



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO DE POLÍMEROS NATURALES PARA LA PRODUCCIÓN DE
MATERIALES POROSOS Y SU APLICACIÓN COMO SOPORTES DE CRECIMIENTO DE
Gluconacetobacter xylinus”**

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

M. en B. Mariana Quintana Quirino

Directora de Tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa
Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros

Asesores:

Dr. Laurent David

Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, Francia.

Dr. Humberto Vázquez Torres

Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa
Departamento de Física, Área de Polímeros

Ciudad de México a 03 de julio de 2020

“El doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto 10 del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y de la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (SECTEI) Proyecto No. SECTEI/196/2019.

Ciudad de México a 03 de julio de 2020

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

"ESTUDIO DEL PROCESAMIENTO DE POLÍMEROS NATURALES PARA LA PRODUCCIÓN DE MATERIALES POROSOS Y SU APLICACIÓN COMO SOPORTES DE CRECIMIENTO DE *Gluconacetobacter xylinus*"

Que presenta:

M. en B. Mariana Quintana Quirino

Comité tutorial:

Directora de Tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros

Asesores:

Dr. Laurent David

Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, Francia.

Dr. Humberto Vázquez Torres

Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa, Departamento de Física, Área de Polímeros

H. Jurado:

Presidente: Dr. Miquel Gimeno Seco

Secretario: Dr. Humberto Vázquez Torres

Vocat: Dra. Diana Alonso Segura

Vocat: Dr. Juan Gabriel Viguera Ramírez

A la memoria de mi madre, María Inés Quirino, fallecida poco antes de concluir esta etapa; una mujer maravillosa y humilde. Gracias por educarme, motivarme y enseñarme a valorar las pequeñas cosas de esta vida, siempre te recordaré con amor.

Mariana Quintana

AGRADEZCO...

A la Universidad Autónoma Metropolitana por darme la oportunidad de pertenecer a su comunidad una vez más, por prestar las instalaciones, equipos y materiales para la realización del trabajo, y por los apoyos a la investigación.

A la Dra. Keiko Shirai, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por la atención, los conocimientos transmitidos, por guiarme en la preparación de esta etapa profesional, por el cariño y sobre todo por su apoyo incondicional en el momento más difícil de mi vida. Muchas gracias por las pláticas motivacionales acompañadas de café, la echaré mucho de menos, Dios la bendiga siempre.

Al Dr. Miquel Gimeno, por darme la oportunidad de realizar parte del trabajo experimental en su laboratorio (Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM), por su atención y apoyo en la interpretación de resultados, y su dedicación en la redacción del segundo artículo.

Al Dr. Gabriel Viguera, por su paciencia, dedicación y tiempo durante el doctorado. A su familia, por recibirme en su casa en tiempos de huelga, son maravillosas personas. Dios los bendiga siempre.

Al Dr. Humberto Vázquez, por su dedicación a lo largo de esta etapa, por apoyarme incondicionalmente, por los consejos y conocimientos transmitidos durante el doctorado.

A la Dra. Diana Alonso, gracias por su buena disposición, tiempo y sus comentarios.

A mis padres, en especial a mi mamá, quien en vida siempre me alentó a ser mejor, por apoyarme, escucharme y aconsejarme, por haberme ayudado a ser como soy, por no cortarme las alas, y por estar junto a mi en todo momento. Muchas gracias mamá, siempre serás lo mejor que pude haber tenido, mi mayor tesoro, te amo.

A mis hermanas Adriana, Patricia Guadalupe, Julieta y Norma Paola, por su cariño y por todos los buenos y malos momentos que hemos compartido juntas, por acompañarme en mis desvelos, por regalarme momentos de alegría en mis peores días y motivarme a alcanzar mis metas, sin ustedes nada sería igual. Gracias por existir.

A mi cuñado Osvaldo, una persona muy trabajadora y humilde, gracias por los momentos de alegría y apoyo incondicional.

A mi sobrina Fátima Ximena, por hacerme la tía más feliz del mundo, por llegar a mi vida cuando menos lo esperaba, por ser el motivo de mi alegría en estos días de tristeza. Gracias por tanta dicha y felicidad.

A Jesús Rojas, una gran persona, por compartir esta etapa conmigo, por la ayuda, consejos y momentos de risa que me hacían olvidar los días de estrés. Gracias por todo el apoyo brindado en el momento más difícil de mi vida, no me alcanzan las palabras para expresarte mi agradecimiento. Dios te bendiga siempre, y a tu familia también; y que tengas éxito en todo lo que te propongas.

A mis compañeros de laboratorio, que a su manera comparten las mismas preocupaciones que yo, por la ausencia de riñas y los momentos de alegría, por ayudarme y permitirme ayudarlos incondicionalmente. Gracias por todo, los quiero y admiro mucho.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	- 1 -
JUSTIFICACIÓN.....	- 3 -
OBJETIVOS.....	- 4 -
GENERAL	- 4 -
PARTICULARES	- 4 -
ETAPA I. FORMACIÓN DE CELULOSA BACTERIANA CON ESTRUCTURA GEOMÉTRICA DE PANAL EN CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO DE <i>Gluconacetobacter xylinus</i> UTILIZANDO ESPUMA DE POLIURETANO COMO SOPORTE.....	- 5 -
1. INTRODUCCIÓN.....	- 6 -
2. MATERIALES Y MÉTODOS	- 8 -
2.1 Materiales	- 8 -
2.2 Microorganismo y condiciones de cultivo.....	- 8 -
2.3 Medio de cultivo	- 8 -
2.4 Preparación y caracterización de la espuma de poliuretano.....	- 8 -
2.5 Condiciones del cultivo en estado sólido (SSC)	- 9 -
2.6 Purificación y caracterización de BC.....	- 10 -
2.7 Análisis microscópicos	- 11 -
2.8 Análisis Estadístico	- 11 -
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 13 -
3.1 PUF como soporte del crecimiento de <i>G. xylinus</i> para la producción de BC	- 13 -
3.2 Estructura química de la BC	- 18 -
3.3 Producción de BC empleando PUF-C como soporte inerte y 15% de inóculo inicial en SSC.....	- 20 -
3.4 Caracterización morfológica de la BC.....	- 23 -
4. CONCLUSIONES.....	- 27 -
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 28 -

ETAPA II. PRODUCCIÓN DE MATRICES POROSAS DE QUITINA EMPLEANDO DIÓXIDO DE CARBONO COMO DISOLVENTE NO TÓXICO MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y SU APLICACIÓN EN LA PROLIFERACIÓN DE OSTEÓBLASTOS DE PERIOSTIO HUMANO - 33 -

1. INTRODUCCIÓN.....	- 34 -
2. METODOLOGÍA.....	- 36 -
2.1 Elaboración de los hidrogeles	- 36 -
2.2 Producción de matrices porosas de quitina empleando dióxido de carbono en estado supercrítico	- 36 -
2.3 Caracterización de las matrices porosas.....	- 37 -
2.4 Evaluación de los andamios con osteoblastos humanos.....	- 38 -
2.5 Análisis Estadístico	- 40 -
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 41 -
3.1 Sorción del dióxido de carbono por los hidrogeles de quitina	- 41 -
3.2 Estructura química de las matrices porosas de quitina	44
3.3 Caracterización superficial	49
3.4 Cultivo celular y evaluación de las matrices de quitina en la proliferación de osteoblastos humanos	64
4. CONCLUSIONES	67
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

ETAPA III. PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EMPLEANDO MATRICES POROSAS DE QUITINA COMO SOPORTE EN CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO 72

1. INTRODUCCIÓN.....	73
2. MATERIALES Y MÉTODOS	74
2.1 Materiales	74
2.8 Análisis Estadístico	77
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
3.1 Producción de celulosa bacteriana empleando matrices de quitina obtenidas mediante CO ₂ en estado supercrítico.....	78
4. CONCLUSIONES	88

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
CONCLUSIÓN GENERAL.....	91
PERSPECTIVAS	92
TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS.....	93
ANEXOS	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografías de PUF-C y PUF-M (A-B). Capturas de pantalla de micrografías convertidas en imágenes binarias (C, D) y análisis de partículas de ImageJ (E, F). APS de tamaños PUF (G). Una letra diferente indica que hay diferencias significativas según la prueba de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).	- 13 -
Figura 2. Gráficos de superficie de respuesta para la producción de biomasa (A) y BC (B) con diferentes niveles de inóculo y tamaño de PUF a las 96 h en SSC de <i>G. xylinus</i> a 30 °C.	- 16 -
Figura 3. Consumo de glucosa (A) y producción de ácido glucónico (B) durante la producción de BC de <i>G. xylinus</i> con PUF- C y M a las 96 h del SSC a 30 °C.	- 18 -
Figura 4. Celulosa vegetal y BC producida por <i>G. xylinus</i> empleando PUF-C y PUF-M con 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo a las 96 h: espectros de infrarrojo (A); patrones de XRD (B).	- 19 -
Figura 5. Cultivo en estado sólido de <i>G. xylinus</i> utilizando PUF-C como soporte inerte y 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo: biomasa (A); consumo de glucosa (B); BC (C); pH (D); ácido glucónico (E). Datos experimentales ajustados al modelo de Gompertz con $R^2 > 0.97$	- 22 -
Figura 6. Adherencia de la BC en diferentes zonas de soporte (flechas punteadas) durante la producción en SSC con 15% de inóculo inicial en PUF-C (flechas negras) a las 96 h.	- 24 -
Figura 7. Imágenes de BC producida a las 96 h en SSC y 15% de inoculo inicial en PUF-C teñido con CW observadas por microscopia de fluorescencia.	- 25 -
Figura 8. Espectros de ^{13}C CP / MAS NMR de BC producidos por <i>G. xylinus</i> con 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo inicial empleando PUF-C como soporte en SSC a las 96 h (A); Medio de cultivo Hestrin & Schramm (B).	- 26 -
Figura 9. Curva representativa de desorción de S_A y S_M (A y B) y pérdida de masa debida a la desorción del CO_2 en ambos materiales (C y D) a 353 K y 175 bar.	- 42 -
Figura 10. Espectros de infrarrojo de quitina, S_A y S_M después del tratamiento con ScCO_2	45
Figura 11. Patrón de difracción de quitina pura.	46
Figura 12. Patrones de difracción de rayos X de quitina y de las matrices porosas S_A y S_M	47
Figura 13. Patrones de difracción de rayos X de las matrices S_M obtenidas a diferentes condiciones de temperatura y presión.	48
Figura 14. Micrografías de las matrices de quitina obtenidas a partir de hidrogeles sumergidos en MeOH y agua después del proceso con scCO_2 . S_A (A: superficial, C: transversal); S_M (B: superficial, D: transversal).	50
Figura 15. Diagrama de caja-bigotes de los poros formados en los materiales S_A y S_M después del proceso de espumado con ScCO_2 . Las letras significan que son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) mediante la prueba de Tukey- Kramer (10 mediciones de cada material).	51

Figura 16. Diámetro promedio (A) y distribución de los poros (B) formados en las matrices de quitina procesados con agua y metanol. Las letras diferentes significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).	52
Figura 17. Micrografías de las matrices porosas de quitina después de $scCO_2$ a diferentes temperaturas. Superficial: (A) 298 K, (C) 313 K, (E) 353 K; transversal: (B) 298 K, (D) 313 K, (F) 353 K.	54
Figura 18. Diámetro promedio (A) y distribución de los poros (B) formados en las matrices porosas procesadas a diferentes temperaturas. Las letras diferentes significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).	55
Figura 19. Micrografías de las matrices de quitina obtenidas a partir de hidrogeles M después de $ScCO_2$ a diferentes presiones. 175 bar (A: superficial, B: transversal); 200 bar (C: superficial, D: transversal); 250 bar (E: superficial, F: transversal); 300 bar (G: superficial, H: transversal)	57
Figura 20. Diámetro promedio (A) y distribución de los poros (B) formados en las matrices procesadas a diferentes presiones. Las letras diferentes significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).	59
Figura 21. Determinación del ángulo de contacto de las matrices porosas de quitina obtenidas después del proceso de espumado con $ScCO_2$ empleando agua y MeOH como disolventes.	60
Figura 22. Perfil de hinchamiento (A) y de erosión (B) de las matrices porosas obtenidos empleando agua y metanol como disolventes. Las letras diferentes significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).	62
Figura 23. Curvas de esfuerzo-deformación de las matrices porosas de quitina obtenidas al emplear $scCO_2$ con agua y MeOH como disolventes a 353 K y 175 bar.	64
Figura 24. Proliferación celular de osteoblastos humanos incubados en matrices porosas de quitina producidos con $scCO_2$ empleando agua y MeOH como disolventes. Las letras diferentes en el histograma significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).	65
Figura 25. Micrografías de SEM de los osteoblastos humanos sembrados (flechas blancas) empleando matrices de quitina como andamios después de 21 días de cultivo. S_A (A) y S_M (B).	66
Figura 26. Producción de biomasa (A) y celulosa bacteriana (B) de <i>G. xylinus</i> empleando matrices de quitina en cultivo y 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo inicial en estado sólido a las 144 h. Las letras diferentes en el histograma significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).	78
Figura 27. Producción de biomasa (A) y celulosa bacteriana (B) de <i>G. xylinus</i> empleando las matrices porosas S_M en cultivo en estado sólido y 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo inicial a las 144 h. Los datos experimentales se ajustaron empleando el modelo de Gompertz con un $R^2 > 0.96$ para la biomasa y 0.94 para la celulosa bacteriana.	80
Figura 28. Imágenes de microscopia confocal de la viabilidad celular de <i>G. xylinus</i> empleando las matrices porosas S_M en cultivo en estado sólido y 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo inicial a las 144 h.	83

Figura 29. Espectros de infrarrojo de estándar de celulosa vegetal y celulosa bacteriana de <i>G. xylinus</i> empleando matrices porosas S_M de quitina con inóculo inicial del 15% ($v \cdot v^{-1}$).	84
Figura 30. Patrón de difracción de rayos X de BC producida en cultivo en estado sólido de <i>G. xylinus</i> empleando matrices porosas S_M de quitina con inóculo inicial del 15% ($v \cdot v^{-1}$).	85
Figura 31. Espectro de ^{13}C CP / MAS RMN de celulosa producida por <i>G. xylinus</i> en cultivo en estado sólido con 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo inicial empleando matrices porosas S_M de quitina.	86
Figura 32. Micrografías de SEM de la producción de celulosa bacteriana de <i>G. xylinus</i> en SSC con 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo inicial empleando matrices porosas SM de quitina obtenidas mediante $scCO_2$ a las 96 h. Soporte S_M (A), crecimiento bacteriano (B), morfología de <i>G. xylinus</i> (C), secreción de fibrillas de celulosa bacteriana (flechas punteadas) (D).	87
Figura 33. Curva patrón para el análisis de glucosa por el método de DNS.	105
Figura 34. Determinación de pH variando el nivel de inóculo de <i>G. xylinus</i> para la producción de BC empleando dos tamaños de PUF de 0.125 cm ³ (PUF-C) y 0.075 cm ³ (PUF-M) a las 96 h de SSC.	106
Figura 35. Duplicación de imagen original.	107
Figura 36. Generación de patrón con medida conocida(A) y establecimiento de la escala con base en el patrón generado (B).	108
Figura 37. Conversión de imágenes de SEM a imágenes binarias de 8 bits.	108
Figura 38. Selección de parámetros (A), análisis de imágenes binarias (B) e informe detallado de los resultados (C).	109
Figura 39. Curvas representativas de desorción (A) y sorción de CO_2 (B) de las matrices S_M procesadas a diferentes temperaturas después del proceso de espumado.	110
Figura 40. Curvas representativas de desorción (A) y sorción de CO_2 (B) de las matrices S_M procesadas a diferentes presiones después del proceso de espumado.	111
Figura 41. Espectros de infrarrojo de quitina y S_M a diferentes temperaturas después del tratamiento con $scCO_2$	112
Figura 42. Espectros de infrarrojo de quitina y S_M a diferentes presiones después del tratamiento con $scCO_2$	112
Figura 43. Determinación del ángulo de contacto de las matrices porosas de quitina obtenidos después del proceso de espumado con $scCO_2$ a diferentes temperaturas (A) y presiones (B).	113
Figura 44. Perfil de hinchamiento (A) y de erosión (B) de las matrices porosas S_M después del proceso de espumado a diferentes temperaturas.	114

