



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

**Obtención y caracterización de compósitos de nanofibras de celulosa y
quitosano por formación nebulizada de películas**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Forestales

Camilo Antonio Torres Rojas.
CONCEPCIÓN- CHILE
2023

Profesor(a) Guía: Dr Miguel A. Pereira Soto
Departamento de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad de Concepción

Obtención y caracterización de compósitos de nanofibras de celulosa y quitosano por formación nebulizada de películas.

Comisión Evaluadora:

Miguel Pereira Soto (Profesor guía)
Ingeniero Civil Químico, Dr.

Oscar Valerio González (Comisión evaluadora)
Ingeniero Civil Químico, Dr.

Regis Teixeira Mendonça (Comisión evaluadora)
Ingeniero Químico, Dr.

Directora de Postgrado:

Regis Teixeira Mendonça
Ingeniero Químico

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Manuel Sánchez Olate
Ingeniero Forestal, Dr.

Agradecimientos

De manera inicial deseo agradecer al profesor Miguel Pereira, por recibirme en su oficina hace dos años y abrirme las puertas para formar parte de su equipo, por la confianza depositada en mí y en el trabajo realizado. Segundo, al grupo humano del Laboratorio de Productos Forestales: Isidora, Sergio, Héctor, Carla, y Alexandra, quienes me enseñaron, aconsejaron y alentaron durante este periodo. También, al profesor Óscar Valerio por enriquecer la calidad de la discusión realizada y aportar con su experiencia.

Finalmente, deseo agradecer a mis padres Jorge Torres y Solange Rojas, por la genética, la crianza y apoyo que, a pesar de los años, nunca han dejado de brindarme.

Resumen

Uno de los desafíos actuales es reducir la producción y desecho de plásticos de origen fósil en la industria de empaques alimenticios. Se han estudiado diversas alternativas, entre ellas el uso de nanofibras de celulosa (NFC) y quitosano (CS). Si bien se han realizado diversas investigaciones relativas a cada material y el uso de NFC como refuerzo de CS, su mezcla con un enfoque más amplio ha recibido menos atención. Además, no se han realizado estudios exhaustivos sobre la interacción electrostática entre NFC y CS. Es por esto que el objetivo general de esta investigación fue desarrollar y caracterizar películas, obtenidas a partir de mezclas de NFC con la adición de quitosano. Se prepararon dos baterías de películas. La primera, fue obtenida variando la composición de NFC y CS. La segunda, fue preparada manteniendo constante la composición, y modificando el grado de protonación (α), por medio del ajuste del pH de las dispersiones. Respecto a la composición NFC/CS, se encontró que el aumento de CS disminuyó el módulo de Young, el límite elástico, y aumentó la permeabilidad al aire de las películas obtenidas. La modificación del grado de protonación del quitosano en películas, con mezcla de NFC y CS, pudo ser comprobado por variaciones en espectros FTIR y Raman. Un mayor grado de protonación aumentó significativamente el módulo de Young y límite elástico de películas. Esto fue atribuido al aumento en las interacciones electrostáticas entre NFC y CS, que ayudaron a reforzar la matriz de nanofibras. Las mediciones de ángulo de contacto revelaron que el aumento del porcentaje de CS en la mezcla NFC/CS ayuda a obtener mayores ángulos de contacto. Películas con 100%NFC resultaron hidrofílicas (43.5°), mientras que las 100%CS fueron hidrofóbicas (104.2°). Sin embargo, al aumentar el grado de protonación, fue posible obtener películas hidrofóbicas con mayor contenido de NFC.

La combinación de NFC y CS, junto con la modificación de la protonación de CS, demostró potencial para obtener materiales compuestos como alternativas sostenibles para la industria de empaques de alimentos. Estos resultados sugieren que la modificación del pH puede ser una forma fácil y escalable de producir materiales más amigables con el medio ambiente.

Abstract

One of the current challenges is to reduce the production and disposal of fossil-based plastics in the food packaging industry. In the search for a more sustainable industry, various alternatives have been studied, including nanofibrillated cellulose from plant biomass and chitosan. While individual contributions related to each material and the use of NFC as reinforcement for CS have been made, the broader mix of NFC and CS has received less attention. Additionally, comprehensive studies on the electrostatic interaction between NFC and CS are still lacking. Thus, the general objective of this research was to develop and characterize a sustainable material from NFC/CS mixtures with characteristics suitable for food packaging applications. For this, two sets of films were prepared. The first set varied the NFC/CS composition. The second set maintained a constant composition and varied the chitosan protonation degree, by adjusting the pH of the dispersions. Regarding the NFC/CS composition, it was found that increasing CS content reduced the Young's modulus, elastic limit, and increased air permeability of the films. The modification of chitosan protonation degree in films with NFC-CS mixture was confirmed by changes in FTIR and Raman spectra. A higher protonation degree significantly increased the Young's modulus and elastic limit of the films. This was attributed to the increase in electrostatic interactions between NFC and CS, reinforcing the nanofiber matrix. Contact angle measurements revealed that increasing CS percentage in the NFC-CS mixture resulted in higher contact angles. Films with 100% NFC were hydrophilic (43.5°), while those with 100% CS were hydrophobic (104.2°). However, by increasing the protonation degree, it was possible to obtain hydrophobic films with higher NFC content.

The combination of NFC and CS, along with chitosan protonation modification, showed potential for producing composite materials as sustainable alternatives for the food packaging industry. These results suggest that pH modification can be a simple and scalable way to produce more environmentally friendly materials.

Índice

1. Introducción	1
2. Hipótesis	5
3. Objetivos	5
3.1. Objetivo general	5
3.2. Objetivo específicos	5
4. Marco Teórico	6
4.1. Desafíos de la industria del empaque	6
4.2. Nanofibras de celulosa y quitosano como materias primas	10
4.2.1. Nanofibras de celulosa	10
4.2.2. Quitosano	15
4.2.3. Materiales compuestos de nanofibras de celulosa y quitosano reportados	21
4.3. Procesos de fabricación de películas	22
5. Materiales y métodos	25
5.1. Materiales	25
5.2. Metodología	26
5.2.1. Producción de nanofibras de celulosa	26
5.2.2. Caracterización de nanofibras de celulosa	26
5.2.3. Obtención de dispersiones de quitosano	28
5.2.4. Determinación del grado de protonación de dispersiones de quitosano	28
5.2.5. Formulaciones nanofibra de celulosa /quitosano estudiadas	28
5.2.6. Producción de películas por nebulización	29
5.2.7. Caracterización de películas obtenidas	30
5.2.7.1. Ensayo mecánico de tensión	30
5.2.7.2. Medición ángulo de contacto	30
5.2.7.3. Microscopía óptica y electrónica de barrido	31
5.2.7.4. Análisis de espectroscopía FTIR y Raman	31
5.2.7.5. Permeabilidad de aire	31
5.2.7.6. Tasa de transferencia de oxígeno	32
5.2.8. Análisis estadístico de mediciones	32
6. Resultados y discusión	33
6.1. Caracterización de las nanofibras producidas	33
6.2. Grado de protonación de quitosano	33
6.3. Espesor de películas obtenidas	34
6.4. Microscopía de películas obtenidas	35
6.4.1. Microscopía óptica	35
6.4.2. Microscopía electrónica de barrido	39
6.5. Análisis espectrónicos	42
6.5.1. Espectroscopía FTIR	42
6.5.2. Espectroscopía Raman	43
6.6. Propiedades mecánicas	44
6.7. Ángulo de contacto	46
6.8. Barrera a gases	47
7. Conclusiones	50
8. Bibliografía	52

Índice de tablas

Tabla 1. Publicaciones relacionadas con NC, CS y obtención de materiales de empaque_____	21
Tabla 2. Muestras y composiciones de la primera batería de ensayos _____	29
Tabla 3. Muestras y grados de protonación de la segunda batería de ensayos _____	29
Tabla 4. pH objetivo de dispersiones utilizadas para estudiar el cambio de grado de protonación (α) ($pK_a = 6.52$) _____	34
Tabla 5. Resultados de las pruebas de tensión en películas obtenidas _____	45
Tabla 6. Ángulo de contacto al agua de películas obtenidas _____	46
Tabla 7. Propiedades de barrera de películas obtenidas _____	47

Índice de figuras

Figura 1. Permeabilidad de oxígeno (OTR) vs Permeabilidad de vapor (WVTR) para distintos alimentos. (Schmidt et al., 2012)	8
Figura 2. Esquema tridimensional de la estructura de la pared de célula vegetal. (Plomion et al., 2002)	11
Figura 3. Proceso de producción de nano materiales celulósicos a partir de biomasa vegetal. (A) Pretratamientos químicos y mecánicos de la biomasa para extracción de pulpa de fibra. (B) Hidrólisis enzimática controlada para la producción de nanofibras de celulosa y nanocristales con sus tamaños respectivos. (C) Posible tratamiento mecánico posterior, habitualmente utilizado para obtener una distribución de tamaño más uniforme. (Michelin et al., 2020)	12
Figura 4. Esquema de las principales metodologías para la obtención de nanomateriales de celulosa a partir de pulpa blanqueada de fibras (Pirih et al., 2020)	13
Figura 5. Esquema de la acción enzimática en de endoglucanasas (EG), exoglucanasas (CBH) y β -glucosidasas (β G) en conjunto sobre microfibras (Pirih et al., 2020)	14
Figura 6. Esquema de un gas atravesando una película de NFC (izquierda) y una película de CNC (derecha) (Wang et al., 2020)	15
Figura 7. Diagrama de bloques del proceso de obtención habitual del quitosano (Ilyas et al., 2022). Esquema químico de la desacetilación de la quitina (Munim et al., 2020)	16
Figura 8. Efecto del grado de acetilación y grado de polimerización sobre el tamaño de partícula y potencial Zeta de quitosano (Goycoolea et al., 2007)	17
Figura 9. Ilustración de las interacciones electrostáticas entre nanofibras de celulosa y quitosano en distintos grados de protonación	19
Figura 10. Cambio en el grado de protonación del quitosano frente a cambios en concentración de ácido clorhídrico y ácido acético (Rinaudo et al., 1999)	20
Figura 11. Efecto en el módulo de elasticidad en distintos ensayos con películas de NC nebulizadas (Shanmugan et al., 2018)	24
Figura 12. Esquema del diseño experimental realizado	25
Figura 13. Arreglo utilizado para la formación nebulizada de películas. Pistola a presión con aire (izquierda) y bastidor de 15cm de diámetro (derecha)	30

Figura 14. Relación de viscosidad reducida y concentración para el cálculo de viscosidad intrínseca _____	33
Figura 15. Titulación potenciométrica realizada (a). Curva $\Delta\text{pH}/\Delta V$ obtenida (b) _____	34
Figura 16. Diagrama de cajas del espesor de películas fabricadas. (a) Batería 1: A (100%NFC), B(80%NFC+20%CS), C(60%NFC+40%CS), D(40%NFC+60%CS), E(20%NFC+80%CS), F(100%CS). (b) Batería 2: CA($\alpha=1$), CB($\alpha=0.8$), CC($\alpha=0.63$), CD($\alpha=0.4$), CE($\alpha=0.2$), CF($\alpha=0$) _____	35
Figura 17. Microscopía óptica de películas con diferente composición NFC/CS _____	37
Figura 18. Microscopía óptica de películas con diferente grado de protonación (α) _____	38
Figura 19. Microscopía electrónica de barrido de superficie de películas de diferente composición _____	40
Figura 20. Microscopía electrónica de barrido de superficie de películas de diferente grado de protonación ($\alpha=1$) _____	41
Figura 21. Espectros FTIR de películas obtenidas. (a) Películas con diferente composición; A (100% NFC), C (60%NFC+40%CS), F (100%CS). (b) Películas con misma composición (60%NFC+40%CS) y distinto grado de protonación; CA ($\alpha=1$), C ($\alpha=0.63$), CF ($\alpha=0$). _____	43
Figura 22. Espectro Raman de películas obtenidas. (a) Muestras con diferente composición; A (100% NFC), C (60%NFC+40%CS), F (100%CS). (b) Muestras con misma composición (60%NFC+40%CS) y diferentes grados de protonación (α). _____	44
Figura 23. Cambios en interacción entre NFC y CS en diferentes condiciones de protonación. _____	45

1. Introducción

Uno de los importantes desafíos de nuestra época es disminuir la producción y desecho de plásticos de origen fósil. Se ha estimado que, anualmente, 32 mil millones de toneladas de plástico es desechado, de los cuales parte importante proviene de la industria de empaques alimenticios (Lavric *et al.*, 2021). Su capacidad de proteger y prolongar la vida útil para cada tipo de producto depende de tres aspectos principales; resistencia mecánica, permeabilidad de gases y degradabilidad (Yang *et al.*, 2020).

Polímeros como polietileno y polipropileno son ampliamente utilizados en la industria de empaques debido a su durabilidad y versatilidad. Sin embargo, su naturaleza persistente contribuye a la acumulación de desecho y daño medioambiental. La necesidad de una industria sustentable insta la búsqueda de materiales renovables que se adapten a nuevas necesidades. El uso de polímeros de origen natural en empaques de alimentos se ha presentado como una alternativa de interés (Yates *et al.*, 2021). Sustancias como; ácido poliláctico (PLA) derivado de almidón de maíz, polihidroxialcanoatos (PHA) y polihidroxitirato (PHB) obtenidos por la fermentación de azúcares, quitosano (CS) derivado de la quitina presente en el exoesqueleto de crustáceos o materiales lignocelulósicos extraídos de la pared secundaria de las células vegetales de especies leñosas entre otros, han sido estudiados como posibles sustitutos y/o complementos de empaques tradicionales en distintas aplicaciones.

Tanto el quitosano como los materiales lignocelulósicos destacan como alternativas debido a su escalabilidad asociada con la disponibilidad de materias primas y el conocimiento existente de su procesamiento y obtención.

La celulosa obtenida desde biomasa vegetal es generada en la membrana plasmática de cada célula vegetal y depositada en la pared celular, en conjunto con hemicelulosas y lignina. La celulosa obtenida desde plantas se considera una fuente renovable y sustentable para la producción de nuevos materiales. El contenido de celulosa en plantas varía dependiendo del tipo de especie, representa el 90%p/p en el algodón, 35-50%p/p en

especies leñosas y entre el 70-80%p/p en especies como la lianza o el cáñamo. A nivel microscópico, las microfibrillas de celulosa son estructuras resistentes, insolubles en agua conformadas por agrupaciones de fibrillas elementales con regiones amorfas y cristalinas (Fotie *et al.*, 2020). A partir de distintos procesos de pulpage químico y mecánico es posible separar las fibras de madera entre sí, a través de la degradación de la lignina presente en la lámina media en el caso de los métodos químicos como el pulpage Kraft y por la separación de las fibras por un esfuerzo cortante en el caso de los métodos mecánicos. Tratamientos posteriores a esta pulpa permiten desarmar la fibra y acceder a la ultra estructura de la pared celular. Cuando es tratada de forma química, mecánica y/o enzimática, es posible modular el tamaño de partícula y generar una variedad de materiales con características deseables distintas aplicaciones, como los empaques de alimentos.

Es posible obtener, a partir de biomasa vegetal, diferentes materiales nanoscópicos, como nanocristales de celulosa (CNC) y nanofibras de celulosa (NFC). Ambos materiales presentan una gran cantidad de grupos hidroxilos en sus cadenas principales, otorgandoles una carga superficial negativa. Estos han demostrado un gran potencial en su aplicación como empaque de alimentos área debido a su elevada resistencia mecánica, estabilidad térmica, protección de barrera al traspaso de gases y baja resistencia al agua. Wang (2020) estudio las diferencias en propiedades físico mecánicas y de barrera a gases de películas obtenidas a partir CNC y NFC provenientes de un mismo origen vegetal. A partir de sus resultados concluyó que, CNC y NFC se comportan de manera similar respecto a sus propiedades mecánicas cuando se comparan espesores, sin embargo, se ha observado una mayor fragilidad a la ruptura en la manipulación en películas de CNC. Por otra parte, películas de NFC presentan mayor resistencia al vapor que CNC, esto se atribuye a la generación de un trayecto más tortuoso que el generado por películas de CNC.

Por otra parte, el segundo polímero natural más abundante es la quitina, homopolímero de N-acetil-D-glucosamina, componente estructural presente en el exoesqueleto de crustáceos y generado por algunos hongos. Desde el punto de vista estructural es similar a la celulosa y también es obtenido a escala industrial.

Quitosano (CS) es un biopolímero obtenido por medio de la desacetilación de la quitina. Un aumento del grado de desacetilación (DD) permite mejorar la solubilidad en medio ácido e incrementar su actividad antibacteriana (Li *et al.*, 2020). Se ha comprobado ampliamente su capacidad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, entre otras bacterias asociadas a la contaminación de alimentos (Liu *et al.*, 2013).

Se ha aportado evidencia que indica que la formación de películas de quitosano presenta gran capacidad antibacteriana y resistencia al agua, pero deficientes propiedades físico mecánicas y permeabilidad al vapor de agua (Kaya *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018). Al mismo tiempo, se ha estudiado que cambios en pH del medio con distintos ácidos permiten modular el grado de protonación de los grupos amino presentes en la estructura principal del CS, afectando fuertemente su polaridad y su solubilidad (Wang, 2006; Rinaudo *et al.*, 1999). Al mismo tiempo, la modificación de su protonación permite modular las fuerzas electrostáticas cuando interactúa con otras sustancias como alginato (Lavric *et al.*, 2021) y nano arcillas (Lewandowska *et al.*, 2022). Un mayor carácter catiónico permite favorecer las fuerzas de cohesión con matrices aniónicas como la celulosa. Al presente no se han reportado estudios exhaustivos en la determinación de la interacción entre NFC y CS en distintas condiciones de protonación.

La interacción entre materiales nanocelulósicos y quitosano ha despertado el interés de distintos grupos de investigación. El principal enfoque de estos estudios ha sido el reforzamiento de películas de quitosano con la adición de bajas porciones de materiales nanocelulósicos para mejorar sus propiedades físico mecánicas. Se ha evidenciado que la formación de películas por evaporación de quitosano reforzado con bajas concentraciones de NC (<1%), permite una mejora en su módulo de elasticidad sin una variación significativa en la permeabilidad al vapor (Solkhin *et al.*, 2018). Por otra parte, películas de CS recubiertas con CNC, no presentan cambios significativos en la permeabilidad al vapor de agua, y bajos módulos de tensión, atribuidos a la destrucción entre capas (Satam *et al.*, 2018). Por el contrario, la adición de quitosano en películas de nanocelulosa y sus efectos en sus distintas propiedades como empaque de alimentos ha recibido menos atención.

