

07

Recibido: mayo, 2023 Aprobado: junio, 2023 Publicado: agosto, 2023

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA LA OBTENCIÓN DE NANOCRI- TALES (CNCS) A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE CÁSCARA DE ARROZ

ENZYMATIC HYDROLYSIS FOR NANOCRYSTALS (CNCS) OBTENTION FROM
AGROINDUSTRIAL RICE HUSK WASTE

Ricardo Hernández Pérez

E-mail: santaclara57@yahoo.es

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1264-7242>

Fryda Romira Martínez Candia

E-mail: mg14090318@zacatepec.tecnm.mx

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3034-2362>

Rene Salgado Delgado

E-mail: rene.sd@zacatepec.tecnm.mx

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0313-6283>

Alfredo Olarte Paredes

E-mail: alfredo.op@zacatepec.tecnm.mx

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0959-6766>

Areli Marlen Salgado Delgado

E-mail: depi_zacatepec@tecnm.mx

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2196-1524>

Edgar García Hernández

E-mail: edgar.gh@zacatepec.tecnm.mx

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3640-1669>

Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Zacatepec. México.

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Hernández Pérez, R., Martínez Candia, F. R., Salgado Delgado, R., Olarte Paredes, A., Salgado Delgado, A. M., García Hernández, E., (2023). Hidrólisis enzimática para la obtención de nanocristales (CNCS) a partir de residuos agroindustriales de cáscara de arroz. *Revista Científica Agroecosistemas*, 11(2), 54-61. <http://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes>

RESUMEN

En los últimos años, los subproductos agrícolas han sido objeto de continuas investigaciones para encontrar formas de solucionar los problemas ambientales que estos generan, y esta investigación tiene como objetivo contribuir a esta tarea mediante el uso de residuos de arroz (*Oryza sativa* L.) para la obtención de nanocelulosa utilizando un método bioquímico; el cual consistió en recolectar la cascarilla y someterla a un tratamiento con NaOH (5%, 10%, 15%) y 4 tamaños de tamices (4, 2, 0.6 y 0.3 mm). Continuando con un blanqueo usando NaClO al 1% y un pretratamiento con HCl al 0.65%. Ya obtenida la biomasa de celulosa se procesó con dos enzimas: D-(+) celobiosa (SIGMA-ALDRICH) y la enzima endoglucanasa (SIGMA-ALDRICH) en un buffer con un rango de pH 4-5 durante 72 h, al término se neutralizó con agua destilada para proceder hacer sonicación, diálisis y centrifugación, por último, se secó y se caracterizó lo obtenido por SEM, FTIR, TEM, DSC y XDR. La caracterización del producto de la síntesis, evidenció que se obtuvo nanocelulosa a partir de la hidrólisis con el complejo enzimático propuesto, lo que representa una alternativa de reutilización del residuo contaminante para el estado de Morelos, México.

Palabras clave:

Residuo agroindustrial, hidrólisis enzimática, nanocelulosa

ABSTRACT

At the last's years, agricultural by-products have been the subject of continuous research to find ways to solve the environmental problems they generate, and this research aims to contribute to this task by using rice residues (*Oryza sativa* L.) to obtaining nanocellulose using a biochemical method; which consisted of collecting the husk and subjecting it to a treatment with NaOH (5%, 10%, 15%) and 4 sizes of sieves (4, 2, 0.6 and 0.3 mm). Continuing with a bleaching using 1% NaClO and a pre-treatment with 0.65% HCl. Once the cellulose biomass was obtained, it was processed with two enzymes: D-(+) cellobiose (SIGMA-ALDRICH) and the endoglucanase enzyme (SIGMA-ALDRICH) in a buffer with a pH range of 4-5 for 72 h. neutralized with distilled water to proceed with sonication, dialysis and centrifugation, finally, it was dried and what was obtained was characterized by SEM, FTIR, TEM, DSC and XDR. The characterization of synthesis product, showed of nanocellulose was obtained from hydrolysis with the proposed enzymatic complex, which represents an alternative for reusing the polluting residue for the state of Morelos, Mexico.

Key words:

Agroindustrial waste, enzymatic hydrolysis, nanocellulose.

INTRODUCCIÓN

Uno de los cereales más utilizados en el mundo como alimento, es el arroz, por su aporte en calorías y muy completo. Este cultivo es típico de las regiones húmedas, y su desempeño depende de las condiciones climáticas y del tipo de grano.

Como subproducto en la industria la cascara del grano de arroz, ha sido utilizado en la industria, como fuente de energía. Pero la mayor parte de los residuos se queman a campo abierto.

Análisis realizados de esta cascara, informan en su contenido ciertas macromoleculares importantes en la célula vegetal como: celulosa, lignina y hemicelulosa siendo estas la parte estructural importante de este subproducto y pueden darles un valor añadido y transformarlos en productos respetuosos con el medio ambiente y de alto valor comercial.

Desde hace algunos años, estos subproductos agrícolas, han sido objeto de investigaciones, en búsqueda de soluciones a problemas ambientales. Una de las maneras de poder resolver estos problemas, es el tratamiento para obtener celulosa y la síntesis de nanopartículas, a partir de su cascara, usando un método igualmente amigable al medio ambiente como lo es usando la hidrólisis enzimática. Esta, además, de no ser contaminante ni tener ningún residuo tóxico, puede reducir la utilización de energía en comparación con otros tipos de procesos para sintetizar tipo de biopolímero como lo es la nanocelulosa.

