

**OBTENCIÓN DE NUEVOS MATERIALES CAPTADORES DE LUZ BASADOS
EN NANOCELULOSA BACTERIANA PARA SENSIBILIZACIÓN DE CULTIVOS
DE MICROALGAS (*Chlorella vulgaris*)**

MARVIN SARMIENTO MÉNDEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2018**

**OBTENCIÓN DE NUEVOS MATERIALES CAPTADORES DE LUZ BASADOS
EN NANOCELULOSA BACTERIANA PARA SENSIBILIZACIÓN DE CULTIVOS
DE MICROALGAS (*Chlorella vulgaris*).**

MARVIN SARMIENTO MÉNDEZ

Trabajo de grado para optar al título de Químico

Directora

**MARIANNY YAJAIRA COMBARIZA MONTANEZ,
Ph. D. en Química Analítica Ambiental**

Codirector

**JULIO ROBERTO PINZÓN JOYA,
Ph. D. en Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2018

DEDICATORIA

A mis padres y mis hermanos por su paciencia e incondicional apoyo en esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme guiado en este camino.

A mi hermano Edinson Sarmiento Méndez por su gran actitud frente a las adversidades, a mi hermano Wilson Fernando Sarmiento Méndez por su gran compromiso a pesar de mis falencias, a mi hermana Magaly Sarmiento Méndez por alegrarme todos los días, a mis papas por su apoyo incondicional, a mis amigos Sergio Armando Celis M y Oscar Zarama J, por tantos años de compañía.

A la universidad industrial de Santander y a los profesores Marianny Yajaira Combariza Montañez, Julio Roberto Pinzón Joya, Juan Sebastian Ramírez Pradilla, por su paciencia y orientación en el transcurso de mi carrera.

Al laboratorio de hongos, sede UIS Guatiguará a cargo de la profesora Inés Hernández Celis y un gran amigo, Jose Orlando Blanco L.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 OBJETIVO GENERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. MARCO TEÓRICO	23
4.1 CELULOSA BACTERIANA.....	26
4.2 CARACTERÍSTICAS DE LA CELULOSA BACTERIANA.....	27
4.3 <i>Chlorella Vulgaris</i>	29
5. ESTADO DEL ARTE.....	31
5.1 AMINOPROPILTRIETOXISILANO (APTES).	33
6. METODOLOGÍA	37
6.1 MICROORGANISMO (CEPA <i>Gluconacetobacter X</i>).	37
6.1 AISLAMIENTO Y CRIOPRESERVACIÓN	38
6.2 MEDIO DE CULTIVO HESTRIN AND SCHRAMM (HS).....	38
6.3 FUENTE DE CARBONO.....	39
6.4 PRODUCCIÓN DE CB	39
6.5 PRODUCCIÓN DE AEROGEL BIORGÁNICO	40
6.6 SÍNTESIS DE PRECURSORES.....	40
6.6.1 Modificación del compuesto formiltrifenilamina.....	40
6.6.2 Modificación del 3-isocianatopropiltrimetoxisilano.	41
6.7 SÍNTESIS DE PLATAFORMAS FLUORESCENTES.....	42
6.8 CULTIVO DE MICROALGAS <i>Chlorella Vulgaris</i>	43
6.8.1 Medio de cultivo.	44

6.8.2 Adición de Celulosa Bacteriana fluorescente (CB-F), al medio de cultivo Basal de Bold (BBM) con el inóculo de la cepa <i>Chlorella Vulgaris</i> .	45
6.9 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.	46
6.9.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS).	46
6.9.2 Espectroscopia infrarroja (FT IR).	46
6.9.3 Difracción de rayos X (DRX).	47
7. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	48
7.1 PREPARACIÓN DE CALDO DE CULTIVO	48
7.1.1 Prueba de solubilidad para el medio de cultivo.	49
7.1.2 Conteo de células del medio de cultivo.	49
7.1.3 Análisis y velocidad de crecimiento.	50
7.2 CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO FESEM-SEM.	52
7.3 ANÁLISIS EDS DE LAS PELÍCULAS DE CELULOSA BACTERIANA.	54
7.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.	55
7.5 CARACTERIZACIÓN MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX).	57
7.6 ANÁLISIS FLUORESCENTE UV-VIS.	60
8. CONCLUSIONES.	63
9. RECOMENDACIONES.	64
BIBLIOGRAFÍA.	65
ANEXOS.	75

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Membrana de Celulosa Bacteriana con tratamiento de purificación.	28
Figura 2. Aerogel biorgánico a base de nanocelulosa bacteriana.....	40
Figura 3. Celulosa Bacteriana fluorescente	42
Figura 4. A (Cultivo microalgas 4 días), B (Cultivo microalgas 20 días).	44
Figura 5. Cultivo de Celulosa bacteriana modificada con la muestra final (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea) (fluorescente), impregnada del Inoculo de la microalga Chlorella Vulgaris.	45
Figura 6. Cultivo CB-F luego de 30 días de inoculación.	46
Figura 7. Arriba, fibras de celulosa bacteriana sin tratamiento. Abajo fibras de celulosa bacteriana recubiertas con el compuesto final fluorescente (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea).....	53
Figura 8. Imágenes SEM de películas de celulosa bacteriana. Izquierda, celulosa bacteriana sin tratamiento. Derecha celulosa bacteriana fluorescente (con formiltrifenilamina modificada y 3-isocianatopropiltimetoxisilano).....	54
Figura 9. Análisis EDS. Crecimiento amorfo sobre las fibras de celulosa bacteriana.....	55

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. <i>Estructura química de la celulosa</i>	28
Esquema 2. Mecanismo de la funcionalización de la celulosa nanocristalina con ácidos carboxílicos.....	32
Esquema 3. Nanocristales de celulosa marcados con Isotiocianato de fluoresceína (FITC).	32
Esquema 4. Modificación del APTES	34
Esquema 5. Diferentes tipos de interacción entre el APTES modificado y la superficie hidroxílica del sustrato.....	35
Esquema 6. Formación del compuesto 4-[(bencilamino)metil]-N,N-difenil-anilina.	41
Esquema 7. Formación del compuesto (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3- trimetoxisililpropil)urea).....	42
Esquema 8. Reacción entre la superficie de la celulosa bacteriana y el 1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3- trimetoxisililpropil)urea (compuesto final).	43

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Velocidad de crecimiento <i>Chlorella Vulgaris</i> , (células/día).....	51
Gráfica 2. Espectro FT-IR (ATR) de celulosa bacteriana producidas por <i>G. Xylinus</i> ATCC22768.	56
Gráfica 3. Espectro FT-IR (ATR) de celulosa bacteriana modificada con la muestra final (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea) (fluorescente).....	57
Gráfica 4. (a) Difractograma DRX, de la celulosa bacteriana, (b) celulosa bacteriana fluorescente.....	59
Gráfica 5. Espectro UV-VIS, de (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3- trimetoxisililpropil)urea) (fluorescente).....	61
Gráfica 6. Espectro UV-VIS, celulosa bacteriana modificada con la muestra final (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea).....	62

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición general de fuentes de celulosa presentes en la naturaleza.....	25
Tabla 2. Diferentes características entre celulosa bacteriana y celulosa vegetal.	25
Tabla 3. Reactivos necesarios para preparar el medio de cultivo BBM (Medio Basal de Bold).....	48
Tabla 4. Velocidad de crecimiento. Celulosa Bacteriana (CB), celulosa Bacteriana Fluorescente y Celulosa Bacteriana con fluoresceína (CB-Flu).....	50

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Membranas de celulosa bacteriana antes y después de ser purificadas.	75
Anexo B. Cultivo de Celulosa bacteriana modificada con la muestra final CB-F y CB-fluorescente), luego de 60 días de haber sido Inoculada con la microalga Chlorella Vulgaris.....	76
Anexo C. Imágenes SEM de películas de celulosa bacteriana producidas por G. Xylinus ATCC22768.....	77
Anexo D. Espectro FT-IR (ATR) de celulosa bacteriana modificada con la muestra final (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea) (fluorescente).....	78
Anexo E. Espectro FT-IR (ATR) de celulosa bacteriana modificada con fluoresceína.....	79
Anexo F. Espectro FT-IR (ATR) de celulosa bacteriana producidas por G. Xylinus ATCC22768.....	80
Anexo G. Espectro FT-IR (ATR) del precursor formiltrifenilamina modificado.....	81
Anexo H. Espectro UV-VIS, de (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3- trimetoxisililpropil)urea) (fluorescente).....	82
Anexo I. Espectro UV-VIS, celulosa bacteriana modificada con la muestra final (1- bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea).....	83
Anexo J. Fotobiorreactor utilizado para el inóculo de la microalga Chlorella Vulgaris.....	84

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo	Término
CB	Celulosa Bacteriana
NCN	Celulosa Nanocristalina
CMF	Celulosa microfibrilada
AGU	Unidad de anhidroglucosa
APTES	Aminopropiltrietoxisilano
HS	Hestrin and Schramm
CB-F	Celulosa Bacteriana Fluorescente
BBM	Medio de cultivo Basal de Bold

RESUMEN

TÍTULO: OBTENCIÓN DE NUEVOS MATERIALES CAPTADORES DE LUZ BASADOS EN NANOCELULOSA BACTERIANA PARA SENSIBILIZACIÓN DE CULTIVOS DE MICROALGAS (*CHLORELLA VULGARIS*)*

AUTOR: MARVIN SARMIENTO MÉNDEZ**

PALABRAS CLAVES: Celulosa Bacteriana (CB), Hestrin and Schramm, microalga (*Chlorella vulgaris*), medio basal de Bold (BBM), fluorescencia.

La naturaleza, fuente de una gran variedad de componentes poliméricos naturales como la celulosa, capaz de reaccionar con agentes externos ya sean orgánicos o sintéticos sin modificar drásticamente su estructura, abre una ventana, hacia la obtención de nuevos compuestos con diferentes aplicaciones.

En este trabajo se utilizó celulosa de origen bacteriano, debido a su alta pureza, ya que no presenta lignina ni hemicelulosa recubriendo su estructura, además de su conformación estructural la cual permite generar plataformas fluorescentes, capaces de emitir luz en una determinada longitud de onda, esto con el fin de obtener medios de cultivos que permitan albergar microorganismos, fotosintéticos como la *Chlorella vulgaris*, siendo el organismo unicelular fotosintético más eficiente del planeta gracias a su alta cantidad de clorofila. Este nuevo medio de cultivo pretende mejorar el rendimiento en cuanto a producción de masa microalgal, reduciendo costos y proporcionando medios de cultivo más amigables con el planeta.

Se prepararon nanofibras fluorescentes a base de nanocelulosa bacteriana (*Acetobacter xilynum*), 3-isocianatopropiltrimetoxisilano y formiltrifenilamina, las cuales sirvieron como materia prima para la formación de hidrogeles biorganicos e hidrofobicos, capaces de emitir luz en un rango de 410 a 500 nm, propiedades que le permitieron funcionar de base para la formación de cultivos orgánicos de microalgas de la especie *Chlorella vulgaris*.

* Proyecto de grado

** Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director. Marianny Yajaira Combariza Montanez, Ph.D
Codirector Julio Roberto Pinzón Joya, Ph.D

ABSTRACT

TITLE: OBTAINING NEW LIGHT-CAPTURING MATERIALS BASED ON BACTERIAL NANOCELLULOSE FOR SENSITIZING MICROALGAE CROPS (*CHLORELLA VULGARIS*)*

AUTHOR: MARVIN SARMIENTO MÉNDEZ**

KEY WORDS: Bacterial cellulose (CB), Hestrin and Schramm, microalga (*Chlorella vulgaris*), Bold basal medium (BBM), fluorescence.

The nature is a source of a big variety of natural polymeric components such as cellulose. This polymer is capable of reacting with external agents without drastically modifying its structure opening a window towards obtaining new compounds with different applications. In this work cellulose of bacterial origin was used because it neither has lignin nor hemicellulose and its rigid structure serves not only as support but also to generate fluorescent platforms that emit visible light at wavelengths that are efficiently absorbed by the photo synthetical microorganisms. This new cultivation technique tries to improve the yield in terms of microalgal mass production and to reduce the biomass recovery costs. Fluorescent nanofibers were prepared using bacterial nanocellulose (*Acetobacter xilynum*), 3-isocyanatopropyltrimethoxysilane and formyl triphenylamine, which served as raw material for the formation of biorganic and hydrophobic hydrogels, capable of emitting light in a range from 410 to 500 nm. These nanofibers were then used as support materials for the cultivation of microalgae of the species *Chlorella vulgaris*.

being the most efficient photosynthetic unicellular organism on the planet, the microalga thanks to its large amount of chlorophyll together with a new culture medium, can improve the yield in terms of microalgal mass production, reducing costs and offering more friendly culture media with the planet.

* Proyecto de grado

** Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director. Marianny Yajaira Combariza Montanez, Ph.D
Codirector Julio Roberto Pinzón Joya, Ph.D

INTRODUCCIÓN

En la ciencia de los materiales la celulosa ha sido un pilar fundamental para la investigación de nuevas estructuras biodegradables, debido a la versatilidad sintética de los grupos funcionales que contiene, propiedades fisicoquímicas y costos en cuanto a su producción. La celulosa es el principal componente de las fibras naturales encontradas en las plantas, entre la pectina, hemicelulosa y la lignina. Naturalmente existen tres tipos de celulosa: celulosa nanocristalina (NCN), celulosa microfibrilada (CMF) y celulosa bacteriana (CB), las cuales funcionan como materia prima para la obtención de los materiales.

En este trabajo de investigación, se generaron nuevos materiales celulósicos para la sensibilización de microalgas, sintetizando CB y modificando sus fibras lo cual se logra, mediante el uso de su monómero denominado unidad de anhidroglucosa (AGU), el cual posee tres grupos hidroxilo que se encuentran disponibles en una posición ecuatorial, confiriéndole la capacidad de formar puentes de hidrógeno con otras cadenas paralelas a ella. Los compuestos fluorescentes son la clave en este tratamiento, reforzando la estructura nanocelulósica y brindándole propiedades fluorescentes, ideales para la formación de cultivos biodegradables capaces de albergar microorganismos¹, ya que los sistemas de cultivos convencionales para la producción de este microorganismo presentan desventajas en cuanto a mantenimiento y contaminación del medio ambiente. Para la formación de estos nuevos materiales fluorescentes nanofibrosos, se hizo reaccionar el compuesto 3-isocianatopropiltrimetoxisilano, con la nanocelulosa bacteriana, generando un medio de cultivo para microalgas con un rendimiento promedio o mayor a cualquier cultivo convencional en cuanto a la producción de biomasa microalgal.

¹ JOHNSON, M. B. & WEN, Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 2010 525–534

Las técnicas usadas actualmente para la producción de reactores para el cultivo de microalgas, ya sea con interés biológico, farmacológico o industrial generan una gran variedad de subproductos², esto sin mencionar el costo de los materiales de partida y las desventajas que estos cultivos generan en cuanto a rendimiento de biomasa microalgal. Actualmente pueden clasificarse en dos clases los cultivos de algas: sistemas abiertos y sistemas cerrados³; estos tipos de cultivos son afectados por condiciones ambientales como la temperatura, concentración de iones, luz y contaminación disminuyendo el rendimiento del cultivo, el cual se puede mejorar proporcionando modelos innovadores a base de recursos renovables como la celulosa bacteriana que permitan suministrar al medio los nutrientes necesarios en un entorno controlado.

² ESTRADA, C. A., NOGUERA, Y. C. & LOPEZ, J. E. Desarrollo tecnológico prototipo para la producción de biodiesel a partir de microalgas en sistemas cerrados , como biocombustible de segunda generación. Eighth LACCEI Lat. Am. ... 2010 1–10

³ LIU, J. et al. Production potential of *Chlorella zofingienensis* as a feedstock for biodiesel. *Bioresour. Technol.* 101, 8658–8663 2010

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El biodiesel, combustible natural utilizado como fuente de energía, es obtenido actualmente a partir de lípidos naturales⁴⁴, con la intención de sustituir el combustible fósil⁵. Sin embargo, las fuentes de lípidos requieren de extensos terrenos de monocultivo que suplan la necesidad energética contemporánea. Una solución que ha surgido para suplir la necesidad de lípidos para biodiesel se basa en la producción de estos a partir de microalgas como la *Chlorella vulgaris* las cuales contienen lípidos de cadena larga en alta concentración, convirtiéndolas en una fuente viable en cuanto a producción de biocombustibles. Sin embargo, la gran desventaja de esta aproximación es el bajo rendimiento de crecimiento algal, que depende del medio de cultivo y de la luz absorbida, haciendo énfasis en que este tipo de microorganismos realizan procesos fotosintéticos en medios enriquecidos. Algunos sistemas de cultivo son abiertos, en los cuales existen desventajas como la contaminación, utilización deficiente de la luz, la cual es difícil de controlar junto con la temperatura. Los fotobiorreactores, sistemas complejos cerrados, presentan desventajas en el costo de los materiales los cuales sufren deterioros con el tiempo, además de una iluminación deficiente y bajos niveles de CO₂^{6 7}.

⁴ SAYAGO, D. Producción De Biocombustibles a Partir De Microalgas. Ra Ximhai - Rev. Soc. Cult. Desarro. 4, 543–558 2008

⁵ LEE, K. Y., BULDUM, G., MANTALARIS, A. & BISMARCK, A. More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. Macromol. Biosci. 14, 10–32 2014

⁶ ABEER, M. M., MOHD AMIN, M. C. I. & MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: Their biochemistry, current approaches and future prospects. J. Pharm. Pharmacol. 66, 1047–1061 2014

⁷ GRATE, J. W. et al. Alexa Fluor-Labeled Fluorescent Cellulose Nanocrystals for Bioimaging Solid Cellulose in Spatially Structured Microenvironments. Bioconjug. Chem. 26, 593–601 2015

2. JUSTIFICACIÓN

El principio de esta investigación es el desarrollo de nuevos materiales basados en trifenilamina capaces de absorber y emitir luz en una determinada longitud de onda sobre un soporte de nanocelulosa bacteriana, que puedan albergar microalgas como la *Chlorella vulgaris*, implementando nuevas metodologías amigables con el medio ambiente que involucren un menor consumo energético y una mayor viabilidad económica.

Durante los últimos años, el Grupo de Investigación en Fisicoquímica Teórica y Experimental (GIFTEX)-UIS, ha investigado sobre la obtención de nanocelulosa bacteriana, a través de diversas rutas sintéticas, con el fin de generar nuevos materiales en los cuales se han encontrado numerosas aplicaciones sintéticas industriales, entre ellas se encuentra la celulosa regenerada la cual sirve de base para películas sintéticas, celulosa microcristalina utilizada en la industria farmacéutica⁸, en el campo de la medicina⁹ ¹⁰ ¹¹, carboximetilcelulosa utilizada como espesante para pinturas, cosméticos, además de biosensores¹² e hidroxipropilcelulosa como emulsificantes para alimentos¹³.