Por este motivo, se propone el estudio de la obtención de un material basado en NFC y CS en distintas proporciones de composición y protonación de quitosano, a partir del análisis de las propiedades de películas obtenidas bajo distintas condiciones. Así, poder determinar el efecto de las fuerzas electrostáticas en la interacción entre estos polímeros de gran potencial para la industria de empaque de alimentos. Se espera, a través de distintas series de experimentación, establecer cómo cambia la resistencia mecánica, permeabilidad a gases (aire y oxígeno), ángulo de contacto del agua, y características superficiales en películas, frente a distintas proporciones de NFC/CS, como un material de fácil fabricación que sea una alternativa sustentable y con características favorecidas para su aplicación como empaque de alimentos.

2. Hipótesis

La modificación del grado de protonación del quitosano permitirá favorecer su unión a las nanofibras de celulosa, por medio de interacciones electrostáticas, mejorando la formación de películas compuestas y sus propiedades mecánicas y de barrera.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Desarrollar un material sustentable, a partir de mezclas de NFC con la adición de quitosano, que presente propiedades físico mecánicas y de barrera compatibles con su aplicación en empaques de alimento.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la adición de nanofibras de celulosa y quitosano en distintas proporciones sobre la resistencia mecánica, porosidad y ángulo de contacto de películas compuestas nebulizadas.
- Determinar el efecto de la modificación del grado de protonación del quitosano sobre las propiedades finales de películas quitosano/nanofibra de celulosa
- Evaluar la interacción entre nanofibras de celulosa y quitosano en distintas proporciones sobre características superficiales de películas.

4. Marco teórico

4.1. Desafíos de la industria del empaque

Uno de los importantes desafíos de nuestra época es disminuir la producción y desecho de plásticos de origen fósil. Se ha estimado que, anualmente, 32 mil millones de toneladas plástico es desechado, de los cuales parte importante proviene de la industria de empaques alimenticios (Lavric *et al.*, 2021). La necesidad de una industria sustentable insta la búsqueda de materiales renovables que se adapten a nuevas necesidades. La calidad de empaques alimenticios depende de tres aspectos principales; resistencia mecánica, a la humedad y permeabilidad de gases (Yang *et al.*, 2020).

Películas utilizadas en la industria alimenticia cumplen propósitos cruciales en la protección, calidad y durabilidad de productos de consumo humano. Los empaques deben cumplir con una serie de requerimientos que dependen de las características y necesidades de cada alimento. Entre estos requerimientos se encuentran la resistencia mecánica, la permeabilidad a gases y la resistencia al agua (Yates *et al.*, 2021). Algunos de los polímeros más utilizados en la industria de empaque son el polipropileno (PP), el polietileno tereftalato (PET) y el poliestireno (PS), que presentan una variedad de propiedades dependiendo de su composición, orientación molecular y procesamiento. A pesar de sus prestaciones ampliamente estudiadas por la industria, estos polímeros no son considerados biodegradables y constituyen, sobre todo en el caso de los envases de un solo uso, una gran preocupación respecto a la polución global.

La resistencia mecánica se refiere a la capacidad de los empaques para soportar las fuerzas externas reciben durante etapas de almacenamiento y distribución, como la compresión, la tracción, el corte o el impacto. La resistencia mecánica se puede medir mediante diferentes magnitudes como; el módulo de Young, que indica la capacidad de deformación reversible de un material; la elongación en la ruptura, que indica el grado de deformación que puede alcanzar el material antes de romperse; y la resistencia a la

tensión, que representa su resistencia al impacto. Estas propiedades varían ampliamente dependiendo del polímero, aditivos y procesamiento realizado.

La permeabilidad a gases se refiere a la capacidad de los empaques para permitir el paso de gases a través de ellos, como el oxígeno, el dióxido de carbono, el vapor de agua o el aire. La efectividad de esta barrera es crítica para retardar procesos oxidativos y de descomposición de alimentos, al mismo tiempo puede prevenir la contaminación cruzada por microorganismos y polutantes. La permeabilidad a gases se puede medir mediante diferentes parámetros, permeabilidad al oxígeno (OTR), que indica la cantidad de oxígeno que atraviesa una unidad de área del material por unidad de tiempo; permeabilidad al vapor de agua (WVTR), que indica la cantidad de vapor de agua que atraviesa una unidad de área del material por unidad de tiempo; y la permeabilidad de aire, que indica la cantidad de aire que atraviesa una unidad de área del material por unidad de presión.

Dependiendo de la naturaleza del alimento, como en el caso de frutas climatéricas y no-climatéricas, los valores objetivos de estos parámetros pueden variar considerablemente (Fig. 1). Frutas climatéricas como plátanos, manzanas y tomates, sufren un proceso de maduración caracterizado por el aumento súbito en su respiración y producción de etileno, que actúa como acelerador de su maduramiento (Paul *et al.*, 2012). Debido a esto, empaques y protecciones a estas frutas incorporan mecanismos de retención, absorción o bloqueo del etileno de exceso, con el objetivo de evitar el reblandecimiento o pérdida de propiedades organolépticas como apariencia y sabor. Por otra parte, las frutas no-climatéricas como frutas cítricas, frutillas y uvas, no presentan este aumento en la emisión de etileno (Kou *et al.*, 2021). En cambio, su proceso de maduración ha sido relacionado con factores como la humedad y crecimiento bacteriano. Por este motivo, sus empaques priorizan la barrera al oxígeno y vapor de agua, de manera de reducir la pérdida de humedad previniendo la deshidratación, así manteniendo la frescura (Kaur *et al.*, 2013; Alamri *et al.*, 2021).

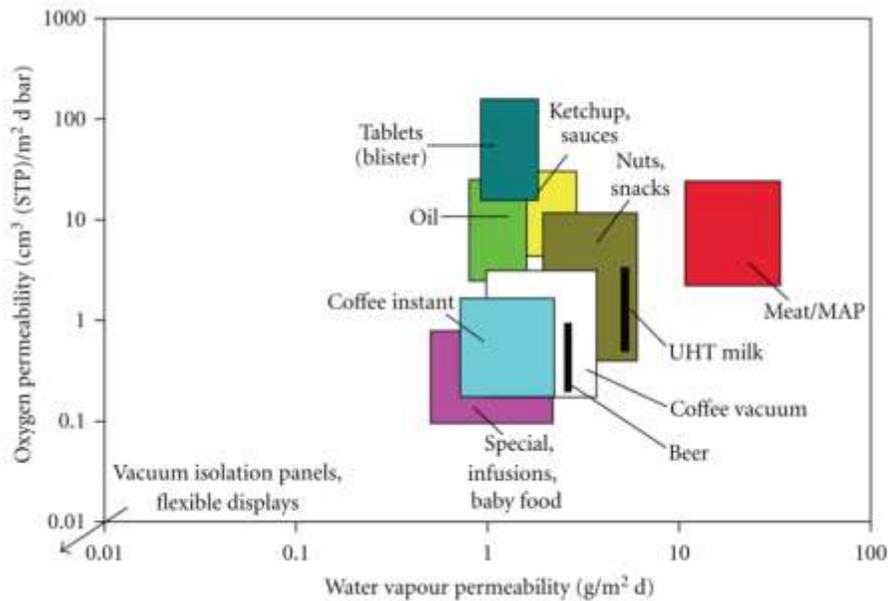


Figura 1. Permeabilidad de oxígeno (OTR) vs Permeabilidad de vapor (WVTR) para distintos alimentos. (Schmidt *et al.*, 2012)

La resistencia al agua se refiere a la capacidad de los empaques de mantener su integridad estructural, para evitar o retardar la absorción o pérdida de agua por parte del alimento o del ambiente. Es importante regular la humedad en el empaque y alimento pues determina su calidad y durabilidad. La resistencia al agua se puede medir mediante diferentes propiedades, como el coeficiente de absorción, que indica la cantidad de agua que absorbe el material por unidad de masa; el coeficiente de hinchamiento, que indica el cambio relativo en las dimensiones del material al absorber agua; y ángulo de contacto, que establece la afinidad del material respecto a la forma que adopta una gota depositada en su superficie (Agarwal *et al.*, 2022). Estas propiedades dependen del tipo, la estructura y la hidrofobicidad o hidrofiliidad de los polímeros que componen los empaques. Algunos polímeros presentan una mayor resistencia al agua que otros, como el PP y el PS, que son hidrofóbicos; y el PET, que es moderadamente hidrofílico.

Por otra parte, los biopolímeros son polímeros derivados de fuentes naturales renovables, como plantas o animales. Los biopolímeros presentan ventajas ambientales frente a los polímeros sintéticos, como la biodegradabilidad o la reducción del uso de combustibles

fósiles. Sin embargo, estos presentan desafíos para su aplicación en la industria de empaque, como su menor disponibilidad, su mayor costo o sus limitaciones en cuanto a sus propiedades mecánicas, térmicas o barrera. Por lo tanto, se requiere un desarrollo e innovación constante para mejorar las capacidades de los biopolímeros en la industria de empaque.

Además de las tres características previamente comentadas (resistencia mecánica, permeabilidad de gases y degradabilidad), los empaques de alimento pueden ayudar a la conservación prolongada de los alimentos.

Actualmente, una de las principales causas de pérdida de comida por deterioro es la presencia de bacterias, hongos, procesos oxidativos y la presencia de algunas enzimas propias del alimento o contaminadas por el ambiente. A nivel comercial las principales pérdidas ocurren por deficiencias en la manipulación durante la producción, almacenamiento y puesta a disposición final para los consumidores (Motelica *et al.*, 2020).

Por este motivo existe un creciente interés por el desarrollo de materiales que no sólo sirvan como protectores, sino que también cumplan un rol activo en la preservación de alimentos. Bacterias como *Escherichia coli* (Gram Positiva) y *Staphylococcus aureus* (Gram Negativa), son bacterias mesófilas, con temperaturas de mayor crecimiento en el rango 25-40°C, habitualmente asociadas a la contaminación de alimentos. Su presencia puede provocar el deterioro de los alimentos y propagar enfermedades (Vilela *et al.*, 2019).

A nivel industrial, se han agregado agentes antimicrobianos a materiales actualmente utilizados. Entre ellos destaca la incorporación de nano partículas de distintos metales y óxidos (ZnO, TiO₂, Ag₂O, Ag, Au) en las matrices de distintos sustratos. Lamentablemente, con el aumento de uso de nanomateriales, también ha aumentado su detección a nivel medioambiental. Existen preocupaciones toxicológicas relacionadas a la disminución de tamaño de partícula y su citotoxicidad. Como alternativa, se ha planteado el uso de distintos aditivos de origen natural para combatir la actividad microbiana. Entre ellos destacan aceites esenciales y extractos hidrofílicos, aislación de agentes microbianos

naturales como la nisina o pediocina y enzimas como lisosomas y peroxidasas entre otros (Hernández-García *et al.*, 2021).

Otra estrategia en el desarrollo de empaques activos, como alternativa a los plásticos fósiles utilizados actualmente, es el desarrollo de películas a partir de biopolímeros como celulosa, lignina, almidón, quitosano, ácido poliláctico (PLA), polivinil alcohol (PVA), ácido algínico entre otros (Motelica *et al.*, 2020). Polímeros naturales como la celulosa no presenta actividad antibacteriana, por lo que es necesario complementarlo para obtener un material con este atributo.

4.2. Nanofibra de celulosa y quitosano como materias primas para empaques alimenticios

4.2.1. Nanofibras de celulosa

La celulosa generada por plantas es considerado el polímero más abundante a nivel mundial, componente principal en plantas, ubicada en distintas proporciones a lo largo de su pared celular. La pared celular es una estructura compleja y dinámica, que provee el soporte mecánico, regula la forma y juega un rol vital en el crecimiento y desarrollo de la planta. Partiendo desde la lamela central, hacia el centro de la célula (lumen), la pared vegetal esta compuesta por un conjunto de capas con diferentes características (Fig 2). La lamela central es una delgada capa compuesta principalmente por pectina y derivados, que va acumulando lignina durante su diferenciación. Más al interior se encuentra la pared primaria, esta capa esta compuesta por microfibrillas de celulosa arregladas de forma aleatoria. Entre estas estructuras se encuentran derivados de pectina, lignina y hemicelulosas. Cuando el desarrollo celular alcanza su tamaño definitivo, se forma al interior la pared secundaria. Esta capa es la que más aporta resistencia mecánica a la célula. Se divide en 3 subcapas, S₁, S₂ y S₃. Cada una de ellas esta formada por microfibrillas de celulosa arregladas de forma paralela con distintas orientaciones entre subcapas (Ek *et al.*, 2009). En cada una podemos encontrar hemicelulosas y lignina. Las cantidades de estos compuestos puede variar por diferentes factores, tanto bióticos como ábóticos. La S₁ es la más delgada, representando entre 5-10% del espesor total del la

pared celular. En general, las microfibrillas presentan ángulos de orientación, respecto del eje de la célula, que varía entre 60-80°. La S₂ corresponde a la subcapa de mayor espesor (75-80%) y considerada como la principal. La orientación de las microfibrillas oscila entre 5-30° y es responsable de las propiedades estructurales de la pared. Finalmente la S₃, más delgada que la S₂ pero un poco más gruesa que la S₁, presenta una orientación paralela pero más desorganizada, con ángulos microfibrilares entre 60-90° (Plomion *et al.*, 2002).

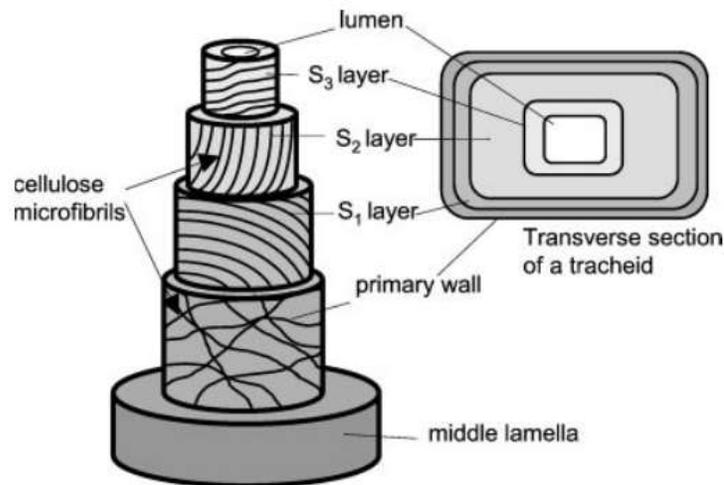


Figura 2. Esquema tridimensional de la estructura de la pared de célula vegetal. (Plomion *et al.*, 2002).

Químicamente, la celulosa se clasifica como un homopolisacárido constituido por unidades monoméricas de β -D-glucopiranososa unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos. Su grado de polimerización depende de diversos factores como la especie de origen, oscila entre 10,000-15,000 unidades (Michelin *et al.*, 2002). Cada unidad de anhidroglucosa presenta tres grupos OH⁻, que le permiten formar puentes de hidrógeno intra y entre hebras de celulosa. Propiedades como resistencia mecánica, carácter aniónico, insolubilidad en agua y alta resistencia a solventes orgánicos son atribuidas a la fortaleza de estas interacciones (Ek *et al.*, 2009).

A partir de distintos procesos de pulpaje químico y mecánico es posible separar las fibras de madera. Tratamientos posteriores a esta pulpa permiten desarmar la fibra y acceder a la ultra estructura de la pared celular, pudiendo obtener diferentes materiales nano y

microscópicos, como nano cristales de celulosa (CNC) y nanofibras de celulosa (NFC) (Fig 1).

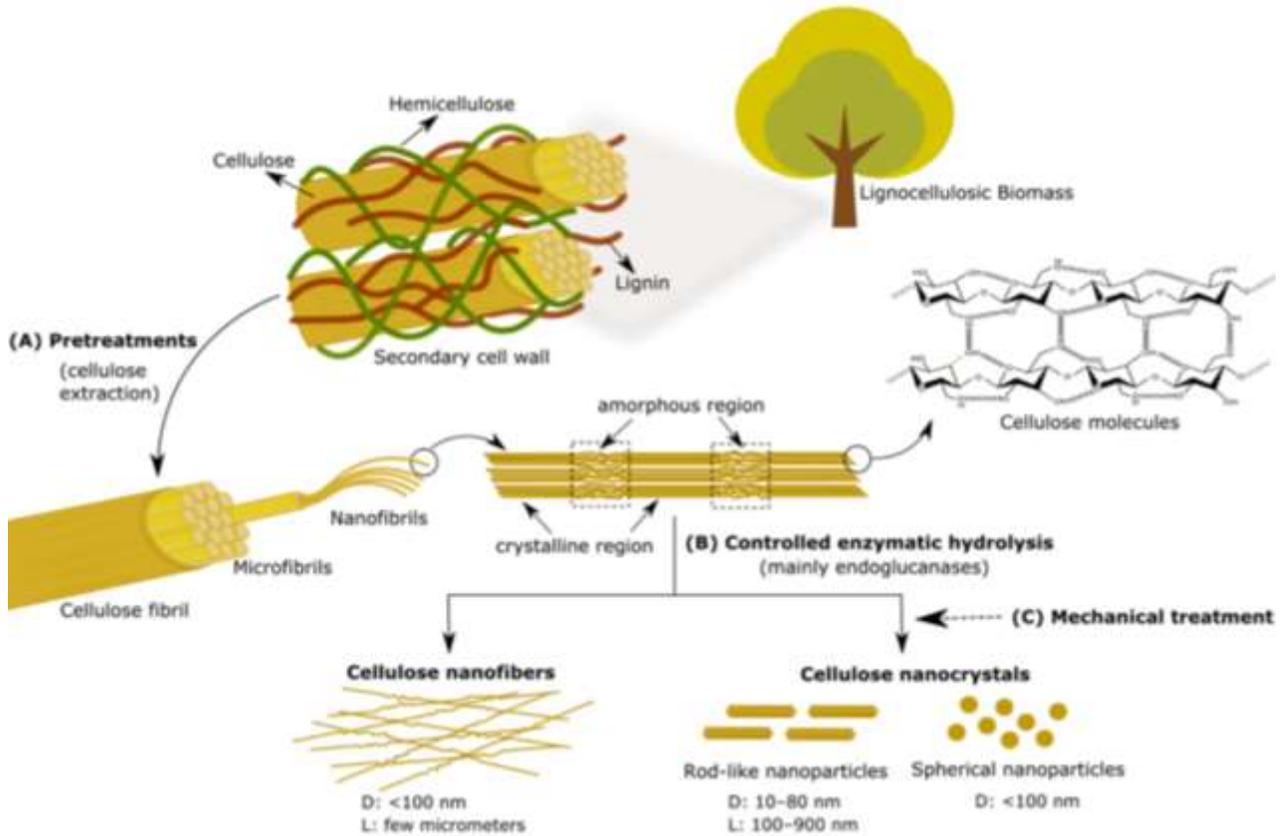


Figura 3. Proceso de producción de nano materiales celulósicos a partir de biomasa vegetal. (A) Pretratamientos químicos y mecánicos de la biomasa para extracción de pulpa de fibra. (B) Hidrólisis enzimática controlada para la producción de nanofibras de celulosa y nanocristales con sus tamaños respectivos. (C) Posible tratamiento mecánico posterior, habitualmente utilizado para obtener una distribución de tamaño más uniforme. (Michelin *et al.*, 2020).

