

10

Recibido: abril, 2024 Aceptado: junio, 2024 Publicado: agosto, 2024

Incremento de celulosa con empleo de enzimas naturales (Brom./Pap.) y síntesis de Nanocelulosa a partir de cascarilla de arroz

Increase in cellulose using natural enzymes (Brom./Pap.) and synthesis of nanocellulose from rice husk

Ricardo Hernández Pérez^{1*}

E-mail: santaclara57@yahoo.es

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

Rene Salgado Delgado¹

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

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

Alfredo Olarte Paredes¹

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

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

Gilda H. Martínez Freyre²

E-mail: martinezfgh@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-0125-2521>

Guadalupe Cayetano Fuentes²

E-mail: 19091192@itdurango.edu.mx

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-5284-1408>

Liliana G. Salazar Trujillo¹

E-mail: l19091236@zacatepec.tecnm.mx

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-5864-7654>

¹National Technological Institute of Mexico/Technological Institute of Zacatepec, Mexico.

² National Technological Institute of Mexico. Technological Institute of Durango. México.

*Autor para correspondencia

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Hernández Pérez, R., Salgado Delgado, R., Olarte Paredes, A., Martínez Freyre, G. H., Cayetano Fuentes, G. y Salazar Trujillo, L. G. (2024). Incremento de celulosa con empleo de enzimas naturales (Brom./Pap.) y síntesis de nanocelulosa a partir de cascarilla de arroz. *Revista Científica Agroecosistemas*, 12(2), 67-72. <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes>

Resumen

La nanocelulosa, es considerado un material innovador con aplicaciones en la biotecnología, lo que ha revolucionado la ciencia y el medio ambiente, pudiendo suplir el plástico y el vidrio en la creación de nuevos dispositivos. Con este ensayo se incrementó el rendimiento de Celulosa, a partir de tratamientos previos de cascarilla de arroz con enzimas naturales (Bromelina y Papaína) (44%), favorecido cuando se usó 10% de CaCl₂ (47%). Al evaluar un protocolo ajustado, usando un complejo enzimático con exo y endonucleasas, se pudo sintetizar nanocelulosa (CNCs) en rango de 200 nm. Aunque los resultados son satisfactorios, se necesita mejorar el manejo para obtener rendimientos superiores.

Palabras clave:

Proteólisis, Hidrólisis, Nanopartículas, Bromelina, Papaina, Contaminante ambiental, Biomasa.

Abstract

The nanocellulose is considered an innovative material with applications in biotechnology, which has revolutionized science and the environment, and can replace plastic and glass in the creation of new devices. With this test, the yield of Cellulose was increased, from previous treatments of rice hulls with natural enzymes (Bromelain and Papain) (44%), advantaged after using 10% CaCl₂ (47%). By evaluating an adjusted protocol, using an enzyme complex with four exo and endonucleases, nanocellulose (CNCs) could be synthesized in the 200 nm range. Although the results are satisfactory, management needs to be improved to obtain higher yields.

Keywords:

Proteolysis, Hydrolysis, Nanoparticles, Bromelain, Papain, Environmental pollutant, Biomass.

Introducción

Como resultado de la gran industria arrocera en Morelos, la generación de cascarilla de arroz (*Oryza sativa* L.) se ha convertido en un residuo abundante, que llega a ser uno de los mayores contaminantes del campo. Algunos resultados recientes han permitido usar esta biomasa para la producción de celulosa con el fin de desarrollar una alternativa sustentable para obtener nanocelulosa (Hernández et al., 2022).

Para pensar en una industrialización a futuro de se necesita convertir la cascarilla en proceso rutinario, pero con mayor rendimiento. Algunos autores han recurrido a un tratamiento previo de la cascarilla, antes de llevarlo a una cocción alcalina. Por lo que estos ensayos tuvieron como objetivo evaluar el efecto combinado de enzimas proteolíticas naturales aplicadas a la cáscara de arroz, y verificar la efectividad de la hidrólisis enzimática compuesta por cuatro enzimas: (D-(+)-celobiosa, endo-1,4-β-D glucanasa, β-glucosidasa y celobiohidrolasa), para la síntesis de (CNCs) con dos procedimientos diferentes.