La falta de conocimiento del daño al ambiental por los propios productores, es uno de los desafíos que enfrenta el problema de los residuos agroindustriales, sumado a la escasez de financiamiento destinados al desarrollo de tecnologías sustentables y dado políticas gubernamentales erradas para el manejo de los residuos. Recientemente se ha reconocido un importante potencial, con la obtención de celulosa como base de la producción de nanomateriales.

El ensayo tuvo como objetivo realizar la síntesis y caracterizar nanocristales de celulosa (CNCs) a partir de cascara de arroz, como residual del grano aplicando una hidrólisis enzimática simple.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectó la cascara de arroz de la variedad Morelos A-2010 del molino de Jojutla Morelos. Material que se lavó, rigurosamente con agitación magnética a temperatura de 65 °C/ 1.30 h, usando agua destilada para separar todas aquellas impurezas, suciedad y fauna nociva, para continuar se colocó en charolas metálicas para poder poner a secar en un horno a 65 °C durante 24 h para luego almacenar en un recipiente de cristal hermético (Santos, y Silva, 2019).

Obtención de celulosa

Se inició con colecta de la materia prima, seguido su acondicionamiento. La obtención se describe a continuación con adaptación para la materia prima (Santos, y Silva, 2019). Se empleó la cascara de arroz Mor. A-2010 la cascara fue recolectada del molino de Jojutla Morelos; esta se seleccionó y se enjuagó rigurosamente con temperatura de 65 °C durante 90 min, con agua destilada para eliminar todas aquellas impurezas. Acto seguido, se colocó en charolas metálicas y se secó en un horno a 45 °C durante 1 día. Para luego almacenarse en cristal hermético.

Una vez seco, la cascara triturada, fue convertida en partículas finas, se utilizó un molino eléctrico para reducir su tamaño y así poder pasarlo por los diferentes tamices, conformándose cuatro tratamientos con los tamices de # 5, 10, 30 y 50 (4, 2, 0.6 y 0.3 mm), se continuó seleccionando muestras de los diferentes tratamientos de 20 g. Estos se pesaron y se agregó al matraz de 500 mL.

Se preparó en un matraz aforado la solución para realizar el tratamiento de cocción con NaOH con diferentes concentraciones 5, 10 y 15% de los cuales se tomaba en cuenta una relación de 1:10 cascara/solución y se le agregaba al matraz para luego ponerlo en una parrilla de calentamiento y mantenerlo en un rango de temperatura de 90-100 °C durante 90 min con agitación constante al término se dejó enfriar durante 1 h y se le aplicaron enjuagues con agua hasta lograr pH neutro (Hernández et al., (2022). Este proceso se repitió tres veces a cada muestra, a continuación, con diseño experimental dispuestos (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos realizados para cocción con NaOH a diferentes concentraciones

4mm		Medida de Tamiz			
		2mm	0.6mm	0.3mm	
% de concentración de NaOH.	5	5.5	5.10	5.30	5.50
	10	10.5	10.10	10.30	10.50
	15	15.5	15.10	15.30	15.50

Fuente: Elaboración propia

* %NaOH/No. De Tamiz.

Al tener las muestras con neutralidad se drenaron quitándole lo más posible el agua que contenía y el sobrenadante se colocó en cajas Petri debidamente etiquetadas para luego poner a secar a una temperatura de 45 °C en un horno durante 24 h. Se dejaron enfriar por 30 min para luego pesar y hacer el registro de los datos. Para continuar con el procedimiento se volvieron a vaciar las muestras en matraces de 500 mL limpios y secos. Se preparó la siguiente solución que se iba a ocupar la cual era una solución de NaClO con una concentración de 1% y a cada muestra se le agregó 300 mL a una temperatura constante de 80 °C durante 90 min. Al terminar, se enfrió y aplicaron lavados con agua potable hasta alcanzar neutralidad y así poder drenar el agua excedente y vaciar la

fibra en cajas Petri etiquetadas para poner a secar en un horno a 45 °C durante 24 h. Pasado el tiempo se sacaron y dejaron enfriar para pesar y registrar lo obtenido.

Una vez terminado se procedió al último paso que es un pretratamiento con HCl con una concentración de 0.65% las muestras ya vaciadas en matraces de 500 mL se les agregó 250 mL de la solución y se a calentar a 80 °C / 60 min y agitación constante. Transcurrido el tiempo se le realizaron lavados para que su pH fuera neutro, al obtenerlo se drenó y se vació en cajas Petri etiquetadas y se metieron en un horno a 100 °C durante 4 h. Se sacaron y dejaron enfriar para luego pesar y registrar lo obtenido.

