



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**FUNCIONALIZACIÓN QUÍMICA Y ENZIMÁTICA DE CELULOSA PARA EL
DESARROLLO DE UN BIOMATERIAL CON PROPIEDAD HIDROFÓBICA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de
Concepción para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología
Vegetal

POR: Sofía Elorza Navarro

Profesor Guía: Regis Teixeira Mendonça
Co Guía: Isidora Reyes González

Agosto, 2025

Concepción, Chile

© 2025, Sofía Elorza Navarro

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

FUNCIONALIZACIÓN QUÍMICA Y ENZIMÁTICA DE CELULOSA PARA EL
DESARROLLO DE UN BIOMATERIAL CON PROPIEDAD HIDROFÓBICA

Profesor Guía



Regis Teixeira Mendonça

Profesor Titular

Ing. Químico, Dr.

Co Guía



Isidora Reyes González

Colaboradora Externa

Ing. Biotecnología Vegetal, Ms.C.

Para Adela...

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis hermanos, que me apoyaron en todo lo posible para seguir adelante y contenerme cuando no pude.

A los amigos que fui conociendo durante esta etapa de formación.

A los profesionales del equipo CADE por darme herramientas para poder enfrentarme a distintas situaciones sociales.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Forestales, por dar el apoyo a sus estudiantes en diferentes instancias y dar consejos cuando uno lo necesitaba.

A todo el personal del Centro de Biotecnología y Laboratorio de Biopolímeros y Materiales Biobasados.

Al proyecto FONDECYT-ANID 1231086 por el financiamiento otorgado para el desarrollo de este tema de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
I. 1. Celulosa	2
I. 2. Hidrofilicidad de celulosa	4
I. 3. Acetilación química	5
I. 4. Acetilación enzimática	6
I. 5. Propuesta de investigación	9
I. HIPÓTESIS	10
I. OBJETIVO GENERAL	11
I. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
II. METODOLOGÍA	2
II. 2. Caracterizaciones de fibras de polimorfos de celulosa	3
II. 2.1. Viscosidad intrínseca para estimar el grado de polimerización de los polimorfos	3
II. 2.2. Solubilidad alcalina (S18)	3
II. 2.3. Microscopía SEM	3
II. 2.4. Fiber-Tester para análisis morfológico de las fibras	4
II. 2.5. Difracción de rayos X (XRD)	4
II. 3. Producción de fibras de celulosa acetilada	5
II. 3.1. Acetilación química	5

II. 3.2. Acetilación enzimática.....	6
II. 4. Caracterización de fibras de celulosa acetilada.....	7
II. 4.1. FTIR	7
II. 4.2. Capacidad de absorción de aceite para evaluar la hidrofobicidad.....	7
III. RESULTADOS	9
IV. CONCLUSIONES	22
V. GLOSARIO	23
VI. BIBLIOGRAFÍA	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Propiedades de polimorfos de celulosa I y II de eucalipto.....	10
Tabla 3.2 Índice de cristalinidad (CrI) y tamaño de cristal (L) de los polimorfos de celulosa I y II obtenidos tras tratamiento con NaOH	13

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1.1 Mecanismo de reacción de acetilación química de la celulosa (Sanz-Tejedor, s. f., Capítulo 3)	6
Figura 1.2 Mecanismo de reacción de acetilación enzimática (Božič et al., 2015).....	8
Figura 2.1 Esquema resumen de la metodología aplicada en esta investigación.	2
Figura 3.1 Micrografías SEM de celulosa I (a, b) y celulosa II (c, d).	11
Figura 3.2 Gráfico XRD para el tratamiento de celulosa I (CI) y celulosa II (CII).	12
Figura 3.3 FTIR de acetilación química con los valores en transmitancia, con los peaks de 3340cm ⁻¹ , 1720cm ⁻¹ y 1240cm ⁻¹ indicados.	16
Figura 3.4 FTIR de acetilación enzimática con los valores en transmitancia, con los peaks de 3340cm ⁻¹ , 1720cm ⁻¹ y 1240cm ⁻¹ indicados.....	16
Figura 3.5 Análisis semi-cuantitativo a partir del FTIR para acetilación química.	18
Figura 3.6 Análisis semi-cuantitativo a partir del FTIR para acetilación enzimática.....	18
Figura 3.7 Gráfico del porcentaje de absorción con las muestras de acetilación química.	21

Figura 3.8 Gráfico del porcentaje de absorción con las muestras de acetilación
enzimática..... 21

RESUMEN

La hidrofiliidad de la celulosa limita sus aplicaciones industriales que requieran propiedades hidrofóbicas. En este trabajo, se evaluó comparativamente la hidrofobización de polimorfos I y II de celulosa de pulpa de eucalipto mediante acetilación química y enzimática. Los polimorfos son estructuras cristalinas distintas, siendo celulosa I con ordenamiento de cadenas paralelo respecto al terminal reductor y la celulosa II con ordenamiento antiparalelo de las cadenas. Los polimorfos se prepararon tratando la pulpa con NaOH (7% m/v para celulosa I, 20% m/v para celulosa II) y se caracterizaron mediante SEM, XRD y FTIR. Para la acetilación química, se empleó anhídrido acético/ácido sulfúrico, mientras que la enzimática utilizó lipasa (con una actividad enzimática de 5,2 U/mg) en DMSO/buffer fosfato. La hidrofobicidad de las fibras obtenidas fue determinada por el grado de acetilación (GA) y capacidad de absorción de aceites (OAC). Los resultados mostraron que la celulosa II presentó un mayor grado de sustitución (GA máximo: 1,1 en 8 h de reacción vs. 0,9 en 24 h de reacción para celulosa I), así como mayor capacidad de absorción de aceite (OAC 85,2% vs. 70,1%), además de menor índice de cristalinidad (38,5% vs. 58,6%) y morfología observada por SEM (estructura porosa con fibras rizadas y desorganizadas vs. fibras planas y compactas en celulosa I). La acetilación enzimática demostró mayor grado de acetilación en menor tiempo de reacción que la acetilación química (GA $\geq 1,0$ en 2-8 h vs. 8-24 h en química). Se

concluye que la selección del polimorfo y el método de acetilación son determinantes para las propiedades finales del biomaterial, destacando el potencial de la celulosa II modificada enzimáticamente para aplicaciones como adsorbente de lípidos y posiblemente de hidrocarburos.

ABSTRACT

The hydrophilicity of cellulose limits its industrial applications that require hydrophobic properties. This study comparatively evaluated the hydrophobization of cellulose polymorphs I and II from eucalyptus pulp through chemical and enzymatic acetylation. Polymorphs are distinct crystalline structures: cellulose I has a parallel chain arrangement with respect to the reducing end, whereas cellulose II has an antiparallel chain arrangement. The polymorphs were prepared by treating the pulp with NaOH (7% w/v for cellulose I, 20% w/v for cellulose II) and characterized by SEM, XRD, and FTIR. For chemical acetylation, acetic anhydride/sulfuric acid was used, while enzymatic acetylation employed lipase (with an enzymatic activity of 5.2 U/mg) in DMSO/phosphate buffer. The hydrophobicity of the obtained fibers was determined by the degree of acetylation (DA) and oil absorption capacity (OAC). The results showed that cellulose II exhibited a higher degree of substitution (maximum DA: 1.1 after 8 h of reaction vs. 0.9 after 24 h for cellulose I), as well as greater oil absorption capacity (OAC 85.2% vs. 70.1%), along with a lower crystallinity index (38.5% vs. 58.6%) and a morphology observed by SEM (porous structure with curly and disorganized fibers vs. flat and compact fibers in cellulose I). Enzymatic acetylation demonstrated a higher degree of acetylation in less reaction time than chemical acetylation (DA \geq 1.0 in 2-8 h vs. 8-24 h for chemical). It is concluded that the selection of polymorph and the acetylation

method are decisive for the final properties of the biomaterial, highlighting the potential of enzymatically modified cellulose II for applications as a lipid adsorbent and possibly for hydrocarbons.