Materiales y métodos

Se preparó una solución de 200 mL de enzimas naturales Bromelina + Papaína (Brom./Pap.), en una proporción 50/50 p:p, aplicado sobre la cascarilla de arroz, en agitación constante durante 72 h (Martínez et al., 2016).

Para la obtención de celulosa se utilizó la cascarilla de arroz de la variedad Morelos A-2010. Una vez lavada, triturada y tamizada se pasó por tamiz # 30, separándose cinco muestras de 20 g para su tratamiento (Hernández et al., 2022).

Posteriormente se valoró la concentración de proteínas de la fibra con base del método Lowry ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se comparó su estructura y morfología en SEM (Rashid et al., 2020).

Para la obtención de celulosa se trató la fibra en una cocción con NaOH al 5% en relación 1:10 (cascarilla/solución), se colocó en una parrilla a 102°C durante 90 min. con agitación constante. Al término se realizaron tres lavados con agua destilada y se midió su pH. Al final, se llevaron las muestras a una estufa a 80°C por 180 min. Para luego registrar su peso (Hossain et al., 2018). El blanqueo de las fibras se realizó comparando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 1% con hipoclorito de sodio (NaClO) 1%, llevándolo a una parrilla de calentamiento a 80°C por 90 min. Pasado el tiempo se sacaron y se dejaron enfriar y registrar el peso (Kaur et al., 2018).

Una vez que se obtuvo la fibra blanqueada, se procedió a realizar un pre tratamiento con ácido clorhídrico (HCl) 0.65% p/p, repitiendo el proceso de calentamiento anterior 80°C por 90 min. Por último, las muestras fueron secadas registrando su peso. Al finalizar el pesaje de las muestras, se calculó el rendimiento aplicando la fórmula Martelli et al., 2016).

Para la obtención de nanocelulosa se realizaron dos ensayos (Ensayo 1) con empleo de todas las enzimas en conjunto (exo y endoglucanasas) sobre la celulosa, aplicadas a la vez y (Ensayo 2) con estas enzimas aplicadas en pareja exo o endoglucanasas, en dos fases o tiempos diferentes. Se preparó un complejo enzimático con las enzimas, D-(+)-cellobiose, endo-1,4--D-glucanase,-glucosidase y Cellobiohidrolase (Martínez et al., 2016). Posteriormente se dejó en baño María a 30°C /72 h con agitación y luego se verificó el pH entre 4- 5 (Castillo et al., 2019). Después de cumplir este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente (TA), y se verificó el pH entre 4 - 5.

Seguidamente de la hidrólisis, se vaciaron los productos de cada ensayo en tubos de membranas de diálisis (14000 Da), dichos tubos fueron suspendidos en un vaso de precipitado de 2000 mL que contenía agua desionizada, en agitación constante 72 h, con cambios de agua cada 24 h para mantener el pH (Martínez et al., 2016). Al finalizar, se verificó el pH neutro para cada caso. De este se, obtuvo un sobrenadante los que fueron separados y centrifugados a 3000 rpm durante 10 min (Cheng et al., 2017). Posteriormente

el contenido se llevó a secado en una estufa a una temperatura de 80°C durante 24 h, para luego pesar lo obtenido.

En el Ensayo 2, se procedió a tomar el sobrenadante se llevó a un matraz de 50 mL para aplicar una sonicación a 28 Herz por 30 min. Posteriormente, se tomó el sobrenadante y se repitió la centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Al término, la muestra se secó en estufa a 80°C durante 24 h y luego se pesó el producto.

Después del proceso de secado, el rendimiento de la nanocelulosa se calculó de la misma forma que para la celulosa según (Martelli et al., 2016).

La caracterización de los productos obtenidos se realizó mediante análisis de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), mediante Microscopía electrónica de barrido (SEM), se determinó la estructura y morfología, según Zhang et al., (2016) y el análisis de grado de cristalinidad y la estabilidad de la nanocelulosa, asociado con la desnaturalización térmica de la molécula, se realizó por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), en colaboración con el Doctor Apolonio Vargas Torres de la UAEH campus Tulancingo Hidalgo, según Hernández et al., (2022) y Sullivan et al., (2015).