⁸ GUTIÉRREZ-HERNÁNDEZ, J. M. et al. In vitro evaluation of osteoblastic cells on bacterial cellulose modified with multi-walled carbon nanotubes as scaffold for bone regeneration. Mater. Sci. Eng. C 75, 445–453 2017

⁹ LI, G. et al. Biosensor based on bacterial cellulose-Au nanoparticles electrode modified with laccase for hydroquinone detection. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 509, 408–414 2016

¹⁰ RAJWADE, J. M., PAKNIKAR, K. M. & KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 2491–2511 2015

¹¹ HUNGUND, B. S. & GUPTA, S. G. Strain improvement of *Gluconacetobacter xylinus* NCIM 2526 for bacterial cellulose production. African J. Biotechnol. 9, 5170–5172 2010

¹² KOJIMA, I. & LI, B. Structural characterization of thin films by X-ray reflectivity. Rigaku J. 16, 31–42 1999

¹³ UL-ISLAM, M., KHAN, T., KHATTAK, W. A. & PARK, J. K. Bacterial cellulose-MMTs nanoreinforced composite films: Novel wound dressing material with antibacterial properties. Cellulose 20, 589–596 2013

La celulosa siendo un polímero lineal de unidades β -(1,4)-D-glucopiranososa, como componente principal de la pared celular de las plantas, es la fuente de carbono renovable más abundante de la naturaleza y fuente principal de la industria textil y el papel, es considerada propia del organismo del reino de las plantas. Sin embargo nuevas investigaciones y rutas biosintéticas han mostrado la identificación de otras especies productoras de celulosa como las bacterias, principalmente la *Acetobacter xylinum*, capaz de generar biocelulosa o también llamada celulosa bacteriana con diferentes propiedades fisicoquímicas pero la misma estructura química, además de tener una alta pureza y cristalinidad, propiedades que la convierte en un excelente candidato para la producción de nuevos materiales^{14 15}, capaces de reaccionar con diversos compuestos orgánicos y sintéticos sin modificar drásticamente su estructura¹⁶.

¹⁴ SINGH, M. et al. Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter acetii* MTCC 2623. *Carbohydr. Polym.* 94, 12–16 2013

¹⁵ ROJAS John, LÓPEZ Alvin, GAMBOA Yudy, GONZÁLEZ Christian, F. M. Assessment of Processing and Polymorphic Form Effect on the Powder and Tableting Properties of Microcrystalline Celluloses I and II. *Chem. Pharm. Bull.* 59, 603–607 2011

¹⁶ CARREÑO PINEDA, L. D., CAICEDO MESA, L. A. & MARTÍNEZ RIASCOS, C. A. Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ing. y Cienc. - ing.cienc.* 8, 307–335 2012

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener materiales captadores de luz a base de nanocelulosa bacteriana que sirvan de plataforma para la sensibilización de microalgas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener celulosa bacteriana a partir del medio de cultivo *Hestrin and Schramm*, utilizando (*Acetobacter xylinum*).
- Sintetizar los precursores basados en formiltrifenilamina y *N,N*-4-dimetilaminobenzaldehido.
- Modificar superficialmente la nanocelulosa mediante reacciones de 3-isocianatopropiltrimetoxisilano modificado con captadores de luz.
- Generar plataformas (soportes) fluorescentes a base de nanocelulosa bacteriana.
- Cultivar la microalga (*Chlorella Vulgaris*), sobre los nuevos soportes fluorescentes, optimiando condiciones de síntesis, caracterizando los precursores y compuestos finales.

4. MARCO TEÓRICO

El propósito del cultivo de microalgas es la producción de biocombustibles de tercera generación, con características que proporcionen un crecimiento rápido en ambientes extremos¹⁷, alta tolerancia a niveles altos de CO₂, con capacidad de controlar la luz y la temperatura, sencillos y fáciles de construir que no requieran mayor costo económico. Gran parte de los recursos económicos son designados a fuentes de energía, que no se pueden sustituir sin afectar la calidad de vida, por ese motivo se propone formar nuevas estructuras que sirvan de base para generar plataformas para el cultivo de algas que permitan la producción de biodiesel como un sustituto parcial de las fuentes de energía a base de petróleo.

Los medios de cultivos utilizados para la producción de microorganismos fotosintéticos con el fin de generar biodiesel, limitan el rendimiento en la producción de ácidos grasos, ya que estos cultivos funcionan con una determinada intensidad de luz a un pH adecuado, con una densidad celular relativamente alta, por esta razón existen varios sistemas de cultivo con diferentes especies de microalgas¹⁸ divididos en dos clases: sistemas abiertos y sistemas cerrados, donde el sistema abierto es alimentado por energía solar teniendo un contacto directo con el ambiente y contaminación, sin un control directo de la temperatura, por este motivo la producción de celdas solares fluorescentes a base de nanocelulosa, presenta la oportunidad ideal para optimizar la producción de lípidos generados por microalgas que luego serán convertidos en combustible. Iluminados con luz artificial permiten un mayor control sobre las condiciones del

¹⁷ VERA, F. L., ARTURO, H., CORTES, M., MURCIA, C. V. & GALVIS, I. C. Modificación superficial de micro fibras de celulosa obtenidas a partir de bagazo de caña de azúcar usando silanización. 2014

¹⁸ GRIFFITHS, M. J. & HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21, 493–507 2009

cultivo generando un mayor rendimiento de aceite comparado con otros medios de cultivo ya que las algas son excelentes captadoras de CO₂, dejando una huella ecológica pequeña con un costo y análisis moderadamente bajo^{19 20}.

Para el desarrollo de esta investigación, se escogió la celulosa de origen bacteriano, ya que una de las características más importantes es que no contiene hemicelulosa ni lignina, considerándose como una forma de celulosa de alta pureza^{21 22}, en comparación con las fuentes de celulosa convencionales^{23 24}.

En la Tabla 1, se presentan las fuentes convencionales de celulosa, dentro de un marco composicional de lignina y hemicelulosa, donde se puede apreciar que las fuentes convencionales de celulosa contienen material no deseado que requiere además el uso de ácidos y bases minerales para la purificación y obtención de materiales puros.

¹⁹ LUIS, P. & BARBOSA, A. Iteckne innovación e investigación en ingeniería. iteckne Vol 8 No 1,

²⁰ AYTEKIN, A. Ā., DEMIRBAĞ, D. D. & BAYRAKDAR, T. The statistical optimization of bacterial cellulose production via semi-continuous operation mode. J. Ind. Eng. Chem. 37, 243–250 2016

²¹ KIM, S. S. et al. Gluconacetobacter sp. gel_SEA623-2, bacterial cellulose producing bacterium isolated from citrus fruit juice. Saudi J. Biol. Sci. 24, 314–319 2017

²² XIE, K., YU, Y. & SHI, Y. Synthesis and characterization of cellulose/silica hybrid materials with chemical crosslinking. Carbohydr. Polym. 78, 799–805 2009

²³ YAMANAKA, S. et al. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. J. Mater. Sci. 24, 3141–3145 1989

²⁴ RANI, M. U. & APPAIAH, K. A. A. Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter hansenii UAC09 using coffee cherry husk. J. Food Sci. Technol. 50, 755–762 2013

Tabla 1. Composición general de fuentes de celulosa presentes en la naturaleza.

FUENTE	COMPOSICIÓN (%)			
	Celulosa	hemicelulosa	lignina	extracto
<i>Bacteriana</i>	98	0	0	0
<i>Algodón</i>	95	2	1	0.4
<i>Henequén</i>	78	4-8	13	4
<i>Madera</i>	43-47	23-35	16-24	2-8
<i>Bagazo</i>	40	30	20	10

Fuente: CHÁVEZ-PACHECO Juan Luis, S. M.-Y. & ESCAMILLA-MARVÁN, M. C.-Z. y E. Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. 18–25 2004

La celulosa considerado uno de los biopolímeros más abundantes de la naturaleza como producto secundario de la reacción de la glucosa, presenta propiedades que incentivan su investigación, como: biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad, alto grado de cristalización, elasticidad, alta resistencia a la presión, menor diámetro de microfibrillas en comparación con la celulosa vegetal, además de ser metabólicamente inerte y no alergénica²⁵,

Debido a sus características estructurales cumple los requisitos necesarios para la síntesis de nuevas plataformas fluorescentes de microalgas capaces de proporcionar la energía necesaria que permita a las algas realizar la fotosíntesis.

Tabla 2. Diferentes características entre celulosa bacteriana y celulosa vegetal.

Características	Celulosa bacteriana	Celulosa vegetal
	Referencia	Referencia
<i>Dimensiones de las cadenas</i>	70-80 nm 133 nm	<i>Yamanaka et al. 1989</i> <i>Bielecki et al. 2002</i>
		<i>Pino: 3,0-7,5*10⁻² mm</i> <i>Abedul: 1,4-4,0*10⁻²</i>
		<i>Bielecki et al. 2002</i>

²⁵ LIN, D., LOPEZ-SANCHEZ, P., LI, R. & LI, Z. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresour. Technol.* 151, 113–119 2014

Características	Celulosa bacteriana	Celulosa vegetal
	Referencia	Referencia
		<i>mm</i>
Grado de polimerización	de 16.000-20.000 unidades <i>Bielecki et al. 2002</i>	13.000-14.000 <i>Bielecki et al. 2002</i>
Módulo de Young (KPa)	4,9 <i>Yamanaka et al. 1989</i>	Algodón: 0,085 <i>Yamanaka et al. 1989</i>
Temperatura de degradación (°C)	de 200-270 <i>Yamanaka et al. 1989</i>	Algodón: 150 <i>Yamanaka et al. 1989</i>

Fuente: LUZ, I., CARREÑO, D., LUZ, I. & CARREÑO, D. Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Físicoquímicas y de Transporte en Membranas de Celulosa Bacteriana Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Físicoquímicas y de Transporte en Membra. Universidad Nacional de Colombia, 2011

4.1 CELULOSA BACTERIANA

La celulosa bacteriana es producida a través de microorganismos^{26 27 28} de los géneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina* y *Agrobacterium*, de los cuales la especie más eficiente es la *Acetobacter Xylinum*, la cual utiliza azúcares simples como la fructosa, el manitol y algunos alcoholes como fuente de carbono, generando polímeros de residuos de glucosa, unidas por enlaces covalentes en forma de cadenas lineales, que al unirse forman microfibrillas²⁹, las cuales le proporcionan características especiales. Este biopolímero presenta propiedades físicoquímicas diferentes a la celulosa de origen vegetal pero la misma estructura química, formada por 2000 a 14000 unidades de β -(1,4)-D-glucopiranosas, unidas por enlaces tipo puente de hidrógeno.

²⁶ LAZARINI, S. C. et al. Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone. *Cellulose* 23, 737–748 2016

²⁷ CHÁVEZ-PACHECO Juan Luis, S. M.-Y. & ESCAMILLA-MARVÁN, M. C.-Z. y E. Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. 18–25 2004

²⁸ CASTRO, C. et al. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydr. Polym.* 84, 96–102 2011

²⁹ ORTIZ, M., MARCELA, M. & HERNÁNDEZ, M. Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* 7, 26–34 2004

Acetobacter xylinum o (*Gluconacetobacter xylinum*), es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Acetobacteraceae*, aerobio encargado de realizar la fermentación oxidativa de diversos azúcares y alcoholes, capaz de producir celulosa ya sea en medios solidos o líquidos, formando películas sobre la superficie^{30 31}. Su estructura depende del medio de cultivo³²: En un cultivo estático, se genera una película en la interface aire/líquido del medio mientras que en un medio agitado se generan grumos de celulosa dispersos en el líquido.

4.2 CARACTERÍSTICAS DE LA CELULOSA BACTERIANA

Las microfibrillas que contienen los alomorfos cristalinos de la celulosa bacteriana pueden alcanzar 500 a 15.000 unidades de glucosa de largo, estas microfibrillas, están unidas por fuerzas de Van der Waals y enlace de hidrogeno, controlando la dirección del crecimiento celular. En las plantas la celulosa proporciona la fuerza para el crecimiento en contra de la gravedad, además de la resistencia a las tensiones del medio ambiente³³, esta película de CB, funciona como dispositivo de flotación³⁴ que permite una mayor captación de O₂ necesaria para su crecimiento, además de ser una barrera física que protege a la bacteria de la radiación UV, aparición de sustancias toxicas, variaciones de pH o cambios desfavorables como el descenso en el contenido de agua.

La celulosa bacteriana tiene como características físicas importantes, la alta resistencia a la presión, elasticidad, alto grado de cristalinidad, baja biodegradabilidad, durabilidad, susceptible a hidrólisis, estable en soluciones

³⁰ HUNGUND, B. Production of Bacterial Cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 using Dual and Cheaper Carbon Sources. *J. Microb. Biochem. Technol.* 5, 31–33 2013

³¹ BRETT, C. T. Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *Int. Rev. Cytol.* 199, 161–199 2000

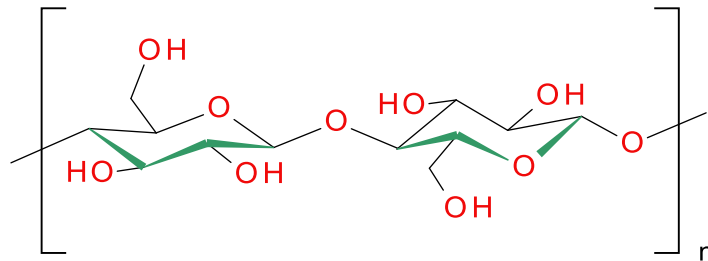
³² SINGH, M. et al. *Op. Cit.*

³³ BOARD, E., LONG, L. T. E. & VOIT, T. B. *Advances in Polymer Science*

³⁴ WU, J. M. & LIU, R. H. Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 284–290 2013

básicas, el diámetro de las microfibrillas determina la capacidad de la CB para absorber agua, debido a su polaridad y grosor variable^{35 36}.

Esquema 1. Estructura química de la celulosa.



La celulosa es el principal componente de la mayoría de las fibras naturales las cuales están conformadas por microfibrillas de celulosa impregnadas en una matriz de lignina amorfa y hemicelulosa semicristalina, responsables de las propiedades mecánicas de estas fibras³⁷, la longitud de la microfibrillas es de aproximadamente 1 mm, mientras que el diámetro está en la nanoescala de 3 a 20 nm dependiendo de la fuente de la nanocelulosa³⁸, ya sean bacterias (*Acetobacter xylinum* y *Agrobacterium tumefaciens*), animal (*Tunicidae*) o plantas³⁹
40.

Figura 1. Membrana de Celulosa Bacteriana con tratamiento de purificación.

³⁵ HUANG, Y. et al. Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose* 21, 1–30 2014

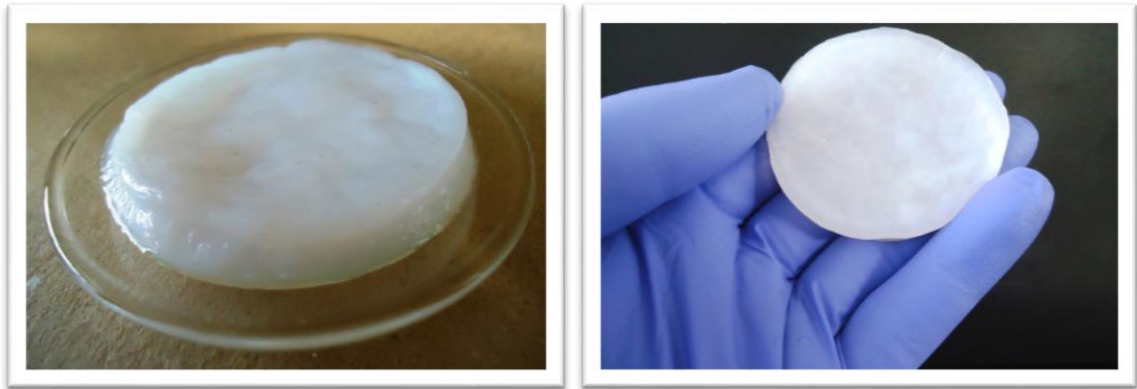
³⁶ LUZ, I., CARREÑO, D., LUZ, I. & CARREÑO, D. Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Fisicoquímicas y de Transporte en Membranas de Celulosa Bacteriana Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Fisicoquímicas y de Transporte en Membr. Universidad Nacional de Colombia, 2011

³⁷ HSIEH, J. T., WANG, M. J., LAI, J. T. & LIU, H. S. A novel static cultivation of bacterial cellulose production by intermittent feeding strategy. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 63, 46–51 2016

³⁸ PACHECO, C., LUIS, J., YEE, M., ZENTELLA, C. & MARVÁN, E. Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinus*: síntesis y aplicaciones. *Red Rev. Cient. Am. Lat. el Caribe, Espana y Port.* 7, 18–25 2004

³⁹ TANSKUL, S., AMORNTHATREE, K. & JATURONLAK, N. A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: Screening and optimization of culture conditions. *Carbohydr. Polym.* 92, 421–428 2013

⁴⁰ LUIS, P. & BARBOSA, A. Op. Cit.



4.3 *Chlorella Vulgaris*

Las microalgas son organismos unicelulares, de forma esférica con un diámetro de 2-10µm, inmóviles pertenecientes al reino protista, también llamado Protoctista. Su reproducción se da mediante la formación de autosporas de forma asexual, llegando a doblar su masa en tan solo 24 horas, gracias a su alta concentración de clorofila son considerados los organismos fotosintéticos más eficientes del planeta.

Dada su capacidad para fijar CO₂, reproducirse en medios extremos ya sea en cultivos de aguas residuales, saladas, dulces, cultivos sólidos y líquidos, además de producir compuestos como ácidos grasos, carotenoides, lípidos y proteínas, se han convertido en objeto de importancia para innumerables aplicaciones a nivel industrial⁴¹.

Las condiciones del cultivo deben ser similares al ambiente natural del alga, la mayoría de las especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 30 °C, temperaturas menores a 16 °C pueden retardar su crecimiento, otros parámetros importantes que regulan el crecimiento de las microalgas son la calidad de los nutrientes, salinidad, luz y pH, estas absorben la energía de la luz solar (Fotones),

⁴¹ GARIBAY-HERNÁNDEZ, A. Biodiesel a partir de microalgas. BioTecnología 13, 38–61 2009

a través de la clorofila en un rango de 400 a 700 nm, con un pH óptimo entre 8.2-8.7, con un periodo de adaptación fisiológico en el cual el crecimiento de la población puede ser muy lento o puede que no ocurra⁴².

⁴² SIRIVIRIYANUN, A. & IMAE, T. Anti-fingerprint properties of non-fluorinated organosiloxane self-assembled monolayer-coated glass surfaces. Chem. Eng. J. 246, 254–259 2014

5. ESTADO DEL ARTE

La silación intermolecular entre grupos hidroxilo de la nanocelulosa bacteriana y el 3-isocianatopropiltrimetoxisilano, pueden generar estructuras Si-O-Si, formando nuevos materiales nanocelulósicos los cuales, con pequeñas modificaciones adquieran propiedades fluorescentes^{43 44}, que permitan un mejor flujo de electrones, formando reactores más adecuados para el cultivo de microalgas.