Figura 45. Perfil de hinchamiento (A) y de erosión (B) de las matrices porosas S_M después del proceso de espumado a diferentes presiones.....	114
Figura 46. Curvas de esfuerzo- deformación de las matrices S_M de quitina procesadas con $scCO_2$ empleando diferentes temperaturas y 175 bar.....	115
Figura 47. Curvas de esfuerzo- deformación de las matrices de quitina procesadas con $scCO_2$ empleando diferentes presiones y 353 K.	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modelos de regresión múltiple para la predicción de la producción de biomasa y BC con varios niveles de inóculo (% v·v ⁻¹) y diferentes tamaños de PUF.....	- 15 -
Tabla 2. Características físicas y químicas evaluadas en las matrices de quitina S _A y S _M después del espumado con scCO ₂ a 353 K y 175 bar.	43
Tabla 3. CO ₂ absorbido en las matrices S _M a diferentes temperaturas y presiones durante el proceso de espumado.....	43
Tabla 4. Determinaciones de ángulo de contacto de las matrices S _M de quitina obtenidas después del proceso de espumado con scCO ₂	61
Tabla 5. Producción de biomasa y celulosa en cultivo en estado sólido empleando diferentes matrices porosas con <i>G. xylinus</i> a las 96 h.....	79
Tabla 6. Composición del reactivo de ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS).....	105

ABREVIATURAS

BC	Celulosa Bacteriana
PUF	Espuma de poliuretano
BM	Biomasa
HS	Hestrin-Schramm
rpm	Revoluciones por minuto
vvm	Volumen de aire por volumen de medio por minuto
nm	Nanómetro
DNS	Acido 3,5-dinitrosalicílico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
XRD	Difracción de rayos X
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo
min	Minuto
h	Hora
YGC	Extracto de levadura, glucosa y carbonato de calcio.
PUF	Espuma de poliuretano
CO ₂	Dióxido de carbono
K	Kelvin
SmC	Cultivo sumergido
SSC	Cultivo en estado sólido
UV	Ultravioleta
PUF-C	Espuma de poliuretano cortada
PUF-M	Espuma de poliuretano molida
cm	Centímetro
°C	Celsius
WSC	Capacidad de almacenamiento de agua
SEM	Microscopía electrónica de barrido
a _w	Actividad de agua
RMN	Resonancia magnética nuclear
XRD	Difracción de rayos X
CW	Blanco de calcofluor
P _{max}	Producto máximo (estimado por el modelo de Gompertz)
S _M	Matriz porosa de quitina sumergido en metanol
S _A	Matriz porosa de quitina sumergido en agua
scCO ₂	Dióxido de carbono en estado supercrítico
I _{CR}	Índice de cristalinidad
D _{ap}	Tamaño aparente de cristal
DA	Grado de acetilación
µm	Micrómetro

g	Gramos
L	Litro
mL	Mililitro
θ	Ángulo de contacto
kPa	Kilopascal
MPa	Megapascal
DMEM	Medio Dulbecco modificado
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
PBS	Buffer de fosfatos
mm	Milímetro
ppm	Partes por millón
H ₂ O _{di}	Agua destilada
MeOH	Metanol

RESUMEN

La celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza, el cual puede ser sintetizado por bacterias del género *Gluconacetobacter spp.* como parte de su proceso metabólico para llegar a las superficies donde el oxígeno es abundante facilitando así su supervivencia. *Gluconacetobacter xylinus* es un microorganismo ampliamente estudiado para la producción de celulosa bacteriana (BC) en cultivo sumergido debido a los altos rendimientos. En virtud de lo anterior, en esta tesis de doctorado se estudió la producción de celulosa bacteriana por cultivo en estado sólido empleando soportes porosos con la finalidad de mejorar los rendimientos reportados en el convencional cultivo sumergido. En la primera fase de la experimentación, se evaluó la influencia del nivel de inóculo inicial y el tamaño de la espuma de poliuretano (PUF), como sistema de andamiaje y soporte en el crecimiento y la formación de BC de *Gluconacetobacter xylinus*. El mayor rendimiento de BC fue de $2.46 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ con espuma cortada y 15% de inóculo a las 96 h. Los análisis de caracterización evidenciaron una estructura cristalina tipo I con 73% de cristalinidad para la celulosa microbiana producida y una estructura química con los grupos funcionales característicos de este biopolímero.

En la segunda fase, mediante el proceso de espumado físico con fluidos supercríticos se produjeron matrices porosas a partir de hidrogeles de quitina. En ellos, se evaluó la influencia de parámetros como el tipo de disolvente, la presión y la temperatura en la morfología, porosidad, diámetro de poro, distribución del diámetro de poro e hinchamiento durante la formación de dichos materiales. Las matrices porosas que presentaron las mejores características morfológicas fueron las obtenidas con metanol como disolvente del CO_2 , a 353 K y 175 bar.

Finalmente, en la tercera fase, al evaluar el efecto de dos tipos de matrices porosas de quitina en la proliferación de osteoblastos humanos se observaron diferencias significativas en la viabilidad al llegar a los 21 días de cultivo. Por lo que cabe destacar que los materiales porosos de quitina producidos en el presente estudio exhibieron características potenciales para ser aplicados en el campo de la ingeniería de tejidos. Por otro lado, la porosidad de las matrices de quitina mostró ser importante en la producción de BC empleándolas como sistema de andamiaje en cultivo en estado sólido ya que se logró producir hasta $3.34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de celulosa a las 96 h, lo cual es 1.4 veces mayor a lo que se alcanzó empleando espuma de poliuretano en cubos.

ABSTRACT

Cellulose is an abundant polysaccharide in nature, which can be synthesized by bacteria of the genus *Gluconacetobacter spp.* as part of its metabolic process to reach surfaces where oxygen is abundant thus facilitating its survival. *Gluconacetobacter xylinus* is a microorganism widely studied to produce bacterial cellulose (BC) in submerged culture due to high yields. Therefore, in this doctoral thesis, the production of bacterial cellulose in solid-state culture was studied using porous supports to improve yields compared to those reported in conventional submerged cultures. The first stage of the experimentation evaluated the influence of the initial inoculum level and size of polyurethane foam (PUF) as a scaffold system for growth and formation of BC by *Gluconacetobacter xylinus*. The highest BC yield was $2.46 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ with cut foam and 15% inoculum at 96 h. Characterization of BC showed a type I crystalline structure with 73% crystallinity for microbial cellulose produced and a chemical structure with the characteristic functional groups for this biopolymer.

During second phase, porous matrices from chitin hydrogels were produced by physical foaming process with supercritical fluids. Here, the influence of parameters such as solvent type, pressure and temperature in morphology, porosity, pore diameter, pore diameter distribution, and swelling during porous formation materials was evaluated. Porous matrices with best morphological characteristics were those obtained where methanol was used as a co-solvent for scCO_2 at 353 K and 175 bar.

Finally, in the third section, on the evaluation of the effect of two types of chitin porous matrices in the proliferation of human osteoblasts, significant difference in viability was observed in 21 days of culture. Therefore, it should be noted that chitin porous materials produced in the present study exhibited characteristics for tissue engineering. On the other hand, porosity of chitin matrices was important to produce bacterial cellulose as a scaffold system in solid-state culture producing up to $3.34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of cellulose at 96 h, which is 1.4 times greater than that with cut polyurethane foam.

JUSTIFICACIÓN

La producción de celulosa a partir de bacterias ha sido ampliamente estudiada en cultivo sumergido (SmC). Sin embargo, se ha observado que la transferencia de O₂ es limitada en este tipo de sistemas. En estudios reportados para la producción de otros metabolitos, se ha demostrado que el cultivo en estado sólido (SSC) tiene ventajas respecto al SmC, tales como una mejor transferencia y mayor disponibilidad de O₂ (Marin-Cervantes *et al.*, 2008; Singhanian *et al.*, 2009; Zhang-Chen, 2010; Augusto-Ferrari *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2013). Este hecho puede ser importante para bacterias aerobias estrictas del género *Gluconacetobacter spp* crezcan mejor y sintetizen más celulosa.

La quitina, al igual que la celulosa, es un biopolímero de mayor abundancia en la naturaleza, debido a las diversas propiedades que posee, tiene un amplio campo de aplicaciones tales como el área biomédica (Pillai *et al.*, 2009). Tanto la quitina como la celulosa son empleados como hidrogeles, ya sea de manera individual o combinados, que, bajo la forma física de estructuras porosas, pueden ser usados en ingeniería de tejidos debido a las características que este tipo de materiales presentan como la alta porosidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, y tamaño de poro, funcionando como andamio para células o acarreadores de moléculas de interés (Shen *et al.*, 2016).

Por lo tanto, debido a que no hay reportes sobre la producción de celulosa bacteriana en SSC y su caracterización estructural, en el presente trabajo se estudió la producción de dicho biopolímero empleando dos tipos de soportes en cultivo en estado sólido; espuma de poliuretano y matrices porosas de quitina; estas últimas obtenidas mediante fluidos supercríticos usando CO₂. Adicionalmente, se evaluó el efecto de dos tipos de matrices porosas de quitina en la proliferación celular de osteoblastos obtenidos del periostio humano.

OBJETIVOS

GENERAL

Estudiar la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* en cultivo en estado sólido, SSC, empleando soportes porosos y su caracterización.

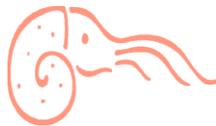
PARTICULARES

1. Establecer las condiciones de producción de celulosa en cultivo en estado sólido empleando espuma de poliuretano como sistema de andamiaje.
2. Establecer las condiciones de producción de las matrices porosas de quitina empleando scCO₂.
3. Caracterizar física y químicamente las matrices porosas producidas.
4. Evaluar la producción de celulosa empleando las matrices porosas de quitina como sistema de andamiaje.
5. Caracterizar física y químicamente los biopolímeros producidos.
6. Evaluar las matrices porosas de quitina en la proliferación celular de osteoblastos.

ETAPA I

FORMACIÓN DE CELULOSA BACTERIANA CON ESTRUCTURA GEOMÉTRICA DE PANAL EN CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO DE *Gluconacetobacter xylinus* UTILIZANDO ESPUMA DE POLIURETANO COMO SOPORTE

(Quintana- Quirino M., Morales-Osorio C., Viguera Ramírez G., Vázquez-Torres H., Shirai K. (2019). Bacterial cellulose grows with a honeycomb geometry in a solid-state culture of *Gluconacetobacter xylinus* using polyurethane foam support, Process Biochemistry, 82,1-9.



1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias de los géneros *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella* y *Sarcina* producen celulosa bacteriana (BC) como parte de su proceso metabólico (Uzyol *et al.*, 2016) para alcanzar superficies ricas en oxígeno. La bacteria sintetiza la celulosa como un metabolito primario que utiliza como protección contra la radiación UV y además retiene la humedad (Castro *et al.*, 2011). La BC tiene la misma estructura química que la celulosa vegetal; sin embargo, la BC está libre de lignina y hemicelulosa, por lo que presenta un mayor grado de pureza que implica procesos de purificación simples (Machado *et al.*, 2016). Entre los reportes que existen, *G. xylinus* es una bacteria aerobia estricta, Gram- negativa, que produce celulosa extracelular en medios de cultivo entre 28 y 30 °C y a un pH que varía de 3 a 7 utilizando una amplia variedad de fuentes de carbono, como glucosa, fructosa, sacarosa y manitol (Krystynowicz *et al.*, 2002). La producción de BC ha sido mejor en cultivos sumergidos (SmC) de *Gluconacetobacter spp.* variando las fuentes de carbono y nitrógeno (Coban y Biyik, 2011). Además, hay varios enfoques de ingeniería cuyo objetivo es aumentar los rendimientos del biopolímero (Machado *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2018; Islam *et al.*, 2017). Sin embargo, la principal limitación en SmC para la producción de BC es la limitación en la transferencia de oxígeno a la célula debido a su baja difusión en un medio acuoso (Mohite *et al.*, 2014; Kose *et al.*, 2013; Bilgi *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2015).

Alternativamente, el cultivo en estado sólido (SSC) tiene la ventaja de una mayor transferencia de oxígeno en comparación con el SmC (Zhang *et al.*, 2010; Augusto-Ferrari *et al.*, 2013). El SSC emplea sustratos sólidos o soportes impregnados con los nutrientes para mejorar el crecimiento de los microorganismos, lo que también facilita la recuperación de productos concentrados (Singhania *et al.*, 2009). Los sustratos en SSC generalmente son subproductos agroindustriales que tienen algunas desventajas, como la baja porosidad con estructuras internas inadecuadas que limitan la aireación y ofrecen una eliminación de calor deficiente. Por lo tanto, los soportes inertes como la espuma de poliuretano (PUF), en la que se absorben los nutrientes disueltos en el agua,

muestran una alta porosidad, baja densidad y excelentes propiedades mecánicas que evitan la compactación y, además, permite la cuantificación de la biomasa por métodos directos (Augusto- Ferrari *et al.*, 2013; Marín- Cervantes *et al.*, 2008).

Sin embargo, a pesar de estas ventajas, no hay informes sobre la producción de BC en SSC. Por lo tanto, hasta donde sabemos somos pioneros en describir las ventajas para la producción por SSC utilizando cultivos de *G. xylinus*, estableciendo así el mejor nivel de inóculo y el tamaño de PUF. Los resultados también demuestran que la BC exhibe una geometría de panal debido a su producción a lo largo del soporte de PUF.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

J.T. Baker (Ecatepec, Estado de México) suministró dextrosa anhidra, sulfito de sodio anhidro y ácido cítrico monohidrato. BD Bioxon (Cuautitlán Izcalli, México) proporcionó extracto de levadura y agar bacteriológico. La peptona de caseína fue suministrada por Dibico S.A. de C.V. (Cuautitlán Izcalli, México). Laboratorios Laitz (Ciudad de México, México) proporcionó el carbonato de calcio. El fosfato de sodio dibásico anhidro, el hidróxido de sodio, el ácido clorhídrico, el hidrocloreuro de hidroxilamina, el ácido fosfórico, el cloruro férrico y el carbonato de calcio se compraron en Reactivos Química Meyer (Ciudad de México, México). Se adquirió ácido glucónico (solución al 53% en agua), ácido 3,5-dinitrosalicílico y el fluoróforo blanco de calcoflúor con Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). El fenol se compró en Fermont (Nuevo León, México). La celulosa vegetal fue un obsequio de Derivados Macroquímicos (Ecatepec Morelos, México). Todos los reactivos empleados fueron grado analítico.