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se muestran los datos obtenidos para la cuantificación de proteínas de la muestra de cascarilla de arroz sin tratar (Control Absoluto), cascarilla con agua (Control) y cascarilla tratada con las proteasas (Brom/Pap), utilizando de referencia la ecuación de la recta obtenida de la disolución patrón.

Tabla 1. Valores de absorbancia y concentración obtenidos con la cascarilla de arroz en los diferentes tratamientos con base del método Lowry (g.mL⁻¹).

Replicas	1	2	3	4	5
Cascarilla Control Absol. (g. mL ⁻¹)	0.0170	0.0264	0.0441	0.0672	0.0794
Cascarilla agua (g. mL ⁻¹)	0.0161	0.0251	0.0394	0.0531	0.0703
Cascarilla tratada Brom/Pap) (g. mL ⁻¹)	0.0120	0.0210	0.0363	0.0503	0.0690

Fuente: Elaboración propia

Comparando la información que se obtuvo para cada medición en la tabla, es posible apreciar la disminución en concentración (g.mL⁻¹) de la muestra tratada con enzimas proteolíticas en comparación a la muestra control. Las proteasas son capaces de provocar una digestión de las proteínas y por ello son utilizadas para la síntesis de nuevos compuestos como lo menciona (Quino-Favero et al., 2008). Esto evidencia el efecto que producen las enzimas en la cascarilla de arroz al producir una disminución en la concentración de proteínas, esto, corroborando con el procedimiento de (Pérez-Higuera, 2013) al cuantificar proteínas a través de Lowry.

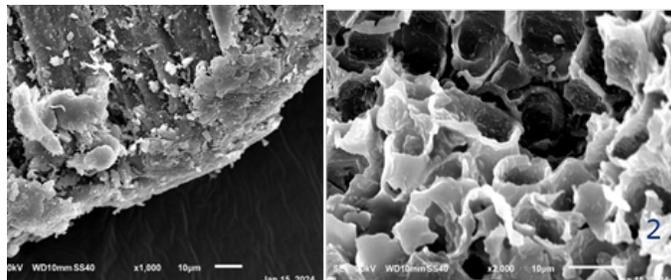
Microscopía electrónica de barrido (SEM) de cascarilla de arroz

La figura 1 muestra el efecto de las proteasas sobre la biomasa (cascarilla de arroz) antes de ser usada para obtener la celulosa. La imagen 1a muestra la superficie de la cáscara sin haber sido tratada, aspecto liso, sin modificación alguna. Imagen 2b parte de la cascarilla con algunas oquedades por efecto mecánico. mismas que permiten el vaciado de las cavidades que almacenan almidón y proteínas de la pared, que ocasionan un aligeramiento del tejido y facilitan la acción posterior del pretratamiento o cocción. Lo anterior corrobora lo inferido por Rodríguez-Almarza (2007). Donde claramente los gránulos de almidón gelatinizado o proteínas, están cubriendo parte de las células, cuando no han sido tratadas, con fracciones donde hay capas de células enteras sin daño. Mientras que cuando se ha dado el tratamiento enzimático, se distingue las cavidades vacías con restos de almidón. Estas observaciones en el tejido, confirman los resultados anteriores, detectados por remoción de proteína que favorece el mayor rendimiento posterior de celulosa.

En el caso de la papaína, tiene una amplia especificidad, es decir, digiere la gran mayoría de las proteínas, y en el caso de las carnes tratadas, tienden a volverse cada vez más blandas. Estas proteasas también se han utilizado para coagular la leche, formar queso, así como en el proceso de clarificación de la cerveza.

A pesar de esto es la primera evidencia en tejido vegetal, que contribuye a la obtención de celulosa (Hernández et al., 2023d).