En la literatura se encuentra una gran variedad de estudios dedicados al mejoramiento de las propiedades de la celulosa bacteriana^{45 46}, como el reforzamiento de la superficie al hacerla reaccionar con derivados de silanos⁴⁷, como el hexadeciltrimetoxisilano, aumentando su hidrofobicidad y densidad.

Existen nanomateriales a base de celulosa⁴⁸, los cuales han sido utilizados para la detección de drogas en el medio ambiente⁴⁹ ya que su biodegradabilidad no genera mayor impacto en las aguas residuales, también los hidrogeles nanocelulósicos con aplicaciones biomédicas⁵⁰, ya que sus zonas activas le permiten reaccionar con ácidos carboxílicos como se muestra en el esquema 2. Con solo con una

⁴³ HAIGLER, C. H. & CHANZY, H. Electron diffraction analysis of the altered cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of fluorescent brightening agents and direct dyes. *J. Ultrastruct. Res. Mol. Struct. Res.* 98, 299–311 1988

⁴⁴ GRATE, J. W. et al. Op. Cit.

⁴⁵ VERA, F. L., ARTURO, H., CORTES, M., MURCIA, C. V. & GALVIS, I. C. Op. Cit.

⁴⁶ VANSANT E. E, R. V. D. V. and K. C. V. & University. Characterization and chemical modification of the silica surface. 1995

⁴⁷ MOON, R. J., MARTINI, A., NAIRN, J., SIMONSEN, J. & YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev* 40, 2011

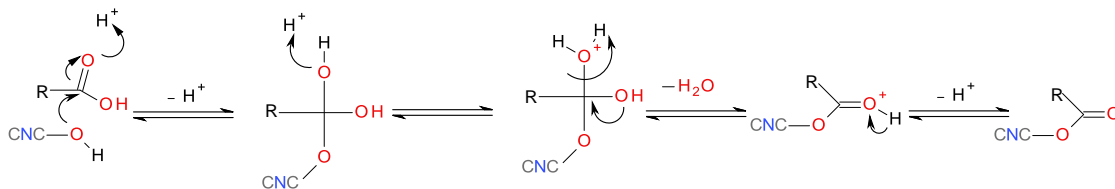
⁴⁸ GOMES, H. I. A. S. & SALES, M. G. F. Development of paper-based color test-strip for drug detection in aquatic environment: Application to oxytetracycline. *Biosens. Bioelectron.* 65, 54–61 2015

⁴⁹ ZANDER, N. E., DONG, H., STEELE, J. & GRANT, J. T. Metal cation cross-linked nanocellulose hydrogels as tissue engineering substrates. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 18502–18510 2014

⁵⁰ SULAEVA, I., HENNIGES, U., ROSENAU, T. & POTTHAST, A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. *Biotechnol. Adv.* 33, 1547–1571 2015

pequeña modificación en su estructura con diferentes sustratos nos muestra la eficacia de este sistema como una potencial fuente de nuevos materiales de interés industrial⁵¹.

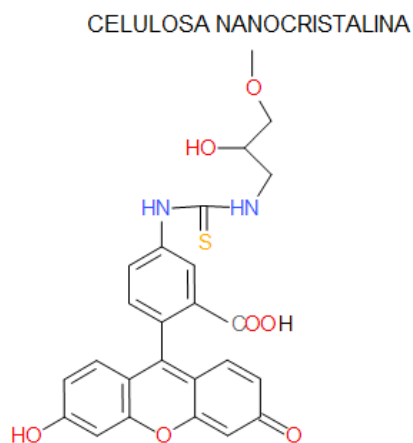
Esquema 2. Mecanismo de la funcionalización de la celulosa nanocrystalina con ácidos carboxílicos.



CNC = Celulosa nanocrystalina

Se ha reportado el marcaje fluorescente de nanocristales de celulosa con el fin de generar bioimágenes en el campo de la medicina (esquema 3).

Esquema 3. Nanocristales de celulosa marcados con Isotiocianato de fluoresceína (FITC)



⁵¹ DONG, S. & ROMAN, M. Fluorescently labeled cellulose nanocrystals for bioimaging applications. J. Am. Chem. Soc. 129, 13810–13811 2007

El comportamiento de sus centros activos los cuales se asocian con su alta hidrofiliidad, son propensos a reacciones químicas con precursores protonados en medios de reacción básicos^{52,48}, los cuales hasta ahora están siendo motivo de investigación generando compuestos fluorescentes como 7-hydrazino-4-methylcoumarin (HMC)-CNC⁵³, también aplicando métodos de tres pasos para etiquetar CNC con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC)⁵⁴, por otro lado se conoce la capacidad del precursor (APTES), para reaccionar de forma favorable en la formación de siloxanos con cualquier superficie que contenga grupos hidroxilos disponibles⁵⁵ ⁵⁶, interactuando en una atmosfera adecuada y generando estructuras estables, siendo este la base de nuevos derivados de silanos como el bis(3-trietoxisililpropil)-tetrasulfuro, el 2,4-dicloro-6-n-octadeciloxi-1,3,5-triazina el γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano y el vinil trietoxisilano⁵⁷, utilizados como precursores en reacciones similares.

5.1 AMINOPROPILTRIETOXISILANO (APTES)

El aminopropiltriethoxisilano, contiene una funcionalidad amino (-NH₂) terminal reactiva, la cual puede reaccionar de diversas formas dependiendo de las modificaciones que se le hagan a este precursor o del mecanismo por el cual se lleve a cabo la reacción⁵⁸ ⁵⁹ ⁶⁰. Teniendo en cuenta la estructura de los

⁵² HUANG, J. L., LI, C. J. & GRAY, D. G. Cellulose nanocrystals incorporating fluorescent methylcoumarin groups. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 1, 1160–1164 2013

⁵³ DONG, S. & ROMAN, M. Op. Cit.

⁵⁴ SIRIVIRIYANUN, A. & IMAE, T. Op. Cit.

⁵⁵ POTHAN, L. A., SIMON, F., SPANGE, S. & THOMAS, S. XPS studies of chemically modified banana fibers. *Biomacromolecules* 7, 892–898 2006

⁵⁶ BLITZ, J. P., MURTHY, R. S. S. & LEYDEN, D. E. Ammonia-catalyzed silylation reactions of Cab-O-Sol with methoxymethylsilanes. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 7141–7145 1987

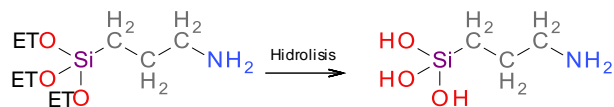
⁵⁷ VASHIST, S. K., LAM, E., HRAPOVIC, S., MALE, K. B. & LUONG, J. H. T. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. *Chem. Rev.* 114, 11083–11130 2014

⁵⁸ LIU, Y., LI, Y., LI, X. M. & HE, T. Kinetics of (3-aminopropyl) triethoxysilane (aptes) silanization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Langmuir* 29, 15275–15282 2013

⁵⁹ XU, W. et al. Amine surface modifications and fluorescent labeling of thermally stabilized mesoporous silicon nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* 116, 22307–22314 2012

precursores seleccionados para la modificación superficial de la celulosa bacteriana los cuales se muestran en el esquema 4 y 5.

Esquema 4. Modificación del APTES.



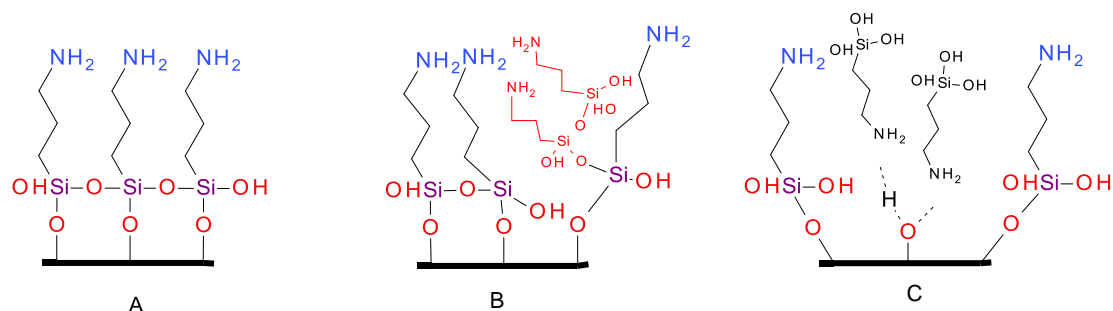
La modificación superficial con silanos, permite reducir la afinidad de la celulosa por el agua, mejorando sus propiedades mecánicas gracias a la transferencia de carga, que ocurre entre estos compuestos, facilitando la formación de enlaces siloxano con la superficie Si-OH en diferentes sustratos⁶¹

El esquema 5, muestra cómo puede reaccionar el grupo amino del APTES si no se modifica o protege, o como puede reaccionar con el mismo APTES cambiando drásticamente su estructura y propiedades. En la parte A, la molécula reacciona con la superficie hidroxílica del sustrato, formando siloxanos con sus APTES vecinos, en la parte B, reacciona con una molécula de APTES cercana en solución, en C, la amina del APTES reacciona con los hidroxilos de la superficie del sustrato.

⁶⁰ NORDGREN, N., LÖNNBERG, H., HULT, A., Malmström, E. & Rutland, M. W. Adhesion dynamics for cellulose nanocomposites. ACS Appl. Mater. Interfaces 1, 2098–2103 2009

⁶¹ GOMES, H. I. A. S. & SALES, M. G. F. Op. Cit.

Esquema 5. Diferentes tipos de interacción entre el APTES modificado y la superficie hidroxílica del sustrato.



El compuesto 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), es un agente de acoplamiento importante además de ser utilizado ampliamente para la remoción de óxidos inorgánicos en sílice, cerámica y nanopartículas magnéticas de óxido de hierro, mediante el mecanismo de funcionalización superficial por medio de la formación de enlaces Fe-O-Si entre las nanopartículas y los ligandos de silano, incluso después de la hidrólisis los grupos silanol, pueden reaccionar con grupos hidroxilos superficiales, los cuales conducen a una silanización superficial formando una estructura policondensada con los ligandos inmovilizados gracias a la condensación en la superficie de reacción⁶².

Los estudios realizados acerca del avance en la química de los silanos muestran estructuras bioactivas derivadas de productos naturales^{63 64}, de manera que el 3-isocianatopropiltimetoxisilano, la nanocelulosa y la formiltrifenilamina tienen las cualidades necesarias para actuar como precursores ideales en la reacción de silación, promoviendo la obtención de una nueva serie de compuestos

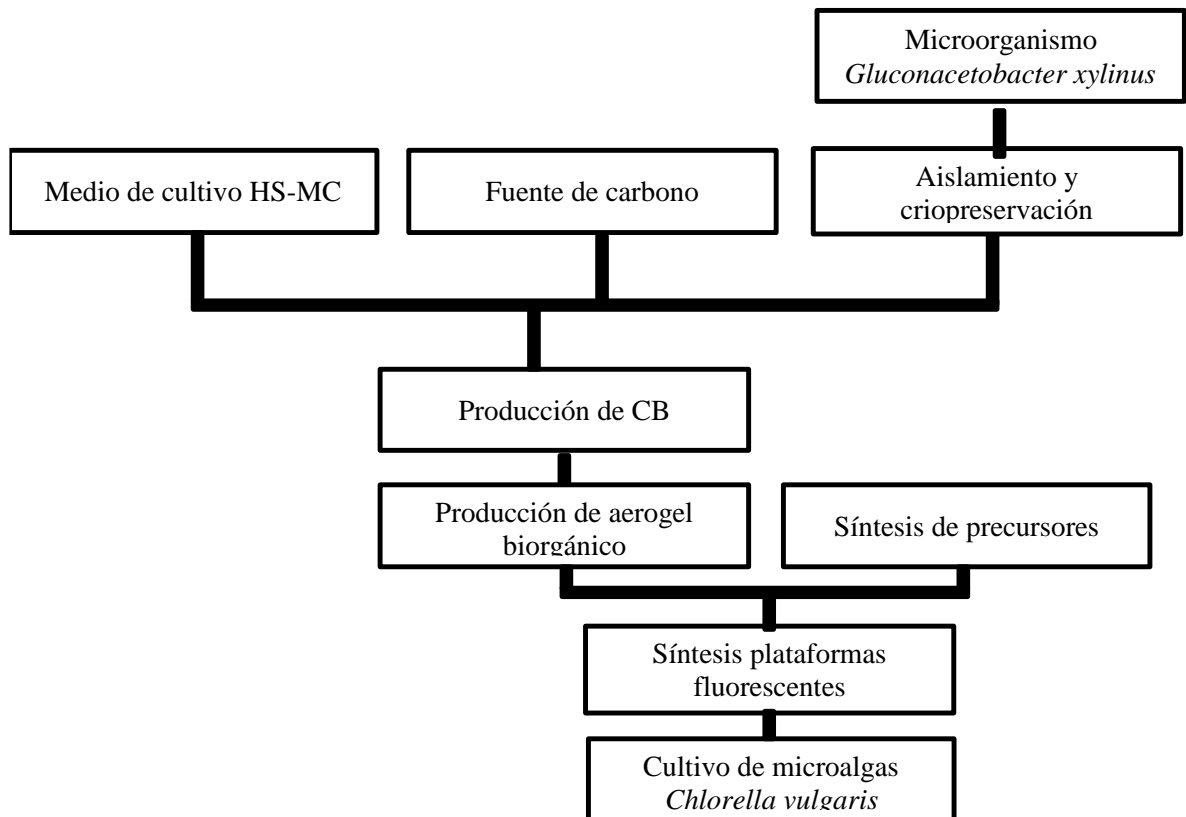
⁶² ANDR, F. & OLAVARR, B. "Nuevos complejos biheteronucleares derivados de anillos fundidos del tipo [Cp*MLM'A. (Pontificia Universidad Católica de Chile)

⁶³ BILGI, E., BAYIR, E., SENDEMIR-URKMEZ, A. & HAMES, E. E. Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. *Int. J. Biol. Macromol.* 90, 2–10 2016

⁶⁴ YAŞAR, F., TOĞRUL, H. & ARSLAN, N. Flow properties of cellulose and carboxymethyl cellulose from orange peel. *J. Food Eng.* 81, 187–199 2007

nanocelulósicos fluorescentes con propiedades estructurales similares a los grupos anteriormente mencionados.

6. METODOLOGÍA



6.1 MICROORGANISMO (CEPA *Gluconacetobacter X*).

La cepa utilizada para el proyecto de investigación, fue la *Gluconacetobacter Xylinus* ATCC 23768, del American Type Culture Collection-ATCC (Manassas,

USA). Incubada por 32 horas a 25 °C, en una solución aséptica de manitol y caldo de cultivo nutritivo con el fin de reactivar la cepa⁶⁵.

6.1 AISLAMIENTO Y CRIOPRESERVACIÓN

Luego de 3 días de activar la cepa, se tomaron 10 muestras del sobrenadante del caldo de cultivo, en tubos de ensayo respectivamente marcados, después de haber sido centrifugada la solución inicial a 3500 rpm durante 20 minutos. Se tomaron 2 ml de cada tubo de ensayo y se adicionaron a 10 tubos eppendorf rotulados con el nombre de (cepa *Gluconacetobacter X.*), los cuales contenían 100 µl DMSO, 900 µl de caldo de cultivo mezclado, llevando esta solución a una temperatura de 5 °C, durante 30 minutos, para luego ser almacenada en recipientes herméticos debidamente sellados a temperaturas bajo 0 °C, con el fin de garantizar la criopreservación de la cepa.

6.2 MEDIO DE CULTIVO HESTRIN AND SCHRAMM (HS)

Para la inoculación de la cepa *Gluconacetobacter Xylinus*, fue utilizando el medio de cultivo tradicional Hestrin and Schramm (HS) modificado, sustituyendo la fuente de carbono por diferentes muestras de levadura ricas en sacáridos, dejando la muestra en incubación a 26 °C durante 7 días, tomando un análisis diario para su respectivo control. Luego de 7 días fueron aisladas las películas de celulosa bacteriana formadas en la superficie de cada recipiente, y llevadas a lavado en un vaso de precipitados de 500 ml con NaClO al 0.5% por 24 horas. Se tomaron 5 muestras de celulosa bacteriana en recipientes separados a las cuales se les realizo varios lavados con agua destilada con el fin de obtener un pH de 7, como

⁶⁵ ZENG, X., SMALL, D. P. & WAN, W. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. *Carbohydr. Polym.* 85, 506–513 2011

se muestra en el anexo 1, garantizando la eliminación de impurezas sobre la película de celulosa bacteriana^{66 67}.

6.3 FUENTE DE CARBONO

El salvado de trigo fue utilizado como fuente de carbono^{68 69 70} con fines biosintéticos, proporcionado por el laboratorio de microbiología molecular, sede Guatigüra de la Universidad Industrial de Santander. Estas muestras fueron depositadas en recipientes de vidrio.

6.4 PRODUCCIÓN DE CB

Las películas de celulosa bacteriana fueron retiradas y lavadas con agua estilada en diferentes recipientes, luego de ser trituradas y zonificadas por 1 hora, con un pulso de 60 Hertz en frío⁷¹.

⁶⁶ LAÇIN, N. T. Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing. *Int. J. Biol. Macromol.* 67, 22–27 2014

⁶⁷ YAN, Z., CHEN, S., WANG, H., WANG, B. & JIANG, J. Biosynthesis of bacterial cellulose/multi-walled carbon nanotubes in agitated culture. *Carbohydr. Polym.* 74, 659–665 2008

⁶⁸ KUROSUMI, A., SASAKI, C., YAMASHITA, Y. & NAKAMURA, Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydr. Polym.* 76, 333–335 2009

⁶⁹ MOHITE, B. V., SALUNKE, B. K. & PATIL, S. V. Enhanced production of bacterial cellulose by using *gluconacetobacter hansenii* NCIM 2529 strain under shaking conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169, 1497–1511 2013

⁷⁰ ZULUAGA, R., PUTAUX, J. L., RESTREPO, A., Mondragon, I. & Gañán, P. Cellulose microfibrils from banana farming residues: Isolation and characterization. *Cellulose* 14, 585–592 2007

⁷¹ LIN, S. *Algal Culturing Techniques*. *Journal of Phycology* 41, 2005

6.5 PRODUCCIÓN DE AEROGEL BIORGÁNICO

La solución que contenía las películas de CB, se liofilizó por 28 horas, en un recipiente plástico debidamente sellado, generando una película de celulosa bacteriana porosa llamada: Aerogel biorgánico (coloide altamente poroso). Figura 2

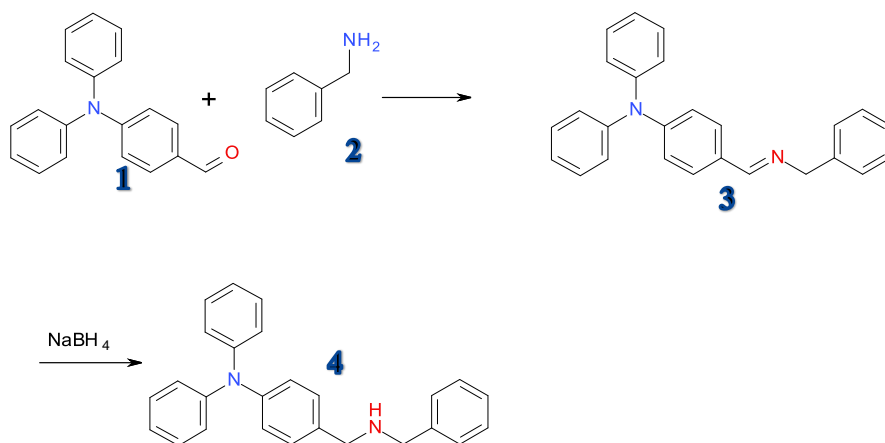
Figura 2. Aerogel biorgánico a base de nanocelulosa bacteriana.



