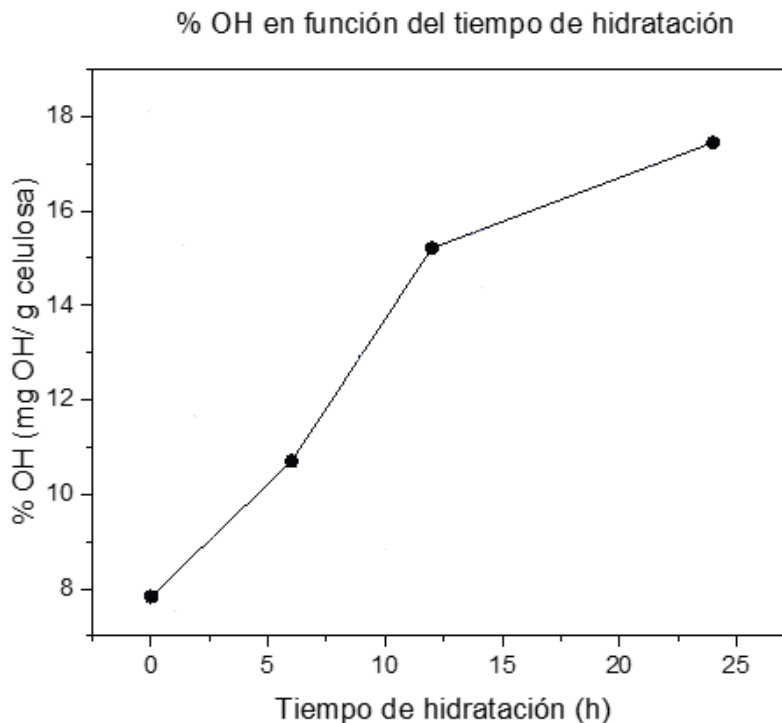


Figura 13. Aumento de la disponibilidad de OH en función del tiempo de hidratación a 6,12 y 24 h.

Cuadro 9. Efecto del tiempo de hidratación sobre la disponibilidad de OH

Tiempo (horas)	0	6	12	24
% OH (mg OH/g celulosa)	7.8453 8.1700 7.4917	10.1283 11.0502 10.9300	16.2220 15.1652 13.1226	16.2889 18.4372 17.6255
Promedio	7.8357 ^a ±0.8424	10.7028 ^b ±1.2449	14.8366 ^c ±3.9141	17.4505 ^d ±2.6948

Letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre los tratamientos a un nivel de significancia, $\alpha=0.05$, $d>c>b>a$.

VI. CONCLUSIONES

- La mercerización, la reacción de xantación y la regeneración, modifican el arreglo estructural de celulosa afectando directamente la disponibilidad de grupos OHs.
- El método de Fock presentó gran dispersión de datos, sin embargo, permitió establecer que la modificación de los grupos hidroxilo en la celulosa afecta las propiedades de la misma, en este caso, la solubilidad.

-La oxidación de celulosa con ácido crómico sobrestima la cantidad de hidroxilos disponibles debido al poco control de la reacción y a la ruptura de enlaces glucosídicos.

-Se estableció que el método colorimétrico con azul reactivo 19 es un método cuantitativo, repetible y rápido para determinar el contenido de grupos hidroxilo en celulosa.

-Se determinó que existe diferencia en la disponibilidad de hidroxilos en las celulosas tratadas con calcio y NaOH con los métodos empleados en el estudio.

-Se estableció que el proceso de blanqueo aumenta la disponibilidad de grupos OH

VII. REFERENCIAS.

Attieh, M.D., Zhao, Y., Elkak, A., Falcimaigne, A. and Haupt, K. (2017) Enzyme initiated free radical polymerization of molecularly imprinted polymer nanogels on a solid phase with an immobilized radical source. *Angewandte Chemie*, 129,1-6. doi: 10.1002/anie.201612667

Astley, O.M. and Donald, A. (2001). A small angle X-ray scattering study of the effect of hydration on the microestructure of flax fibers. *Biomacromolecules*, 2(3), 672-680. doi: 10.1021/bm0056431.

Ciechańska, D. and Nousiainen P., 2005, Cellulosic fibres and fabric processing En: Blackburn, R.S. Biodegradable and sustainable fibres, 1st. Ed., Woodhead publishing limited y CRC Press LLC.

Dufresne, A. (2013). Cellulose and potential reinforcement **En:** Dufresne, Alain. Nanocellulose, from nature to high performance tailored materials, 1st. Ed. De Gruyter, Berlin,1-42. doi:10.1515/9783110254600

Fernández, L. y Fernández R. (1992). Celulosa microcristalina. Memorias ATCP, 32^a, reunión anual, Ciudad de México.

Fink, H.P., Walenta, E., Kunze, J. and Mann, G. (1995). Wide angle X-ray and solid state C-NMR studies of cellulose alkalisiation En: Cellulose and cellulose derivates: physicochemical aspects and industrial applications. 1st. Ed. Cambridge, England: Woodhead publishing Ltd. 523-528.

Fock, V.W. (1959). *Das papier*,13(3), 92.

Freudenberg, K. & Braun, E. (1928). Methycellulose. *Justus liebig's annalen der chemie*, 460(1), 288-304.