2.2 Microorganismo y condiciones de cultivo

Gluconacetobacter xylinus ATCC 700187 fue resembrado en agar YGC #459, se incubó a 30 °C durante 48 h y se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso. La composición del medio YGC #459: glucosa (50 g·L⁻¹), extracto de levadura (5 g·L⁻¹), carbonato de calcio (12.5 g·L⁻¹) y agar bacteriológico (15 g·L⁻¹).

2.3 Medio de cultivo

Se trabajó con el medio de cultivo reportado por Hestrin y Schramm (HS; 1954) el cual está compuesto por glucosa (20 g·L⁻¹), extracto de levadura (5 g·L⁻¹), fosfato de sodio dibásico anhidro (2.7 g·L⁻¹) y ácido cítrico monohidratado (1.15 g·L⁻¹).

2.4 Preparación y caracterización de la espuma de poliuretano

La PUF fue picada (PUF-C) o cortada en cubos (PUF-M). La PUF-M fue preparada usando un triturador (Scienceware, EUA) hasta obtener tamaños de partícula entre 0.30 cm y 0.50 cm (tamaño promedio de partícula de 0.08 cm³). El soporte de PUF-C

tenía un tamaño de 0.50 cm x 0.50 cm x 0.50 cm (0.125 cm³) (Marin- Cervantes *et al.*, 2008). Todas las espumas se lavaron con H₂Odi y se secaron a peso constante a 70 °C durante 24 h y luego se enfriaron en un desecador para calcular la capacidad de almacenamiento de agua (WSC) siguiendo la ecuación 1. Cada determinación se realizó por triplicado.

$$WSC = \left(\frac{m_w - m_d}{m_d} \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde, m_w es la masa de la PUF húmeda; m_d es la masa de la PUF seca. Cada volumen de espuma se calculó considerando la altura y el diámetro. La densidad de PUF se calculó dividiendo la masa por el volumen.

2.4.1 Determinación del tamaño medio de poro (APS) de PUF

El APS fue obtenido por SEM de PUF-C y PUF-M de diferentes regiones y ampliaciones utilizando el software ImageJ versión 1.51j8 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Las imágenes SEM se convirtieron en imágenes en blanco y negro de 8 bits, en las que las áreas negras representan los poros y las áreas blancas en la superficie sólida. Las imágenes binarias se analizaron como partículas empleando software de análisis de imágenes (ImageJ) (AlMarzooqi *et al.*, 2017) (Anexo 3).

2.5 Condiciones del cultivo en estado sólido (SSC)

El cultivo y el inóculo se absorbieron en muestras de PUF-M y C y el SSC se llevó a cabo en matraces de 250 mL con tapones de algodón a un pH inicial de 6 y a 30 °C, durante cuatro días por duplicado para cada condición. La proporción de PUF y medio de cultivo fue de 0.09 con 90% de contenido de agua y $a_w = 0.99 \pm 0.01$ y 1.00 ± 0.003 para PUF-M y C, respectivamente, según lo determinado en un medidor de actividad de agua (AquaLab CX-2, EUA) a 20 °C. Los niveles de inóculo fueron 0.5, 5, 10, 15 a 25% (v·v⁻¹). El cultivo de cada matraz fue colectado; la PUF se mezcló con su mismo peso de agua y se presurizó a 1,000 psi. Luego, se filtró y se almacenó a -20 °C para su posterior uso. Las determinaciones de peso seco midieron el crecimiento bacteriano. Las determinaciones de pH se obtuvieron con un medidor de pH (Hanna Instruments pH 216, Microprocesador pH-metro, Italia). El método de azúcares

reductores (DNS) se empleó para determinar la concentración de glucosa en los filtrados (Anexo 1); mientras que, el método del hidroxamato permitió realizar la determinación del ácido glucónico (Lien, 1959).

2.5.1 Producción de BC empleando PUF-C y 15% (v·v⁻¹) en cultivo en estado sólido

El medio de cultivo y el inóculo fueron absorbidos en PUF- C, se colocaron en matraces de 250 mL a un pH inicial de 6.0. El cultivo se llevó a cabo a 30 °C y se realizó muestreo cada 4 h hasta las 24 h, y; posteriormente, cada 24 h hasta las 96 h. La biomasa, celulosa, concentración de azúcares y pH de las muestras fueron determinadas como se describe en la sección 2.5.

2.6 Purificación y caracterización de BC

La BC de los filtrados se purificó después del tratamiento con solución de NaOH 1% (w·v⁻¹) a 80 °C por 2 h. Luego, la BC se neutralizó en solución de ácido acético al 5% (v·v⁻¹) durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 g a 4 °C durante 15 min, se lavó con H₂Odi a pH 7 y se secó a 50 °C (Akerholm *et al.*, 2004). Se determinó la presencia de grupos funcionales mediante espectroscopía de infrarrojo de reflectancia total atenuada mediante un espectrómetro Perkin Elmer 100 (Reino Unido) a 24 °C y 30% de humedad relativa entre 4,000-650 cm⁻¹ de rango espectral y 4 cm⁻¹ de resolución con 32 escaneos. Antes del análisis, las muestras se secaron durante 3 h a 50 °C y se homogeneizó el tamaño de partícula (120 µm). Los patrones de difracción de rayos X se adquirieron en el rango $5^{\circ} \leq 2\theta \leq 50^{\circ}$ con un difractorómetro Bruker D8 Advance utilizando radiación Cu K α ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) y una velocidad del goniómetro de 0.5° (2 θ) min⁻¹. El porcentaje de cristalinidad se calculó dividiendo la diferencia de las intensidades de la difracción de las fases amorfa y cristalina; entre la intensidad de la difracción de la fase cristalina multiplicado por 100. El espectro de resonancia magnética nuclear (CP / MAS NMR) de polarización cruzada ¹³C y ángulo mágico giratorio de BC se adquirió usando un espectrómetro (Avance II 300 Bruker BioSpin GmbH, Alemania) con un detector de banda ancha (BB-CPMAS) usando una frecuencia resonante para ¹³C de 75 MHz. Se utilizó un rotor de ZrO (óxido de circonio) de 4 mm de diámetro externo. El pulso de contacto fue de 1-5 ms (milisegundos), con

una adquisición de 24-8 ms y un tiempo de espera entre repeticiones de 6 s. El espectro de BC se obtuvo con 4288 exploraciones, y un tiempo total de 7-14 h.

2.7 Análisis microscópicos

Las muestras obtenidas del SSC (7 mg) se suspendieron en 3 mL de buffer de fosfatos (pH 7.2) con 30 μ L de blanco de calcoflúor (CW), y se agitó durante 20 s. Después de 2 h, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, el pellet se observó en un microscopio con luz fluorescente (Axiostar plus Carl Zeiss, Alemania) y se analizó con el software ImageJ (Gallardo *et al.*, 2018). Las muestras secas obtenidas de cultivo en estado sólido se fijaron con una cinta adhesiva de carbono, se trataron con grafito coloidal y se dejaron secar por 24 h a 25 °C. Finalmente, se cubrieron con oro antes de la visualización en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 LV, Tokio, Japón).

2.8 Análisis Estadístico

Se realizó un diseño aleatorio por cuadruplicado para experimentos con diferentes niveles de inóculo y tamaños de PUF en SSC de *G. xylinus*. Con el programa NCSS se realizó el análisis de varianza con BC y biomasa como variables de respuesta. La prueba de comparación de medias múltiples de Tukey Kramer comparó las medias ($P \leq 0.05$). Se aplicó el análisis de regresión múltiple para evaluar el efecto del nivel de inóculo y el tamaño de PUF como variables independientes sobre la variable dependiente biomasa y BC. Las variables se codificaron de acuerdo con la ecuación 2.

$$X_i = \frac{x_i - \left[\frac{(x_{i \max} + x_{i \min})}{2} \right]}{\frac{(x_{i \max} + x_{i \min})}{2}} \quad (2)$$

Donde X_i es la variable codificada, x_i es el valor actual; $x_{i \max}$ y $x_{i \min}$ son los valores máximos y mínimos, respectivamente. Los datos experimentales se ajustaron mediante una función polinomial de segundo orden aplicando análisis de regresión múltiple y usando el programa NCSS (ecuación 3).

(3)

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^{k=2} \beta_{ii} X_i^2$$

Donde y es la respuesta predicha (BC o biomasa); β_0 , β_i , β_j , β_{ii} , y β_{ij} son los coeficientes de regresión del modelo para el efecto de la intercepción, lineal, cuadrática y la interacción, respectivamente y X_i , X_j son las variables independientes codificadas.

La determinación del nivel de inóculo con los tamaños de PUF se realizó mediante optimización numérica utilizando el programa Design-Expert (Stat-Ease versión 11, EUA) siguiendo dos criterios; maximizando BC y biomasa, con la mayor importancia en cada caso (Flores- Albino *et al.*, 2012).

El modelo de Gompertz (Ecuación 3) se empleó para el ajuste de los datos experimentales de consumo de glucosa, biomasa y concentración de celulosa (P)

$$P = P_{\max} \exp\left(-b \exp^{-(\mu t)}\right) \quad (3)$$

donde P_{\max} es la producción máxima de biomasa o celulosa o el consumo de glucosa, b es un parámetro no biológico relacionado con la condición inicial del cultivo, μ es la tasa de producción o consumo, y t es el tiempo de cultivo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PUF como soporte del crecimiento de *G. xylinus* para la producción de BC

El PUF inicial presentó una densidad promedio de $5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ con una estructura celular pentagonal como en PUF-C, mientras que la PUF-M mostró formas irregulares debido a la picadura efectuada (Fig. 1).

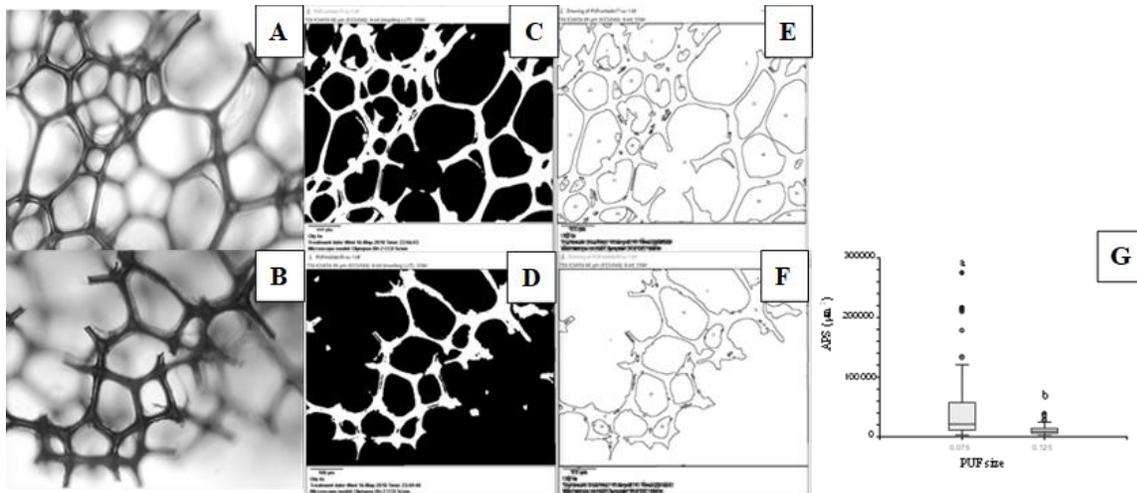


Figura 1. Micrografías de PUF-C y PUF-M (A-B). Capturas de pantalla de micrografías convertidas en imágenes binarias (C, D) y análisis de partículas de ImageJ (E, F). APS de tamaños PUF (G). Una letra diferente indica que hay diferencias significativas según la prueba de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

La destrucción de la estructura en PUF-M redujo significativamente su capacidad de absorción de agua alcanzando una absorción máxima de $19.50 \text{ mL H}_2\text{O}\cdot\text{g PUF}^{-1}$, mientras que, PUF-C absorbió $21.60 \text{ mL H}_2\text{O}\cdot\text{g PUF}^{-1}$. También hubo una disminución significativa en la porosidad de PUF-M ($65 \pm 0.03\%$) en comparación con la de PUF-C ($72 \pm 0.01\%$), lo que podría afectar la absorción de los medios de cultivo. Sin embargo, la picadura efectuada mejoró el área intersticial promedio como se esperaba ($3.96 \times 10^4 \pm 2.26 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) ya que fue casi 4 veces mayor que la medida para PUF-C ($1.07 \times 10^4 \pm 5.03 \times 10^2 \mu\text{m}^2$). No obstante, un trabajo previo sobre la producción de quitinasas por *Lecanicillium lecanii* en SSC utilizando PUF demostró que el promedio del área intersticial aumentó porque la picadura alteró la capilaridad debido a la reducción de la porosidad (Marin- Cervantes *et al.*, 2008).

En otros reportes, también se ha caracterizado la estructura del PUF en SSC, y los autores explicaron sus altas producciones por las altas porosidades de la PUF. Con base en lo anterior, Augusto-Ferrari *et al.* (2013) reportaron la producción de ácido hialurónico utilizando cilindros de PUF en un reactor de lecho empacado con un área superficial de $1.40 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ y una densidad de $0.02 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. En este estudio, la estructura de PUF mejoró significativamente el crecimiento bacteriano y la producción de metabolitos. Esto concuerda con Zhang y Chen (2010) quienes, en su estudio reportaron la producción de xantano por *Xanthomonas campestris* usando PUF en cubos (0.13 , 1 y 3.38 cm^3) con un diámetro de poro de $700 \text{ }\mu\text{m}$ y un área superficial específica de $4.50 \times 10^3 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ en un biorreactor con pulsos de aire. Del mismo modo, los autores afirmaron que la alta porosidad y la geometría cúbica de la PUF fue un factor crucial para lograr altos rendimientos del metabolito objetivo, además de una transferencia de oxígeno adecuada.

La selección del mejor nivel de inóculo es una estrategia experimental para aumentar la productividad de BC favoreciendo el crecimiento microbiano, generalmente, medido directamente a partir de biomasa, utilizando sustratos insolubles. Sin embargo, en SSC, este enfoque a menudo es desafiante. Alternativamente, la determinación gravimétrica a partir de soportes inertes como la PUF proporciona datos precisos fácilmente. Por este método, la producción de biomasa más alta fue a las 96 h con PUF-C, un nivel de inóculo del 15% y una concentración de $6.94 \pm 0.41 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Para PUF-M con un inóculo inicial del 10%, la producción más alta requirió hasta $5.70 \pm 0.38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Cabe destacar que la PUF-M mostró la formación de aglomerados que impidieron una difusión adecuada. Por lo tanto, la concentración de biomasa obtenida con SSC y PUF-C fue 1.21 veces mayor que PUF-M. En este sentido, la transferencia de oxígeno podría explicar esta mejora del crecimiento bacteriano con PUF-C.

Con el ajuste en el análisis de regresión múltiple se evaluó el modelo de coeficientes basado en los datos experimentales de biomasa y BC. La Tabla 1 muestra los coeficientes estimados por el modelo cuadrático y los niveles de significancia que explican mejor los datos experimentales. Sin embargo, los análisis arrojaron un significado estadístico para todos los niveles. Por otro lado, los modelos estimados

predijeron la producción de biomasa y BC al variar el nivel de inóculo de *G. xylinus* y el tamaño de PUF (Tabla 1) para determinar los valores máximos.

