



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

FACULTAT DE QUÍMICA

DEPARTAMENT DE QUÍMICA FÍSICA

INSTITUT DE CIÈNCIA DELS MATERIALS

**DESARROLLO DE
NANOCOMPUESTOS BASADOS EN
CELULOSA BACTERIANA PARA
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

Memoria que presenta

Cristian Grande Cruz

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias Químicas

Directores de la Tesis:

Dra. Clara M Gómez Clari

Dr. Fernando G Torres García

Valencia, Noviembre 2014



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



D^a. Clara M. Gomez Clari, Catedrática del Departament de Química-Física de la Universitat de València

D. Fernando G. Torres García, Profesor Principal del Departamento de Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta D. Cristian Grande Cruz en esta memoria bajo el título “DESARROLLO DE NANOCOMPUESTOS BASADOS EN CELULOSA BACTERIANA PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS” ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departament de Química-Física y en el Institut de Ciència dels Materials de la Universitat de València.

Y para que así conste, a efectos de su presentación para optar al título de Grado de Doctor en Ciencias Químicas, expedimos la presente, que firmamos a 3 de Noviembre de 2014.

Dra. Clara M Gómez Clari

Dr. Fernando G Torres García

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar unas notas de agradecimiento y reconocimiento a algunas personas e instituciones de Perú y España, sin quienes esta tesis no hubiera podido ser llevada a cabo.

En primer lugar a Clara Gómez y Fernando Torres, directora y co-director del proyecto de tesis; por su confianza, el haberme permitido realizar este trabajo en colaboración y por guiarme durante la ejecución del mismo.

En segundo lugar a la Fundación General y a la Oficina de Relaciones Internacionales de la Universitat de Valencia, a la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado y a la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP) por las becas y ayudas recibidas.

A Javier Nakamatsu, Dora Mautua, Daniel López y Maricarmen Bañó por sus valiosos comentarios y por permitirme las instalaciones de sus respectivos laboratorios. A Agustín Campos[†], Juan Figueruelo, Armando Codoñer y Francisco Vicente por sus enriquecedoras conversaciones. A Lorena Solar, Pablo Pardo, Andrés Gómez y Pedro Burguete del ICMUV y a Omar Troncoso de la PUCP por su colaboración; y de manera especial a Mario Culebras con quien desarrollamos el método experimental para la optimización del crecimiento celular.

A mis compañeros y amigos; y en especial a Bob Roefs, Amparo Casas, Andrea Morgan, Anthony Velarde, Guido Palomino, Oscar Arroyo y José Luis Rodríguez.

A todas las personas que de alguna u otra manera me brindaron su apoyo.

A mi esposa. A mi madre.
A mi hijo Daniel, por supuesto.

ÍNDICE

<i>Índice</i>	<i>I</i>
<i>Símbolos y Acrónimos</i>	<i>V</i>
Capítulo 1. Introducción	3
1.1. Celulosa: Estructura y Propiedades	3
1.2. Nanocelulosa	7
1.3. Celulosa Bacteriana	10
1.3.1. Cepas para la producción de celulosa.....	11
1.3.2. Mecanismo de biosíntesis.....	14
1.3.3. Métodos de Producción.....	15
1.3.4. Propiedades.....	19
1.3.5. Aplicaciones.....	25
1.3.6. Aplicaciones Biomédicas.....	30
1.4. Estructura y Alcances de la tesis	36
Capítulo 2. Técnicas De Fabricación De Nanocompuestos De Celulosa Bacteriana	41
2.1. Fabricación de nanocompuestos mediante Técnicas Bottom-Up	41
2.1.1. Síntesis química.....	41
2.1.2. Ensamblaje posicional.....	42
2.1.3. Autoensamblaje.....	42
2.2. Fabricación de nanocompuestos basados en celulosa bacteriana	44
2.2.1. Fabricación de nanocompuestos de celulosa bacteriana mediante métodos Top-Down.....	45
2.2.2. Fabricación de nanocompuestos de celulosa bacteriana mediante métodos Bottom-Up.....	51

Capítulo 3. Formación De Nanocompuestos De Celulosa Bacteriana Y Almidón 57

3.1. Nanocompuestos de celulosa y almidón	57
3.2. Experimental.....	59
3.2.1. Materiales.....	59
3.2.2. Preparación de los nanocompuestos.....	59
3.2.3. Caracterización cristalográfica y físico química: Difracción de Rayos X y Espectroscopía mediante infrarrojos.....	60
3.2.4. Caracterización mecánica: Ensayos de tracción.....	62
3.2.5. Caracterización morfológica.....	62
3.3. Resultados y Discusión.....	63
3.3.1. Análisis cristalográfico.....	67
3.3.2. Análisis físico-químico.....	71
3.3.3. Análisis de propiedades mecánicas.....	73
3.3.4. Morfología de los nanocompuestos BC-almidón...75	
3.4. Conclusiones	80

Capítulo 4. Desarrollo de Nanocompuestos de Celulosa Bacteriana e Hidroxiapatita 83

4.1. Formación de nanocompuestos de celulosa en presencia de aditivos	83
4.2. Experimental.....	84
4.2.1. Preparación de partículas de hidroxiapatita.....	84
4.2.2. Preparación de geles nanocompuestos de celulosa bacteriana e hidroxiapatita.....	85
4.2.3. Preparación de muestras para caracterización.....	87
4.2.4. Caracterización de los nanocompuestos.....	88
4.2.5. Siembra y cultivos celulares.....	90
4.3. Resultados y Discusión.....	92
4.3.1. Análisis morfológico.....	92

4.3.2. Estudio de formación de los nanocompuestos.....	101
4.3.3. Propiedades físico químicas.....	104
4.3.4. Respuesta celular.....	109
4.4. Conclusiones	112
<i>Capítulo 5. Optimización del Crecimiento Celular Mediante Adsorción de Colágeno y Polilisina</i>	<i>117</i>
5.1. Biocompatibilidad, viabilidad y proliferación celular en sustratos de celulosa	117
5.2. Experimental.....	118
5.2.1. Preparación de los geles de celulosa.....	118
5.2.2. Modificación superficial de celulosa bacteriana...	119
5.2.3. Adsorción de colágeno y poli-L-lisina en celulosa bacteriana.....	119
5.2.4. Siembra y cultivos celulares.....	120
5.2.5. Análisis morfológico mediante SEM.....	122
5.3. Resultados	122
5.3.1. Análisis morfológico.....	122
5.3.2. Análisis de biocompatibilidad y viabilidad celular.	125
5.4. Conclusiones	127
<i>Capítulo 6. Conclusiones Generales.....</i>	<i>131</i>
<i>Capitulo 7. Referencias.....</i>	<i>135</i>
<i>Publicaciones</i>	<i>157</i>

SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

t	Tamaño de cristal
λ	Longitud de onda
β	Anchura a media altura
Θ	Mitad del ángulo de difracción
σ	Esfuerzo a la rotura
E	Módulo de elasticidad o de Young
ϵ	Deformación a la rotura
V_s	Velocidad de sedimentación
g	Aceleración gravitacional
ρ_p	Densidad de partícula
ρ_s	Densidad de medio líquido
μ	Viscosidad dinámica de medio líquido
R	Radio de partícula
n	Tamaño de muestra
AFM	Microscopía de fuerza atómica
ATP	Trifosfato de adenosina
ATR-FTIR	Espectroscopía infraroja con reflectancia total atenuada
BC	Celulosa bacteriana
CAB	Acetato butirato de celulosa

CBM	Módulo de unión a celulosa
CMC	Carboximetilcelulosa
CHO	Células de ovario de hamster chino
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DP	Grado de polimerización
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva
ESEM	Microscopía electrónica de barrido ambiental
FWHM	Valor de anchura a media altura del pico de difracción
HAp	Hidroxiapatita
HEK	Células embrionarias de riñón humano
MCC	Celulosa microcristalina
MFC	Celulosa microfibrilar
OGP	Péptido de crecimiento osteogénico
PBS	Solución buffer fosfato salino
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietilenglicol
PEO	Óxido de polietileno
PHB	Polihidroxibutirato
PLA	Ácido poliláctico
PVA	Alcohol de polivinilo
RGD	Tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico
RTC	Complejo terminal en forma de roseta
SBF	Solución de fluido corporal simulado

Símbolos y Acrónimos

SEM	Microscopía electrónica de barrido
SPM	Microscopía de efecto túnel
TCP	Plato de cultivo de tejidos
Tg	Temperatura de transición vítrea
TGA	Análisis termogravimétrico
UDP	Uridina difosfato
UDP-glucosa	Uridina difosfato glucosa
XRD	Difracción de rayos X

Capítulo 1

Introducción

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Celulosa: Estructura y Propiedades

En el año 1838 el químico francés Anselme Payen utilizó por primera vez el término “celulosa” cuando luego de la purificación de varias plantas descubrió un material fibroso remanente. A partir de este primer aislamiento, la celulosa ha sido aprovechada a nivel industrial para múltiples aplicaciones que van desde las primeras películas de celuloide hasta aplicaciones más recientes principalmente en la industria del empaque, farmacéutica, textil y del papel. La celulosa es el material orgánico más abundante en la tierra siendo su producción estimada de aproximadamente 180 billones de toneladas cada año (Perrin, 2001). Su fórmula molecular es $(C_6H_{10}O_5)_n$, y es el principal componente de las plantas, sirve para mantener su estructura; y está presente en bacterias, hongos, algas y en animales.

La estructura de la celulosa está compuesta de moléculas repetitivas de β -glucopiranososa que se unen mediante enlaces covalentes β -1,4 glucosídico, a diferencia de las moléculas de almidón y otros carbohidratos que están unidas mediante enlaces α -1,4 glucosídico. Como resultado, la celulosa es una cadena polimérica lineal con un alto número de grupos hidroxilos (tres por cada unidad anhidroglucosa) situados en las posiciones C2, C3 y

C6, los cuales forman puentes de hidrógeno con los átomos de oxígeno de la misma o de otras cadenas (Figura 1)

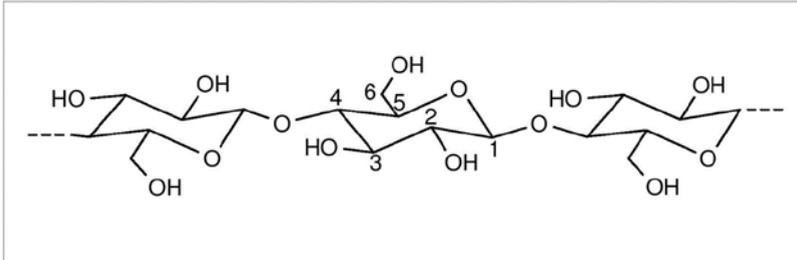


Figura 1. Estructura molecular de celulosa

La longitud de las cadenas o grado de polimerización (DP) es el número de unidades anhidroglucosas que conforman la cadena polimérica. El DP depende del origen de la celulosa y su tratamiento. En el caso de la pulpa de madera los valores típicos varían entre 300 y 1,700; mientras que la celulosa bacteriana y las fibras de plantas tienen rangos de DP entre 800 y 10,000. En el caso del algodón se presentan más de 10,000 unidades, y la celulosa producida por algas de la especie *Valonia ventricosa* tiene aproximadamente 25,000. Por el contrario, el DP de fibras regeneradas de celulosa se encuentra en el rango entre 250 y 500, y la celulosa microcristalina tiene valores de DP menores que 400 unidades (Klemm et. al., 2005).

Asimismo, la extensa red de enlaces de hidrógeno confiere a la celulosa propiedades tales como hidrofiliidad, degradabilidad, insolubilidad en solventes comunes, así como una estructura parcialmente cristalina. Las cadenas tienden a formar fibrillas

elementales, microfibrillas y bandas microfibrilares. Tomando como modelo la biosíntesis de celulosa en plantas vasculares, las cadenas de β -glucopiranososa se generan a través de un arreglo enzimático de seis complejos terminales en forma de roseta (RTC) ubicados en la membrana plasmática (Mueller and Brown, 1980; Kimura et. al., 1999; Brown y Saxena, 2000). Los RTC son estructuras proteicas que contienen celulosa sintasa, las cuales utilizan sustrato de uridina difosfato (UDP) para la generación de las cadenas. Luego de extruidas, se produce la fusión de las cadenas debido a las fuerzas de van der Waals y los enlaces de hidrógeno (Cousins y Brown, 1995). De esta manera se produce la primera unidad fibrilar conocida como fibrilla elemental, la cual tiene dimensiones laterales de entre 1.5 y 3.5 nm. A partir de las fibrillas elementales se forman las microfibras (dimensiones laterales entre 10 y 30 nm), las cuales componen a su vez las bandas microfibrilares (dimensiones laterales en el orden de los 100 nm) (Klemm et. al., 2005).

Las microfibras de celulosa se componen de dos regiones diferentes. La región cristalina está formada por moléculas altamente ordenadas, mientras que las moléculas en la región amorfa, o también conocida como para-cristalina, tienen menor ordenamiento. Existen varios modelos para describir la naturaleza exacta y configuración de las regiones; sin embargo el modelo de micela con flecos (“fringe micelle”) es el más reconocido. En él se describe a las regiones cristalinas sin límites distintivos de las

regiones amorfas. Otro de los modelos propuestos (Wickholm et al., 2001) describe a las regiones cristalinas solo en la parte interna de la microfibra y la estructura no cristalina ubicada entre la parte interna y la superficie.

La cristalinidad de la celulosa, como proporción relativa de las regiones cristalinas, varía según el tipo de celulosa. De esta manera la celulosa puede existir hasta en seis formas diferentes: I, II, III₁, III₁₁, IV₁ y IV₁₁ (O'Sullivan, 1997). La Celulosa I, encontrada en la naturaleza y conocida comúnmente como celulosa nativa, presenta dos tipos de estructura cristalina: I_α e I_β (Atalla y VanderHart, 1984), las cuales pueden coexistir en diferentes proporciones dependiendo del origen. De esta manera, la celulosa I_α es producida en mayor proporción por bacterias y algas; mientras que la I_β es la que predomina en plantas (madera, algodón, ramio, etc.) (Sugiyama et al., 1991). Ambas se diferencian en el empaquetamiento cristalino, la conformación molecular y los enlaces de hidrógeno (Nishiyama et al., 2003)

La Celulosa II es la estructura más estable de relevancia técnica. Puede ser obtenida a partir de Celulosa I ya sea mediante el tratamiento con hidróxido de sodio concentrado (proceso de mercerización) o mediante solubilización seguida de precipitación y regeneración tal como se realiza para la fabricación de láminas y fibras (Klemm et al., 2005), alterándose la estructura original de la celulosa precursora (Lee et al., 1994). Asimismo, en forma natural es obtenida a partir de la bacteria *Gluconacetobacter xylinum* (Bureau y Brown, 1987; Roberts et al., 1989) y por algas de la especie

Halicystis (WA Sisson, 1938; RM Brown, 1989). La diferencia entre Celulosa I y Celulosa II se basa en las dimensiones de la celda unitaria y la polaridad de las cadenas.

Las formas de Celulosa III₁ y III₁₁ son obtenidas a partir de Celulosa I y II, respectivamente (Marrinan and Mann, 1956; Sarko et al., 1976; Sarko, 1987), y los tipos de Celulosa IV₁ y IV₁₁ pueden ser obtenidos mediante el calentamiento en glicerol de Celulosa III₁ y III₁₁, respectivamente (Gardiner and Sarko, 1985)

1.2. Nanocelulosa

La nanotecnología es un área de las ciencias aplicadas que se refiere al control y la manipulación de la materia a una escala atómica, molecular y supramolecular. Asimismo, comúnmente los nanomateriales se definen como aquellos que tienen al menos una de sus dimensiones en el rango nanométrico. A estas escalas los materiales tienen propiedades muy diferentes a las que exhiben en una macroescala. Por ello es común que diversas estructuras de nanomateriales tengan excelentes propiedades ópticas, electrónicas, térmicas, mecánicas y de barrera.

Debido a las ventajas descritas muchos nuevos materiales en estas escalas vienen siendo desarrollados continuamente en los últimos años; y asimismo aquellos materiales que se encuentran de forma natural en estas escalas son objeto de investigación. Específicamente el término nanocelulosa se define como un material que contiene fibras de celulosa en el rango nanométrico.

De esta manera, la nanocelulosa combina las propiedades de la celulosa con las propiedades específicas que tienen los materiales a escalas nanométricas debido a su alto ratio área de superficie: volumen.

Dependiendo de la fuente de obtención o método de formación, la nanocelulosa puede ser de tres tipos d: i) Celulosa microfibrilar, ii) Celulosa microcristalina, y iii) Celulosa bacteriana.

La celulosa microfibrilar (abreviada comúnmente como MFC por su descripción en inglés Microfibrillated Cellulose) se obtiene mediante procesos de homogenización de alta presión que dan como resultado la delaminación de las paredes celulares de las fibras y la liberación de las microfibras. Las principales fuentes de obtención de MFC son la madera, el cáñamo y el lino; y las aplicaciones se encuentran en la industria del papel y cartón como agente de refuerzo. Asimismo en la industria del envase de alimentos se utiliza como material de barrera contra el oxígeno, vapor de agua y grasas. Otras áreas de aplicación son en las industrias de la medicina, cosmética, farmacéutica e higiene.

La extracción de MFC mediante métodos mecánicos se inició con los trabajos de Herrick et. al. (1983) y Turbak et. al. (1983) en los que se obtienen geles que contienen microfibras con diámetros de entre 10 y 100 nm. Una de las limitaciones que tienen los procesos de homogenización para la formación de MFC es la alta energía requerida. Actualmente, para hacer más eficiente el consumo de energía, en combinación con los esfuerzos mecánicos se utiliza

hidrólisis enzimática (Pääko et. al., 2007), carboximetilización de las fibras (Wagberg et. al., 2008) y oxidación de 2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-oxilo (TEMPO) (Saito et. al., 2006) (Saito et. al., 2007)

El segundo tipo de nanocelulosa es la celulosa microcristalina (MCC), la cual consiste de cristales de celulosa de formas alargadas, conocidos comúnmente como whiskers. Los whiskers se obtienen a causa de la eliminación de las partes amorfas de fibras de celulosa.

Debido a sus buenas propiedades mecánicas, se ha desarrollado aplicaciones para la celulosa microcristalina principalmente como refuerzo de un amplio rango de matrices poliméricas y en biopolímeros tales como almidón, quitosano, ácido poliláctico, polihidroxitirato y polihidroxi octanoato (Habibi et. al., 2010). Asimismo, la estructura altamente ordenada genera no solo refuerzo sino también cambios significativos en las propiedades eléctricas, ópticas, magnéticas, ferromagnéticas, dieléctricas, conductivas y superconductoras.

El proceso de obtención de whiskers de celulosa se inicia con la remoción de los polisacáridos que están unidos a las fibras y la división de las partes amorfas mediante hidrólisis ácida. De esta manera se liberan las partes cristalinas y los ácidos residuales e impurezas son removidos mediante repetidos procesos de diálisis y centrifugación. Con la finalidad de dispersar los cristales y formar una suspensión estable se aplica generalmente ultrasonido.

La estructura y propiedades de la celulosa microcristalina depende del tipo de ácido utilizado para la hidrólisis y su concentración, de la temperatura y tiempo del proceso de hidrólisis y de la intensidad de la irradiación al ultrasonido (Bondeson et. al., 2006). El uso de ácido clorhídrico produce celulosa microcristalina con reducida carga superficial, mientras que el uso de ácido sulfúrico produce suspensiones acuosas altamente estables (Araki et. al., 1999; Beck-Candanedo et. al., 2005).

Asimismo, las dimensiones y grado de cristalinidad de los whiskers dependen de la fuente de obtención. Por ejemplo, los whiskers que provienen de algodón, madera y Avicel presentan cristalinidad de alrededor de 90%, con anchos de entre 5 y 10 nm y longitudes que varían entre 100 y 300 nm (Klemm et. al., 2011), mientras que aquellos que son obtenidos de tunicina, bacterias y algas presentan dimensiones de entre 5 y 60 nm de ancho y aproximadamente 100 nm de longitud. Otras fuentes biológicas para la obtención de whikers son sisal, cáñamo, lino, paja de trigo y ramio.

El tercer tipo de nanocelulosa es la conocida como celulosa bacteriana (abreviada comúnmente como BC por su descripción en inglés Bacterial Cellulose).

1.3. Celulosa Bacteriana

Descrita por primera vez en 1886 por Adrian J Brown (AJ Brown, 1886) como “una membrana gelatinosa traslúcida [que crece] en la superficie del medio de cultivo”, la celulosa bacteriana es producida por algunos organismos procariotas del género

Acetobacter xylinus (reclasificado como *Gluconacetobacter xylinus*), *Rhizobium spp.*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Sarcina ventriculi* (Ross et. al., 1991), *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium* (Zogaj et. al., 2001); y por organismos eucariotas que incluyen animales, algas, hongos, plantas vasculares, gimnospermas y angiospermas (Nobles et. al., 2001). Sin embargo, la celulosa obtenida a partir de la especie *Gluconacetobacter* ha sido objeto de la más intensiva investigación (Ross et. al. 1991) y aplicada como modelo en estudios relacionados a su formación, dado que es la cepa más eficiente en la producción a partir de diversas fuentes de carbón y nitrógeno (Bielecki et. al., 2005).

1.3.1. Cepas para la producción de celulosa

Las bacterias de la especie *Gluconacetobacter* son aeróbicas, y presentan formas alargadas como se observa en la Figura 2. Pueden ser aisladas principalmente a partir de frutas en descomposición; y utilizando diversos medios de cultivo y en presencia de oxígeno producen celulosa como parte de su metabolismo. La razón por la cual los microorganismos producen celulosa ha sido discutida en diversos reportes (Iguchi et. al., 2000). La primera teoría se basa en que las bacterias aeróbicas producen una película para mantener su posición cerca a la superficie del cultivo. La segunda asume que las bacterias generan celulosa para protegerse de los rayos ultravioleta, y la tercera teoría asume que los microorganismos producen una “jaula” para protegerse de

enemigos y iones de metales pesados mientras que los nutrientes pueden ser suministrados fácilmente por difusión.

Comercialmente las cepas de la especie *Gluconacetobacter* son utilizadas para obtener vinagre a partir de vino, mediante la transformación de etanol en ácido acético. Asimismo, se utilizan para la fabricación de cervezas con elevado grado de acidez.

Las especies más eficaces en la producción de celulosa son *Gluconacetobacter xylinus* (Klemm et. al., 2009), *Gluconacetobacter sucrofermentans* (Helenius et. al., 2005; Brackmann et. al., 2010), *Gluconacetobacter saccharivorans* (Lisdiyanti et. al., 2006) y *Gluconacetobacter hansenii* (Hutchens et. al., 2006)

En términos de estructura la celulosa bacteriana es similar a la celulosa de las plantas, sin embargo existen importantes características estructurales y propiedades en las que difiere como por ejemplo en el mayor grado pureza, ya que no contiene hemicelulosa, lignina y pectina; mayor grado de polimerización (en el rango de 4000 a 10000) (Klemm et. al., 2011), mayor cristalinidad (de 80 a 90%) (Klemm et. al., 2011), mayor capacidad de retención de agua (Chawla et. al., 2009), y alta estabilidad mecánica y térmica (Klemm et. al., 2006)

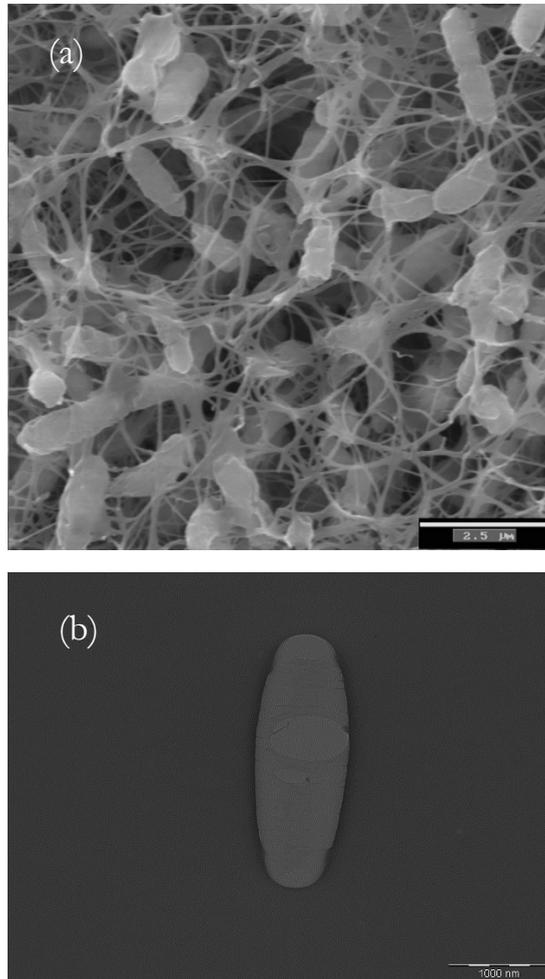


Figura 2.a. Imagen de un gel de celulosa bacteriana liofilizado (SEM) en el que se observa la red de fibras en presencia de bacterias. b. Imagen de una bacteria del género *Gluconacetobacter saccharivorans*

1.3.2. Mecanismo de biosíntesis

La síntesis de celulosa en organismos productores, incluyendo plantas, consiste de dos mecanismos: i) formación de las cadenas de glucano β -1,4 con la polimerización de unidades de glucosa, y ii) ensamble y cristalización de las cadenas de celulosa.

1.3.2.1. Formación de las cadenas de glucano β -1,4

La formación de las cadenas de glucano β -1,4, involucra los siguientes pasos fundamentales llevados a cabo por diferentes enzimas: la transformación de glucosa a glucosa-6-fosfato por acción de la enzima glucoquinasa, posteriormente la transformación en presencia de la enzima fosfoglucomutasa de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato y luego la transformación a uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa) por acción de la enzima UDPG pirofosforilasa.

El complejo enzimático celulosa sintasa se encuentra firmemente unido a la membrana citoplasmática interna de los microorganismos y a partir de la UDP-glucosa, que es el único sustrato para la biosíntesis de celulosa, forman las cadenas de glucano β -1,4.

1.3.2.2. Ensamble y cristalización de las cadenas de celulosa

Los microorganismos de la especie *Gluconacetobacter* presentan externamente un arreglo de entre 50 y 80 poros localizados a lo largo del eje axial de la membrana celular. Estas estructuras son conocidas también como poros o agregados (tactoides), los cuales

atravesan la membrana celular y son las zonas por las cuales se extruye los polímeros pre celulósicos en grupos de entre 10 y 15 cadenas. Cabe señalar que la existencia de los agregados y de estructuras análogas en algas sugiere que la síntesis simultánea de algunas cadenas de glucano β -1,4 y en un espacio limitado es una característica común del ensamble de microfibras de celulosa en organismos superiores e inferiores (Ross et. al., 1991).