Se considera nanocelulosa (NC) a una estructura compuesta principalmente por celulosa, que presenta al menos una dimensión característica igual o menor a 100nm. CNC han sido descritos como nanopartículas cristalinas obtenidas a través de una hidrólisis alcalina o ácida, donde se han disuelto las regiones amorfas de las microfibrillas. Por otra parte, NFC presenta tanto regiones cristalinas como amorfas y son habitualmente obtenidas por tratamiento mecánico, a través de la desintegración de las fibras (Beneventi *et al.*, 2014).

Las características de la nanocelulosa obtenida no dependen solo del tratamiento utilizado, sino también de la naturaleza de la materia prima. A pesar de esto, se considera que las dimensiones habituales de CNC corresponden a un largo entre 100-250nm y 3-50nm de ancho, mientras que la NFC presentan largos mayores a 1000nm y 3-100nm de ancho (Dufresne, 2013). Esta propuesta involucra la obtención de NFC a partir de fibra de eucalipto, para la obtención de un compósito utilizable en la industria de empaque de alimentos.

La NFC es obtenida por desintegración mecánica, precedida por pretratamientos que pueden ser mecánicos, químicos, enzimáticos o en acción conjunta. Esta desintegración involucra las etapas de refinación y homogenización de alta presión. La refinación considera el paso de una solución diluida de fibras de madera entre dos discos estrechamente posicionados. Se obtiene una dispersión de fibras de menor distribución de tamaño que son posteriormente sometidas a la homogenización. Durante la homogenización se aplican altas presiones (600-900bar) sobre pequeñas porciones de dispersiones y se obtiene la desintegración de las fibras de madera (Lee et al., 2009).

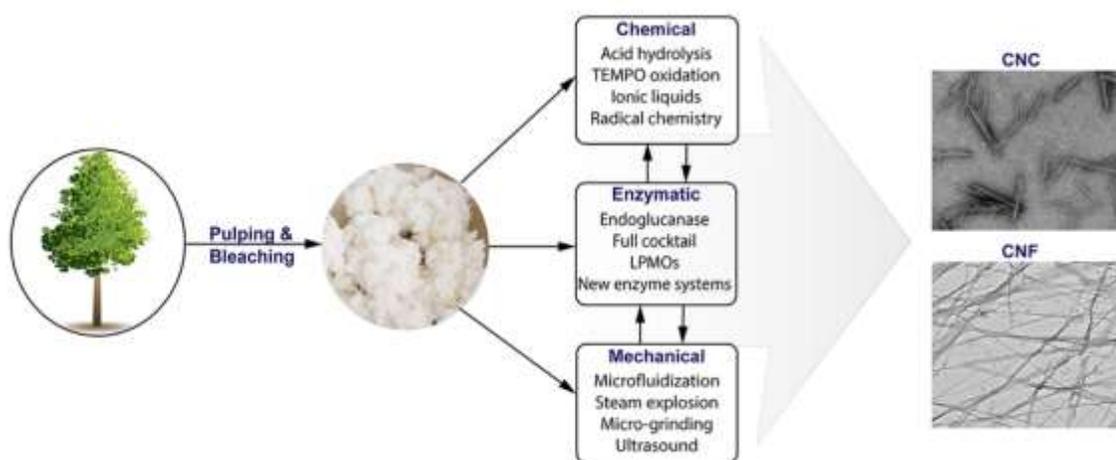


Figura 4. Esquema de las principales metodologías para la obtención de nanomateriales de celulosa a partir de pulpa blanqueada de fibras (Pirih *et al.*, 2020).

Se ha reportado que la utilización de pretratamientos enzimáticos permite disminuir los costos energéticos de fabricación y facilitar su procesamiento (Josset *et al.*, 2014). Las

enzimas celulasas habitualmente utilizadas en el pretratamiento de fibras corresponden a endoglucanasas, exoglucanasas, glucosidasa y celobiosidasa. Su acción es en conjunto y se considera sinérgica (Pirih *et al.*, 2020). Estas enzimas son producidas por una diversidad de bacterias y hongos. Actualmente, existen diversas mezclas enzimáticas accesibles comercialmente. La actividad enzimática permite la sacarificación de las hebras de celulosa y la disminución del grado de polimerización, degradación de hemicelulosas y lignina, pudiendo obtener distintas distribuciones de tamaño dependiendo del nivel de acción utilizado (Álvarez *et al.*, 2016).

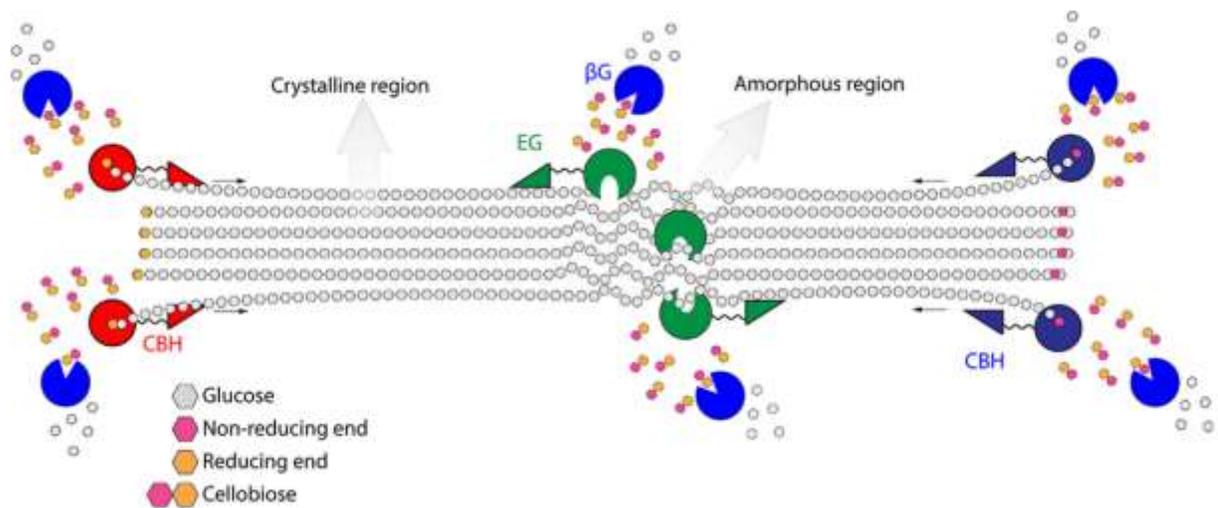


Figura 5. Esquema de la acción enzimática de endoglucanasas (EG), exoglucanasas (CBH) y β-glucosidasas (βG) en conjunto sobre microfibras (Pirih *et al.*, 2020).

Tanto NFC como CNC han sido estudiadas como matrices para la obtención de materiales de empaque. Se han estudiado las diferencias en propiedades físico mecánicas de películas obtenidas a partir de CNC y NFC (Wang *et al.*, 2020). Se ha reportado que, CNC y NFC se comportan de manera similar respecto a sus propiedades de resistencia a la tensión, cuando se comparan a espesores similares. Sin embargo, se ha observado una mayor fragilidad a la ruptura en la manipulación en películas de CNC. Por otra parte, películas de NFC presentan mejor resistencia a la transferencia de gases que CNC, esto

ha sido atribuido a la generación de un trayecto más tortuoso que el generado por películas de CNC (Fig 6).

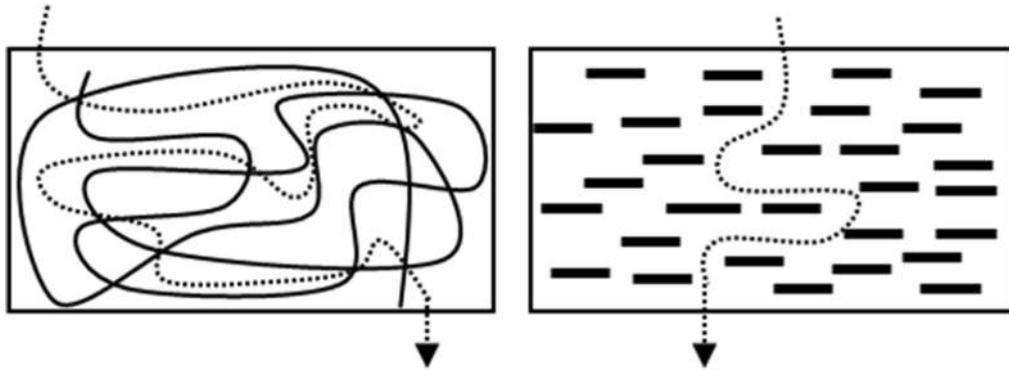


Figura 6. Esquema de un gas atravesando una película de NFC (izquierda) y una película de CNC (derecha) (Wang *et al.*, 2020).

NFC ofrecen numerosas ventajas que la convierten una alternativa sustentable para la producción de materiales para empaque de alimentos (Azeredo *et al.*, 2017). Poder obtenerlas a partir de biomasa natural y su biodegradabilidad la convierten en una matriz ecológicamente amigable. Por otra parte, su resistencia mecánica le permite compararse con otros plásticos utilizados en la industria de empaque de alimentos. Además, a diferencia de otros polímeros, films de NFC han demostrado gran capacidad como barrera a gases (Fotie *et al.*, 2020). Sin embargo, se ha reportado que estos films presentan baja resistencia a la humedad, por lo que muchas de estas características se pierden durante su hinchamiento (Solberg *et al.*, 2023).

4.2.2. Quitosano.

Por otra parte el quitosano (CS), es un biopolímero derivado de la quitina presente en el exoesqueleto de crustáceos, ha recibido mucha atención debido a que presenta características valorables en la formación de empaques y su origen natural biodegradable.

De forma general el quitosano es obtenido a partir de una secuencia de etapas (Fig 7(a)). Primero se realiza la molienda de exoesqueletos para reducir su tamaño de partícula.

Luego se le extraen las proteínas presentes usando una hidrólisis alcalina con soluciones de NaOH. La etapa siguiente tiene como objetivo la remoción del contenido de minerales, principalmente CaCO_3 . Esto es realizado por medio de tratamiendo ácido con HCl o ácido acético. Luego de estos tratamientos, el sólido remanente recibe un primer lavado con abundante agua para remover las especies disueltas. Le sigue un proceso de decoloración con H_2O_2 para remover impurezas y pigmentos para obtener un producto más blanco. Es reciente en este nivel donde se produce la desacetilación donde la quitina presente se convierte en quitosano. Esta conversión es principalmente realizada con NaOH a alta temperatura, para asegurar la eliminación de la mayor cantidad de grupos acetilo (Fig 7(b)). Finalmente, el producto resultante es lavado por segunda vez para remover la base e impurezas remanentes. A partir de modificaciones en este proceso es posible obtener productos con distinto grados de desacetilación, tamaño de partícula y grado de polimerización (Munim *et al.*, 2020).

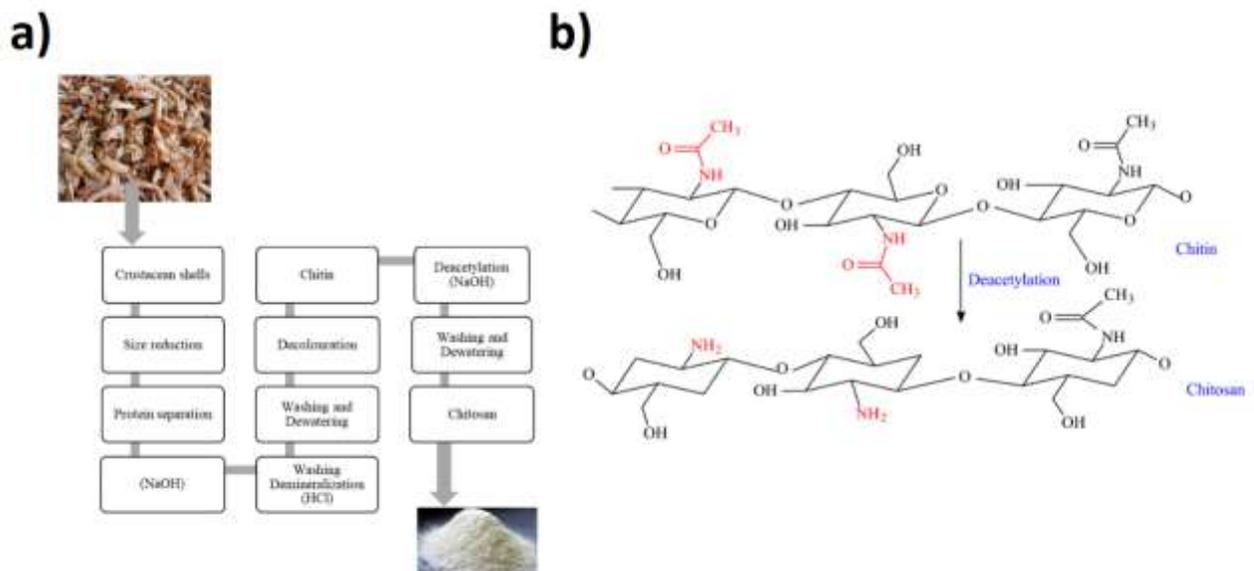


Figura 7. Diagrama de bloques del proceso de obtención habitual del quitosano (a) (Ilyas *et al.*, 2022). Esquema químico de la desacetilación de la quitina (b) (Munim *et al.*, 2020).

Químicamente, es un polisacárido compuesto por unidades de N-acetilglucosamina unidos por enlaces β -1,4-glucosídicos. Su grado de polimerización ha sido reportado entre 1000-4000 unidades. Debido a los grupos amino presenta un carácter catiónico (Fig 8).

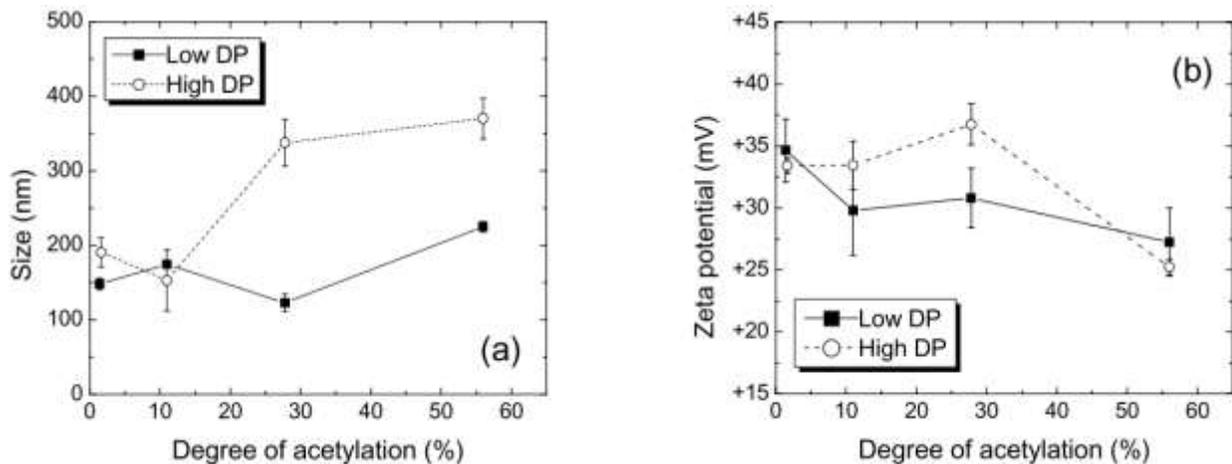


Figura 8. Efecto del grado de acetilación y grado de polimerización sobre el tamaño de partícula y potencial Zeta de quitosano (Goycoolea *et al.*, 2007).

Varios autores han estudiado materiales para empaque basados en quitosano, destacando tanto su actividad antimicrobiana, capacidad de barrera y resistencia a la humedad, como su compatibilidad con otras sustancias (Thambiliyagodage *et al.*, 2023; Yaneva *et al.*, 2020). Las propiedades del CS dependen fuertemente de su grado de acetilación, fuente de origen, tratamiento de obtención y grado de protonación, este último siendo el menos explorado. El grado de acetilación corresponde a la cantidad relativa de grupos acetilo presentes originalmente en la quitina y que son eliminados a través de tratamientos alcalinos. Dependiendo de la cantidad remanente, es posible obtener distintas características de solubilidad, resistencia mecánica y actividad antibacteriana (Yaneva *et al.*, 2020).

El grado de protonación hace referencia a la cantidad de grupos amino $-NH_2$ presentes en las cadenas de CS que son protonados a $-NH_3^+$ en presencia de medio ácido. En términos de materiales basados sólo en CS, Kim (2006) estudió el efecto del pH en películas de quitosano en el rango de 3-5 con diferentes ácidos orgánicos (acético, propiónico y láctico). En sus resultados observa variaciones en la permeabilidad de vapor de agua, resistencia a la tensión y elongación de ruptura respecto tanto al tipo de ácido, pH y grado de acetilación. Encontró que pH más ácidos fueron relacionados a un aumento en la resistencia a la tensión en todos los ácidos evaluados. También que, independiente al tipo

de ácido, una mayor desacetilación se relacionaba directamente con una mayor sensibilidad al cambio de pH debido al mayor número de grupos amino disponibles para interactuar con los protones del medio ácido.

Por otra parte, Melro (2021) estudió el efecto de tres ácidos (acético, láctico y cítrico) y su concentración en las propiedades finales de películas de CS, encontrando que un aumento en la concentración de ácido mejora las propiedades mecánicas. Adicionalmente, fue posible establecer la influencia del tipo de ácido en la actividad antimicrobiana de las películas frente a *escherichia coli* y *staphylococcus aureus*, midiendo la concentración mínima inhibitoria (MIC). A través de su ensayo demostró que, a diferencia de los ácidos acético y láctico, el ácido cítrico disminuía significativamente la actividad antimicrobiana de la película de quitosano. Esto fue atribuido a la baja solubilidad de los iones citrato y a su resistencia a la evaporación durante la conformación de las películas.

Zhang *et al.* (2019) comparó las propiedades de películas de quitosano fabricadas por dos métodos diferentes (evaporación de solvente y termomecánico), usando diferentes concentraciones de ácido clorhídrico y acético. De sus resultados pudo concluir que, para ambos ácidos, un aumento en la concentración permitía obtener mejores propiedades de resistencia mecánica. La sensibilidad al pH del quitosano ha sido explorada en distintas aplicaciones en campos como la agricultura, medicina y tratamiento de agua para obtener sistemas de liberación controlada de sustancias como fertilizantes y medicamentos a través de cambios de pH en el medio, basados en materiales derivados del quitosano (Cazón *et al.*, 2019).