6.6 SÍNTESIS DE PRECURSORES

6.6.1 Modificación del compuesto formiltrifenilamina. Se agregaron 210 μl de bencilamina a un Erlenmeyer de 100 ml el cual contenía 50 ml de metanol, se pesaron 0.5 g de formiltrifenilamina y agregaron al Erlenmeyer junto con la mezcla, luego de 5 minutos se adicionaron 1.5 ml de ácido acético tornándose la mezcla de color amarillo. Manteniendo la temperatura a 40 $^{\circ}\text{C}$ y una agitación constante luego de 4 horas, se adicionaron 0.1 g de borohidruro de sodio para reducir el compuesto **3** hasta alcanzar una mezcla incolora. Se dejó reposar y enfriar el producto por 24 horas, se rotavaporo y liofilizo por otras 24 horas más.

Esquema 6. Formación del compuesto 4-[(bencilamino)metil]-N,N-difenil-anilina.

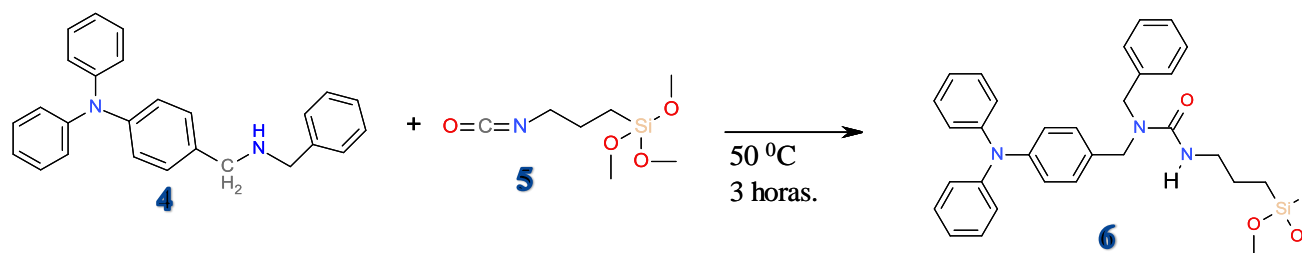


1. 4-(difenilamino)bensaldehido
2. fenilmetanamina
3. 4-[(E)-benciliminometil]-N,N-difenil-anilina
4. 4-[(bencilamino)metil]-N,N-difenil-anilina

6.6.2 Modificación del 3-isocianatopropiltrimetoxisilano. Se tomaron 0.7 g de trifenilformilamina modificada disuelta en un balón de 250 ml el cual contenía 60 ml de tolueno; esta mezcla se dejó en el ultrasonido por 40 minutos, luego se añadieron 400 µl de 3-isocianatopropiltrimetoxisilano, dejando la reacción con un calentamiento de 50 °C y agitación constante durante 3 horas.

Con la formiltrifenilamina modificada disuelta en tolueno, se hizo reaccionar el 3-isocianatopropiltrimetoxisilano, tomando diferentes concentraciones durante lapsos de dos horas con el fin de llevar un progreso de reacción en presencia de calor y agitación constante durante 8 horas más, llevando un control con capa fina.

Esquema 7. Formación del compuesto (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea).



4. 4-[(bencilamino)metil]-N,N-difenil-anilina
5. 3-isocianatopropil(trimetoxi)silano
6. 1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea

6.7 SÍNTESIS DE PLATAFORMAS FLUORESCENTES

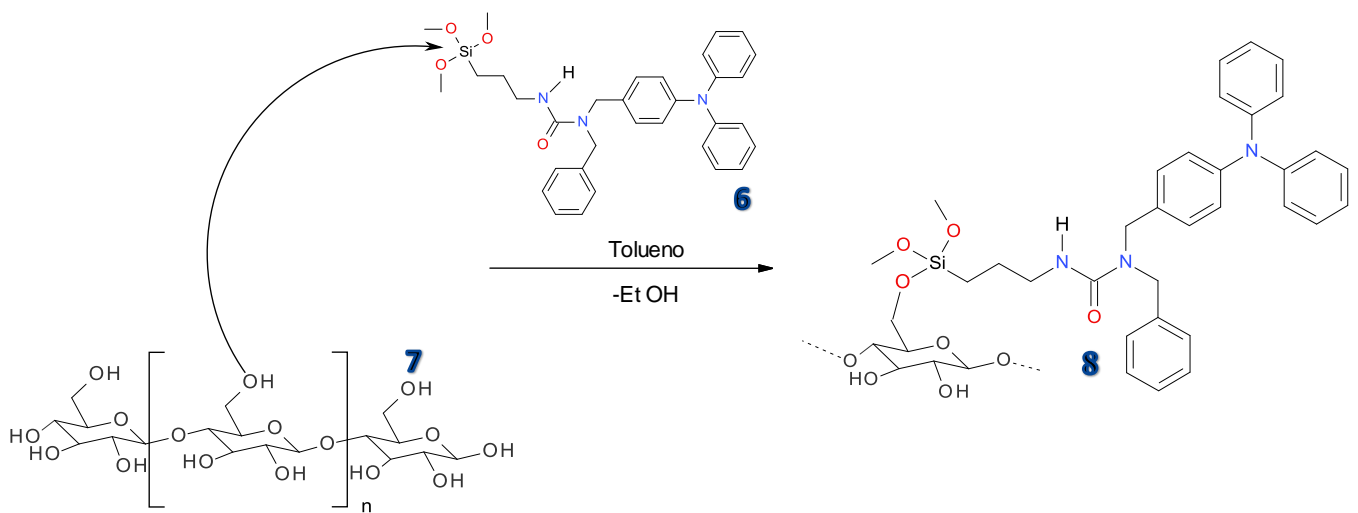
Se agregaron 0.8 g de celulosa bacteriana liofilizada y previamente tratada (hidrogel biorgánico), a un balón aforado de 250 ml, el cual contenía 3-isocianatopropiltrimetoxisilano modificado. Figura 3.

Figura 3. Celulosa Bacteriana fluorescente



La reacción se llevó a cabo entre el precursor modificado 3-isocianatopropiltrimetoxisilano y la celulosa bacteriana siguiendo la reacción representada en el esquema 8.

Esquema 8. Reacción entre la superficie de la celulosa bacteriana y el 1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea (compuesto final).



- 6. 1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea
- 7. unidad de anhidroglucosa (AGU)
- 8. Celulosa modificada

6.8 CULTIVO DE MICROALGAS *Chlorella Vulgaris*

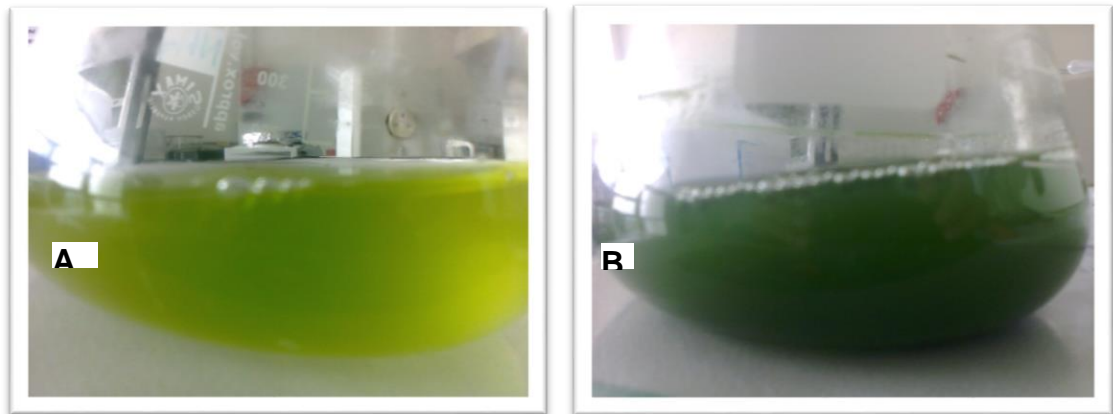
El medio de cultivo es definido como un ambiente artificial en el que las microalgas crecen con un periodo de adaptación, tiempo en el cual el crecimiento es muy

lento o puede que no ocurra. Por tal motivo es necesario generar un preinóculo⁷²
⁷³.

6.8.1 Medio de cultivo. Utilizando la cepa (A.01-*Chlorella Vulgaris*) obtenida en el laboratorio de microbiología molecular sede Guatigura de la Universidad Industrial de Santander, se disolvieron 5g de esta, en un matraz con agua destilada y medio de cultivo con agar, esterilizado previamente a 120 °C, durante 30 minutos en el autoclave.

Se tomaron 6 placas con agar, rotuladas con la fecha y tipo de muestra, las cuales fueron inoculadas con la cepa (A.01), utilizando una campana de flujo laminar, luego de 15 días se tomó una colonia representativa de cada placa con el fin de hacer un análisis bacteriológico.

Figura 4. A (Cultivo microalgas 4 días), B (Cultivo microalgas 20 días).



Se aisló la cepa A.01 en 3 cajas Petri rotuladas con el nombre (*Chlorella Vulgaris* A.01.1-A.01.2-A.01.3), dejándolas durante 15 días a la luz del sol, tomando una muestra diaria para su respectivo análisis. Se escogieron 3 muestras representativas de cada cultivo con el fin de obtener una cepa limpia, la cual fue

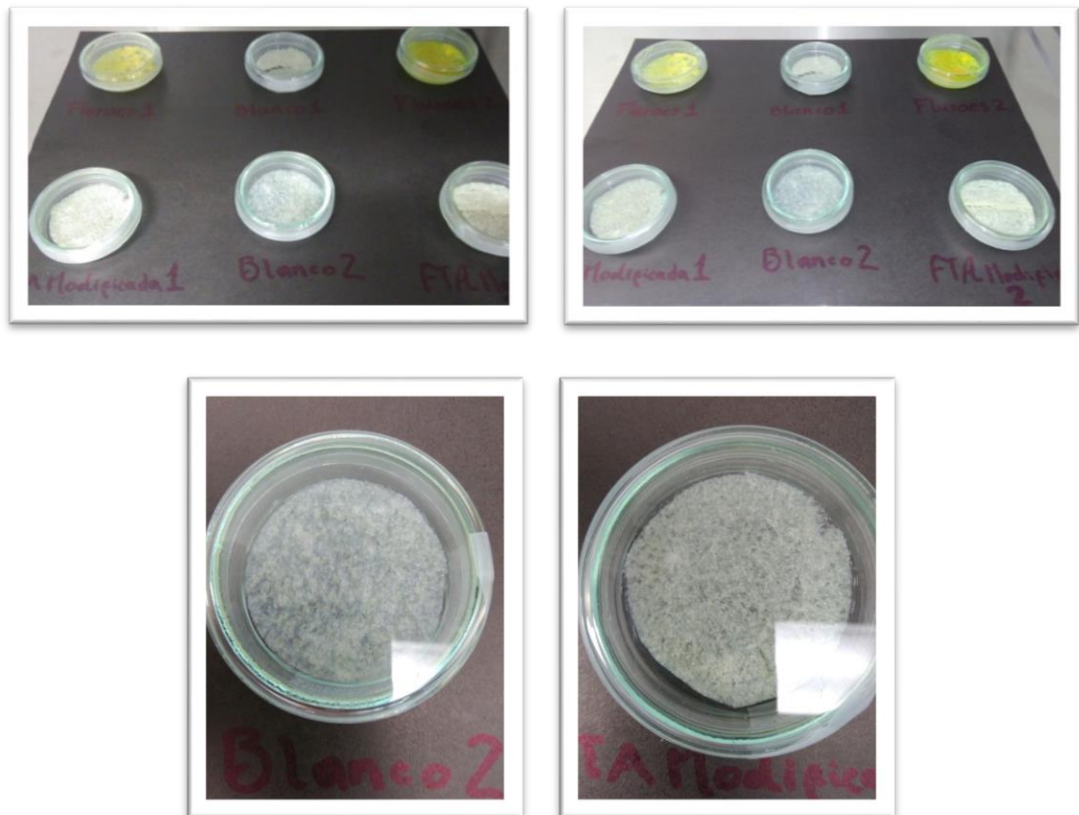
⁷² LUIS, P. & BARBOSA, A.

⁷³ HUANG, C. et al. Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydr. Polym.* 136, 198–202 2016

introducida en el caldo de cultivo, ambiente ideal para el crecimiento del microorganismo.

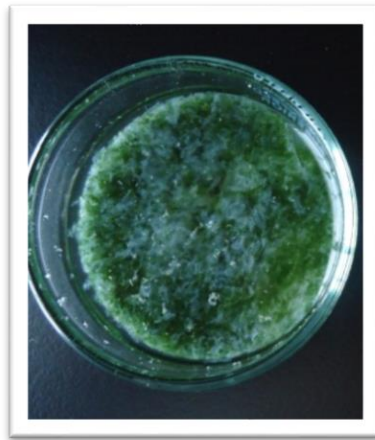
6.8.2 Adición de Celulosa Bacteriana fluorescente (CB-F), al medio de cultivo Basal de Bold (BBM) con el inoculo de la cepa *Chlorella Vulgaris*. Teniendo en cuenta la solubilidad de las muestras en el medio de cultivo, se tomaron 5 concentraciones diferentes de (CB-F) 0, 4.0, 8.0, 12.0 y 16.0 g/ml disueltas en 50 ml de caldo el cultivo nutritivo, junto con el inoculo de la microalga, selladas en cajas Petri, luego de haber sido autoclavadas por 2 horas, eliminando cualquier microorganismo presente en el medio.

Figura 5. Cultivo de Celulosa bacteriana modificada con la muestra final (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea) (fluorescente), impregnada del Inoculo de la microalga *Chlorella Vulgaris*.



Se realizó el mismo procedimiento, trasladando las muestras al fotobioreactor diseñado (ANEXO 10), para albergar el medio de cultivo fluorescente de las microalgas. **Figura 6.**

Figura 6. Cultivo CB-F luego de 30 días de inoculación.



6.9 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.

6.9.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS). Se determinó la estructura cristalina de la celulosa bacteriana, antes y después de ser modificada, utilizando un microscopio electrónico de barrido QUANTA FEG 650 (FEI) con detector LFD (Large Field Detector) en modo vacío, equipado con un analizador de energía dispersiva de rayos X (EDX) recubriendo la superficie de la celulosa bacteriana con una delgada capa de oro.

6.9.2 Espectroscopia infrarroja (FT IR). El análisis espectroscópico de Infrarrojo con Transformada de Fourier y Reflectancia Total Atenuada (ATR), para la celulosa bacteriana (CB) y la celulosa bacteriana fluorescente (CB-F), se realizó con el espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier FT-IR marca

Bruker-Tensor 27 utilizando el aditamento de ATR marca Bruker A225/Q Platinum con cristal de diamante de índice de refracción 2.

6.9.3 Difracción de rayos X (DRX). Para el análisis de DRX, la muestra final de celulosa bacteriana, fue examinada por el difractómetro marca Bruker modelo D8 DISCOVER con geometría DaVinci de haz paralelo, con el fin de determinar el % de cristalinidad (% Cr), de la celulosa bacteriana (CB) y celulosa bacteriana modificada (CB-F).

7. DISCUSIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS

7.1 PREPARACIÓN DE CALDO DE CULTIVO

Teniendo en cuenta los parámetros que regulan el crecimiento de las algas, se proporcionaron las condiciones adecuadas para la cepa *Chlorella vulgaris*, colocando la cepa aislada en un recipiente con capacidad de 500 ml, al cual se agregaron 10 ml de caldo de cultivo nutritivo junto con circuito de aire evitando las sedimentaciones y garantizando una homogenización del medio.

Tabla 3. Reactivos necesarios para preparar el medio de cultivo BBM (Medio Basal de Bold).

Nutrientes	Componentes	Cantidad por litro
Macronutrientes	KH ₂ PO ₄	175 mg
	CaCl ₂	25 mg
	MgSO ₄	75 mg
	NaNO ₃	250 mg
	K ₂ HPO ₄	75 mg
	NaCl	25 mg
Solución de boro H₃BO₃		11.42 mg
Solución de micronutrientes		1 ml
Solución alcalina		1ml
Solución acida		1 ml

Nutrientes	Componente	Cantidad por litro
Micronutrientes	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.82 mg
	MnSO ₄ .H ₂ O	1.20 mg
	(NH ₄) ₂ MoO ₄	8.70 mg
	CuSO ₄ .5H ₂ O	1.57 mg
	CoCl ₂	0.41 mg

Solución ácida	
Componente	g / litro
FeSO ₄	4.98 g
H ₂ SO ₄	1 ml

Solución alcalina	
componente	Solución (g)
NaEDTA	5 g
KOH	3.1 g

7.1.1 Prueba de solubilidad para el medio de cultivo. Se tomaron 250 ml del medio de cultivo BBM (Medio Basal de Bold), en un matraz de 500 ml, al cual se añadieron 50 mg de celulosa bacteriana fluorescente (CB-F), dejándola 30 minutos en el ultrasonido con una frecuencia de 60 Hertz en un recipiente herméticamente cerrado. Luego de un reposo de 1 hora, se procedió a pesar la muestra seca, calculando la cantidad de celulosa fluorescente disuelta en el medio.

7.1.2 Conteo de células del medio de cultivo. El cultivo de la microalga de la especie *Chlorella Vulgaris*, se mantuvo constante durante 6 semanas, tomando una muestra diaria de cada recipiente con el fin de evaluar la densidad celular (células/ml), utilizando la cámara de Neubauer.