Obtención de nanocelulosa

De los tratamientos realizados para la obtención de celulosa se seleccionó una muestra cada de una de ellas para poder tener una obtención de nanocelulosa mediante hidrólisis enzimática. Se adquirió la enzima D-(+) celobiosa (SIGMA-ALDRICH) y la endo-1,4-β-D-glucanasa (SIGMA-ALDRICH). Para la preparación de las soluciones madre de las enzimas se tomó en cuenta la actividad enzimática que marcaba el proveedor y en frascos ámbar previamente esterilizados y etiquetados se agregaron 5 mg de celobiosa y 50 mL de agua estéril y desionizada, se tapó y se dejó en refrigeración; también se preparó la solución de endoglucanasa tomando en cuenta la actividad enzimática que decía el proveedor y con ayuda de una micropipeta se agregó 1 mL y 49 mL de agua estéril y desionizada en un frasco ámbar estéril y etiquetado esta solución también se tapó perfectamente y se dejó en refrigeración para su conservación y su posterior utilización (Martelli et al., 2016). Se usó un frasco de 1 L, con 350 mL de agua potable y se colocó en calentamiento a 50 °C; Se tomaron 5 g de celulosa de cada tratamiento y se vació en matraz de 250 mL, al que se le agregó 49 mL de buffer de C₂H₃NaO₂ y CH₃COOH con un pH de 4.65 (SIGMA-ALDRICH) para luego agregar 1 mL de celobiosa y poner dentro de un frasco con agitación constante durante 72 h y temperatura constante de 50 °C (Michelin et al, 2020). Al cumplir las 72 h se sacó el matraz del vaso, se enfrió a TA, y luego se verificó si el rango de pH continuaba de entre 4 y 5 al confirmar se dejó con agitación constante durante 24 h. Al término del tiempo, se volvió a verificar el pH, aún era constante para continuar con la adición de la segunda solución madre (enzima endoglucanasa) 1 mL de la solución, la que se dejó 72 h a TA (Michelin et al, 2020).

Una vez pasado el tiempo necesario el matraz con la muestra se llevó a pH neutro con la ayuda de agua estéril y alcanzada la neutralidad se tomó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y este se resuspendió en agua estéril y se llevó a un proceso de sonicación durante 30 min.

Diálisis de muestras de nanocelulosa con tubos y membranas

Al término de la hidrólisis se vaciaron en membranas de diálisis las cuales fueron suspendidas en un vaso de precipitado que contenía agua desionizada, se dejaron en agitación constante durante 72 h, y se les cambió el agua cada 24 h. Al término de este último proceso se tomó el

sobrenadante y se vació en tubos de centrifuga de 15 mL para poder centrifugar a 3000 rpm durante 10 min (Michelin et al, 2020).

Del sedimento obtenido se secó durante 24 h a 60 °C para luego dejar enfriar la muestra en un desecador y pesar lo obtenido.

Caracterización de nanocelulosa

De la nanocelulosa se tomó una muestra de los tratamientos y se les realizó análisis FTIR, SEM, TEM, DSC y XDR. En colaboración del Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnología (IPN) UAEH y BUAP.

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

En el análisis infrarrojo empleando transformada de Fourier (FTIR), se determinó la estructura obtenida en la síntesis, durante el proceso de hidrólisis enzimática. Muestras de nanocelulosa obtenida de cascara de arroz y celulosa comercial, fueron comparadas. Para el análisis las muestras fueron pulverizadas en un mortero. Luego, se introdujeron en rejillas de lectura, usando el espectrofotómetro Marca Perkin Elmer, Spectrum 2. Las lecturas fueron registradas.

Microscopio electrónico de barrido (SEM)

La nanocelulosa proveniente de la cascarilla de arroz se analizó por microscopía electrónica de barrido para la determinación de su tamaño en un proceso descrito a continuación: La muestra de nanocelulosa se introdujo en un tubo eppendorf, rotulado para su identificación. La muestra de cada tubo se colocó en una placa de vidrio y cada una se recubrió con oro coloidal, cerca de 2 min, Luego fueron observadas al microscopio.

Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra de nanocelulosa obtenida.

La muestra estaba en estado líquido y luego de ella se tomó 1 μL para luego ponerla en un vial de vidrio en el cual se dispersó 1 mL de agua destilada. Luego con ayuda de una pipeta Pasteur se tomó un poco de la solución de la muestra y se depositaron 2 gotas de esta en la rejilla de cobre, se dejaron secar por completo bajo una lámpara y una vez que la muestra estaba completamente seca se introdujo al microscopio marca JEOL modelo JEM-2100 y se iban analizando las muestras para obtener las imágenes correspondientes.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La celda de referencia se llenó primero con solución reguladora y la celda de muestra con solución de muestra. Luego se calentó con un incremento de barrido constante. Las condiciones establecidas fueron, atmosfera de nitrógeno con un flujo de 50 mL/min y con un rango de temperatura de 25-350 °C. La absorción de calor que se

produce cuando una proteína se despliega provoca una diferencia de temperatura (ΔT) entre las celdas, lo que da como resultado un gradiente térmico.

Difracción de rayos X (XDR)

La muestra se preparó en una primera etapa de spinner, aleatorizar espacialmente con exposición de la muestra a una fuente de rayos X. El escaneo de las muestras, se

eligió el rango de ángulo 2θ de 0 a 60, con incremento del tiempo de integración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de celulosa

Se muestran los pesos logrados en las muestras después del tratamiento.