Gandini, A. and Belgacem, M.N. (2008). The state of the Art **En:** Belgacem, M.N. and Gandini, A. Monomers, polymers and composites from renewable resources, 1st. Ed. Elsevier, Amsterdam, 1-16.

Haines, A. (1976). Relative reactivities of hydroxyl groups in carbohydrates. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 33, 11-109. doi: 10.1016/S0065-2318(08)60280-2

Hashemi Gahruie, H. and Niakousari, M. (2017). Antioxidant, antimicrobial, cell viability and enzymatic inhibitory of antioxidant polymers as biological macromolecules. *International journal of biological macromolecules*. 104, 606-617.

Kondo, T. (2005). Hydrogen bonds in cellulose and cellulose derivatives **En:** Dumitri, S., Polysaccharides, structural diversity and functional versatility. 2nd. Ed. Marcel Dekker, 69-98.

Liu, R., Dong, A., Fan, X., Wang, Q., Yu, Y. and Cavaco, A. (2015). HRP mediated polyacrylamide graft modification of raw jute fabric. *Journal of molecular catalysis b: enzymatic*, 116, 29-38. doi: 10.1016/j.molcatb.2015.03.004

Lohrasbi, S., Mirzaei, E., Karimizade, A. *et. al.* (2020) Collagen/cellulose nanofiber hydrogel scaffold: physical, mechanical and cell biocompatibility properties. *Cellulose*, 27, 927-940. doi: 10.1007/s10570-019-02841-y

Miljkovic´, M. (2009). Relative reactivity of hydroxyl groups in monosaccharides **En:** Miljkovic´, M. Carbohydrates, synthesis, mechanisms and stereoelectronic effects. 1st Ed. Springer, 113-142 doi: 10.1007/978-0-387-92265-2_5

Okano, T. and Sarko, A. (1985). Mercerization of cellulose. II. Alkali cellulose intermediates and a possible mercerization mechanism. *Journal of applied polymer science*, 30, 325-332.

Olatunji, O. (2016). Natural polymers, industry techniques and applications. 1st Ed. Springer doi: 10.1007/978-3-319-26414-1

Padilha de Paula, J., Farago, P.V., Binhara, P.B., Silva, S.A., and Zawadzki, S.F. (2008). Determination of hydroxyl number in aliphatic polyesters and polyethers using a colorimetric method. *Polymer Testing*, 27(6), 675-678. doi: 10.1016/j.polymertesting.2008.05.007

Pérez, S. and Mazeau, K. (2005). Conformations, structures and morphologies of cellulose. **En:** Dumitri, S., Polysaccharides, structural diversity and functional versatility. 2nd. Ed. Marcel Dekker, 41-68.

Roy, D., Semsarilar, M., Guthrie, J.T. and Perrier, S. (2009). Cellulose modification by polymer grafting. A review. *Chemical society reviews*, 38, 2046-2064.

Sayed, A., Deshmukh, N.A. and Pinjari, D. (2019). A critical review of manufacturing processes used in regenerated cellulosic fibres: viscose, cellulose acetate, cuproammonium, LiCl/DMAc, ionic liquids and NMMO based lyocell. *Cellulose*, 26, 2913-2940. doi: 10.1007/s10570-019-02318-y

Smith, M.B. and March, J. (2007). Oxidations and reductions En: Smith, M.B. y March, J. March's advanced organic chemistry reactions, mechanisms and structure 6th Ed. Wiley interscience.

Strauss, G.M. and Gibson, S. (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin based coacervates for use as food ingredients. *Food hydrocolloids*, 18, 81-89.

Tian, C., Zheng, L., Miao, Q., Nash, C., Cao, C. and Ni, Y. (2013). Improvement in the fock test for determining the reactivity of dissolving pulp. *Tappi journal*, 12(11), 21-26.

Thygesen, A., Oddershede, J., Lilholt, H., *et al.* (2005). On the determination of cristallinity and cellulose content in plant fibers. *Cellulose*, 12, 563-576 doi: 10.1007/s10570-005-9001-8

Trejo-O'reilly, JA., Cavaille, JY. and Gandini, A. (1997). The surface chemical modification of cellulosic fibers in view of their use in composites materials. *Cellulose* 4, 305-320. doi: 10.1023/A:1018452310122

Valiulin, R. (2020). Organic chemistry: 100 most know mechanisms. De Gruyter

Van Krevelen, D.W. and te Nijenhuis, K. (2009) Properties of polymers. Their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions. 4thEd. El sevier. doi: B978-0-08-054819-7.00007-8

Willstätter, R. and Zechmeister, L. (1913). Zur kenntnis der hydrolyse von cellulose, *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft*, 46(2), 2401-2412.

Zalloum, H. and Mubarak, M. (2013). Chitosan and chitosan derivates as chelating agents **En:** Thomas, S., Ninan, N., Mohan, S. y Francis, E. Natural polymers, biopolymers, biomaterials and their composites, blends and IPNS. *Advances in material science*, Vol. 2, 1st Ed, Apple academic press.

Zhang, D., Chen, L., Zang, C., Chen, Y. and Lin, H. (2013). Antibacterial cotton fabric grafted with silver nanoparticles and its excellent laundering durability, *Carbohydrate polymers*, 92, 2088-2094. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.11.100