Figura 1. Morfología del tejido de cascarilla de arroz (sección transversa) con diferentes tratamientos. 1) Sin tratamiento, magnificada 1000 y 2000 X, varilla de 10 µm. 2) Muestra tratada con enzimas (Brom. /Pap.) magnificada 1000 y 2000 X respectivamente, con varilla 10 µm.



Fuente: Elaboración propia

Un análisis puntual al microscopio de barrido (SEM), de la Cascarilla donde se hizo un análisis de elementos (EDS) (Tabla 2), muestra valores de Nitrógeno (N) en la muestra control (10.90 %). Mientras que en la siguiente que corresponde a la cascarilla tratada con enzimas (Brom/Pap), los valores de este elemento disminuyeron a la mitad (5.26 %).

Tabla 2. Valores de un análisis puntual de elementos químicos (EDS), en la fibra de cascarilla con agua (control) en microscopía de barrido (SEM).

Fibra Control				
Elementos	ms%	mol%	Sigma	Net K ratio Line
N*	10.9	14.6	5.74	915 0.0030189 K
O	48.84	57.25	2.4	14694 0.0122753 K
Si	38.82		1.2	69235 0.0207785 K
Fibra tratada (Brom/Pap)				
N*	5.26	7.47	6.88	80 0.0002655 K
O	47.61	59.17	2.33	3254 0.0027183 K
Si	47.13	33.37	1.27	17469 0.0052426 K

Fuente: Elaboración propia

Lo anterior confirma la pérdida de proteínas, las que son desnaturalizadas con el tratamiento de proteasas, considerando los valores que se han reportado para la cascarilla por algunos investigadores Abdul et al. (2012); Rodríguez-Almarza (2007) y Valverde et al. (2007). Lo que produce finalmente una mejor estructura de la fibra, antes de la síntesis de celulosa (Hernández et al., 2023a).

Los resultados de la obtención de celulosa resultan favorables como se muestra en la Tabla 3, puesto que, al comparar la celulosa obtenida de la cascarilla tratada con

enzimas proteolíticas con la celulosa obtenida de la cascarilla que fue tratada con agua existe un rendimiento de 44.51 %.

Además, como propuesta extra el tratamiento adicional, con enzimas proteolíticas (Brom/Pap) y cloruro de calcio (CaCl_2) al 10%, logró mejor resultados, por la presencia del Cloruro de calcio, que mejora la actividad de las enzimas proteolíticas. Como se muestra en la Tabla, el mismo procedimiento ofreció un rendimiento del 47.41%.

Tabla 3. Rendimiento de celulosa obtenida de cascarilla de arroz en gramos (g), previamente tratada con enzimas (Brom/Pap), no tratada (Se hizo un promedio de las tres repeticiones para cada tratamiento y tratada con enzimas (Brom/Pap) y CaCl_2 .

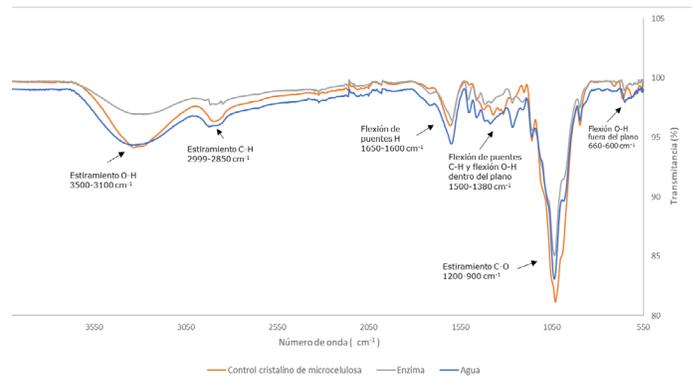
Tratamiento	Tratada con enzima	Tratamiento CaCl_2 y enzimas	(Control)
Tratamiento (Con agua / enzimas/ CaCl_2 + enzimas)	19.45	19.50	19.39
Tratamiento alcalino	14.12	16.15	11.83
Blanqueamiento	8.71	10.66	8.10
Pretratamiento ácido	8.21	9.48	6.58
Celulosa	8.21	9.48	6.58
Rendimiento (%)	44.51	47.41	35.84