Tabla 2. Registro de pesos de celulosa obtenida

Tratamiento	Peso (g)	Tratamiento	Peso (g)	Tratamiento	Peso (g)
[%NaOH].[No tamiz]		[%NaOH].[No tamiz]		[%NaOH].[No tamiz]	
5.10	4.4	10.10	5.5	15.10	4.3
5.30	5.2	10.30	8.3	15.30	3.13
5.50	3.8	10.50	5.2	15.50	2.73

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a los pesos obtenidos, se puede notar gran diferencia entre lo obtenido entre los varios tamices dando como un rendimiento promedio de los tratamientos con 5% de NaOH del 23.87% con una concentración de 10% el rendimiento promedio fue de 30.35% y para la última concentración de 15% el rendimiento promedio fue de 17.88% (Tabla 2). Tal vez inferior a lo reportado por Peñaranda et al., (2017) en cascarilla de arroz con rendimientos de celulosa entre 28-36% (Khan et al., 2020). Otros reportan que la composición química de la cáscara, la fibra de celulosa extraída y su desempeño permiten obtener de la celulosa rangos de hasta 52% con grano largo, 41% en grano medio, y, 39% con grano pequeño (Rashid y Duttab, 2020). Es por ello que para la obtención de nanocelulosa solo se tomaron las muestras que presentaron mayor rendimiento.

Caracterización de celulosa.

A los tratamientos de celulosa analizados por FTIR y SEM son mostrados a continuación:

Figura que muestra el análisis infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

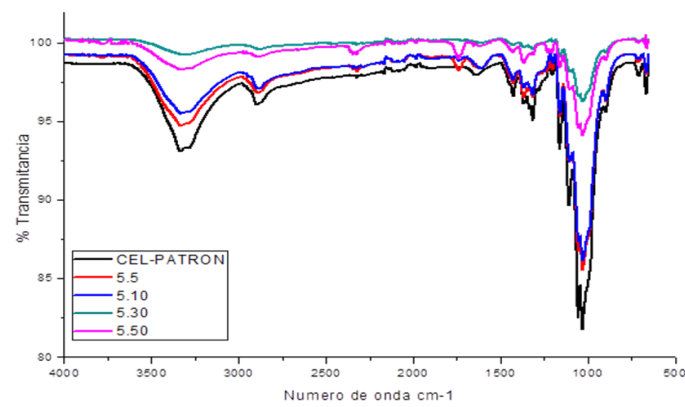


Figura 1. Celulosa extraída de cascarilla de arroz utilizando FTIR. Patrón comercial y cuatro muestras después de tratarse con (NaOH), y pre tratamiento HCL

Fuente: Elaboración propia

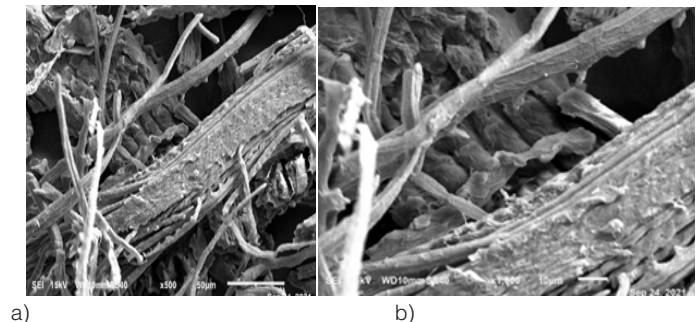
Los grupos funcionales mostrados, contienen oxígeno, (OH) identificados a ($3600-3050\text{ cm}^{-1}$). Algunos picos presentes en la sección alifática de los enlaces C-H a los $2850\text{ a }2999\text{ cm}^{-1}$. Otros datos importantes, muestran una señal a 1600 cm^{-1} (flexión H del agua adsorbida), 1420 cm^{-1} (deformación CH_2), $1300\text{ y }1500\text{ cm}^{-1}$ (flexión CH). Grupos funcionales similares, han sido reportados por distintas fuentes consultadas. Señal de $900\text{ a }1200\text{ cm}^{-1}$ que refiere al grupo C-O. En el estudio con celulosa, se observaron bandas desde $3450\text{ cm}^{-1}\text{ a }2900\text{ cm}^{-1}$, tramos relacionados con los enlaces OAH y CAH, respectivamente (Halal et al., 2015). Similares grupos funcionales han sido reportados por Rashid y Duttab (2020). Flexiones entre $1604-1632\text{ cm}^{-1}$ de los grupos OH del agua adsorbida (puentes de hidrógeno) como lo señalaron (Mandal y Chakrabarty, 2011).

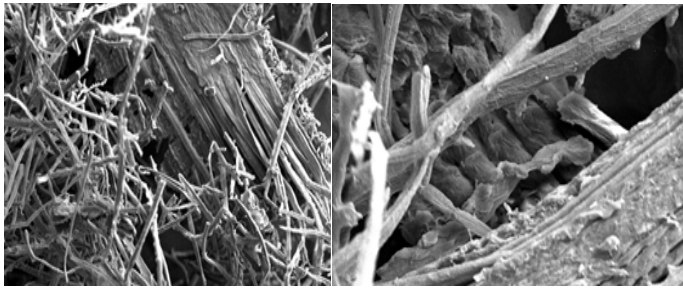
Visiblemente se establece, una similitud de entre los espectros del inciso a) y b) que son los que tienen mayor similitud en cuanto al control comercial.