Tabla 1. Modelos de regresión múltiple para la predicción de la producción de biomasa y BC con varios niveles de inóculo (% v·v⁻¹) y diferentes tamaños de PUF.

MODELO	Biomasa		BC	
	Coefficiente de regresión	Nivel de significancia	Coefficiente de regresión	Nivel de significancia
Constantes	6.05±0.12	0.000	1.83± 0.06	0.000
Inóculo	1.11±0.11	0.000	0.49±0.06	0.000
PUF _{Tamaño}	0.43±0.08	0.000	0.16±0.04	0.0005
Inóculo* PUF _{Tamaño}	0.54±0.11	0.0001	0.13±0.06	0.030
Inóculo ²	-1.89±0.19	0.000	-0.77±0.10	0.000
Coefficiente de correlación múltiple	0.90		0.85	
Coefficiente de determinación	0.92		0.90	

Los gráficos de superficie de respuesta (figura 2) muestran la producción óptima de biomasa y BC. Tal como se observó, el aumento del nivel de inóculo después del 5% (v·v⁻¹) mejoró la biomasa y la BC a su valor máximo utilizando 15% (v·v⁻¹) de inóculo (figura 2A). La mejor producción de BC coincide con la determinada para la biomasa, es decir, con el 15% (v·v⁻¹) (figura 2B). La mayor producción de biomasa y BC con el 15% de inóculo en PUF-C fue 6.94 ± 0.41 g·L⁻¹ y 2.46 ± 0.12 g·L⁻¹, respectivamente. Los valores predichos en estas condiciones fueron 6.32 g·L⁻¹ y 1.94 g·L⁻¹, respectivamente. No obstante, la PUF-M en SSC mostró una producción máxima de 1.51 g·L⁻¹ de BC con 10% del nivel de inóculo inicial (figura 2).

Para niveles de inóculo superiores al 15% en SSC con PUF-C, la producción de biomasa disminuyó gradualmente debido a una disminución en los nutrientes. En consecuencia, la síntesis de BC también disminuyó. Para PUF-M, el 10% (v·v⁻¹) de inóculo alcanzó una producción de biomasa y BC de 5.70 ± 0.38 g·L⁻¹ y 1.51 ± 0.11

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, a las 96 h. La reducción del nivel de inóculo ($<10\%$) produjo una disminución constante de la biomasa, aunque no hubo efectos adversos en la BC.

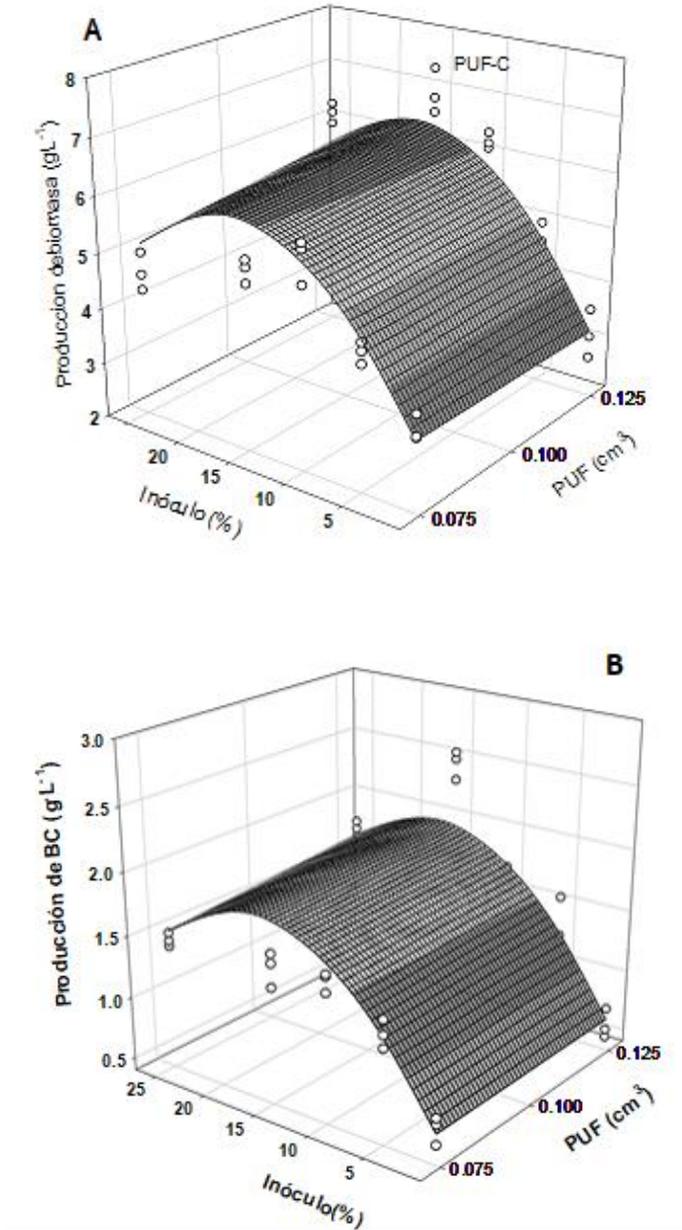


Figura 2. Gráficos de superficie de respuesta para la producción de biomasa (A) y BC (B) con diferentes niveles de inóculo y tamaño de PUF a las 96 h en SSC de *G. xylinus* a 30 °C.

Cabe destacar que la glucosa se consumió parcialmente con un nivel de inóculo del 10% y no se presentaron diferencias significativas para el consumo de glucosa con un nivel de inóculo del 15 y 25% (figura 3A) con un pH de 7.4- 8.3 a las 96 h de SSC. El pH adecuado para la síntesis de BC es de 4 a 6, el descenso de este está relacionado con la producción de ácidos orgánicos como el ácido glucónico, ácido acético y ácido láctico, el pH ácido (<4) podría inhibir la producción de BC (Keshk y Sameshima *et al.*, 2005; Zywicka *et al.*, 2015). En este estudio, la concentración de ácido glucónico fue significativamente mayor en PUF-M que en PUF-C, con 25% (v·v⁻¹) de inóculo produjo $1.35 \pm 0.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (figura 3). El uso de PUF-C con 15% (v·v⁻¹) de inóculo presentó la menor formación de ácido glucónico, $0.31 \pm 0.016 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, una explicación plausible es el ambiente estresante para *G. xylinus* basado en diferencias por la estructura superficial de la PUF, como se muestra en la figura 1. Liu *et al.* (2016) han reportado la acumulación de ácido glucónico y ácido láctico en el ánodo, lo que produjo una reducción del crecimiento celular por estrés ácido cuando se aplicó un campo eléctrico de corriente continua en cultivo estático de *G. xylinus* para reducir la concentración de oxígeno.

Por lo tanto, la formación de ácido glucónico produjo un impacto negativo en la síntesis de BC; por lo tanto, al estar presente una alta concentración de ácido glucónico, se obtuvo una baja concentración de BC (figura 2 y 3). Este patrón puede estar relacionado con la disponibilidad de glucosa para la producción de BC (figura 3A). También, vale la pena señalar el valor de $a_w > 0.90$ que necesitan las bacterias para mantener su crecimiento (Thomas *et al.*, 2013). En este sentido, el a_w de SSC después de 96 h cumple los requisitos bacterianos con 0.99 para PUF-C y PUF-M.

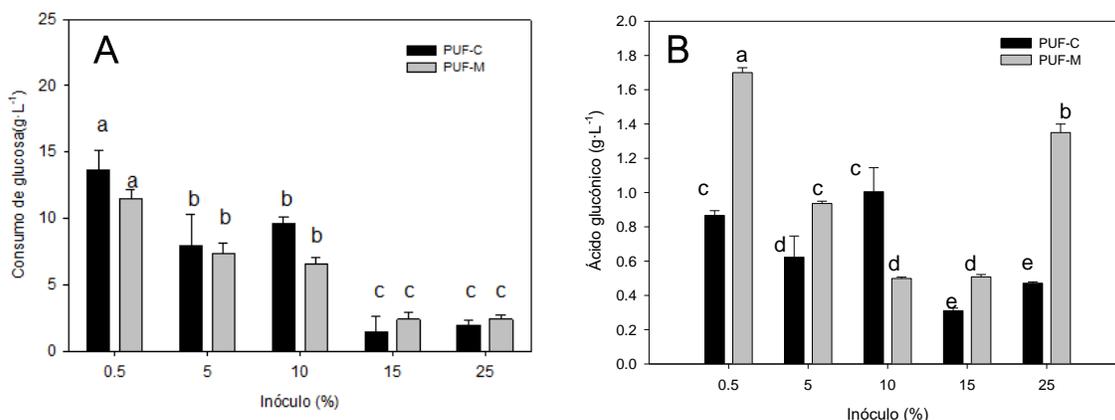


Figura 3. Consumo de glucosa (A) y producción de ácido glucónico (B) durante la producción de BC de *G. xylinus* con PUF- C y M a las 96 h del SSC a 30 °C.

3.2 Estructura química de la BC

La figura 4A muestra los espectros de infrarrojo de BC comparados con una muestra de celulosa vegetal. Las bandas características de celulosa a 3400-2800 cm^{-1} y entre 1160 y 1000 cm^{-1} se pueden asignar a las vibraciones de los grupos funcionales O-H, C-H y C-O-C y C-O, respectivamente. Por otro lado, la presencia de una banda a 890 cm^{-1} es típica de estos polímeros y se asigna al estiramiento C-O-C del enlace glucosídico β de BC (Daya ley *et al.*, 2013). La banda en 1428 cm^{-1} corresponde a la flexión del grupo CH_2 , la cual hace referencia a una banda característica de celulosa I (Dayal *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2011). Rani *et al.* (2011) reportaron la presencia de bandas a 1428 y 1155 cm^{-1} para indicar la presencia de celulosa tipo I como el componente principal de la estructura. Las bandas a 1315 cm^{-1} y 1375 cm^{-1} se deben a la vibración de flexión de CH_2 y del grupo C-H, respectivamente. Además, en otros reportes se observa la presencia de estas bandas en muestras de BC para señalar la región cristalina dentro de la estructura de celulosa (Dayal *et al.*, 2013; Bilgi *et al.*, 2016). Las bandas determinadas entre 3700 y 3100 cm^{-1} se asignan a las vibraciones de la flexión de O-H en la celulosa, las bandas en esta región del espectro (figura 4A) evidencian el enlace de hidrógeno inter e intramolecular (Dayal *et al.*, 2013). La banda a 1644 cm^{-1} asignada a la vibración de las moléculas de agua es intensa en las muestras de BC, y lo que indica su origen bacteriano, debido a la creciente capacidad

de BC para retener agua comparada con la celulosa vegetal (Machado *et al.*, 2016; Rani *et al.*, 2011).

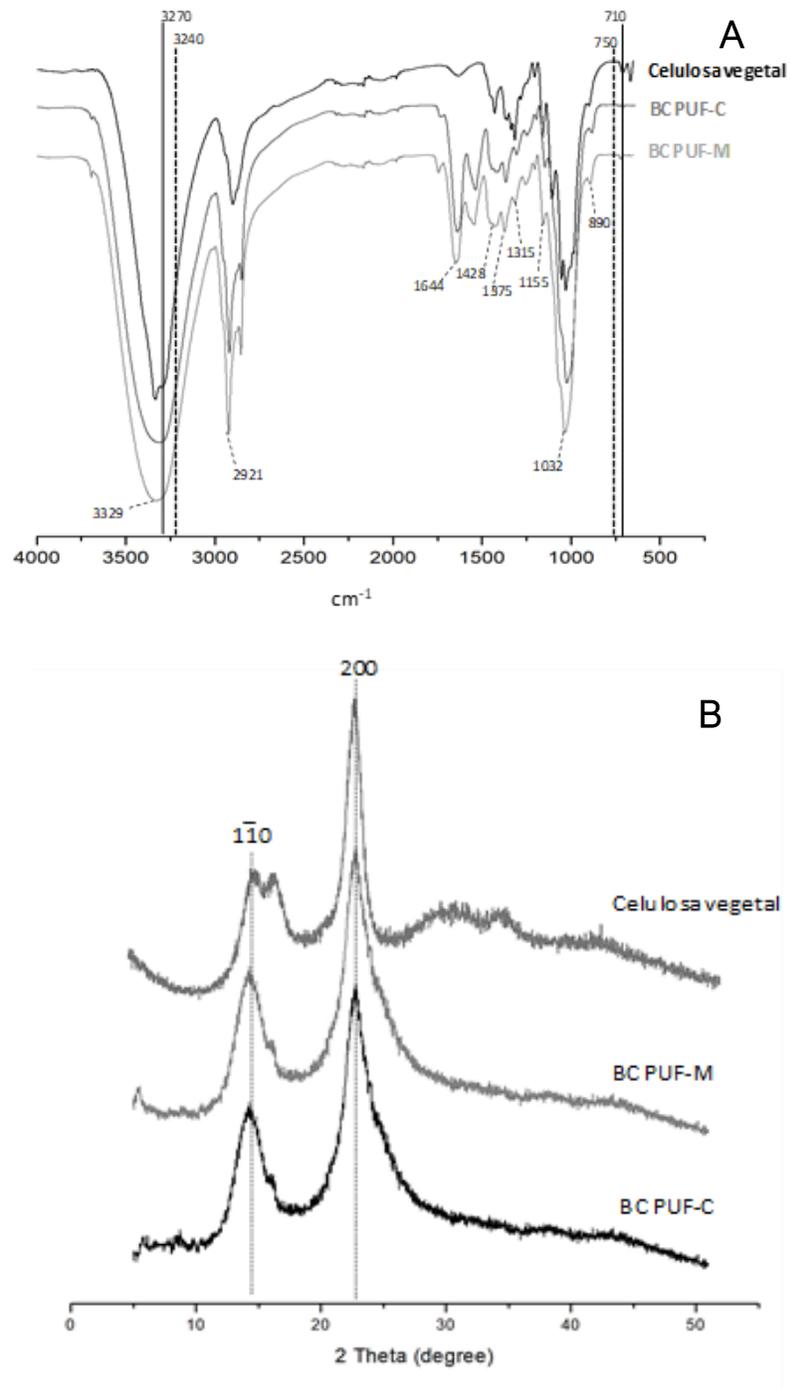


Figura 4. Celulosa vegetal y BC producida por *G. xylinus* empleando PUF-C y PUF-M con 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo a las 96 h: espectros de infrarrojo (A); patrones de XRD (B).

La celulosa vegetal presenta seis polimorfos; la más abundante y estudiada es la celulosa I, la cual presenta estructuras denominadas como I α y I β (Mohite *et al.*, 2014). La celulosa producida por microorganismos se compone principalmente de polimorfo I α , mientras que, en el polimorfo de celulosa vegetal, I β es predominante (Rani *et al.*, 2011). De acuerdo con Castro *et al.* (2011), las bandas de absorción entre 3240 y 750 cm⁻¹ se deben al polimorfo triclinico I α y las bandas entre 3270 y 710 cm⁻¹ corresponden al polimorfo monoclinico I β lo cual evidencia que *G. xylinus* produce ambos polimorfos simultáneamente (Dayal *et al.*, 2013).