I. INTRODUCCIÓN

La celulosa es un material versátil con amplias aplicaciones, principalmente en la industria de papeles y cartones, pero que también puede generar otros productos, como excipientes de medicamentos, fabricación de textiles (rayón/viscosa), revestimientos, películas autoadhesivas y, debido a sus prometedoras propiedades mecánicas y de barrera, cartones en el envasado de alimentos (Samyn, 2013; Aziz et al., 2022). Sin embargo, la hidrofiliidad de la celulosa, causada por la gran cantidad de grupos hidroxilo en sus cadenas moleculares, limita algunas de estas aplicaciones (Etale et al., 2023). Existen métodos para modificar la celulosa y conferirle características hidrofóbicas, como la esterificación, y en particular, la acetilación (Liu et al., 2023). El acetato de celulosa, un producto conocido desde 1865, se obtiene al sustituir parte de los grupos OH de la celulosa por grupos acetilo, y tiene aplicaciones en plásticos, filtros para cigarrillos, rollos fotográficos, ósmosis inversa, nanofiltración, entre otros (Vatanpour et al., 2022).

Una alternativa biotecnológica para la hidrofobización de la celulosa es el uso de enzimas, como por ejemplo la lipasa. Igualmente, este tipo de reacción podría influir por la existencia de polimorfos en la estructura supramolecular de la celulosa (Heinze, 2015). Estos polimorfos podrían presentar diferente reactividad y funcionalidad que darían características diferenciadoras cuando

son usados en reacciones enzimáticas. Los principales antecedentes que fundamentan esta propuesta se describen a continuación.

1.1 Celulosa

La celulosa es un homopolisacárido no ramificado, que comprende largas cadenas de β -d-glucopiranosas unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ glucosídicos (Etale et al., 2023). Es el polímero natural más abundante en la biosfera, siendo un importante componente estructural de la pared celular primaria de las plantas verdes, muchas formas de algas y los oomicetos (Aziz et al., 2022). Aunque puede estar en estado puro, suele ir acompañada de hemicelulosas, ligninas y cantidades comparativamente menores de extractos (Heinze, 2015).

La compleja estructura multinivel de la celulosa está compuesta por haces o agregados de fibrillas ultrafinas en las que las distintas cadenas de celulosa están presentes en la fibrilla superfina y cada una de las fibrillas está formada por grandes zonas ordenadas llamadas regiones cristalinas y pequeñas zonas desordenadas conocidas como regiones amorfas (Abolore et al., 2024). La celulosa, debido a la presencia de múltiples grupos hidroxilo en su estructura, es capaz de formar una extensa red de enlaces de hidrógeno tanto intra como intermoleculares. Esta característica es fundamental para la formación de microfibrillas rígidas e insolubles, que son las unidades estructurales básicas de las fibras vegetales (Béguin & Aubert, 1994). La versatilidad de los enlaces de

hidrógeno permite una amplia variedad de disposiciones cristalinas, lo que explica el polimorfismo de la celulosa y su capacidad para formar estructuras altamente ordenadas (Pérez & Samain, 2010). Se han identificado cuatro polimorfos principales de la celulosa: los tipos I, II, III y IV, siendo la celulosa I la estructura cristalina básica que se encuentra en una gran variedad de fibras celulósicas (Pérez & Samain, 2010; de Souza et al., 2020).

La celulosa II exhibe una mayor amorfidad y un índice de cristalinidad menor que la celulosa I, además de una mayor accesibilidad debido a un mayor espaciamiento interfibrilar y una red de enlaces de hidrógeno más extensa (de Souza et al., 2020). La conversión de biomasa celulósica en celulosa II puede lograrse mediante tratamientos con álcali, como el hidróxido de sodio (Potenza et al., 2022).

La pulpa kraft blanqueada de eucalipto (BEKP) se destaca por su versatilidad y eficiencia. Derivada de una madera de rápido crecimiento y bajo costo (Campinhos, 1999), la BEKP presenta características únicas que la hacen ideal para diversas aplicaciones, especialmente en productos basados en fibras secas. Su alta viscosidad, fibras cortas y contenido de xilanos carboxilados favorecen la formación de redes fibrosas altamente absorbentes y resistentes (Rebola et al., 2020). Estas propiedades, combinadas con su creciente disponibilidad y menor consumo energético en comparación con otras pulpas

(Tonoli et al., 2012), han posicionado a la BEKP como una materia prima fundamental en la industria papelera.

1.2 Hidrofilicidad de celulosa

La celulosa es conocida por su buena interacción con el agua, debido a la gran cantidad de grupos hidroxilo que presenta en los carbonos C2, C3 y C6 de su cadena (Etale et al., 2023). La naturaleza intrínsecamente hidrofílica de la celulosa la hace susceptible a la adsorción de agua y humedad. En estado hinchado, la pared celular de las fibras de papel presenta una alta hidratación, donde el agua forma una matriz amorfa que alberga las hemicelulosas y la lignina. Estas macromoléculas, junto con las microfibrillas de celulosa, conforman una red compleja que define las propiedades mecánicas y de absorción de la fibra (Samyn, 2013).

La reactividad de los grupos hidroxilo de la celulosa, determinada por su microestructura, condiciona su interacción con diversos medios. En el proceso de acetilación, la celulosa reacciona con anhídrido acético en presencia de un catalizador ácido, dando lugar al triacetato de celulosa. La elección del método de acetilación (heterogéneo u homogéneo) y del disolvente activador influye en la eficiencia y la distribución de los grupos acetilo en la cadena polimérica (Samyn, 2013; Shaikh et al., 2022).

1.3 Acetilación química

Una de las reacciones comerciales más exitosas es la acetilación, comúnmente empleada para modificar este compuesto, ya sea a nivel industrial para la producción de acetatos de celulosa o en el ámbito de laboratorio con propósitos analíticos o de síntesis (Potthast et al., 2022), la cual típicamente se lleva a cabo empleando anhídrido y ácido acéticos, utilizando ácido sulfúrico como catalizador (Koso et al., 2022). En esta reacción puede ocurrir la completa esterificación de los tres hidroxilos de la anhidro-D-glucosa cuando se lleva a cabo en una fase homogénea, por lo tanto, se basaría en una reacción entre los grupos hidroxilos con los grupos acetilos (Ashori et al., 2014). Este método ha demostrado producir principalmente triacetato de celulosa (Koso et al., 2022).

El mecanismo de reacción de la acetilación química utilizando ácido sulfúrico (Fig. 1) como catalizador puede describirse de la siguiente manera: primero, el ácido sulfúrico reacciona con el anhídrido, formando un producto intermedio conocido como ácido acetil sulfúrico. Posteriormente, este ácido acetil sulfúrico reacciona con la celulosa (Meng et al., 2017). Al reemplazar los grupos hidroxilo presentes en los carbonos 2, 3 y 6 por grupos acetato (Etale et al., 2023), se modifica la estructura de la celulosa, otorgándole al acetato de celulosa propiedades hidrofóbicas.

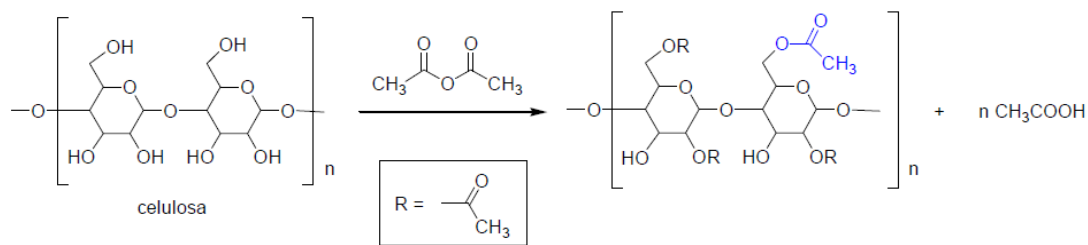


Figura 1.1 Mecanismo de reacción de acetilación química de la celulosa (Sanz-Tejedor, s. f., Capítulo 3)

1.4 Acetilación enzimática

Las enzimas son consideradas como catalizadores naturales. La mayoría de las enzimas utilizadas actualmente se producen por fermentación de materiales biológicos (Hasan et al., 2006). Al seleccionar la enzima adecuada, es posible controlar la producción de productos específicos y minimizar las reacciones secundarias no deseadas, gracias a la especificidad de las enzimas presentes en la corriente residual (Gremos et al., 2011).

Las lipasas son enzimas hidrolíticas ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en animales, plantas y, sobre todo, en microorganismos, como bacterias, hongos y levaduras (Salazar Carranza et al., 2020). Existen notables diferencias en las propiedades y funciones de estas enzimas según su origen.

Las lipasas de origen animal, como la lipasa pancreática humana o porcina, suelen participar predominantemente en la digestión de grasas. Se caracterizan por una alta especificidad hacia triglicéridos y por operar bajo condiciones fisiológicas específicas de pH y temperatura (Mukherjee, 2003).