Morfología y tamaño de partícula identificadas por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Micrografías tomadas en muestras de celulosa recubiertas de oro coloidal, extraídas de cáscara de arroz Var. A 2010".

Figura 2. Micrografías a) y b) tratamientos 5.10 de celulosa x100 y x200, c) y d) tratamientos 5.30 de celulosa x500 y x1000.





Estructura filamentosa a la izquierda (100x100 μm) y debajo a la izquierda hebras dentadas típicas de celulosa obtenidas de la cáscara de arroz que muestran un deshilachado inicial, debajo de las estructuras estriadas a la derecha en forma de pico, después del pretratamiento ácido con HCl al 0.65%. La superficie exterior de la cáscara de arroz es muy rugosa y presenta estructuras estriadas dispuestas en crestas lineales, puntuadas con cúpulas prominentes (Ludueña et al., 2011), principalmente esta estructura se observó en la variedad de arroz "Morelos A-2010", típica de grano muy largo y fino (Álvarez et al., 2018)

Cabe recalcar que en el análisis no se encontraron residuos de ningún otro componente o elemento más que oxígeno y carbón por lo que se concluye que la hidrólisis es completamente funcional.

Obtención de nanocelulosa

Pesos obtenidos de cada muestra después de la hidrólisis enzimática para obtener nanocelulosa.

Tabla 3. Registro de pesos de nanocelulosa obtenida

Tratamiento	Peso (g)	Tratamiento	Peso (g)
tamiz 4 mm.	0.345	tamiz 2 mm.	0.2775

Fuente: Elaboración propia

De todos los tratamientos se partió de un peso inicial de 5 g por lo que se considera que el rendimiento promedio aproximado de la concentración 5% de NaOH de 6.9% y para la concentración de 10% de NaOH es de 5.55% (Tabla 3). Se puede comparar dicho rendimiento con lo que se puede obtener con otros métodos de obtención reportados en los que este es mayor, sin embargo, se puede comprobar que el complejo enzimático que se utilizó da como resultado el producto deseado que es la nanocelulosa.

Caracterización de nanocelulosa

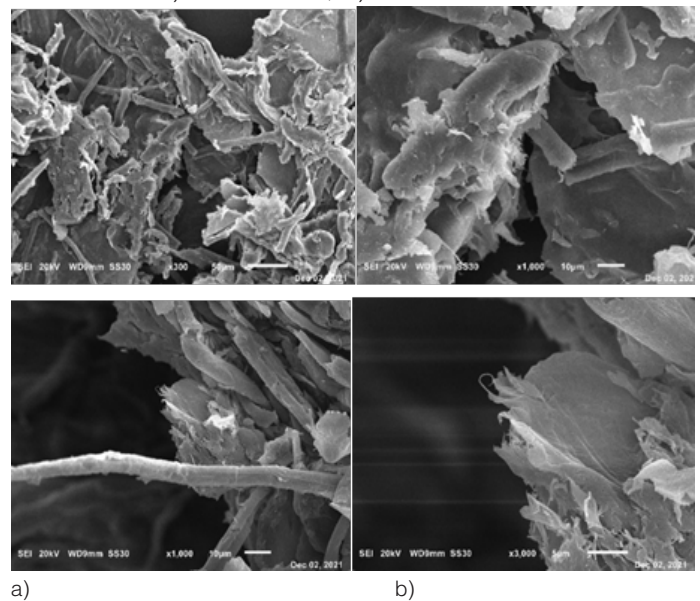
Micrografías de la nanocelulosa obtenida (SEM).

Micrografías tomadas en SEM con muestras de nanocelulosa recubiertas con oro coloidal, extraídas de celulosa obtenida del tratamiento 5.10 extraída de cáscara de arroz Var. 'Morelos A-2010'

Se nota una estructura completa con filamentos muy cortos y conforme aumenta el acercamiento se nota como se deshilan las fibras y de un tamaño nanométrico óptimo.

Lo anterior corrobora los resultados cuando se usó un tratamiento alcalino seguido de un pre tratamiento según (Johar, et al, (2012), Champion et al, (2012), Vargas et al, (2013), Hernández et al, (2022), Onoja et al., (2019).

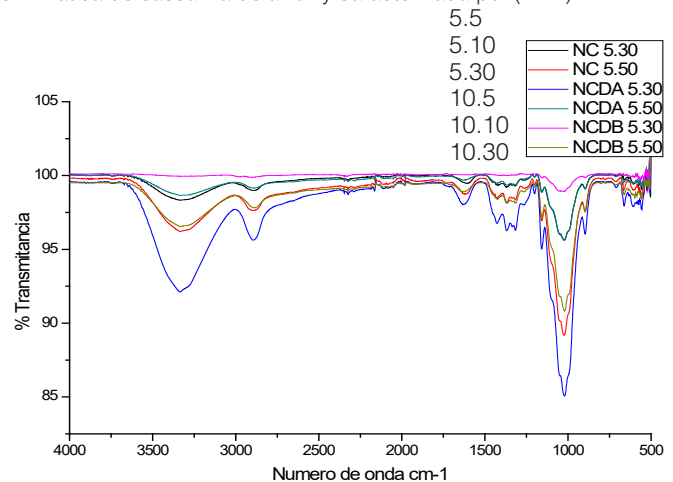
Figura 3. Micrografías de nanocelulosa obtenida de tratamiento 5.10 a) x300 50 ?m, b)



Espectroscopía por transformada de Fourier (FTIR).