Omer *et al.* (2021) evaluó las capacidades de distintos materiales obtenidos a partir de la mezcla chitosano-alginato, para la liberación controlada de diclofenaco de sodio microencapsulado. Aprovechando la característica catiónica del CS de sus grupos $-NH_3^+$ y los grupos aniónicos $-COO^-$ propios del alginato, encontró que en condiciones ácidas (pH=1.2) la curva de liberación del medicamento se mantenía estable durante más de 8h, mientras que en condiciones neutras (pH=7.4) esta estabilidad se perdía y el diclofenaco era rápidamente liberado durante las primeras horas. Lewandoska *et al.* (2022) comparó la adición de tres diferentes arcillas modificadas y quitosano en la formación de películas

obtenidas por evaporación de solvente y observó que con el tratamiento de NaOH sobre películas se observaron cambios significativos en la rugosidad y morfología superficial de las películas obtenidas. Esto fue asociado a la disminución de interacciones entre CS y las arcillas producto de su neutralización. En el área de los empaques de alimentos, los cambios en el grado de protonación y las propiedades del quitosano han recibido atención al ser utilizado como soporte de diferentes sustancias con capacidades de cambio de color respecto a cambios en pH, con el objetivo de obtener materiales inteligentes con la capacidad de informar visualmente a los consumidores respecto al estado de los alimentos (Chalitangkoon *et al.*, 2021; Alizadeh-Sani *et al.*, 2021). Estas investigaciones ilustran el potencial del grado de protonación en el desarrollo de materiales con características mejoradas.

En el contexto de materiales compuestos de NFC/CS, es necesario considerar las interacciones electrostáticas entre ambos biopolímeros. NFC, consistente en estructuras celulósicas con diámetros en escala nanométrica, ha sido ampliamente reportado como una partícula de carga negativa principalmente debido a la alta presencia de grupos hidroxilos en su superficie por medio de diferentes mediciones de potencial Zeta (Prathapan *et al.*, 2016; Fall *et al.*, 2011). Cuando el quitosano se encuentra en su forma protonada, puede formar interacciones electrostáticas con NFC (Fig 9).

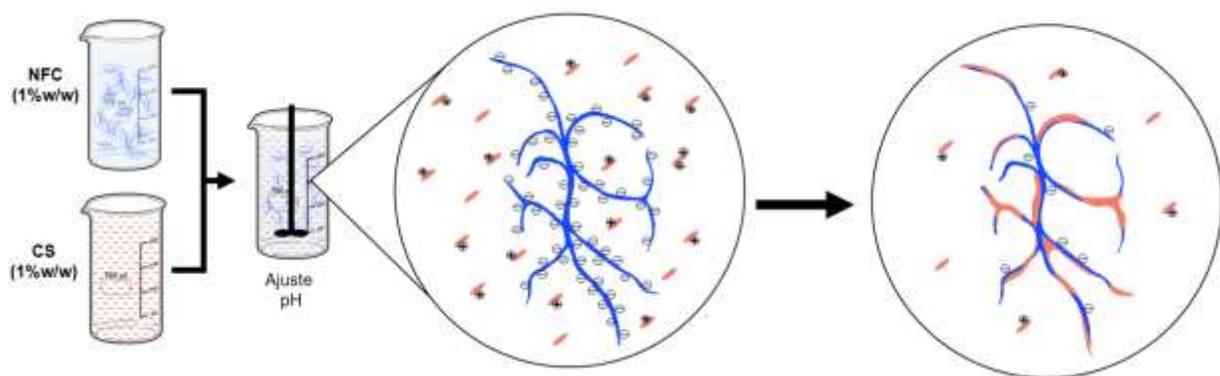


Figura 9. Ilustración de las interacciones electrostáticas entre nanofibras de celulosa y quitosano.

Estas atracciones facilitan y ayudan a la adhesión de quitosano a la superficie de las fibras. Trabajos previos han demostrado la gran influencia de la protonación del quitosano frente a diferentes ácidos orgánicos y grados de deacetilación sobre propiedades de films de quitosano puros (Wang *et al.*, 2006; Melro *et al.*, 2021). La protonación del quitosano depende del pH de la solución. Frente a bajos valor de pH, el CS tiende a estar altamente protonado, resultando en una carga superficial positiva. De la misma forma, altos valores de pH se asocian con un bajo nivel de protonación. (Fig 10).

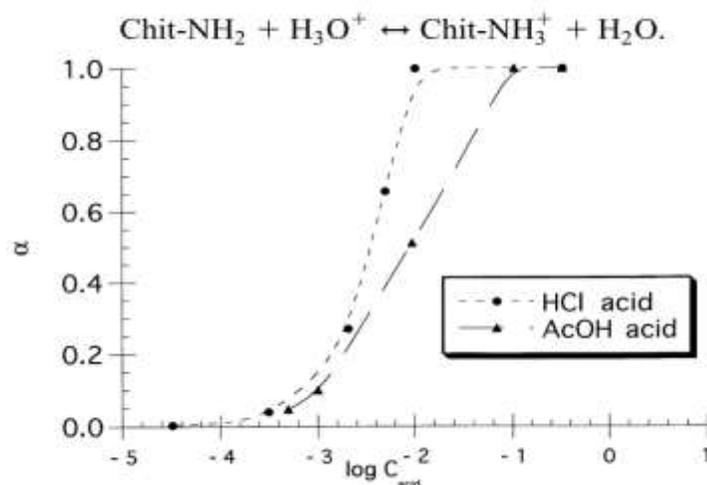


Figura 10. Cambio en el grado de protonación del quitosano frente a cambios en concentración de ácido clorhídrico y ácido acético (Rinaudo *et al.*, 1999).

El grado de protonación en quitosano juega un rol crucial en la formación del material NFC/CS. El ajuste del pH de la solución puede ser modulado para favorecer las interacciones electrostáticas con NFC. Esto abre la oportunidad de poder modificar las características del material resultante en un amplio rango de forma simple, aprovechando las características singulares de ambos biopolímeros.

4.2.3. Materiales compuestos de nanofibras de celulosa y quitosano.

La interacción entre nanocelulosa y quitosano ha despertado el interés de distintos grupos de investigación. El principal enfoque de estos estudios ha sido el reforzamiento de quitosano con la adición de nanocelulosa, para mejorar sus propiedades físico mecánicas. Se ha evidenciado que, la formación de películas de quitosano reforzado con bajas

concentraciones de NC (<1%), permite una mejora en su módulo de elasticidad sin una variación significativa en la permeabilidad al vapor (Solkhin *et al.*, 2018). Por otra parte, películas de CS recubiertas con CNC, no presentan cambios significativos en la permeabilidad al vapor de agua, y bajos módulos de tensión, atribuidos a la destrucción entre capas (Satam *et al.*, 2018). Por el contrario, la adición de quitosano como agente antibacteriano en películas de nanocelulosa y sus efectos en sus distintas propiedades como empaque de alimentos ha recibido menos atención. La tabla 1 presenta algunos de los desarrollos obtenidos a partir de mezclas de materiales nanocelulósicos y quitosano.

Tabla 1. Publicaciones relacionadas con NC, CS y obtención de materiales para empaque.

Material celulósico (% dispersión)	Proceso de obtención NC	%CS(%DD)	Aditivos	Resultados	Autor
MFC (3% <i>m/m</i>)	Desfibración mecánica de pulpa de bagazo	0.5 – 1- 3% <i>m/m</i> (>95%)	Pirrol, ácido acético	Adición capa por capa. Disminución propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor	Gao, 2022
NFC (1-2% <i>m/m</i>)	Obtenida comercialmente (20-50nm, Acros Organics Co.)	1 – 1.3% <i>m/m</i> (600-800kDa)	Glicerol	Presenta actividad antibacteriana	Dehnad, 2014
CNC (1% <i>m/m</i>)	Ultrasonicación de MFC obtenida comercialmente	5% <i>m/m</i> (85%)	-	La adición de CNC permite disminuir la permeabilidad de gases	Dong, 2015
MFC (2% <i>m/m</i>)	Tratamiento alcalino y pretratamiento enzimático de pulpa blanqueada de bagazo	2.5-20% <i>m/m</i> (-)	-	La adición de MFC permite mejorar las propiedades mecánicas de películas de CS	Hassan, 2011
CNC (2-4-6-8% <i>m/m</i>)	Hidrólisis ácida de MFC obtenida comercialmente	1% <i>m/m</i> (90%)	-	La adición de CNC aumento la resistencia UV de películas	Yadav, 2020
CNC – BNC (0.5-5% <i>m/m</i>)	CNC por hidrólisis ácida, BNC por fermentación acética	3%(<75%)	Alginato y glicerol	La adición de CNC y BNC permite mejorar la resistencia mecánica de películas	Lavric, 2021
CNC (0.5% <i>m/m</i>)	Obtenida externamente	0.9-1.5% (90%)	PLA	Es posible obtener compuestos multi capa con gran resistencia	Satam, 2018

MFC (10% <i>m/m</i>)	Obtenida comercialmente (Daicell Chemical Industries, Ltda)	1% <i>m/m</i> (95%)	Alginato de sodio	Es posible reforzar mecánicamente películas de alginato	Liu, 2013
-----------------------	---	---------------------	-------------------	---	-----------

En estas publicaciones, si bien presentan materiales celulósicos y quitosano, no profundizan ni evalúan los efectos de la concentración de ácido en las propiedades finales de los materiales obtenidos ni el impacto de la relación de cantidades entre material celulósico y quitosano. A pesar de los positivos resultados publicados, no existen estudios que establezcan las características de la mezcla de NC y CS en un amplio rango, y el efecto del pH del medio. Tampoco, relacionadas a la preservación de sus propiedades individuales o la naturaleza de la formación de la mezcla NC/CS, ya sea química o morfológicamente.

4.3. Proceso de fabricación de películas

Es posible tratar estos polímeros con distintas metodologías para obtener materiales. Entorno a la obtención de películas utilizables como empaque para alimentos, se han reportado distintas técnicas, entre ellas; ensamble capa por capa, evaporación y nebulización.

El ensamble capa por capa permite la adición de una dispersión de nanocelulosa sobre un sustrato sólido que es puesto a secar y recubierto secuencialmente hasta alcanzar las propiedades físico mecánicas requeridas. Dependiendo de la aplicación, el número de capas puede oscilar entre 20-150. Este procedimiento permite utilizar capas multi componente y aprovechar incluso efectos electrostáticos alternar entre capas catiónicas y aniónicas para obtener capas ultra finas (Martin and Jean, 2014).

La evaporación, método tradicionalmente utilizado, comprende utilizar soluciones diluidas (<5%*p/p*) de NC a una temperatura controlada, dejado a secar sobre sustratos impermeables. Este procedimiento presenta tiempos de secado que pueden ser mayores a 72h dependiendo de la dilución y el tamaño del ensayo. Por lo mismo, permite obtener películas con distintos espesores y propiedades físico mecánicas (Fotie *et al.*, 2020).

La nebulización de dispersiones de NC ha recibido recientemente interés en la formación de películas como barrera (Shanmugam *et al.*, 2017; Messa y Faez, 2020; Chen *et al.*, 2021). A través de esta metodología se proyecta una dispersión de NC en pequeñas gotas que recubren un sustrato impermeable o semipermeable. Se considera una técnica rápida para generar películas, con propiedades comparables a las obtenidas por evaporación y menor tiempo de secado (Pirozzi *et al.*, 2021). Esta técnica se considera escalable y compatible con la formación de empaques para alimentos.

Películas nebulizadas de NC presentan menor rugosidad y menor permeabilidad de gases cuando se comparan con películas preparadas por evaporación. La figura 11 presenta los módulos de elasticidad y gramaje de películas de NC obtenida bajo diferentes procedimientos. Se observa que películas obtenidas por nebulización presentan módulos de elasticidad comparables a las obtenidos con evaporación con el mismo espesor. Adicionalmente, se observa la relación directa entre el módulo de elasticidad y el gramaje de películas de NC obtenidas vía nebulización. En la serie 1 es posible observar el efecto de aplicar distintas concentraciones de dispersiones de NC (1-2%p/p). Se observa que un aumento en la concentración permite obtener películas de mayor gramaje, a su vez, se logra relacionar un aumento del módulo de elasticidad. Por otra parte, la serie 2 evalúa el cambio en la velocidad de pasada del nebulizador en el rango 0.25-0.59 cm/s. Finalmente, la serie 3 presenta el resultado obtenido con una configuración modificada con mayor rango de concentraciones (1.5-2.5%p/p) y mayor velocidad de pasada (1.05 cm/s). A través de estos ensayos es posible contemplar cómo variables de procesamiento durante la nebulización afectan las propiedades finales de películas obtenidas.

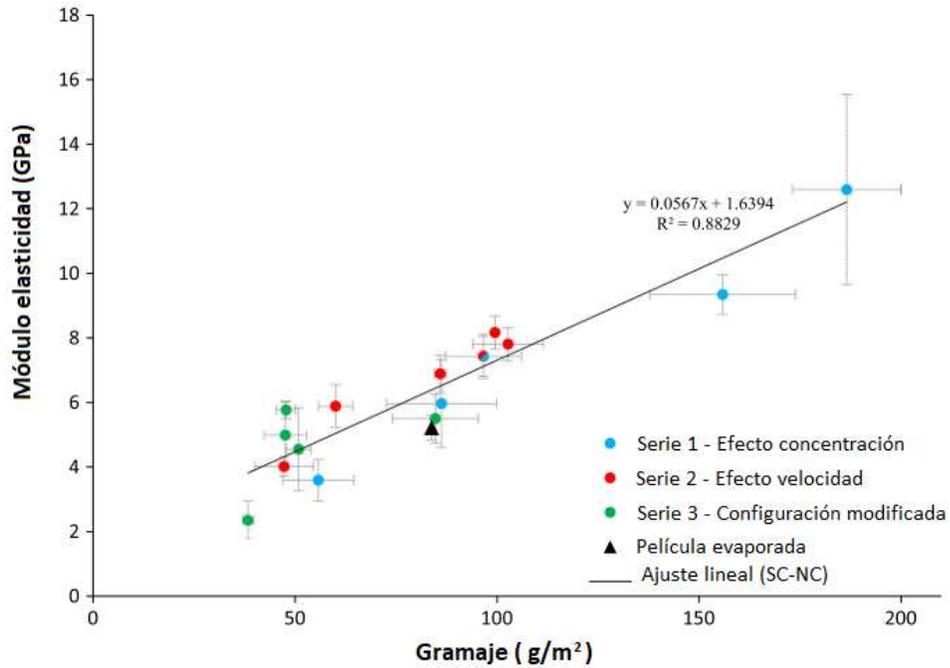


Figura 11. Efecto en el módulo de elasticidad en distintos ensayos con películas de NC nebulizadas (Shanmugan *et al.*, 2018).

Con estas consideraciones, se ha optado por la fabricación nebulizada de películas en el desarrollo de esta investigación, por ser una metodología rápida, simple y escalable para la obtención de un material orientado a la industria del empaque.

5. Materiales y métodos

A partir de lo previamente expuesto, se plantea que la metodología comprende desde la preparación de la NFC a partir de pulpa de fibra de madera, hasta el análisis estadístico de las propiedades medidas desde películas obtenidas. En esta sección se presentan las condiciones de tratamiento de cada etapa. Posteriormente, se presentan los experimentos propuestos, objetivos que persiguen y el diseño experimental correspondiente. La figura 12 presenta el esquema de experimentación realizada donde se evalúa la composición de los films NFC/CS y el efecto de la modificación del grado de protonación de quitosano para una proporción de polímeros constante.

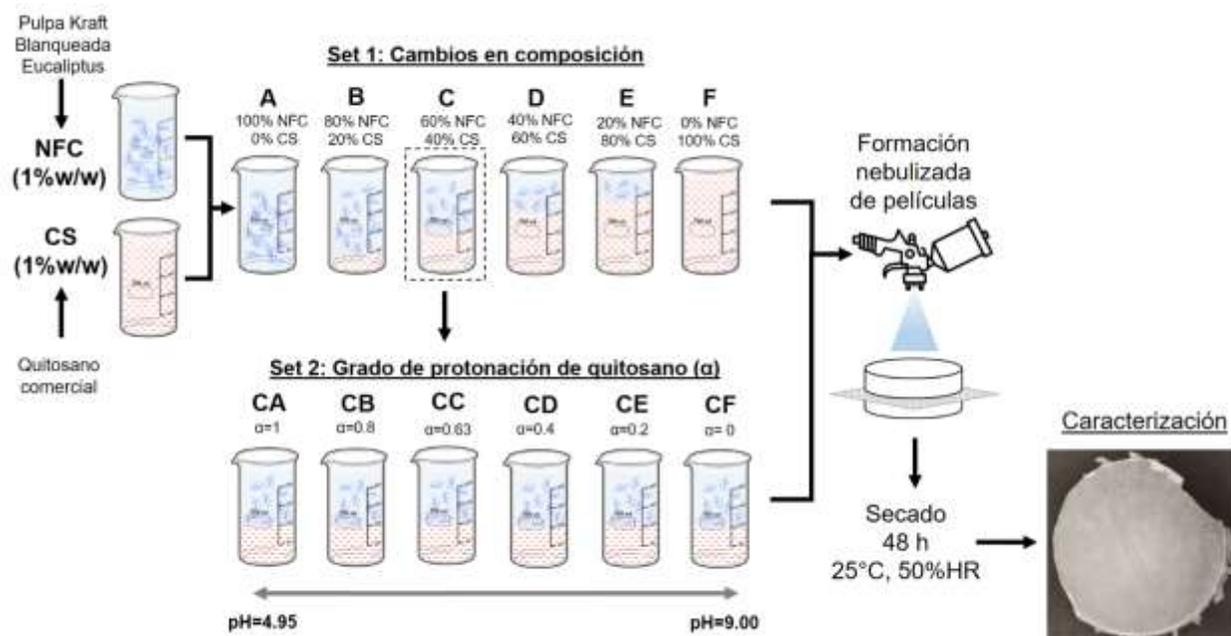


Figura 12. Esquema del diseño experimental realizado.

5.1. Materiales

Como materia prima para la obtención de nanofibras de celulosa, se utilizó pulpa Kraft blanqueada de Eucalipto, proporcionada por una planta local (CMPC, Planta Santa Fe). El tratamiento enzimático fue realizado utilizando un complejo enzimático de celulasas QuimizimeB proporcionado por el grupo CHT (Santiago, Chile), compuesto principalmente

por endoglucanasas (con actividad de 7.75 U/mL). Durante la experimentación se utilizó quitosano de bajo peso molecular (50,000-190,000 Da) con un grado de deacetilación 75-85%, comprado a Sigma-Aldrich (CAS:9012-76-4) que fue disuelto en placa calefactora y agitación mecánica.

5.2. Metodología

5.2.1. Producción de nanofibras de celulosa

Se obtendrán dispersiones de NFC, a partir del tratamiento enzimático y mecánico de pulpa de fibra de *Eucalyptus globulus* blanqueada. El proceso consta de cuatro etapas.