Las cadenas se unen para formar fibrillas de alta cristalinidad que tienen dimensiones de entre 1.5 y 4 nm (Hirai et. al., 2002; Iguchi et. al., 2000). Debido a la presencia de enlaces de hidrógeno, las fibrillas se ensamblan a su vez para formar nanofibras de celulosa, las cuales tienen forma de cinta torcida, se extruyen paralelas al eje longitudinal de la membrana celular, presentan anchos en el rango de 50 a 145 nm, altura de hasta 4 nm, longitud variable en el orden de los micrones (Brown, et. al., 1976; Astley et. al., 2001; Iguchi et. al., 2000; Ishida et. al., 2004), y permanecen asociadas a la membrana durante la división celular (Ross et. al., 1991)

1.3.3. Métodos de Producción

La producción de BC puede ser llevada a cabo en medios estáticos y agitados. La mayor parte de la investigación usando cepas aeróbicas del género *Gluconacetobacter* utiliza el modo estático para la síntesis de nanofibras de BC, las cuales se producen una vez se introduce la cepa en el medio de cultivo y permanecen expuestas al oxígeno a temperaturas de entre 28 y 30 °C. Inicialmente las

bacterias incrementan su población cuando consumen el oxígeno disuelto en el medio líquido y producen algunas cantidades de celulosa. Esto puede observarse por la aparición de cierta turbidez en el medio. Una vez consumido el oxígeno disuelto, solo las bacterias que permanecen cerca de la interfase del medio de cultivo y el aire, mantienen su actividad y producen celulosa en forma de una película la cual se suspende y desciende a través del medio líquido, dada la continua formación de celulosa desde la interfase. Los nutrientes para las bacterias que permanecen cerca de la interfase son suministrados por difusión a través de la película que se va formando. Las bacterias que permanecen en la parte inferior de la película se mantienen inactivas y pueden ser reactivadas y usadas como nuevo inóculo para futuros cultivos. De esta manera la película adopta la forma de un gel tridimensional que contiene las fibras de celulosa (Borzani and de Souza, 1995; Iguchi et. al., 2000; Klemm et. al., 2001) (Figuras 3 y 4) y el tiempo para que alcancen su máximo espesor es de hasta 21 días.

Los factores que afectan la productividad de celulosa son la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el pH, la temperatura y el método de cultivo. La glucosa es la fuente de carbono principalmente utilizada en los medios de cultivo para *Gluconacetobacter* (Hestrin and Schramm, 1954) y otras fuentes similares incluyen manitol (Nguyen et. al., 2008), fructosa (Bae and Shoda, 2005), sacarosa (Iguchi et. al., 2000; Yamanaka et. al., 2000; Nakagaito et. al., 2005), xilosa (Ishihara et. al., 2002) y glicerol (Masaoka et. al., 1993).



Figura 3. Cultivos estáticos de celulosa bacteriana.



Figura 4. Hidrogel de celulosa bacteriana.

El etanol se considera una fuente adicional de carbono ya que contribuye a la generación de trifosfato de adenosina (ATP) y de esta manera mejora la productividad de celulosa (Krystynowicz et. al., 2002). Asimismo contribuye a la eliminación de la mutación espontánea de las bacterias no productoras de celulosa (Park et. al., 2003).

Las fuentes de nitrógeno son importantes ya que para que los organismos vivos funcionen correctamente deben presentarlo en forma de proteínas y ácidos nucleicos. Existen principalmente dos fuentes de nitrógeno que se utilizan en medios de cultivo para *Gluconacetobacter*: peptona y extracto de levadura. Otras fuentes de nitrógeno incluyen caseína, sulfato de amonio, glutamato sódico (Ramana et. al., 2000), y licor de maíz, el cual es un subproducto derivado de la molienda de maíz (Ishida et. al., 2003; Bae and Shoda 2005)

El crecimiento de celulosa bacteriana se optimiza cuando el medio de cultivo se encuentra a una temperatura de entre 28 y 30 °C. Asimismo, se ha observado que el pH del medio disminuye a medida que transcurre el tiempo de cultivo debido a la transformación de etanol y carbohidratos en ácido acético y de glucosa en ácido glucónico (Kongruang et. al., 2008). De esta manera, el pH óptimo del medio de cultivo inicial para el crecimiento de celulosa bacteriana puede variar entre 4.0 y 6.0.

Por otro lado, los medios de cultivo agitados son requeridos para incrementar la producción de celulosa bacteriana (Bungay et. al.,

1999; Park et. al., 2003; Cheng et. al., 2010; Hornung, 2010), y según la técnica utilizada, se obtiene celulosa en forma de fibras en suspensión (Bae and Shoda, 2005), pellets elípticos (Czaja et. al., 2004) y masas irregulares (Krystynowicz et. al., 2002). Con respecto a las propiedades de la celulosa obtenida según el método de cultivo se ha reportado que la celulosa producida en medios estáticos presenta mayor módulo de Young (9 veces) y mayor esfuerzo a la tracción (5 veces) que la celulosa producida en medios agitados (Krystynowicz et. al., 2002). Asimismo, el índice de cristalinidad y el grado de polimerización son mayores cuando se obtiene celulosa bacteriana a partir de medios estáticos (Cheng et. al., 2002)

1.3.4. Propiedades

A continuación se describen las propiedades morfológicas, mecánicas, térmicas y otras importantes de la celulosa bacteriana.

1.3.4.1. Propiedades morfológicas

Las fibras de celulosa en los hidrogeles representan aproximadamente el 0.9% del contenido. El resto del contenido está compuesto por agua ligada (0.3%) y agua libre (98.8%). El agua libre es la que puede ser liberada fácilmente mediante diversas formas de deshidratación; mientras que el agua ligada es la que se encuentra retenida. El agua se mantiene unida a las nanofibras de celulosa mediante adsorción y formando capilares de entre 0.5 y

1.0 μm (Okiyama et. al., 1992). Debido a los bajos valores de agua ligada, el agua se presenta físicamente en las superficies y dentro de las fibras de celulosa pero no forman enlaces químicos. (Watanabe et. al., 1998)

La morfología del arreglo original de celulosa bacteriana depende de las especies de los microorganismos productores. Asimismo, la técnica que se aplique para deshidratar el gel influirá en la morfología final. En tal sentido y con el objetivo de mantener la estructura original Astley et. al. (2001) observaron mediante microscopía de barrido electrónico ambiental (ESEM) que las fibras de celulosa bacteriana en un estado completamente hidratado tienen dimensiones de 50 nm.

Cabe señalar que la liofilización es la técnica más utilizada para retirar el agua de los geles de celulosa bacteriana. Esta técnica consiste en congelar los geles en nitrógeno líquido e inmediatamente luego sublimar en una cámara de vacío. De esta manera se evita que se formen algunas partes líquidas en el gel. El tamaño de los poros de celulosa bacteriana que se obtienen mediante liofilización es mayor que el obtenido con otras técnicas de deshidratación, debido a que durante el congelamiento los poros se expanden; y una vez sublimada el agua, los poros mantienen la deformación. Una vez liofilizada, el gel adopta la forma de espuma tridimensional.

Sin embargo, el método más apropiado para mantener la morfología original de la celulosa bacteriana es el secado mediante

intercambio de solvente (agua-etanol-alcohol terbutílico) (Kuga et. al., 2002). De esta manera las fibras alcanzan dimensiones de hasta 50 nm vistas en SEM (Ishida et. al., 2004). Otras técnicas de deshidratación incluyen el secado al aire y el prensado en caliente, mediante las cuales se obtiene celulosa bacteriana en forma de láminas planas.

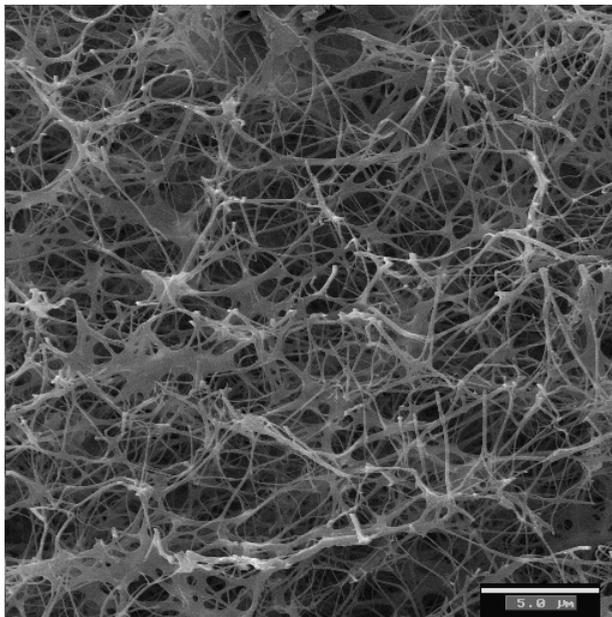


Figura 5. Vista de la parte superior de un gel de celulosa bacteriana liofilizado

1.3.4.2. Propiedades térmicas

Se ha determinado que la degradación de la celulosa bacteriana en estado puro y sin tratamiento inicia entre los 290 y 298 °C.

Asimismo, la temperatura de fusión es de 120.4 °C y la temperatura de transición vítrea (T_g) de 13.9 °C (Gea et. al., 2011; George et. al., 2005). Cabe señalar que cuando se realizan tratamientos alcalinos a los geles se obtiene una temperatura de transición vítrea en el rango de 41.4 °C a 48.8 °C, y se incrementa los valores de temperatura para la descomposición térmica, la cual se inicia en el rango entre 343.2 °C y 370.0 °C. (George et. al., 2005)

1.3.4.3. Propiedades mecánicas

Debido a su cristalinidad y estructura nanométrica, la celulosa bacteriana tiene excelentes propiedades mecánicas (Tabla 1), la cual la convierte en un material adecuado como refuerzo de diversos materiales. Cabe señalar que las propiedades mecánicas de la celulosa bacteriana han sido estudiadas principalmente para el caso de láminas secas. Los valores de módulo de elasticidad pueden variar entre 16 y 18 GPa de manera isotrópica, dependiendo si el método de secado es solo con aire o prensado en caliente. Asimismo, el esfuerzo a la tracción y la deformación de las láminas secas alcanzan 260 MPa y 2.1%, respectivamente (Yamanaka et. al., 1989). Cabe señalar que el proceso de limpieza de los geles de celulosa, una vez retirados del medio de cultivo, es importante para mejorar las propiedades mecánicas. Por ejemplo cuando se hace la limpieza de los geles utilizando hidróxido de sodio e hipoclorito de sodio, el módulo de elasticidad puede alcanzar valores de hasta 30

GPa (Nishi et. al., 1990) y llega a duplicar los valores de esfuerzo a la tracción respecto a las láminas que no presentan tratamiento alguno (Gea et. al., 2011). Este incremento en las propiedades se atribuye a que cuando se retiran las impurezas de la red de celulosa, se produce una mejor interacción entre las nanofibras.

Tabla 1. Propiedades mecánicas de celulosa bacteriana y otros materiales orgánicos (Yamanaka y Watanabe, 1994).

Material	Módulo de Elasticidad [GPa]	Esfuerzo a la tracción [MPa]	Elongación [%]
Celulosa Bacteriana	15-35	200-300	1.5-2-0
Polipropileno (PP)	1-1.5	30-40	100-600
Polietileno Tereftalato (PET)	3-4	50-70	50-300
Celofán	2-3	20-100	15-40

En el caso de análisis de geles de celulosa bacteriana sin secar, el módulo de elasticidad varía entre 8 y 12 MPa; y el esfuerzo a la tracción entre 15 y 20 MPa aproximadamente (Svensson et. al., 2005).

En términos de mediciones directas de las propiedades de las nanofibras de celulosa bacteriana, se ha determinado mediante las curvas de fuerza-deflexión, obtenidas al aplicar una fuerza conocida sobre la punta del cantiléver del microscopio de fuerza

atómica, que el módulo de elasticidad de las nanofibras es de 78 ± 17 GPa (Guhados et. al., 2005). Por otro lado, Hsieh et. al. (2008) usando espectroscopía de Raman, demostraron mediante la deformación molecular originada por el desplazamiento en una banda correspondiente al estiramiento del enlace glicosídico, que el módulo de elasticidad de las nanofibras de celulosa bacteriana es de 114 GPa. La diferencia entre ambos resultados puede ser atribuida a que Guhados et. al. obtuvieron el módulo de elasticidad en flexión, mientras que Hsieh et. al., lo obtuvieron en tensión.

1.3.4.4. Otras propiedades

La solubilidad de la celulosa depende de varios factores especialmente de su estructura, peso molecular y origen. Con el objetivo de disolver la celulosa bacteriana se utilizan algunos ácidos concentrados tales como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido nítrico (Chawla et. al., 2009). Asimismo, se alcanza la disolución usando una solución de 8.5% de NaOH y la solubilidad se incrementa mediante la adición de 1% de urea (Laszkiewicz, 1998). La solubilidad de la celulosa bacteriana es una propiedad importante a alcanzar en caso que se requiera aplicar técnicas de fabricación de fibras o regeneración.

Por otro lado, se ha demostrado que luego de ser liofilizada, la celulosa bacteriana puede ser rehidratada hasta el 70% de su contenido original de agua. Si la extracción inicial de agua ha sido hecha mediante secado al aire, la celulosa bacteriana solo se rehidratará al mismo nivel de contenido de agua que el que ocurre

con la celulosa de las plantas cuando es rehidratada, es decir 6%. Asimismo, si se somete a los geles a una extracción de agua para cambio de solvente, es posible introducir por ejemplo metanol, acetona, n-hexano, entre otros. El volumen de agua inicial se mantendrá una vez se haya realizado el intercambio de solvente, manteniendo de esta manera el espaciamiento de poros y la estructura de la red de fibras (Klemm et. al., 2005).

1.3.5. Aplicaciones

Debido a sus buenas propiedades tales como alta pureza, alto grado de cristalinidad, resistencia a la tracción, alta temperatura de descomposición, alta capacidad de absorción de agua, capacidad de rehidratación, susceptibilidad a la biodegradación y solubilidad entre otras; la celulosa bacteriana puede ser utilizada en múltiples aplicaciones que incluyen la industria del papel, alimentaria, farmacéutica, optoelectrónica y textil. Las aplicaciones de la celulosa bacteriana se encuentran recopiladas a continuación.

1.3.5.1. Aplicaciones alimentarias

En la industria alimentaria se ha utilizado celulosa bacteriana como espesante para masas, estabilizante en la fabricación de helados, gelificante para la preparación de Tofu y Kamaboko, ambas comidas orientales a base soja y mariscos respectivamente; y como agente de suspensión de cocoa en bebidas a base de cacao (Okiyama et. al., 1992; Okiyama et. al., 1993). Asimismo, se ha utilizado como emulsificante, cuyo principal atributo es el bajo

contenido de grasas, en la producción de albóndiga (Lin y Lin, 2004) y Surimi (Lin et. al., 2011), alimento de origen japonés a base de pescados y aves de corral.

En Filipinas e Indonesia se produce un alimento tradicional conocido como "nata de coco" a partir de geles de celulosa bacteriana que fermentan en un medio de cultivo basado en el jugo del fruto (Iguchi et. al., 2000). Por otro lado, existe una bebida preparada a partir del gel de celulosa cultivado en té azucarado. Aunque no hay evidencia científica sólida de los efectos, esta bebida se utiliza con fines dietéticos y medicinales. Este gel de celulosa conocido como "kombucha" u "hongo de té" crece en presencia de bacterias (*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*) que comparten el medio de cultivo con hongos (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*) (Sreeramulu et. al., 2000).

Aunque existen diversas aplicaciones en las que se puede utilizar la celulosa bacteriana en la industria alimentaria de manera potencial, se presentan algunos retos por superar, principalmente relacionados con los costes de producción y mejora de la productividad.

1.3.5.2. Aplicaciones farmacéuticas

Debido principalmente a las propiedades mecánicas, morfología y permeabilidad, la celulosa bacteriana representa un soporte

adecuado para la inclusión de fármacos y el desarrollo de sistemas de liberación controlada transdérmica y oral.

Los primeros estudios para aplicaciones transdérmicas llevados a cabo in vitro demuestran que la forma enantiómera S del propranolol, fármaco utilizado principalmente en el tratamiento de la hipertensión y ansiedad, puede ser liberado de forma controlada hacia la piel a partir de un material compuesto de celulosa bacteriana y metacrilato (Bodhibukkana et. al., 2006). Estudios in vitro desarrollados posteriormente (Trovatti et. al., 2011; Trovatti et. al. 2012; Silva et. al., 2014) demuestran que las formulaciones comerciales de clorhidrato de lidocaína, ibuprofeno y diclofenaco pueden distribuirse de manera uniforme dentro las membranas de celulosa bacteriana. Los ratios de permeabilidad sobre tejido epitelial humano que se han reportado usando celulosa bacteriana se encuentran en el orden de aquellos que tienen los sistemas convencionales. Asimismo, estudios de biocompatibilidad en pruebas desarrolladas in vivo con seres humanos, demuestran la buena tolerancia de la piel a los parches transdérmicos de celulosa bacteriana para diversas aplicaciones farmacéuticas (Almeida et. al., 2014)

Dado que las aplicaciones para sistemas transdérmicos están relacionadas también con el tratamiento de quemaduras y heridas, las láminas de celulosa bacteriana presentan propiedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, cuando han sido inmersas en cloruro de benzalconio (Wei et. al., 2011). Asimismo, la inclusión de nanopartículas de plata (Jung et. al.,

2009; Pinto et. al., 2009) confieren al material propiedades antimicrobianas contra los dos tipos de bacterias descritos así como *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, todas comunes en heridas contaminadas.

Respecto a aplicaciones de liberación controlada para vía oral, se ha demostrado el uso de celulosa bacteriana como soporte para la liberación controlada de hidrocloreto de berberina y sulfato de berberina, sustancias con propiedades antibacterianas y antiinflamatorias, a diferentes velocidades según el tipo de fluido simulado, ya sea gástrico o intestinal (Huang et. al., 2013). Asimismo, existen aplicaciones como recubrimiento de tabletas de paracetamol a partir de dispersiones de celulosa bacteriana y se demuestra un retardo en la liberación del fármaco (Amin et. al., 2012).

1.3.5.3. Aplicaciones optoelectrónicas

Las principales aplicaciones de celulosa bacteriana en sistemas optoelectrónicos están relacionadas con la fabricación de sustratos tales como displays flexibles usando resinas acrílicas, fenólicas, fenol formaldehído (Yano et. al., 2005) y poliuretano (Juntaro et. al., 2012), displays fabricados en base a electrodos transparentes y sustratos de celulosa con propiedades de semiconductores eléctricos (Shah and Brown, 2005), y diodos orgánicos de emisión de luz (OLED) (Legnani et. al., 2008).

La transmitancia de luz de la celulosa bacteriana y los compuestos formados a partir de este material dependen de la longitud de onda, el espesor de los films, la fracción de celulosa y el índice de refracción de los materiales (Nogi et. al., 2005; Yano et. al., 2005). En el caso de films puros de celulosa bacteriana, los valores de transmitancia de luz son menores al 50%. Sin embargo cuando se impregna con resinas del tipo epóxica, acrílica, fenolformaldehído o poliuretano se alcanza transmitancias por encima de 80% en el espectro visible (Ummartyotin et. al., 2012). Estos valores de transmitancia se encuentran en el orden de aquellos que presentan films de resina acrílica que alcanzan hasta 90% (Nogi y Yano, 2008). De esta manera, la transmitancia de los films disminuye pero se alcanza mejoras en las propiedades mecánicas de al menos 20% para el esfuerzo a la tracción y 11% para el módulo de elasticidad (Yano et. al., 2005) respecto a resinas comerciales.

Con el objetivo de mejorar la transparencia de los compuestos, Ifuku et. al., (2007) demostraron que el proceso de acetilación, utilizado para reducir la higroscopicidad de la celulosa bacteriana, incrementa estos valores dependiendo de la resina matriz así como el grado de acetilación.

1.3.5.4. Aplicaciones misceláneas

En general las primeras aplicaciones de celulosa bacteriana se realizaron en colaboración con compañías tales como Mitsubishi Paper Mills y Ajinomoto Co. a finales de la década de 1980. Los

primeros reportes indican que los fragmentos de celulosa bacteriana desintegrados mecánicamente proporcionan una mejor resistencia a la pulpa de papel y a la pulpa de algodón (Yamanaka et. al., 1989) y a la vez pueden ser utilizados como aglutinante (Brown, 1998). Estas aplicaciones están basadas en el beneficio de las buenas propiedades mecánicas de la celulosa bacteriana respecto a otros materiales, tales como el esfuerzo a la tracción, el módulo de elasticidad y la resistencia al doblez.

Asimismo, debido a la buena estabilidad dimensional se utiliza celulosa bacteriana para la fabricación de diafragmas acústicos. Estos productos mantienen una alta velocidad de sonido, comparable con aquellos hechos a partir titanio o aluminio, en un amplio rango de frecuencias (Ichimura et. al., 1988). Por otro lado debido al arreglo tridimensional de las fibras de celulosa, Shibazaki et al. (1994) evalúan las propiedades de filtración y demuestran la utilidad de la celulosa bacteriana como membrana para diálisis las cuales presentan mayor índice de permeabilidad y resistencia mecánica en comparación con membranas de diálisis comerciales de celulosa regenerada.

1.3.6. Aplicaciones Biomédicas

Existen varios factores por los cuales la celulosa bacteriana es un material adecuado para ser utilizado en aplicaciones biomédicas. Uno de los principales es la biocompatibilidad, propiedad por la cual el material se mantiene en contacto con sistemas biológicos

sin causar efectos perjudiciales o tóxicos. Asimismo, presenta una extensa área superficial, cubierta por las nano/microfibras, la cual junto con el agua alojada, mantiene un alto nivel de conformabilidad. Estas dos propiedades junto a la buena estabilidad química, el control de las formas en la fabricación de diversas estructuras para implante y las buenas propiedades mecánicas (importantes para otro tipo de aplicaciones), hacen que el material pueda ser aplicado principalmente como estructura soporte de células, también conocido como scaffold, para la i) regeneración de tejidos in-vivo y ii) regeneración de tejidos in-vitro.

1.3.6.1. Aplicaciones biomédicas In vivo

Los primeros reportes del uso de celulosa bacteriana para regeneración de tejidos in-vivo están relacionados con el tratamiento de quemaduras y la cicatrización de heridas (Ribeiro et. al., 1987; Fontana et. al., 1990). En el proceso de cicatrización ocurren una serie de fenómenos para la reparación del daño, los cuales pueden ser divididos en una primera fase inflamatoria (eliminación de bacterias), seguida de la fase proliferativa y una tercera fase de remodelación. Es en la fase proliferativa donde ocurre la mayor cantidad de subprocesos y en la que las células que formarán el tejido se sitúan en los scaffolds para llevar a cabo el proceso de regeneración.

El estudio de Alvarez et. al. (2004) en el tratamiento de insuficiencia venosa crónica y ulceraciones en la parte baja de las piernas demuestran que los vendajes de heridas hechos a partir de celulosa bacteriana (XCell®) forman el tejido granular más rápido, aceleran la eliminación de tejido no viable y reducen el dolor en comparación con los vendajes convencionales de acetato de celulosa. De manera similar, existen estudios en los que se ha tratado pacientes con quemaduras severas de segundo grado (Czaja et. al., 2006; Czaja et. al., 2007), en los cuales se demuestra que el uso de membranas de celulosa bacteriana produce una cicatrización más rápida y además se resalta las propiedades de moldeo en la superficie de las heridas y la reducción en la formación de cicatrices.

Asimismo, se ha llevado a cabo estudios de celulosa bacteriana en aplicaciones de regeneración tisular guiada, la cual es una técnica quirúrgica dental mediante la cual se regenera el hueso y encías en lugares de dimensiones o volúmenes insuficientes para el funcionamiento adecuado. En el tratamiento de enfermedades periodontales se ha demostrado la eficacia de membranas de barrera de celulosa bacteriana en comparación con otras de Teflón (Dos Anjos et. al., 1998), así como la regeneración de tejido óseo luego de ocho semanas de implante en estudios con animales (Novaes et. al., 1993).

Otra de las aplicaciones in-vivo de celulosa bacteriana es la fabricación de formas tubulares como alternativa de reemplazo de vasos sanguíneos. En el estudio de Klemm et. al. (2001) se

demuestra que el material cumple con las condiciones de esfuerzo mecánico y presión interna. Además de presentar una buena interacción con el tejido existente, en los diámetros internos de los tubos de celulosa bacteriana se forma el tejido celular conocido como endotelio, que finalmente estará en contacto con la sangre. Por otro lado, Helenius et. al. (2005) observan el crecimiento celular, una buena integración del material con el tejido receptor y sin reacciones inflamatorias cuando se implanta geles de celulosa bacteriana de forma subcutánea. A través de estos dos estudios aplicados en ratas queda demostrada la funcionalidad de la celulosa bacteriana como material a ser aplicado en ingeniería de tejidos.

1.3.6.2. Aplicaciones biomédicas In vitro

Con el objetivo de reparar o reemplazar principalmente tejidos óseos y cartilagosos de manera eficiente, recientemente se han venido aplicando celulosa bacteriana in vitro utilizando varios enfoques de la ingeniería de tejidos, tales como la modificación de la microestructura para una mejor proliferación celular (Andersson et. al., 2010, Zaborowska et. al., 2010) y la inclusión de péptidos de tal manera que se mejore la interacción superficie-células.

Respecto a aplicaciones in vitro para ingeniería de tejido de hueso, a partir del primer día de crecimiento de osteoblastos en celulosa bacteriana, se inicia la formación de colágeno y la mineralización del tejido (Brackmann et. al., 2011). La hidroxiapatita se utiliza en la regeneración de hueso y dientes, y como recubrimiento para

promover el crecimiento de tejido óseo en implantes. La presencia de hidroxapatita en los sustratos de celulosa bacteriana mejora la adhesión (Zimmermann et. al., 2011) y el crecimiento de diversos tipos de células tales como osteoblastos (Tazi et. al., 2012) y células estromales de médula ósea (Fang et. al., 2009), respecto a sustratos que no contienen el mineral.

Por otro lado y con el objetivo de mejorar la adhesión celular en los sustratos de celulosa bacteriana, se puede aplicar varias técnicas de modificación superficial. Una de ellas consiste en recubrir las superficies del sustrato con un conjugado del tripéptido RGD (arginina-glicina-aspartato), los cuales mejoran la adhesión de las células con la superficie de celulosa bacteriana (Bodin et. al., 2007). Específicamente el uso de péptidos de crecimiento osteogénico (OGP, osteogenic growth peptide) mejora la proliferación de osteoblastos y el proceso de mineralización (Saska et. al., 2012); y el uso de proteínas quiméricas que consisten de más de dos subunidades polipeptídicas tales como el módulo de unión a celulosa (CBM, cellulose binding module) y la secuencia de adhesión RGD, también mejoran la adhesión celular. En este último caso la proteína resultante, que es obtenida mediante clonación y expresión en *E. Coli*, ha sido eficientemente utilizada en otras aplicaciones in vitro con fibroblastos (Andrade et. al., 2010a), células endoteliales vasculares (Andrade et. al., 2010b) y células neuronales y mesenquimales (Pétille et. al., 2012).

Otra de las mayores aplicaciones de celulosa bacteriana in vitro está relacionada con la ingeniería de tejido de cartílago. La

estructura original de celulosa bacteriana puede mantener la proliferación de condrocitos y las propiedades mecánicas requeridas para el desarrollo del tejido cartilaginoso (Svensson et. al., 2005).