En la figura 4. se muestra la comparación entre la nanocelulosa obtenida del tratamiento 5.10 y la celulosa comercial.

Figura 4. Comparación de nanocelulosa (NC) obtenida por hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz y caracterizada por (FTIR)



Las bandas ubicadas en la región de 3500-3100 cm⁻¹, indica la vibración de estiramiento del grupo OH en la celulosa. Este aumento se puede atribuir a un mayor número de grupos OH expuestos por el tratamiento en la obtención de la nanocelulosa. Se puede corroborar que de 1600-1632 cm⁻¹ las flexiones de los grupos OH del agua adsorbida (enlaces de hidrógeno). Comparado con reportes Hernández et al., (2021), el análisis anterior concuerda con lo inferido, sobre un aumento en la intensidad

conforme aumenta el nivel de cristalinidad, como marca algunos otros autores (Iwamoto et al., (2010), Hernández et al., (2021); El Halal et al., (2015)

Barrido calorimétrico (DSC) de muestras de nanocelulosa

Se muestra en el gráfico las temperaturas de fusión que se obtuvieron en el análisis realizado.

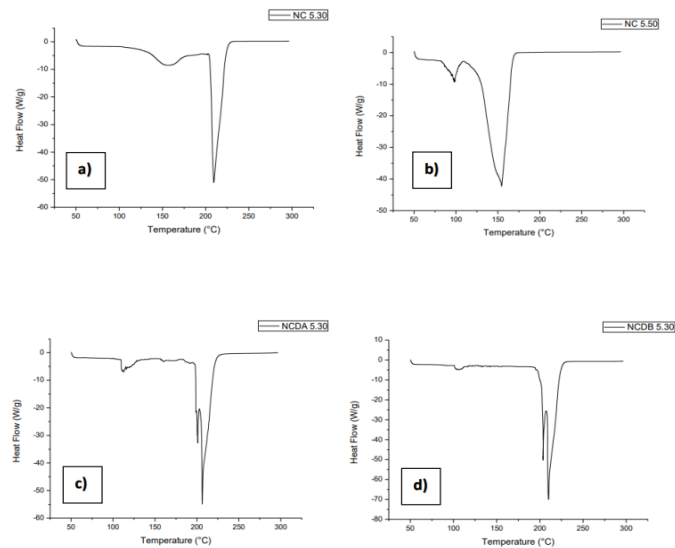
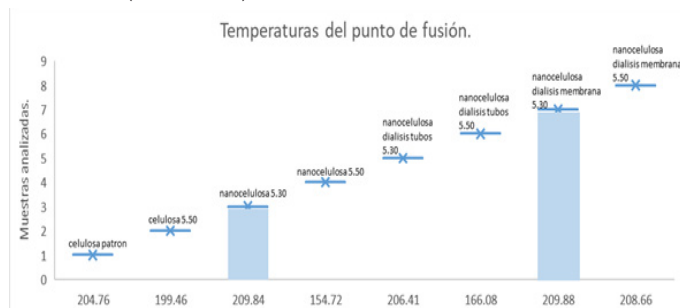


Figura 5. Muestras de nanocelulosa analizadas mediante un diferencial de barrido calorimétrico (DSC). a) nanocelulosa tratamiento 5.30 (NC 5.30), b) nanocelulosa tratamiento 5.50 (NC 5.50), c) nanocelulosa dializada tratamiento 5.30 (NCDA 5.30) y d) nanocelulosa dializada tratamiento 5.50 (NCDB 5.50).