En la primera, se obtiene una dispersión acuosa al 10%p/p de pulpa de fibra y es procesada utilizando un refinador de pulpa (PFI), con 4,000 pasadas. Se espera que este proceso permita aumentar el área superficial disponible y facilitar el tratamiento enzimático. La segunda, contempla la dilución hasta el 5%p/p de la dispersión de fibras y la adición de 0.5%, respecto a la masa de fibra, de la solución enzimática (QuimizimeB) de forma de favorecer la separación de las fibras sin que se produzca sacarificación de las mismas. El tratamiento es realizado a 50°C durante 1h bajo agitación mecánica, al final de este tiempo la solución es calentada sobre los 90°C para detener la acción enzimática. Durante esta etapa se facilita el hinchamiento de las fibras y la separación de las microfibrillas. En la tercera, la dispersión obtenida es procesada nuevamente en el refinador, con 46,000 pasadas, permitiendo disminuir el tamaño de partícula, obteniendo una dispersión al 5%p/p de NFC. Finalmente, la dispersión obtenida es diluida al 1%p/p y homogenizada por el equipo PandaPlus a una presión de 700 bar en 10 pasadas.

5.2.2. Caracterización de nanofibras de celulosa

Para caracterizar las NFC se determinó la relación de aspecto ($P = \text{largo}/\text{diámetro}$) y la viscosidad intrínseca (η). La caracterización de la consistencia de las nanofibras se realizó masando tres muestras de 4 gramos en cápsulas de aluminio para ingresarlas en una

estufa a 105°C durante un mínimo de 4 horas. Luego de transcurrido el tiempo, se situaron las cápsulas en desecador hasta enfriar y se masaron en balanza analítica de precisión.

El porcentaje de consistencia de las nanofibras (C) se calculó mediante la ecuación (1).

$$C (\%) = (m_{fs} - m_c)/m_i \cdot 100 \quad (1)$$

Considerando la masa total de la cápsula luego del secado (m_{fs}), la masa de la cápsula (m_c) y la masa inicial de la muestra (m_i).

Posteriormente, se determinó la viscosidad intrínseca (η) de la suspensión mediante el método de Albornoz-Palma (Albornoz-Palma *et al.*, 2022). A partir de la consistencia de las nanofibras, se prepararon muestras en matraces aforados de 100 mL al 0,02%, 0,04%, 0,06% y 0,08% en masa seca de nanofibras/volumen, estas muestras se agitaron magnéticamente y luego fueron llevadas a un baño termostático con agitación a 23°C. La viscosidad fue medida utilizando el viscosímetro rotacional (Premium Series, Fungilab) y cada muestra se midió a una velocidad de 60 rpm durante 90 segundos. Las mediciones fueron realizadas en triplicado. La relación de aspecto (P) se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\rho \cdot \eta = 0,051 \cdot P^{1,85} \quad (2)$$

El largo promedio de las nanofibras de celulosa, se determinó utilizando una solución al 0,05% masa seca de nanofibras/volumen en un matraz aforado de 100 mL. Esta muestra fue llevada a un analizador de tamaño de partículas Microtrac (S3500) con una configuración para partículas de forma irregular y un índice de refracción de 1,54 (valor correspondiente a celulosa). La muestra fue sonicada durante 60 segundos previo a la medición para evitar aglomeraciones. La medición se realizó en triplicado. Con los resultados de la medición del largo promedio de las nanofibras (L) y la relación de aspecto (P) calculada se obtuvo el diámetro aproximado (D) de las nanofibras.

$$D = L/P \quad (3)$$

5.2.3. Obtención de dispersiones de quitosano

Quitosano de bajo peso molecular y con grado de desacetilación entre 75-85% (CAS 9012-76-4), será solubilizado utilizando placa calefactora y agitador magnético. Se obtendrán soluciones de CS al 1%p/p. Se prepararán muestras de 200g totales a partir de la mezcla de las dispersiones de NFC y CS. Las soluciones serán adicionadas directamente y homogenizadas bajo agitación mecánica durante 1h. Al final de esta etapa se obtendrán soluciones NFC/CS con distintas proporciones.

5.2.4. Determinación del grado de protonación de dispersiones de quitosano

La curva de grado de protonación (α) para dispersiones de quitosano fue obtenida a través de titulación potenciométrica (Rinaudo et al., 1999) usando el pH-metro HI 3221 de HANNA. La titulación fue realizada por medio de la adición de alícuotas de 0.5ml de solución de NaOH al 0.1M, midiendo el pH en cada adición. Se realizó la titulación de la dispersión al 1% de quitosano (muestra F) y la mezcla de 60%NFC y 40%CS (muestra C). En ambos casos se construyeron las curvas $\Delta\text{pH}/\Delta V$ y se obtuvo el volumen promedio entre ambos picos encontrados en la curva $\Delta\text{pH}/\Delta V$. Posteriormente, se obtuvo el valor de pKa del quitosano como el valor de pH al volumen promedio en la curva de titulación. La relación entre el pH y el grado de protonación se deriva de la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) \quad ; \quad \alpha = \frac{[\text{CS-NH}_3^+]}{[\text{CS-NH}_3^+] + [\text{CS-NH}_2]} \quad (4)$$

A partir de esta relación es posible conocer el valor de grado de protonación (α) a partir del pH de la solución y el valor de pKa encontrado (Domard et al., 1987).

$$\alpha(\text{pH}) = \frac{1}{10^{\text{pH}-\text{pKa}+1}} \quad (5)$$

5.2.5. Formulaciones nanofibra de celulosa /quitosano estudiadas

Se prepararon dos baterías de mezclas de NFC/CS. La primera fue una batería de 6 dispersiones acuosas etiquetadas desde la A hasta la F, con composiciones como se

presentan en la Tabla 2. Estos ensayos presentan diferentes proporciones de NFC/CS, y no fueron ajustadas de pH. Se preparó en cada caso 200g de mezcla para ser nebulizada. En la segunda, se utilizó una proporción fija de 60%NFC y 40% CS en 6 mezclas, pero con diferentes grados de protonación, etiquetadas desde CA hasta CF, desde más protonada hasta menos protonada. Inicialmente se obtuvieron dispersiones acuosas de mezcla NFC/CS, que posteriormente fueron ajustadas al pH objetivo para cada grado de protonación. El ajuste de las muestras CA y CB fue realizada a través de la adición de diferentes cantidades de ácido acético glacial, la muestra CC fue la única que no recibió modificaciones y fue utilizada directamente en dispersión acuosa por tener un pH similar al objetivo, mientras que las muestras CD, CE y CF fueron ajustadas adicionando diferentes cantidades de NaOH al 0.1M. Al igual que en la primera batería, se prepararon 200g totales para ser nebulizadas en cada caso.

Tabla 2. Muestras y composiciones de la primera batería de ensayos.

Set 1

<i>Muestra</i>	A	B	C	D	E	F
<i>%NFC</i>	100	80	60	40	20	0
<i>%CS</i>	0	20	40	60	80	100

Tabla 3. Muestras y grados de protonación de la segunda batería de ensayos.

Set 2

<i>Muestra</i>	CA	CB	C	CD	CE	CF
<i>%NFC</i>	60	60	60	60	60	60
<i>%CS</i>	40	40	40	40	40	40
<i>DP (α)</i>	1	0.8	0.63	0.4	0.2	0

5.2.6. Producción de películas por nebulización

Las muestras de 200g con distintas dispersiones NFC/CS fueron nebulizadas utilizando una pistola nebulizadora operada con aire, con presión de 3 bar. Se utilizó como base

bastidores de 15cm de diámetro con tela de poliéster, con entramado de 320 mesh. El sistema utilizado se muestra en la Figura 13. El tiempo de nebulización fue 25s, con una distancia de 40cm de la boquilla a la tela, similares a previamente reportadas (Shanmugan *et al.*, 2018). Las películas fueron obtenidas en triplicado y secadas en sala climatizada con 23°C y 50%HR por 48h antes de ser caracterizadas.



Figura 13. Arreglo utilizado para la formación nebulizada de películas. Pistola a presión con aire (izquierda) y bastidor de 15cm de diámetro (derecha).

5.2.7. Caracterización de películas obtenidas

5.2.7.1. Ensayo mecánico de tensión

Se midió el esfuerzo de tensión utilizando una máquina de ensayos universal (Instron modelo 5566) con probetas de 1x12 cm obtenidas de cada película. La tasa de elongación utilizada fue de 12.5 mm/min, siguiendo los procedimientos de la norma ASTM D882-18. Cada ensayo fue realizado en triplicado.

5.2.7.2. Medición ángulo de contacto

Antes de la medición de ángulo de contacto cada película fue inspeccionada en detalle para evitar la presencia de impurezas o defectos. Una gota de agua destilada fue formada

utilizando una jeringa con aguja de 0.516 mm de diámetro externo. La gota fue depositada sobre el film y se realizó la medición a los 30 s posteriores, por medio de la toma de imágenes utilizando el sistema de análisis de gotas KRÜSS DSA25. Todas las mediciones se realizaron en triplicado.

5.2.7.3. Microscopía óptica y electrónica de barrido

De forma de observar detalles en la superficie de las películas, se cortaron muestras de 1cmx1cm y fueron analizadas utilizando el microscopio Carl Zeiss Primo Star, con aumentos x10 y x40, capturando las imágenes con el software del equipo. Por otra parte las imágenes de microscopía de barrido fueron obtenidas luego del dopamiento de las muestras de películas con oro. Las microfotografías fueron obtenidas utilizando el equipo JEOL JSM-6380.

5.2.7.4. Análisis de espectroscopía FTIR y Raman

Para estudiar los enlaces presentes en las películas de NFC/CS y sus espectros vibracionales, se realizaron análisis de espectroscopia IR con transformada de Fourier (FTIR) y Raman. Espectros IR en el rango 400-4000 cm^{-1} fueron obtenidos utilizando el equipo Nicolet Nexus. Pequeños cortes de 1 cm^2 de películas fueron secadas en desecador de silica por 24 h para evitar la interferencia de humedad. Luego, fueron molidas y combinadas con KBr para obtener un disco analizable por el equipo. Por otra parte, los espectros Raman fueron obtenidos en el rango 600-4000 cm^{-1} utilizando el equipo LabRAM HR evolution. Para facilitar el análisis, corrección de línea base y reconocimiento de señales, los espectros FTIR y Raman fueron procesados utilizando el software OriginPro (2022b).

5.2.7.5. Permeabilidad de aire

La permeabilidad al aire de películas fueron medidos usando un equipo Gurley para porosidad. A través de este método se mide el tiempo total que requiere un volumen fijo de aire para atravesar la película, estableciendo una relación inversa entre tiempo

transcurrido y permeabilidad. El área de prueba es de 12.5 cm². El volumen de aire utilizado fue de 100 ml, siguiendo las recomendaciones de la norma Tappi T460-0m. Para cada película el procedimiento fue repetido en triplicado.

5.2.7.6. Tasa de transferencia de oxígeno

La tasa de transferencia de oxígeno fue medida utilizando la norma ASTM D3985-02 usando el equipo SYSTESTER, modelo OTR-1903 en el modo inteligente. Las condiciones dentro de la cámara fueron controladas a 23°C y 0%HR, el área de medición fue de 38.5 cm².

5.2.8. Análisis estadístico de mediciones

La información generada en cada caracterización será analizada utilizando el software RStudio (1.4.1717). Se realizarán análisis de varianza (ANOVA) y test de Tukey para diferenciar las medias en distintos grupos. En cada caso, la significancia utilizada será $p=0.05$.

6. Resultados y discusión

6.1. Caracterización de las nanofibras producidas

El análisis viscosimétrico de la solución de NFC presentó una viscosidad intrínseca de 988.6 mg/L en agua (Fig 14). A partir de los resultados reportados por el analizador de tamaño se obtuvo un largo aparente promedio de $8.45 \pm 0.5 \mu\text{m}$, posteriormente, y usando la correlación previamente reportada (Albornoz-Palma *et al.*, 2022), se estimó la relación de aspecto (L/D) con valor 268, lo que permitió obtener un diámetro aproximado de $31.5 \pm 18.7 \text{ nm}$.

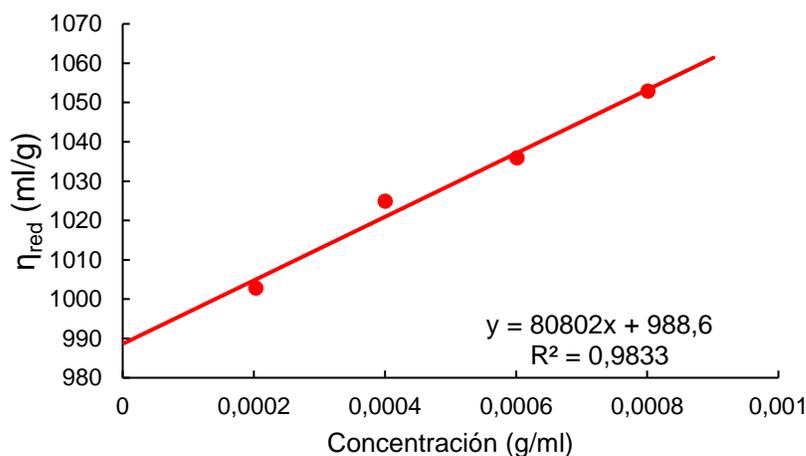


Figura 14. Relación de viscosidad reducida y concentración para el cálculo de viscosidad intrínseca.

6.2. Grado de protonación de quitosano

La titulación potenciométrica de la dispersión de quitosano y la mezcla NFC/CS fue realizada (Fig 15 (a)). Posteriormente se obtuvo el pKa del quitosano como el valor de pH a partir del promedio de los picos encontrados (V_1 y V_2) en la curva $\Delta\text{pH}/\Delta V$ (Fig 15(b)) para cada ensayo. Se obtuvo un pKa = 6.49 para la muestra de 100%CS y pKa=6.52 para la muestra con 60%NFC + 40%CS. Estos valores son similares a previamente reportados (Domard *et al.*, 1987; Rinaudo *et al.*, 1999).

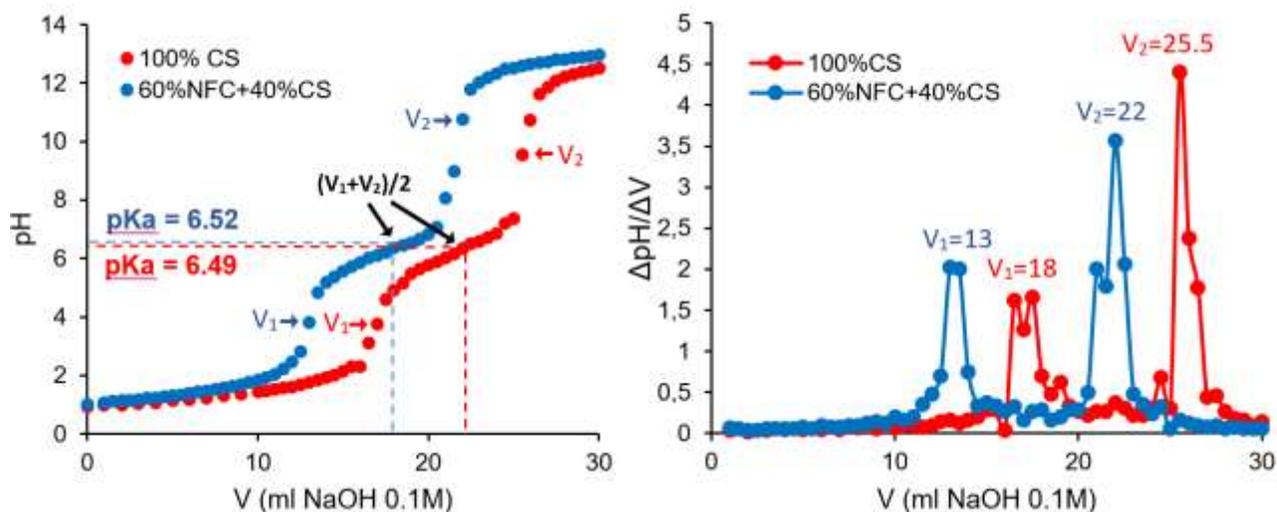


Figura 15. Titulación potenciométrica realizada (a). Curva $\Delta pH/\Delta V$ obtenida (b).

Utilizando el valor encontrado para la mezcla de NFC/CS fue posible correlacionar el pH de la dispersión con el grado de protonación (α) del quitosano presente utilizando la ecuación (5).

$$\alpha = \frac{1}{10^{pH-6.52}+1} \quad (6)$$

La tabla 4 presenta los valores de pH asociados a cada grado de protonación estudiado en la segunda batería de ensayos.

Tabla 4. pH objetivo de dispersiones utilizadas para estudiar el cambio en el grado de protonación (α) ($pK_a = 6.52$).

Muestra	CA	CB	C	CD	CE	CF
α	1	0.8	0.63	0.4	0.2	0
pH	4.95	5.91	6.35	6.71	7.13	9.00

6.3. Espesor de películas obtenidas

Se estudió el espesor de películas obtenidas usando un micrómetro. La figura 16 presenta el diagrama de cajas de ambas baterías de ensayos. A pesar de la simpleza del método de nebulización, fue posible obtener películas con gran reproducibilidad de sus espesores.

En todos los casos se utilizó el mismo tiempo de nebulizado, consistencia de la dispersión y condiciones de secado.

Es importante comentar la influencia de las condiciones de secado. Se probaron diversas variantes antes de establecer la metodología utilizada, como el secado en condiciones ambientales, en estufa de tiro forzado o estufa al vacío y en todos los casos se observó que cambios de temperatura durante el secado promovían el arrugamiento y la aparición de defectos durante la formación de las películas, por lo que se prefirió utilizar el secado en sala climatizada (23°C y 50%HR). Por otra parte la muestra F (100%CS) fue la única que no pudo formar una superficie continua durante el tiempo de nebulización, presentando puntos vacíos observables de forma macroscópica y fragilidad al tacto.

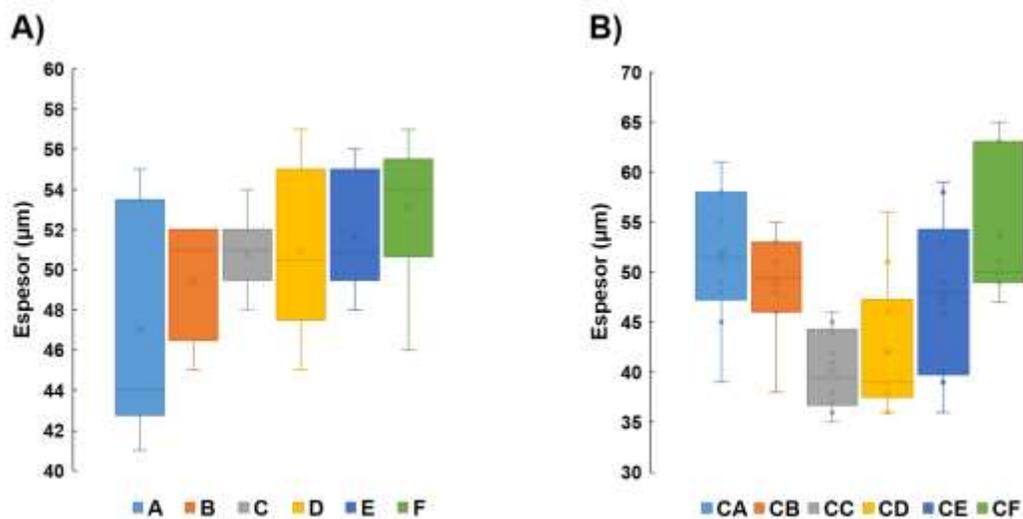


Figura 16. Diagrama de cajas del espesor de películas fabricadas. (a) Batería 1: A (100%NFC), B(80%NFC+20%CS), C(60%NFC+40%CS), D(40%NFC+60%CS), E(20%NFC+80%CS), F(100%CS). (b) Batería 2: CA($\alpha=1$), CB($\alpha=0.8$), CC($\alpha=0.63$), CD($\alpha=0.4$), CE($\alpha=0.2$), CF($\alpha=0$).