Las células madre mesenquimales son células pluripotenciales primitivas que tienen la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células, incluyendo osteocitos, condrocitos, adipocitos, cardiomiocitos y otras. Un enfoque actual de la ingeniería de tejidos está relacionada con el uso de células madre mesenquimales dado el diverso rango de necesidades médicas. Se ha demostrado la viabilidad y actividad metabólica de este tipo de células en hidrogeles basados en celulosa bacteriana (Favi et. al., 2013).

Por otro lado, Yadav et. al. (2011) han reportado la fabricación de celulosa bacteriana incluyendo la asimilación de N-acetylglucosamina como fuente de carbón durante la biosíntesis. De esta manera, el biopolímero obtenido responde de manera adecuada a la adhesión y proliferación celular, y tiene la propiedad especial de que puede degradarse en el cuerpo humano cuando sea utilizado in vivo (Yadav et. al., 2013).

Otras aplicaciones in vitro de celulosa bacteriana incluyen el uso de células que cumplen funciones neuronales (Innala et. al., 2013), células de músculo liso (Backdahl et. al., 2006), fibroblastos y queratinocitos (Sanchavanakit et. al., 2006).

1.4. Estructura y Alcances de la tesis

La tesis está compuesta de siete capítulos que se describen brevemente a continuación.

En el Capítulo 1 se hace una revisión de la estructura y propiedades de la celulosa así como sus diversas formas de estructuras nanométricas existentes. Asimismo se detalla el mecanismo de biosíntesis de celulosa en microorganismos, en el cual se incluye la formación de las cadenas de glucano β -1,4, a partir de fuentes de carbono; y el posterior ensamblaje de las cadenas para la formación del arreglo tridimensional de fibras. Las propiedades y diversas aplicaciones de la celulosa bacteriana son parte de este capítulo.

Las diferentes técnicas de fabricación de nanocompuestos se describen en el Capítulo 2. De esta manera se pone énfasis en los métodos "de arriba a abajo" (top-down) y "de abajo a arriba" (bottom-up). Cabe señalar que los métodos de fabricación "de abajo a arriba" para la fabricación de nanocompuestos basados en celulosa bacteriana son utilizados en este trabajo de tesis.

El primer método de fabricación de nanocompuestos "de abajo a arriba" usando celulosa bacteriana se describe en el Capítulo 3. Para ello se incluye una fase orgánica (almidón) en el medio de cultivo de los microorganismos para que se inicie el autoensamblaje de las fibras de celulosa, y de esta manera se forme el material compuesto. La técnica utilizada en este capítulo puede ser extendida para la adición de otros materiales en la red de celulosa

bacteriana. Como parte de este capítulo se reporta las propiedades físico-químicas, mecánicas y morfológicas de los compuestos de celulosa bacteriana-almidón que se obtienen.

En el Capítulo 4 se desarrollan nanocompuestos de celulosa bacteriana-hidroxiapatita utilizando el mismo principio de autoensamblaje de las fibras de celulosa. Esta vez las fibras de celulosa se forman en el medio de cultivo de los microorganismos productores en presencia de una fase mineral (hidroxiapatita), la cual se mantiene en suspensión durante el tiempo que dura la biosíntesis. Los materiales compuestos obtenidos son analizados mediante diversas técnicas para caracterizar de manera morfológica, térmica y físico-química. Asimismo, se demuestra la biocompatibilidad, viabilidad y proliferación celular en los sustratos obtenidos.

Debido a que los sustratos basados en celulosa bacteriana son adecuados para la fabricación de estructuras soporte para la ingeniería de tejidos, es muy importante mejorar las propiedades de adhesión celular que presentan. Por ello, en el Capítulo 5 se reporta la modificación superficial de la celulosa bacteriana mediante la inclusión de dos factores de crecimiento celular: colágeno y poli-L-lisina. De esta manera se logra una mejor adhesión y metabolismo celular en los sustratos.

En el Capítulo 6, se presenta las conclusiones generales de la tesis y en el Capítulo 7 se presenta las referencias utilizadas en todo el trabajo.

Capítulo 2

**Técnicas de Fabricación
de Nanocompuestos de
Celulosa Bacteriana**

CAPÍTULO 2. TÉCNICAS DE FABRICACIÓN DE NANOCOMPUESTOS DE CELULOSA BACTERIANA

En general, en la construcción de nanocompuestos se utilizan dos tipos de métodos de fabricación. Mediante el enfoque Top-Down (de arriba a abajo), a partir de los componentes macroscópicos de sistemas complejos se pueden construir materiales en escalas nanométricas usando medios mecánicos, químicos u otros.

Por otro lado mediante el enfoque Bottom-Up (de abajo hacia arriba) los nanomateriales son sintetizados a través de reacciones químicas y a partir de componentes moleculares, e incluso atómicos (Zhang, 2003).

2.1. Fabricación de nanocompuestos mediante Técnicas Bottom-Up

Las técnicas de fabricación con un enfoque Bottom-Up se agrupan a la vez en tres categorías: i) síntesis química, ii) ensamblaje posicional, y iii) autoensamblaje (self-assembly) (Varadan et. al., 2010).

2.1.1. Síntesis química

La síntesis química se refiere a los métodos utilizados para la fabricación de materiales de partida, tales como moléculas o nanopartículas, los cuales posteriormente se utilizarán

directamente con otros productos o como precursores de materiales más ordenados. Algunos ejemplos comunes de nanomateriales obtenidos por síntesis química son el dióxido de titanio, el óxido de zinc, los nanotubos de carbono y la nanohidroxiapatita.

2.1.2. Ensamblaje posicional

El ensamblaje posicional es la única técnica capaz de manipular y posicionar átomos y moléculas uno a uno. Algunos ejemplos de técnicas con este enfoque son la microscopía de sonda de barrido (SPM por sus siglas en inglés, Scanning Probe Microscopy) para el estudio de superficies (Bottomley et. al., 1998), así como las pinzas ópticas para el estudio de materiales en volumen (Moffitt et. al., 2008). Dado que actualmente esta técnica es considerada laboriosa, no se considera adecuada para procesos industriales.

2.1.3. Autoensamblaje

La tercera técnica para la fabricación de nanomateriales es el autoensamblaje. Mediante esta técnica, los átomos o moléculas se arreglan por sí mismos y de manera espontánea para formar estructuras ordenadas mediante interacciones físicas o químicas.

Entre los ejemplos más comunes de autoensamblaje que ocurre en la naturaleza se encuentra la formación del hueso, el cual en sus niveles más reducidos de estructura jerárquica presenta el componente orgánico formado por las fibras de colágeno, el cual a su vez está compuesto de una triple hélice de tres cadenas polipeptídicas, y el componente mineral o hidroxiapatita, cuyos

cristales crecen dentro de las fibras de colágeno con sus respectivos ejes orientados a lo largo de las fibras.

Otro ejemplo de autoensamblaje en la naturaleza ocurre con el nácar, cuya estructura consiste de aproximadamente 95% en volumen de plaquetas de aragonita (CaCO_3) separadas por 5% de capas de biopolímeros, formando entre ambos componentes un arreglo del tipo "ladrillo y cemento" similar a una pared donde los ladrillos componen la parte inorgánica y el cemento la parte orgánica. Asimismo, en la parte orgánica existen puentes minerales que hacen que se conecten las plaquetas de aragonita. La estructura del nácar exhibe una dureza de entre dos y tres órdenes de magnitud mayor que su constituyente fase mineral (Kamat et. al., 2000) y su mecanismo de formación se origina con las células epiteliales las cuales secretan los componentes requeridos para la formación de CaCO_3 así como algunas proteínas y polisacáridos.

Aunque el autoensamblaje ha ocurrido en la naturaleza durante miles de años, la tendencia en el uso de diversas técnicas y procedimientos para la formación de materiales autoensamblados a nivel molecular es relativamente nueva. El control en la formación de las nanoestructuras da lugar a materiales con especiales características y las aplicaciones se encuentran en los campos de la manufactura, robótica, software y principalmente en las ciencias de los materiales y la biología.

2.2. Fabricación de nanocompuestos basados en celulosa bacteriana

La fabricación de nanocompuestos basados en celulosa bacteriana comúnmente ha sido llevada a cabo mediante técnicas en las que se combinan los componentes de tres maneras: i) utilizando los geles en estado hidratado y agregando la segunda fase sin alterar la primera; ii) utilizando las láminas o estructuras que se obtienen al secar los geles para luego incluir la segunda fase; y iii) solubilizando los geles o estructuras y regenerando mediante un segundo proceso.

Sin embargo recientemente se ha reportado diferentes nanocompuestos celulósicos obtenidos mediante técnicas del tipo Bottom-Up a partir de *Gluconacetobacter*. Estos compuestos se han desarrollado mediante autoensamblaje.

Cabe señalar que en todos los casos de fabricación Top-Down o Bottom-Up descritos a continuación, la celulosa bacteriana crece en medios estáticos. Como se ha descrito, los cultivos en medios estáticos son los más utilizados en las investigaciones con celulosa bacteriana. Asimismo la celulosa sintetizada en este tipo de medios presenta mejores propiedades mecánicas, índice de cristalinidad y grado de polimerización que la celulosa obtenida a partir de medios de cultivo agitados.

2.2.1. Fabricación de nanocompuestos de celulosa bacteriana mediante métodos Top-Down

2.2.1.1. A partir de los geles hidratados

El método que más se emplea para la fabricación de materiales compuestos basados en celulosa bacteriana es utilizar los geles que producen las cepas de la especie *Gluconacetobacter*, y agregar la segunda fase ex situ. Comúnmente la segunda fase se encuentra en disolución y los geles se sumergen, en algunos casos se entrecruzan, y luego se secan para obtener el material compuesto.

Asimismo, la formación de la segunda fase se puede alcanzar in situ, es decir utilizando los geles para la formación interna del segundo componente. Ejemplos de este segundo método son la formación de partículas metálicas en las redes de celulosa mediante diferentes reacciones a las que son sometidos los geles y formación de nanopartículas tales como sílice o hidroxiapatita imitando algún proceso que ocurre en la naturaleza (biomimética).

Un tercer método de tratamiento de los geles para la formación de los compuestos es desintegrando y mezclando los componentes para luego formar por lo general láminas del material compuesto.

Mediante el primer método descrito, se ha reportado materiales compuestos de celulosa bacteriana con ácido acrílico para aplicaciones de membranas con capacidad de intercambio iónico (Choi et. al., 2004), con poliacrilamida (Yasuda et. al., 2005) y metacrilato (Hobzova et. al., 2012) para mejorar las propiedades mecánicas y utilizar en aplicaciones biomédicas, con alcohol de

polivinilo (PVA) para la formación de materiales reforzados, con buenas propiedades de transparencia (Gea et. al., 2010) y que puedan aplicarse como reemplazo de vasos sanguíneos (Millon et. al., 2006), con polietilenglicol (PEG) y polihidroxibutirato (PHB) por separado para obtener estructuras liofilizadas que sirvan como matriz extracelular en aplicaciones biomédicas (Kim et. al., 2010; Cai y Kim, 2010; Cai et. al., 2011), con ácido poliláctico (PLA) prensando en caliente los geles entre láminas de PLA para obtener un material con mejores propiedades mecánicas respecto al PLA manteniendo la transparencia (Quero et. al., 2011).

Asimismo, se han fabricado compuestos de celulosa bacteriana con gelatina para mejorar sus propiedades mecánicas para aplicaciones de reemplazo de cartílago (Nakayama et. al., 2004; Kim et. al., 2009), con quitosano, el cual es también un biopolímero que presenta buenas propiedades antimicrobianas y antimicóticas así como una alta capacidad de absorción de exudados en el proceso de cicatrización de heridas (Dubey et. al., 2004; Kim et. al., 2010; Ul Islam et. al., 2011), con fibrina con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas y elasticidad de los compuestos que será utilizados en aplicaciones de vasos sanguíneos (Brown et. al., 2011), con fibroína del capullo del gusano de seda de la especie *Bombyx mori* (Jung y Jin, 2007), y con colágeno para la obtención de estructuras con aplicaciones biomédicas (Cai y Guang, 2011).

Por otro lado, el uso de geles para la formación de compuestos a partir de metales y óxidos metálicos incluyen los compuestos de celulosa bacteriana con nanopartículas de plata (Maneerung et. al.,

2007; Sureshkumar et. al., 2010; Maria et. al., 2010) para aplicaciones como agentes antimicrobianos, con nanopartículas de oro (Zhang et. al., 2010) para aplicaciones de biosensores y con nanopartículas de dióxido de titanio (Gutierrez et. al., 2012). Respecto al uso de nanopartículas inorgánicas o previamente sintetizadas para la formación de compuestos, se incluyen aquellos formados a partir de la inmersión de celulosa bacteriana en soluciones de nanotubos de carbono (Yoon et. al., 2006), nanopartículas de sílice (Yano et. al., 2008) y montomorillonita (Ul Islam et. al., 2012; Ul Islam et. al., 2013)

Es importante resaltar que la formación de compuestos a partir de los geles hidratados puede tener un enfoque biomimético. Es decir, se puede lograr compuestos al sumergir los geles en soluciones que contienen los componentes finales o iónicos de la segunda fase y a la vez se imita algún comportamiento que ocurre en la naturaleza. Por ejemplo, Hutchens et. al. (2007) reportan la formación ordenada de partículas de hidroxiapatita deficiente en calcio mediante la incubación repetitiva de los geles en soluciones de calcio y fosfato. Asimismo, los cristales de apatita que se forman son similares e imitan en geometría a aquellos que se forman en los huesos por los procesos naturales de biomineralización. De manera similar, Hong et. al. (2006), Wan et. al. (2006), y Zimmermann et. al. (2011) consideran la incubación de los geles en cloruro de calcio y luego la formación de los cristales de apatita en soluciones de fluido corporal simulado (SBF), la cual es una

solución con concentración iónica similar a la del plasma de la sangre humana.

Otras investigaciones han desarrollado la introducción de una fase de sílice mediante la incorporación de los materiales de partida en los geles de celulosa simulando el proceso de biomineralización que ocurre en plantas cuando la sílice es transferida desde el suelo y depositada en las matrices de polisacáridos (Maeda et. al., 2006; Barud et. al., 2008)

Finalmente, el tercer método para fabricar compuestos basados en los geles de celulosa es manteniéndolos en su estado original hidratado y mezclando luego ambos componentes desintegrados. De esta manera los geles de celulosa bacteriana se han triturado y mezclado con pulpa de rábano y manzana para la posterior fabricación de láminas secas (Gea et. al., 2007), con PLA en los cuales se mejoran las propiedades mecánicas de la celulosa debido a la buena dispersión de las fibras obtenida por el proceso de acetilación (Tome et. al., 2011), con almidón de maíz para luego procesar mediante moldeo por inyección y así mejorar el módulo de elasticidad y elongación respecto a compuestos de almidón con fibras vegetales (Martins et. al., 2009), con almidón de yuca para posteriormente vaciar y secar al vacío e incrementar de esta manera el módulo de elasticidad y esfuerzo a la tracción del almidón (Woehl et. al., 2010) y con alginato para posteriormente vaciar, entrecruzar con cloruro de calcio y secar para la formación de estructuras porosas que tengan aplicaciones biomédicas (Chiaoprakobkij et. al., 2011).

2.2.1.2. A partir de láminas o estructuras secas

Los materiales compuestos en los que se utiliza estructuras de celulosa bacteriana seca han sido desarrollados principalmente para aplicaciones en las que es importante mantener la transparencia de las resinas incrementando la resistencia mecánica, tales como displays flexibles y diodos de emisión de luz.

El método de fabricación de estos materiales consiste en secar los hidrogeles e impregnarlos con resinas. En el caso de las resinas termofijas se secarán mediante curado y en el caso de otros polímeros el secado se realiza al aire o mediante separación de fases.

Por ejemplo se ha reportado la fabricación de materiales compuestos de láminas de celulosa bacteriana con acetato butirato de celulosa (CAB) en las que se incrementa el esfuerzo a la tracción y módulo de elasticidad respecto al CAB (Gindl y Keckes, 2004), con resinas de fenol formaldehído (Nakagaito et. al., 2005) con las que se obtiene mayor resistencia comparado con materiales compuestos basados en celulosa microfibrilar (MFC), con resinas acrílicas (Ifuku et. al., 2007) y fenólicas en las que se mejora la resistencia a la tracción y módulo de elasticidad de las resinas y se conserva la transparencia (Yano et. al., 2005), con almidón de trigo en las que se incrementan las propiedades mecánicas del almidón (Wan et. al., 2009), con PLA usando tanto láminas en las que se conserva la transparencia del PLA (Kim et. al., 2009) así como estructuras liofilizadas para la formación de microesferas mediante

separación de fases (Lee t. al., 2009), con policaprolactona (PCL) en las que se incrementa el esfuerzo a la tracción y módulo de elasticidad de la resina manteniendo la transparencia (Barud et. al., 2013), y con fibroína del capullo del gusano de seda para aplicaciones como elementos de fijación en huesos, en los que se incrementa el módulo de elasticidad a medida que aumenta la concentración de celulosa (Choi et. al., 2013).

2.2.1.3. A partir de la regeneración

La última categoría de fabricación de nanocompuestos de celulosa bacteriana mediante métodos Top-Down, se inicia con la disolución de celulosa ya sea en una misma solución junto a la segunda fase, o empleando la celulosa disuelta para formar el material compuesto ex situ.

De esta manera se ha reportado el recubrimiento de tubos de poliéster con celulosa bacteriana con el objetivo de preparar un material para dispositivos vasculares que reduzcan el riesgo de trombosis, (Charpentier et. al., 2006), y la fabricación de films obtenidos a partir de una disolución de celulosa bacteriana con quitosano los cuales presentan alta transparencia, flexibilidad y mejores propiedades mecánicas que los films de quitosano puro (Fernandes et. al., 2009).

Asimismo, a partir de una disolución de celulosa bacteriana y alginato se ha demostrado la fabricación de hilos extruidos y coagulados (Zhang y Luo, 2011), y de estructuras porosas obtenidas mediante secado supercrítico de dióxido de carbono que

tienen mejor capacidad de adsorción y permeabilidad que aquellas estructuras hechas a partir de celulosa bacteriana regenerada (Phisalaphong et. al., 2008).

2.2.2. Fabricación de nanocompuestos de celulosa bacteriana mediante métodos Bottom-Up

Una forma de alterar las propiedades de celulosa bacteriana ha sido la manipulación de la biosíntesis mediante la inclusión de otros polímeros o partículas en el medio de cultivo. Por ejemplo, Seifert et. al. (2004) reportaron que puede agregarse alcohol de polivinilo al medio de cultivo para producir un material con mejoras en la retención de agua y absorción iónica. De manera similar Ciechanska (2004) desarrolló un medio de cultivo de celulosa bacteriana enriquecido con quitosano para la formación de nuevos materiales con mejoras en las propiedades mecánicas.

Existen polisacáridos tales como el almidón y la laminarina cuya presencia en el medio no altera el proceso de biosíntesis y morfología de la celulosa bacteriana (Haigler et. al., 1982). Sin embargo, el proceso de ensamblaje de las fibras de celulosa puede ser alterado drásticamente por la presencia de blanqueadores ópticos, derivados de la celulosa y algunos otros polímeros solubles en el medio de cultivo, los cuales alteran la cristalización y formación de las fibras (Whitney et. al., 1995).

De esta manera, y de acuerdo a las propiedades y morfologías que ciertas aplicaciones requieran, se puede elegir entre una variedad de materiales para la fabricación de nanocompuestos con técnicas

Bottom-Up, cuyas propiedades finales puede ser “controladas” respecto de aquellos obtenidos por métodos convencionales. Por ejemplo, Gea et. al., (2010) desarrollaron nanocompuestos de celulosa bacteriana - alcohol de polivinilo (PVA) mediante: i) inmersión de los geles en una solución de PVA, y ii) mediante la inclusión de PVA en el medio de cultivo; manteniendo constante la concentración de PVA para ambos métodos. El contenido final de PVA de los nanocompuestos obtenidos mediante Bottom-Up y mediante impregnación fue de 1.4% y 3.7%, respectivamente, manteniéndose inalterable la estructura cristalina. Sin embargo la resistencia máxima a la tracción y el módulo de elasticidad de los films que fueron obtenidos mediante Bottom-Up es aproximadamente el doble en comparación con las correspondientes propiedades de aquellos films obtenidos mediante inmersión, debido a una mejor homogenización del PVA en la matriz de BC. Otra ventaja de los métodos Bottom-Up es la cantidad de nanopartículas de refuerzo que se pueden cargar en los compuestos. Yano et. al. (2008) demostraron que cuando los geles de celulosa bacteriana crecen en presencia de nanopartículas de sílice de entre 10 y 20 nm de diámetro, las láminas prensadas obtenidas tienen una concentración de hasta 50% (w/w) de sílice; mientras que cuando las nanopartículas se incorporan mediante inmersión, la concentración máxima de nanopartículas en las láminas es de 10% (w/w).

Otros materiales han sido también incorporados al medio de cultivo de *Gluconacetobacter* para la obtención de algunas mejoras o

usos principalmente en aplicaciones biomédicas. Así por ejemplo, óxido de polietileno (PEO) para aplicaciones biomédicas (Brown y Laborie, 2007), colágeno (Luo et. al., 2008) para mejorar las propiedades de adhesión celular de los sustratos, quitosano (Phisalaphong, 2008) y Aloe vera (Saibuatong, 2010) para incrementar las propiedades mecánicas de la celulosa bacteriana, alginato sódico (Kanjamosit, 2010) y gelatina (Taokaew, 2013) mediante los cuales las propiedades mecánicas de la celulosa bacteriana se reducen incrementando la capacidad de absorción de agua. De manera similar se ha incorporado nanopartículas a los medios de cultivo con el objetivo que permanezcan en los compuestos finales. Algunos ejemplos son la inclusión de nanopartículas de anatasa - dióxido de titanio (Wesarg, 2012) y la inclusión de nanotubos de carbono (Yan et. al., 2008).

Capítulo 3

Formación de

Nanocompuestos de

Celulosa Bacteriana y Almidón

CAPÍTULO 3. FORMACIÓN DE NANOCOMPUESTOS DE CELULOSA BACTERIANA Y ALMIDÓN

3.1. Nanocompuestos de celulosa y almidón

Tal como se ha revisado en el capítulo anterior, la mayoría de las investigaciones relacionadas con la fabricación de materiales compuestos basados en celulosa bacteriana utilizan métodos convencionales de fabricación. En ellos se mezcla la celulosa bacteriana con la segunda fase, una vez terminado el proceso de formación de las nanofibras de celulosa.

Algunos de los métodos involucran la fabricación de compuestos a partir de hidrogeles desintegrados, los cuales al contener las nanofibras en su estructura, son utilizados como nanorefuerzos convencionales. Otros métodos de fabricación utilizan los hidrogeles sin desintegrar, y otras investigaciones utilizan los geles deshidratados en forma de films para la formación de materiales de más de una fase.

El objetivo de este capítulo no es producir un material compuesto para mejorar las propiedades mecánicas de una matriz polimérica sino desarrollar una técnica para la producción de nanocompuestos. Para ello se utiliza el enfoque Bottom-Up, que se encuentra en la biosíntesis de celulosa bacteriana, para producir un

nanocompuesto autoensamblado mediante la adición de almidón nativo en la red de nanofibras.

El almidón está sujeto a un proceso denominado gelatinización (el cual es descrito con mayor precisión en 3.3.) el cual permite la difusión controlada de las cadenas poliméricas en la red de fibras existente. Esta propiedad “inteligente” del almidón es un tema clave en la producción de estos nanocompuestos bioinspirados, y como resultado se obtiene un material con una alta fracción volumétrica de la fase más resistente, en este caso las nanofibras de celulosa bacteriana, cubiertas de la fase de almidón.

Considerando que tanto el almidón como la celulosa bacteriana tienen potenciales aplicaciones como biomateriales, los compuestos producidos con el método desarrollado en este capítulo, pueden tener una variedad de aplicaciones biomédicas. Asimismo, la técnica presentada puede ser extendida para la adición de otro tipo de materiales a la red de celulosa bacteriana tal como se detallará en el capítulo 4.

El primer método de fabricación de nanocompuestos "de abajo a arriba" usando celulosa bacteriana se describe en el Capítulo 3. Para ello se incluye una fase orgánica (almidón) en el medio de cultivo de los microorganismos para que se inicie el autoensamblaje de las fibras de celulosa, y de esta manera se forme el material compuesto. Asimismo, a nuestro mejor entender es el primer reporte de materiales compuestos de celulosa bacteriana-almidón. Como parte de este capítulo se reporta las propiedades físico-

químicas, mecánicas y morfológicas de los compuestos que se obtienen.

3.2. Experimental

3.2.1. Materiales

Para la preparación de los nanocompuestos basados en celulosa se utilizó almidón de papa y almidón de maíz para la industria alimentaria (Negrita, Perú).

La cepa de la especie *Gluconacetobacter saccharivorans* fue cultivada en un medio estático conteniendo 1.0% (w/v) D-Glucosa anhidra (Scharlau), 1.5% (w/v) peptona (Scharlau), 0.8% (w/v) extracto de levadura (Scharlau) y 0.3% (v/v) de ácido acético glacial (Scharlau); y con pH ajustado en 3.5 con ácido clorhídrico al 37% (Scharlau). El medio de cultivo fue autoclavado a 121 °C durante 20 minutos y luego dejado a enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 0.01% (w/v) de cicloheximida (Acros Organics) y 0.5% (w/v) de etanol absoluto (Scharlau). La cicloheximida y el etanol se agregan después de esterilizar el medio de cultivo para evitar el punto de fusión (107 - 114 °C) y el punto de ebullición (78.3 °C), respectivamente.

3.2.2. Preparación de los nanocompuestos

El almidón de maíz y de papa fueron agregados por separado a un medio de cultivo nuevo a una concentración de 2.0% (w/v). Los medios de cultivo enriquecidos con almidón fueron autoclavados a 121 °C durante 20 minutos. Los geles de celulosa-almidón fueron

retirados de la interfase y lavados en tres etapas: 1) con agua destilada; ii) en una solución de NaOH al 5% (w/v) durante 40 minutos y iii) en una solución de NaOCl al 2.5% (w/v) durante 12 horas. Finalmente los geles fueron enjuagados repetidamente usando agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. Las muestras fueron comprimidas en una prensa hidráulica Collins a 105 °C para la producción de láminas.

Se preparó por separado láminas de celulosa pura y láminas de almidón de maíz y de papa.

3.2.3. Caracterización cristalográfica y físico química: Difracción de Rayos X y Espectroscopía mediante infrarrojos

Los espectros de difracción de rayos X fueron registrados usando un difractómetro Seifert XRD 3003 TT. La radiación $\text{CuK}\alpha$ utilizada (filtro de Ni; longitud de onda de 0.1542 nm) fue producida a 40 kV y 40 mA. La radiación dispersa fue detectada en el rango angular de $2.5 - 40^\circ (2\theta)$ en intervalos de 0.08° y tiempo de medida de 5 segundos por cada intervalo de 2θ (0.016° por segundo).

Los datos fueron analizados usando los softwares ANALYZE y DRXWin. Los espaciamentos -d de los picos principales fueron calculados de acuerdo a la Ley de Bragg. Los tamaños de cristales fueron determinados usando el valor de la anchura a media altura

del pico (FWHM, Full Width at Half Maximum) en la ecuación de Scherrer:

$$t = \frac{0.89 \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (1)$$

donde λ es la longitud de onda de la radiación (0.1542 nm), β es la anchura a media altura (en radianes) y θ es la mitad del ángulo de difracción en el plano de análisis.