Por otro lado, la cristalinidad es importante para las propiedades y aplicaciones de BC, por lo que varios trabajos reportan patrones de difracción con dos picos característicos a 14.30 y 22.6°, asignados a los planos cristalográficos 110 y 200, respectivamente (Molina- Ramírez *et al.*, 2017). La figura 4B muestra los patrones de difracción de rayos X donde se pueden apreciar dos picos en 14.50 ° y 22.80 ° que confirma la presencia de celulosa tipo I de acuerdo con los espectros de infrarrojo (Lee *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2018). Respecto al porcentaje de cristalinidad, la BC producida presentó un índice del 73% para PUF-C y del 71% para PUF-M, lo que puede estar relacionado con un mejor embalaje de microfibrillas en estos soportes (Bilgi *et al.*, 2016). Además, la cristalinidad de la BC producida se encuentra en el intervalo de lo que otros autores han reportado entre 73 y 85% (Machado *et al.*, 2016; Mohammadkazemi *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2018).

3.3 Producción de BC empleando PUF-C como soporte inerte y 15% de inóculo inicial en SSC.

La bacteria mostró una rápida adaptación al medio de cultivo durante la producción de BC con PUF-C y un inóculo del 15% (v·v⁻¹) en SSC, presentando una fase de adaptación corta (figura 5A). Después de 24 h, *G. xylinus* alcanzó el P_{max} de 8.36 ± 0.38 g biomasa·L⁻¹ con una tasa de crecimiento de 0.21 h⁻¹ y R² de 0.99 (figura 5A). El consumo de glucosa y la producción de BC están fuertemente relacionados porque las bacterias asimilan la fuente de carbono para crecer y producir protofibrillas de biopolímeros, en este caso celulosa (figura 5B y C). Luego, las protofibrillas BC se ensamblan en microfibrillas en una segunda etapa, y más tarde, forma un paquete de cintas entrelazadas (Castro *et al.*, 2011). El consumo máximo de glucosa fue a las 48

h (P_{\max} de $20.11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) con una tasa de consumo de 0.11 h^{-1} ($R^2 = 0.99$), mientras que para BC, la P_{\max} ($1.32 \pm 0.28 \text{ g BC}\cdot\text{L}^{-1}$) se alcanzó a las 24 h con una tasa de producción de 0.25 h^{-1} y R^2 de 0.97 (figura 5C).

La figura 5D muestra el comportamiento del pH del cultivo con un valor inicial de 6.30, que permaneció constante hasta las 4 h. Posteriormente, el pH del cultivo disminuyó a 4.60 después de transcurridas a las 8 h y se mantuvo estable entre 4.40 y 4.60 hasta las 20 h (figura 5D). En cultivos líquidos, se ha visto que *Gluconacetobacter* es capaz de producir ácido glucónico a partir de glucosa razón por la cual disminuye el pH (figura 5E) y la producción de BC (Bilgi *et al.*, 2016) después de 24 h de SSC en el presente estudio. Al finalizar el cultivo, el pH aumentó a 5.60, lo que podría deberse al consumo de ácido glucónico (Liu *et al.*, 2016), lo que lleva al pH óptimo para la producción de BC de 5.50 (Bilgi *et al.*, 2016).

Bilgi *et al.* (2016) han reportado la producción de BC en cultivos sumergidos estáticos o agitados con *G. xylinus* donde la transferencia de oxígeno fue un factor limitante debido al rápido agotamiento del oxígeno disuelto en el medio, lo que, a su vez, restringió la producción del biopolímero. En otro estudio relacionado, el crecimiento bacteriano en el cultivo sumergido estático para la producción de BC fue de $0.31 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, que es 22 veces menor que la biomasa obtenida con SSC en este estudio (Coban y Biyik *et al.*, 2011). Otros autores han reportado que la agitación mejoró la producción de biomasa de 1.95 a $3.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ con varias cepas de *G. xylinus* (Zywicka *et al.*, 2015); sin embargo, estos datos son inferiores a los obtenidos en el presente estudio, lo que indica o confirma que la presencia de oxígeno es un factor esencial en la proliferación durante la producción de BC.

La comparación más cercana con *G. xylinus* para la producción de BC es en SmC con medio Hestrim-Schramm, ya que no hay informes sobre el empleo del SSC para la producción de este biopolímero, y fue 2.70 veces mayor que en el SmC estático que usa el mismo medio (Mohammadkazemi *et al.*, 2015). En un trabajo reciente de Molina-Ramírez *et al.* (2017), el rendimiento de BC en SmC estático de *Komagataeibacter medellinensis* mejoró al variar la concentración de glucosa, lo que concuerda con

nuestros resultados. Sin embargo, el tiempo requerido para la producción de BC en el informe anterior fue de 8 días.

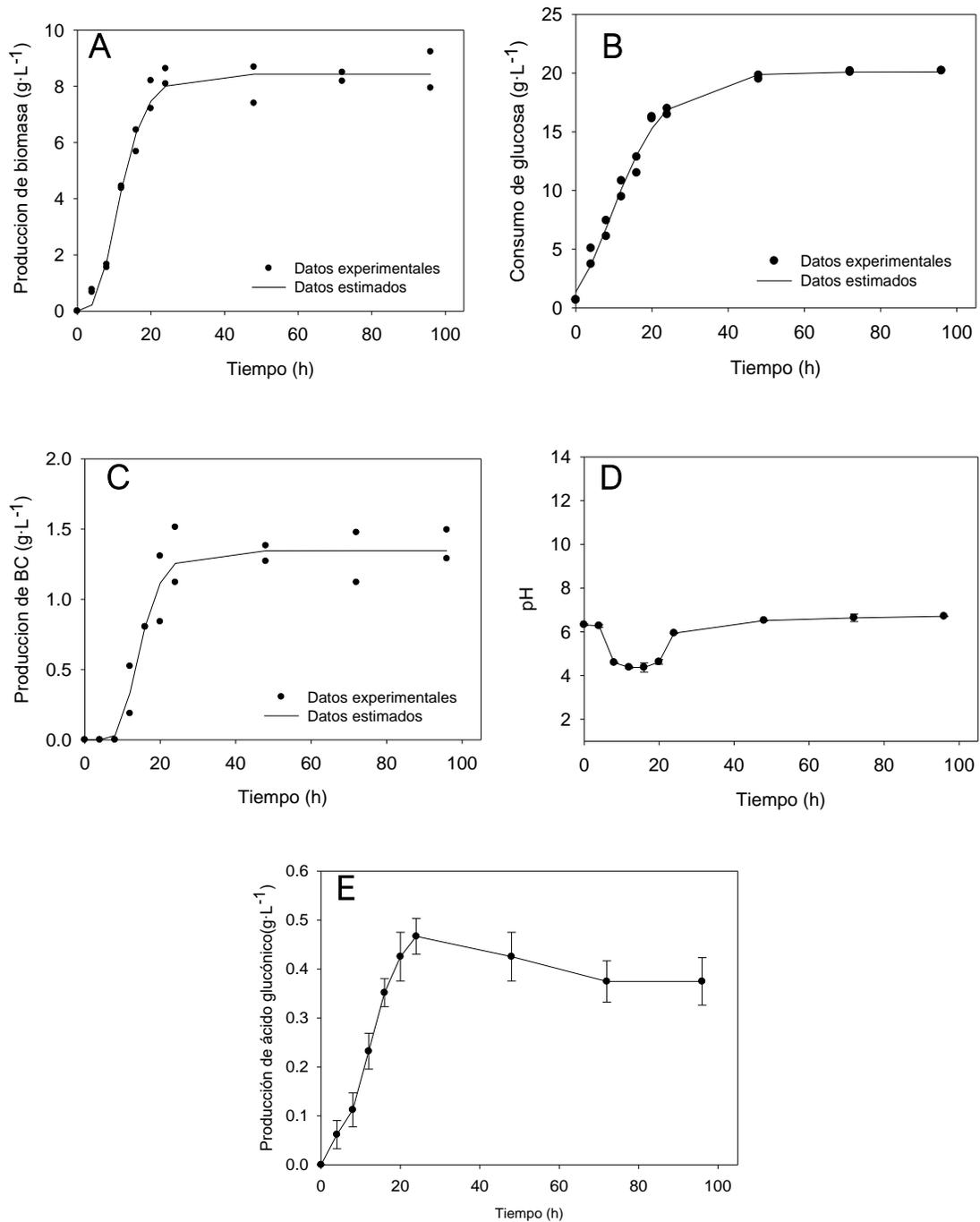


Figura 5. Cultivo en estado sólido de *G. xylinus* utilizando PUF-C como soporte inerte y 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo: biomasa (A); consumo de glucosa (B); BC (C); pH (D); ácido glucónico (E). Datos experimentales ajustados al modelo de Gompertz con $R^2 > 0.97$.

Otro estudio sobre SmC para la producción de BC utilizó subproductos agroindustriales para la formulación del medio, como los hidrolizados enzimáticos de bagazo (Qi *et al.*, 2017), donde se necesitan largos tiempos de fermentación. En éste, la producción de BC es 1.30 veces menor que en nuestro estudio. Además, Uzyol *et al.* (2016) había estudiado la producción de BC por *Komagataeibacter hansenii* empleando como fuente de carbono un hidrolizado ácido de almidón de algas en SmC estático con una producción de BC de 2.2 veces menor que la obtenida en el presente trabajo. Curiosamente, Zywicka *et al.* (2015) emplearon un SmC con un agitador orbital y un rodillo oscilante donde las condiciones agitadas favorecieron el crecimiento bacteriano, pero desalentaron la producción de BC. Este informe corrobora la explicación de los altos rendimientos de BC en SSC con PUF-C basado en la transferencia de oxígeno. En este aspecto, la transferencia de oxígeno explica el crecimiento bacteriano mejorado con PUF-C, ya que el k_{La} estimado fue de 9.04 h^{-1} , que es similar al del informe anterior sobre la mejora de la productividad de BC en el caldo de cultivo viscoso de *Acetobacter xylinum* en SmC agitado, que emplea un tornillo con impulsor de tubo de tiro a 500 rpm (Kouda *et al.*, 1997). El OUR obtenido fue de $17.49 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (OUR específico de $2.85 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{g biomasa}^{-1} \text{ h}^{-1}$) a las 24 h, correspondiente al final de la fase exponencial cuando comenzó la fase estacionaria (figura 5A), que es superior a lo informado por Kornmann *et al.* (2003) en un estudio sobre el efecto de la adición de etanol sobre el crecimiento de *G. xylinus* en SmC en biorreactor agitado con un OUR de ca. $10 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en fase estacionaria después de 30 h con una velocidad de agitación de 800 rpm. Estos resultados muestran que la PUF como material de soporte en SSC presentó una adecuada difusión de oxígeno lo que permitió el crecimiento de *G. xylinus* y la producción de BC a un menor costo y ahorro de energía.

3.4 Caracterización morfológica de la BC

La morfología de los poros interconectados de la PUF en el que la bacteria se adhirió y proliferó fue observada por SEM (figura 1). Durante el cultivo, la bacteria secretó BC formando una biopelícula con una geometría de panal. Esto difiere de otros informes sobre la producción de BC en SmC estático en forma de una película suspendida en la

interfaz aire-líquido. En cultivos agitados, el suministro de oxígeno favorece la formación de BC en forma de agregados (Krystynowicz *et al.*, 2002). En el presente estudio, la figura 6 muestra la formación de una biopelícula en los poros de la PUF. Cabe mencionar, que las bacterias secretaron microfibras de celulosa incrustada en la matriz de PUF. Por el contrario, en el reporte de Augusto-Ferrari *et al.* (2013) al producir ácido hialurónico en SSC utilizando PUF, los autores observaron la secreción de ese metabolito y la deposición en la estructura interna del soporte, donde se absorbió el medio de cultivo.

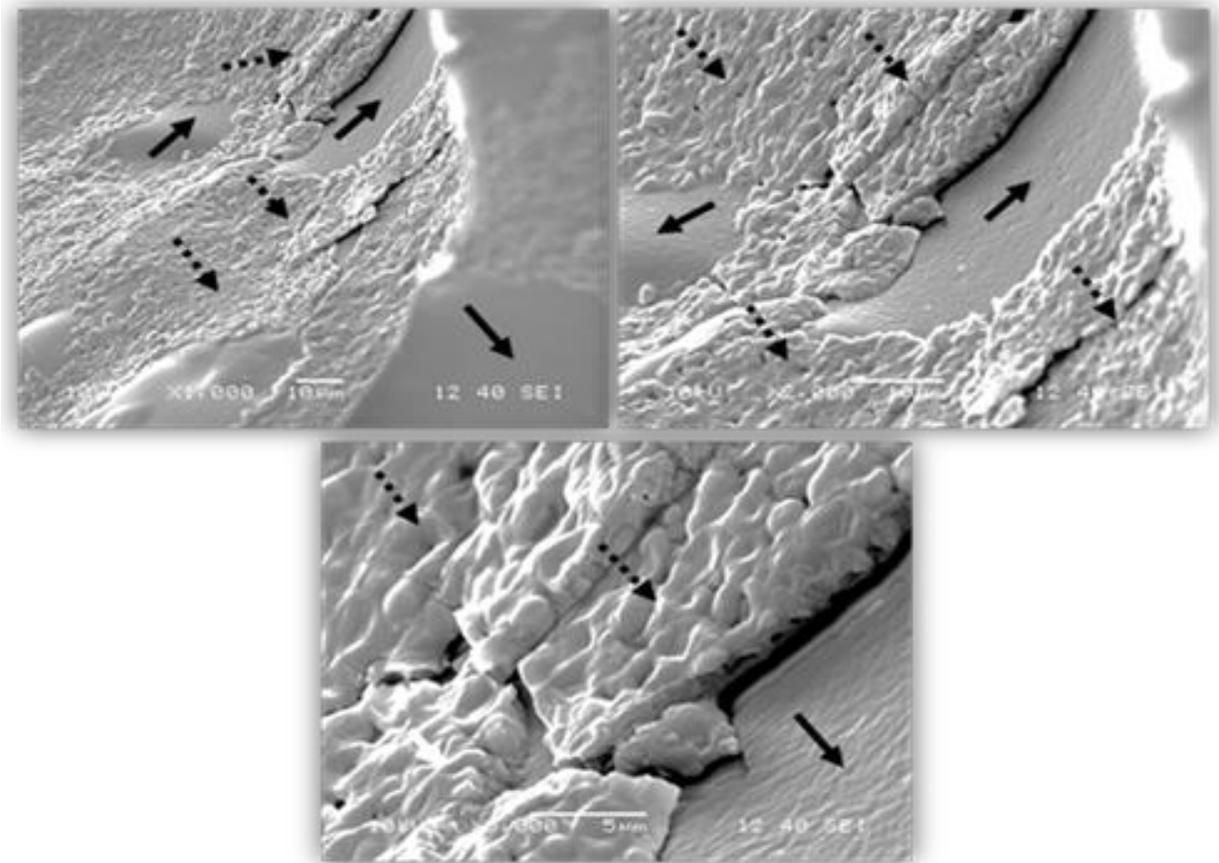


Figura 6. Adherencia de la BC en diferentes zonas de soporte (flechas punteadas) durante la producción en SSC con 15% de inóculo inicial en PUF-C (flechas negras) a las 96 h.