Se tomaron 30 µL de cada recipiente con medio de cultivo, analizando su pH y temperatura, luego fueron introducidos en 10 tubos de ensayo debidamente rotulados con el fin de realizar un segundo conteo, del cual se tomaron 15 µL e insertándolos en la cámara Neubauer, con ayuda de un microscopio de marca OLYMPUS, con un lente planc N-100X/1.25. Con el fin de determinar el parámetro poblacional utilizando la siguiente ecuación.

$$K = \frac{\ln(Cf/Ci)}{tf - ti}$$

$$TD = \frac{\ln 2}{K}$$

En donde:

TD = tiempo de duplicación

K = velocidad de crecimiento por día

Cf = concentración final del cultivo

Ci = concentración inicial del cultivo

Tf = tiempo final

Ti = tiempo inicial

7.1.3 Análisis y velocidad de crecimiento. Con el fin de comparar y calcular el crecimiento microalgal de la CB-F, se preparó un medio adicional compuesto por fluoresceína, cuyo estudio previo mostro un crecimiento mayor para el microorganismo en comparación con los cultivos convencionales, efectuando dos mediciones por día del pH y temperatura, manteniendo constante las condiciones del cultivo.

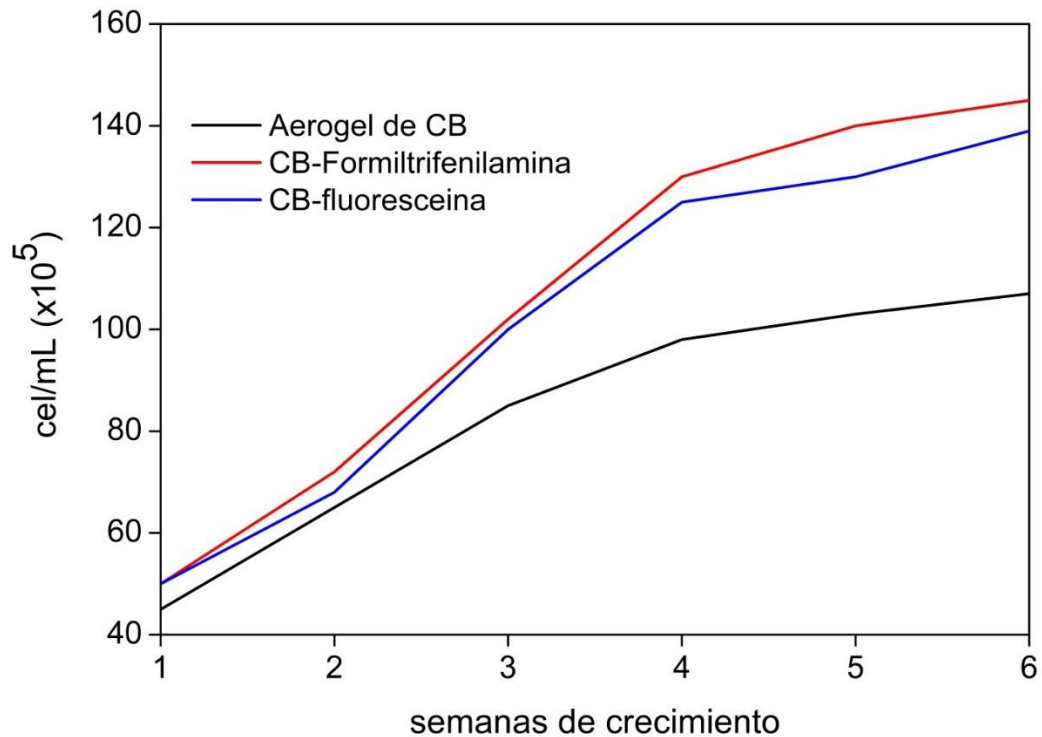
En cuanto al crecimiento de la microalga *Chlorella Vulgaris*, **Tabla N-4**, se evidenció un mayor crecimiento de células en el medio de cultivo Basal Bold's, que contenía CB-F, con un tiempo de duplicación de casi 15 días, y una mayor velocidad de crecimiento con respecto a los demás medios.

Tabla 4. Velocidad de crecimiento. Celulosa Bacteriana (CB), celulosa Bacteriana Fluorescente y Celulosa Bacteriana con fluoresceína (CB-Flu).

Velocidad de crecimiento, medio de cultivo Bold's Basal.(células/día)			
semana	Solución (cel/mL) Aerogel de CB	Solución (cel/mL) CB-F	Solución (cel/mL) CB-Flu
1	45 X10 ⁶	50 X10 ⁶	50 X10 ⁶
2	65 X10 ⁶	72 X10 ⁶	68 X10 ⁶
3	85 X10 ⁶	102 X10 ⁶	100 X10 ⁶
4	98 X10 ⁶	130 X10 ⁶	125 X10 ⁶
5	103 X10 ⁶	142 X10 ⁶	133 X10 ⁶
6	103 X10 ⁶	141 X10 ⁶	133 X10 ⁶
7	100 X10 ⁶	130 X10 ⁶	123 X10 ⁶

Luego de 5 semanas, se presenció en todas las colonias una disminución en el crecimiento iniciándose la fase de declive, **grafica N-1**, presentando un máximo de crecimiento en el día 35 con una concentración de 20 mg/L para cada medio.

Gráfica 1. Velocidad de crecimiento *Chlorella Vulgaris*, (células/día).



Se tomaron las muestras del cultivo inoculado de microalgas luego del análisis, dejándolas en reposo por 7 días sin agitación a la luz del sol, luego de una semana de sedimentación y al observar la total separación de la fase líquida de la sólida, se procedió a separar el sobrenadante por decantación, liofilizando el material sólido con el fin de deshidratarlo y guardarlo en un recipiente; se colocó la biomasa *Chlorella Vulgaris*, en un matraz con tapa introduciéndolo en el autoclave a 120 °C durante 30 minutos, introduciendo la biomasa deshidratada en capsulas estériles, herméticas a una temperatura de 5 °C, garantizando la preservación de las muestras finales.

7.2 CARACTERIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO FESEM-SEM.

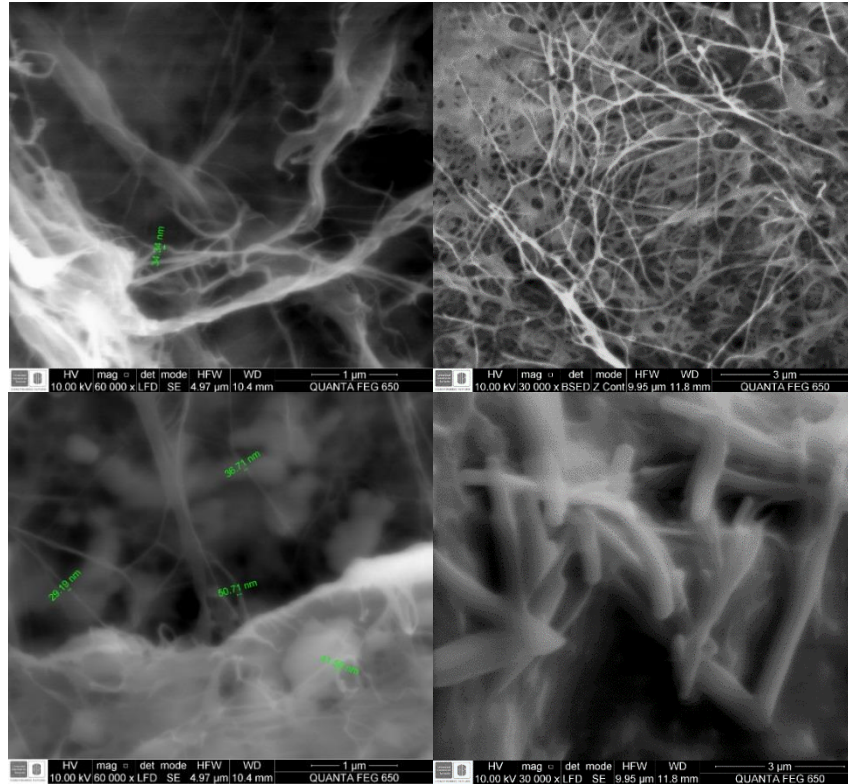
El análisis microscópico de las películas de celulosa bacteriana antes y después de ser modificada muestra una estructura entrecruzada de microfibrillas y nanofibrillas mostradas en la **figura 7**, véase anexo 3. Las microfibrillas que contienen los alomorfos cristalinos de la celulosa bacteriana pueden alcanzar tamaños de 5.34 μm de largo y unidades de 30 nm de ancho ^{74 75 76}, demostrando que no sufrió cambios en la estructura al ser tratada con los precursores sintetizados, conservando sus propiedades iniciales, como diámetro y grosor de las fibrillas.

⁷⁴ ULLAH, H., WAHID, F., SANTOS, H. A. & KHAN, T. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. *Carbohydr. Polym.* 150, 330–352 2016

⁷⁵ TRACHE, D., DONNOT, A., KHIMECHE, K., BENELMIR, R. & BROSSE, N. Physico-chemical properties and thermal stability of microcrystalline cellulose isolated from Alfa fibres. *Carbohydr. Polym.* 104, 223–230 2014

⁷⁶ GUO, J. & CATCHMARK, J. M. SURFACE area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydr. Polym.* 87, 1026–1037 2012

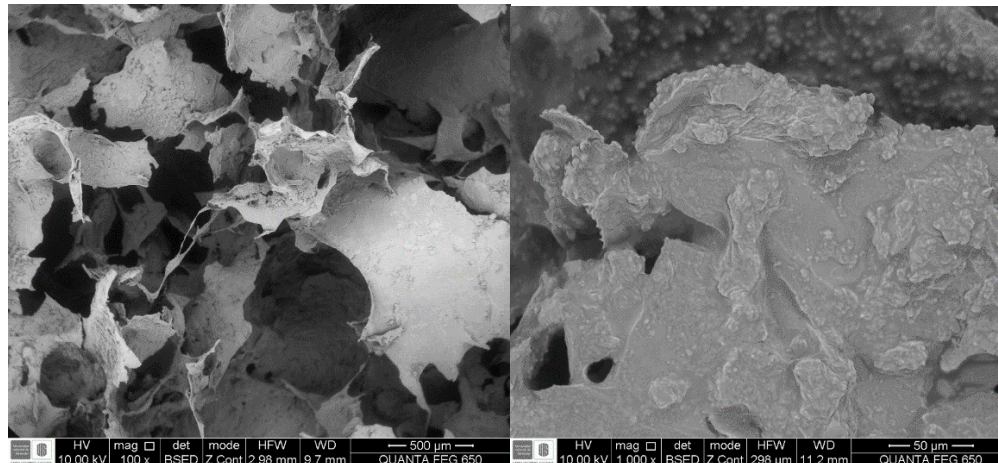
Figura 7. Arriba, fibras de celulosa bacteriana sin tratamiento. Abajo fibras de celulosa bacteriana recubiertas con el compuesto final fluorescente (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea).



La modificación superficial con silanos, permite reducir la afinidad de la celulosa por el agua, disminuyendo su estructura porosa y recubriendo el área superficial. La **figura 8**, muestra la morfología externa de la película de celulosa bacteriana antes y después de ser tratada, en ella se puede observar como las fibras de celulosa son recubiertas por una capa de precursor fluorescente⁷⁷.

⁷⁷ YEH, J. T. et al. Ultradrawing novel ultra-high molecular weight polyethylene fibers filled with bacterial cellulose nanofibers. *Carbohydr. Polym.* 101, 1–10 2014

Figura 8. Imágenes SEM de películas de celulosa bacteriana. Izquierda, celulosa bacteriana sin tratamiento. Derecha celulosa bacteriana fluorescente (con formiltrifenilamina modificada y 3-isocianatopropiltrimetoxisilano).



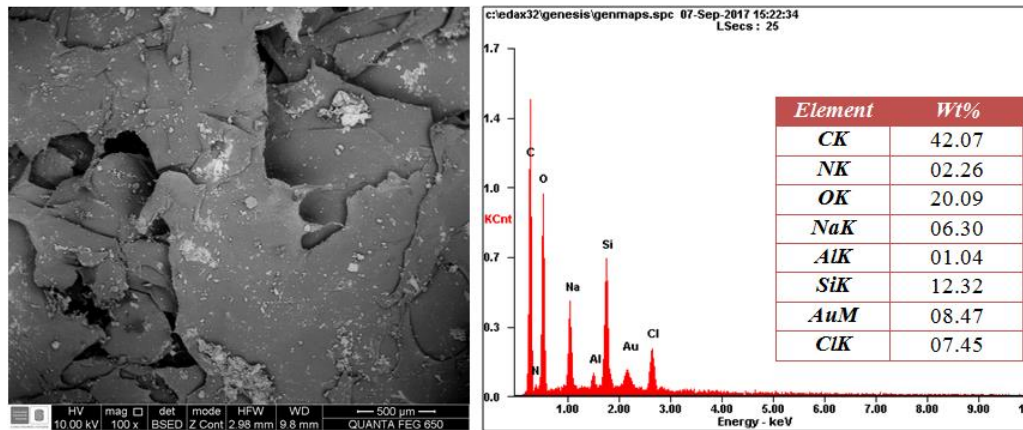
7.3 ANÁLISIS EDS DE LAS PELÍCULAS DE CELULOSA BACTERIANA.

El análisis EDS de las películas de celulosa bacteriana tratadas con 3-isocianatopropiltrimetoxisilano modificado, muestra altas concentraciones de C y O correspondientes a 42.07 y 20.09 de Wt% respectivamente, debido a la estructura hidroxilica de la celulosa^{78 79}. También se puede observar la presencia de sal en la muestra con valores de 06.30 Wt% para Na y 07,45 Wt% para el Cl, debido a que fue tratada con NaClO al 5%. Los valores para Si 12.32 Wt%, muestra la presencia en la superficie hidroxilica de la celulosa, con el 3-isocianatopropiltrimetoxisilano modificado. Las muestras fueron lavadas con agua desionizada y liofilizadas luego del tratamiento para su posterior análisis.

⁷⁸ ERBAS KIZILTAS, E., KIZILTAS, A. & GARDNER, D. J. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. *Carbohydr. Polym.* 124, 131–138 2015

⁷⁹ KESHK, S. M. A. S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydr. Polym.* 99, 98–100 2014

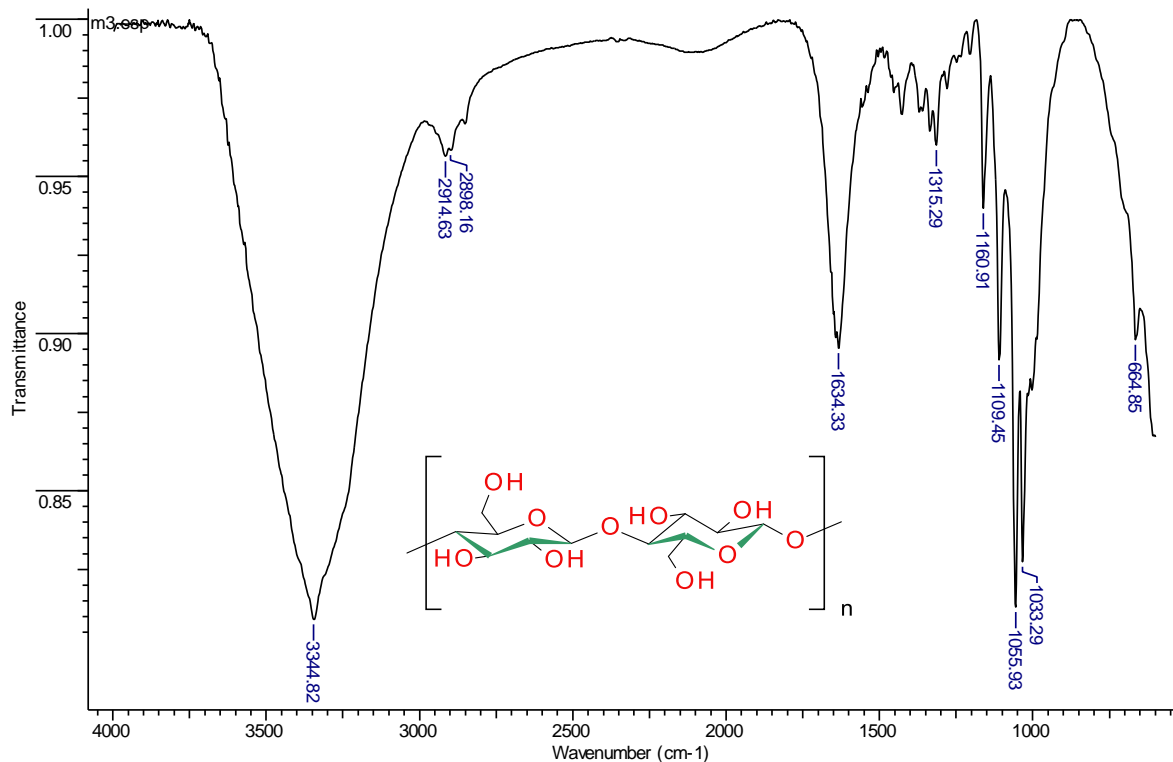
Figura 9. Análisis EDS. Crecimiento amorfo sobre las fibras de celulosa bacteriana.



7.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

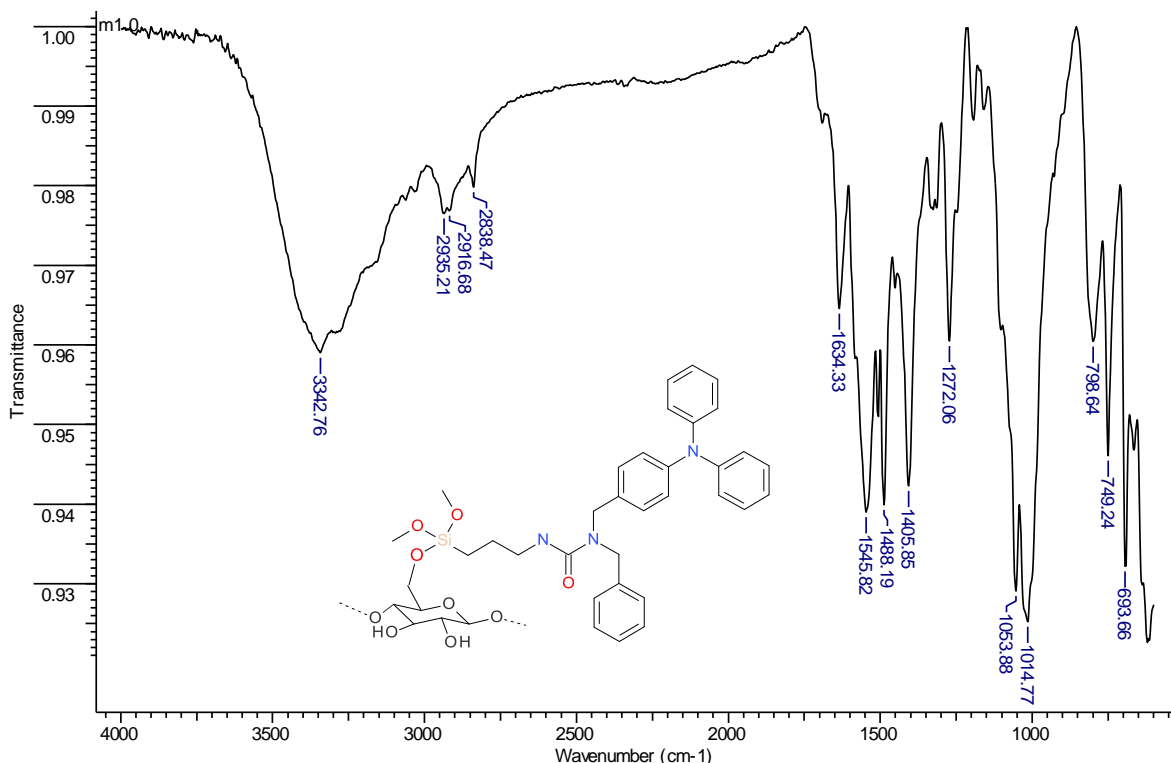
Como se muestra en la **gráfica N-2**, el espectro IR de la muestra m3 (CB-BLANCO), contiene dos bandas alrededor de 2900 cm^{-1} , debidas a la tensión de enlace C-H sp^3 , también se pueden observar bandas de absorción en la región de 3344.82 cm^{-1} , correspondiente a la tensión de los grupos OH presentes en la estructura de la celulosa bacteriana, los cuales corresponden con los reportados en la literatura; además de otras bandas características como 2914.63 cm^{-1} , debida a las tenciones C-H, 1634.33 cm^{-1} , la cual señala la existencia de enlaces C=O, y las bandas en 1315.29 cm^{-1} , 1160.91 cm^{-1} y 1109.45 cm^{-1} , ubicadas en la región de la huella dactilar, confirmando que la celulosa bacteriana obtenida en el medio, no presenta diferencias con las reportadas en la literatura.