El grado de cristalinidad de las muestras fue estimado usando el método de Nara y Komiya (Nara y Komiya, 1983) el cual brevemente se describe a continuación. Se traza una curva regular que une a los puntos más bajos del difractograma. El área sobre la curva trazada para cada plano cristalino (área del pico de difracción) corresponde a la porción cristalina; mientras que el área entre la curva trazada y la línea que une a los dos puntos más bajos de todo el difractograma corresponde a la sección amorfa. El grado de cristalinidad será el ratio del área del pico de difracción entre el área total de difracción.

Para el caso de celulosa bacteriana pura, la curva descrita pasa por dos puntos ($2\theta = 8.3^\circ$ y 28°), mientras que en el caso de las muestras de celulosa con almidón (tanto de maíz como de papa) la curva pasa por tres puntos ($2\theta = 4.5^\circ$, 8.3° y 28°)

Por otro lado, los espectros de infrarrojos basados en reflexión total atenuada (ATR-FTIR, Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy) fueron obtenidos usando un espectrofotómetro Nicolet Nexus 470 mediante el promedio de 64

barridos a una resolución de 8 cm^{-1} en el rango $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Los datos fueron analizados usando el software OMNIC.

3.2.4. Caracterización mecánica: Ensayos de tracción

Los ensayos de tracción fueron llevados a cabo en una máquina de tracción MTS Synergie 200. Las muestras utilizadas fueron bandas rectangulares (40 mm x 5 mm) de muestras comprimidas y secas ($N=5$). Se utilizó una celda de carga de 100 N y la velocidad de los ensayos fue de 0.17 mm/s. Mediante los ensayos de tracción se registra el esfuerzo a la tracción y el módulo de Young.

3.2.5. Caracterización morfológica

La evaluación cualitativa de la morfología de los nanocompuestos fue llevada a cabo mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM, Environmental Scanning Electron Microscopy) y mediante microscopía de fuerza atómica (AFM, Atomic Force Microscopy).

Los ensayos de microscopía electrónica fueron desarrollados en un ESEM XL-30 Philips. Para ello todas las muestras fueron cubiertas por chisporroteo con Au-Pd y observadas usando un voltaje de aceleración de 10 kV.

La caracterización mediante microscopía de fuerza atómica se llevó a cabo usando un AFM multimodo con cabezal NANOTEC. Las muestras fueron vistas usando el modo contacto con vigas de silicio con constante nominal de resorte de 40 Nm^{-1} . El rango de velocidad de barrido fue de 0.25 a 0.5 Hz y la frecuencia de resonancia de 276 kHz.

3.3. Resultados y Discusión

La cepa en la cual se lleva a cabo la biosíntesis de celulosa es de la especie *Gluconacetobacter hansenii*, reclasificada por Lisdiyanti et. al. (2006) como *Gluconacetobacter saccharivorans* LMG 1582. Esta cepa fue aislada de una membrana conocida como “hongo de té”, cultivada en Perú e identificada en la Colección Española de Cultivos Tipo, CECT. Dicha membrana crece en un caldo de cultivo en presencia de bacterias y hongos del tipo levadura (Figura 6). Con la finalidad de promover el crecimiento de bacterias productoras de celulosa se utilizó un medio de cultivo basado en glucosa, peptona y extracto de levadura; y para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos y levaduriformes se utilizó cicloheximida.

Este proceso se repitió hasta que el crecimiento de hongos fue totalmente inhibido. La cepa final fue posteriormente inoculada nuevamente en un medio de cultivo puro y se dejó crecer el gel de celulosa durante 21 días a temperatura ambiente.

Cabe señalar que el etanol absoluto siempre se comporta como una fuente adicional de energía para la producción de celulosa tanto en crecimientos estáticos (Krystynowicz et. al., 2002) como agitados (Park et. al., 2003).

La técnica de fabricación de los materiales compuestos se basa en la adición de gránulos intactos de almidón al medio de cultivo de los microorganismos productores de celulosa. La suspensión medio de cultivo-almidón es autoclavada a 121 °C con dos

objetivos: i) esterilizar el medio de cultivo para asegurar que los microorganismos productores de celulosa, una vez inoculados, no compartan los nutrientes del medio con otros posibles microorganismos, y ii) llevar a cabo la “primera gelatinización” (Figura 7).



Figura 6. Visualización de la presencia de hongos y bacteria en membranas de “hongo de té”, fuente de la cepa *Gluconacetobacter* utilizada en este capítulo.

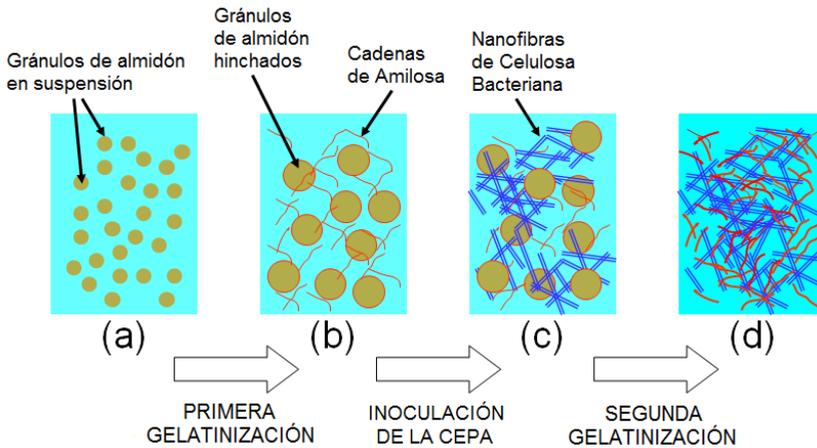


Figura 7. Diagrama del proceso Bottom-Up para fabricación de compuestos BC-almidón. (a) Los granos de almidón se encuentran en suspensión en el medio de cultivo; (b) Después del autoclavado, el almidón es parcialmente gelatinizado. Se libera amilosa y los granos se hinchan; (c) Las nanofibras de celulosa crecen en presencia del almidón parcialmente gelatinizado; (d) Después del prensado en caliente, los nanocompuestos se muestran como redes interpenetradas de amilosa y celulosa.

Brevemente, los gránulos de almidón tienen una estructura semicristalina y contienen dos polímeros: amilopectina, la cual es una estructura ramificada, con un peso molecular promedio de $0.7 - 57 \times 10^8$; y amilosa, la cual tiene una estructura casi lineal con un peso molecular promedio de $0.3 - 1.9 \times 10^6$ (Vermeulen et. al., 2006). Los contenidos de amilosa en los gránulos de almidón se encuentran en el rango de 15 a 30% y las propiedades cristalinas del almidón están asociadas con la fracción de cadenas cortas de

amilopectina arregladas como doble hélices y empaquetadas en cristales (Randzio et. al., 2002)

La gelatinización es un proceso mediante el cual en presencia de calor y agua, se rompen los enlaces intermoleculares de las moléculas de almidón, iniciando un proceso lento de absorción de agua en las zonas amorfas. De esta manera los gránulos de almidón aumentan en volumen y se libera amilosa. Este proceso da como resultado la disolución irreversible de los gránulos de almidón generando una estructura amorfa.

Cabe señalar que la presencia de almidón en el medio de cultivo no afectará la formación de celulosa por parte de los microorganismos (Haigler et. al., 1982). De esta manera es razonable esperar que el almidón no será consumido como fuente de carbón sino que permanecerá presente en los nanocompuestos. Una manera simple de comprobar la presencia de amilosa es mediante la adición de una gota de yodo a los sustratos finales. Si el sustrato se tiñe de color azul, se puede deducir que la amilosa está presente (Zhang et. al., 2006; Kuipers et. al., 1994). Este fue el caso de los nanocompuestos de celulosa bacteriana-almidón reportados en este capítulo.

Como paso final en la fabricación de los materiales compuestos, los geles de celulosa bacteriana-almidón son prensados en caliente y la fase de almidón es sometida a una “segunda gelatinización”, la

cual está probablemente asociada a los gránulos de almidón remanentes que quedaron intactos y a una difusión extra de cadenas de amilosa.

3.3.1. Análisis cristalográfico

Los difractogramas de rayos X para las muestras de celulosa bacteriana (BC) pura y los nanocompuestos de BC con almidón se muestran en la Figura 8.

Los picos de difracción para almidón de maíz ($2\theta = 15^\circ, 17^\circ, 18^\circ$ y 23°) están relacionados a la estructura cristalina tipo A (Cheetham y Tao, 1998), mientras que los picos que se observan para el almidón de papa ($2\theta = 5^\circ, 15^\circ, 17^\circ, 20^\circ, 22^\circ$ y 24°) están relacionados a la estructura tipo B (Cheetham y Tao, 1998; Rindlav et. al., 1997).

Como se aprecia en la Figura 8, las láminas tanto de almidón de maíz como de almidón de papa no muestran picos de difracción, por tanto los valores de cristalinidad son reducidos. Esto probablemente está asociado a las dos etapas de gelatinización a la que es sometido el material.

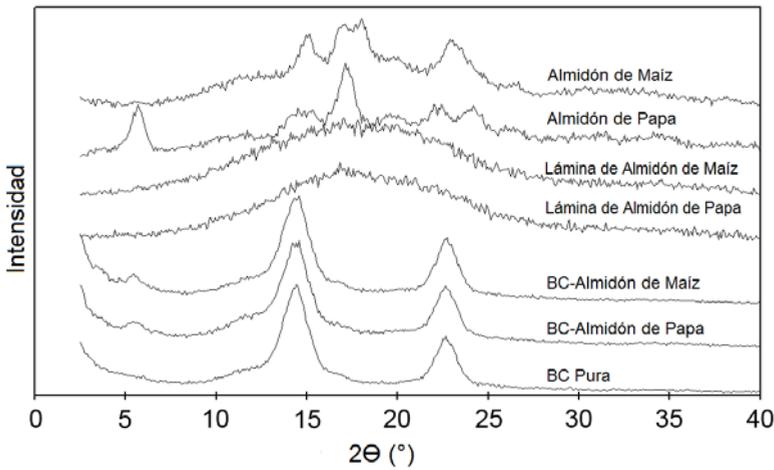


Figura. 8. Difractogramas de rayos X (de arriba abajo): almidón de maíz natural, almidón de papa natural, lámina de almidón de maíz, lámina de almidón de papa, lámina del nanocompuesto BC-almidón de maíz, lámina del nanocompuesto BC-almidón de papa, lámina de celulosa bacteriana pura.

Por otro lado, los difractogramas para celulosa bacteriana pura muestran dos picos bien definidos en $2\theta = 14.5^\circ$ y 22.6° . Asimismo, los difractogramas para los nanocompuestos celulosa bacteriana-almidón son similares a los de celulosa bacteriana pura con picos en $2\theta = 5.4^\circ$, 14.5° y 22.6° para las láminas de celulosa bacteriana-almidón de papa y picos en $2\theta = 5.6^\circ$, 14.5° y 22.7° para las láminas de celulosa bacteriana-almidón de maíz. Estos resultados sugieren que la celulosa bacteriana pura forma una red de nanofibras en presencia de los dos tipos de almidón que se ha utilizado.

Los valores de espaciamento-d, los tamaños de cristales, los valores de la anchura a media altura del pico (FWHM) y los índices

de cristalinidad para láminas de celulosa bacteriana pura y sus nanocompuestos con almidón de papa y de maíz se muestran en la Tabla 2.

Como se observa en la Tabla 2, la celulosa bacteriana pura muestra los más altos niveles de cristalinidad (74.8%). Asimismo, la presencia de almidón gelatinizado amorfo en los nanocompuestos explica la reducción de los valores de cristalinidad a 69.5% para el caso de los nanocompuestos con almidón de papa y 71.0% para los nanocompuestos con almidón de maíz.

La regla de mezclas para materiales compuestos ha sido utilizada anteriormente para medir la cristalinidad de materiales compuestos tipo celulosa-pectina, usando las cristalinidades y composiciones relativas de celulosa y pectina (Georget et. al., 1999). De modo similar en este estudio la regla de mezclas ha sido utilizada para estimar la fracción volumétrica de cada componente en los nanocompuestos, de acuerdo a la ecuación:

$$\% X_{Compuesto} = \% X_{BC} \cdot V_{BC} + \% X_{Almidón} \cdot (1 - V_{BC}) \quad (2)$$

donde X es el grado de cristalinidad y V es la fracción de volumen.

Tabla 2. Picos de difracción, espaciamiento-d, anchura a media altura del pico (FWHM), tamaño de cristales y grado de cristalinidad de láminas de almidón, láminas secas de celulosa bacteriana pura y láminas de los compuestos celulosa bacteriana-almidón.

	Picos de difracción (°)	Espaciamiento d (nm)	Anchura a media altura del pico (°)	Tamaño de cristales (nm)	Grado de Cristalinidad (%)
Celulosa	14.5	0.611	1.9208	8.3	
Bacteriana Pura	19.1	0.465	1.5794	10.1	74.8
	22.6	0.393	1.7344	9.2	
Celulosa Bacteriana- Almidón de Papa (2% w/v)	5.6	1.578	17.0200	0.9	
	14.5	0.611	2.2359	7.1	69.5
	22.6	0.393	1.8860	8.5	
Celulosa Bacteriana- Almidón de Maíz (2% w/v)	5.4	1.637	3.5318	4.5	
	14.5	0.611	2.1393	7.4	71.0
	22.7	0.392	1.7947	8.9	

Como se observó anteriormente en los difractogramas de rayos X (Figura 8), la cristalinidad de las láminas de almidón puro puede ser considerada igual a cero, ya que en estos difractogramas no se observan picos cristalinos. De esta manera la fracción volumétrica de celulosa bacteriana pura en los nanocompuestos formados con almidón de papa y con almidón de maíz es de 92.8% y 95.0%, respectivamente.

3.3.2. Análisis físico-químico

En la Figura 9.a. se muestra los espectros de infrarrojos para celulosa bacteriana pura (BC) y sus nanocompuestos con almidón al 2% (w/v).

El espectro para celulosa bacteriana pura muestra cinco picos característicos entre 984 y 1106 cm^{-1} correspondientes a los enlaces C–O principalmente atribuidos a los alcoholes primarios (Marechal y Chanzy, 2000). La banda en 1160 cm^{-1} es asignada al estiramiento asimétrico de C–O–C, y los picos en 1313 cm^{-1} y 1426 cm^{-1} son atribuidos al aleteo (wagging) simétrico de CH_2 y flexión simétrica de CH_2 , respectivamente (Kacurakova et. al., 2002). Las bandas presentes entre 3200 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} corresponden a los modos de estiramiento de los grupos O–H.

Los espectros de los nanocompuestos están principalmente dominados por el contenido de celulosa. Se puede observar que para los nanocompuestos de celulosa bacteriana-almidón no hay presencia del enlace C–O a 984 cm^{-1} que sí aparece en celulosa bacteriana pura. Asimismo, se pueden observar dos picos en la región entre 700 y 760 para celulosa bacteriana pura (Figura 9.b). Estos son atribuidos a las formas cristalinas I α e I β , típicas de celulosa bacteriana (Atalla y VanderHart, 1984; Czaja et. al., 2004).

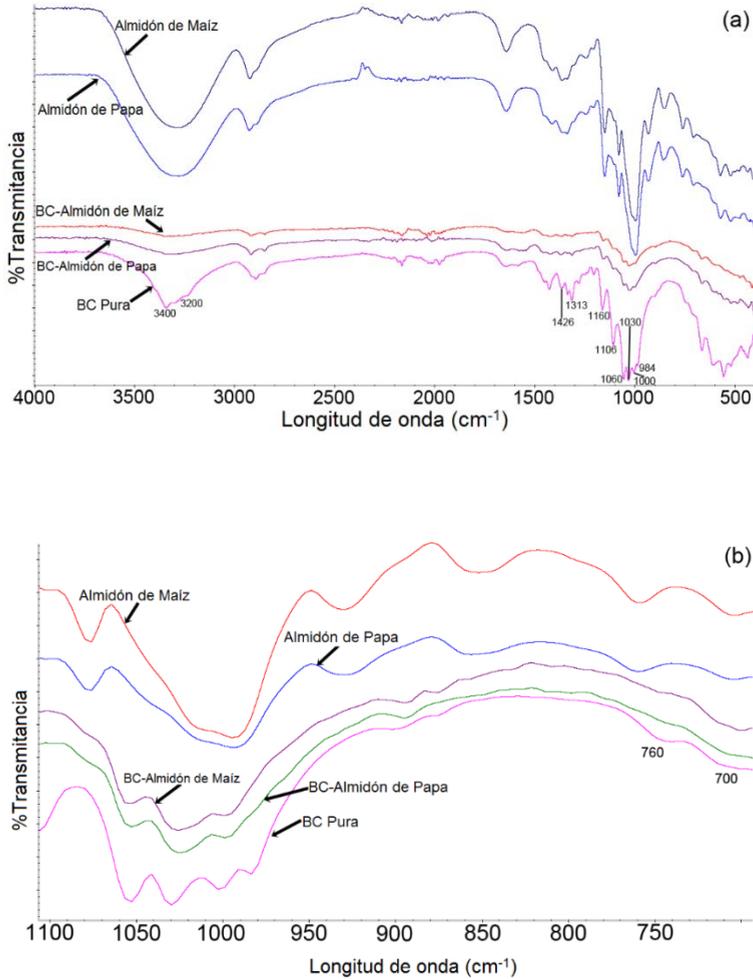


Figura 9. (a) Espectros ATR-FTIR (de arriba abajo) de láminas de: almidón de maíz, almidón de papa, nanocompuesto de celulosa bacteriana-almidón de maíz 2% (w/v), nanocompuesto de celulosa bacteriana-almidón de papa 2% (w/v), celulosa bacteriana pura. (b) Detalle del espectro mostrado en la Figura 2 (a), resaltando los picos asignados a celulosa I α e I β .

Estas formas cristalinas permanecen en los nanocompuestos pero con una menor intensidad, siendo la forma I β más evidente e indicando que hay una interacción entre el almidón amorfo (previamente determinado mediante difracción de rayos X) y la celulosa bacteriana predominante.

3.3.3. Análisis de propiedades mecánicas

En la Figura 10, se muestra curvas representativas de esfuerzo-deformación. Como se puede ver en la figura los nanocompuestos de celulosa bacteriana-almidón muestran una disminución no significativa en sus propiedades mecánicas, evaluadas mediante ensayos de tracción, con respecto a celulosa bacteriana pura.

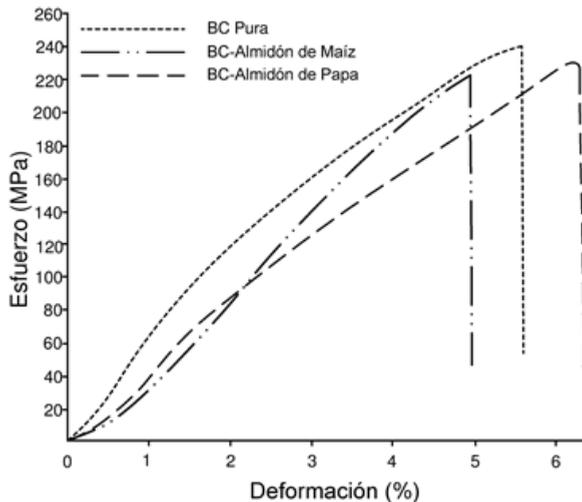


Figura 10. Curvas representativas de esfuerzo-deformación para BC pura, y nanocompuestos de BC-almidón de papa y BC-almidón de maíz.

Los valores de esfuerzo de rotura (σ) y módulo de Young (E) son similares para cada lámina ensayada. El rango del esfuerzo máximo varía entre 200 y 250 MPa, mientras que los valores del módulo de Young varían entre 5.6 y 6.8 GPa (Tabla 3). Asimismo, los valores de deformación a la rotura (ϵ) en las láminas de BC pura estuvieron alrededor de 8%, mientras que las láminas de los nanocompuestos fallaron en valores de deformaciones ligeramente menores (4.5 – 6%).

En general, los menores valores de propiedades mecánicas fueron obtenidos para muestras de celulosa bacteriana-almidón de maíz, mientras que las muestras de celulosa bacteriana-almidón de papa mostraron un comportamiento que se asemeja más al de celulosa bacteriana pura.

Esto confirma que las buenas propiedades mecánicas de las redes de celulosa se mantienen casi intactas con el uso de la técnica Bottom-Up descrita en este capítulo. Cabe señalar que anteriormente se ha reportado que para compuestos basados en celulosa bacteriana y producidos mediante técnicas estándar de mezclado, los valores de las propiedades mecánicas muestran una importante disminución con respecto a los valores de celulosa bacteriana pura. (Yamanaka et. al. 1989)

Tabla 3. Propiedades mecánicas de láminas secas de celulosa bacteriana pura, láminas de almidón y láminas de los compuestos de celulosa bacteriana-almidón.

	Esfuerzo máximo (MPa)	Elongación máxima (%)	Módulo de elasticidad (GPa)
Celulosa Bacteriana Pura	241.42±21.86	8.21% ± 3.01	6.86 ± 0.32
Almidón de Maíz	19.41 ± 1.90	22.45 ± 3.16	0.138 ± 0.0018
Almidón de Papa	18.41 ± 1.14	12.6 ± 2.20	0.285 ± 0.066
Celulosa Bacteriana-Almidón de Papa	228.94 ± 11.51	5.67% ± 1.32	6.08 ± 0.73
Celulosa Bacteriana-Almidón de Maíz	206.68 ± 30.18	4.79% ± 0.59	5.65 ± 0.49

3.3.4. Morfología de los nanocompuestos BC-almidón

La morfología de la celulosa bacteriana es conocida y ha sido reportada en diversos estudios como una red de nanofibras interconectadas. Los diámetros de las nanofibras están en el rango 100 – 150 nm de acuerdo a imágenes de AFM (Figura 11.a). Las muestras de celulosa bacteriana pura (Figura 11.a) muestran una

red de nanofibras bien definidas comparadas con las muestras de los nanocompuestos celulosa bacteriana-almidón (Figura 11.b y 11.c) en las que no se puede apreciar de manera correcta la red.

Las diferencias cualitativas entre las morfologías de las láminas de celulosa bacteriana pura y las de los nanocompuestos se pueden apreciar en las imágenes ESEM (Figura 12). La morfología común de celulosa bacteriana y similar a las anteriormente reportadas se muestra en la Figura 12.a., mientras que la Figura 12.b y 12.c muestra una capa de almidón cubriendo las nanofibras de celulosa en los nanocompuestos. Esta capa aparece casi homogénea en un orden de las micras. En las mismas imágenes se puede observar la falta de regularidad de la capa de almidón, donde las regiones de fibras cubiertas están cerca de las regiones de las fibras parcialmente cubiertas y descubiertas. Asimismo en la Figura 12.c se puede observar (señalizado con flechas blancas) que una sola fibra tiene partes cubiertas y descubiertas a lo largo de su eje.

Por otro lado, la morfología de muestras crio-fracturadas se muestra en la Figura 13. Se puede observar que las estructuras de celulosa bacteriana pura y de los nanocompuestos están formadas por un grupo de láminas delgadas que forman una pila. Esta morfología es típica del papel y otros productos basados en pulpa, y en el caso de celulosa bacteriana y los nanocompuestos fueron originados por el proceso de compresión en caliente. El hecho que la celulosa bacteriana pura y los nanocompuestos de celulosa bacteriana-almidón tengan similar morfología a estas escalas,

confirman que la combinación del almidón con la celulosa se realiza a la escala nanométrica.

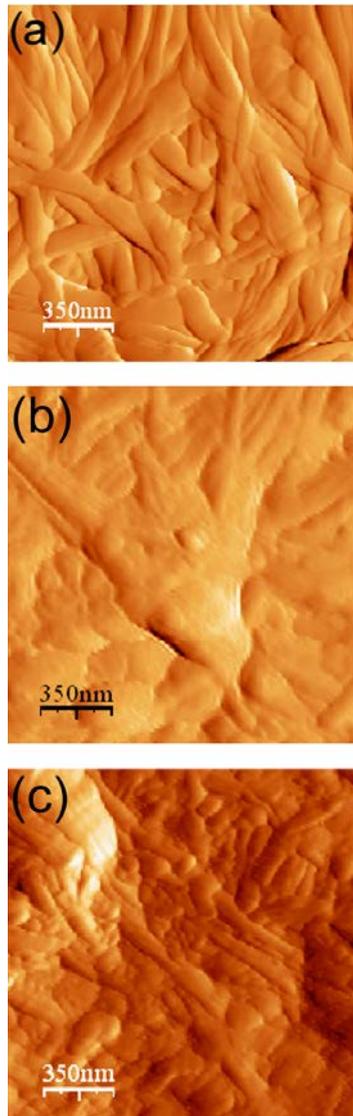


Figura 11. Imágenes obtenidas mediante AFM para (a) BC pura, (b) nanocompuesto BC-almidón de papa, (c) nanocompuesto BC-almidón de maíz.

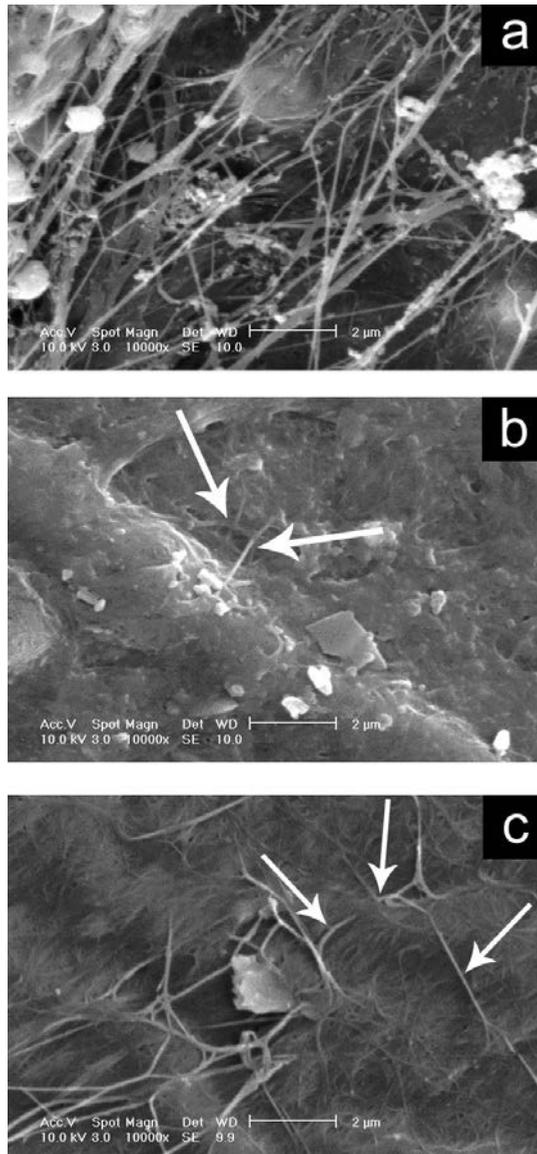


Figura 12. Imágenes ESEM de (a) lámina de BC pura, (b) lámina de nanocompuesto BC-almidón de papa mostrando una capa de almidón que mantiene algunas nanofibras de celulosa cubiertas y otras descubiertas, (c) lámina de nanocompuesto BC-almidón de maíz mostrando una capa de almidón y algunas fibras descubiertas.