En la figura 7 se pueden apreciar muestras de PUF obtenidas a las 96 h de cultivo y teñidas con CW. Las zonas fluorescentes son evidencia de interacción entre CW y BC que permaneció adherida en la estructura de PUF durante el SSC. Vale la pena señalar que CW presenta una alta afinidad por los polisacáridos con enlaces glucosídicos β - (1,3) y β - (1,4) como la celulosa o la quitina y puede interactuar en el proceso de

formación de microfibrillas de polisacáridos estructurales para dar una coloración azul brillante bajo luz UV (Jofré *et al.*, 2018).

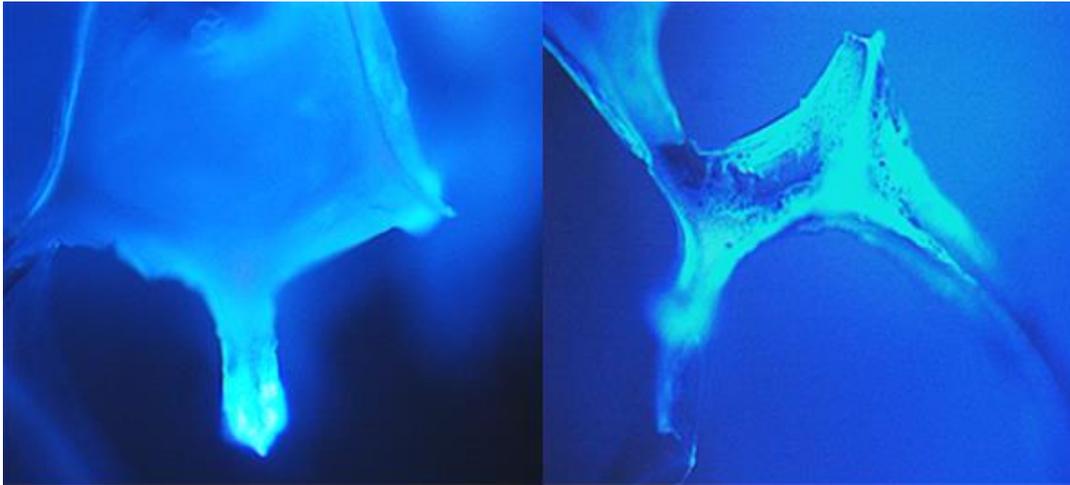


Figura 7. Imágenes de BC producida a las 96 h en SSC y 15% de inóculo inicial en PUF-C teñido con CW observadas por microscopia de fluorescencia.

La figura 8 muestra el espectro ^{13}C NMR de BC obtenida en PUF-C con 15% de inóculo inicial a las 96 h de SSC, en el cual se pueden ver los picos de los seis carbonos de la unidad de glucosa y se indican como C1 a C6. El espectro ^{13}C NMR de BC presentó un pico a 104.5 ppm correspondiente a C1; mientras que, para C4 y C6 se observaron a 86.90 y 64.60 ppm, respectivamente. El pico a 86.9 ppm corresponde a las regiones amorfas de C4. Los picos entre 70 y 75 ppm se asignaron a C2, 3 y 5, los cuales se observan traslapados tal como en el estudio de Du *et al.* (2018). Los picos a 104.50 y 64.60 ppm, así como las regiones amorfas a 86.90 y 64.60 ppm (C4 y C6) se atribuyeron a los polimorfos I α de celulosa (Castro *et al.*, 2011; Mohite *et al.*, 2014).

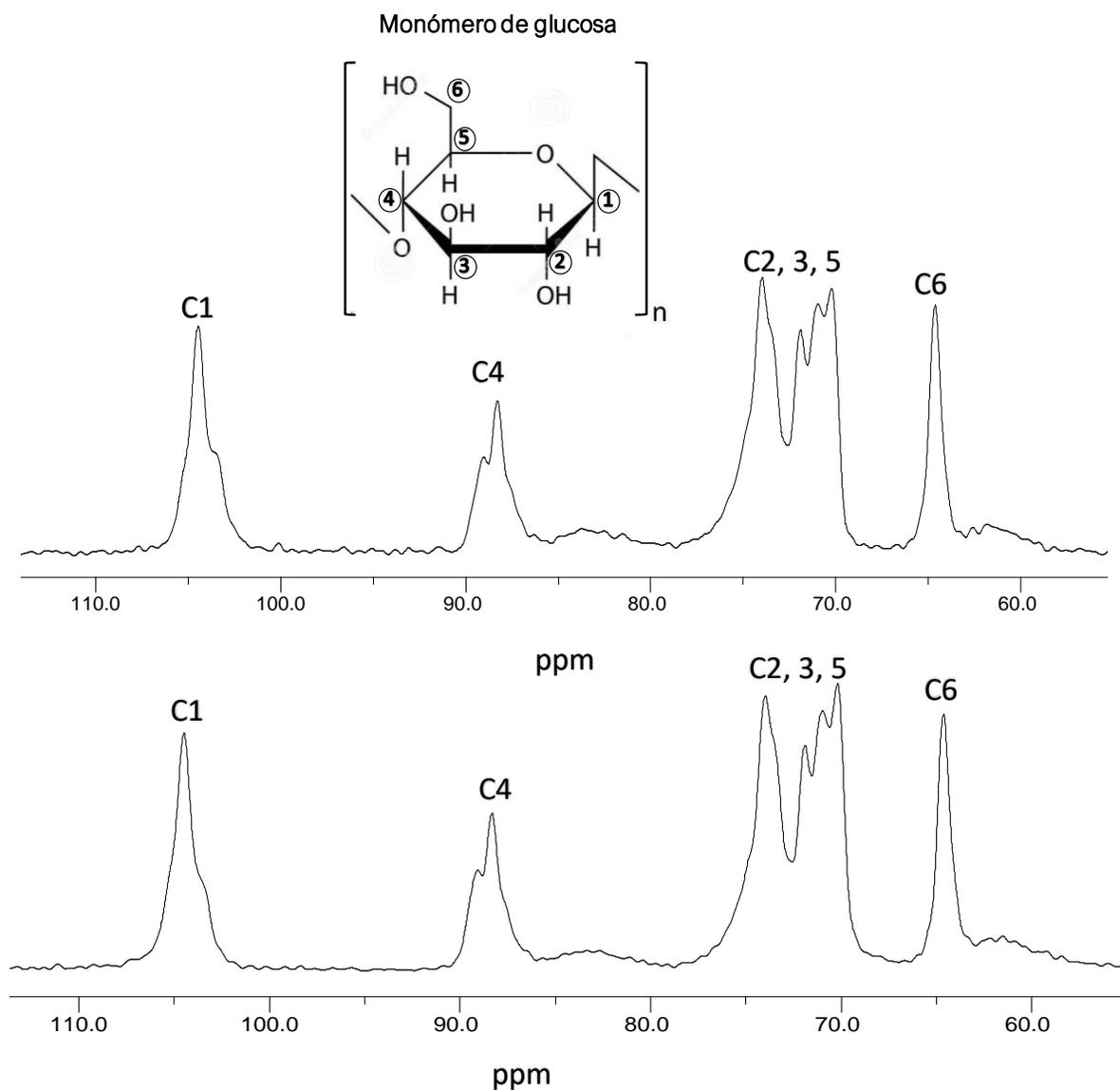


Figura 8. Espectros de ^{13}C CP / MAS NMR de BC producidos por *G. xylinus* con 15% (v·v⁻¹) de inóculo inicial empleando PUF-C como soporte en SSC a las 96 h (A); Medio de cultivo Hestrin & Schramm (B).

4. CONCLUSIONES

Se ha producido eficientemente BC de *G. xylinus* en SSC. Este estudio concluyó que este sistema de fermentación mejora la producción del biopolímero en cuestión a partir de bacterias al ofrecer una mayor disponibilidad de oxígeno. Es importante destacar, que la BC producida sigue la geometría del PUF con geometría de panal. Por lo tanto, el SSC tiene el potencial de producir BC con estructuras físicas controladas. Además, el soporte de PUF mejoró la recuperación de la biomasa y la BC durante el cultivo en comparación con otros enfoques biotecnológicos como la producción de enzimas a partir de diversos microorganismos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Uzyol, H.K., Sacan, M.T., (2016), Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* using algae-based glucose, Environmental Science Pollution Research 1–9.
- Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J.L., Caro, G., Mondragon, I., Gañán, P. (2011), Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes, Carbohydrate Polymers, 84: 96–102.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jezierska, A., Goncalves-Miskiewicz, M., Turkiewicz, M., Bielecki, S. (2002), Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 29: 189–195.
- Machado, R.T.A., Gutierrez, J., Tercjak, A., Trovatti, E., Uahib, F.G.M., Padua Moreno, G., Nascimento, A.P., Berreta, A.A., Ribeiro, S.J.L, Barud, H.S. (2016), *Komagataeibacter rhaeticus* as an alternative bacteria for cellulose production, Carbohydrate Polymers, 152: 841–849.
- Coban, E.P., Biyik, H. (2011), Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5, Afr. J. Biotechnol. 10 5346–5354.
- Wu, S.C., Li, M.H. (2015), Production of bacterial cellulose membranes in a modified airlift bioreactor by *Gluconacetobacter xylinus*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 120:444–449.
- Tian, D., Shen, F., Hu, J., Renneckar, S., Saddler, J.N. (2018), Enhancing bacterial cellulose production via adding mesoporous hallosyte nanotubes in the culture medium, Carbohydrate Polymers, 198: 191–196.
- Islam, M. Ul., Ullah, M.W, Khan, S., Shan, N., Park, J.K. (2017), Strategies for cost- effective and enhanced production of bacterial cellulose, International Journal of Biological Macromolecules, 102: 1166–1173.

- MOXA Mohite, B.V., Patil, S.V. (2014), Physical, structural, mechanical, and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529, Carbohydrate Polymers, 106: 132-141.
- MOXA Kose, R., Sunagawa, N., Yoshida, M., Tajima, K. (2013), One-step production of nanofibrillated bacterial cellulose (NFBC) from waste glycerol using *Gluconacetobacter intermedius* NEDO-01, Cellulose, 20: 2971–2979.
- MOXA Bilgi, E., Bayir, E., Sendemir-Urkmez, A., Hames, E.E. (2016), Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean, International Journal of Biological Macromolecules, 90: 2–10.
- MOXA Lee, C.M., Gu, J., Kafle, K., Catchmark, J., Kim, S.H. (2015), Cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strains ATCC 53524 and ATCC 23768: Pellicle formation, post-synthesis aggregation and fiber density, Carbohydrate Polymers, 133: 270–276.
- MOXA Zhang, Z.G., Chen, H.Z. (2010), Xanthan production on polyurethane foam and its enhancement by air pressure pulsation, Applied Biochemistry and Biotechnology, 162: 2244–2258.
- MOXA Augusto-Ferrari, F., Lopes Motta, F., Gaspar Bastos, R., Andrade Santana, M.H. (2013), The solid-state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in polyurethane foam as a strategy for the production of hyaluronic acid, Applied Biochemistry Biotechnology, 170: 1491–1502.
- MOXA Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A. (2009), Recent advances in solid-state fermentation, Biochemical Engineering Journal, 44: 13–18.
- MOXA Marin- Cervantes, M.C., Matsumoto, Y., Ramirez-Coutiño, L., Rocha-Pino, Z., Viniegra, G., Shirai, K. (2008), Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases, Process Biochemistry, 43: 24–32.
- MOXA Hestrin, S., Schramm, M. (1954), Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*, Biochemical Journal, 58: 345–352.

- AlMarzooqi, F.A., Bilad, M.R., Mansoor, B., Arafat, H.A. (2016), A comparative study of image analysis and porometry techniques for characterization of porous membranes, *Journal of Materials Science*, 51: 2017–2032.
- Lien, O.G. (1959), Determination of gluconolactone, galactonolactone and their free acids by the hydroxamate method, *Analytical Chemistry*, 31: 1363–1365.
- Bonilla-Blancas, W., Mora, M., Revah, S., Baeza, J.A, Lafuente, J., Gamisans, X., Gabriel, D., González-Sánchez, A. (2015), Application of a novel respirometric methodology to characterize mass transfer and activity of H₂S-oxidizing biofilms in biotrickling filter beds, *Biochemical Engineering Journal*, 99: 24–34.
- Mohammadkazemi, F., Azin, M., Ashori, A. (2015), Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media, *Carbohydrate Polymers*, 117: 518–523.
- Gallardo- Rivera, R., Aguilar- Santamaría, M.A., Silva- Bermúdez, P., García- López, J., Tecante, A., Velasquillo, C., Róman- Guerrero, A., Pérez- Alonso, C., Vázquez- Torres, H., Shirai, K. (2018), Polyelectrolyte complex of Aloe vera, chitosan, and alginate produced fibroblast and lymphocyte viabilities and migration, *Carbohydrate Polymers*, 1992: 84–94.
- Hintze J., NCSS 2007, NCSS, LLC, Kaysville, UT, USA, 2007.
- Flores- Albino, B., Arias, L., Gómez, J., Castillo, A., Gimeno, M., Shirai, K. (2012), Chitin and L (+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus sp.* B2 using sugar cane molasses as a carbon source, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35: 1193–1200.
- Keshk, S.M., Sameshima, K. (2005), Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production, *African Journal of Biotechnology*, 4: 478–482.
- Zywicka, A., Peitler, D., Rakoczy, R., Konopacki, M., Kordas, M., Fijalkowski, K. (2015), The effect of different agitation modes on bacterial cellulose synthesis by *Gluconacetobacter xylinus* strains, *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica*, 14: 137–150.

- 100x Liu, M., Zhong, C., Zhang, Y.M., Xu, Z.M., Qiao, C.S, Ru Jia, S. (2016), Metabolic investigation in *Gluconacetobacter xylinus* and its bacterial cellulose production under a direct current electric field, *Frontiers in Microbiology*, 17: 331.
- 100x Thomas, L., Laroche, C., Pandey, A. (2013), Current developments in solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 81: 146–161.
- 100x Dayal, M.S., Goswami, N., Sahai, A., Jain, V., Mathur, G., Mathur,,A. (2013), Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter aceti* MTCC 2623, *Carbohydrate Polymers*, 94: 12–16.
- 100x Rani, M.U., Rastogi, N.K., Appaiah, K.A.A. (2011), Statistical optimization of medium composition for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk extract - an agro-industry waste, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 739–745.
- 100x Akerholm, M., Hinsteroisser, B., Salmén, L. (2004), Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy, *Carbohydrate Research*, 339: 569–578.
- 100x Du, R., Zhao, F., Peng, Q., Zhou, Z., Han, Y. (2018), Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar, *Carbohydrate Polymers*, 194: 200–207.
- 100x Molina-Ramírez, C., Castro, M., Osorio, M., Torres-Taborda, M., Gómez, B., Zuluaga, R., Gómez, C., Gañán, P., Rojas, O., Castro, C. (2017), Effect of different carbon sources on bacterial nanocellulose production and structure using the low pH resistant strain *Komagataeibacter medellinensis*, *Materials*, 10: 1–13.
- 100x Qi, G.X., Luo, M.T., Huang, C., Guo, H.J., Chen, X.F., Xiong, L., Wang, B., Lin, X.Q., Peng, F., Chen, X.D. (2017), Comparison of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* on bagasse acid and enzymatic hydrolysates, *Journal of Applied Polymer Science*, 134: 1–7.