Fuente: Elaboración propia

Obtención de la nanocelulosa

En la figura 2, se presenta el espectro FTIR de los tratamientos, tomando en cuenta un barrido del número de ondas desde 4000 a 550 cm^{-1} . En el rango de 3500 a 3100 cm^{-1} se encuentran los estiramientos O-H donde indica una vibración en las moléculas, compuesto por una banda ancha en ambas muestras. Esto se debe a que hay mayor número de grupos O-H mostrados por el tratamiento, este resultado coincide con lo reportado por (Han *et al.*, 2013) el cual obtuvo nanocelulosa mediante hidrólisis ácida a partir de desechos de madera. En cuanto a la muestra control cristalino de microcelulosa presenta un pico similar en el rango de 3500 a 3100 cm^{-1} lo que, la hace igual a los ensayos 1 y 2. Asimismo, se observó un estiramiento de los enlaces C-H que se encuentran en un rango de 2999 a 2850 cm^{-1} , igualmente se encontró un pico que indica la flexión de puentes de H del agua absorbida en el rango de 1650-1600 cm^{-1} . Algunos informes muestran que dentro del rango de 1500 a 1380 cm^{-1} se obtiene una flexión de O-H dentro del plano y una flexión de puentes de C-H. También, se observó una señal particular que es el estiramiento de C-O dentro de un rango de 900 a 1200 cm^{-1} . Y finalmente, se tiene la flexión de O-H fuera del plano que está dentro de un rango de 660 a 600 cm^{-1} .

Fig.2. Espectro comparativo mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), entre una muestra control cristalino de microcelulosa y los tratamientos enzima y agua.

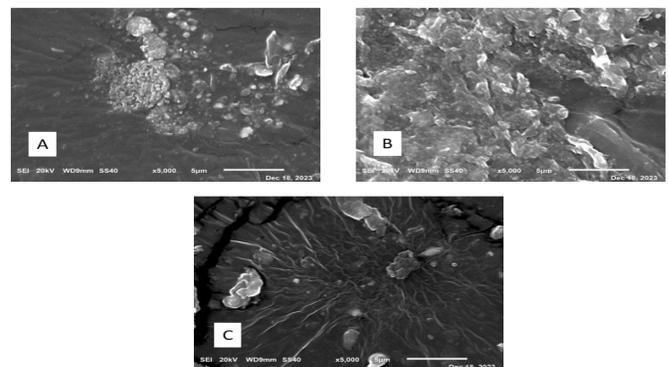


Fuente: Elaboración propia

Los espectros obtenidos mediante los tratamientos enzima y agua, coinciden con lo reportado anteriormente (Hernández *et al.*, 2023 a,b) debido a que, reportaron estos mismos grupos funcionales al obtener nanocelulosa mediante la hidrólisis enzimática, se puede concluir que, si se logró obtener nanocelulosa, puesto que, existen otros trabajos que obtuvieron los mismos resultados en sus espectros.

La figura 3, muestra imágenes de nanocelulosa obtenida en los tratamientos donde se muestra su estructura y morfología, comparando la muestra Control (3^a), con la tratada con enzimas (3^b). Se observan las nanopartículas de entre 200 nm que están dispersas en la superficie, estas son visualizadas con magnitudes de 5000 X (línea 5 μm), (Hernández *et al.*, 2023a).

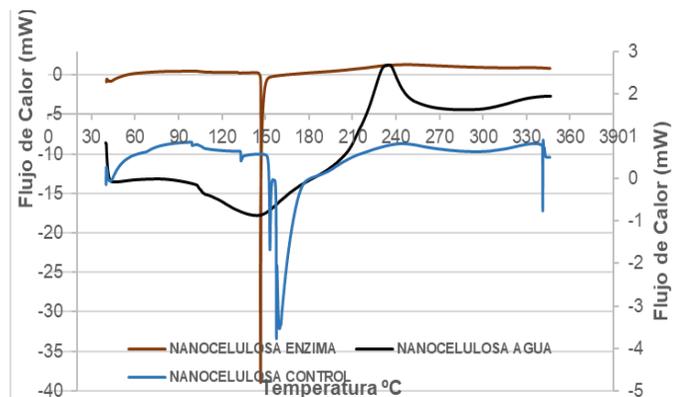
Fig. 3. Micrografía de nanocelulosa obtenidas mediante SEM (30000 X 0.5 μm) de los tratamientos. (a) control, (b) tratada con complejo enzimático.