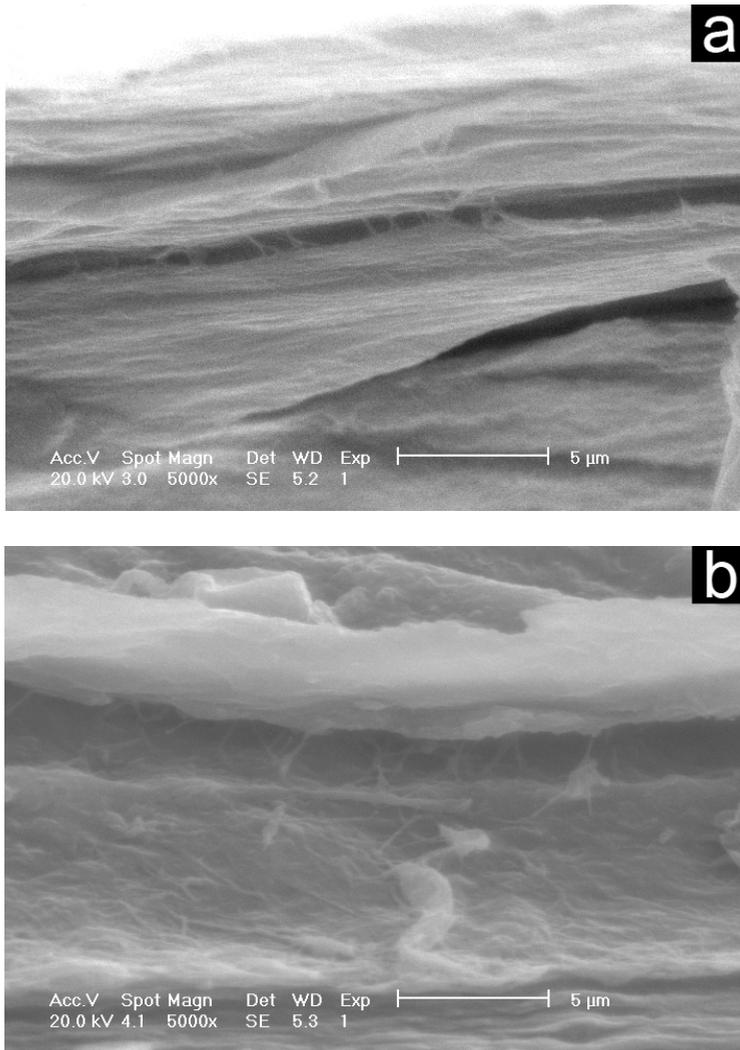


Figura 13. Imágenes ESEM de superficies criofracturadas correspondientes a (a) lámina de celulosa bacteriana pura, (b) lámina de nanocompuesto BC-almidón de maíz.

3.4. Conclusiones

Se preparó nanocompuestos de celulosa bacteriana y almidón mediante una formación Bottom-Up de las nanofibras de celulosa en presencia de granos de almidón parcialmente gelatinizados. Esta técnica preserva el arreglo original de fibras de celulosa ya que no hubo necesidad de modificar el gel de celulosa bacteriana con la finalidad de combinarlo con la segunda fase. De esta manera, se obtuvo una nanoestructura coherente que puede ser controlada en diferentes etapas del proceso.

La técnica Bottom-Up parece ser un adecuado enfoque para la preparación de nanocompuestos de celulosa bacteriana. El almidón fue gelatinizado en diferentes etapas y formó una capa que cubre las nanofibras de celulosa. La fracción volumétrica de la fase de refuerzo de los nanocompuestos producidos mediante esta técnica es de aproximadamente 90%, la cual es similar a las proporciones presentes en algunos nanocompuestos de origen biológico como el nácar.

Las propiedades estructurales determinadas mediante difracción de rayos X y ATR-FTIR indican que la cristalinidad de la celulosa bacteriana se preserva a pesar de la presencia de almidón. De esta manera las propiedades mecánicas de los nanocompuestos no mostraron una disminución significativa.

Capítulo 4

**Desarrollo de Nanocompuestos
de Celulosa Bacteriana e Hidroxiapatita**

CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE NANOCOMPUESTOS DE CELULOSA BACTERIANA E HIDROXIAPATITA

4.1. Formación de nanocompuestos de celulosa en presencia de aditivos

Como se ha revisado en el capítulo 2, la mayoría de investigaciones para la fabricación y aplicaciones de materiales compuestos basados en celulosa bacteriana utilizan métodos convencionales del tipo Top-Down y diversos tipos de materiales son usados entre ellos partículas inorgánicas, polímeros termofijos, polímeros de origen biológico, entre otros.

Uno de los métodos de fabricación de materiales compuestos basados en celulosa bacteriana es el que se propone en esta tesis. De esta manera el capítulo 4 tiene como objetivo desarrollar compuestos basados en celulosa bacteriana-hidroxiapatita utilizando el principio de autoensamblaje de las fibras de celulosa, esta vez en presencia de una fase de hidroxiapatita.

La hidroxiapatita es un mineral utilizado frecuentemente en la regeneración de hueso y como sustituto de huesos y dientes debido a que es biocompatible, no inflamatorio y no tóxico. Para alcanzar la formación del material compuesto se utiliza carboximetilcelulosa en el medio de cultivo original de los microorganismos

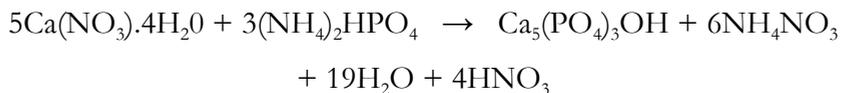
productores de celulosa. La carboximetilcelulosa es un compuesto orgánico derivado de la celulosa y se emplea en este capítulo para aumentar la viscosidad del medio de cultivo, y de esta manera mantener en suspensión las partículas de hidroxiapatita durante el tiempo que dura la biosíntesis de las fibras de celulosa.

Los materiales resultantes son analizados mediante diferentes técnicas morfológicas, térmicas y físico-químicas. Asimismo, se analiza la biocompatibilidad, viabilidad y proliferación celular en los materiales obtenidos para aplicaciones biomédicas.

4.2. Experimental

4.2.1. Preparación de partículas de hidroxiapatita

Las partículas de hidroxiapatita fueron preparadas in vitro usando un método de precipitación química (Jarcho et. al., 1976; Zhitomirsky y Gal-Or, 1997) en donde se utilizó calcio nitrato tetrahidrato (Scharlau, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y di-amonio hidrogenofosfato (Scharlau, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) como precursores de Ca y P, respectivamente, siguiendo la siguiente reacción:



El procedimiento se llevó a cabo preparando inicialmente soluciones separadas de 0.6M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y 1.0M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Ambas fueron ajustadas a pH=10.2 utilizando NH_4OH

concentrado. Posteriormente, la solución de fosfato fue agregada en gotas en la solución de calcio que se encontraba en agitación a 70 °C. La agitación de la solución se llevó a cabo por 24 horas a la temperatura descrita, luego de la cual se continuó la agitación por 48 horas a temperatura ambiente.

La solución resultante que presentaba un aspecto lechoso, fue filtrada y lavada 4 veces cada una con agua destilada. El precipitado final fue secado en un horno con vacío a 60 °C durante 24 horas. Finalmente la masa obtenida fue molida en un mortero de ágata para la obtención de las partículas de hidroxiapatita.

4.2.2. Preparación de geles nanocompuestos de celulosa bacteriana e hidroxiapatita

Cabe señalar que el medio de cultivo enriquecido descrito a continuación fue utilizado anteriormente por Lisdiyanti et. al. (2002) y Yamada et. al. (1999) en el aislamiento de bacterias ácido acéticas productoras de celulosa y obtenidas de productos naturales. Asimismo, la cepa que se ha utilizado es la *Gluconacetobacter saccharivorans* cuyo aislamiento e identificación es descrito en el capítulo anterior.

El medio de cultivo de las bacterias para la síntesis de celulosa fue preparado en base a los siguientes productos en agua destilada: 1.0% (w/v) D-Glucosa anhidra (Scharlau), 1.5% (w/v) peptona (Scharlau), 0.8% (w/v) extracto de levadura (Scharlau) y 0.3%

(v/v) de ácido acético glacial (Scharlau). El pH de la solución fue ajustado en 3.5 con ácido clorhídrico al 37% (Scharlau). Con la finalidad de esterilizar el medio de cultivo, éste fue autoclavado a 121 °C durante 20 minutos. Después del enfriamiento, se le agregó 0.01% (w/v) de cicloheximida (Acros Organics) y 0.5% (w/v) de etanol absoluto (Scharlau). La cicloheximida fue utilizada con la finalidad de evitar el crecimiento de filamentos en el medio de cultivo, mientras que el etanol absoluto se comporta como una fuente adicional de energía para la producción de celulosa tanto en crecimientos estáticos (Krystynowicz et. al., 2002) como agitados (Park et. al., 2003). La cicloheximida y el etanol se agregan después de esterilizar el medio de cultivo para evitar el punto de fusión (107 - 114 °C) y el punto de ebullición (78.3 °C), respectivamente.

La cepa fue inoculada y cultivada a 30 °C durante 21 días. Después de este período los geles de celulosa pura, crecidos en la interface líquido-aire de los recipientes, fueron retirados y lavados con agua destilada. Con la finalidad de eliminar las bacterias y el medio de cultivo remanente, los geles fueron lavados en una solución 1.0M NaOH a 70 °C durante 90 minutos y enjuagados repetidamente con agua destilada (Backdahl et. al., 2006)

Para la formación del nuevo material compuesto, las partículas de hidroxiapatita fueron suspendidas en el medio de cultivo, de tal manera que la formación del gel se lleve a cabo en presencia de las partículas. Con el objetivo de evitar que las partículas se asienten en el fondo del recipiente que contiene el medio de cultivo, la

viscosidad de la solución fue controlada usando sal sódica de carboximetilcelulosa (CMC; Acros Organics, MW 25,000, DS = 1.2). El CMC fue agregado al medio de cultivo en concentración de 1.0 (w/v) y la agitación se llevó a cabo hasta que el CMC se haya disuelto en el medio de cultivo. Las partículas de hidroxiapatita fueron agregadas en concentración de 1.0% (w/v) y la solución permaneció en agitación durante 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente el pH de la solución se ajustó en 3.5 y se autoclavó a 121 °C durante 20 minutos. Después del enfriamiento se agregó la cicloheximida y el etanol en las mismas proporciones que para la formación de celulosa pura y se colocó un inóculo de la parte superior del medio de celulosa pura que se había cultivado antes (Klemm et. al., 2001)

4.2.3. Preparación de muestras para caracterización

Con el objetivo de caracterizar las estructuras obtenidas, el agua fue removida de los geles mediante tres métodos: liofilización (freeze drying), intercambio de solvente y compresión en caliente.

Los geles de celulosa bacteriana pura (BC), celulosa bacteriana producida en presencia de 1% de CMC (BC-CMC) y los compuestos de celulosa bacteriana con hidroxiapatita al 1% agregada al medio de cultivo modificado con 1% de CMC (BC-CMC-HAp) fueron congelados en nitrógeno líquido (-196 °C) y liofilizados en un equipo Telstar Cryodos 80 a una temperatura de sublimación de -58 °C y una presión de 0.18 mbar.

El método de secado por intercambio de solvente (agua-etanol-t-butil alcohol) es adecuado para preservar la estructura original de las redes de celulosa (Kuga et. al., 2002). Se preparó muestras secas de BC y BC-CMC introduciendo las muestras en etanol por 45 minutos y luego en t-butil alcohol por 45 minutos. Después del intercambio de solvente, las muestras fueron secadas al vacío.

Los geles de BC, BC-CMC y BC-CMC-HAp fueron también deshidratados mediante compresión en caliente a una presión de aproximadamente 0.015 MPa a 105 °C durante 5 minutos, con el objetivo de obtener láminas para analizar la Cristalinidad y la viabilidad celular.

4.2.4. Caracterización de los nanocompuestos

Para los análisis mediante infrarrojos, se utilizó muestras liofilizadas así como partículas de hidroxiapatita. Las muestras fueron evaluadas por separado en un FTIR-ATR Nicolet Nexus 470 con celda de diamante a las mismas condiciones: 64 barridos a una resolución de 8 cm⁻¹ en el rango de 4000 a 400 cm⁻¹. Los datos fueron analizados posteriormente con el software Omnic.

Con la finalidad de analizar la microestructura de los materiales, se utilizó microscopía de barrido electrónico (SEM) con muestras liofilizadas basadas en celulosa y partículas de hidroxiapatita, las cuales recibieron previamente un tratamiento con Au-Pd para hacerlas conductivas. Asimismo, se utilizó espectroscopía de energía dispersiva (EDS) para determinar la relación Ca/P de las

partículas de hidroxiapatita. Para la adquisición y procesamiento de los microanálisis se utilizó los programas RÖNTEC-Shell y RÖNTEC-Tool, respectivamente. Las imágenes de microscopía de barrido electrónico y el análisis mediante espectroscopía de energía dispersiva se llevaron a cabo en un microscopio de barrido electrónico de emisión de campo SEM Hitachi S4100 a 15 y 20 kV, respectivamente.

Los análisis de las imágenes obtenidas de SEM fueron llevadas a cabo utilizando el programa ImageJ (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, National Institutes of Health, NHI, USA). El diámetro de las fibras, su orientación y el tamaño de poro de las superficies de BC y BC-CMC que crecieron en contacto con el medio de cultivo (Nge y Sugiyama, 2007), fueron evaluadas. Con la finalidad de evaluar la orientación de las fibras de celulosa, éstas fueron reemplazadas por segmentos que unen los entrecruzamientos. De estas imágenes se midió los ángulos que forman los segmentos descritos con el eje x. El diámetro de Feret, definido como la máxima distancia entre dos tangentes paralelas, fue considerado como la medida de tamaño de poro.

Para determinar el contenido de hidroxiapatita en los materiales compuestos así como para analizar la pérdida de peso de los materiales empleados y determinar el contenido de agua en los geles de celulosa, se hizo análisis termogravimétrico (TGA) con un equipo Setaram Setsys 92-12 en el rango de 50 a 900 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

Mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) se analizó las superficies de BC y BC modificada con CMC al 1% (BC-CMC) que crecieron en contacto con el medio de cultivo y fueron deshidratadas posteriormente mediante intercambio de solvente. Para esto se utilizó un equipo easyScan 2 (Nanosurf AG, Switzerland) en modo dinámico. Se utilizó una viga con una constante de resorte de 42 N/m, frecuencia de resonancia de 179 kHz y una punta con radio menor de 10 μm .

Para los análisis mediante rayos X (XRD) y los estudios de siembra celulares en los materiales, se preparó muestras planas de BC, BC-CMC y BC-CMC-HAp. Para el ensayo de XRD se utilizó un equipo Seifert XRD 3003 TT con una radiación de Ni filtrado $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.1542 \text{ nm}$) producida a 40 kV y 40 mA. La radiación fue detectada en el rango angular de 2.5 a 70° (2 θ) utilizando pasos de 0.08° (2 θ). Los datos fueron analizados con los programas Analyze y DRXWin.

4.2.5. Siembra y cultivos celulares

Para evaluar la biocompatibilidad y viabilidad celular de los materiales, se utilizó células del tipo HEK. Antes de la siembra celular, las muestras planas fueron esterilizadas con rayos UV durante 12 horas. Las células fueron cultivadas en un medio que contiene DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) con suplemento de 10% de suero bovino fetal (FBS, Gibco), 1% de penicilina-estreptomicina (P/S) y 0.1% de fungizona. Las

condiciones ambientales de la incubadora fueron 37 °C y 5% CO₂. Después que se muestra que las células han crecido y son confluentes, el medio es removido y las células fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS, Gibco). Las células fueron tripsinizadas en una solución con 0.2% de tripsina y posteriormente 5 ml de medio de cultivo fue agregado para detener la reacción. La suspensión de células fue centrifugada a 1500 RPM durante 3 minutos y el medio fue removido. Las células fueron resuspendidas en 6 ml de medio nuevo. Posteriormente, se hace la siembra con 1 ml de la suspensión de células directamente sobre los materiales a analizar dentro de un plato de cultivo de tejidos (TCP). Asimismo, 3 ml de medio de cultivo puro se agrega al material cubriendo todas las partes para que el crecimiento sea uniforme. Un TCP fue utilizado como control.

Después de 1 día de cultivo, se hizo imágenes de los materiales y las placas para analizar la biocompatibilidad. Asimismo, los materiales fueron removidos de los TCP y puestos en nuevos con medio de cultivo fresco con la finalidad de analizar si las células se han adherido a las superficies. Para los ensayos de viabilidad, las células de los TCP originales fueron tripsinizadas con 300 µl de tripsina. Usando 700 µl de medio de cultivo fresco se detuvo la reacción. Posteriormente, 100 µl de estas soluciones se colocó en tubos eppendorf con el mismo volumen de trypan blue. Las soluciones se colocaron en cámara de Neubauer y fueron analizadas por microscopía óptica.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Análisis morfológico

La caracterización morfológica se llevó a cabo para entender el efecto que tiene la fase de hidroxiapatita en la formación de los compuestos con celulosa bacteriana. En la Figura 14.a. se muestra algunas partículas de hidroxiapatita obtenidas por precipitación en base a las sales de Ca y P. En general, las partículas de hidroxiapatita aparecen libres de otras partículas y aglomeradas en dimensiones microscópicas. Asimismo, estas partículas micrométricas están compuestas de otras partículas en la escala nano (Pretto et. al., 2003).

Por otro lado, en la Figura 14.b., se observa un arreglo de fibras de celulosa bacteriana de la superficie que creció expuesta al medio de cultivo; mientras que en las Figuras 14.c. y 14.d. se muestra el arreglo del nanocompuesto celulosa bacteriana-hidroxiapatita también de la superficie que creció en contacto con el medio. Se observa que las partículas de hidroxiapatita han quedado atrapadas en la red de celulosa formada por los microorganismos.

En presencia de CMC al 1% en el medio de cultivo (BC-CMC), las bacterias forman fibras de celulosa de diámetros menores que los obtenidos en los arreglos de celulosa pura (BC). La distribución de diámetros de fibras puede observarse en la Figura 15. De esta manera se ha calculado que el diámetro promedio de las fibras de

BC es $117.76 \text{ nm} \pm 29.58 \text{ nm}$. Asimismo, el promedio de las fibras de celulosa producidas en presencia de CMC es $60.90 \text{ nm} \pm 12.63 \text{ nm}$.

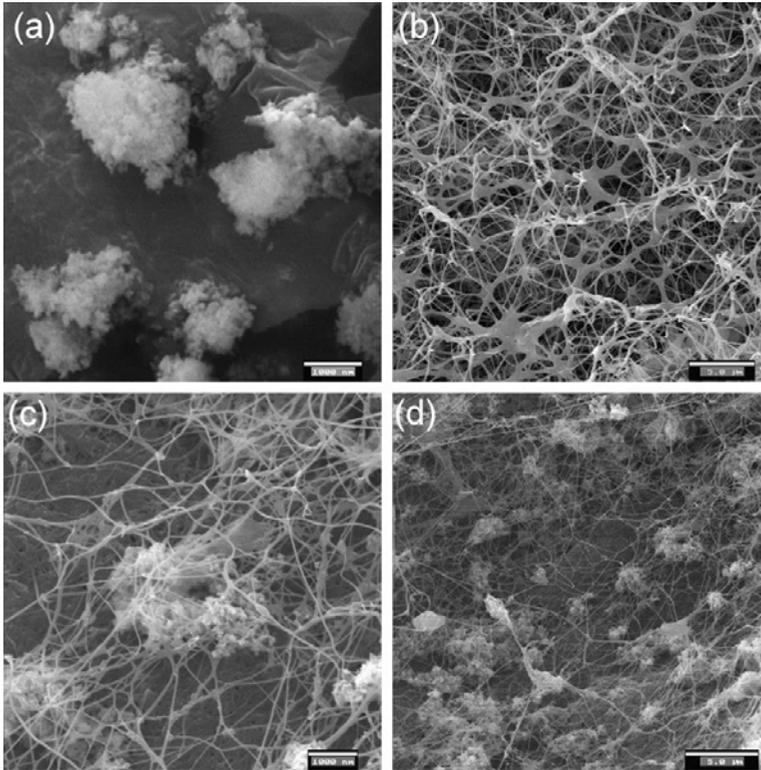


Figura. 14. Micrografías SEM de (a) partículas sintetizadas de hidroxiapatita; (b) red de celulosa bacteriana original; (c) partículas de hidroxiapatita dentro de la red de celulosa; (d) distribución de las partículas de hidroxiapatita en la red.

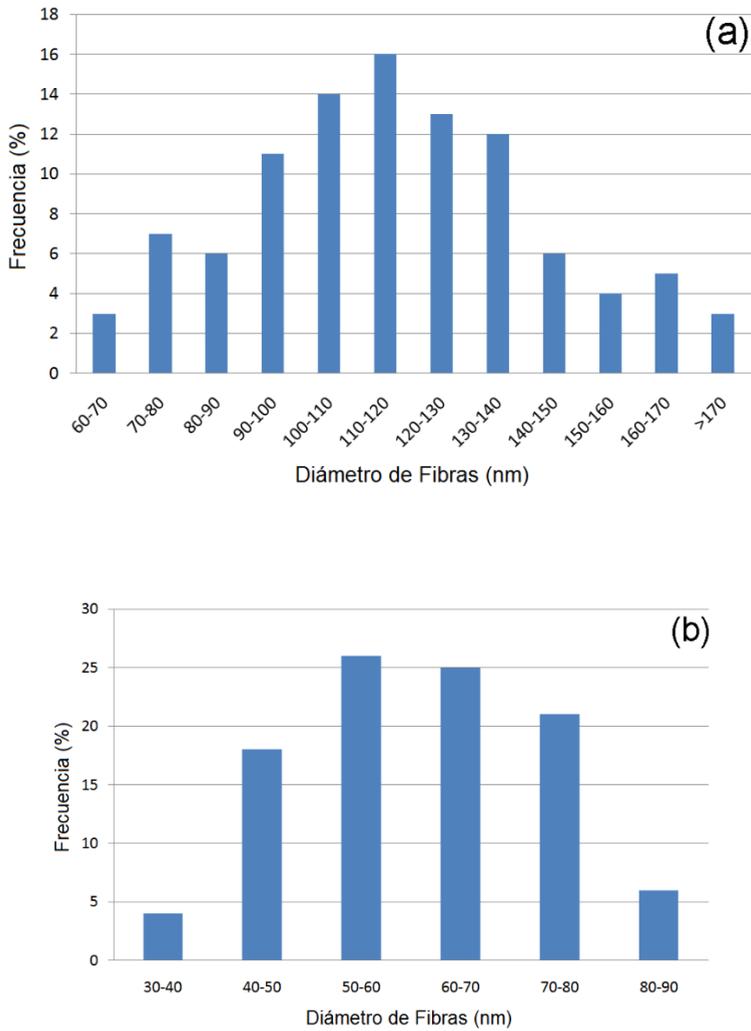


Figura 15. Distribución de diámetro de fibras correspondientes a (a) celulosa pura; (b) celulosa modificada con carboximetilcelulosa al 1% (w/v).

Es importante indicar que el método de extracción de agua influye en la morfología de las redes de celulosa. En el capítulo anterior se demostró que las fibras de celulosa de esta misma cepa crecida en las mismas condiciones y secadas por compresión en caliente, presentan diámetros que varían entre 100 y 200 nm. El método de intercambio de solvente (agua-etanol-t butil alcohol) fue llevado a cabo con la finalidad de preservar la estructura de celulosa (Kuga et. al., 2002) y analizar por microscopía de fuerza atómica (AFM) si hubo algún cambio en la estructura por el método de liofilización. Las mediciones realizadas por AFM (Figura 16) confirmaron las mediciones por SEM.

El diámetro promedio de las fibras de BC y BC-CMC fueron $119.90 \text{ nm} \pm 49.97 \text{ nm}$ y $70.44 \pm 30.04 \text{ nm}$, respectivamente. De esta manera se confirma que las fibras de BC son más gruesas que las fibras de BC-CMC.

Estos resultados difieren de otros reportados en la literatura donde las fibras de BC-CMC son más gruesas que las de BC debido a la agregación que hacen las fibras producida por la presencia de un polímero compatible (Klemm et. al., 2001; Hirai et. al., 1998). Las diferencias encontradas en este trabajo pueden ser atribuidas al efecto que tiene el CMC sobre la cepa usada en estos experimentos.

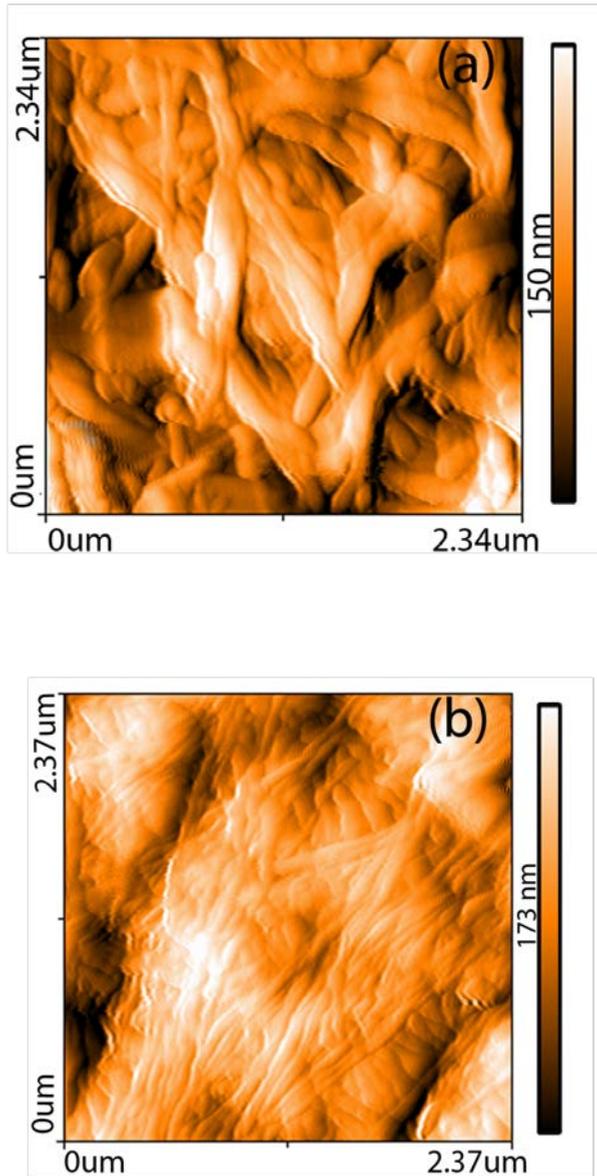


Figura 16. Imágenes de AFM de (a) celulosa pura; (b) celulosa modificada con carboximetilcelulosa al 1% (w/v).