Por su parte, las lipasas de origen vegetal predominan en tejidos de reserva, donde actúan durante la movilización de lípidos en procesos como la germinación. Suelen ser funcionales en un rango de pH más amplio que las animales, pero presentan una menor variedad catalítica en comparación con las de origen microbiano (Rodrigues dos Santos et al., 2022).

En contraste, las lipasas de origen microbiano son extremadamente versátiles. Exhiben una notable resistencia a solventes orgánicos y a variables de temperatura y pH, además de mostrar una mayor diversidad de sustratos y tipos de reacciones que pueden catalizar, incluyendo hidrólisis, síntesis y transesterificación (Salazar Carranza et al., 2020). Precisamente debido a esta robustez y diversidad catalítica, sumada a su fácil producción extracelular, las lipasas microbianas son las más empleadas a nivel industrial (Aceves & Castañeda, 2012).

Una aplicación biotecnológica emblemática de esta versatilidad es la acetilación enzimática de celulosa. Esta estrategia utiliza lipasas, típicamente derivadas de microorganismos, para modificar la estructura y funcionalidad de la celulosa mediante la introducción selectiva de grupos acetilo en su cadena polimérica bajo condiciones suaves de reacción (Yang & Wang, 2003).

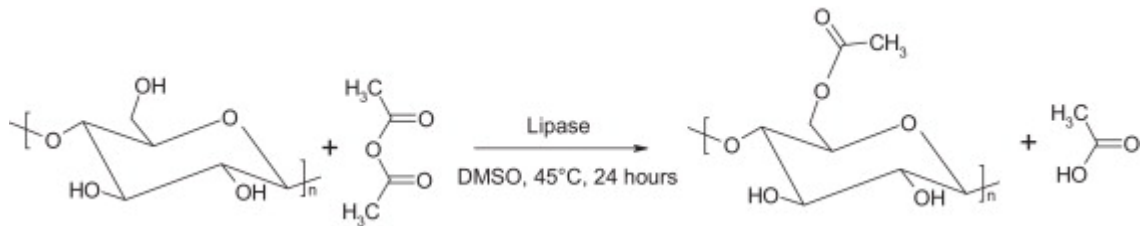


Figura 1.2 Mecanismo de reacción de acetilación enzimática (Božič et al., 2015)

En primer lugar, el grupo hidroxilo del residuo de serina situado en el centro activo de la enzima fue acetilado por el anhídrido acético activado, y siguió el ataque nucleofílico del otro sustrato con grupos nucleofílicos (por ejemplo, hidroxilos), como la celulosa, que en este caso actuó como aceptor de acetilo (Božič et al., 2015).

Los estudios demuestran que la elección de la enzima es crítica para el éxito del proceso. Entre 11 lipasas comerciales evaluadas, la lipasa A12 de *Aspergillus niger* se ha identificado como la más eficaz para catalizar la acetilación de celulosa (Yang & Wang, 2003). La eficacia de esta lipasa en particular no solo se atribuye a su actividad transferasa, sino también a una actividad secundaria tipo celulasa que facilita una degradación parcial del sustrato. Este proceso mejora significativamente la accesibilidad de los grupos hidroxilo de la celulosa, permitiendo una modificación más eficiente (Yang et al., 2004).

Asimismo, la naturaleza del medio de reacción ejerce una influencia determinante en el rendimiento del proceso. Mientras que en medio acuoso se

alcanzan rendimientos de acetilación relativamente bajos (~0.16%), el uso de sistemas orgánicos, específicamente una mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO) y paraformaldehído, incrementa notablemente el rendimiento hasta valores del 7.87% (Yang & Wang, 2003; Božič et al., 2015). Esta mejora sustancial se explica por la mayor solubilidad de la celulosa en este medio y la reducción de la competencia por el agua, lo que favorece cinéticamente la reacción de transferencia del grupo acetilo sobre la de hidrólisis (Božič et al., 2015).

1.5 Propuesta de investigación

La celulosa, un biopolímero fundamental en las plantas, existe en diferentes estructuras cristalinas o polimorfos (principalmente I y II). Su naturaleza hidrofílica, inherente a la abundancia de grupos hidroxilo, varía intrínsecamente según la organización de cada polimorfo y la accesibilidad de dichos grupos. Si bien la celulosa I es la forma nativa y comúnmente menos reactiva, la celulosa II, con su estructura cristalina más abierta y un mayor número de enlaces de hidrógeno intramoleculares, suele ser más accesible y, por ende, potencialmente más reactiva a modificaciones.

La acetilación, proceso mediante el cual se introducen grupos acetato en la estructura molecular de la celulosa, es una estrategia efectiva para modificar su superficie y conferirle propiedades hidrofóbicas. Esta modificación expande significativamente su potencial de aplicación en diversas áreas, como

biomateriales, textiles, empaques avanzados y productos farmacéuticos. Tradicionalmente, la acetilación se ha llevado a cabo mediante métodos químicos que, aunque efectivos, a menudo presentan limitaciones relacionadas con la eficiencia, el uso de reactivos tóxicos y la generación de residuos.

En este contexto, la acetilación enzimática emerge como una alternativa prometedora. Este método emplea enzimas, como la lipasa, para catalizar la reacción de forma más selectiva y en condiciones más suaves, lo que se traduce en una mayor eficiencia. Es fundamental comparar ambos enfoques (químico y enzimático) no solo en su capacidad de hidrofobización, sino también en cómo cada polimorfo de celulosa (I y II) responde a la modificación, lo cual podría influir en el grado de sustitución y, por ende, en el nivel final de hidrofobicidad. Adicionalmente, dado que un aumento en la hidrofobicidad superficial a menudo se correlaciona con una mayor afinidad por sustancias no polares, se explorará la capacidad de absorción de aceite de los biomateriales resultantes como un indicador complementario de su funcionalización exitosa.

HIPÓTESIS

La acetilación enzimática con lipasa B de los polimorfos de celulosa de eucalipto será más eficiente (mayor grado de acetilación por unidad de tiempo) que la acetilación química, resultando en biomateriales con superiores propiedades hidrofóbicas. Se espera que la celulosa II, debido a su mayor

accesibilidad estructural (menor cristalinidad y morfología porosa), exhiba un grado de sustitución significativamente más alto en ambos procesos en comparación con la celulosa I, lo que se traducirá en un material hidrofóbico con buena absorción de aceite.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar comparativamente el proceso de hidrofobización de polimorfos de celulosa I y II de eucalipto a través de métodos de acetilación química y enzimática con lipasa, determinando la influencia de la estructura polimórfica en la eficiencia de las reacciones y la consecuente capacidad de absorción de aceite de los biomateriales resultantes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar los polimorfos de celulosa I y II de eucalipto,
2. Realizar acetilación química y enzimática.
3. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los biomateriales de celulosa acetilados.
4. Evaluar comparativamente la eficiencia de la acetilación química y enzimática en función del grado de acetilación y las propiedades hidrofóbicas obtenidas para los polimorfos de celulosa I y II.

II. METODOLOGÍA

El esquema metodológico general se muestra en la Fig. 3. El cual se divide en la producción de polimorfos, acetilación química y enzimática, y luego en su caracterización. A continuación, se detallará cada proceso.

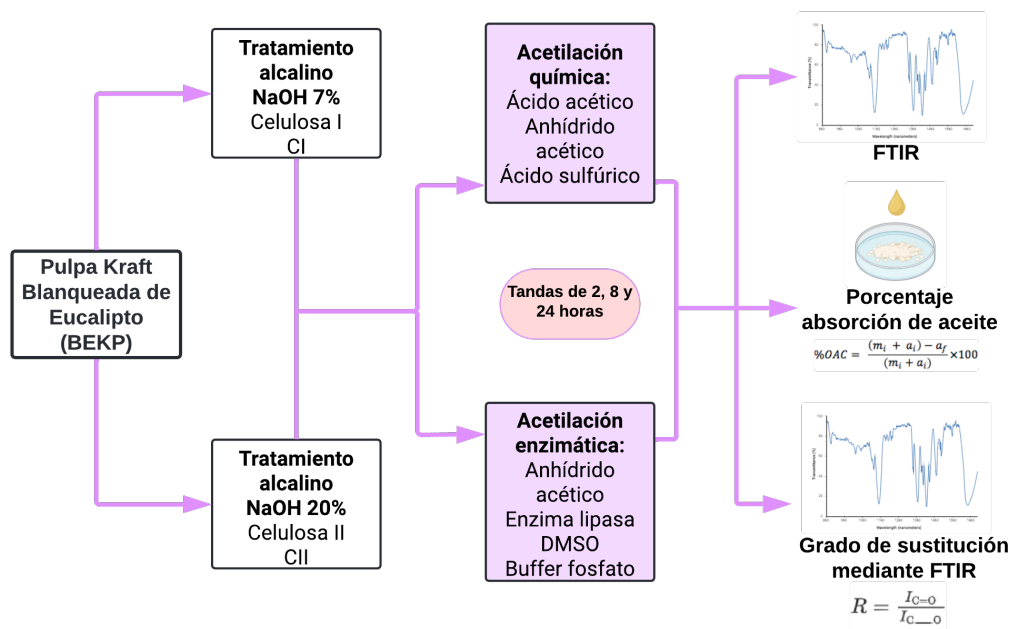


Figura 2.1 Esquema resumen de la metodología aplicada en esta investigación.