- 100x Kouda, T., Yano, H., Yoshinaga, F. (1997), Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83: 371–376.
- 100x Kornmann, H., Duboc, P., Niederberger, P., Marison, I., von Stockar, U. (2003), Influence of residual ethanol concentration on the growth of *Gluconacetobacter xylinus* I 2281, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 168–173.
- 100x Jofré, E., Liaudat, J.P., Medeot, D., Becker, A. (2018), Monitoring succinoglycan production in single *Sinorhizobium meliloti* cell by Calcofluor with M2R staining and time-lapse microscopy, *Carbohydrate Polymers*, 181: 918–922.

ETAPA II

PRODUCCIÓN DE MATRICES POROSAS DE QUITINA EMPLEANDO DIÓXIDO DE CARBONO COMO DISOLVENTE NO TÓXICO MEDIANTE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y SU APLICACIÓN EN LA PROLIFERACIÓN DE OSTEÓBLASTOS DE PERIOSTIO HUMANO

Quintana-Quirino M., Hernández-Rangel A., Silva- Bermúdez P., Domínguez-Hernández V., Araujo Monsalvo V., Gimeno M., Shirai K. Green foaming of chitin hydrogels using supercritical carbon dioxide for scaffolding of human periosteum osteoblasts. Carbohydrate Polymers. EN PROCESO.



1. INTRODUCCIÓN

La quitina es un biopolímero estructural que se produce en la naturaleza como microfibrillas que forman componentes estructurales en el exoesqueleto de los artrópodos o en las paredes celulares de los hongos y las levaduras (Pillai *et al.*, 2009). La quitina es un polisacárido muy abundante en la naturaleza y debido sus propiedades (no tóxico, biocompatible y biodegradable) ha sido ampliamente usada para muchas aplicaciones biomédicas, tales como la aceleración de la cicatrización de heridas y la supresión del crecimiento de células tumorales, entre otras (Chakravarty *et al.*, 2018). Sin embargo, la quitina es insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos debido a la presencia de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares (Chakravarty *et al.*, 2018; El Knidri *et al.*, 2018; Tamura *et al.*, 2011). El disolvente más comúnmente empleado para quitina es la *N, N*-dimetilacetamida con cloruro de litio (DMAc / LiCl) el cual ha demostrado ser eficaz; sin embargo, se ha visto que además de ser tóxico es corrosivo degradando la quitina incluso con exposiciones cortas (Chakravarty *et al.*, 2018). Con base en ello, se ha reportado el desarrollo de sistemas alternos que permiten disolver quitina lo cual ha sido esencial para la fabricación de materiales funcionales; no obstante, aunque la quitina exhibe una afinidad limitada hacia ciertos solventes, sólo algunos son capaces de destruir las interacciones de enlaces de hidrógeno logrando así la disolución de dicho biopolímero (Duan *et al.*, 2018).

Una opción es el uso de sales inorgánicas como el cloruro de calcio que ha sido considerado como una estrategia alternativa para mejorar la solubilidad y con ello su procesamiento (Tamura *et al.*, 2011).

El empleo del cloruro de calcio en combinación con el metanol ha sido reportado como un buen sistema para la disolución de quitina (Tokura *et al.*, 1995; Tamura *et al.*, 2006), donde se ha visto que la presencia de agua y el número de iones de calcio son factores importantes en este sistema, ya que destruyen los puentes de hidrógeno inter e intramoleculares de las cadenas; así como también, el enlace del grupo acetamida modificando así la cristalinidad y facilitando la disolución (Tokura *et al.*, 1995; Tamura *et al.*, 2006; Pillai *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2018). Tamura *et al.* (2011) han reportado

el uso del cloruro de calcio y metanol como sistema de disolución para la elaboración de hidrogeles de quitina. Los polímeros naturales son en su mayoría biodegradables y biocompatibles, generalmente poseen grupos funcionales hidroxilos y aminos los cuales son capaces de formar puentes de hidrógeno inter e intramoleculares que favorecen la interacción del polímero con el agua formando hidrogeles (Tsiptsias *et al.*, 2011).

En este tema, el uso de fluidos supercríticos (SCF) ha sido ampliamente reportado para la producción de materiales porosos basados en polímeros, como ácido poli-láctico, policaprolactona, β - quitina (White *et al.*, 2012; Diaz- Gomez *et al.*, 2016; Bong Lee *et al.*, 2004) para la producción de espumas, micropartículas, membranas y fibras con un tamaño promedio menor a 10 μm

(Tsivintzelis *et al.*, 2007). El CO_2 es el fluido supercrítico que se usa con mayor frecuencia debido a su bajo costo, a que no es flamable ni tóxico y a su bajo punto crítico de presión (73 bar) y temperatura (31 °C) (White *et al.*, 2012). Durante el procesamiento de polímeros en condiciones supercríticas se ha reportado el empleo de disolventes para la obtención de materiales porosos, comúnmente alcoholes y acetona, donde alcoholes como el metanol ha mostrado una mejor interacción con el CO_2 que el agua (Tsiptsias-Panayiotou, 2008; Tsiptsias *et al.*, 2009; Tsiptsias *et al.*, 2008).

2. METODOLOGÍA

2.1 Elaboración de los hidrogeles

La quitina pura (g) se disolvió en una mezcla de metanol (8.75 mL) (Meyer, México), agua (16.25 mL) y cloruro de calcio (25 g) (J. T. Baker, México) en un matraz Erlenmeyer de 125 mL sellado herméticamente. La mezcla se mantuvo con agitación magnética durante 48 h a temperatura ambiente para disolver la quitina. La disolución se vertió en placas Petri (55 mm) con un peso conocido (21.56 g); y se colocaron en una cámara de bioclimática (Memmert HPP110, Schwabach, Alemania) a 25 °C con humedad relativa del 90% para facilitar la formación de los hidrogeles de quitina, los cuales se forman cuando los grupos amino de la quitina interactúan con los grupos hidroxilo del agua formando una red mediante puentes de hidrógeno (Flores *et al.*, 2006). Posteriormente, se les retiró el exceso de disolvente y se lavaron con H₂O hasta eliminar los residuos de éste.

2.2 Producción de matrices porosas de quitina empleando dióxido de carbono en estado supercrítico

Se llevó a cabo la formación de las matrices porosas empleando diferentes condiciones de producción. Se evaluó el efecto de dos disolventes (agua: S_A y metanol: S_M), la temperatura (298, 313 y 353 K) y la presión (175, 200, 250, 300 bar) en hidrogeles de quitina. Estos se colocaron en un reactor químico de alta presión (Homemade, México) y empleando una bomba (ISCO Syringe pump, Modelo 260D, USA) se añadió CO₂ (Grupo Infra, Ciudad de México, México) hasta alcanzar la presión deseada con un tiempo de exposición de 2 h. Después, se llevó a cabo una rápida despresurización y finalmente se sacaron las matrices de quitina del reactor. Se ultracongelaron por 24 h para conservar la estructura porosa y se liofilizaron (Labconco Freezone 2.5 plus, Missouri, USA) para eliminar el agua residual (Tsiptsias y Panayiotou, 2008; Tsiptsias *et al.*, 2011).

2.3 Caracterización de las matrices porosas

Se evaluaron los cambios en masa (Ohaus Pionner, Nueva Jersey, EUA), diámetro y grosor (Mitutoyo Absolute, Mitutoyo Corporation Japón) de las matrices después del proceso de espumado. Mediante la técnica de pérdida de masa se determinó la cantidad de CO₂ absorbido en cada uno de los hidrogeles (Tsiptsias *et al.*, 2008; Tsiptsias- Panayiotou, 2008). La porosidad de las matrices de quitina se determinó mediante la medición de la fracción vacía en las matrices porosas en los diferentes tratamientos a través de una relación de masas entre las matrices producidas y la quitina en polvo sin tratamiento de espumado (control). Las determinaciones se realizaron por triplicado empleando la siguiente ecuación (Ec. 1) (Marin- Cervantes *et al.*, 2008).

$$\phi = 1 - \varepsilon \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde ε es igual a ω/ω_0 . ω es el peso de las matrices de los diferentes tratamientos, ω_0 es el peso de la quitina en polvo sin tratamiento de espumado y ϕ es la porosidad.

El diámetro de poro promedio y la distribución de estos se llevó a cabo mediante el procesamiento de las imágenes de microscopía electrónica de barrido (JEOL JSM-5900 LV, Tokio, Japón) empleando el software ImageJ versión 1.51j8 de acuerdo con lo reportado por AlMarzooqi *et al.* (2017) (Anexo 3) (Instituto Nacional de Salud, EUA). Se identificaron los grupos funcionales característicos mediante espectroscopía de infrarrojo (Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR, Seer Green, Reino Unido), el índice de cristalinidad se obtuvo mediante la relación de las intensidades del pico cristalino y del amorfo; y el tamaño de cristal aparente de la quitina en las matrices porosas por difracción de rayos X (Bruker D-8 Advance, Karlsruhe, Alemania) empleando la ecuación 2:

$$D_{ap} = \frac{k\lambda}{\beta_o \cos \theta} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde k es una constante de 0.9, λ (angstroms) es la longitud de onda de radiación incidente, β_o (rad) es el ancho a la mitad de la altura del pico cristalino y θ es el ángulo de escaneo de la (110) línea de difracción (Focher *et al.*, 1990).

El grado de acetilación se determinó mediante resonancia magnética nuclear de protón (Bruker Avance II 300, Rheinstetten, Alemania). Los porcentajes de hinchamiento y erosión de las matrices se evaluaron a 30 °C durante 14 días, así como la capacidad de absorción de estos se llevó a cabo empleando agua (Tsiptsias *et al.*, 2008).

Se evaluó la resistencia a la compresión de los materiales porosos de quitina y para ello previamente se cortaron cilindros (1.0 x 1.0 x 0.1 cm). Las pruebas se realizaron en una máquina universal de ensayos INSTRON 4502 (Instron Corporation, Massachusetts, EUA), se seleccionó una celda de carga de 1 kN y una velocidad de cabezal transversal de 2 mm·min⁻¹. El módulo de compresión se obtuvo como la pendiente tangente de la curva tensión-deformación (Chengdong *et al.*, 2011).

Los ángulos de contacto se midieron con agua destilada (10 µL) en las matrices de quitina por triplicado a 25 °C. Las imágenes digitales de las gotas se obtuvieron en un microscopio de luz horizontal Q x 3 Intel con un procesador de imagen (Intel Corporation, EUA) y se analizaron con el software ImageJ 1.51j8 (Instituto Nacional de Salud, EUA).

2.4 Evaluación de los andamios con osteoblastos humanos

2.4.1 Cultivo celular

Los osteoblastos se obtuvieron por el método de explante a partir de una muestra de hueso humano. La muestra consistió en un cilindro de aproximadamente 6 mm de diámetro y 1.5 cm de largo, se lavó 3 veces con 10 mL de amortiguador de fosfatos (pH 7.4) con 10% de antibiótico/antimicótico; después del último lavado se dejó la muestra con 10 mL de solución fresca. Posteriormente la muestra y la solución de antibiótico se vertieron en una caja Petri estéril y se descartó el cartilago adherido al hueso. Finalmente, la muestra se cortó en cilindros más pequeños de aproximadamente 6 mm de diámetro y 3 mm de largo, obteniendo 5 cilindros pequeños que fueron colocados en dos cajas Petri con 8 mL de DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino y 1% (v·v⁻¹) penicilina/estreptomicina (el medio de cultivo se cambió cada tercer día). Las cajas Petri fueron incubadas en un ambiente húmedo de

5% CO₂ a 37 °C hasta que se observó migración de los osteoblastos del tejido en las cajas hasta alcanzar un 80% de confluencia.

Para desprender las células adheridas al frasco de cultivo, los osteoblastos se lavaron y se trataron con una solución de 0.05% (v·v⁻¹) tripsina-EDTA. Posteriormente, se centrifugaron durante 10 min a 2500 rpm, el pellet se resuspendió en DMEM: F12 suplementado y se sembraron en frascos de cultivo para la expansión celular hasta el pase 3, cuando los osteoblastos fueron usados para los ensayos de viabilidad por el método indirecto de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

2.4.2 Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular de los osteoblastos en las matrices porosas de quitina se determinó mediante la prueba de MTT. Las matrices se esterilizaron en autoclave (121 °C y 15 lb·in⁻²) durante 15 minutos, posteriormente se colocaron en una microplaca y se hidrataron con solución buffer de fosfato (pH 7.4) y se cortaron con un tamaño de 8 mm de diámetro y 1 mm de grosor. Las células fueron sembradas en los materiales porosos previamente aquí desarrollados con una densidad de 50,000 células·soporte⁻¹ en una placa de 48 pozos para evaluar la proliferación. Mientras que, en los controles se sembraron 2,000 células por pozo. A determinados tiempos (2, 4, 7, 14 y 21 días) se añadieron 15µL de solución de MTT (0.5 mg·mL⁻¹) y 150 µL de DMEM: F12 suplementado y se incubaron durante 3 h. Posteriormente, la solución se removió y se añadieron 150 µL de una solución de DMSO: isopropanol (1:1) para disolver el formazán por 10 min. Finalmente, la absorbancia fue medida a 570 nm en un lector de microplaca (Filter Max F5 Multimode Microplate reader, California, EUA) (Bong Lee *et al.*, 2004).

2.4.3 Morfología de los osteoblastos humanos sembrados en las matrices porosas de quitina determinada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de los osteoblastos humanos empleando las matrices porosas de quitina como andamios fue observada mediante SEM. Después de 21 días de proliferación

celular, los materiales de quitina cultivados con osteoblastos humanos fueron lavados con amortiguador de fosfatos y se fijaron en 2% de formaldehído durante 4 h. Posteriormente, los andamios fueron lavados con buffer de fosfatos, se deshidrataron con un gradiente de solución de etanol (30, 40, 50, 70, 80, 90 and 100%) dos veces durante 15 min. Después del lavado final con solución de etanol al 100%, las muestras se secaron al punto crítico con CO₂. Finalmente se fijaron con carbono coloidal y se recubrieron con oro.

2.5 Análisis Estadístico

El programa NCSS en versión 7.0 (NCSS Inc., USA) se empleó para evaluar la significancia entre los tratamientos evaluados. Las medias se compararon con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey Kramer ($P \leq 0.05$).

El modelo de Gompertz (Ecuación 3) ajustó los datos experimentales de consumo de glucosa, biomasa y concentración de celulosa (P)

$$P = P_{\max} \exp\left(-b \exp^{-(\mu t)}\right) \quad (\text{Ec. } 3)$$

donde P_{\max} es la producción máxima de biomasa o celulosa o el consumo de glucosa, b es un parámetro no biológico relacionado con la condición inicial del cultivo, μ es la tasa de producción o consumo, y t es el tiempo de cultivo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Absorción del dióxido de carbono por los hidrogeles de quitina

La masa promedio de los hidrogeles antes del proceso de espumado fue de 5.36 ± 0.44 g, un grosor de 1.78 ± 0.22 mm y un diámetro de 5.94 ± 0.33 cm. Al evaluar el efecto del disolvente (agua y MeOH) en la formación de las matrices porosas a partir de hidrogeles de quitina a una temperatura y presión constante (353 K y 175 bar) se apreciaron diferencias significativas en masa y diámetro al interactuar con el scCO_2 , después del proceso de espumado, con respecto a los valores mencionados inicialmente. El comportamiento antes mencionado también se observó en los materiales obtenidos a diferentes temperaturas y presiones. En la tabla 2 se muestran los cambios registrados en los materiales después del proceso de espumado donde se puede observar que el grosor fue el parámetro que menos cambios presentó en los diferentes tratamientos; mientras que la masa y el diámetro final de las matrices presentaron cambios relativamente significativos en todos los tratamientos. Los cambios descritos anteriormente se atribuyeron a la interacción que se lleva a cabo entre la mezcla supercrítica del CO_2 - co-disolvente (metanol o agua) con los hidrogeles de quitina durante la exposición de estos, la cual es dependiente de las condiciones de temperatura y presión (Tsiptsias y Panayiotou, 2008; Tsiptsias *et al.*, 2008).