Fuente: Elaboración propia

La figura 4 muestra el análisis de diferenciación calorimétrica de barrido (DSC) con cristalinidad y estabilidad térmica de las muestras.

Figura 4. Resultados del análisis de Calorimetría diferencial de barrido (DSC) desde 50°C-350°C con las tres muestras de nanocelulosa.



Fuente: Elaboración propia

La muestra de nanopartículas según el protocolo aplicado muestra la temperatura de cristalización con un pico bien definido a los 150°C, típico de una cristalización para nanocelulosa, mientras que el control ofrece tres picos, con etapas de transición, a 100°C, segundo a los 125°C y por último la cristalización final a los 149°C, lo anterior corrobora lo obtenido por (Hernández *et al.*, 2022), lo que confirma la estabilidad térmica, similares resultados informados (Kaur *et al.*, 2018) para nanocelulosas extraídas de cáscaras de arroz respectivamente.

Los resultados del rendimiento fueron inferiores en ambos casos (1.1 y 1.06), a los obtenidos con otros protocolos aplicados previamente. Claro que la producción podría ser mayor, si tenemos rendimiento óptimo de materia prima de partida. Estos resultados no coinciden, con los reportados por Martínez (2022). Algunos aspectos pueden influir en rendimiento como: pH, temperatura, afinidad de unión, actuarán las enzimas sobre la celulosa, afectando así el rendimiento del proceso (Michelin *et al.*, 2020).

Conclusiones

La aplicación de enzimas proteolíticas (Brom/Pap) sobre la cascarilla de arroz permite la desnaturalización de las proteínas que forma parte del tejido vegetal y contribuyen a mejorar el rendimiento de celulosa. Los protocolos aplicados para sintetizar nanocelulosa mediante hidrólisis enzimática, son efectivos logrando nano partículas de 200 nm, pero aún se necesita mayor ajuste para lograr rendimientos superiores a los propuestos para una etapa industrial.

Referencias bibliográficas

- Abdul H.P.S; Khalil, A.H. Bhat, A.F. y Ireana Yusra. (2012). "Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review." *Carbohydr Polym.*, 87: 2 963-979. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.078>.
- Cheng, M., Qin, Z., Chen, Y., Hu, S., Ren, Z. y Zhu, M. (2017). Efficient extraction of cellulose nanocrystals through hydrochloric acid hydrolysis catalyzed by inorganic chlorides under hydrothermal conditions. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 5 (6):4656-4664. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b03194>.
- Han J., Zhou C., Wu Y., Liu F. y Wu Q. (2013). Self-Assembling Behavior of Cellulose Nanoparticles during Freeze-Drying: Effect of Suspension Concentration, Particle Size, Crystal Structure, and Surface Charge. *Biomacromolecules.* 14:1529–1540. doi:[10.1021/bm4001734](https://doi.org/10.1021/bm4001734).
- Hossain, I., Zaman, H., y Rahman, T. (2018). Derivation of Nanocellulose from Native Rice Husk. *Chemical Engineering Research Bulletin.*, 20: 19-22. <https://doi.org/10.3329/ cerb.v20i1.36926>.
- Hernández Pérez, R., Salgado Delgado, R., Olarte Paredes, A., Salgado Delgado, A. M., García, E., Medrano, A., y Martínez, F. (2022). Comparing acid and enzymatic hydrolysis methods for cellulose nanocrystals (CNCs) obtention from agroindustrial rice husk waste. *Journal of Nanotechnology*, ID 5882113, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2022/5882113>.
- Hernández Pérez, R., Martínez Candia, F. R., Salgado Delgado, R., Olarte Paredes, A., Salgado Delgado, A. M. y García Hernández, E., (2023a). 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>.
- Hernández Pérez, R., Olarte Paredes, A., Salgado Delgado, R. y Salgado Delgado, A. M. (2023b). 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*, 103(19), 7571-7586. <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1972991>.
- Hernández Pérez R., Salgado Delgado S., Olarte Paredes A., Salgado Delgado A.M., Flores Abarca B. y Silva Astudillo O. (2023d). Combined Hydrolysis to Yield Increase of Cellulose and (CNCs), Starting From Agroindustrial Rice Husk Waste in Morelos, Mexico. *Journ of Water and Enviromental Nanotechnology.* (Aceptada).