2.1 Producción de polimorfos de celulosa

Para la obtención de celulosa I y celulosa II, se emplearon extracciones alcalinas en frío con hidróxido de sodio a diferentes concentraciones (7% m/v y 20% m/v, respectivamente). La suspensión de celulosa de eucalipto se ajustó a una consistencia del 10% m/v. Las muestras se incubaron en baño de agua a

30°C durante una hora, luego se filtraron y lavaron exhaustivamente con agua hasta alcanzar un pH de 5,5. Se caracterizaron las muestras mediante viscosidad intrínseca, S18 (solubilidad alcalina), microscopía SEM, fiber tester y XRD para confirmar la presencia de los diferentes polimorfos celulósicos según la metodología descrita por Reyes-González et al. (2024).

2.2 Caracterizaciones de fibras de polimorfos de celulosa

2.2.1 Viscosidad intrínseca para estimar el grado de polimerización de los polimorfos

Se calculó mediante el método del viscosímetro capilar empleando cuprietilendiamina como disolvente, acorde con la norma ISO 5352:2010.

2.2.2 Solubilidad alcalina (S18)

Bajo la norma TAPPI T235 cm-09, la pulpa se pretrató con una solución acuosa de hidróxido de sodio al 18% m/v a 25 °C durante 60 minutos. Luego de la filtración, el filtrado alcalino se oxidó con dicromato de potasio y se tituló con sulfato ferroso amónico.

2.2.3 Microscopía SEM

Las muestras de pulpa fueron sometidas a un proceso de metalización con oro durante 60 segundos para conferirles conductividad eléctrica. Posteriormente,

se obtuvieron las micrografías a un aumento de 700x utilizando un microscopio electrónico de barrido conectado a un sistema de adquisición de imágenes.

2.2.4 Fiber-Tester para análisis morfológico de las fibras

Se empleó un L&W Fiber-Tester para analizar un mínimo de 35000 fibras por muestra y determinar su longitud media, ancho y contenido de finos (partículas menores a 200 µm).

2.2.5. Difracción de rayos X (XRD)

Se realizó XRD utilizando la metodología descrita por Reyes-González et al. (2024), se obtuvieron difractogramas de rayos X de muestras de celulosa I y II liofilizadas (50 mg) en un equipo Endeavor D4, utilizando radiación Cu K α y un paso de barrido de 0,02°. Se realizó un ajuste de perfil de Rietveld con funciones gaussianas y corrección de fondo para calcular el índice de cristalinidad a partir del área de los picos cristalinos. El índice de cristalinidad aparente por XRD (CrI) de las muestras se calculó a partir de las áreas deconvueltas utilizando la siguiente fórmula (1) (Park et al., 2010).

$$(1) CrI (\%) = \frac{A_{crist}}{A_{total}} \times 100$$

Donde A_{crist} es la suma de las áreas de las bandas cristalinas y A_{total} es el área total del difractograma.

Se calculó la suma de las áreas de todos los picos asociados a la celulosa I (ΣA_{CI}) y a la celulosa II (ΣA_{CII}) en los difractogramas de rayos X. A partir de estos valores, se determinaron los porcentajes relativos de ambas fases cristalinas utilizando las ecuaciones (2) y (3) (Carrillo-Varela et al., 2018).

$$(2) \text{ Celulosa I (\%)} = \frac{\sum A_{CI}}{\sum A_{CI} + A_{CII}} \times CrI$$

$$(3) \text{ Celulosa II (\%)} = \frac{\sum A_{CII}}{\sum A_{CI} + A_{CII}} \times CrI$$

A través de la ecuación (4) de Scherrer, se obtuvo el tamaño de los cristalitos (L).

$$(4) L = \frac{\kappa \times \lambda}{\beta \times \cos \theta}$$

2.3 Producción de fibras de celulosa acetilada

2.3.1 Acetilación química

Siguiendo el protocolo de Shaikh (2022), se pesaron 2,5 g seco de celulosa y se

introdujeron en un vaso precipitado. A continuación, se adicionaron 62,5 mL de ácido acético glacial, y la mezcla se enfrió a una temperatura entre 0 y 5 °C. Se agitó continuamente durante una hora. Posteriormente, se añadieron 18,75 mL de anhídrido acético y 0,25 mL de ácido sulfúrico concentrado como catalizador. La mezcla de reacción se mantuvo a 30 °C durante una hora bajo agitación constante.

Para evaluar el efecto del tiempo de reacción, se mantuvieron las muestras a temperatura ambiente bajo agitación continua durante diferentes períodos: 2 horas, 8 horas y 24 horas. Una hora antes de finalizar cada tiempo de reacción, se adicionó una solución de 0,125 g de acetato de sodio en 2,5 mL de ácido acético glacial para neutralizar cualquier grupo sulfito residual.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción deseado, cada muestra se vertió en 500 mL de agua destilada. Después de un período de reposo, el producto sólido se filtró y lavó exhaustivamente con acetona hasta alcanzar un pH de 5 y eliminar el olor característico de los reactivos.

2.3.2 Acetilación enzimática

De acuerdo con Božič et al. (2015), se prepararon mezclas de reacción pesando 0,5 g de muestras secas y agregando una solución de DMSO al 90%

v/v con un 10% v/v de buffer fosfato que contenía 0,12g de la enzima lipasa con una actividad de 5,2U/mg. A continuación, se adicionó anhídrido acético 6 M. Estas mezclas se incubaron a 50°C y 130 rpm durante 2, 8, y 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, las mezclas se centrifugaron por 5 minutos a 5000rpm para eliminar el exceso de anhídrido. Posteriormente, se adicionó agua y se sometieron a ebullición con el fin de inactivar la enzima. Tras una nueva centrifugación, se procedió a lavar el precipitado con acetona.

2.4 Caracterización de fibras de celulosa acetilada

2.4.1 FTIR

Se realizó el FTIR con fibras secas de los polimorfos acetilados con tratamiento químico y enzimático. Las doce muestras fueron escaneadas en el intervalo de 4000–400 cm^{-1} para identificar los grupos acetilos presentes.

2.4.2 Capacidad de absorción de aceite para evaluar la hidrofobicidad

Se adaptó el procedimiento reportado por Paiva et al. (2023). Inicialmente, se pesó aproximadamente 0,05 g de la muestra seca y prensada, la cual fue colocada en una placa Petri. Posteriormente, se adicionaron 50 μL de aceite y se dejó reposar la mezcla durante 10 minutos. Finalmente, se determinó la masa total de la muestra junto con el aceite que no fue absorbido y permaneció en la placa Petri. Se calculó el porcentaje bajo la siguiente fórmula.

$$(5) \%OAC = \frac{(m_i + a_i) - a_f}{(m_i + a_i)} \times 100$$

Donde m_i representa la masa inicial de la muestra, a_i corresponde a la masa de aceite adicionado, y a_f es la masa de aceite que no fue absorbido y permaneció en la placa Petri.

III. RESULTADOS

3.1.1 Obtención de polimorfos

Se observó que la celulosa I presentó un valor de solubilidad alcalina (S_{18}) significativamente mayor que el de la celulosa II. Esto sugiere una mayor presencia de hemicelulosas y otros componentes solubles en álcali en la celulosa I, lo que podría estar relacionado con diferencias en la cristalinidad debido al pretratamiento aplicado. Estos resultados coinciden con los reportados por Fechter et al. (2020) en su estudio sobre pulpas de madera, donde se observó que concentraciones más altas de NaOH durante la mercerización reducían la solubilidad alcalina. En particular, los resultados obtenidos con el pretratamiento de la celulosa II concuerdan con su hallazgo de que concentraciones elevadas de álcali (18-20%) favorecen la transformación a celulosa II, una forma más estable químicamente.