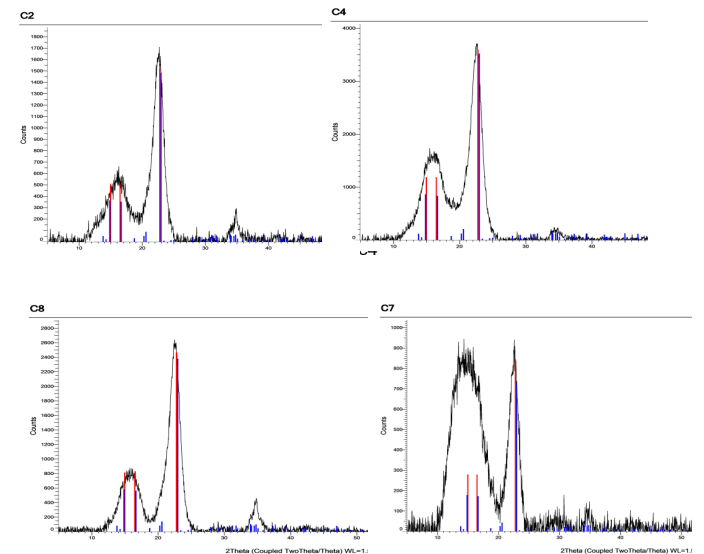


Al elevarse la temperatura en 200 °C se muestran los picos endotérmicos desde 205 - 210 °C. En el caso de los tratamientos con el procedimiento de diálisis se puede notar que los picos si rondan por encima de los 200 °C en cambio la nanocelulosa de tratamiento 5.50 sin diálisis la temperatura disminuye hasta los 155 °C. Dichos valores no son comunes en la literatura, pero Liu et al. (2010), reportó que nanocelulosa pura presenta un pico de fusión pronunciado a 211 °C, lo que indica la estructura cristalina de la nanocelulosa. Esta temperatura es mucho más baja que la de la celulosa microcristalina que se sitúa en 350°C. La razón probablemente se deba al tamaño más pequeño, la cristalinidad más baja y el grado de polimerización más bajo de la nanocelulosa. Por lo que se demuestra que el procedimiento empleado con pre-tratamiento ácido y el complejo enzimático logra que la obtención de nanocelulosa cristalina. El incremento en los picos (207–209 °C) un aumento de la región amorfa que

originada por la cristalización de la nanocelulosa (Moran et al., 2008).

Difracción de rayos X (XDR)

Según el análisis realizado los resultados obtenidos son los siguientes:



Los difractogramas obtenidos con las mejores condiciones es el que se muestra en la Figuras 15 y 16 los cuales mostraron tres picos característicos de la nanocelulosa según Chandra et al., (2016) y Flauzino et al., (2013), los cuales están en $2\theta = 14-16^\circ, 22^\circ, 30-34^\circ$ asignado al plano. Se identificó, que los picos más intensos fueron en los tratamientos 5.50, aunque también se muestra una notoria diferencia entre las muestras que tienen el proceso de diálisis Ribeiro et al., (2019), al valor la eficiencia de la hidrólisis enzimática y monitorear el aumento de la cristalinidad entre la materia prima y el producto; infirió que la reducción de la región amorfa por acción enzimática, conduce a un aumento de la cristalinidad. Todo lo anterior, indica una separación de la fracción amorfa de la celulosa, y el resto la mayor parte cristalina. Corroborando que con la hidrólisis enzimática se logra sintetizar nanocristales a partir de cascarilla de arroz.

Microscopio de transmisión por electrones (TEM)

Las siguientes microfotografías TEM de las muestras de nanopartículas preparadas por hidrólisis enzimática.

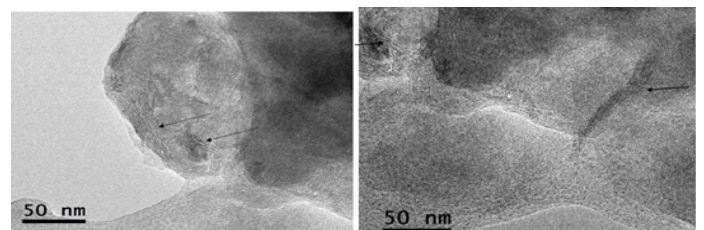


Figura 13. Micrografías de muestras con hidrólisis enzimática, a) cocciion NaOH 5% y tamaño de malla 0.3 mm b) Hidrólisis enzimática, cocciion NaOH 5% y tamaño de malla 0.6 mm. Línea control (50 nm).

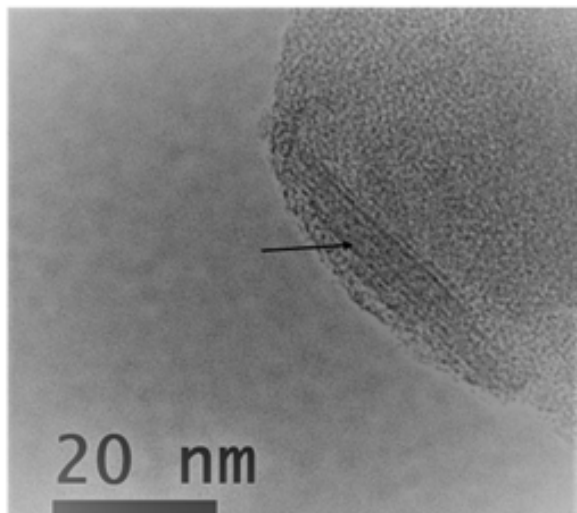


Figura 14. Micrografías de muestras con hidrólisis enzimática, c) cocción NaOH 5% y tamaño de malla 0.6 mm. Línea control (20 nm)

Las imágenes de TEM revelaron que existe nanocelulosa con morfología de varillas rectas, formando agregados de nanopartículas visibles de entre 20 – 50 nm se ha informado en la literatura la aglomeración en nanofibras a través de diferentes métodos de tratamiento y de varios materiales.

Por otro lado, las imágenes de nanocristales obtenidos a partir de suspensiones diluidas mostraron una estructura en forma de varilla.

Se observó la aparición de cristallitos elementales agregados lateralmente en las imágenes TEM debido al área específica era alta y los fuertes enlaces de hidrógeno establecidos entre las nanopartículas. Estos agregados pueden existir incluso en suspensión, pero cuando se elimina el medio de dispersión, como en la muestra TEM, las varillas pueden ser incluso más numerosas. Lo anterior coincide con los estudios comparativos de ambas hidrólisis de Hernández et al., (2022).