Gráfica 2. Espectro FT-IR (ATR) de celulosa bacteriana producidas por *G. Xylinus* ATCC22768.



Para m1 (CB-F), las vibraciones de estiramiento del enlace O-H (señal de banda ancha entre 3650 y 3000 cm⁻¹) y del enlace C-H (2901 cm⁻¹); la flexión del enlace C6-H₂ (1424 y 1315 cm⁻¹); la vibración de los enlaces C-O-C (1160 cm⁻¹) y C-O (1055, 1032 cm⁻¹). Alrededor de los 900 cm⁻¹ se presenta la señal de la vibración del grupo del carbono anomérico, C1-H. La banda que aparece en la región cercana a los 3000 cm⁻¹ es debidas a la tensión de los grupos OH, la cual disminuye en el espectro mostrado en el anexo 1 y 2, de la muestra m1 (CB-F) y la m2 (CB-Fluoresceína) respectivamente, evidenciando la disminución de los grupos OH de la celulosa debido a una interacción entre la CB y los precursores.

Gráfica 3. Espectro FT-IR (ATR) de celulosa bacteriana modificada con la muestra final (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea) (fluorescente).



7.5 CARACTERIZACIÓN MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

La celulosa es un agregado polimérico el cual contiene regiones altamente cristalinas y otras amorfas^{80 81}, El difractograma de rayos X permitió obtener el patrón de difracción característico de la celulosa nativa y determinar el grado de

⁸⁰ DA SILVA FILHO, E. C., SANTANA, S. A. A., MELO, J. C. P., OLIVEIRA, F. J. V. E. & AIROLDI, C. X-ray diffraction and thermogravimetry data of cellulose, chlorodeoxycellulose and aminodeoxycellulose. *J. Therm. Anal. Calorim.* 100, 315–321 2010

⁸¹ YU, X. & ATALLA, R. H. Production of cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the presence of 2,6-dichlorobenzonitrile. *Int. J. Biol. Macromol.* 19, 145–146 1996

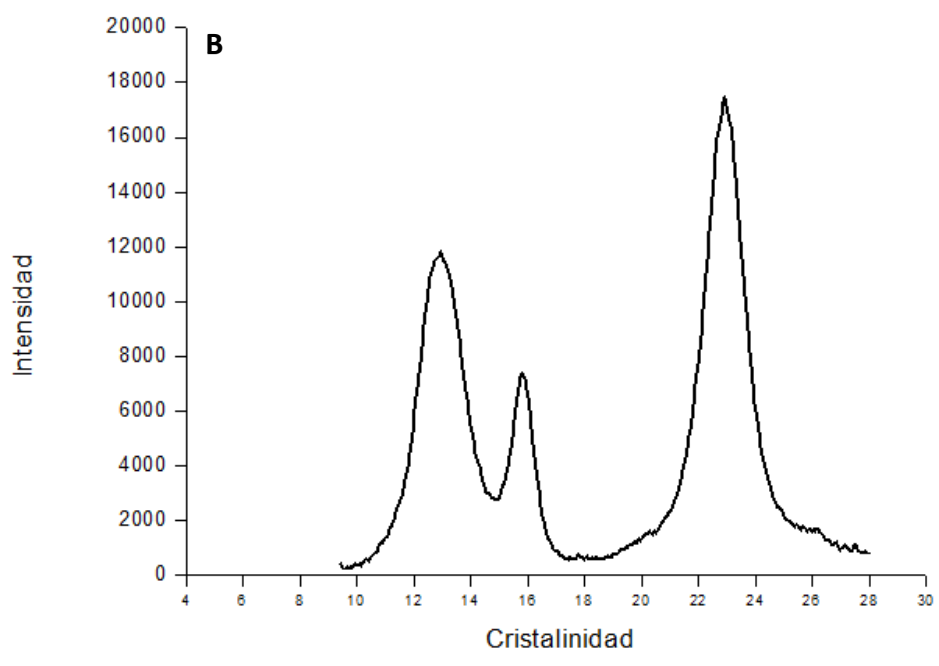
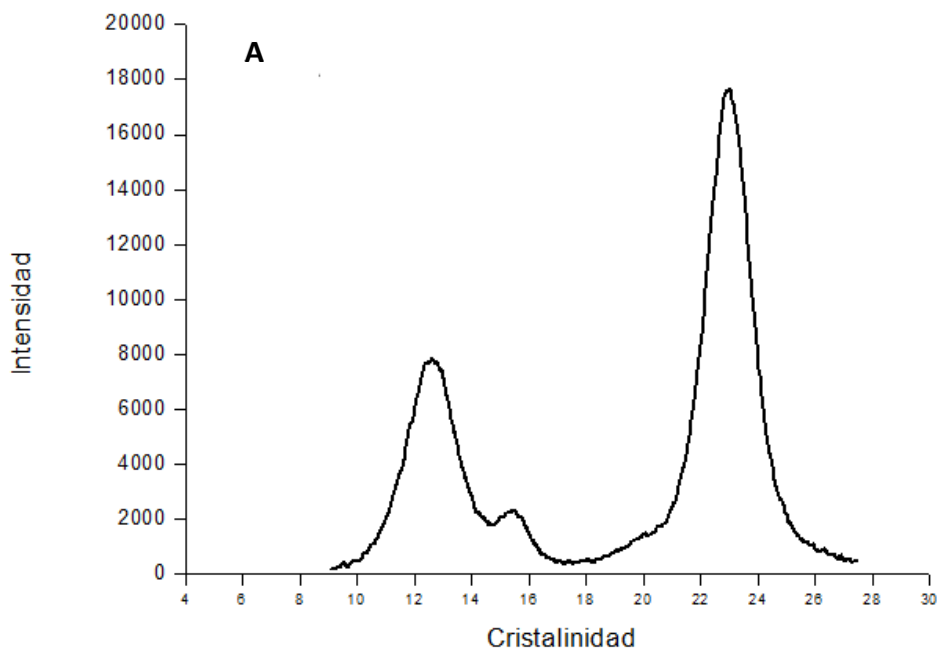
cristalinidad y el tamaño de los materiales celulósicos antes y después de ser modificados.

La estructura cristalina de la celulosa bacteriana se compone de dos Fases: I_α y I_β , denominada celulosa tipo I o celulosa nativa, que se ordenan adoptando configuraciones paralelas en los sistemas cristalinos triclinico (grupo espacial $P1$, $a= 6,7 \text{ \AA}$; $b= 5,9 \text{ \AA}$; $c= 10,4 \text{ \AA}$; $\alpha= 118,1^\circ$; $\beta= 114,8^\circ$; $\gamma= 80,4^\circ$) y monoclinico (grupo espacial $P2_1$, $a= 6,7 \text{ \AA}$; $b= 5,9 \text{ \AA}$; $c= 10,4 \text{ \AA}$; $\gamma= 96,5^\circ$), siendo la menos común la fase I_α , la cual corresponde a una cadena por celda, la cual es dominante en la celulosa producida por algunas especies de bacterias, dejando a la fase I_β , con dos cadenas de celulosa por celda, encontrándose en mayor proporción la fase I_β , en las celulosas de origen vegetal⁸².

Las señales representativas de los planos cristalográficos correspondientes a las fases I_α y I_β , de la nanocelulosa bacteriana y la nanocelulosa modificada no registran cambios significativos en su estructura; en ambos espectros se puede evidenciar las señales correspondientes a los patrones de difracción de la celulosa de origen bacteriano antes y después de ser modificada. **Gráfica N-4**

⁸² LI, Z. et al. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. Carbohydr. Polym. 120, 115–119 2015

Gráfica 4. (a) Difractograma DRX, de la celulosa bacteriana, (b) celulosa bacteriana fluorescente.



La presencia de la primera señal conformada por dos picos alrededor de 12° - 16° y 22° - 28° , corresponden a los planos cristalográficos $(010)I_{\alpha}$, $(1\bar{1}0)I_{\beta}$ y $(100)I_{\alpha}$, $(110)I_{\beta}$, respectivamente⁸³. La señal con mayor intensidad, corresponde a los planos cristalográficos $(110)I_{\alpha}$ y $(200)I_{\beta}$, la mayor intensidad de los grupos modificados, se encuentran en la superficie de la CB fluorescente, tanto para las regiones amorfas como para las cristalinas, ya que la estructura interna de la celulosa no presenta alteraciones al mirar la similitud entre ambos difractogramas.

Los resultados del índice de cristalinidad⁸⁴ (IC), para la celulosa bacteriana sin modificar fue del 95%, mientras que para las fibras modificadas de celulosa bacteriana fluorescente fue del 97%, la reacción de silanización permite la deshidratación de las fibras de celulosa, haciéndola menos flexible, con un menor acceso a las zonas amorfas, aumentando su índice de cristalinidad (CI).

7.6 ANÁLISIS FLUORESCENTE UV-VIS

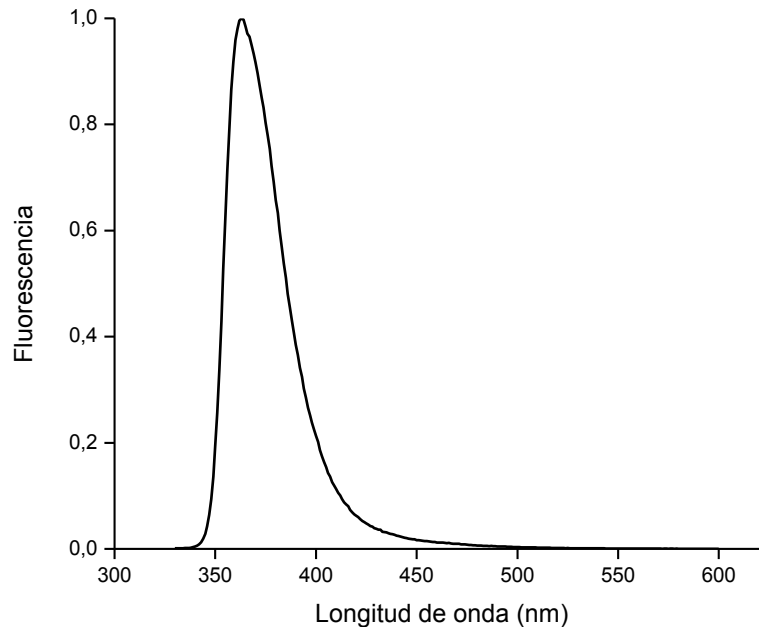
Se adquirió el espectro de fluorescencia del compuesto final (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea), (Gráfica N-5), el cual emite en un rango de 345 a 455 nm con un máximo de emisión en 365 nm, poco ideal para el microorganismo⁸⁵, ya que las microalgas del género *Chlorella vulgaris*, absorben la energía de la luz solar (fotones), a través de la clorofila en un rango de 400 a 700 nm, con un pH óptimo entre 8.2-8.7.

⁸³ MIYAMOTO, H., SCHNUPF, U. & BRADY, J. W. Water structuring over the hydrophobic surface of cellulose. J. Agric. Food Chem. 62, 11017–11023 2014

⁸⁴ DONG, S. & ROMAN, M. op. Cit.

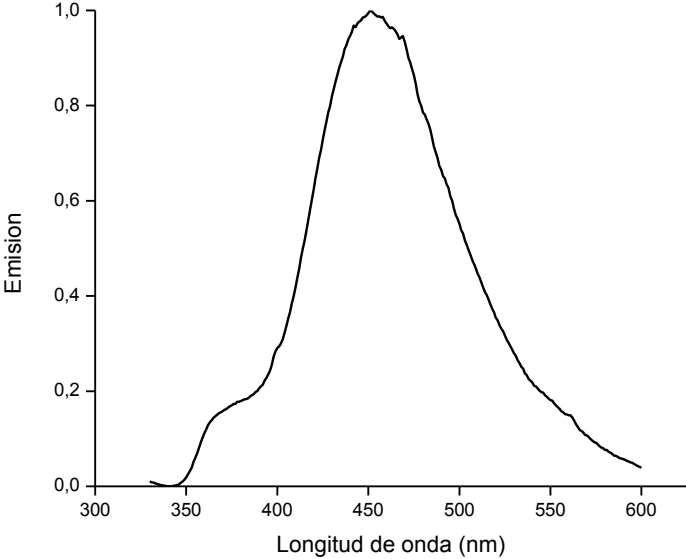
⁸⁵ OKIYAMA, A., SHIRAE, H., KANO, H. & YAMANAKA, S. Bacterial cellulose I. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. Top. Catal. 6, 471–477 1992

Gráfica 5. Espectro de fluorescencia, de (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea) (fluorescente).



Con el fin de general un ambiente artificial en el cual esta especie de microalga pueda subsistir, se sintetizo nanocelulosa fluorescente, haciendo reaccionar el compuesto(1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea), con el Aerogel a base de nanocelulosa bacteriana, sintetizado previamente, el cual es capaz de albergar el microorganismo, y proporcionar la energía necesaria para su fotosíntesis, siendo su máximo de emisión de 470 nm, en un rango que va desde 340 nm hasta 600 nm, como se puede observar la Gráfica N-6.

Gráfica 6. Espectro de fluorescencia de celulosa bacteriana modificada con la muestra final (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea).



8. CONCLUSIONES

Es posible generar materiales fluorescentes a base de nanocelulosa bacteriana, capaces de emitir luz en un rango de 340 a 600 nm, con propiedades físicas que permitan albergar microorganismos fotosintéticos.

Las membranas de CB, no presentan cambios internos en su estructura al ser tratados con compuestos fluorescentes, disminuyendo su afinidad por el agua^{86 87} y presentando una alta cristalinidad antes y después de ser tratada.

Las moléculas derivadas de la formiltrifenilamina, fluoresceína y *N,N*-4-dimetilaminobenzaldehído, presentan propiedades favorables en la absorción y emisión de luz, ideal para el mejoramiento en la producción de masa microalgal.

Se obtuvieron mayores tasas de crecimiento en los medios de cultivo Bold's Basal, con CB-F que para los cultivos CB-Fluoresceína y CB-sin tratar, debido a la cantidad de nutrientes que estos poseen, la capacidad del medio de controlar la luz y la temperatura, debido a su estructura y conformación la cual aprovecha un mayor rango de luz solar, además de ser sencillos y fáciles de construir ya que no requieran mayor costo económico.

⁸⁶ SATYAMURTHY, P., JAIN, P., BALASUBRAMANYA, R. H. & VIGNESHWARAN, N. Preparation and characterization of cellulose nanowhiskers from cotton fibres by controlled microbial hydrolysis. *Carbohydr. Polym.* 83, 122–129 2011

⁸⁷ DONG, S. & ROMAN, M. Op. Cit.

9. RECOMENDACIONES

Realizar modificaciones en la obtención del Aerogel, para mejorar sus propiedades físicas como: textura, maleabilidad, grosor, y tamaño, que puedan albergar una mayor cantidad de muestra, para que sean más fáciles de manipular y de almacenar.

Se recomienda realizar una prueba toxicológica de las sustancias implementadas en esta investigación ya se desconoce el efecto que pueden llegar a causar en el medio ambiente.

Realizar pruebas de identificación de monosacáridos y proteínas con el fin de comprobar la existencia de carbohidratos en *Chorella Vulgaris*, gracias al gran rendimiento del cultivo en comparación con los cultivos convencionales, pueden llegar a servir como suplementos alimenticios ya que son la mayor fuente de energía almacenada de los seres vivos.

BIBLIOGRAFÍA

ABEER, M. M., MOHD AMIN, M. C. I. & MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: Their biochemistry, current approaches and future prospects. *J. Pharm. Pharmacol.* 66, 1047–1061 2014.

ANDR, F. & OLAVARR, B. “Nuevos complejos biheteronucleares derivados de anillos fundidos del tipo [Cp*MLM'A. (Pontificia Universidad Católica de Chile).

AYTEKIN, A. Ā., DEMIRBAĞ, D. D. & BAYRAKDAR, T. The statistical optimization of bacterial cellulose production via semi-continuous operation mode. *J. Ind. Eng. Chem.* 37, 243–250 2016.

BILGI, E., BAYIR, E., SENDEMIR-URKMEZ, A. & HAMES, E. E. Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. *Int. J. Biol. Macromol.* 90, 2–10 2016.

BLITZ, J. P., MURTHY, R. S. S. & LEYDEN, D. E. Ammonia-catalyzed silylation reactions of Cab-O-Sol with methoxymethylsilanes. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 7141–7145 1987.

BOARD, E., LONG, L. T. E. & VOIT, T. B. *Advances in Polymer Science.*

BRETT, C. T. Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *Int. Rev. Cytol.* 199, 161–199 2000.

CARREÑO PINEDA, L. D., CAICEDO MESA, L. A. & MARTÍNEZ RIASCOS, C. A. Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. Ing. y Cienc. - ing.cienc. 8, 307–335 2012.

CASTRO, C. et al. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. Carbohydr. Polym. 84, 96–102 2011.

CHÁVEZ-PACHECO Juan Luis, S. M.-Y. & ESCAMILLA-MARVÁN, M. C.-Z. y E. Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. 18–25 2004.