Por otro lado, la viscosidad intrínseca de la celulosa I fue superior a la de la celulosa II. Dicha tendencia también fue reportada por Fechter et al. (2020), quienes determinaron que la mercerización, bajo condiciones controladas, no afecta significativamente el grado de polimerización.

Finalmente, el análisis morfológico mostró que las fibras de celulosa I presentan una mayor longitud en comparación con las de celulosa II, mientras que el ancho se mantuvo relativamente constante.

Tabla 3.1 Propiedades de polimorfos de celulosa I y II de eucalipto

Muestra	S ₁₈ (%)	Viscosidad intrínseca (mL/g)	Largo de fibras (mm)	Ancho de fibras (μm)
C I	2,36 ± 0,04	710 ± 2	0,6885 ± 0,0007	17,4 ± 0
C II	1,11 ± 0,05	632 ± 8	0,622 ± 0,006	1,9 ± 0,1

3.1.2 Microscopía SEM

Las micrográficas de la celulosa I revelan una red densa y entrelazada de fibras, las cuales, a 700x (fig 5 b), se observan constituidas por microfibrillas individuales con morfología de cinta plana. Estas presentan un empaquetamiento compacto, lo que confiere al material una estructura rígida y uniforme. Por el contrario, la celulosa II exhibe un comportamiento morfológico distinto, a 100x (fig 5 c), su red de fibras aparece más distendida y menos consolidada, y al aumentar a 700x (fig 5 d), las microfibrillas pierden su forma de cinta para adoptar una disposición más enrollada y cilíndrica, con orientación desordenada que genera una apariencia porosa. Este fenómeno coincide con lo reportado por Huang et al. (2022) para celulosa de algodón, donde la celulosa I mostró fibras lisas y planas, mientras que la celulosa II presentó superficies

estriadas y estructuras torsionadas, evidenciando así la transición desde una morfología ordenada hacia una configuración tridimensional irregular.

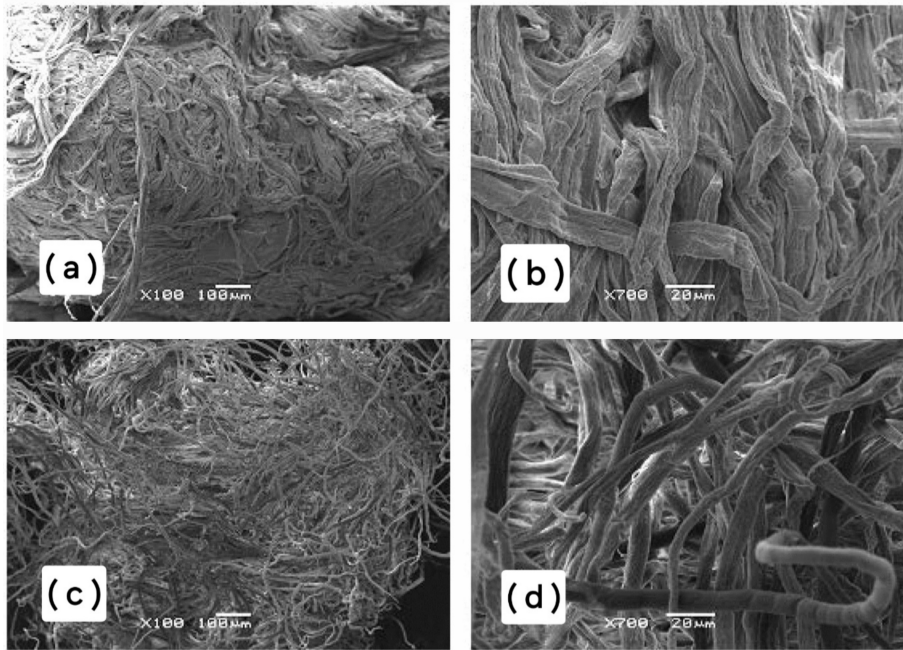


Figura 3.1 Micrografías SEM de celulosa I (a, b) y celulosa II (c, d).

3.1.3 Difracción de rayos X (XRD)

El análisis de difracción de rayos X de la muestra CI revela peaks prominentes en 15° y 22° , confirmando la preservación de su estructura cristalina característica de la celulosa I. Estos resultados concuerdan completamente con los patrones reportados en la literatura para este polimorfo (Çetin et al., 2009; Ashori et al., 2014), donde se identifican peaks característicos entre 14° - 16° , 22° y 34° para la celulosa nativa.

Por el contrario, el patrón de difracción de la muestra CII muestra una transformación estructural significativa: desaparecen los peaks característicos de la celulosa I y emergen nuevos peaks en 12° y $20,5^\circ$. Este cambio morfológico demuestra la conversión exitosa a celulosa II mediante el tratamiento con NaOH al 20% m/v, resultado que se corrobora con estudios recientes que emplearon metodologías similares.

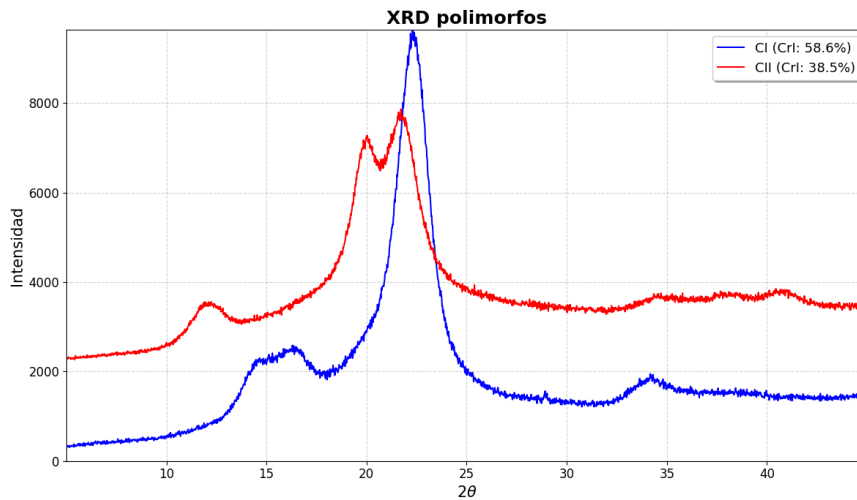


Figura 3.2 Gráfico XRD para el tratamiento de celulosa I (CI) y celulosa II (CII).

Para la celulosa I, el índice de cristalinidad (Crl) (tabla 2) obtenido fue menor al valor típicamente alto reportado por Nam et al. (2016). Esta diferencia refleja el impacto del origen de la celulosa y del tratamiento con NaOH al 7%, que promueve cierta desorganización en la estructura cristalina.

Con el tratamiento para obtener celulosa II, el Crl disminuyó significativamente, confirmando la reorganización de la estructura cristalina hacia dominios más

pequeños y menos ordenados. Dicha reducción también fue reportada por Nam et al. (2016), la cual fue más notoria debido a la diferencia en la materia prima. En cuanto al tamaño de los cristales, se observa una reducción al comparar CII con CI, esta reducción confirma la desorganización parcial de la estructura durante el proceso de conversión, ya que los cristales originales se desordenan y se vuelven a formar en una nueva estructura con dominios cristalinos más pequeños.

Tabla 3.2 Índice de cristalinidad (CrI) y tamaño de cristal (L) de los polimorfos de celulosa I y II obtenidos tras tratamiento con NaOH

Muestra	Tratamiento NaOH	Índice de Cristalinidad (CrI, %)	Tamaño de Cristal (L, nm)
CI	7% m/v	58,64 ± 4,14151	4,99398 ± 0,42563
CII	20% m/v	38,52 ± 0,36533	4,6623 ± 0,00461

3.2.1 Acetilación química y enzimática

En los espectros FTIR de las muestras de celulosa, tanto en la acetilación química (fig 7) como en la enzimática (fig 8), se observaron cambios consistentes que confirman la reacción. La comparación de las muestras tratadas con los controles (CT) mostró una disminución en la intensidad del

peak de 3340 cm^{-1} , lo que indica que los grupos hidroxilo de la celulosa fueron reemplazados por grupos acetilo.

Además, se evidenció un aumento en la intensidad de los peaks de 1720 cm^{-1} , que es la formación de grupos carbonilo C=O de los acetilos, y 1240 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento C-O de los grupos éster. Estos cambios son prueba de la acetilación.