No se encontraron diferencias significativas entre los espesores de las películas obtenidas, por lo que se considera que es posible hacer comparaciones entre sus propiedades físico mecánicas, sin que el espesor sea una variable a ponderar en el análisis.

6.4. Microscopía de películas obtenidas

6.4.1. Microscopía óptica

Por medio de la microscopía óptica fue posible observar diferencias generales en la morfología superficial entre las películas obtenidas. La figura 17 presenta las imágenes obtenidas. La película A (100%NFC) presenta una matriz altamente enmarañada formada por las interacciones entre fibras (Fig 17). Es notable, que el patrón de la tela de poliéster de 140-mesh fue transferido a las películas con gran detalle. Esto se relaciona con lo observado en otras publicaciones respecto a la capacidad de formación de micro patrones en películas de NFC (Browne *et al.*, 2021). En el otro extremo, la película F (100%CS), presenta una estructura continua pero altamente porosa, similar a otros reportes (Qin *et al.*, 2023). Por otra parte, la muestra C (60%NFC+40%CS), revela una red de fibras conectadas con quitosano presente tanto en los espacios entre fibras y como recubrimiento. Cuando se evaluaron cambios en el grado de protonación de quitosano manteniendo fija la proporción NFC/CS (Fig 18), se observan cambios en la superficie. La película CA ($\alpha=1$), presentó una superficie más homogénea, donde fue posible reconocer fibras recubiertas con quitosano (señalado en rojo), de mayor diámetro aparente que fibras observadas en la película CF ($\alpha=0$) que no presentaron este recubrimiento y permitieron observar fibras más expuestas (señalado en rojo). Esto puede ser atribuido a que, a mayor protonación del quitosano, mayor cantidad de interacciones electrostáticas con NFC. Estas fuerzas de menor alcance de acción tienen un efecto de recubrimiento superficial entre los grupos catiónicos $-\text{NH}_3^+$ presentes en quitosano y la carga superficial negativa de las fibras. Mientras que un menor grado de protonación favorece las interacciones puente hidrógeno entre e intra NFC y CS, menos específicas, permitiendo que las fibras queden más expuestas.

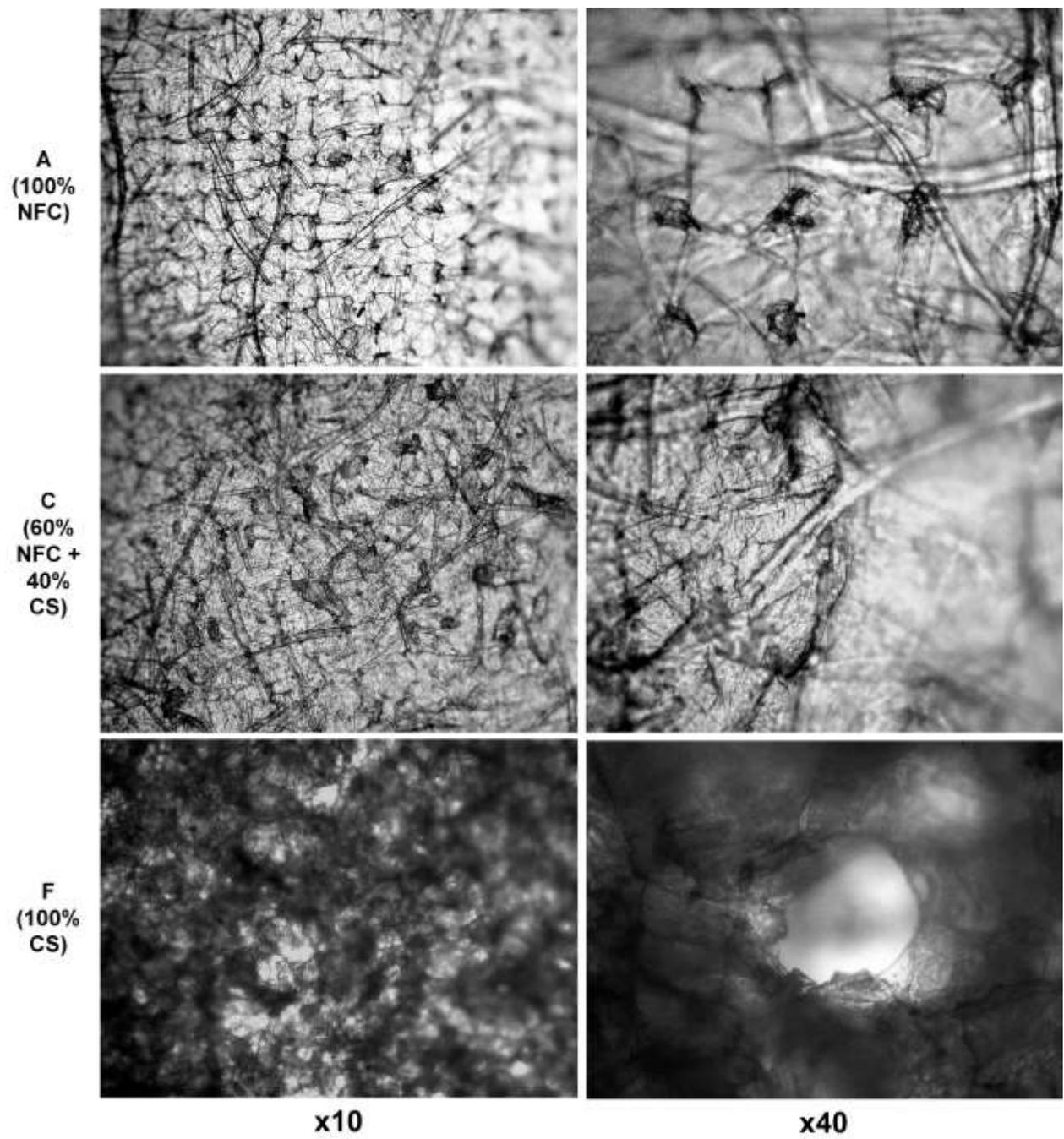


Figura 17. Microscopía óptica de películas con diferente composición NFC/CS.

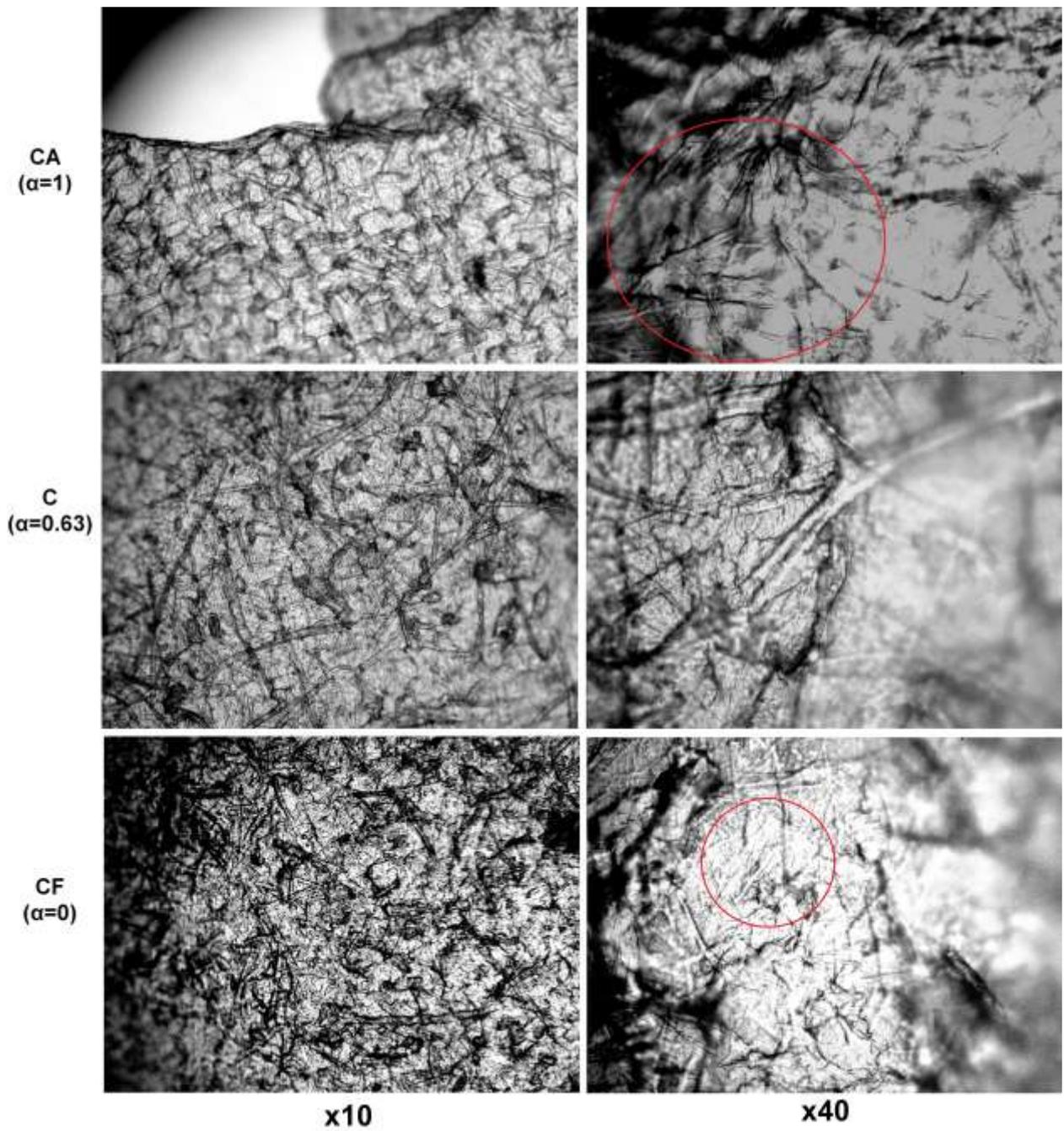


Figura 18. Microscopía óptica de películas con diferente grado de protonación (α).

6.4.2. Microscopía electrónica de barrido.

A través de la microscopía SEM fue posible estudiar con mayor detalle la superficie de películas. La figura 20 presenta las micrografías SEM de películas obtenidas con distinta composición. Es posible observar la red interconectada de microfibrillas en la muestra A (100%NFC) y la estructura porosa de la muestra F (100%CS). También se observa que la muestra C (60%NFC+40%CS) presenta una estructura intermedia, con presencia de conexiones entre microfibras y un recubrimiento parcial con quitosano. Cuando se compara el grado de protonación (Fig 21), la muestra CA ($\alpha=1$) y la muestra C ($\alpha=0.63$) presentan agregación de CS sobre las microfibras, atribuidas al aporte de interacciones electrostáticas. Así mismo, la muestra CF presenta microfibras con una mucho menor agregación de quitosano, preservando su forma alargada. Esto es atribuido a la naturaleza poco específica de los puentes hidrógeno entre e intra NFC/CS. Es importante señalar que en todos los casos la orientación caótica de las fibras es preservada, permitiendo la formación de rutas tortuosas para el transporte de gases y las propiedades mecánicas asociadas a la interacción entre microfibras.

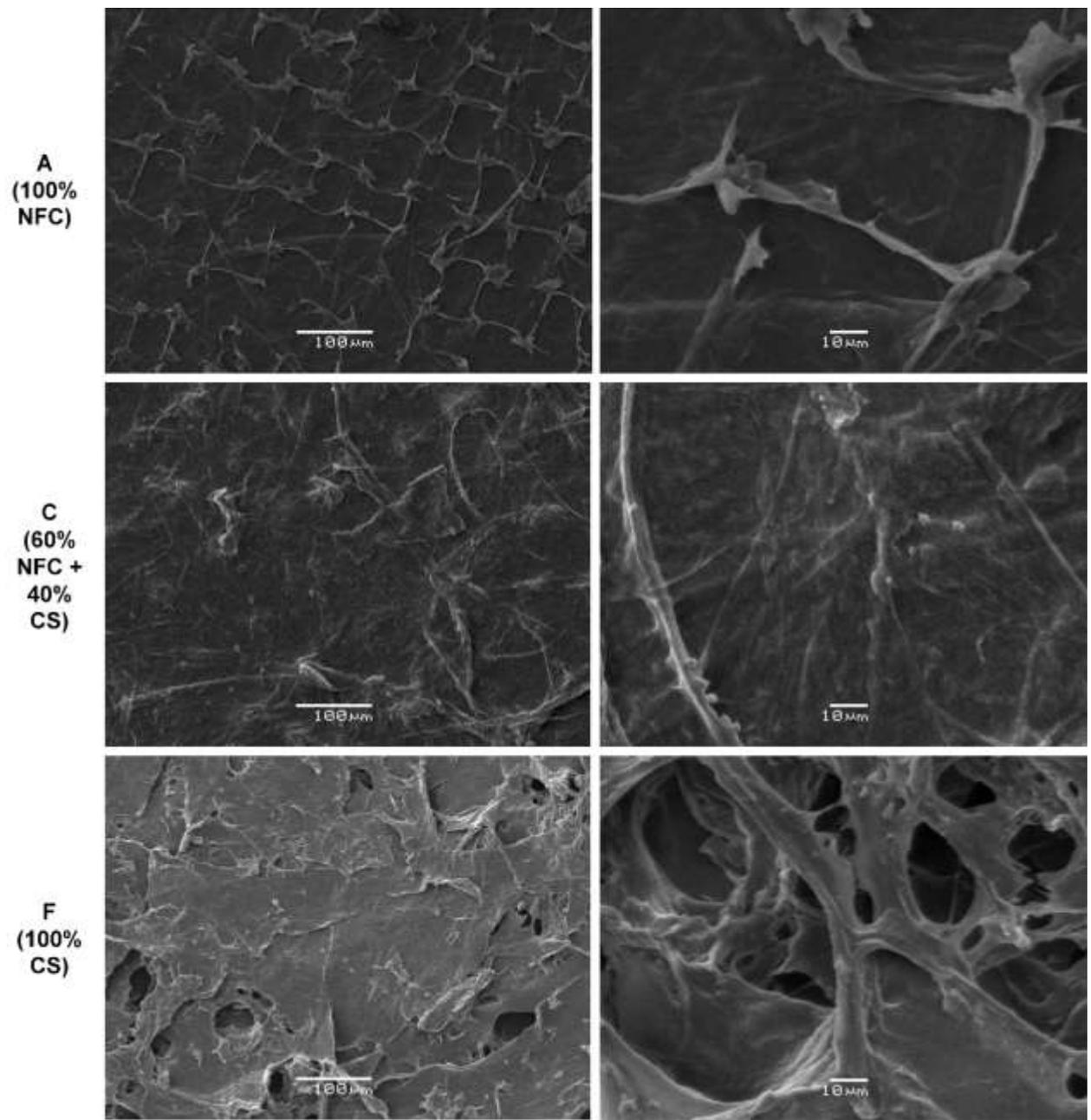


Figura 19. Microscopía electrónica de barrido de superficie de películas de diferente composición.

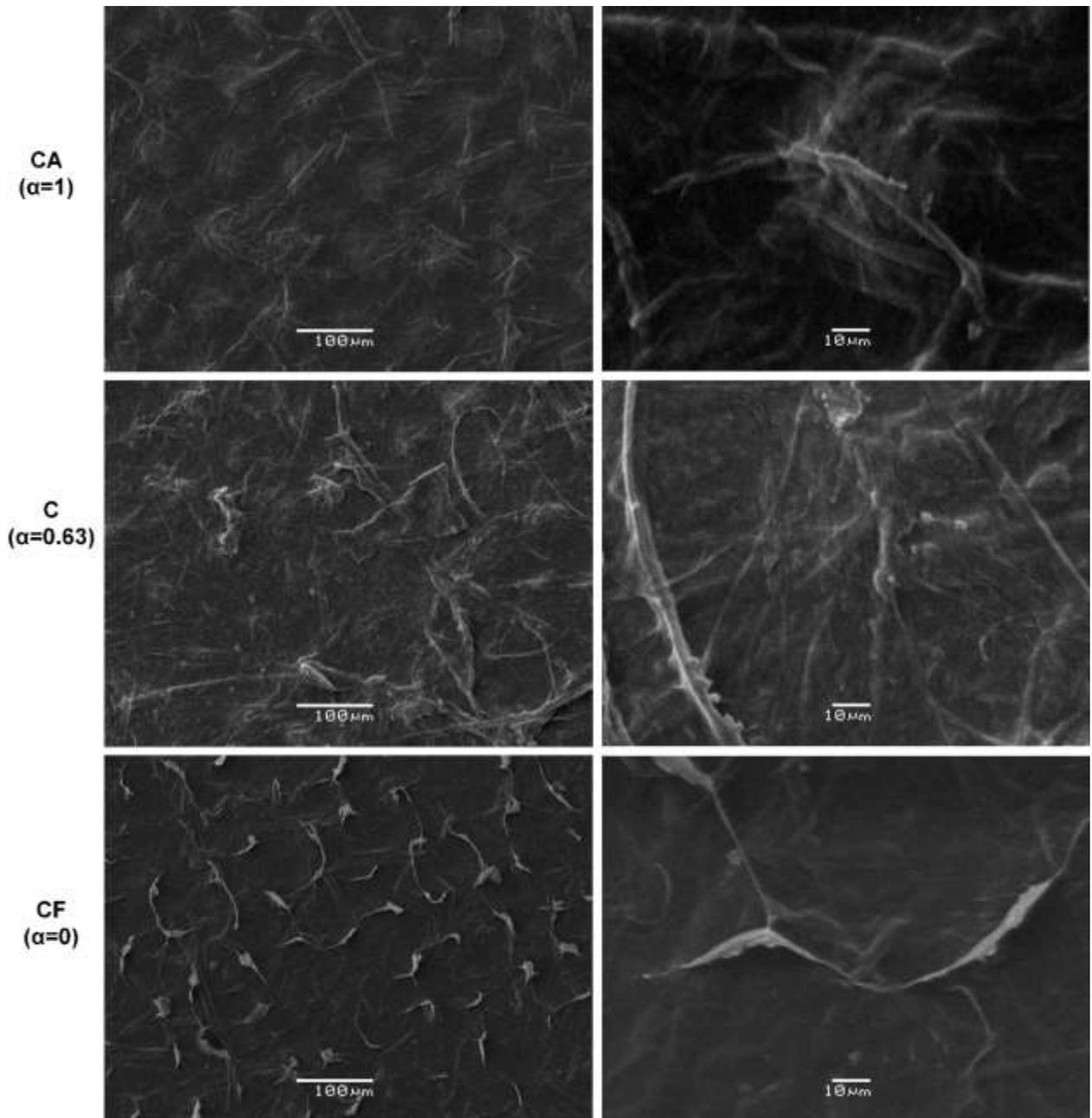


Figura 20. Microscopía electrónica de barrido de superficie de películas de diferente grado de protonación ($\alpha=1$).