Otras propiedades de las redes de celulosa tales como el tamaño de poro y la orientación de las fibras (ángulo entre el eje x y el eje de las fibras) han sido evaluadas. La distribución de ángulos se muestra en la Figura 17 y 18. El valor promedio del ángulo es similar para BC y BC-CMC, siendo éstos de 84.30° y 84.73°. Por el contrario, la distribución de poros y el tamaño de poro promedio son diferentes. El tamaño promedio de poro para las estructuras de BC y BC-CMC son $0.5230 \mu\text{m} \pm 0.2733 \mu\text{m}$ y $0.7733 \mu\text{m} \pm 0.5238 \mu\text{m}$, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con otros resultados publicados para la capacidad de almacenamiento de agua que tienen los materiales basados en celulosa bacteriana (Seifert et. al., 2004; Sakairi et. al., 1998; Brown, 1990).

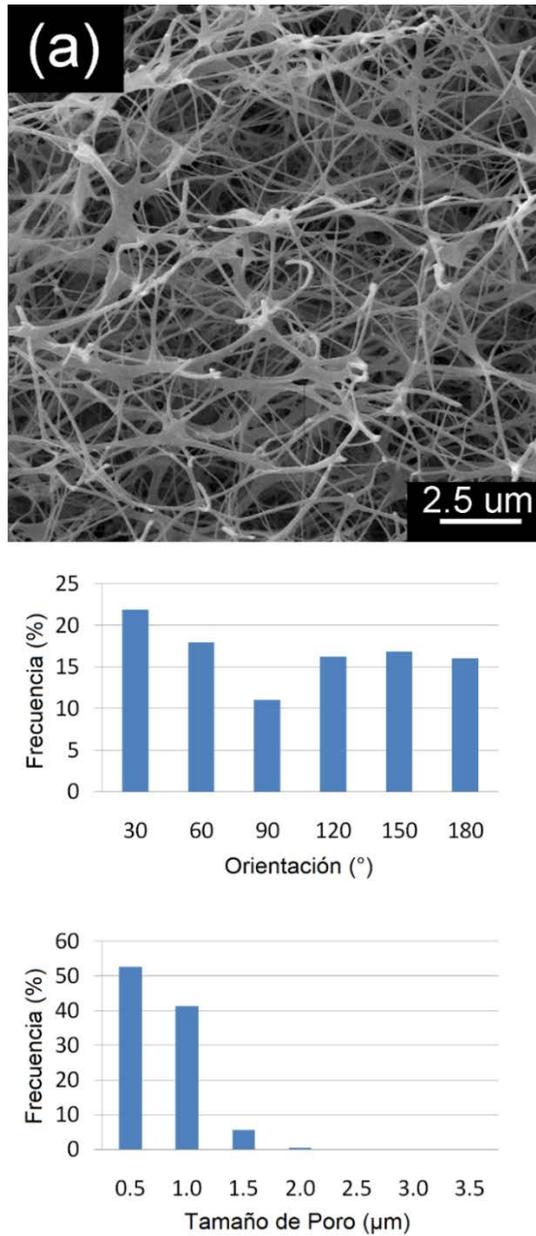


Figura 17. Orientación y distribución de diámetros para las redes de celulosa pura.

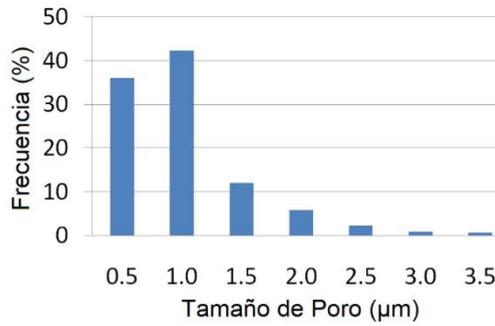
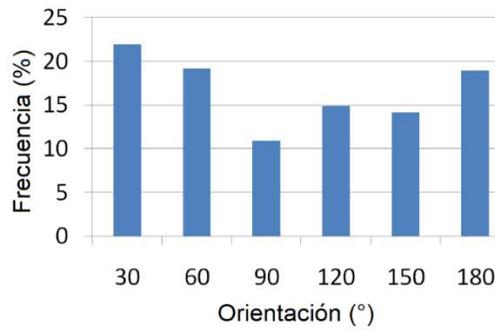
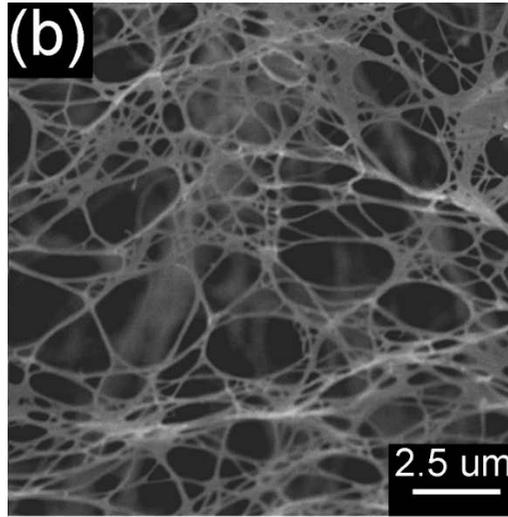


Figura 18. Orientación y distribución de diámetros para las redes de celulosa modificada con carboximetilcelulosa al 1% (w/v).

El ratio Calcio-Fosfato (Ca/P) para la hidroxiapatita estequiométrica es igual a 1.67. Sin embargo, la hidroxiapatita deficiente en calcio es de mayor interés en aplicaciones biomédicas, ya que ese es el tipo que está casi siempre presente en medios fisiológicos (Vallet Regí et. al., 1997). En la Figura 19 se muestra el espectro de EDS obtenido para las partículas de hidroxiapatita sintetizada. La relación Ca/P fue determinada en 1.60 utilizando el programa RÖNTEC. Este resultado indica que la hidroxiapatita utilizada es deficiente en calcio y con buenas propiedades para aplicaciones biomédicas.

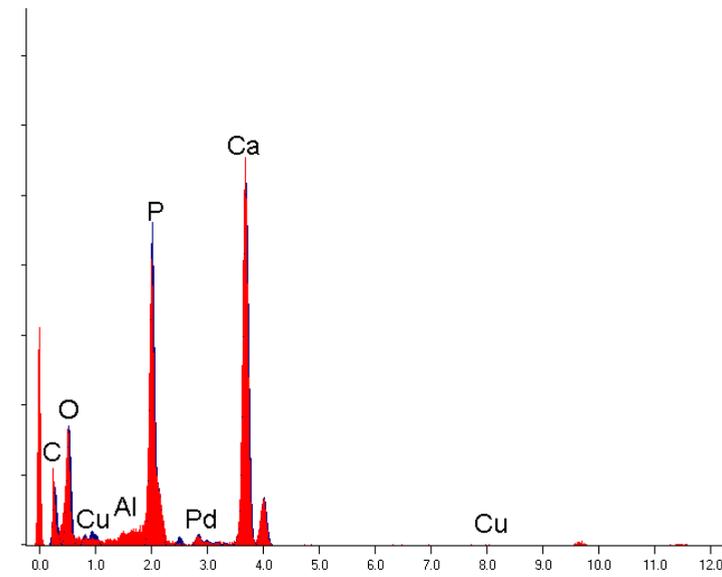


Figura 19. Espectro de EDS para la hidroxiapatita preparada.

Por otro lado, el diámetro de las partículas de hidroxiapatita presentes en los nanocompuestos BC-CMC-HAp fue comparado con los diámetros de las partículas de hidroxiapatita agregadas al medio de cultivo antes de la síntesis de los materiales compuestos (Figura 20). El diámetro promedio de las partículas en los nanocompuestos ($2.59 \mu\text{m} \pm 1.25 \mu\text{m}$) fue menor que el diámetro promedio de las partículas agregadas al medio ($3.34 \mu\text{m} \pm 2.25 \mu\text{m}$). Esta diferencia puede ser atribuida al hecho que las partículas de mayor tamaño en el medio de cultivo tienden a asentarse en el fondo del recipiente, de acuerdo con la teoría de sedimentación de partículas de Stokes.

4.3.2. Estudio de formación de los nanocompuestos

El CMC incrementa la viscosidad del medio de cultivo (Majewicz et. al., 2004) y aumenta la capacidad de la solución para retener partículas de hidroxiapatita en suspensión, Sin el uso de CMC, las partículas de hidroxiapatita caerían más rápido al fondo del envase donde se está produciendo el gel de BC. La teoría de sedimentación de Stokes ha sido utilizada para estimar la velocidad de asentamiento de las partículas de hidroxiapatita en el medio de cultivo.

$$V_s = \frac{2(\rho_p - \rho_f)gR^2}{9\mu_f} \quad (3)$$

donde V_s es la velocidad de sedimentación de las partículas de hidroxiapatita (m/s), g es la aceleración gravitacional (m/s^2), ρ_p es la densidad de las partículas (kg/m^3), ρ_s es la densidad del medio de

cultivo (kg/m^3), R es el radio de las partículas (m) y μ_f es la viscosidad dinámica del medio ($\text{kg}/\text{m}\cdot\text{s}$).

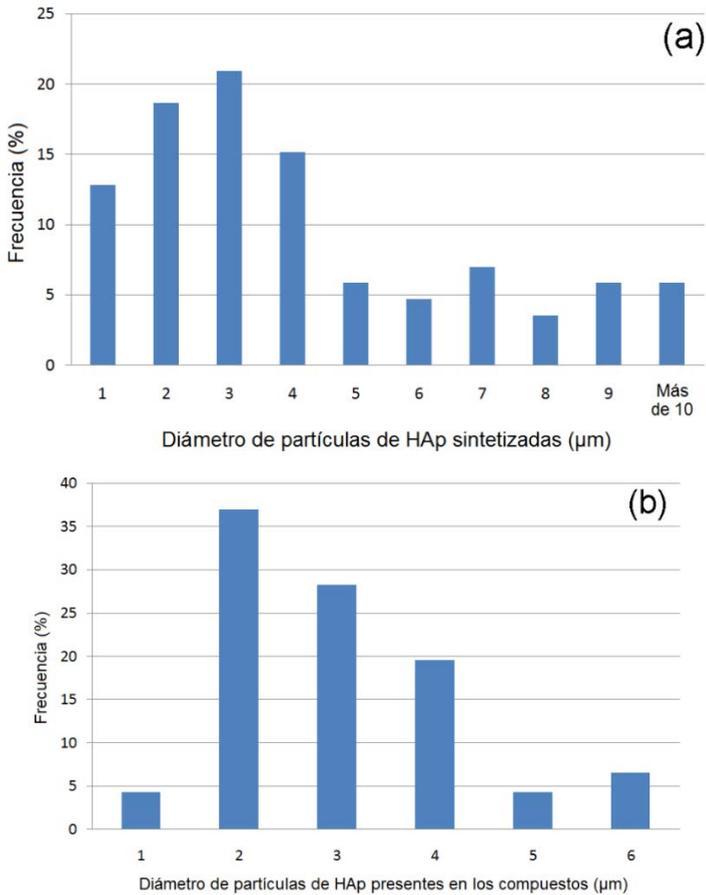


Figura 20. Distribución de diámetros para (a) las partículas sintetizadas de hidroxiapatita; (b) hidroxiapatita presente en los nanocompuestos.

A partir de esta ecuación se puede relacionar la velocidad de las partículas de hidroxiapatita como si estuvieran en un medio de cultivo modificado con CMC (V_1) y en un medio de cultivo sin modificar (V_2):

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{\mu_2}{\mu_1} \quad (4)$$

donde μ_2 es la viscosidad del medio de cultivo que contiene CMC y μ_1 es la viscosidad dinámica del medio de cultivo sin CMC.

De acuerdo con las especificaciones técnicas del fabricante de CMC (Acros Organics), μ_2/μ_1 tendrá valores entre 1500 y 3000 en una solución al 2% y a 25 °C. Así, la velocidad de sedimentación de las partículas de hidroxiapatita en el medio de cultivo que contiene CMC es aproximadamente 3.5×10^{-9} m/s, es decir las partículas descenderán 0.3 mm/día. De esta manera las partículas quedarán atrapadas en el gel de celulosa que crece en la interfase líquido-aire en el medio de cultivo.

Los geles obtenidos en este estudio son uniformes y todos de aproximadamente 8.0 mm con un contenido de agua de 99.15% (determinado por TGA). Asimismo, considerando que el volumen del gel ocupa la cuarta parte del envase que contiene el medio de cultivo, y asumiendo que el CMC está uniformemente solubilizado en el medio, se estima que aproximadamente 0.25% del peso inicial de CMC fue incorporado en los nanocompuestos finales.

4.3.3. Propiedades físico químicas

En la Figura 21 se muestra los espectros de los ensayos de ATR-FTIR para las partículas de hidroxiapatita (HAp), las partículas de HAp en CMC al 1% disuelto en agua (CMC-HAp), celulosa bacteriana (BC), celulosa bacteriana crecida en un medio modificado con CMC al 1% (BC-CMC) y los nanocompuestos BC-CMC-HAp. Una característica usual de la modificación de las redes de celulosa por la adición de CMC es la reducción en intensidad de la banda correspondiente a Celulosa I Tipo Alfa, $I\alpha$ (750 cm^{-1}) (Yamamoto et. al., 1996).

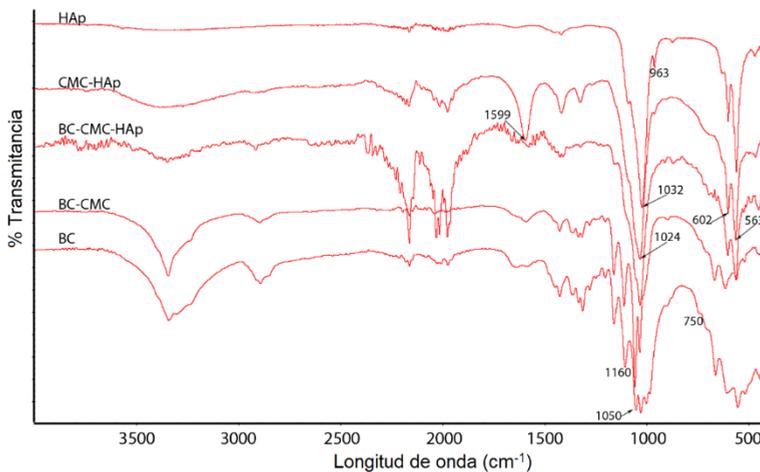


Figura 21. Espectros de IR para las partículas de hidroxiapatita (HAp), carboximetilcelulosa al 1% (w/v) e hidroxiapatita al 1% (w/v) (CMC-HAp), nanocompuestos de celulosa bacteriana-carboximetilcelulosa al 1% (w/v) -hidroxiapatita al 1% (w/v) (BC-CMC-HAp), celulosa bacteriana modificada con carboximetilcelulosa al 1% (w/v) (BC-CMC) y celulosa bacteriana pura (BC).

En la suspensión liofilizada de CMC-HAp, la banda típica de CMC correspondiente a (ν COONa) aparece a 1599 cm^{-1} . En este espectro hay una predominancia de los grupos correspondientes a HAp en 1032 , 602 y 563 cm^{-1} . La interacción entre CMC y HAp se confirma por el hecho que el pico 1024 cm^{-1} en el espectro de HAp se mueve a 1032 cm^{-1} en el espectro de CMC-HAp. Además, en los nanocompuestos de BC-CMC-HAp las bandas a 1032 y 963 cm^{-1} que corresponden a los modos asimétricos y simétricos de los enlaces P—O de los grupos fosfatos, están presentes. Las intensidades en 602 y 563 cm^{-1} son atribuidas a los enlaces O—P—O de los grupos fosfato (Koutsopoulos, 2002; Sukhodub et. al., 2004). De esta manera, la presencia de buenos enlaces de los grupos de BC y HAp aumenta la estabilización de los nanocompuestos.

Tal como sucede en la suspensión liofilizada de CMC-HAp en los nanocompuestos BC-CMC-HAp se observa una predominancia del espectro de las partículas de HAp con respecto a BC y BC-CMC. Asimismo, las intensidades de los picos correspondientes a HAp en los nanocompuestos son menores que las intensidades de los mismo picos en el espectro de HAp pura. Esto puede deberse a una reducción en la cristalinidad de las partículas de HAp en los nanocompuestos. Esta información es confirmada con los ensayos de difracción de rayos X.

En la Figura 22 se observa los difractogramas para hidroxiapatita pura (HAp), para los nanocompuestos de BC-CMC-HAp, para celulosa producida en presencia de CMC al 1% (BC-CMC) y para

celulosa pura (BC). Los picos en 25.8° , 31.8° , 32.9° , 34.0° , 39.7° , 46.6° y 53.1° (2θ) corresponden a hidroxiapatita pura (Zhitomirsky y Gal-Or, 1997). Por otro lado, la celulosa bacteriana presenta intensidades a 14.5° y 22.6° (2θ). Los picos de difracción anchos indican que la celulosa no es un material totalmente cristalino (Watanabe et. al., 1998). Asimismo la celulosa que creció en un medio conteniendo 1% CMC (BC-CMC) presenta planos de difracción en los mismos ángulos que la celulosa pura, pero el tamaño de cristales se ha reducido ya que los picos se han amplificado.

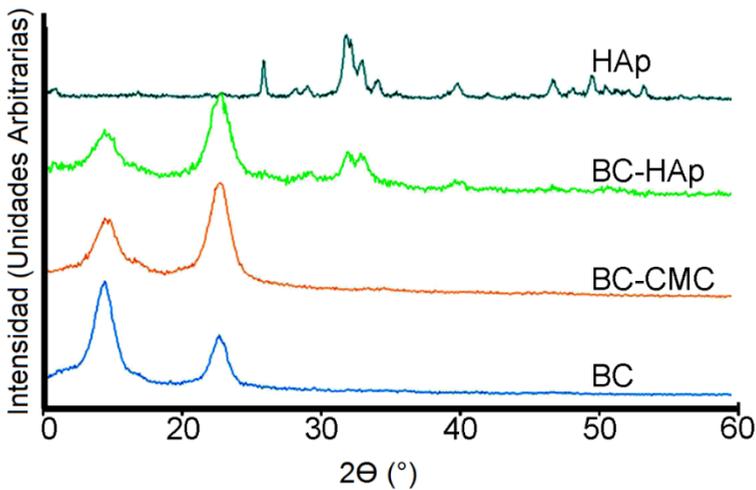


Figura 22. Diffractogramas de hidroxiapatita (HAp), nanocompuestos de celulosa bacteriana-carboximetilcelulosa al 1% (w/v) -hidroxiapatita al 1% (w/v) (BC-CMC-HAp), celulosa bacteriana modificada con carboximetilcelulosa al 1% (w/v) (BC-CMC) y celulosa bacteriana pura (BC).

La reducción del tamaño de los cristales está asociada con la disminución del tamaño de microfibras de celulosa bacteriana (Yamamoto et. al., 1996). Este hecho se asocia a los resultados obtenidos ya que el diámetro promedio de fibras de celulosa crecidas en un medio que contiene 1% de CMC es casi 50% menos que el mismo valor correspondiente para celulosa bacteriana pura.

Los nanocompuestos de BC-CMC-HAp presentan los dos picos típicos de BC-CMC. Asimismo la reducción de las intensidades correspondientes a HAp y los picos más anchos que estas presentan en los difractogramas de los nanocompuestos, indican que hay una reducción en la cristalinidad de la hidroxiapatita, confirmando las observaciones previas en los espectros de infrarrojos.

Los datos obtenidos de XRD están de acuerdo a otros nanocompuestos de celulosa bacteriana-hidroxiapatita obtenidos por el procesamiento de inmersión de los geles en soluciones de calcio-fosfato y en soluciones de fluido simulado de cuerpo (SBF) (Hong et. al., 2006; Wan et. al., 2006; Wan et. al., 2007; Hutchens et. al., 2006)

El análisis termogravimétrico (TGA) es un método analítico en el cual las propiedades físicas y químicas de los materiales son medidas como función del incremento de temperatura, manteniendo constante la velocidad de calentamiento; o como función del tiempo, manteniendo la temperatura y/o la pérdida de masa constante. Las aplicaciones comunes de TGA incluyen la

caracterización de materiales a través de los patrones de descomposición, mecanismos de degradación y cinética, y determinación de contenidos orgánicos e inorgánicos.

Los resultados de TGA para HAp, los nanocompuestos de BC-CMC-HAp, celulosa obtenida del medio modificado (BC-CMC) y celulosa pura (BC) se muestran en la Figura 23. La primera curva indica que a 900 °C la HAp ha perdido 7.2% de su peso inicial. Asimismo, en esta curva se observa que no hay transformación de fase lo cual confirma la estabilidad de este material a altas temperaturas. Asimismo, se calcula que la pérdida total de peso en los nanocompuestos BC-CMC-HAp fue de 76.3% debido a la descomposición de las macromoléculas orgánicas. Asimismo, puede observarse que más allá de 675 °C no hay pérdida de peso. Esto indica que todos los componentes orgánicos fueron descompuestos por debajo de este valor de temperatura. De esta manera el material compuesto permanece estable hasta 900 °C debido solo a la presencia de hidroxiapatita. Por tanto se concluye en esta parte que la fase mineral en los nanocompuestos constituye el 23.7% del peso total.

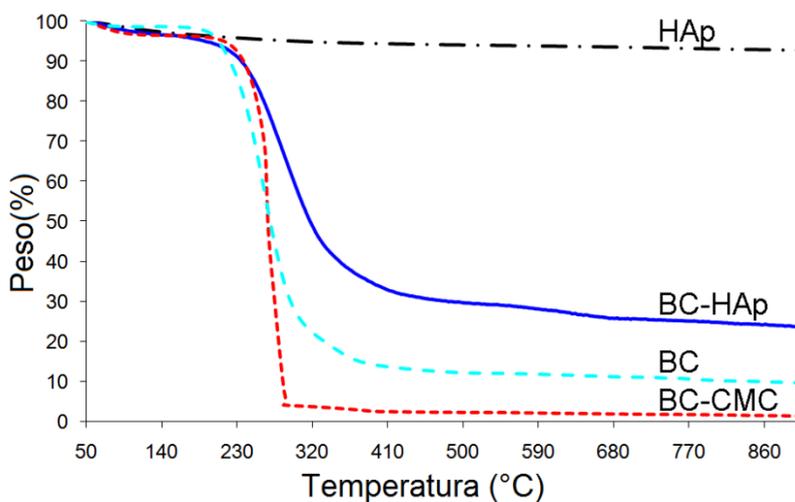


Figura 23. Curvas de TGA para hidroxiapatita (HAp), nanocompuestos de celulosa bacteriana-carboximetilcelulosa al 1% (w/v)-hidroxiapatita al 1% (w/v) (BC-CMC-HAp), celulosa bacteriana modificada con carboximetilcelulosa al 1% (w/v) (BC-CMC) y celulosa bacteriana pura (BC).

4.3.4. Respuesta celular

En la Figura 24 se muestran imágenes de microscopía óptica para cultivos de células HEK de un día en muestras planas de BC, BC-CMC, en el nanocompuesto BC-CMC-HAp y en la placa de control. Las células proliferaron en todos los casos y la confluencia se alcanzó después de dos días de cultivo.

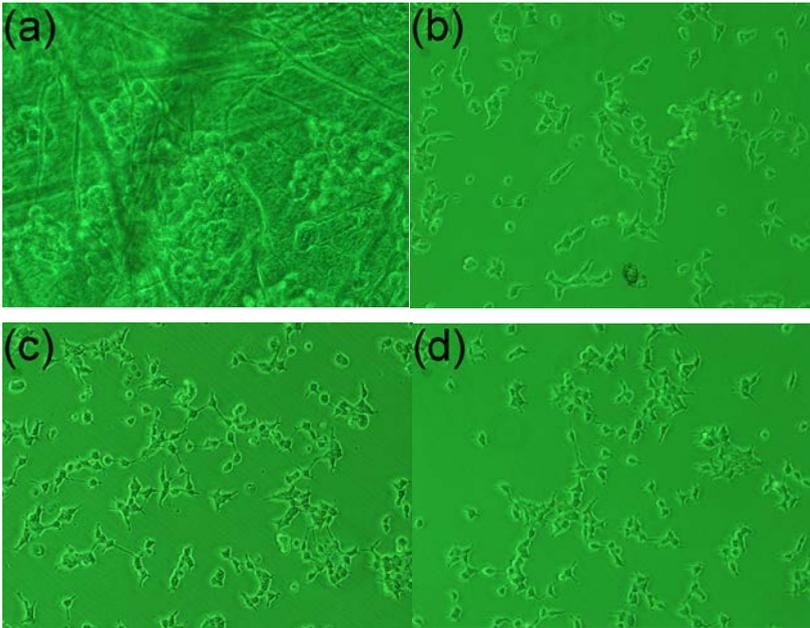


Figura 24. Imágenes de microscopía óptica de células HEK para un día de cultivo en (a) celulosa pura, (b) celulosa bacteriana modificada con carboximetilcelulosa al 1% (w/v), (c) nanocompuestos de celulosa bacteriana-carboximetilcelulosa al 1% (w/v) -hidroxiapatita al 1% (w/v) y (d) placa de Poliestireno de control.

Asimismo, en la Figura 25 se muestra los mismos materiales removidos de sus medios de cultivos originales y colocados en nuevas placas de cultivo en presencia de medio nuevo con la finalidad de analizar si las células se han adherido a los materiales. De las imágenes se puede deducir que la mayor parte de células vivas no se encuentran en las láminas analizadas, sino que están en las mismas superficies de las placas de cultivo.

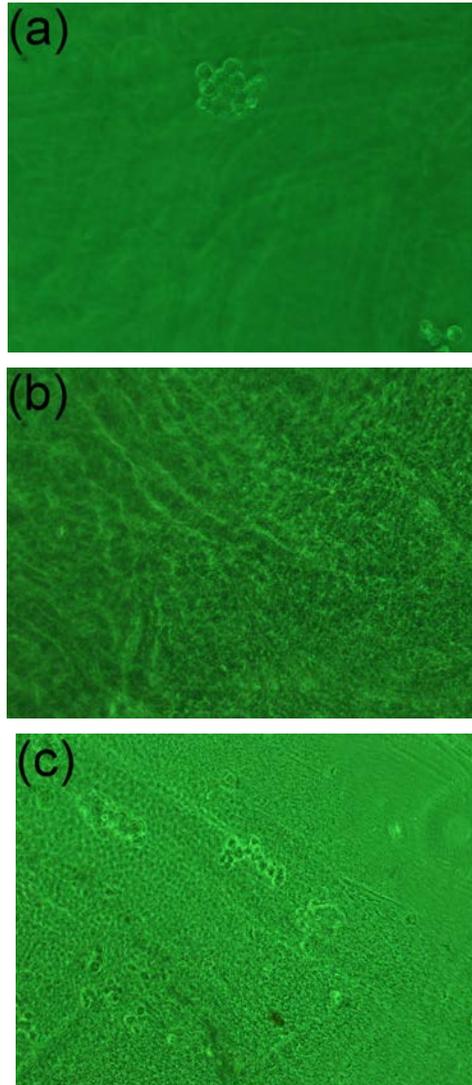


Figura 25. Imágenes de microscopía óptica de láminas de (a) celulosa pura, (b) celulosa bacteriana modificada con carboximetilcelulosa al 1% (w/v), y (c) nanocompuestos de celulosa bacteriana-carboximetilcelulosa al 1% (w/v) - hidroxiapatita al 1% (w/v) las cuales fueron removidas del medio de cultivo con células pegadas a la superficie.