El análisis del peak en 1720 cm^{-1} en ambas metodologías reveló que su intensidad varía según el tiempo de reacción, siendo las muestras de celulosa II las que presentaron un mayor grado de acetilación en esa longitud de onda, lo que sugiere una mayor facilidad de reacción para este tipo de polimorfo.

Al analizar los resultados obtenidos, tanto para la acetilación química como para la enzimática de celulosa, se observa una fuerte concordancia con los estudios de Ashori et al. (2014) y Schmidt et al. (2019), quienes emplearon metodologías químicas. La presencia de nuevos peaks en los espectros FTIR, específicamente el aumento en la intensidad de las bandas de 1720 cm^{-1} , atribuida al estiramiento del grupo carbonilo C=O, y 1240 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento del grupo éster C-O, se alinea con los hallazgos de Ashori et al., que fueron en los peaks de 1737 cm^{-1} y 1244 cm^{-1} y Schmidt et al., con sus peaks de 1750 cm^{-1} y 1240 cm^{-1} , lo que valida la formación de enlaces éster y confirma la acetilación exitosa.

Asimismo, la disminución de la banda ancha de estiramiento del grupo hidroxilo (-OH), que se observó en ambas acetilaciones a 3340 cm^{-1} , concuerda con la

reducción reportada por Ashori et al. (2014) en 3426 cm^{-1} . Este cambio fundamental demuestra que los grupos hidroxilo de la celulosa son efectivamente sustituidos por los grupos acetilo durante la reacción.

Por otro lado, al comparar el resultado de acetilación enzimática con el estudio de Božič et al. (2015), surgen diferencias cruciales en la interpretación de los peaks. Si bien ellos también observaron una banda entre $1720\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$ y una disminución de la banda de OH, la ausencia de la banda en 1240 cm^{-1} en sus espectros los llevó a concluir que la banda en 1725 cm^{-1} se debía a la formación de ácido acético como subproducto y no a los enlaces éster. Esta discrepancia es significativa, ya que la presencia de los peaks en 1720 cm^{-1} y 1240 cm^{-1} en el resultado mostrado (fig 8), en contraste con la falta del peak en 1240 cm^{-1} en el estudio de Božič et al. (2015), sugiere que las condiciones experimentales empleadas en nuestro laboratorio fueron más efectivas para lograr la formación de los enlaces éster esperados.

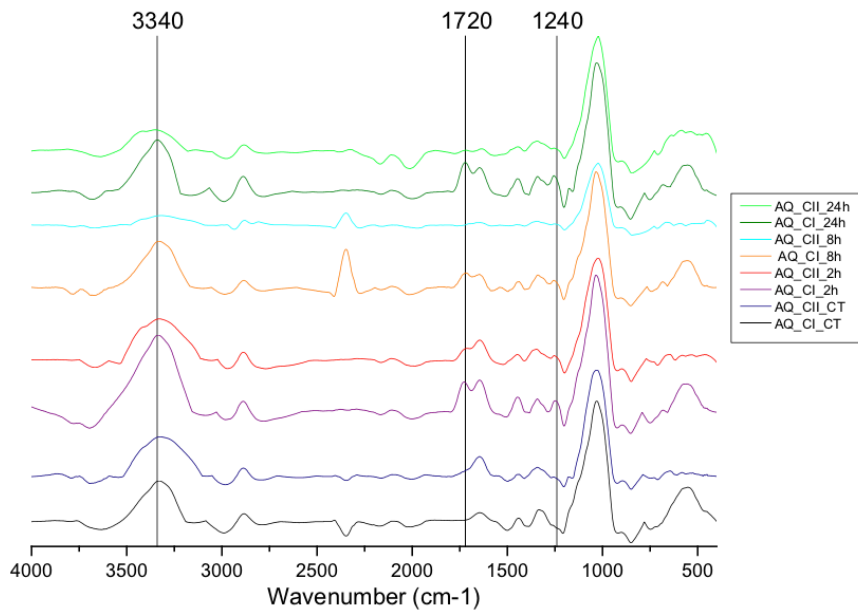


Figura 3.3 FTIR de acetilación química con los valores en transmitancia, con los peaks de 3340cm-1, 1720cm-1 y 1240cm-1 indicados.

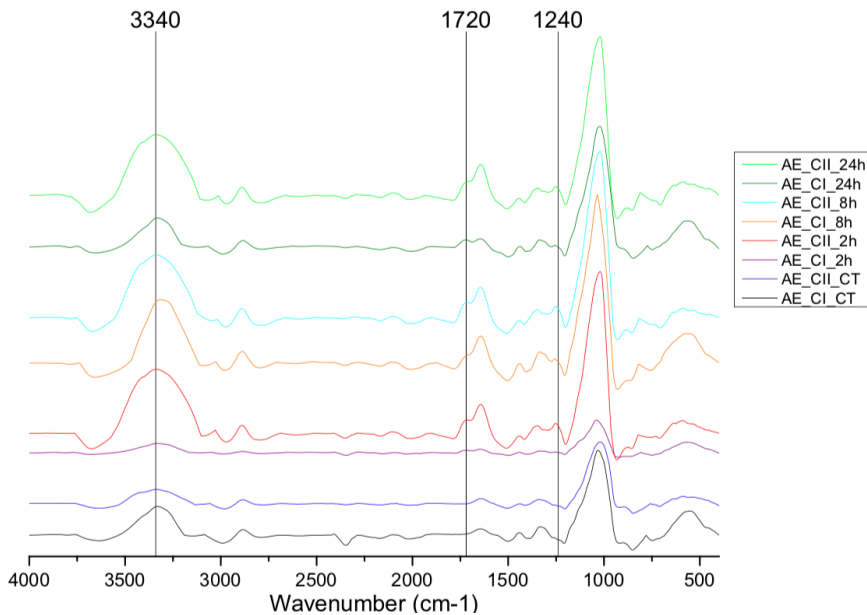


Figura 3.4 FTIR de acetilación enzimática con los valores en transmitancia, con los peaks de 3340cm-1, 1720cm-1 y 1240cm-1 indicados.

3.2.1.2 Estimación de grado de sustitución mediante FTIR

En la acetilación química (fig 9), el grado de sustitución (GS) máximo alcanzado fue de 0,9 en la celulosa I tras 2 horas de reacción, valor considerablemente inferior al GS de 1,82 reportado por Fei et al. (2017) para celulosa de algodón (30 °C, 4 horas). Por su parte, la acetilación enzimática (fig 10) mostró un GS máximo de 1,1 en la celulosa I, también menor que los valores de referencia, como el 1,8 en nanocristales (Li et al., 2019) o el 2,44 obtenido por Fei et al. (2017) a 50 °C.

Estas discrepancias podrían deberse a diferencias en las propiedades de la materia prima, condiciones de reacción no optimizadas o la presencia de impurezas inhibitorias. Además, en la acetilación enzimática, la disminución del GS con el tiempo sugiere un posible proceso de desacetilación o pérdida de actividad enzimática durante la reacción.

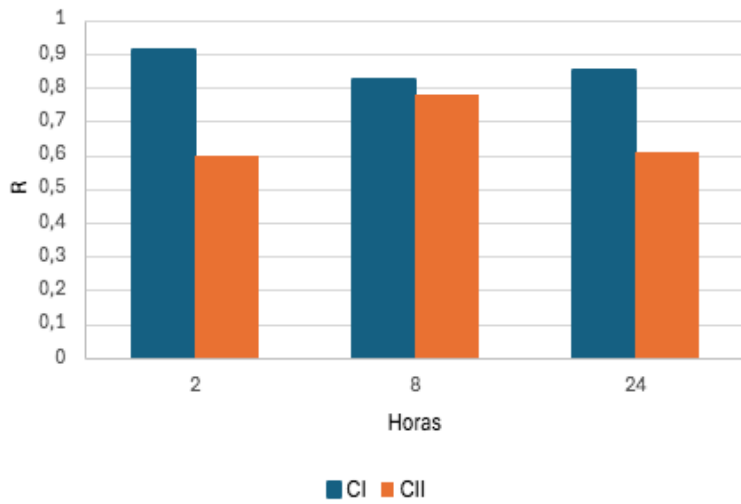


Figura 3.5 Análisis semi-cuantitativo a partir del FTIR para acetilación química.