6.5. Análisis espectrónicos

6.5.1. Espectroscopía FTIR

La figura 21 presenta los espectros FTIR obtenidos para ambas baterías de ensayos. Las muestras A (100%NFC) y F (100%CS) (Fig 21(a)) presentan espectros para NFC y CS con señales que concuerdan con lo previamente reportado (Kim *et al.*, 2006; Lamm *et al.*, 2022; Hai *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2021). Debido a su similitud química, existen señales características compartidas entre NFC y CS. Entre ellas: la banda ancha de absorción entre 3200-3400 cm^{-1} asociado a las vibraciones de estiramiento de O-H y N-H; la señal a 2915 cm^{-1} atribuidos a la vibración de C-H; la señal en 1055 cm^{-1} relacionado al estiramiento del enlace C-O. Adicionalmente, la muestra A (100%NFC) presenta picos característicos en 1369 y 1315 cm^{-1} relacionados a la deformación y doblamiento de grupos C-H y C-O. Por otra parte, la muestra F (100%CS) presenta señales características del quitosano en 1369, 1315 y 1557 cm^{-1} relacionados al estiramiento de C=O y el doblamiento de N-H. La muestra C (60%NFC+40%CS), presenta todas las señales descritas.

Por otra parte, fue posible evidenciar cambios en los espectros asociados al cambio de protonación de quitosano en películas compuestas obtenidas (Fig 22 (b)). Se observa un desplazamiento en la posición del pico en la banda 3200-3400 cm^{-1} (asociado a O-H y N-H) y en la señal de 1557 cm^{-1} asociada al N-H, ambos cambios se encuentran señalados con (*) en la figura. En ambos casos un mayor grado de protonación se relacionó con una disminución del número de onda. Esto es debido a la interacción de $-\text{NH}_3^+$ y grupos O-H (Mauricio-Sánchez *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

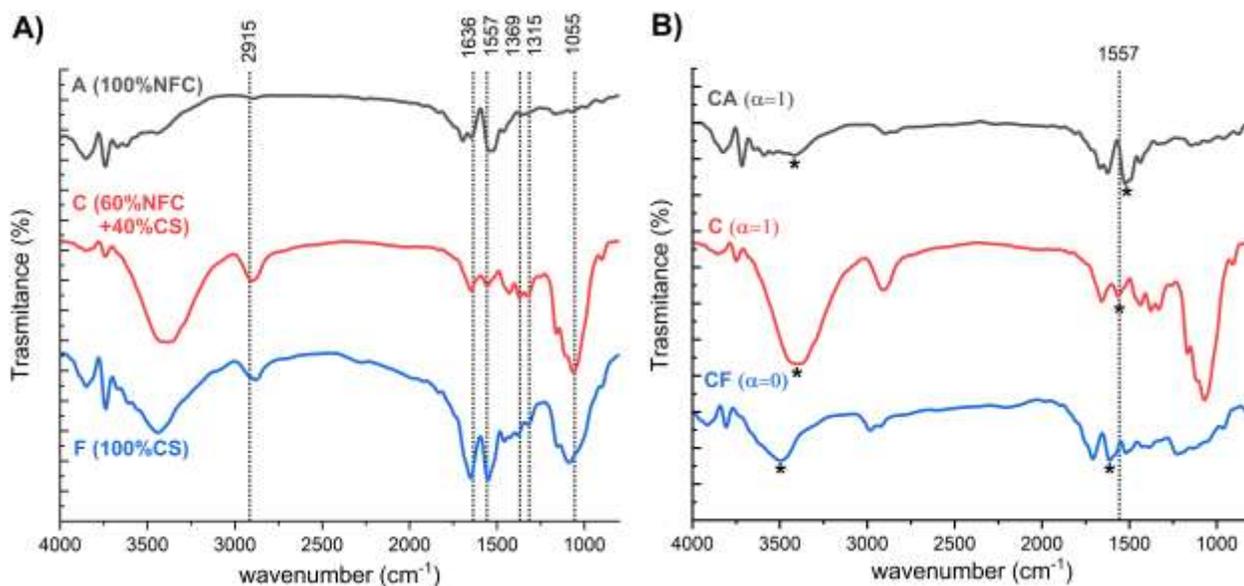


Figura 21. Espectros FTIR de películas obtenidas. (a) Películas con diferente composición; A (100% NFC), C (60%NFC+40%CS), F (100%CS). (b) Películas con misma composición (60%NFC+40%CS) y distinto grado de protonación; CA ($\alpha=1$), C ($\alpha=0.63$), CF ($\alpha=0$). Señales con marca (*) presentan desplazamientos atribuidos a cambios en protonación.

6.5.2. Espectroscopía Raman

De forma similar, la figura 22 presenta los los espectros raman de películas compuestas obtenidas. La muestra A(100%NFC) presenta una señal fuerte cercana 1100 cm^{-1} , que representa el estiramiento y vibración de grupos hidroxilos presentes en celulosa y la señal cercana a 2890 cm^{-1} que representa el estiramiento y vibración de la parte cristalina en la celulosa (Agarwal et al., 2017). Por otra parte la muestra F(100%CS) presenta una señal fuerte en 1625 cm^{-1} asociada a la vibración de C-N y N-H como ha sido previamente reportado (Varma et al., 2020; Nirmala et al., 2011). De manera esperable, la muestra C (60%NFC+40%CS) presenta ambos grupos de señales.

Cuando se evaluó el cambio en el grado de protonación (Fig 22(b)), se observaron ligeras variaciones en los espectros. La señal en 1150 cm^{-1} , asociado a la unión glucosídica C-O-C entre unidades de glucosamina, presentó una señal más ancha con el aumento en el grado de protonación, lo que concuerda con lo encontrado por otros autores (Binias et al.,

2016). También, la señal de la banda amida en 1325cm^{-1} , asociado al estiramiento de C-N y N-H, presentó una variación en la intensidad de su señal. Esto concuerda con lo previamente reportado (Binias et al., 2016; Eddy et al., 2020). Finalmente, la señal débil encontrada en 1690cm^{-1} en la muestra no protonada (CF) fue atribuida al estiramiento de C=O en quitosano permitido por la falta de interacciones con grupos $-\text{NH}_3^+$. Estos resultados revelan que la protonación de quitosano en las películas fue efectiva.

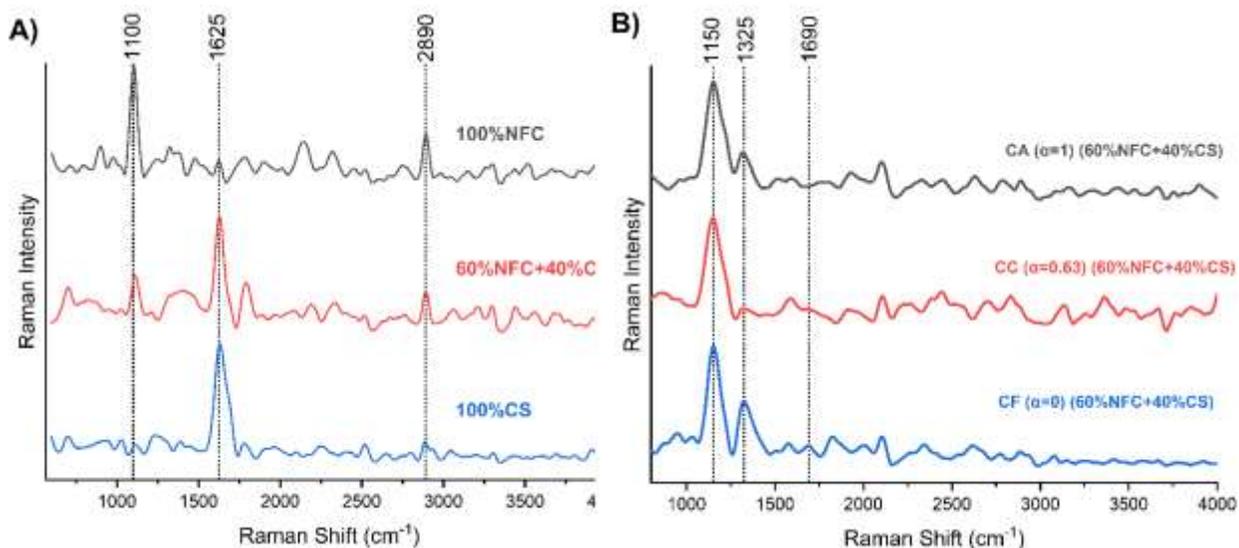


Figura 22. Espectro Raman de películas obtenidas. (a) Muestras con diferente composición; A (100% NFC), C (60%NFC+40%CS), F (100%CS). (b) Muestras con misma composición (60%NFC+40%CS) y diferentes grados de protonación (α).

6.6. Propiedades mecánicas

La tabla 5 presenta los resultados obtenidos de la prueba de tensión. Cuando se analiza el efecto de la composición en las mezclas NFC/CS (set1), es notorio el efecto de refuerzo de las NFC sobre el CS. A medida que aumenta el contenido de CS, propiedades como el módulo de Young, límite elástico y elongación a la ruptura disminuyen significativamente. Esto concuerda con previos reportes (Zhang et al., 2021; Yadav et al., 2020). Las muestras F (100%CS) presentaron las menores propiedades mecánicas. Esto se explica por la falta de tiempo de nebulización para obtener una estructura continua y su naturaleza

quebradiza. En el otro extremo, las muestras A (100%NFC) presentaron las mejores propiedades mecánicas entre las evaluadas.

Cuando se analiza el grado de protonación, se observan cambios significativos. Quitosano más protonado permitió obtener mayores módulos de Young y límite elástico. Esto fue asociado al refuerzo de la matriz de nanofibras por las interacciones electrostáticas de grupos $-NH_3^+$ y la superficie de NFC (Fig 23). Mientras que un menor grado de protonación permite la formación de puentes hidrógenos menos específicos entre e intra NFC y CS, permitiendo que el quitosano ocupe espacios libres entre fibras. Esto concuerda con el aumento en la elongación a la ruptura en la medida que disminuye el grado de protonación, debido al facilitamiento de la separación de fibras durante las pruebas de tensión.

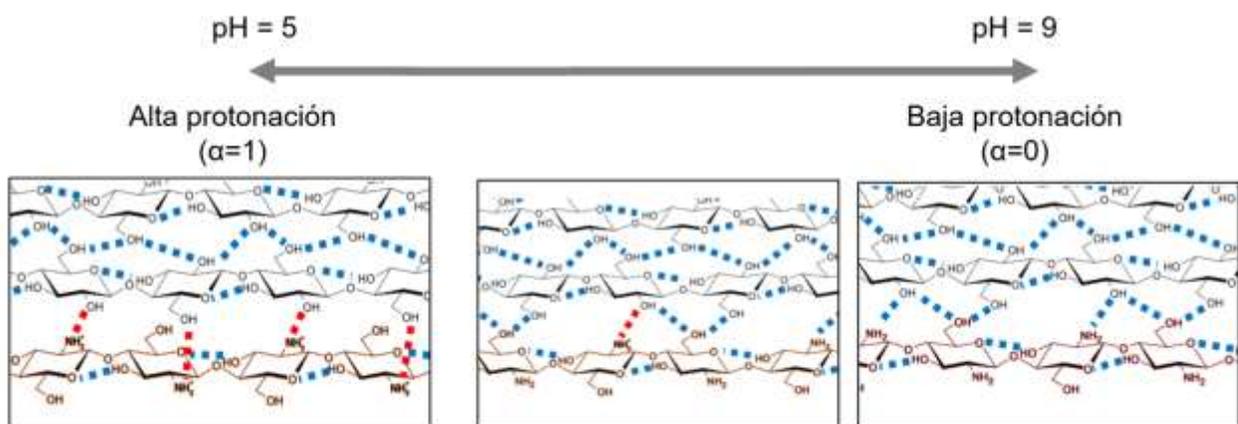


Figura 23. Cambios en interacción entre NFC y CS en diferentes condiciones de protonación.

Estos resultados demuestran el potencial del ajuste de pH en la obtención de materiales con CS y NFC, que permiten obtener una gran variedad de propiedades mecánicas sin la necesidad de funcionalización o la adición de agentes entrecruzantes.

Tabla 5. Resultados de las pruebas de tensión en películas obtenidas.

Muestra	Set 1						Set 2					
	A	B	C	D	E	F	CA	CB	C	CD	CE	CF
<i>Módulo de Young (GPa)</i>	6.1 ^a	5.6 ^a	3.8 ^b	2.3 ^{bc}	2.1 ^c	0.4 ^d	5.3 ^a	5.0 ^{ab}	3.8 ^{bc}	3.0 ^{cd}	2.5 ^{cd}	1.7 ^d
<i>S.D. (±)</i>	1.1	0.7	0.1	0.1	0.3	0.1	0.2	0.2	0.1	0.9	0.5	0.3
<i>Límite elástico (MPa)</i>	39.5 ^a	27.2 ^b	21.5 ^b	29.8 ^b	10.9 ^c	2.4 ^c	37.8 ^a	34.8 ^{ab}	21.5 ^b	26.1 ^{ab}	21.1 ^b	21.9 ^b
<i>S.D. (±)</i>	4.8	3.0	1.5	1.8	4.9	0.9	5.7	7.2	1.5	6.0	5.2	4.0
<i>Elongación a la ruptura (%)</i>	3.2 ^a	2.5 ^{ab}	2.3 ^a	2.5 ^{ab}	0.9 ^c	1.0 ^c	1.2 ^c	1.2 ^c	2.3 ^{ab}	2.0 ^{bc}	1.7 ^{bc}	3.1 ^a
<i>S.D.(±)</i>	0.4	0.1	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	0.1	0.3

*(a,b,c,d,) Corresponde al grupo estadístico asignado por el test de Tukey.

6.7. Ángulo de contacto

En cuanto a empaques de alimento, la interacción superficial con agua es relevante, dado que muchos alimentos como frutas y vegetales interactúan de diversas formas con la humedad durante su procesamiento, distribución y almacenamiento. La tabla 6 presenta los ángulos de contacto obtenidos en ambas baterías de ensayos. Usualmente, un material se considera hidrofóbico si el ángulo de contacto de la gota supera los 90° mientras que se considera hidrofílico si el ángulo es menor. Cuando se evalúa el efecto de la composición se puede observar que sólo la muestra F (100%CS) es caracterizable como hidrofóbico. En la medida que aumenta la cantidad de NFC adicionada el ángulo disminuye significativamente hasta la muestra A (100%NFC). Esto es esperable debido a la gran interacción entre las NFC, alta superficie específica y su capacidad para formar puentes hidrógeno con el agua. Por otra parte, cuando se comparan distintos grados de protonación, utilizando la misma composición, podemos observar el importante impacto de la protonación en la superficie de las películas. El aumento en el grado de protonación permite a las muestras CA ($\alpha=1$) y CB ($\alpha=0.8$) alcanzar ángulo sobre los 90°. Este es atribuido al recubrimiento superficial de las NFC con CS debido a las atracciones electrostáticas entre los grupos $-\text{NH}_3^+$ y la superficie de NFC (Fig 23). Esto permite que, en la superficie, al momento que se deposita la gota, esta tenga contacto principalmente con quitosano, de ahí que los ángulos obtenidos se asemejen a los valores de quitosano

(muestra F). Al mismo tiempo, cuando el quitosano se encuentra con bajo nivel de protonación aumenta la cantidad de grupos $-NH_2$, que son capaces de formar puente hidrógeno con el agua mejorando la afinidad de las películas con el agua. Además, similar a lo previamente comentado, estas interacciones entre e intra NFC y CS permite dejar la celulosa expuesta, fomentando aún más la disminución del ángulo de contacto. Estos resultados sugieren que el ajuste de pH en las dispersiones de NFC/CS puede ser una alternativa atractiva para la obtención de materiales hidrofóbicos.

Tabla 6. Ángulo de contacto al agua de películas obtenidas

Muestra	Set 1						Set 2					
	A	B	C	D	E	F	CA	CB	C	CD	CE	CF
Ángulo de contacto (°)	43.5 ^c	47.4 ^c	64.7 ^b	62.9 ^b	71.0 ^b	104.2 ^a	109.2 ^a	95.5 ^a	64.7 ^b	51.3 ^{bc}	41.2 ^{cd}	31.3 ^d
S.D. (±)	2.8	1.0	4.3	2.0	5.8	1.3	14.5	7.5	4.3	1.4	1.4	0.3

*(a,b,c,d,) Corresponde al grupo estadístico asignado por el test de Tukey.

6.8. Barrera a gases

Teniendo en cuenta su aplicación como empaque de alimentos, la capacidad de barrera a gases de un material es fundamental para asegurar la protección del producto, para evitar contaminación o pérdida. La tabla 7 presenta los resultados obtenidos para permeabilidad de aire y transferencia de oxígeno obtenidos. A partir del método de Gurley y cuando se comparan los cambios de composición en las mezclas NFC/CS, se observa una gran variación de valores de permeabilidad al aire. Las muestras de la A (100%NFC) hasta la D (40%NFC+60%CS) presentan tiempos mayores a 1800 s. Según lo sugerido por la norma Tappi T460-om, materiales que presenten más de 1800s de tiempo para permear 100 ml de aire son considerados como materiales no porosos. Esto concuerda con lo reportado frente a la capacidad de NFC de formar una barrera tortuosa y efectiva para el traspaso de gases (Wang et al., 2020). La muestra E (20%NFC+80%CS) presentó un tiempo de permeabilidad menor a 1800 s, esto ha sido relacionado con el alto contenido de quitosano y su naturaleza porosa. Por otro lado, la muestra F (100%CS), que no pudo formar una superficie continua, no logro oponer mayor resistencia al aire debido a que no logró

presentar una superficie continua, sino más bien porosa (descrita en la sección de microscopía).