- Kaur, M., Kumari, S., y Sharma P. (2018). Chemically modified nanocellulose from rice husk: synthesis and characterization. *Advances in Research.*, 13(3):1-11. <https://doi.org/10.9734/AIR/2018/38934>.
- Martínez, F. R. (2022). Obtención y caracterización de nanocelulosa a partir de cascarrilla de arroz (desecho de la industria arrocera) por el método bioquímico. (Tesis de maestría). Instituto Tecnológico de Zacatepec.
- Martínez-Jaime, O.A., Hernández-Hernández, R., Mendoza-Carrillo, J.M., Bucio-Villalobos, C.M., Salas-Araiza, M.D. y Orozco Gutiérrez, D.V. (2016). Efecto del cloruro de calcio y enzimas proteolíticas sobre la blandura de la carne de res. *Invest. y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1 (2): 506-511. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/7/88.pdf>.
- Martelli-Tosi, M., Torricillas, M., Martins, M., Assis, O. y Tapia-Blácido, D.R. (2016). Using Commercial Enzymes to Produce Cellulose Nanofibers from Soybean Straw. *Journal of Nanomaterials*, 2016, ID 8106814. <https://doi.org/10.1155/2016/8106814>.
- Michelin, M.; Gomes, D.G.; Romani, A.; Polizeli, M.d.L.T.M y Teixeira, J.A. (2020). Production Exploring the Enzymatic Route and Residues of Pulp and Paper Industry. Nanocellulose Production. *Molecules* 25, 3411. <https://doi.org/10.3390/molecules25153411>.
- Pérez-Higuera, M. V. (2013). Estudio de la producción de la casa por un aislado nativo de pleurotus ostreatus en cultivo sólido mediante el uso de cartón, cascara de café y cascarrilla de arroz bajo diversas concentraciones de cobre [Doctoral dissertation, Uniandes]. <https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/8f71a896-01bc-45f9-8168-840bb27c469e/content>
- Quino Favero, J., Bernal Portilla, N., y Yacono Llanos, J. (2008). Diseño de un proceso experimental para la producción de papaína liofilizada. *Ingeniería Industrial*, 0(26), 201-229. 1025-9929. <https://hdl.handle.net/20.500.12724/2440>.
- Rashid, S. y Dutta, H. (2020). Caracterización de nanocelulosa extraída de cáscara de arroz de grano corto, medio y largo. *Cultivos y Productos Industriales*, 154, 112627.
- Rodríguez-Almarza M. B. (2007). Determinación de la Composición Química y Propiedades Físicas y Químicas del Pulido de Arroz (*Oryza sativa* L.). [Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias]. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/far696d/sources/far696d.pdf>.
- Valverde A, Sarria B. y Monteagudo J.P, (2007). Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarrilla de arroz. *Scientia et Technica*, UTP, Colombia, 13 (37): 255-260. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84903743>.
- Zhang, K., Sun, P., Liu, H., Shang, S., Song, J. y Wang D. (2016). Extraction and comparison of carboxylated cellulose nanocrystals from bleached sugarcane bagasse pulp using two different oxidation methods. *Carbohydr Polym.* 15 (138):237-43. doi: [10.1016/j.carbpol.2015.11.038](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.038).
- Sullivan, E., Moon, R. y Kalaitzidou, K. (2015). Processing and Characterization of Cellulose Nanocrystals / Polylactic Acid Nanocomposite Films. *Materials*, 8 (12):1-11. <https://doi.org/10.3390/ma8125447>.