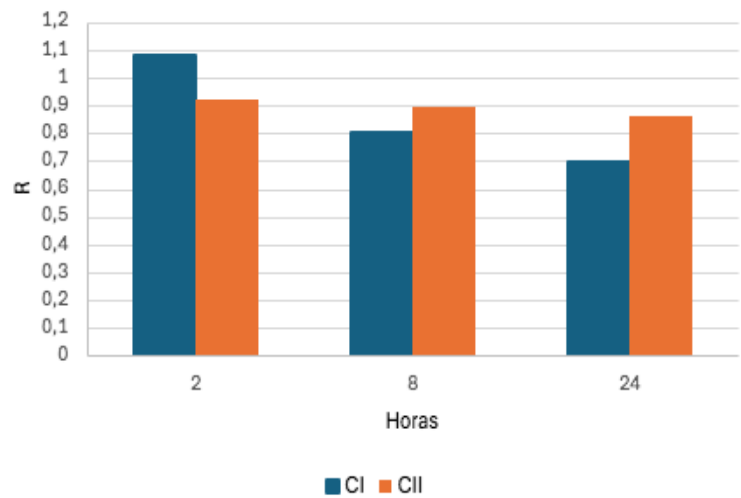


Figura 3.6 Análisis semi-cuantitativo a partir del FTIR para acetilación enzimática.

3.2.2 Capacidad de absorción de aceite

En el proceso de acetilación química (fig 11), la celulosa I muestra un aumento considerable en su capacidad de absorción de aceite (OAC) al comparar los tiempos de 2 y 8 horas. Sin embargo, no se observan diferencias significativas al extender la reacción a 24 horas, lo que sugiere que el grado máximo de sustitución se alcanza alrededor de las 8 horas. Este comportamiento coincide con lo reportado por Paiva et al. (2023) para celulosas de avena y soja, donde los tiempos óptimos fueron 6 y 14 horas respectivamente.

Por otro lado, la celulosa II presenta un aumento progresivo del OAC hasta las 8 horas, seguido de una disminución a las 24 horas. Cabe destacar que, en todos los tiempos evaluados, la celulosa II muestra valores de OAC consistentemente más altos que la celulosa I, probablemente debido a su estructura más abierta y accesible.

En el caso de la acetilación enzimática (fig 12), la celulosa I alcanza rápidamente su máxima capacidad de absorción a las 2 horas, manteniéndose estable en los tiempos posteriores (8 y 24 horas). Esto indica que la reacción alcanza un equilibrio temprano bajo las condiciones empleadas.

Para la celulosa II, se observa un comportamiento más complejo, el OAC aumenta hasta las 8 horas, disminuye ligeramente y luego experimenta un nuevo incremento a las 24 horas. Esta variación podría deberse a que tiempos

prolongados permiten a la enzima actuar sobre sitios menos accesibles o inducen reorganizaciones estructurales que mejoran la distribución de grupos acetilo según un estudio de Frisoni et al. (2001).

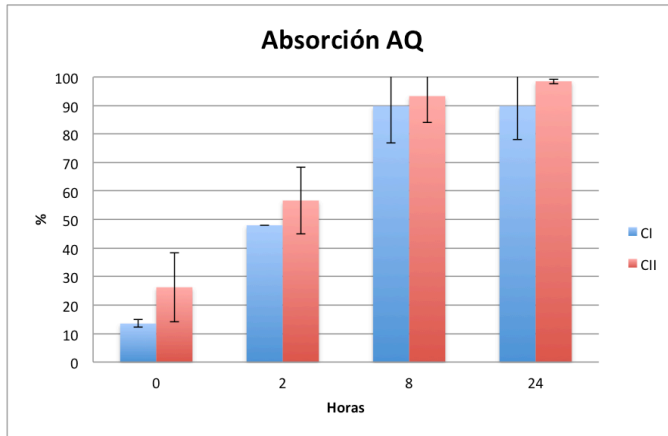


Figura 3.7 Gráfico del porcentaje de absorción con las muestras de acetilación química.

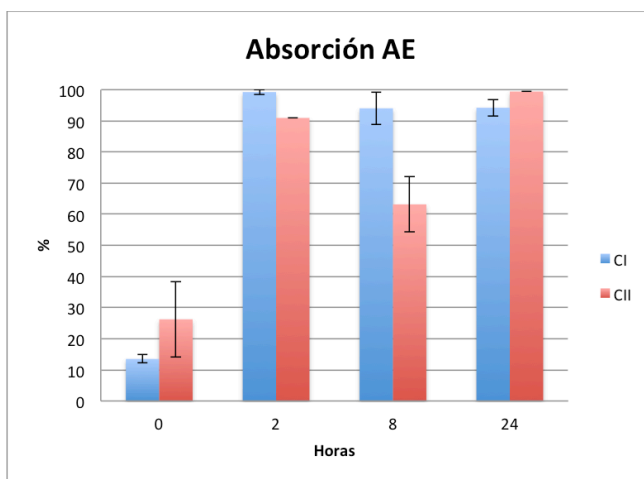


Figura 3.8 Gráfico del porcentaje de absorción con las muestras de acetilación enzimática.

IV. CONCLUSIONES

La investigación muestra que las propiedades hidrofóbicas de los biomateriales celulósicos dependen de su estructura y del método de acetilación. La celulosa II superó a la celulosa I en los procesos de modificación, logrando mayores grados de sustitución y una capacidad superior de absorción de aceite. Esto se debe a su menor cristalinidad y morfología esponjosa, que facilitan la accesibilidad de los grupos hidroxilo durante la funcionalización.

El método enzimático demostró ser más rápido. Sin embargo, tiempos de exposición prolongados podrían revertir la acetilación, destacando la necesidad de optimizar los parámetros de reacción. Los análisis espectroscópicos confirmaron la formación de grupos acetilo en ambos métodos, con mayor intensidad en las muestras de celulosa II, lo que se correlaciona con su mejor desempeño en las pruebas de hidrofobicidad.

Estos hallazgos tienen implicaciones prácticas para el desarrollo de materiales, como envases especializados. Se sugiere que modificar la estructura cristalina inicial podría mejorar aún más la funcionalización. Como trabajo futuro, se propone evaluar la estabilidad a largo plazo de estos materiales y explorar estrategias de pretratamiento que aumenten la eficiencia del proceso enzimático.

V. GLOSARIO

Acetilación: Proceso químico o enzimático de introducción de grupos acetilo en moléculas de celulosa, modificando sus propiedades.

Biomaterial: Material derivado de fuentes naturales con aplicaciones industriales o médicas.

Celulosa I: Polimorfo nativo de celulosa con estructura cristalina paralela y mayor cristalinidad.

Celulosa II: Polimorfo obtenido por tratamiento alcalino, con estructura antiparalela, menor cristalinidad y mayor reactividad.

Crl (Índice de Cristalinidad): Medida porcentual del contenido cristalino en materiales celulósicos, determinado por XRD.

DMSO (Dimetilsulfóxido): Solvente orgánico utilizado en acetilación enzimática para mejorar la accesibilidad de la celulosa.

Enzima lipasa: Catalizador biológico usado en acetilación enzimática para transferir grupos acetilo.

FTIR (Espectroscopía Infrarroja): Técnica para identificar grupos funcionales en materiales modificados.

Grado de Sustitución (GS): Número promedio de grupos hidroxilo sustituidos por acetilo en cada unidad de glucosa (0 a 3).

Hidrofilicidad: Propiedad de absorción de agua debido a grupos hidroxilo en celulosa no modificada.

Hidrofobicidad: Repelencia al agua, inducida por acetilación de la celulosa.

Mercerización: Tratamiento con NaOH concentrado para convertir celulosa I en II.

OAC (Oil Absorption Capacity): Capacidad de absorción de aceite, expresada como porcentaje de masa absorbida.

Polimorfos: Formas cristalinas distintas de un mismo material.

Pulpa Kraft: Celulosa obtenida del procesamiento químico de madera.

SEM (Microscopía Electrónica de Barrido): Técnica para analizar morfología superficial de fibras.

S18 (Solubilidad Alcalina): Porcentaje de componentes solubles en NaOH al 18%, indicador de pureza.

Triacetato de celulosa: Producto totalmente acetilado con aplicaciones industriales.

Viscosidad intrínseca: Medida indirecta del grado de polimerización de cadenas celulósicas.