Cuando se evalúa el cambio en grado de protonación, ambas muestras CA ($\alpha=1$) y CF ($\alpha=0$), presentaron mayores permeabilidades que C ($\alpha=0.63$). A pesar de esto, la muestra CA puede ser considerada como no porosa. En ambos casos, el recubrimiento de las fibras con quitosano altamente protonado, o su exposición debido a una baja protonación pueden aportar a en la formación de caminos menos tortuosos para el traspaso de aire. Se considera que C, por tener una protonación intermedia, podría beneficiarse de ambos fenómenos, permitiendo oponer mayor resistencia al traspaso de aire. Esto concuerda con previos reportes al adicionar CS disuelto en pH neutro (asociado a una protonación intermedia) y su capacidad para mejorar capacidades de barrera en matrices como papel reciclado (Nassar *et al.*, 2014) e hidrogeles de algodón (Benltoufa *et al.*, 2020).

Tabla 7. Propiedades de barrera de películas obtenidas.

Set 1

<i>Sample</i>	A	B	C	D	E	F	CA	CF
<i>Gurley air permeability (s)</i>	12,995 ^a	10,056 ^b	4,126 ^c	3,579 ^c	1,103 ^d	21 ^d	2,074 ^a	426 ^b
<i>S.D. (±)</i>	811	400	338	361	302	3	84	102
<i>OTR (cc/m²day) 0%HR</i>	23.3 ^a		9.6 ^b			-	9.0 ^a	5.5 ^a
<i>S.D. (±)</i>	4.9		2.4			-	5.5	2.6

*(a,b,c,d,) Tukey's test correspondent group among sets.

Cuando se evaluó la tasa de transferencia de oxígeno, la muestra A (100%NFC) presentó una mayor transferencia que la muestra C (60%NFC+40%CS). Esto puede ser relacionado a la interacción directa entre quitosano y oxígeno, y como afecta la tortuosidad del paso del gas. La muestra F no pudo ser analizada pues, tras varios intentos, la cámara no logró estabilizar la concentración de oxígeno, atribuido a la presencia de poros a través de la película. Se requieren más experimentos para entender la relación entre NFC/CS y sus propiedades de barrera, en este caso las muestras fueron procesadas con 0%HR que, si bien es una configuración estándar en el estudio de materiales, se aleja de las condiciones

habituales de almacenamiento de la mayoría de alimentos. Estos ensayos podrían incluir diferentes temperaturas y condiciones de humedad. Cuando se compara el efecto de la protonación, no se aprecian diferencias significativas entre las muestras CA y CF. A pesar de que estos resultados no son reveladores, la composición de 60%NFC y 40%CS en todos los grados de protonación evaluados, esto es CA($\alpha=1$), C($\alpha=0.63$) y CF($\alpha=0$), presentaron valores de OTR menores a 20 cc/m²día lo que permitirá utilizar estos empaques en el envasado de carnes, según Schmidt *et al* (2012). Esto indica el gran potencial de la mezcla NFC/CS como alternativa sustentable como barrera a gases para la protección de alimentos.

7. Conclusiones

Cuando se evaluó el efecto de la adición de nanofibras de celulosa y quitosano en distintas proporciones se encontró que, con el aumento de CS, el módulo de Young disminuyó significativamente desde 6.1 GPa para una película 100% NFC hasta 0.4 GPa para una película 100%CS. El mismo efecto de refuerzo mecánico de NFC fue observado para el límite elástico que varió desde 39.5 MPa (100%NFC) hasta 2.4 MPa (100%CS). La permeabilidad al aire también varió de forma significativa, obteniendo los mejores resultados con las muestras A (100%NFC) y B (80%NFC+20%CS), que presentaron mediciones que permiten considerarlos no porosos. A su vez, la adición de CS a partir de este rango presentó menores permeabilidades hasta no oponer resistencia al paso de aire en el caso de la película F(100%CS). La estructura porosa de CS se comprobó a través de los ensayos de microscopía óptica y SEM.

Respecto a la modificación de grado de protonación de quitosano en películas obtenidas con mezcla 60%NFC+40%CS, se logró satisfactoriamente la protonación en diferentes grados. Fue posible comprobar el proceso a partir de ensayos de espectroscopía FTIR y Raman y el desplazamiento de señales características de los grupos amino ($-NH_2$) presentes en quitosano. Fue posible observar cambios significativos en las propiedades mecánicas de películas con la modificación de la protonación. El módulo de Young varió desde 5.3 GPa para la muestra CA ($\alpha=1$) hasta 1.7 GPa para la muestra CF ($\alpha=0$). Este efecto de refuerzo atribuido al aumento de interacciones electrostáticas con la protonación también se observó en el límite elástico desde 37.8 MPa para la muestra CA($\alpha=1$) hasta 21.9 MPa para la muestra CF ($\alpha=0$). También se observó que la menor permeabilidad al aire se obtuvo con un grado intermedio de protonación C($\alpha=0.63$), mientras que aumentos o disminuciones de la protonación favorecían el traspaso de aire.

Fue posible evaluar el impacto en las características superficiales de películas a partir de las mediciones de ángulo de contacto. Cuando se evaluaron distintas composiciones fue posible comprobar la característica hidrofílica de películas 100% NFC, con ángulo de 43.5° mientras que las películas 100%CS presentaron ángulo centrados en 104.2° , por lo que

podieron ser considerados hidrofóbicos. No fue posible obtener ángulos mayores a 90° con la adición de NFC, siendo la muestra E (20%NFC+80%CS) la de menor cantidad de NFC con ángulo de 71.0° . Sin embargo, cuando se evaluó el efecto del grado de protonación en muestras 60%NFC+40%CS fue posible obtener películas hidrofóbicas cuando se aumentó el grado de protonación: CA($\alpha=1$), 109.2° y CB ($\alpha=0.8$), 95.5° .

Variar la composición de NFC y CS, y la protonación de quitosano, permitió aprovechar las interacciones electrostáticas entre ambos biopolímeros. Estos resultados vislumbran el potencial de la modificación de pH en la obtención de materiales compuestos NFC/CS como una manera fácil y escalable para obtener una alternativa sustentable a la industria de empaque de alimentos.

Se considera que a través de la experimentación fue posible desarrollar y caracterizar un material sustentable, que presenta propiedades atractivas para la industria del empaque de alimentos.

8. Bibliografía

Alamri, M. S., et al. (2021). "Food packaging's materials: A food safety perspective." Saudi J Biol Sci **28**(8): 4490-4499.

Albornoz-Palma, G., et al. (2022) Relationships between Size Distribution, Morphological Characteristics, and Viscosity of Cellulose Nanofibril Dispersions. Polymers **14**.

Alizadeh-Sani, M., et al. (2021). "pH-responsive color indicator films based on methylcellulose/chitosan nanofiber and barberry anthocyanins for real-time monitoring of meat freshness." International Journal of Biological Macromolecules **166**: 741-750.

Álvarez, C., et al. (2016). "Enzymatic hydrolysis of biomass from wood." Microb Biotechnol **9**(2): 149-156.

Agarwal, D., et al. (2022). "Food Packaging Materials with Special Reference to Biopolymers-Properties and Applications." Chemistry Africa **6**.

Agarwal, U. P. (2019). "Analysis of Cellulose and Lignocellulose Materials by Raman Spectroscopy: A Review of the Current Status." Molecules **24**(9).

Azeredo, H. M. C., et al. (2017). "Nanocellulose in bio-based food packaging applications." Industrial Crops and Products **97**: 664-671.

Beneventi, D., et al. (2014). "Highly Porous Paper Loading with Microfibrillated Cellulose by Spray Coating on Wet Substrates." Industrial & Engineering Chemistry Research **53**(27): 10982-10989.

Benltoufa, S., et al. (2020). "Chitosan hydrogel-coated cellulosic fabric for medical end-use: Antibacterial properties, basic mechanical and comfort properties." Carbohydrate Polymers **227**: 115352.

Binias, D., et al. (2016). "Application of Raman Spectroscopy for Evaluation of Chemical Changes in Dibutylchitin Fibres." *Fibres and Textiles in Eastern Europe* 24: 27-38.

Browne, C., et al. (2021). "Moulding of micropatterned nanocellulose films and their application in fluid handling." *Journal of Colloid and Interface Science* **587**: 162-172.

Cazón, P. and M. Vázquez (2019). Applications of Chitosan as Food Packaging Materials. *Sustainable Agriculture Reviews 36: Chitin and Chitosan: Applications in Food, Agriculture, Pharmacy, Medicine and Wastewater Treatment*. G. Crini and E. Lichtfouse. Cham, Springer International Publishing: 81-123.

Chalitangkoon, J. and P. Monvisade (2021). "Synthesis of chitosan-based polymeric dyes as colorimetric pH-sensing materials: Potential for food and biomedical applications." *Carbohydrate Polymers* **260**: 117836.

Chen, Q., et al. (2021). "Layer-by-Layer Spray-Coating of Cellulose Nanofibrils and Silver Nanoparticles for Hydrophilic Interfaces." *Acs Applied Nano Materials* **4**(1): 503-513.

Costa, S. M., et al. (2021). "Active natural-based films for food packaging applications: The combined effect of chitosan and nanocellulose." *International Journal of Biological Macromolecules* **177**: 241-251.

Dehnad, D., et al. (2014). "Thermal and antimicrobial properties of chitosan-nanocellulose films for extending shelf life of ground meat." *Carbohydrate Polymers* **109**: 148-154.

Dong, F., et al. (2015). "Improvement of quality and shelf life of strawberry with nanocellulose/chitosan composite coatings." *Bangladesh J. Bot.* **44**: 709-717.

Domard, A. (1987). "pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to Cull—polymer interactions." *International Journal of Biological Macromolecules* **9**(2): 98-104.

Dufresne, A. (2013). "Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial." Materials Today **16**(6): 220-227.

Eddy, M., et al. (2020). "A comparison of chitosan properties after extraction from shrimp shells by diluted and concentrated acids." Heliyon 6(2): e03486.

Ek, M., et al. (2009). Wood chemistry and wood biotechnology.

Fall, A. B., et al. (2011). "Colloidal Stability of Aqueous Nanofibrillated Cellulose Dispersions." Langmuir **27**(18): 11332-11338.

Fotie, G., et al. (2020). "Manufacturing of Food Packaging Based on Nanocellulose: Current Advances and Challenges." Nanomaterials **10**(9): 1726.

Gao, Q., et al. (2020). "Preparation of a microfibrillated cellulose/chitosan/polypyrrole film for Active Food Packaging." Progress in Organic Coatings **149**.

Goycoolea, F., et al. (2007). "Effect of molecular weight and degree of acetylation on the physicochemical characteristics of chitosan nanoparticles." in Advances in Chitin Science: 542-547.

Hassan, M. L., et al. (2011). "Effect of pretreatment of bagasse fibers on the properties of chitosan/microfibrillated cellulose nanocomposites." Journal of Materials Science **46**(6): 1732-1740.

Hai, L. V., et al. (2020). "Chitosan Nanofiber and Cellulose Nanofiber Blended Composite Applicable for Active Food Packaging." Nanomaterials **10**(9): 1752.

Hernandez-Garcia, E., et al. (2021). "Biodegradable Antimicrobial Films for Food Packaging: Effect of Antimicrobials on Degradation." Foods **10**(6).

Ilyas, R. A., et al. (2022). "Natural-Fiber-Reinforced Chitosan, Chitosan Blends and Their Nanocomposites for Various Advanced Applications." Polymers **14**(5).

Josset, S., et al. (2014). "Energy consumption of the nanofibrillation of bleached pulp, wheat straw and recycled newspaper through a grinding process." Nordic Pulp & Paper Research Journal **29**(1): 167-175.

Kaur, K., et al. (2013). "Effect of different packaging materials and storage intervals on physical and biochemical characteristics of pear." J Food Sci Technol **50**(1): 147-152.

Kaya, M., et al. (2018). "Antioxidative and antimicrobial edible chitosan films blended with stem, leaf and seed extracts of Pistacia terebinthus for active food packaging." RSC Advances **8**(8): 3941-3950.

Kim, K. M., et al. (2006). "Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type." Journal of Food Science **71**(3): E119-E124.

Kou, X., et al. (2021). "Different regulatory mechanisms of plant hormones in the ripening of climacteric and non-climacteric fruits: a review." Plant Mol Biol **107**(6): 477-497.

Lamm, M. E., et al. (2022). "Exploiting chitosan to improve the interface of nanocellulose reinforced polymer composites." Cellulose **29**(7): 3859-3870.

Lavrič, G., et al. (2021). "Functional Nanocellulose, Alginate and Chitosan Nanocomposites Designed as Active Film Packaging Materials." Polymers **13**(15): 2523.

Lewandowska, K. and M. Szulc (2022). "Rheological and Film-Forming Properties of Chitosan Composites." International Journal of Molecular Sciences **23**: 8763.

Lee, S.-Y., et al. (2009). "Preparation of cellulose nanofibrils by high-pressure homogenizer and cellulose-based composite films." Journal of Industrial and Engineering Chemistry **15**(1): 50-55.

Li, J. and S. Zhuang (2020). "Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives." European Polymer Journal **138**.

Liu, K., et al. (2013). "Preparation of Microfibrillated Cellulose/Chitosan-Benzalkonium Chloride Biocomposite for Enhancing Antibacterium and Strength of Sodium Alginate Films." Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**(26): 6562-6567.

Martin, C. and B. Jean (2014). "Nanocellulose/polymer multilayered thin films: tunable architectures towards tailored physical properties." Nordic Pulp & Paper Research Journal **29**(1): 19-30.

Mauricio-Sánchez, R. A., et al. (2018). "FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning." Vibrational Spectroscopy **94**: 1-6.

Melro, E., et al. (2021). "Chitosan Films in Food Applications. Tuning Film Properties by Changing Acidic Dissolution Conditions." Polymers **13**(1): 1.

Messa, L. L. and R. Faez (2020). "Spray-dried chitosan/nanocellulose microparticles: synergistic effects for the sustained release of NPK fertilizer." Cellulose **27**(17): 10077-10093.

Michelin, M., et al. (2020). "Nanocellulose Production: Exploring the Enzymatic Route and Residues of Pulp and Paper Industry." Molecules **25**(15): 3411.

Motelica, L., et al. (2020). "Biodegradable Antimicrobial Food Packaging: Trends and Perspectives." Foods **9**(10).

Munim, S. A., et al. (2020). "Fabrication of cellulose-mediated chitosan adsorbent beads and their surface chemical characterization." Polymer Bulletin **77**(1): 183-196.

Nassar, M., et al. (2014). "Novel coating of bagasse paper sheets by gelatin and chitosan." *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 29: 741.

Nirmala, R., et al. (2011). "Preparation and characterizations of anisotropic chitosan nanofibers via electrospinning." *Macromolecular Research - MACROMOL RES* 19: 345-350.

Omer, A. M., et al. (2021). "pH-Sensitive Alginate/Carboxymethyl Chitosan/Aminated Chitosan Microcapsules for Efficient Encapsulation and Delivery of Diclofenac Sodium." *Pharmaceutics* 13(3).

Paul, V., et al. (2012). "The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene-An overview." *J Food Sci Technol* 49(1): 1-21.

Pirih, C., et al. (2020). "Disruptive enzyme-based strategies to isolate nanocelluloses: a review." *Cellulose* 27.

Pirozzi, A., et al. (2021). "The Use of Nanocellulose in Edible Coatings for the Preservation of Perishable Fruits and Vegetables." *Coatings* 11(8): 990.

Plomion, C., et al. (2002). "Wood Formation in Trees." *Plant physiology* 127: 1513-1523.

Prathapan, R., et al. (2016). "Modulating the zeta potential of cellulose nanocrystals using salts and surfactants." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 509: 11-18.

Rinaudo, M., et al. (1999). "Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan." *Polymer* 40(25): 7029-7032.

Satam, C. C., et al. (2018). "Spray-Coated Multilayer Cellulose Nanocrystal-Chitin Nanofiber Films for Barrier Applications." *Acs Sustainable Chemistry & Engineering* 6(8): 10637-10644.

Schmid, M., et al. (2012). "Properties of Whey-Protein-Coated Films and Laminates as Novel Recyclable Food Packaging Materials with Excellent Barrier Properties." International Journal of Polymer Science **7**.

Shanmugam, K., et al. (2017). "Rapid preparation of smooth nanocellulose films using spray coating." Cellulose **24**(7): 2669-2676.

Shanmugam, K., et al. (2018). "Flexible spray coating process for smooth nanocellulose film production." Cellulose **25**(3): 1725-1741.

Shanmugam, K., et al. (2020). "Engineering surface roughness of nanocellulose film via spraying to produce smooth substrates." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **589**.

Solberg, A., et al. (2023). "Material properties and water resistance of inorganic–organic polymer coated cellulose paper and nanopaper." Cellulose **30**(2): 1205-1223.

Solikhin, A., et al. (2018). "Morphological, chemical, and thermal characteristics of chitosan nanocomposite films reinforced with steam-exploded microfibrillated cellulose." Journal of the Indian Academy of Wood Science **15**(1): 68-79.

Sun, L. J., et al. (2018). "The preservative effects of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols on the quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during cold storage: Correlation between the preservative effects and the active properties of the film." Food Packaging and Shelf Life **17**: 1-10.

Thambiliyagodage, C., et al. (2023). "Recent Advances in Chitosan-Based Applications—A Review." Materials **16**: 2073.

Uysal Unalan, I., et al. (2016). "Graphene Oxide Bionanocomposite Coatings with High Oxygen Barrier Properties." Nanomaterials **6**: 244.

Varma, R. and S. Vasudevan (2020). "Extraction, Characterization, and Antimicrobial Activity of Chitosan from Horse Mussel *Modiolus modiolus*." ACS Omega **5**(32): 20224-20230.

Vilela, C., et al. (2019). "Antimicrobial and Conductive Nanocellulose-Based Films for Active and Intelligent Food Packaging." Nanomaterials **9**(7): 980.

Wang, L., et al. (2020). "Cellulose nanofibrils versus cellulose nanocrystals: Comparison of performance in flexible multilayer films for packaging applications." Food Packaging and Shelf Life **23**.

Wang, Q. Z., et al. (2006). "Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation." Carbohydrate Polymers **65**(2): 194-201.

Yadav, M., et al. (2020). "Cellulose Nanocrystal Reinforced Chitosan Based UV Barrier Composite Films for Sustainable Packaging." Polymers **12**(1): 202.

Yang, Y., et al. (2020). "Bio-based antimicrobial packaging from sugarcane bagasse nanocellulose/nisin hybrid films." Int J Biol Macromol **161**: 627-635.

Yaneva, Z., et al. (2020). "The 21st century revival of chitosan in service to bio-organic chemistry." Biotechnology & Biotechnological Equipment **34**: 221-237.

Yates, J., et al. (2021). "A systematic scoping review of environmental, food security and health impacts of food system plastics." Nature Food **2**(2): 80-87.

Zhang, Y., et al. (2019). "Preparation, Structure and Properties of Acid Aqueous Solution Plasticized Thermoplastic Chitosan." Polymers (Basel) **11**(5).

Zhang, W. L., et al. (2021). "Improving the performance of edible food packaging films by using nanocellulose as an additive." International Journal of Biological Macromolecules **166**: 288-296.