DA SILVA FILHO, E. C., SANTANA, S. A. A., MELO, J. C. P., OLIVEIRA, F. J. V. E. & AIROLDI, C. X-ray diffraction and thermogravimetry data of cellulose, chlorodeoxycellulose and aminodeoxycellulose. J. Therm. Anal. Calorim. 100, 315–321 2010.

DONG, S. & ROMAN, M. Fluorescently labeled cellulose nanocrystals for bioimaging applications. J. Am. Chem. Soc. 129, 13810–13811 2007.

ERBAS KIZILTAS, E., KIZILTAS, A. & GARDNER, D. J. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. Carbohydr. Polym. 124, 131–138 2015.

ESTRADA, C. A., NOGUERA, Y. C. & LOPEZ, J. E. Desarrollo tecnológico prototipo para la producción de biodiesel a partir de microalgas en sistemas cerrados, como biocombustible de segunda generación. Eighth LACCEI Lat. Am. ... 2010 1–10

GARIBAY-HERNÁNDEZ, A. Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología* 13, 38–61 2009.

GOMES, H. I. A. S. & SALES, M. G. F. Development of paper-based color test-strip for drug detection in aquatic environment: Application to oxytetracycline. *Biosens. Bioelectron.* 65, 54–61 2015.

GRATE, J. W. et al. Alexa Fluor-Labeled Fluorescent Cellulose Nanocrystals for Bioimaging Solid Cellulose in Spatially Structured Microenvironments. *Bioconjug. Chem.* 26, 593–601 2015.

GRIFFITHS, M. J. & HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21, 493–507 2009.

GUO, J. & CATCHMARK, J. M. SURFACE area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydr. Polym.* 87, 1026–1037 2012.

GUTIÉRREZ-HERNÁNDEZ, J. M. et al. In vitro evaluation of osteoblastic cells on bacterial cellulose modified with multi-walled carbon nanotubes as scaffold for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* 75, 445–453 2017.

HAIGLER, C. H. & CHANZY, H. Electron diffraction analysis of the altered cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of fluorescent brightening agents and direct dyes. *J. Ultrastruct. Res. Mol. Struct. Res.* 98, 299–311 1988.

HSIEH, J. T., WANG, M. J., LAI, J. T. & LIU, H. S. A novel static cultivation of bacterial cellulose production by intermittent feeding strategy. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 63, 46–51 2016.

HUANG, C. et al. Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydr. Polym.* 136, 198–202 2016.

HUANG, J. L., LI, C. J. & GRAY, D. G. Cellulose nanocrystals incorporating fluorescent methylcoumarin groups. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 1, 1160–1164 2013.

HUANG, Y. et al. Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose* 21, 1–30 2014.

HUNGUND, B. Production of Bacterial Cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 using Dual and Cheaper Carbon Sources. *J. Microb. Biochem. Technol.* 5, 31–33 2013.

HUNGUND, B. S. & GUPTA, S. G. Strain improvement of *Gluconacetobacter xylinus* NCIM 2526 for bacterial cellulose production. *African J. Biotechnol.* 9, 5170–5172 2010.

JOHNSON, M. B. & WEN, Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 2010 525–534.

KESHK, S. M. A. S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydr. Polym.* 99, 98–100 2014.

KIM, S. S. et al. *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2, bacterial cellulose producing bacterium isolated from citrus fruit juice. *Saudi J. Biol. Sci.* 24, 314–319 2017.

KOJIMA, I. & Li, B. Structural characterization of thin films by X-ray reflectivity. *Rigaku J.* 16, 31–42 1999.

KUROSUMI, A., SASAKI, C., YAMASHITA, Y. & NAKAMURA, Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydr. Polym.* 76, 333–335 2009.

LAÇIN, N. T. Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing. *Int. J. Biol. Macromol.* 67, 22–27 2014.

LAZARINI, S. C. et al. Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone. *Cellulose* 23, 737–748 2016.

LEE, K. Y., BULDUM, G., MANTALARIS, A. & BISMARCK, A. More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromol. Biosci.* 14, 10–32 2014.

LI, G. et al. Biosensor based on bacterial cellulose-Au nanoparticles electrode modified with laccase for hydroquinone detection. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 509, 408–414 2016.

LI, Z. et al. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. *Carbohydr. Polym.* 120, 115–119 2015.

LIN, D., LOPEZ-SANCHEZ, P., LI, R. & LI, Z. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresour. Technol.* 151, 113–119 2014.

LIN, S. Algal Culturing Techniques. *Journal of Phycology* 41, 2005.

LIU, J. et al. Production potential of *Chlorella zofingienesis* as a feedstock for biodiesel. *Bioresour. Technol.* 101, 8658–8663 2010.

LIU, Y., LI, Y., LI, X. M. & HE, T. Kinetics of (3-aminopropyl)triethoxysilane (apt) silanization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Langmuir* 29, 15275–15282 2013.

LUIS, P. & BARBOSA, A. Iteckne innovación e investigación en ingeniería. *iteckne* Vol 8 No 1,

LUZ, I., CARREÑO, D., LUZ, I. & CARREÑO, D. Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Fisicoquímicas y de Transporte en Membranas de Celulosa Bacteriana Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Fisicoquímicas y de Transporte en Membra. Universidad Nacional de Colombia, 2011.

MIYAMOTO, H., SCHNUPF, U. & BRADY, J. W. Water structuring over the hydrophobic surface of cellulose. *J. Agric. Food Chem.* 62, 11017–11023 2014.

MOHITE, B. V., SALUNKE, B. K. & PATIL, S. V. Enhanced production of bacterial cellulose by using *gluconacetobacter hansenii* NCIM 2529 strain under shaking conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169, 1497–1511 2013.

MOON, R. J., MARTINI, A., NAIRN, J., SIMONSEN, J. & YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev* 40, 2011.

NORDGREN, N., LÖNNBERG, H., HULT, A., Malmström, E. & Rutland, M. W. Adhesion dynamics for cellulose nanocomposites. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1, 2098–2103 2009.

OKIYAMA, A., SHIRAE, H., KANO, H. & YAMANAKA, S. Bacterial cellulose I. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter acetii*. *Top. Catal.* 6, 471–477 1992.

ORTIZ, M., MARCELA, M. & HERNÁNDEZ, M. Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* 7, 26–34 2004.

PACHECO, C.-, LUIS, J., YEE, M., ZENTELLA, C. & MARVÁN, E. Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinus*: síntesis y aplicaciones. *Red Rev. Cient. Am. Lat. el Caribe, Espana y Port.* 7, 18–25 2004.

POTHAN, L. A., SIMON, F., SPANGE, S. & THOMAS, S. XPS studies of chemically modified banana fibers. *Biomacromolecules* 7, 892–898 2006.

RAJWADE, J. M., PAKNIKAR, K. M. & KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2491–2511 2015.

RANI, M. U. & APPAIAH, K. A. A. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk. *J. Food Sci. Technol.* 50, 755–762 2013.

ROJAS John, LÓPEZ Alvin, GAMBOA Yudy, GONZÁLEZ Christian, F. M. Assessment of Processing and Polymorphic Form Effect on the Powder and Tableting Properties of Microcrystalline Celluloses I and II. *Chem. Pharm. Bull.* 59, 603–607 2011.

SATYAMURTHY, P., JAIN, P., BALASUBRAMANYA, R. H. & VIGNESHWARAN, N. Preparation and characterization of cellulose nanowhiskers from cotton fibres by controlled microbial hydrolysis. *Carbohydr. Polym.* 83, 122–129 2011.

SAYAGO, D. Producción De Biocombustibles a Partir De Microalgas. *Ra Ximhai - Rev. Soc. Cult. Desarro.* 4, 543–558 2008.

SINGH, M. et al. Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter acetii* MTCC 2623. *Carbohydr. Polym.* 94, 12–16 2013.

SIRIVIRIYANUN, A. & IMAE, T. Anti-fingerprint properties of non-fluorinated organosiloxane self-assembled monolayer-coated glass surfaces. *Chem. Eng. J.* 246, 254–259 2014.

SULAEVA, I., HENNIGES, U., ROSENAU, T. & POTTHAST, A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. *Biotechnol. Adv.* 33, 1547–1571 2015.

TANSKUL, S., AMORNTHATREE, K. & JATURONLAK, N. A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: Screening and optimization of culture conditions. *Carbohydr. Polym.* 92, 421–428 2013.

TRACHE, D., DONNOT, A., KHIMECHE, K., BENELMIR, R. & BROSSE, N. Physico-chemical properties and thermal stability of microcrystalline cellulose isolated from Alfa fibres. *Carbohydr. Polym.* 104, 223–230 2014.

UL-ISLAM, M., KHAN, T., KHATTAK, W. A. & PARK, J. K. Bacterial cellulose-MMTs nanoreinforced composite films: Novel wound dressing material with antibacterial properties. *Cellulose* 20, 589–596 2013.

ULLAH, H., WAHID, F., SANTOS, H. A. & KHAN, T. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. *Carbohydr. Polym.* 150, 330–352 2016.

VANSANT E. E, R. V. D. V. and K. C. V. & University. Characterization and chemical modification of the silica surface. 1995.

VASHIST, S. K., LAM, E., HRAPOVIC, S., MALE, K. B. & LUONG, J. H. T. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. *Chem. Rev.* 114, 11083–11130 2014.

VERA, F. L., ARTURO, H., CORTES, M., MURCIA, C. V. & GALVIS, I. C. Modificación superficial de micro fibras de celulosa obtenidas a partir de bagazo de caña de azúcar usando silanización. 2014.

WU, J. M. & LIU, R. H. Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 284–290 2013.

XIE, K., YU, Y. & SHI, Y. Synthesis and characterization of cellulose/silica hybrid materials with chemical crosslinking. *Carbohydr. Polym.* 78, 799–805 2009.

XU, W. et al. Amine surface modifications and fluorescent labeling of thermally stabilized mesoporous silicon nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* 116, 22307–22314 2012.

YAMANAKA, S. et al. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *J. Mater. Sci.* 24, 3141–3145 1989.

YAN, Z., CHEN, S., WANG, H., WANG, B. & JIANG, J. Biosynthesis of bacterial cellulose/multi-walled carbon nanotubes in agitated culture. *Carbohydr. Polym.* 74, 659–665 2008.

YAŞAR, F., TOĞRUL, H. & ARSLAN, N. Flow properties of cellulose and carboxymethyl cellulose from orange peel. *J. Food Eng.* 81, 187–199 2007.

YEH, J. T. et al. Ultradrawing novel ultra-high molecular weight polyethylene fibers filled with bacterial cellulose nanofibers. *Carbohydr. Polym.* 101, 1–10 2014.

YU, X. & ATALLA, R. H. Production of cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the presence of 2,6-dichlorobenzonitrile. *Int. J. Biol. Macromol.* 19, 145–146 1996.

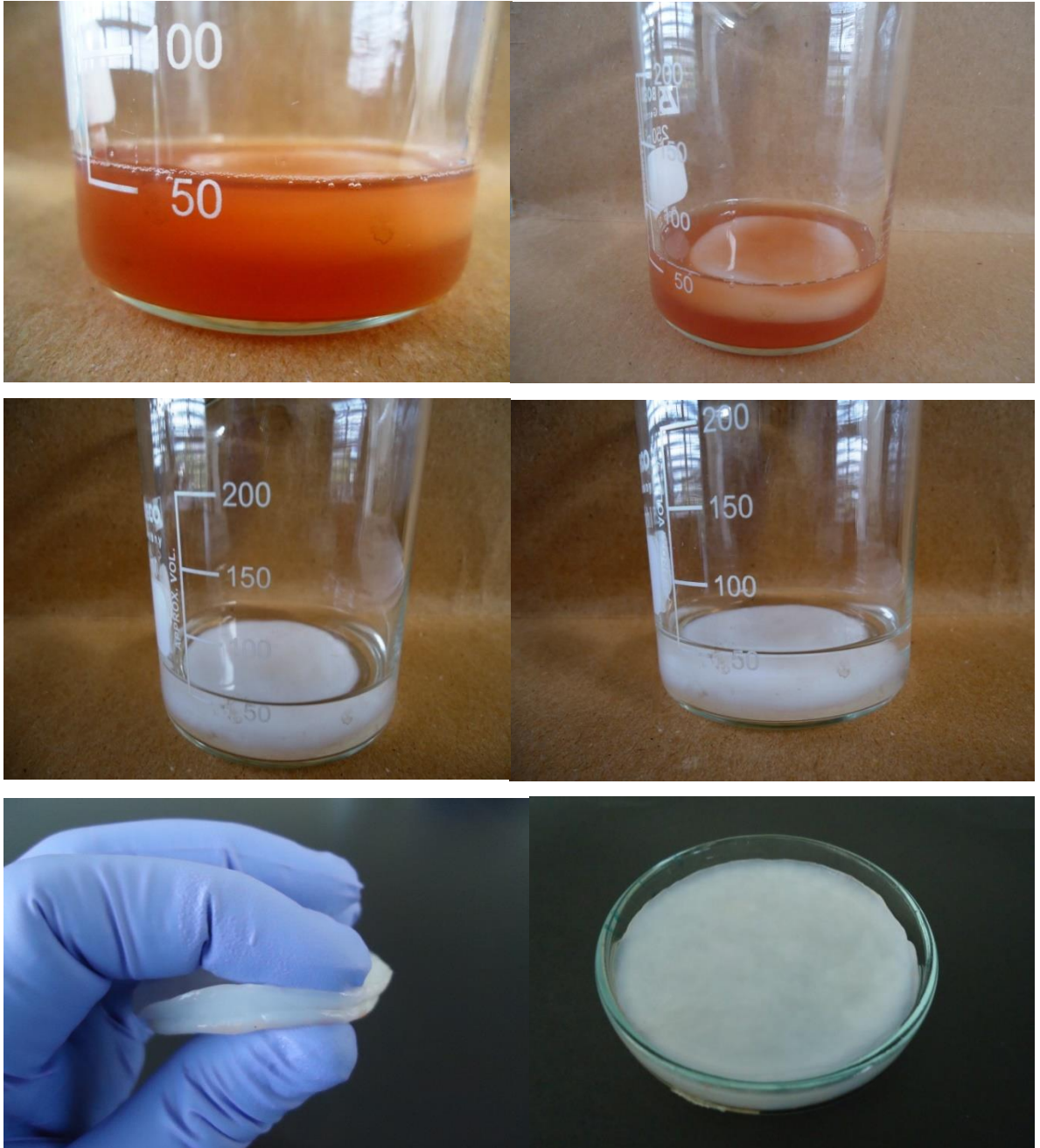
ZANDER, N. E., DONG, H., STEELE, J. & GRANT, J. T. Metal cation cross-linked nanocellulose hydrogels as tissue engineering substrates. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 18502–18510 2014.

ZENG, X., SMALL, D. P. & WAN, W. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. *Carbohydr. Polym.* 85, 506–513 2011.

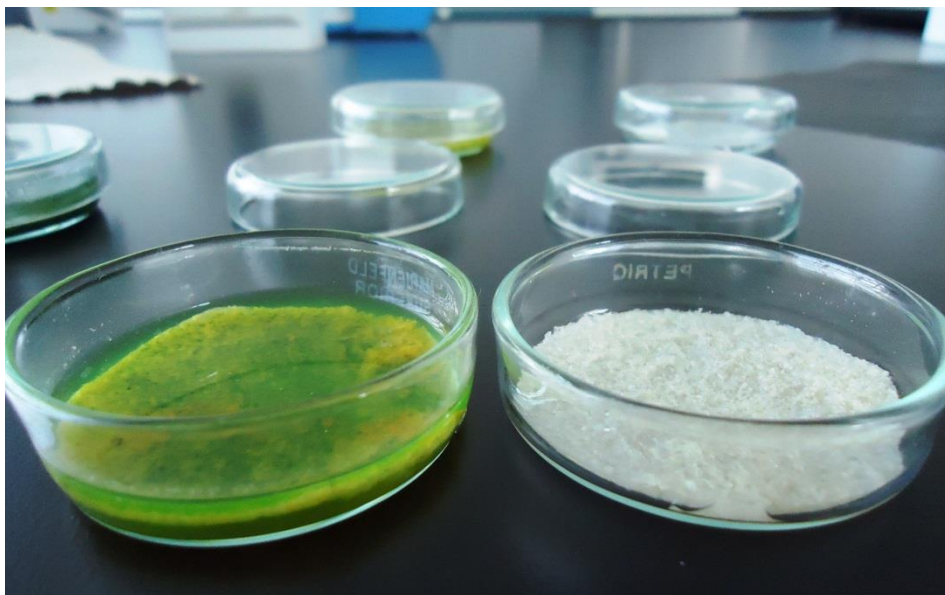
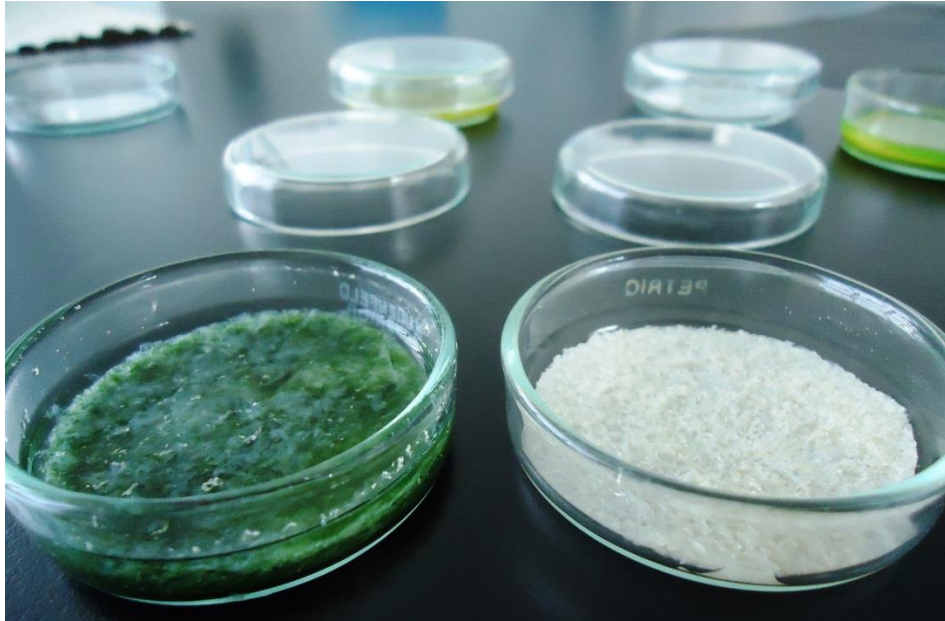
ZULUAGA, R., PUTAUX, J. L., RESTREPO, A., Mondragon, I. & Gañán, P. Cellulose microfibrils from banana farming residues: Isolation and characterization. *Cellulose* 14, 585–592 2007.