XRD (Difracción de Rayos X): Método para identificar polimorfos y calcular cristalinidad.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Abolore, R. S., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. (2024). Green and sustainable pretreatment methods for cellulose extraction from lignocellulosic biomass and its applications: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 7, 100396. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100396>

Aceves, A., & Castañeda, L. (2012). PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LIPASAS MICROBIANAS, UNA ALTERNATIVA SOSTENIBLE PARA LA UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES. *Vitae*, 19(3), 244–247. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-40042012000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Ashori, A., Babaei, M., Jonoobi, M., & Hamzeh, Y. (2014). Solvent-free acetylation of cellulose nanofibers for improving compatibility and dispersion. *Carbohydrate Polymers*, 102, 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.067>

Aziz, T., Farid, A., Haq, F., Kiran, M., Ullah, A., Zhang, K., Li, C., Ghazanfar, S., Sun, H., Ullah, R., Ali, A., Muzammal, M., Shah, M., Akhtar, N., Selim, S., Hagagy, N., Samy, M., & Al Jaouni, S. K. (2022). A Review on the Modification of Cellulose and Its Applications. *Polymers*, 14(15), 3206. <https://doi.org/10.3390/polym14153206>

Béguin, P., & Aubert, J.-P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(1), 25–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x>

Božič, M., Vivod, V., Kavčič, S., Leitgeb, M., & Kokol, V. (2015). New findings about the lipase acetylation of nanofibrillated cellulose using acetic anhydride as acyl donor. *Carbohydrate Polymers*, 125, 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.061>

De Souza, A. G., Junqueira, M. T., de Lima, G. F., Rangari, V. K., & Rosa, D. S. (2020). A New Proposal of Preparation of Different Polymorphs of Nanocellulose from *Eucalyptus citriodora*. *Journal of Polymers and the Environment*, 28(4), 1150–1159. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01672-4>

Etale, A., Onyianta, A. J., Turner, S. R., & Eichhorn, S. J. (2023). Cellulose: A Review of Water Interactions, Applications in Composites, and Water Treatment.

Chemical Reviews, 123(5), 2016–2048.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00477>

Fechter, C., Fischer, S., Reimann, F., Brelid, H., & Heinze, T. (2020). Influence of pulp characteristics on the properties of alkali cellulose. *Cellulose*, 27(12), 7227–7241. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03151-4>

Fei, P., Liao, L., Cheng, B., & Song, J. (2017). Quantitative analysis of cellulose acetate with a high degree of substitution by FTIR and its application. *Analytical Methods*, 9(43), 6194–6201. <https://doi.org/10.1039/C7AY02165H>

Frisoni, G., Baiardo, M., Scandola, M., Lednická, D., Cnockaert, M. C., Mergaert, J., & Swings, J. (2001). Natural Cellulose Fibers: Heterogeneous Acetylation Kinetics and Biodegradation Behavior. *Biomacromolecules*, 2(2), 476–482. <https://doi.org/10.1021/bm0056409>

Gremos, S., Zarafeta, D., Kekos, D., & Kolisis, F. (2011). Direct enzymatic acylation of cellulose pretreated in BMIMCl ionic liquid. *Bioresource Technology*, 102(2), 1378–1382. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.021>

Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235–251. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>

Heinze, T. (2015). Cellulose: Structure and Properties. En O. J. Rojas (Ed.), *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials* (Vol. 271, pp. 1–52). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/12_2015_319

Huang, C., Yu, H., Abdalkarim, S. Y. H., Li, Y., Chen, X., Yang, X., Zhou, Y., & Zhang, L. (2022). A comprehensive investigation on cellulose nanocrystals with different crystal structures from cotton via an efficient route. *Carbohydrate Polymers*, 276, 118766. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118766>

Koso, T., Beaumont, M., L. Tardy, B., Cerro, D. R. del, Eyley, S., Thielemans, W., J. Rojas, O., Kilpeläinen, I., & T. King, A. W. (2022). Highly regioselective surface acetylation of cellulose and shaped cellulose constructs in the gas-phase. *Green Chemistry*, 24(14), 5604–5613. <https://doi.org/10.1039/D2GC01141G>

Li, W., Cai, G., & Zhang, P. (2019). A simple and rapid Fourier transform infrared method for the determination of the degree of acetyl substitution of cellulose nanocrystals. *Journal of Materials Science*, 54(10), 8047–8056. <https://doi.org/10.1007/s10853-019-03471-2>

Liu, H., Guo, L., Dai, Y., Li, M., Wang, D., Li, Y., & Qi, H. (2023). Facile fabrication of cellulose-based hydrophobic paper via Michael addition reaction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127513. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127513>

Mukherjee, M. (2003). Human digestive and metabolic lipases—a brief review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(5), 369–376. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00052-3)

Nam, S., French, A. D., Condon, B. D., & Concha, M. (2016). Segal crystallinity index revisited by the simulation of X-ray diffraction patterns of cotton cellulose I β and cellulose II. *Carbohydrate Polymers*, 135, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.035>

Paiva, M. T. P., da Silva, J. B. M. D., Brisola, J., de Carvalho, G. M., & Mali, S. (2023). Cellulose acetate from lignocellulosic residues: An eco-friendly approach based on a hydrothermal process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 243, 125237. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125237>

Pérez, S., & Samain, D. (2010). Structure and Engineering of Celluloses. En D. Horton (Ed.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Vol. 64, pp. 25–116). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(10\)64003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(10)64003-6)

Potenza, M., Bergamonti, L., Lottici, P. P., Righi, L., Lazzarini, L., & Graiff, C. (2022). Green Extraction of Cellulose Nanocrystals of Polymorph II from *Cynara scolymus* L.: Challenge for a “Zero Waste” Economy. *Crystals*, 12(5), 672. <https://doi.org/10.3390/cryst12050672>

Potthast, A., Ahn, K., Becker, M., Eichinger, T., Kostic, M., Böhmendorfer, S., Jeong, M. J., & Rosenau, T. (2022). Acetylation of cellulose – Another pathway of natural cellulose aging during library storage of books and papers. *Carbohydrate Polymers*, 287, 119323. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119323>

Reyes-González, I., Carrillo-Varela, I., Mazega, A., Tarrés, Q., Delgado-Aguilar, M., & Mendonça, R. T. (2024). Chemo-enzymatic pre-treatment of eucalyptus kraft pulp for phosphorylated nanocellulose production. *Cellulose*. <https://doi.org/10.1007/s10570-024-06257-1>

Rodrigues dos Santos, M. R., Battaglia Hirata, D. B., & de Alencar Figueira Angelotti, J. A. F. (2022). Lipases: Sources of Acquisition, Ways of Production, and Recent Applications. *Catalysis Research*, 2(2), 1–43. <https://doi.org/10.21926/cr.2202013>

Salazar Carranza, L. A., Hinojoza Guerrero, M. M., Acosta Gaibor, M. P., Escobar Torres, A. F., Scrich Vázquez, A. J., Salazar Carranza, L. A., Hinojoza Guerrero, M. M., Acosta Gaibor, M. P., Escobar Torres, A. F., & Scrich Vázquez, A. J. (2020). Caracterización, clasificación y usos de las enzimas lipasas en la producción industrial. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 39(4). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0864-03002020000400017&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Samyn, P. (2013). Wetting and hydrophobic modification of cellulose surfaces for paper applications. *Journal of Materials Science*, 48(19), 6455–6498. <https://doi.org/10.1007/s10853-013-7519-y>

Schmidt, V. C. R., Blanco-Pascual, N., Tribuzi, G., & Laurindo, J. B. (2019). Effect of the degree of acetylation, plasticizer concentration and relative humidity on cassava starch films properties. *Food Science and Technology*, 39, 491–499. <https://doi.org/10.1590/fst.34217>

Shaikh, H. M., Anis, A., Poulouse, A. M., Al-Zahrani, S. M., Madhar, N. A., Alhamidi, A., Aldeligan, S. H., & Alsubaie, F. S. (2022). Synthesis and Characterization of Cellulose Triacetate Obtained from Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Trunk Mesh-Derived Cellulose. *Molecules*, 27(4), 1434. <https://doi.org/10.3390/molecules27041434>

Vatanpour, V., Pasaoglu, M. E., Barzegar, H., Teber, O. O., Kaya, R., Bastug, M., Khataee, A., & Koyuncu, I. (2022). Cellulose acetate in fabrication of polymeric membranes: A review. *Chemosphere*, 295, 133914. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133914>

Yang, K., & Wang, Y. (2003). Lipase-Catalyzed Cellulose Acetylation in Aqueous and Organic Media. *Biotechnology Progress*, 19(6), 1664–1671. <https://doi.org/10.1021/bp0341388>

Yang, K., Wang, Y.-J., & Kuo, M.-I. (2004). Effects of substrate pretreatment and water activity on lipase-catalyzed cellulose acetylation in organic media. *Biotechnology Progress*, 20(4), 1053–1061. <https://doi.org/10.1021/bp034247m>