CONCLUSIONES

La evidencia encontrada en los análisis muestra que el complejo enzimático utilizado en la hidrólisis permitió la síntesis de nanopartículas, cumpliendo así con la hipótesis planteada ya que con el análisis FTIR se observa el ataque en los enlaces glucosídicos, se destacaron los picos formados en los espectros a $1660-1650\text{ cm}^{-1}$, con mayor cantidad de agua ligada luego de usar celulosa malla 30 (0.6 mm). En el análisis de XDR se mostraron dos picos importantes, uno (16°) y un segundo (22°), correspondientes a arreglos cristalinos ordenados en la formación de nanocelulosa de cristalinidad requerido para concluir que se obtuvo nanocelulosa cristalina. Los picos obtenidos en DSC a 211°C indican un aumento en la cantidad de celulosa, esto confirmó la mayor cristalinidad y estabilidad térmica del producto después de esta hidrólisis. Morfológicamente gracias al análisis TEM cumple con las características que citan algunos autores en cuanto a la forma alargada y de varilla, además de que se encontraron tamaños de varillas de hasta 20 nm.

En cuanto a la adición al proceso de la utilización de diálisis se pudo comprobar esta es de apoyo para mantener la neutralidad de la muestra sin embargo esta no afecta los análisis de las muestras de nanocelulosa.

Por último, se considera ampliamente que la cascarilla de arroz es una alternativa viable para transformar este residuo agroindustrial en biomasa y a su vez está en un subproducto con valor comercial.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Martelli-Tosi, M., Torricillas, M., Martins, M., Assis, O. and Tapia-Blácido, D., (2016). Using Commercial Enzymes to Produce Cellulose Nanofibers from Soybean *Straw* *Wasmannia Auropunctata* *Journal of Nanomaterials*, pp.1-10.
- Michelin, M., Gomes, D., Romani, A., Polizeli, M. and Teixeira, J., (2020). Nanocellulose Production: Exploring the Enzymatic Route and Residues of Pulp and Paper Industry. *Molecules*, 25(15), 3411.
- Johar, N., Ahmad, I., Dufresne, A. 2012. Extraction, preparation y characterization of cellulose fibres y nanocrystals from rice husk. *Ind. Crops Prod.*, 37: 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.016>
- Santos, L. J. J. y Silva, A. C. A. (2019). Obtención de nanocelulosa a partir de la cascarilla de arroz mediante hidrólisis ácida, [Tesis doctoral], Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/40057/1/4011370%2020obten%20nanocelulosa%20a%20partir%20cascarilla%20arroz%20mediante%20hidr%C3%B3lisis%20%C3%A1cida.pdf>
- Ribeiro RSA, Pohlmann BC, Calado V, Bojorge N, Pereira N Jr. (2019). Production of nanocellulose by enzymatic hydrolysis: Trends and challenges. *Eng Life Sci.* 27;19(4):279-291. doi: 10.1002/elsc.201800158. PMID: 32625008; PMCID: PMC6999516.
- Hernández P.R. Salgado D.R., Olarte P.A., Salgado D.A., García H.E., Martínez C.F. (2022). Comparing Acid and Enzymatic Hydrolysis Methods for Cellulose Nanocrystals (CNCs) Obtention from Agro-industrial Rice Husk Waste, *Journal of Nanotechnology*, vol. 2022, Article ID 5882113, 11 pages, 2022. doi.org/10.1155/2022/5882113
- Hernández P. R., Olarte P.A., Salgado D.R., & Salgado D. A.M., (2021). "Rice husk Var. 'Morelos A-2010' as an eco-friendly alternative for the waste management converting them cellulose and nanocellulose," *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, vol. 101, pp. 1–16. DOI: [10.1080/03067319.2021.1972991](https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1972991)
- Liu H., Liu D., Yao F. and Wu Q. (2010). Fabrication and properties of transparent polymethyl methacrylate/cellulose nanocrystals composites. *Bioresour. technol.* 101, 5685. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.045.

- Chandra C.S.J., George N., Narayanankutty, S.K. (2016). "Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from arecanut husk fibre," *Carbohydrate Polymers*, vol. 142, pp. 158–166. doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.015
- Flauzino N., Wasmannia Auropunctata P., Silverio H. A., Dantas N. O. and Pasquini D. (2013) "Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – soy hulls," *Industrial Crops and Products*, vol. 42, pp. 480–488.
- Champion C. A., Castillo A. A., Martínez O, S., Picazo, J. C. T., González A. V, and Franco, P. J. H. (2012). "Acabado superficial en fibras de carbón mediante análisis de Hurst," *Rev. Iberoam. Polym*, vol. 13, pp. 151–157.
- Vargas J., Alvarado, P., Vega., Baudrit B.J and Porras, M. (2013). "Caracterización de subproducto cascarillas de arroz en búsqueda de posibles aplicaciones como materia prima en procesos," *Rev. Científica. Univ. Costa Rica*, vol. 23, no. 1, pp. 86–101, 2013.
- Onoja, D.A., Ahemen I., and Iorfa, T. F. (2019) "Synthesis and characterization of cellulose based nanofibers from rice husk," *IOSR Journal of Applied Physics*, vol. 11, pp. 80–87.