Por otro lado, los análisis de viabilidad celular muestran valores de 86.8%, 95.1% y 97.2% para los medios en los que estuvieron presentes BC, BC-CMC y los nanocompuestos de BC-CMC-HAp, respectivamente. Cabe señalar que el tamaño de poro, la orientación de los poros, la estructura de la fibra y el diámetro de las fibras de los andamiajes para ingeniería de tejidos tienen influencia en el comportamiento celular y desarrollo de tejidos (Bhattarai et. al., 2005). El incremento de la viabilidad celular de las células HEK en los materiales de BC-CMC con respecto a BC pura, puede ser atribuido a los menores diámetros de las fibras y los mayores tamaños de poro obtenidos para los materiales de BC-CMC. Por otro lado, la hidroxiapatita tiene la habilidad de formar enlaces con los tejidos circundantes (Murugan y Ramakrishna, 2006), por esta razón se justifica que los nanocompuestos de BC-CMC-HAp presenten una mayor viabilidad celular que los otros materiales.

Aunque las células vivas no estuvieron presentes en su mayoría en las superficies de los materiales, todos estos pueden considerarse como biocompatibles debido a la presencia de células en los mismos medios de cultivo.

4.4. Conclusiones

Se han producido nanocompuestos de celulosa bacteriana-hidroxiapatita (BC-CMC-HAp) introduciendo la fase mineral dentro del medio de cultivo de las bacterias para la posterior

formación de nanofibras de celulosa. Para este propósito, se ha utilizado carboximetilcelulosa (CMC) al 1% (w/v) con el objetivo de suspender las partículas de hidroxiapatita aprovechando la viscosidad del medio de cultivo modificado.

Utilizando CMC al 1% (w/v), el diámetro de las fibras de celulosa es casi 50% menor que el diámetro de las fibras obtenidas de un medio de cultivo sin modificar. Este resultado es atribuido al efecto que tiene el CMC sobre la cepa *Gluconacetobacter saccharivorans* durante la biosíntesis de celulosa.

Las imágenes y análisis de distribución de fibras en celulosa pura y en celulosa modificada al 1% con CMC, demuestran que ambas estructuras forman una red de nanofibras aleatorias. Asimismo el tamaño de poro de celulosa pura aumenta 47.8% cuando se agrega carboximetilcelulosa al medio de cultivo.

Los análisis mediante espectroscopía de infrarrojos (ATR-FTIR) demuestran las interacciones de los grupos funcionales de hidroxiapatita y celulosa en los nanocompuestos finales. De esta manera, los enlaces químicos entre los componentes mejora la estabilización del material para aplicaciones biomédicas. Asimismo, los ensayos de difracción de rayos X demuestran que los nanocompuestos tienen menor cristalinidad comparada con la de hidroxiapatita pura, y los análisis termogravimétricos demuestran que la fase inorgánica representa el 23.7% del peso total del nanocompuesto.

La biocompatibilidad y viabilidad celular de los nanocompuestos preparados fue confirmada por siembras de células HEK en los sustratos. Asimismo, el tamaño de poro y el diámetro de las fibras de los materiales basados en celulosa bacteriana están influenciados por el método de extracción de agua. Algunos estudios (Bhattarai et. al., 2005; Yang et. al., 2001) indican que el tamaño de poro y el diámetro de fibras de los andamiajes para ingeniería de tejidos tienen influencia en el crecimiento celular. Por esta razón en un trabajo futuro podría analizarse la influencia de la geometría de las redes en la respuesta celular para los andamiajes obtenidos por liofilización e intercambio de solvente.

Con este estudio se demuestra que se puede suspender varios tipos de micro y nanopartículas en un medio de cultivo variando la viscosidad con un aditivo compatible. De esta manera, diferentes tipos de partículas sólidas pueden agregarse a los medios de cultivos con la finalidad de obtener materiales compuestos basados en celulosa bacteriana.

Finalmente, la biocompatibilidad de los materiales y la bioactividad que presenta la hidroxiapatita hacen de este un material nanocompuesto con potenciales aplicaciones biomédicas.

Capítulo 5

**Optimización del Crecimiento
Celular Mediante Adsorción
de Colágeno y Polilisina**

CAPÍTULO 5. OPTIMIZACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR MEDIANTE ADSORCIÓN DE COLÁGENO Y POLILISINA

5.1. Biocompatibilidad, viabilidad y proliferación celular en sustratos de celulosa

Dos de los aspectos más importantes a considerar para la fabricación y uso de materiales en ingeniería de tejidos, son la biocompatibilidad y la correcta elección de una matriz extracelular que permita la adhesión celular (Goddard and Hotchkiss, 2007). Mediante un buen proceso de adhesión, se podrá controlar de mejor manera los procesos subsiguientes que ocurren en la mejora o reemplazo de tejidos existentes tales como la proliferación, migración y diferenciación celular.

En los capítulos anteriores 3 y 4 de esta tesis, se demostró un método para la fabricación de materiales compuestos basados en celulosa bacteriana incluyendo la segunda fase del material durante la biosíntesis de las fibras de celulosa. Asimismo, los materiales obtenidos (compuestos de celulosa bacteriana-almidón y celulosa bacteriana-hidroxiapatita) pueden ser utilizados en aplicaciones biomédicas, y por ello en el capítulo 4 se demostró la

biocompatibilidad de la celulosa bacteriana. Sin embargo las células no se adhieren de manera eficiente a los sustratos analizados.

La adhesión de células en materiales biomédicos puede incrementarse mediante la adición de péptidos en las superficies de los sustratos (Bodin et. al., 2007; Andrade et. al., 2010a). Los péptidos son fragmentos que presentan dominios de señales proteicas que interactúan con receptores de la membrana celular, y pueden incluirse mediante modificación física o química de las matrices extracelulares (Hersel et. al., 2003). Otras formas de mejorar la adhesión es a través del uso de capas de proteínas adhesivas tales como fibronectina, vitronectina, laminina y colágeno (Watanabe et. al., 1993; Wiegand et. al., 2006; Luo et. al., 2008); y mediante la incorporación de poliaminoácidos tales como los polímeros de D- y L-lisina, los cuales son utilizados para el recubrimiento de placas de cultivo celular.

El objetivo del capítulo 5 es demostrar la adhesión celular en los sustratos de celulosa bacteriana que se han venido trabajando, mediante el uso de colágeno y poli-L-lisina. Asimismo, se reporta por primera vez el uso de poli-L-lisina como promotor de adhesión celular en aplicaciones con celulosa bacteriana.

5.2. Experimental

5.2.1. Preparación de los geles de celulosa

En este trabajo se utilizó una cepa de la especie *Gluconacetobacter xylinus* subsp. *sucrofermentans* (BPR2001) proveniente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), la cual fue

Optimización del Crecimiento Celular Mediante Adsorción de Colágeno y Polilisina

inoculada en un medio de cultivo Hestrin-Schramm (Hestrin y Schramm, 1954).

El medio estuvo compuesto de 2.0% (w/v) D-Glucosa, 0.5% (w/v) peptona, 0.5% (w/v) extracto de levadura, 0.27% (w/v) dihidrógenofosfato anhidro y 0.115% (w/v) ácido cítrico monohidrato. El pH de la solución fue ajustado en 4.0 usando ácido clorhídrico y autoclavado durante 20 minutos a 121 °C. Luego que el medio de cultivo fue enfriado, se agregó 0.5% (w/v) de etanol. Una vez que los geles alcanzaron el espesor de 4 mm fueron retirados del medio para su posterior tratamiento.

5.2.2. Modificación superficial de celulosa bacteriana

Los geles fueron introducidos en 20 ml de una solución 0.5 M de NaOH. Las superficies fueron eléctricamente modificadas mediante la adición de 6.63 ml de cloruro de glicidil trimetilamonio (Sigma). La reacción fue llevada a cabo durante 5 horas a 70 °C. Luego de este periodo, la mezcla fue neutralizada usando una solución 6 M de HCl. Los geles fueron posteriormente lavados repetidamente con agua destilada hasta alcanzar un pH igual a 7.0 y luego almacenados en frascos estériles.

5.2.3. Adsorción de colágeno y poli-L-lisina en celulosa bacteriana

Inicialmente 0.03% (w/v) de colágeno de piel de ternero (Sigma) y 0.03% de poli-L-lisina hidrobromida (Sigma) fueron introducidos y disueltos por separado en soluciones de medio de cultivo Eagle

modificado por Dulbecco, DMEM/F-12 (Gibco) en estado puro, es decir sin antibiótico ni suero.

Las soluciones de colágeno y poli-L-lisina fueron posteriormente agregadas por separado en los frascos que contenían los geles de celulosa bacteriana y se mantuvieron en agitación durante 4 días. Luego de este periodo, los geles fueron retirados y lavados repetidamente usando DMEM/F-12 puro. Los geles modificados con colágeno y poli-L-lisina fueron introducidos en frascos conteniendo DMEM/F-12 y autoclavados durante 20 minutos a 121 °C.

5.2.4. Siembra y cultivos celulares

Con el objetivo de analizar la proliferación y adhesión celular en los geles de celulosa bacteriana modificados con colágeno y poli-L-lisina (CmBC y PmBC, respectivamente) se utilizó células de ovario de hámster chino, también conocidas como CHO (*chinese hamster ovary*). Inicialmente el medio de cultivo celular consistió de una solución de DMEM/F-12 (Gibco) con los siguientes suplementos: 10% suero bobino fetal (FCS, Gibco), 1% penicilina-estreptomicina (P/S) y 1% de aminoácidos esenciales (*AA essential*). Las células se mantuvieron en atmósfera modificada a 37 °C y 5% CO₂.

Una vez que se alcanzó la confluencia de las células, el medio de cultivo celular fue removido y las células lavadas con solución buffer fosfato salino (PBS, Gibco). Las células fueron luego tripsinizadas usando 1 ml de tripsina, y la reacción fue detenida

Optimización del Crecimiento Celular Mediante Adsorción de Colágeno y Polilisina

usando 1 ml de medio de cultivo fresco. Los geles de CmBC y PmBC fueron colocados en los platos de cultivo celular y las células CHO fueron directamente sembradas en los geles. Posteriormente, los geles sembrados fueron recubiertos con medio de cultivo fresco.

Con el objetivo de analizar si las células se fijaron a los geles CmBC y PmBC, ambos sustratos fueron observados mediante microscopía óptica luego de 3 días de crecimiento. Para ello, los materiales fueron lavados usando medio de cultivo fresco para remover las células que no se fijaron. Luego los sustratos fueron transferidos en nuevos platos de cultivo celular, sembrados nuevamente con células CHO e incubados durante 2 días. Luego de este periodo fueron observados en el microscopio para analizar si hay células vivas y asimismo llevar a cabo el estudio de viabilidad celular, tomando como control placas Petri para cultivo celular.

Para determinar la viabilidad celular, las células fueron tripsinizadas usando 1 ml de tripsina. De igual forma, 1 ml de medio de cultivo fresco fue utilizado para detener la reacción. Luego de mover suavemente los platos, las soluciones fueron colocadas en la cámara de Neubauer y analizadas mediante microscopía óptica. El valor de viabilidad es obtenido dividiendo el número de células vivas entre el total de células. Los experimentos fueron llevados a cabo al menos 4 veces.

5.2.5. Análisis morfológico mediante SEM

Se obtuvieron imágenes de los geles PmBC mediante microscopía de barrido electrónico con el objetivo de analizar la fijación y morfología celular. Los geles fueron obtenidos al quinto día de cultivo celular. Inmediatamente fueron cortados asépticamente en piezas las cuales fueron fijadas con agente fijador de Karnovsky. Las muestras fueron luego deshidratadas mediante un gradiente de concentraciones de etanol y finalmente se sometieron a un secado de punto crítico para evitar que colapsen o deformen su estructura original. Las imágenes se obtienen para las caras de arriba y debajo de los geles.

5.3. Resultados

5.3.1. Análisis morfológico

Una vez transcurridos tres días de crecimiento de las células CHO en los sustratos de CmBC y PmBC, estos fueron lavados varias veces con medio de cultivo fresco y vistos al microscopio para analizar si existían células vivas en las superficies. A diferencia de los estudios iniciales que se muestran en el capítulo 4, en las Figuras 26 y 27 se muestra que las células del tipo CHO permanecen adheridas a los sustratos luego que estos son lavados repetidamente con medio de cultivo fresco. Los sustratos son posteriormente transferidos a nuevos platos de cultivos celulares y sembrados con células frescas, las cuales se incubaron a las condiciones iniciales.

Optimización del Crecimiento Celular Mediante Adsorción de Colágeno y Polilisina

Luego del segundo día de incubación, los sustratos CmBC y PmBC mostraron confluencia (Figura 28). De esta manera se demuestra que la modificación de la carga eléctrica de los sustratos de celulosa y posterior inclusión de los factores de crecimiento incrementan la cantidad de ubicaciones con carga eléctrica positiva disponibles para la unión con las membranas celulares.

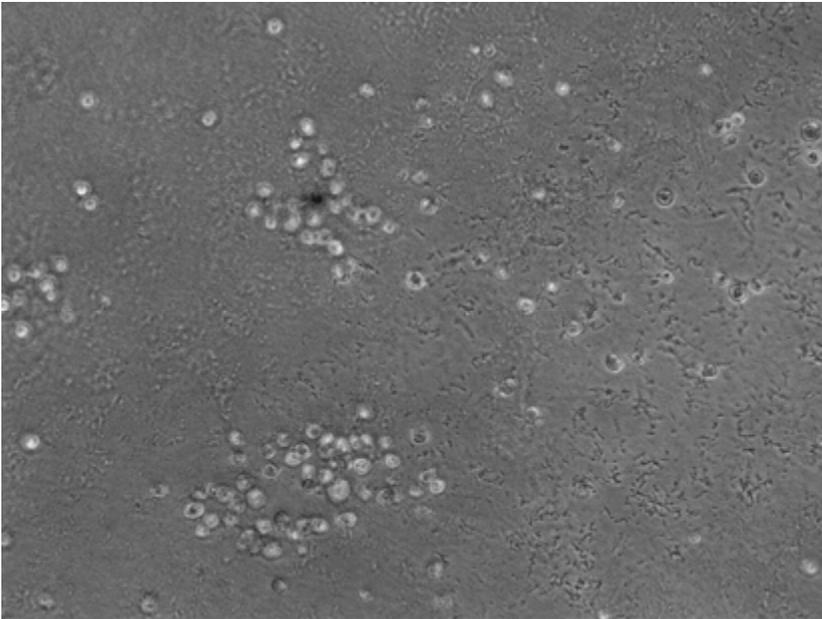


Figura 26. Sustrato CmBC luego de 3 días de incubación y lavado con medio de cultivo fresco. Se puede observar las células CHO adheridas al material.

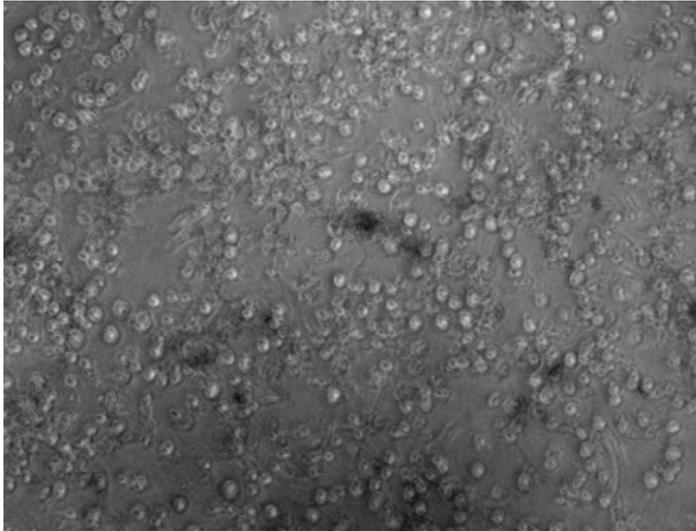


Figura 27. Sustrato PmBC luego de 3 días de incubación y lavado con medio de cultivo fresco. Se puede observar las células CHO adheridas al material.

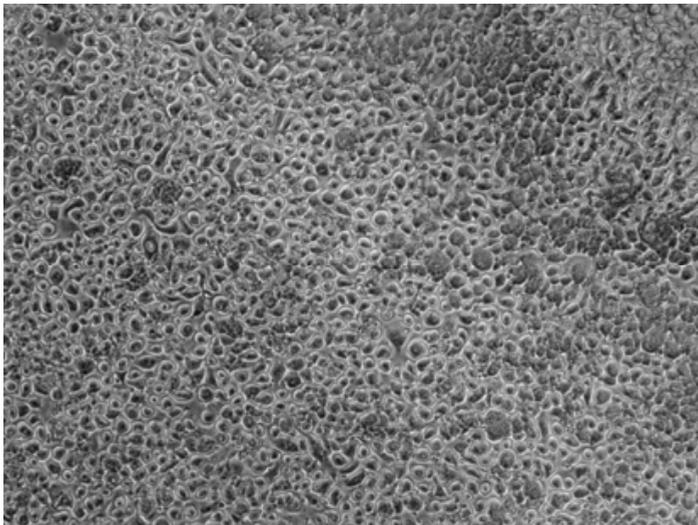


Figura 28. Sustrato PmBC luego de una nueva siembra y 2 días adicionales de incubación.

Optimización del Crecimiento Celular Mediante Adsorción de Colágeno y
Polilisina

Por otro lado la morfología de la red tridimensional de celulosa bacteriana no se altera al realizar las modificaciones de carga eléctrica y adsorción de los factores de crecimiento. En la Figura 29 se muestran imágenes SEM representativas de la cara superior de los sustratos de celulosa bacteriana modificada con poli-L-lisina. Se puede observar la confluencia que alcanza las células CHO en la superficie de los sustratos PmBC. Asimismo, se deduce de las imágenes que las células muestran confluencia en toda la superficie de celulosa y no hay presencia de células muertas (Fig 29A y 29B). Se observa asimismo una morfología celular alargada (Fig. 29C, 29D), característica de las células que se encuentran firmemente adheridas a la superficie de celulosa bacteriana. (Svensson et. al., 2005).

5.3.2 Análisis de biocompatibilidad y viabilidad celular

Los resultados de viabilidad celular fueron 99%, 91% y 65% para las placas de cultivo celular tomadas como control, los sustratos PmBC y los sustratos CmBC, respectivamente (Figura 30). Por medio de estos resultados se deduce que las proteínas consideradas como factores de adhesión celular son adsorbidas en las membranas de celulosa bacteriana. Asimismo, los sustratos modificados con poli-L-lisina, aunque muestran un nivel de viabilidad celular menor que el que ocurre para placas Petri de poliestireno, tienen mejores resultados de respuesta celular que los sustratos con colágeno.

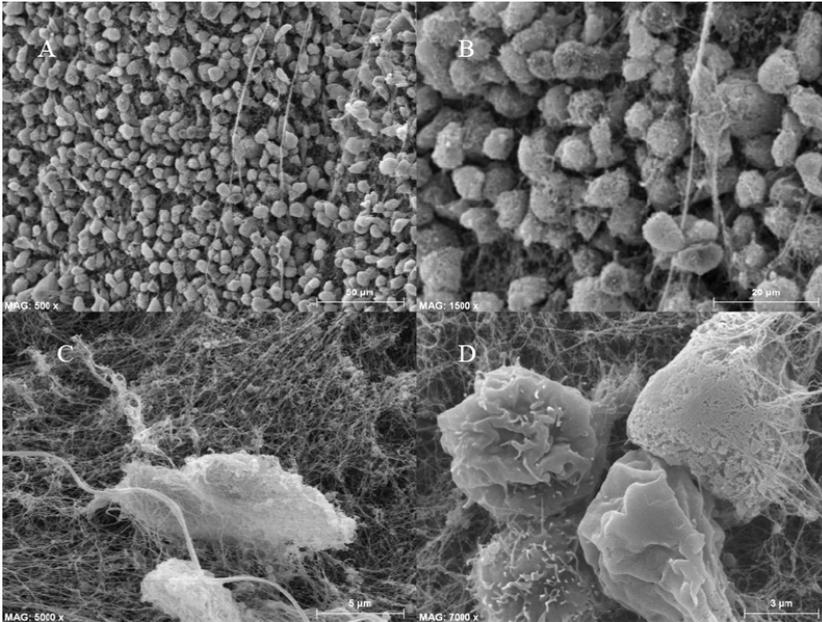


Figura. 29. Imágenes SEM de la adhesión de las células del tipo CHO en los sustratos de celulosa bacteriana.

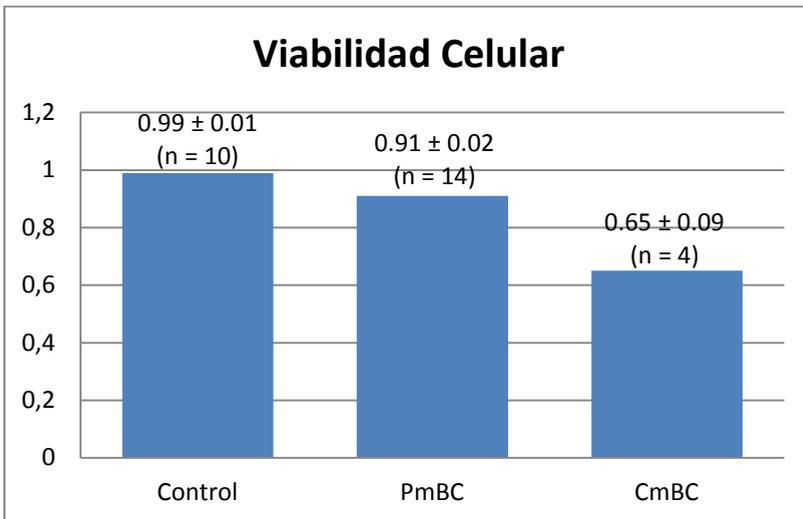


Figura 30. Comparativo de viabilidad celular entre placa control, sustratos PmBC y sustratos CmBC

5.4. Conclusiones

La adhesión celular en los sustratos de celulosa bacteriana fue alcanzada usando por separado poli-L-lisina y colágeno como factores de adherencia, luego de modificar eléctricamente las superficies y sin alterar la morfología de la celulosa. La viabilidad celular en los sustratos de celulosa bacteriana-poli-L-lisina (91%) es comparable a la obtenida en platos de cultivo celular comerciales (99%).

Por otro lado, la confluencia en los sustratos con adsorción de colágeno y poli-L-lisina se alcanza a los dos días de incubación celular; y se ha demostrado mediante SEM que se produce una fuerte adhesión entre las fibras de celulosa bacteriana y las células CHO. De esta manera se demuestra que tanto la poli-L-lisina como el colágeno pueden ser utilizados como agentes para mejorar las capacidades de la celulosa bacteriana como biomaterial.

Capítulo 6

Conclusiones Generales

CAPÍTULO 6.

CONCLUSIONES GENERALES

- Los materiales compuestos basados en celulosa bacteriana se pueden obtener mediante el método de autoensamblaje de los componentes usando materiales orgánicos o inorgánicos como segunda fase. De esta manera se puede controlar las propiedades de los materiales resultantes así como las etapas del proceso de fabricación.
- La cepa productora de celulosa se aisló de un material nativo conocido como “nata de té”. La presencia de almidón en la formación de la red de celulosa no altera su morfología original ni su estructura cristalina. El almidón gelatinizado se ubica en las zonas externas del material compuesto siendo su fracción volumétrica de aproximadamente 90%
- En la fabricación de los compuestos de celulosa bacteriana-hidroxiapatita, la fase inorgánica se mantiene en suspensión durante el tiempo que dura la biosíntesis de las redes de celulosa. Debido a la presencia de carboximetilcelulosa, el tamaño de las fibras de celulosa se reduce y el tamaño de poro aumenta respecto a las redes de celulosa obtenidas sin alterar el medio de cultivo.
- El material compuesto celulosa bacteriana-hidroxiapatita contiene aproximadamente 23.7% en peso de la fase mineral. Asimismo, se demuestra la biocompatibilidad y

proliferación celular, siendo el material adecuado para aplicaciones de cultivos celulares (ingeniería de tejidos)

- La adhesión celular de los sustratos de celulos bacteriana se optimiza modificando eléctricamente las superficies e incluyendo colágeno y poli-L-lisina como factores de crecimiento celular sin alterar la morfología de las redes de celulosa. La viabilidad celular de los sustratos tratados con poli-L-lisina es mayor que 90% y se demuestra una fuerte adhesión entre células y redes de celulosa.

Capítulo 7

Referencias Bibliográficas

CAPITULO 7. REFERENCIAS

1. Almeida IF, Pereira T, Silva NHCS, Gomes FP, Silvestre AJD, Freire CSR, Sousa Lobo JM, Costa PC. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 86, 2014, 332-336.
2. Alvarez OM, Patel M, Booker J, Markowitz L. *Wounds* 16, 2004, 224-233.
3. Amin MCIM, Abadi AG, Ahmad N, Katas H, Jamal JA. *Sains Malaysiana* 41, 2012, 561-568.
4. Andersson J, Stenhamre H, Backdahl H, Gatenholm P. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 94A, 2010, 1124–1132.
5. Andrade FK, Moreira SM, Domingues L, Gama FM. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 92, 2010a, 9-17.
6. Andrade FK, Costa R, Domingues L, Soares R, Gama Miguel. *Acta Biomaterialia* 6, 2010b, 4034-4041.
7. Araki J, Wada M, Kuga S, Okano T. *Journal of Wood Science* 45, 1999, 258-261.
8. Astley OM, Chanliaud E, Donald AM, Gidley MJ. *International Journal of Biological Macromolecules*, 29, 2001, 193-198.
9. Atalla RH, VanderHart DL. *Science* 223, 1984, 283-285.

10. Backdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risberg B, Gatenholm P. *Biomaterials* 27, 2006, 21-31.
11. Bae S, Shoda M. *Biotechnology and Bioengineering* 90, 2005, 20-28.
12. Barud HS, Assunção RMN, Martines MAU, Dexpert-Ghys J, Marques RFC, Messaddeq Y, Ribeiro SJL. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 46, 2008, 363-367.
13. Barud HS, Ribeiro SJ, Carone CL, Ligabue R, Einloft S, Queiroz PVS, Borges APB, Jahno VD. *Polímeros* 23, 2013, 135-142.
14. Beck-Candanedo S, Roman M, Gray DG. *Biomacromolecules* 6, 2005, 1048-1054.
15. Bhattarai SJ, Bhattarai N, Yi HK, Hwang PH, Cha DI, Kim YH. *Biomaterials* 25, 2005, 2595-2602.
16. Bielecki S, Krystynowicz A, Turkiewicz M, Kalinowska H. Bacterial cellulose. En: *Biopolymers online*. Wiley Online Library, 2005.
17. Bodhibukkana C, Srichana T, Kaewnopparat S, Tangthong N, Bouking P, Martin GP, Suedee R. *Journal of Controlled Release* 113, 2006, 43-56.
18. Bodin A, Ahrenstedt L, Fink H, Brumer H, Risberg B, Gatenholm P. *Biomacromolecules* 8, 2007, 3697-3704.
19. Bondeson D, Mathew A, Oksman K. *Cellulose* 13, 2006, 171-180.