ANEXOS

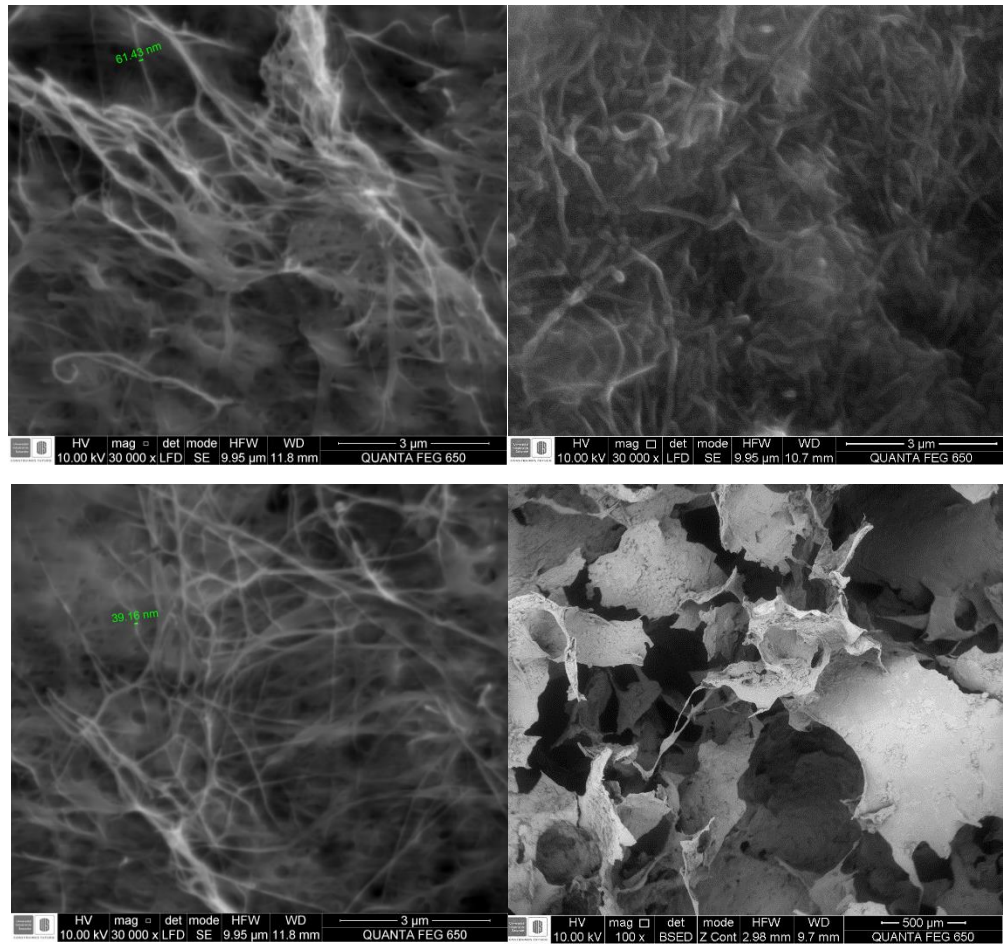
Anexo A. Membranas de celulosa bacteriana antes y después de ser purificadas.



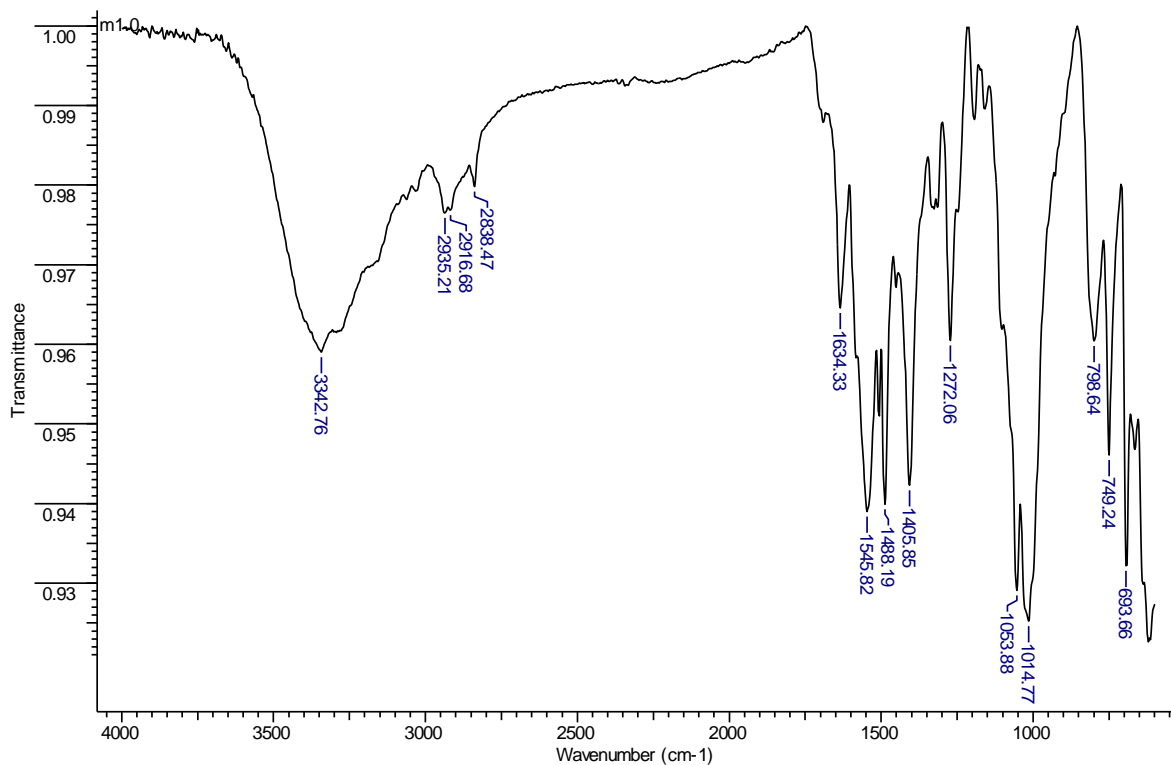
Anexo B. Cultivo de Celulosa bacteriana modificada con la muestra final CB-F y CB-fluorescente), luego de 60 días de haber sido Inoculada con la microalga *Chlorella Vulgaris*.



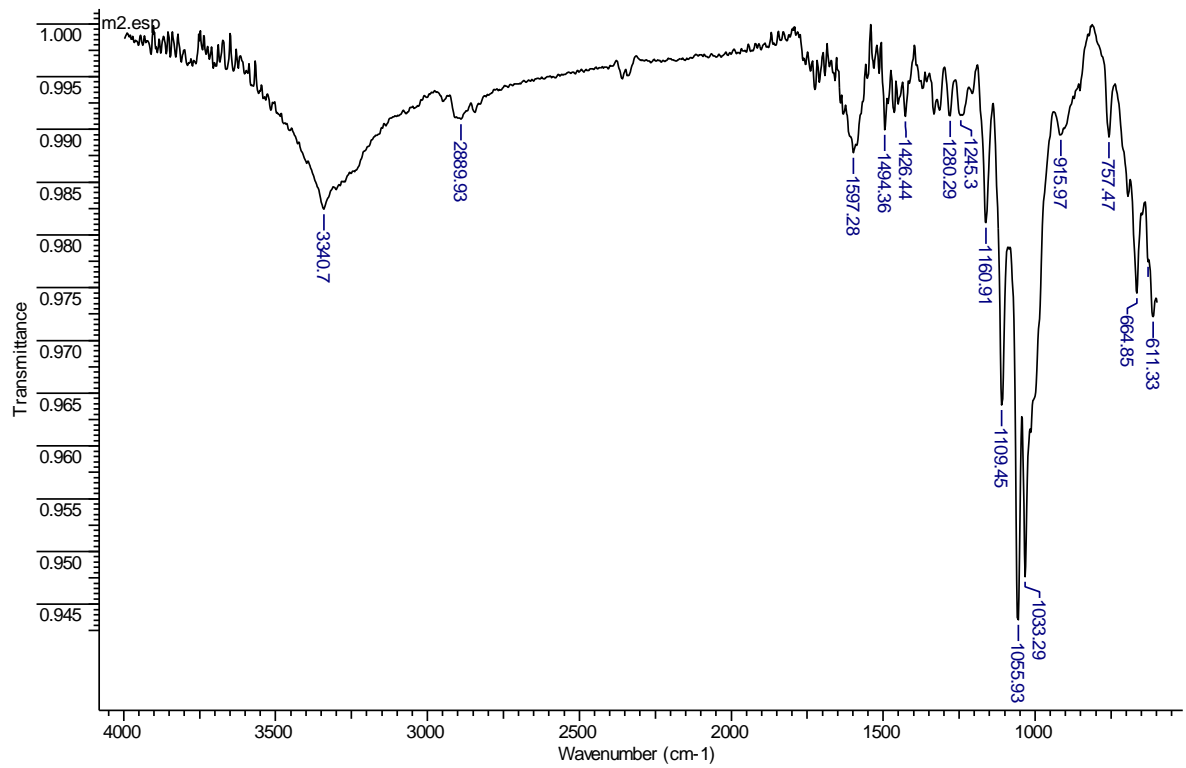
**Anexo C. Imágenes SEM de películas de celulosa bacteriana producidas por
G. Xylinus ATCC22768.**



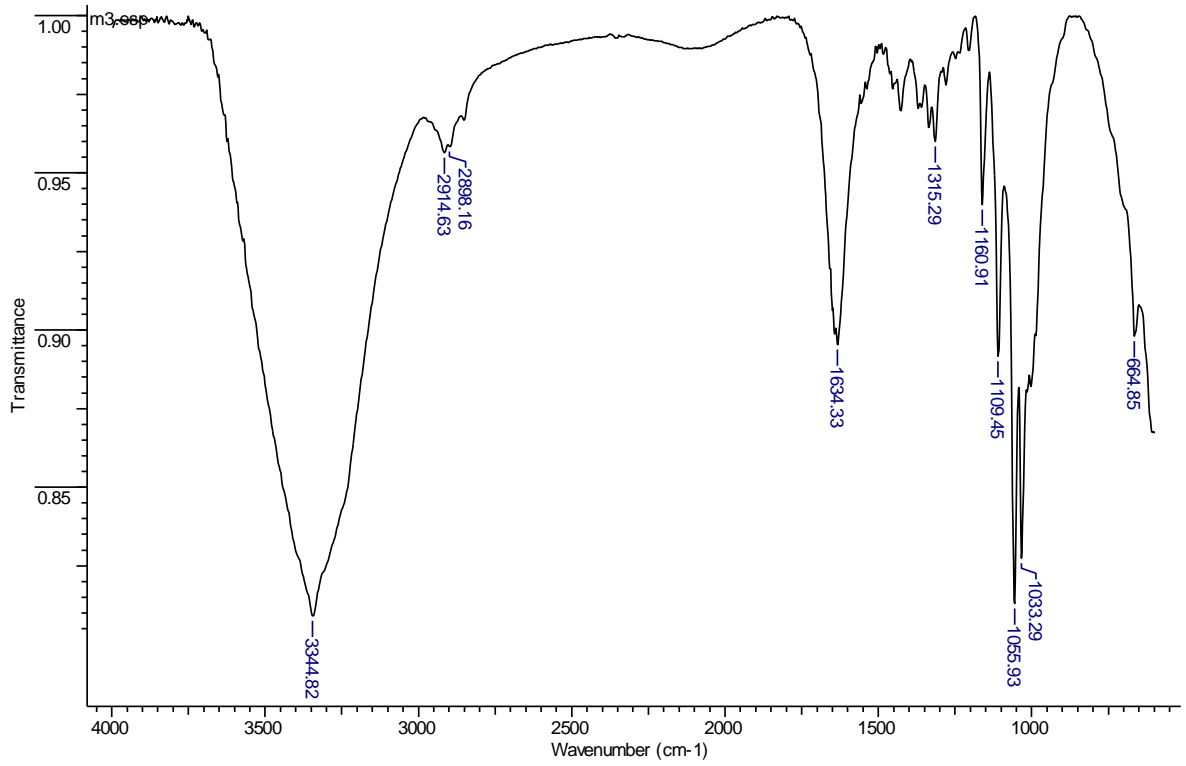
Anexo D. Espectro FT-IR (ATR) de celulosa bacteriana modificada con la muestra final (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea) (fluorescente).



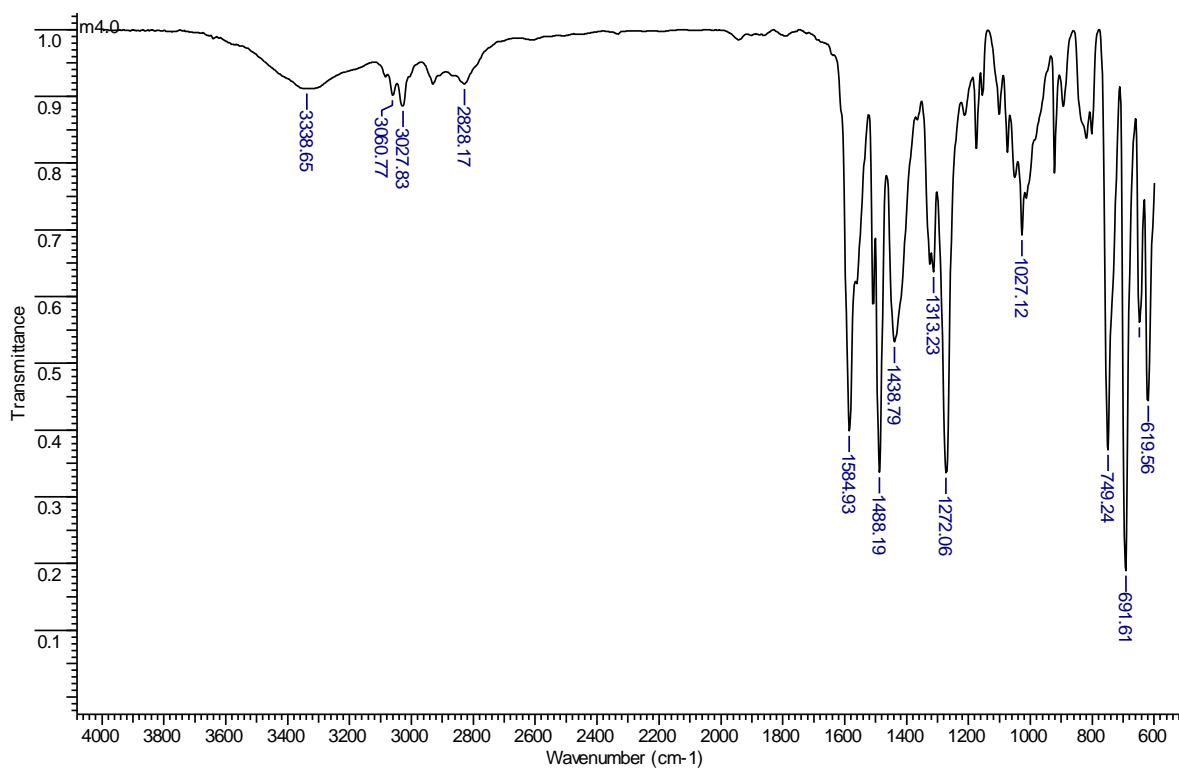
Anexo E. Espectro FT-IR (ATR) de celulosa bacteriana modificada con fluoresceína.



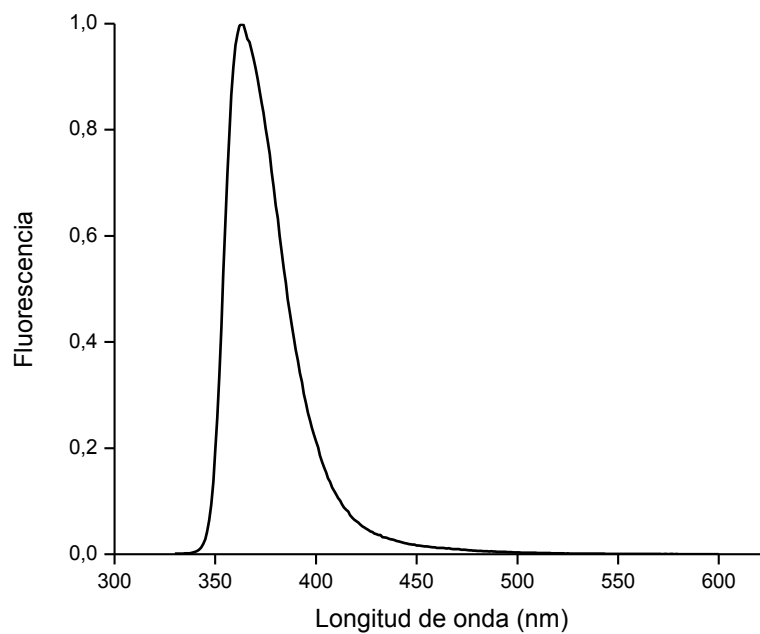
Anexo F. Espectro FT-IR (ATR) de celulosa bacteriana producidas por *G. Xylinus* ATCC22768.



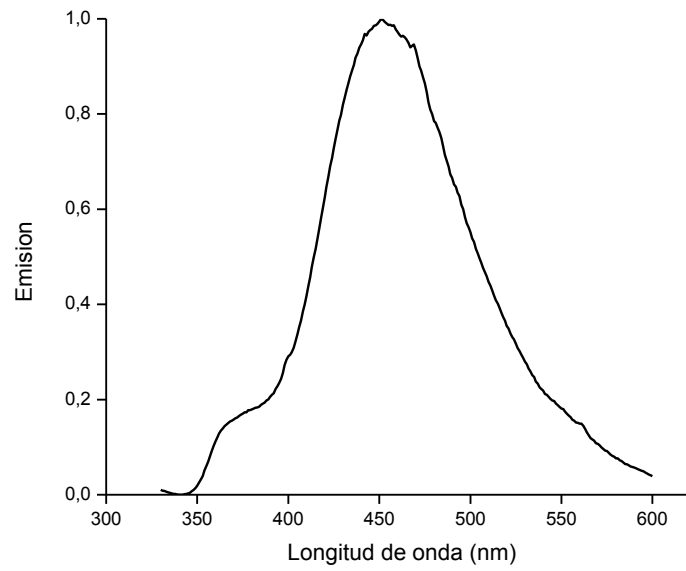
Anexo G. Espectro FT-IR (ATR) del precursor formiltrifenilamina modificado.



Anexo H. Espectro UV-VIS, de (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea) (fluorescente).



Anexo I. Espectro UV-VIS, celulosa bacteriana modificada con la muestra final (1-bencil-1-[[4-(difenilamino)fenil]metil]-3-(3-trimetoxisililpropil)urea).



Anexo J. Fotobiorreactor utilizado para el inoculo de la microalga *Chlorella Vulgaris*



El compartimento diseñado para albergar las muestras representativas de microalgas, consta de una caja con paredes de madera y puerta removible, dispositivo de aire incorporado en los extremos y fuente de luz proporcionada por leds azules que emiten en una frecuencia de (420 nm a 480 nm) con un máximo en 450 nm, frecuencia, tomado con el espectrómetro HR- 4000, ideal para la absorción de luz del microorganismo.