20. Borzani W, De Souza SJ. *Biotechnology Letters* 17, 1995, 1271-1272.
21. Bottomley LA, Coury JE, First PN. *Analytical chemistry* 70, 1998, 425-476.
22. Brackmann C, Bodin A, Akesson M, Gatenholm P, Enejder A. *Biomacromolecules* 11, 2010, 542-548.
23. Brackmann C, Zaborowska M, Sundberg J, Gatenholm P, Enejder A. *Tissue Engineering Part C: Methods* 18, 2012, 227-234.
24. Brown AJ. *Journal of the Chemical Society* 49, 1886, 432-439.
25. Brown EE, Laborie M-PG. *Biomacromolecules* 8, 2008, 3427 - 3428.
26. Brown EE, Zhang J, Laborie M-PG. *Cellulose* 18, 2011, 631-641.
27. Brown RM, Saxena IM. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 2000, 57-67.
28. Brown RM, Willison JH, Richardson CL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 1976, 4565-4569.
29. Brown RM. Cellulose Biogenesis and a Decade of Progress: A Personal Perspective. En: Cellulose and wood: chemistry and technology. *John Wiley and Sons*, New York, 1989, 639-657.
30. Brown RM. *US Patent* 4942128, 1990.
31. Brown RM. *Position Paper*, 1998.
32. Bungay HR, Serafica G. *US Patent* 5,955,326, 1999.

33. Bureau TE, Brown RM. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 1987, 6985-1989.
34. Cai Z, Guang Y, Kim J. *Current Applied Physics* 11, 2011, 247-249.
35. Cai Z, Guang Y. *Journal of Applied Polymer Science* 120, 2011, 2938-2944.
36. Cai Z, Kim J. *Cellulose* 17, 2010, 83-91.
37. Charpentier PA, Maguire A, Wan WK. *Applied Surface Science* 252, 2006, 6360-6367.
38. Chawla PR, Bajaj IB, Survase SA, Singhal RS. *Food Technology and Biotechnology* 47, 2009, 107-124.
39. Cheetham NW, Tao L. *Carbohydrate polymers* 36, 1998, 277-284.
40. Cheng H-P, Wang P-M, Chen J-W, Wu W-T. *Biotechnology, Applied Biochemistry*, 35, 2002, 121-132.
41. Cheng K-C, Catchmark JM, Demirci A. *Journal of Biological Engineering* 3, 2009, 12-21.
42. Chiaoprakobkij N, Sanchavanakit N, Subbalekha K, Pavasant P, Phisalaphong M. *Carbohydrate Polymers* 85, 2011, 548-553.
43. Choi Y, Cho S-Y, Heo S, Jin H-J. *Fibers and Polymers* 14, 2013, 266-270.
44. Choi YJ, Ahn Y, Kang M-S, Jun H-K, Kim I-S, Moon S-H. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79, 2004, 79-84.
45. Ciechanska D. *Fibres and Textiles in Eastern Europe* 12, 2004, 69-72.

46. Cousins SK, Brown RM. *Polymer* 36, 1995, 3885-3888.
47. Czaja W, Romanovicz D, Brown RM. *Cellulose* 11, 2004, 403-411.
48. Dos Anjos B, Novaes AB, Meffert R, Barboza EP. *Journal of Periodontology* 69, 1998, 454-459.
49. Dubey V, Pandey LK, Saxena C. *Journal of membrane science* 251, 2005, 131-136.
50. Fang B, Yan YZ, Tang TT, Gao C, Dai KR. *Tissue Engineering Part A* 15, 2009, 1091-1098.
51. Favi PM, Benson RS, Neilsen NR, Hammonds RL, Bates CC, Stephens CP, Dhar MS. *Materials Science and Engineering C* 33, 2013, 1935-1944.
52. Fernandes SC, Oliveira L, Freire CS, Silvestre AJ, Neto CP, Gandini A, Desbrières J. *Green Chemistry* 11, 2009, 2023-2029.
53. Gardiner ES, Sarko A. *Canadian Journal of Chemistry* 63, 1985, 173-180.
54. Gea S, Reynolds C, Roohpour N, Wirjosentono B, Soykeabkaew N, Bilotti E, Peijs T. *Bioresource Technology* 102, 2011, 9105-9110.
55. Gea S, Torres FG, Troncoso OP, Reynolds CT, Vilasecca F, Iguchi M, Peijs T. *International Polymer Processing* 22, 2007, 497-501.
56. Gea, S, Bilotti E, Reynolds CT, Soykeabkaew N, Peijs, T. *Materials Letters* 64, 2010, 901-904.

57. Georget DM, Cairns P, Smith AC, Waldron KW. *International Journal of Biological Macromolecules* 26, 1999, 325-331.
58. Gindl W, Keckes J. *Composites Science and Technology* 64, 2004, 2407-2413.
59. Goddard JM, Hotchkiss JH. *Progress in Polymer Science* 32, 2007, 698-725.
60. Guhadós G, Wan W, Hutter JL. *Langmuir* 21, 2005, 6642-6646.
61. Gutierrez J, Tercjak A, Algar I, Retegi A, Mondragon I. *Journal of Colloid and Interface Science* 377, 2012, 88-93.
62. Habibi Y, Lucia LA, Rojas OJ. *Chemical Review* 110, 2010, 3479-3500.
63. Haigler CH, White AR, Brown RM, Cooper KM. *The Journal of Cell Biology* 94, 1982, 64-69.
64. Herrick FW, Casebier RL, Hamilton JK, Sandberg KR. *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposia* 37, 1983, 797-813.
65. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. *Biomaterials* 24, 2003, 4385-4415.
66. Hestrin S, Schramm M. *Biochemical Journal* 58, 1954, 345-352.
67. Hirai A, Tsuji M, F Horii. *Cellulose*, 9, 2002, 105-113.
68. Hirai A, Tsuji M, Yamamoto H, Horii F. *Cellulose* 5, 1998, 201-213.

69. Hobzova R., Duskova-Smrckova M, Michalek J, Karpushkin E, Gatenholm P. *Polymer International* 61, 2012, 1193-1201.
70. Hong L, Wang YL, Jia SR, Huang Y, Gao C, Wan YZ. *Materials Letters* 60, 2006, 1710-1713.
71. Hornung M. *Dr.-Ing dissertation thesis*, 2010.
72. H-P Fink, H Purz, A Bohn, J Kunze. *Macromolecular Symposia*, 120, 1997, 207-217.
73. Hsieh YC, Yano H, Nogi M, Eichhorn SJ. *Cellulose* 15, 2008, 507-513.
74. Huang L, Chen X, Nguyen TX, Tang H, Zhang L, Yang G. *Journal of Materials Chemistry B* 1, 2013, 2976-2984.
75. Hutchens SA, Benson RS, Evans BR, O'Neill HM, Rawn CJ. *Biomaterials* 27, 2006, 4661-4670.
76. Ichimura K, Iguchi M, Mitsunashi S, Nishi Y, Uryu M, Watanabe K, Yamanaka S. *US Patent* 4,742,164, 1998.
77. Ifuku S, Nogi M, Abe K, Handa K, F Nakatsubo, Yano H. *Biomacromolecules* 8, 2007, 1973-1978.
78. Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A. *Journal of Material Science* 35, 2000, 261-270.
79. Innala M, Riebe I, Kuzmenko V, Sundberg J, Gatenholm P, Hanse E, Johannesson S. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 0, 2013, 1-7.
80. Ishida O, Kim D-Y, Kuga S, Nishiyama Y, Brown RM. *Cellulose* 11, 2004, 475-480.

81. Ishida T, Mitarai M, Sugano Y, Shoda M. *Biotechnology and Bioengineering* 83, 2003, 474-478.
82. Ishihara M, Matsunaga M, Hayashi N, Tisler V. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 2002, 986–991.
83. Jarcho M, Bolen CH, Thomas MB, Bobick J, Kay JF, Doremus RH. *Journal of Materials Science* 11, 1976, 2027-2035.
84. Jung R, Jin H-J. *Key Engineering Materials* 342, 2007, 741-744.
85. Jung R, Kim Y, Kim H-S, Jin H-J. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 20, 2009, 311-324.
86. Juntaro J, Ummartyotin S, Sain M, Manuspiya H. *Carbohydrate Polymers* 87, 2012, 2464–2469.
87. Kačuráková M, Smith AC, Gidley MJ, Wilson RH. *Carbohydrate Research* 337, 2002, 1145-1153.
88. Kamat S, Su X, Ballarini R, Heuer AH. *Nature* 405, 2000, 1036-1040.
89. Kanjanamosit N, Muangnapoh C, Phisalaphong M. *Journal of Applied Polymer Science* 115, 2010, 1581-1588.
90. Kim J, Cai Z, Chen Y. *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine* 1, 2010, 011006.
91. Kim Y, Jung R, Kim H-S, Jin H-J. *Current Applied Physics* 9, 2009, S69-S71.
92. Kimura S, Laosinchai W, Itoh T, Cui X, Linder R, Brown RM. *The Plant Cell* 11, 1999, 2075-2085.

93. Klemm D, Heublein B, H-P Fink, A Bohn. *Angewandte Chemie International Edition* 44, 2005, 3358-3393.
94. Klemm D, Kramer F, Moritz S, Lindström T, Ankerfors M, Gray D, Dorris A. *Angewandte Chemie International Edition* 50, 2011, 5438–5466.
95. Klemm D, Schumann D, Kramer F, Heßler N, Hornung M, Schmauder H-P, Marsch S. *Advances in Polymer Science* 205, 2006, 49-96.
96. Klemm D, Schumann D, Kramer F, Heßler N, Koth D, Sultanova B. *Macromolecular Symposia* 280, 2009, 60-71.
97. Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. *Progress in Polymer Science* 26, 2001, 1561-1603.
98. Koutsopoulos S. *Journal of Biomedical Materials Research Part B* 62, 2002, 600-612.
99. Krystynowicz A, Czaja W, Wiktorowska-Jeziarska A, Goncalves-Miskiewicz M, Turkiewicz M, Bielecki S. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29, 2002, 189–195.
100. Kuga S, Kim DY, Nishiyama Y, Brown RM. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 387, 2002, 13–19.
101. Kuipers AG, Jacobsen E, Visser RG. *The Plant Cell Online* 6, 1994, 43-52.
102. Laszkiewicz B. *Journal of Applied Polymer Science* 67, 1998, 1871–1876.
103. Lee JH, Brown RM, Kuga S, Shoda SI, Kobayashi S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 1994, 7425-7429.

104. Lee KY, Blaker JJ, Bismarck A. *Composites Science and Technology* 69, 2009, 2724-2733.
105. Legnani C, Vilani C, Calil VL, Barud HS, Quirino WG, Achete CA, Ribeiro SJJ, Cremona M. *Thin Solid Films* 517, 2008, 1016-1020.
106. Lin KW, Lin HY. *Journal of Food Science* 69, 2004, 107-111.
107. Lin SB, Chen LC, Chen HH. *Journal of Food Process Engineering* 34, 2011, 1363-1379.
108. Lisdiyanti P, Navarro RR, Uchimura T, Komagata K. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2006, 2101-2111.
109. Luo H, Xiong G, Huang Y, He F, Wang Y, Wan Y. *Materials Chemistry and Physics* 110, 2008, 193-196.
110. Maeda H, Nakajima M, Hagiwara T, Sawaguchi T, Yano S. *Journal of Materials Science* 41, 2006, 5646-5656.
111. Majewicz TG, Erazo-Majewicz PE, Podlas TJ. Cellulose ethers. En: Mark HF, editor. *Encyclopedia of polymer science and technology*, vol. 5. New York: John Wiley and Sons; 2004. p. 503-31.
112. Maneerung T, Tokura S, Rujiravanit R. *Carbohydrate Polymers* 72, 2008, 43-51.
113. Maréchal Y, Chanzy H. *Journal of Molecular Structure* 523, 2000, 183-196.
114. Maria LCS, Santos ALC, Oliveira PC, Valle ASS. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 20, 2010, 72-77.

115. Marrinan HJ, Mann J. *Journal of Polymer Science* 21, 1956, 301-311.
116. Martins IM, Magina SP, Oliveira L, Freire CS, Silvestre AJ, Neto CP, Gandini A. *Composites Science and Technology* 69, 2009, 2163-2168.
117. Millon LE, Mohammadi H, Wan WK. *Journal of Biomedical Materials Research Part B* 79, 2006, 305-311.
118. Moffitt JR, Chemla YR, Smith SB, Bustamante C. *Biochemistry* 77, 2008, 205-228.
119. Mueller SC, Brown RM. *Journal of Cell Biology* 84, 1980, 315-326.
120. Murugan R, Ramakrishna S. *Applied Physics Letters* 88, 2006, 193124.
121. Nakagaito AN, Iwamoto S, Yano H. *Applied Physics A* 80, 2005, 93-97.
122. Nakayama A, Kakugo A, Ping Gong J, Osada Y, Takai M, Erata T, Kawano S. *Advanced Functional Materials* 14, 2004, 1124 – 1128.
123. Nara S, Komiya T. *Starch-Stärke* 35, 1983, 407-410.
124. Nge TT, Sugiyama J. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 81, 2007, 124-134.
125. Nguyen VY, Flanagan B, Gidley MJ, Dykes GA. *Current Microbiology* 57, 2008, 449-453.
126. Nishi Y, Uryu M, Yamanaka S, Watanabe K, Kitamura N, Iguchi M, Mitsuhashi S. *Journal of Materials Science* 25, 1990, 2997-3001.

127. Nishiyama Y, Sugiyama J, Chanzy H, Langan P. *Journal of the American Chemical Society* 125, 2003, 14300–14306.
128. Nobles DR, Romanovicz DW, Brown RM. *Plant Physiology* 127, 2001, 529-542.
129. Nogi M, Ifuku S, Abe K, Handa K, Nakagaito AN, Yano H. *Applied Physics Letters* 88, 2006, 133124-133124.
130. Nogi M, Yano H. *Advanced Materials* 20, 2008, 1849-1852.
131. Novaes AB, Novaes AB, Grisi MFM, Soares UN, Gabarra F. *Brazilian Dental Journal* 4, 1993, 65-71 .
132. Okiyama A, Motoki M, Yamanaka S. *Food Hydrocolloids* 6, 1992, 479-487.
133. Okiyama A, Motoki M, Yamanaka S. *Food Hydrocolloids* 6, 1993, 503-511.
134. O'Sullivan AC. *Cellulose* 4, 1997, 173-207.
135. Pääkkö M, Ankerfors M, Kosonen H, Nykänen A, Ahola S, Österberg M, Ruokolainen J, Laine J, Larsson PT, Ikkala O, Lindström T. *Biomacromolecules* 8, 2007, 1934-1941.
136. Park J-K, Jung J-Y, Park Y-H. *Biotechnology Letters* 25, 2003, 2055-2059.
137. Park J-K, Park Y-H, Jung J-Y. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8, 2003, 83-88.
138. Perrin RM. *Current Biology* 11, 2001, R213-R216.
139. Pértile R, Moreira S, Andrade F, Domingues L, Gama M. *Biotechnology Progress* 28, 2012, 526-532.

140. Phisalaphong M, Jatupaiboon N. *Carbohydrate Polymers* 74, 2008, 482-488.
141. Phisalaphong M, Suwanmajo T, Tammarate P. *Journal of Applied Polymer Science* 107, 2008, 3419-3424.
142. Pinto RJB, Marques PAAP, Neto CP, Trindade T, Daina S, Sadocco P. *Acta Biomaterialia* 5, 2009, 2279-2289.
143. Pretto M, Costa AL, Landi E, Tampieri A, Galassi C. *Journal of the American Ceramic Society* 86, 2003, 1534–1539.
144. Quero F, Nogi M, Yano H, Abdulsalami K, Holmes SM, Sakakini BH, Eichhorn SJ. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2, 2009, 321-330.
145. Ramana KV, Tomar A, Singh L. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16, 2000, 245-248.
146. Randzio SL, Flis-Kabulska I, Grolier JPE. *Macromolecules* 35, 2002, 8852-8859.
147. Rindlav A, Hulleman SH, Gatenholm P. *Carbohydrate Polymers* 34, 1997, 25-30.
148. Roberts EM, IM Saxena, Brown RM. Biosynthesis of cellulose II in *Acetobacter xylinum*. En Cellulose and wood: chemistry and technology. John Wiley & Sons, New York, 1989, p. 689-704.
149. Ross P, Mayer R, Benziman M. *Microbiological Reviews* 55, 1991, 35-58.
150. Saibuatong OA, Phisalaphong M. *Carbohydrate Polymers* 79, 2010, 455-460.

151. Saito T, Kimura S, Nishiyama Y, Isogai A. *Biomacromolecules* 8, 2007, 2485-2491.
152. Saito T, Nishiyama Y, Putaux J-L, Vignon M, Isogai A. *Biomacromolecules* 7, 2006, 1687-1691.
153. Sakairi N, Suzuki S, Ueno K, Han, S-M, Nishi, N, Tokura, S. *Carbohydrate Polymers* 37, 1998, 409-414.
154. Sakurada I, Nukushina Y, Ito T. *Journal of Polymer Science* 57, 1962, 651-660.
155. Sanchavanakit N, Sangrungraungroj W, Kaomongkolgit R, Banaprasert T, Pavasant P, M Phisalaphong. *Biotechnology Progress* 22, 2006, 1194-1199.
156. Sarko A, Southwick J, Hayashi J. *Macromolecules* 9, 1976, 857-863 .
157. Sarko A. Cellulose-How much do we know about its structure. En Wood and cellulose: industrial utilisation, biotechnology, structure and properties. *Halsted Press*, 1986. p. 55-69.
158. Saska S, Scarel-Caminaga RM, Teixeira LN, Franchi LP, dos Santos RA, Gaspar AMM, de Oliveira PT, Rosa AL, Takahashi CS, Messadeq Y, Ribeiro SJL, Marchetto R. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23, 2012, 2253-2266.
159. Seifert M, Hesse S, Kabrelian V, Klemm D. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 42, 2004, 463-470.
160. Shah J, Brown RM. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 2005, 352-355.

161. Shibazaki H, Kuga S, Onabe F, Usuda M. *Journal of Applied Polymer Science* 50, 1991, 965-969.
162. Silva NHCS, Rodrigues AF, Almeida IF, Costa PC, Rosado C, Neto CP, Silvestre AJD, Freire CSR. *Carbohydrate Polymers* 106, 2014, 264-269.
163. Sisson WA. *Science* 87, 1938, 350.
164. Sugiyama J, Persson J, Chanzy H. *Macromolecules* 24, 1991, 2461-2466.
165. Sukhodub LF, Moseke C, Sukhodub LB, Sulkio-Cleff B, Maleev VY, Semenov MA, Bereznyak EG, Bolbukh TV. *Journal of Molecular Structure* 704, 2004, 53-58.
166. Sureshkumar M, Siswanto DY, Lee CK. *Journal of Materials Chemistry* 20, 2010, 6948-6955.
167. Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P. *Biomaterials* 26, 2005, 419-431.
168. Taokaew S, Seetabhawang S, Siripong P, Phisalaphong M. *Materials* 6, 2013, 782-794.
169. Tazi N, Zhang Z, Messaddeq Y, Almeida-Lopes L, Zanardi LM, Levinson D, Rouabhia M. *AMB Express* 2, 2012, 1-10.
170. Tome LC, Pinto RJB, Trovatti E, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP, Gandini A. *Green Chemistry* 13, 2011, 419-427.
171. Trovatti E, Freire CS, Pinto PC, Almeida IF, Costa P, Silvestre AJ, Neto CP, Rosado C. *International Journal of Pharmaceutics* 435, 2012, 83-87.

172. Trovatti E, Silva NH, Duarte IF, Rosado CF, Almeida IF, Costa P, Freire CS, Silvestre AJ, Neto CP. *Biomacromolecules* 12, 2011, 4162-4168.
173. Turbak AF, Snyder FW, Sandberg KR. *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposia* 37, 1983, 815-827.
174. Ul-Islam M, Khan T, Khattak WA, Park JK. *Cellulose* 20, 2013, 589-596.
175. Ul-Islam M, Khan T, Park JK. *Carbohydrate polymers* 89, 2012, 1189-1197.
176. Ul-Islam M, Shah N, Ha J-H, Park J-K. *Korean Journal of Chemical Engineering* 28, 2011, 1736-1743.
177. Ummartyotin S, Juntaro J, Sain M. *Industrial Crops and Products* 35, 2012, 92-97.
178. Vallet-Regí M, Rodriguez-Lorenzo LM, Salinas AJ. *Solid State Ionics* 101-103, 1997, 1279-1285.
179. Varadan VK, Pillai AS, Mukherji D, Dwivedi M, Chen L. Nanoscale Fabrication and Characterization. En Nanoscience and Nanotechnology Engineering. World Scientific 2010.
180. Vermeulen R, Derycke V, Delcour JA, Goderis B, Reynaers H, Koch MH. *Biomacromolecules* 7, 2006, 2624-2630.
181. Wågberg L, Decher G, Norgren M, Lindström T, Ankerfors M, Axnäs K. *Langmuir* 24, 2008, 784-795.

182. Wan YZ, Hong L, Jia SR, Huang Y, Zhu Y, Wang YL, Jiang HJ. *Composites Science and Technology* 66, 2006, 1825-1832.
183. Wan YZ, Huang Y, Yuan CD, Raman S, Zhu Y, Jiang HJ, He F, Gao C. *Materials Science and Engineering: C* 27, 2007, 855-864.
184. Wan YZ, Luo H, He F, Liang H, Huang Y, Li XL. *Composites Science and Technology* 69, 2009, 1212-1217.
185. Watanabe K, Tabuchi M, Morinaga Y, Yoshinaga F. *Cellulose* 5, 1998, 187-200.
186. Wei B, Yang G, Hong F. *Carbohydrate Polymers* 84, 2011, 533-538.
187. Wesarg F, Schlott F, Grabow J, Kurland HD, Heßler N, Kralisch D, Müller FA. *Langmuir* 28, 2012, 13518-13525
188. Whitney SE, Brigham JE, Darke AH, Reid JS, Gidley MJ. *The Plant Journal* 8, 1995, 491-504.
189. Wickholm K, Hult EL, Larsson PT, Iversen T, Lennholm H. *Cellulose* 8, 2001, 139-148.
190. Wiegand C, Elsner P, Hipler U-C, Klemm D. *Cellulose* 13, 2006, 689-696.
191. Woehl MA, Canestraro CD, Mikowski A, Sierakowski MR, Ramos LP, Wypych F. *Carbohydrate Polymers* 80, 2010, 866-873.
192. Yadav V, Panilaitis B, Shi H, Numuta K, Lee K, Kaplan DL. *PloS one* 6, 2011, e18099.

193. Yadav V, Sun L, Panilaitis B, Kaplan DL. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2013.
194. Yamada Y, Hosono, R, Lisdiyanti P, Widyastuti Y, Saono S, Uchimura T, Komagata K. *The Journal of General and Applied Microbiology* 45, 1999, 23-28.
195. Yamamoto H, Horii F, Hirai A. *Cellulose* 3, 1996, 229-242.
196. Yamanaka S, Ishihara M, Sugiyama J. *Cellulose* 7, 2000, 213-225.
197. Yamanaka S, Watanabe K, Kitamura N, Iguchi M, Mitsubashi S, Nishi Y, Uryu M. *Journal of Materials Science* 24, 1989, 3141-3145.
198. Yamanaka S, Watanabe K. Applications of Bacterial Cellulose. Cellulosic Polymers—Blends and Composites. Ed. R. Gilbert. Hanser Gardner, Munchen, 1994, p. 207 – 215.
199. Yan Z, Chen S, Wang H, Wang B, Wang C, Jiang, J. *Carbohydrate research* 343, 2008, 73-80.
200. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. *Tissue Engineering* 7, 2001, 679-689.
201. Yano H, Sugiyama J, Nakagaito AN, Nogi M, Matsuura T, Hikita M, Handa K. *Advanced Materials* 17, 2005, 153-155
202. Yano S, Maeda H, Nakajima M, Hagiwara T, Sawaguchi T. *Cellulose* 15, 2008, 111-120.
203. Yasuda K, Ping Gong J, Katsuyama Y, Nakayama A, Tanabe Y, Kondo E, Ueno M, Osada Y. *Biomaterials* 26, 2005, 44-68.

204. Yoon S-H, Jin H-J, Kook M-C, Pyun Y-R. *Biomacromolecules* 7, 2006, 1280-1284.
205. Zaborowska M, Bodin A, Bäckdahl H, Popp J, Goldstein A, Gatenholm P. *Acta Biomaterialia* 6, 2010, 2540-2547.
206. Zhang Q, Lu Z, Hu H, Yang W, Marszalek PE. *Journal of the American Chemical Society* 128, 2006, 9387-9393.
207. Zhang S, Luo J. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* 6, 2011, 69-72.
208. Zhang T, Wang W, Zhang D, Zhang X, Ma Y, Zhou Y, Qi L. *Advanced Functional Materials* 20, 2010, 1152-1160.
209. Zhang, S. *Nature biotechnology* 21, 2003, 1171-1178.
210. Zhitomirsky I, Gal-Or L. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8, 1997, 213-219.
211. Zimmermann KA, LeBlanc JM, Sheets KT, Fox RW, Gatenholm P. *Materials Science and Engineering C* 31, 2011, 43-49.
212. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. *Molecular Microbiology* 39, 2001, 1452-1463.

Publicaciones

PUBLICACIONES

Esta tesis doctoral ha dado lugar a cuatro artículos cuya información se presenta en este libro. Además se presentan otras publicaciones relacionadas a los temas abordados en esta tesis.

Publicaciones principales

1. **CJ Grande**, FG Torres, CM Gomez, OP Troncoso, J Canet-Ferrer, J Martinez-Pastor. Morphological Characterisation of Bacterial Cellulose-Starch Nanocomposites. *Polymers and Polymer Composites* 16, 2008, 181-185
2. **CJ Grande**, FG Torres, CM Gomez, OP Troncoso, J Canet-Ferrer, J Martinez-Pastor. Development of self-assembled bacterial cellulose-starch nanocomposites. *Materials Science and Engineering C* 29, 2009, 1098-1104
3. **CJ Grande**, FG Torres, CM Gomez, MC Bañó. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. *Acta Biomaterialia* 5, 2009, 1605-1615
4. M Culebras, **CJ Grande**, FG Torres, OP Troncoso, CM Gomez, MC Bañó. Optimization of cell growth on bacterial cellulose by adsorption of collagen and poly-l-lysine. *Aceptado en International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2014

Otras publicaciones relacionadas

5. FG Torres, OP Troncoso, D Lopez, **CJ Grande**, CM Gomez. Reversible stress softening and stress recovery of cellulose networks. *Soft Matter* 5, 2009, 4185-4190

6. FG Torres, **CJ Grande**, OP Troncoso, CM Gomez, D Lopez. Bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications. In *Biocompatible Nanomaterials: Synthesis, Characterization and Application in Analytical Chemistry*. Ed. SA Kumar, S Thiagarajan, F Wang. Nova Science Publishers USA 2010, 2488-2495
7. FG Torres, OP Troncoso, C Torres, **CJ Grande**. Cellulose Based Blends, Composites and Nanocomposites. In *Advances in Natural Polymers Composites and Nanocomposites*. Ed. S Thomas, PM Visakh, AP Mathew. Springer Berlin Heidelberg 18, 2013, 21-54