En el presente estudio, mediante la técnica de pérdida de masa se determinó la cantidad de CO_2 absorbido por el material durante el proceso de espumado. En la figura 9A y 9B, se pueden apreciar las curvas representativas de desorción de las matrices S_A y S_M a 25 °C. En dichas curvas se aprecian dos regiones distintas, la parte lineal superior representa la desorción combinada de CO_2 y la pérdida de humedad, mientras que la parte lineal inferior corresponde sólo a la pérdida de masa debida a la humedad. La regresión lineal de ambas zonas permitió conocer la masa del CO_2 absorbido mediante la sustracción de éstas. En las figuras 9C y D se muestra la representación gráfica de dicha desorción en unidades de masa (g) (eje Y) notándose una mayor pérdida en la matriz sumergida en MeOH (S_M) respecto a la que se sumergió en agua (S_A).

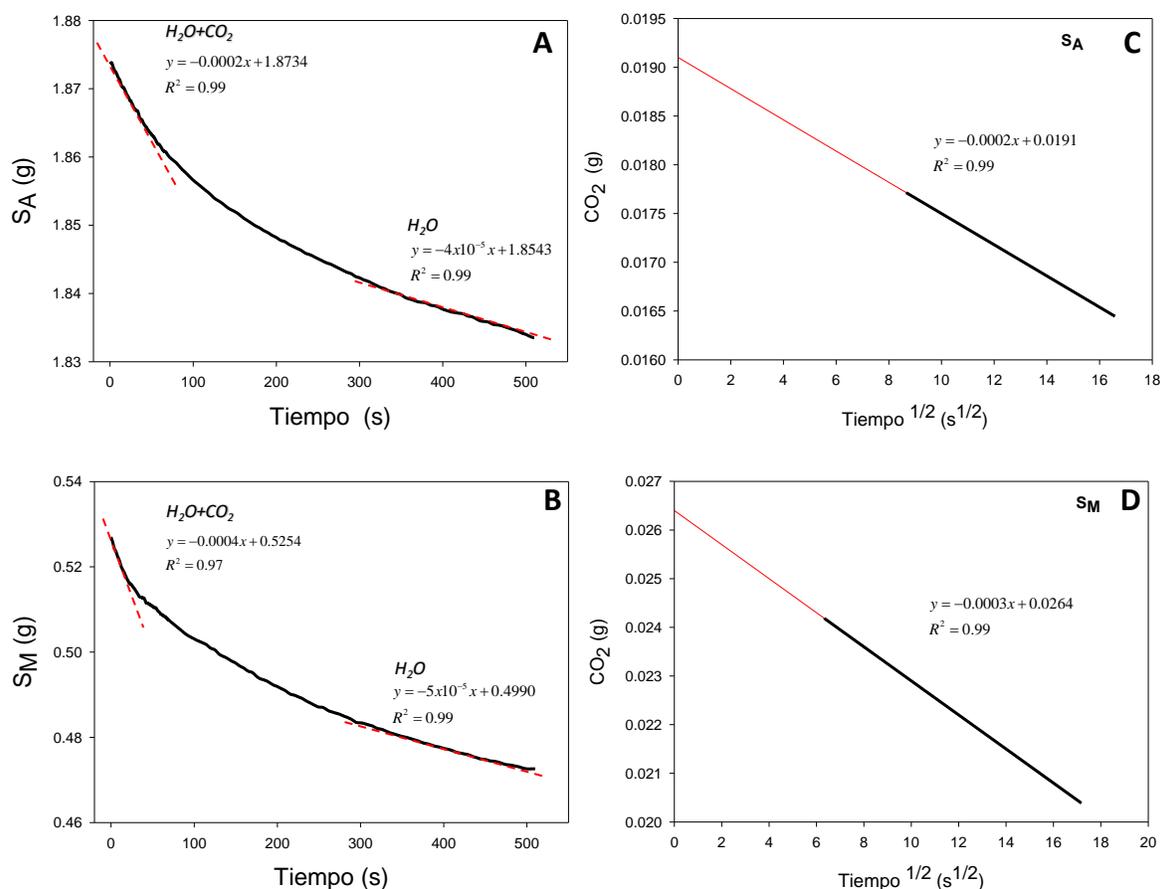


Figura 9. Curva representativa de desorción de S_A y S_M (A y B) y pérdida de masa debida a la desorción del CO_2 en ambos materiales (C y D) a 353 K y 175 bar.

Un comportamiento similar a lo mencionado anteriormente fue reportado por Tsiptsias y Panayiotou (2008) quienes en su estudio observaron que, al producir materiales porosos de quitina, estos presentaron una reducción en el diámetro y pérdida de masa empleando agua y MeOH como co-disolventes después de su procesamiento con $scCO_2$.

Tabla 2. Características físicas y químicas evaluadas en las matrices de quitina S_A y S_M después del espumado con $scCO_2$ a 353 K y 175 bar.

Matriz	Parámetros									
	Masa (g)	Diámetro (cm)	Grosor (mm)	I_{CR} (%)	D_{ap} (nm)	DA (%)	Ángulo de contacto (θ)	Hinchamiento (%)	Erosión (%)	Módulo de Young (MPa)
S_A	4.28 ± 0.75^a	4.65 ± 0.19^a	1.23 ± 0.10^a	88.5	5.67	83.9 ± 0.2^b	94.03 ± 7.61	218.6 ± 2.7	10.7 ± 0.9	37.9 ± 8.2
S_M	1.09 ± 0.08^b	3.63 ± 0.08^b	1.24 ± 0.09^a	73.7	3.96	84.4 ± 0.5^b	31.94 ± 5.98	326.7 ± 2.5	22.4 ± 3.4	14.4 ± 1.4

Las letras diferentes en las columnas significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).

Tabla 3. CO_2 absorbido en las matrices S_M a diferentes temperaturas y presiones durante el proceso de espumado.

Presión (Bar)	Temperatura (K)	CO_2 Absorbido (mg)	Capacidad de absorción de agua (g H_2O · g matriz ⁻¹)
175	298	2.6	2.16 ± 0.02^b
	313	1.7	2.35 ± 0.16^b
	353	16.6	2.99 ± 0.12^a
175	353	18.5	3.49 ± 0.72^a
200		2.3	2.60 ± 0.29^b
250		1.4	1.98 ± 0.04^c
300		1.6	2.10 ± 0.28^c

Las letras diferentes en las columnas significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).

En un posterior estudio, Tsiptsias *et al.* (2009) reportaron la producción de materiales porosos de carbón y quitina a partir de hidrogeles evaluando el efecto de alcoholes como disolventes, apreciando que al sustituir el agua por disolventes como el MeOH se favorece la absorción del CO₂, obteniendo estructuras porosas que, después del tratamiento, presentaron una pérdida de masa y encogimiento reflejándose en el peso y el diámetro final. En la tabla 3 se puede observar la cantidad de CO₂ absorbido durante el proceso de producción de materiales porosos al evaluar diferentes temperaturas y presiones notándose que a 353 K y 175 bar las matrices presentaron una mayor absorción respecto a los otros tratamientos (Anexo 4).

3.2 Estructura química de las matrices porosas de quitina

Al analizar un estándar de quitina pura se apreciaron las bandas características de ésta, observándose la región del estiramiento CO que se encuentra a los 1085, 1125 y 1160 cm⁻¹. La región de estiramiento del grupo C=O de la amida I como doblete se encuentra entre 1620 y 1660 cm⁻¹ en α -quitina. La flexión NH de la amida II se puede apreciar a los 1560 cm⁻¹ para α -quitina. Los estiramientos, asimétrico y simétrico del grupo funcional NH se pueden apreciar a los 3250 y 3167 cm⁻¹, respectivamente. Los estiramientos de los grupos OH se aprecian a los 3460 cm⁻¹ y de CH son observados a los 2877 cm⁻¹. En los polímeros, una banda característica es el enlace glucosídico el cual se muestra desde 895 cm⁻¹ en α -quitina (Kumirska *et al.*, 2010; Aranday-García *et al.*, 2017).

Al comparar los espectros de infrarrojo del estándar de quitina con las matrices obtenidas, se pudo apreciar que los materiales muestran las bandas características de la quitina. En la figura 10 se muestra el espectro de infrarrojo de los tratamientos evaluados con diferentes disolventes, en ellos se pueden distinguir las bandas características asignadas al estiramiento del grupo CO a los 1068 y 1153 cm⁻¹ que corresponden a la estructura del polisacárido (Tsiptsias *et al.*, 2009; Lui *et al.*, 2016); a los 1620 cm⁻¹ se aprecia una banda debida al estiramiento del grupo C=O de la amida I, a los 1556 cm⁻¹ se encuentra la banda asignada a la flexión NH de la amida II, también se observa a los 3258 cm⁻¹ una banda asignada al estiramiento asimétrico del grupo

NH y finalmente se notaron bandas a los 3434 y 2918 cm^{-1} propias de los estiramientos de los grupos OH y CH, respectivamente (Tsiopstias *et al.*, 2009; Chakravarty *et al.*, 2018). La banda característica del enlace glucosídico se muestra alrededor de los 897 cm^{-1} , la cual indica la presencia de α -quitina (Kumirska *et al.*, 2010).

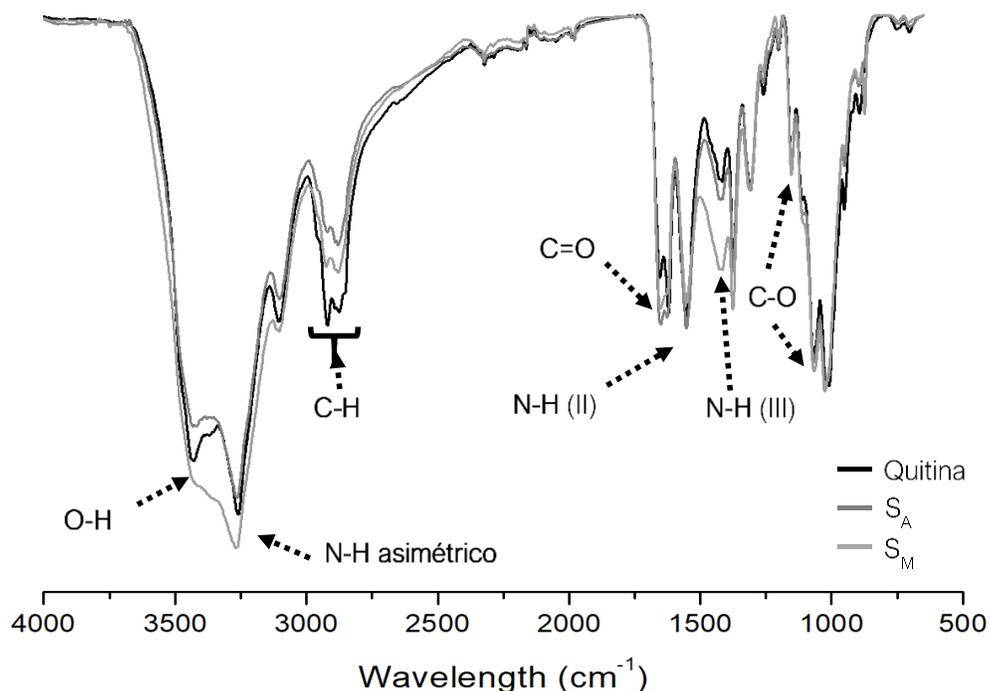


Figura 10. Espectros de infrarrojo de quitina, S_A y S_M después del tratamiento con ScCO_2 .

La quitina es un polímero que muestra diferentes polimorfos, debidos a los arreglos de las cadenas en las regiones cristalinas: la α -quitina tiene una estructura antiparalela, la β -quitina tiene una estructura paralela con enlaces de hidrógeno entre las cadenas, y la γ -quitina es una combinación de α -quitina y β -quitina, por lo que dicha estructura tiene cadenas con orientación paralela y antiparalela (El Knidri *et al.*, 2018). Las diferencias entre los polimorfos de quitina ofrecen diferentes propiedades; por ejemplo, la β -quitina es más soluble en disolventes orgánicos, también es más susceptible a la desacetilación que la α -quitina.

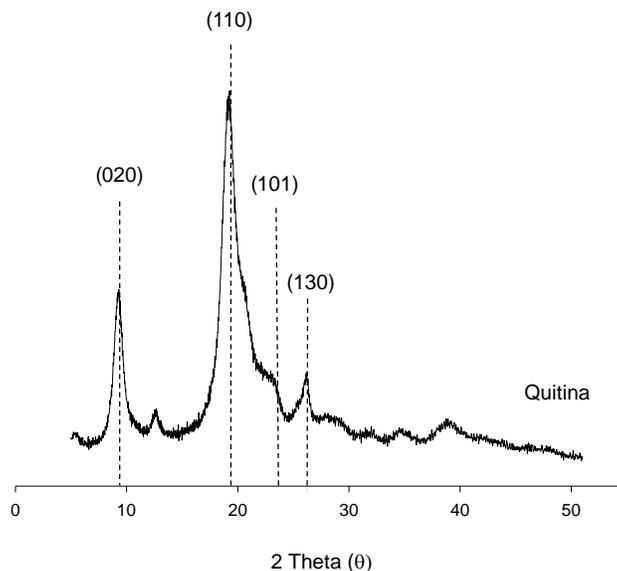


Figura 11. Patrón de difracción de quitina pura.

Kumirska *et al.* (2010), reportaron los picos característicos en el patrón de difracción de rayos X de la quitina, presentes en la quitina pura empleada en el presente estudio (figura 11). Las reflexiones (020) y (110) en 2θ alrededor de $9-10^\circ$ y de $20-21^\circ$, respectivamente; son muy intensas; mientras que, las de (101) y (130) en $21-26^\circ$ son de muy baja intensidad (Kumirska *et al.*, 2010). La quitina empleada en esta investigación presenta un índice de cristalinidad del 89.1%, un tamaño aparente de cristal de 7.44 nm y un grado de acetilación de $99.8 \pm 0.4\%$.

En la figura 12 se observan los patrones de difracción de rayos X de las matrices tratadas con agua y MeOH que, al compararlas con el estándar de quitina, se aprecia que ambos materiales conservan el pico de mayor reflexión de la quitina ($2\theta = 19-20^\circ$); mientras que, el segundo pico característico ubicado en 2θ entre $9-10^\circ$ es de menor intensidad en el material tratado con MeOH. Lo anterior se atribuyó a la baja cristalinidad que presenta la quitina al ser espumada empleando MeOH como disolvente del CO_2 en estado supercrítico. Dicha postulación concordó con lo reportado por Tsiptsias y Panayiotou (2008), quienes en su estudio observaron que el metanol facilitó la solubilidad del CO_2 en los materiales de quitina de cangrejo, favoreciendo la absorción y la interacción del CO_2 con las moléculas del polímero al

romper los enlaces inter e intramoleculares de las cadenas y modificar así el arreglo cristalino.

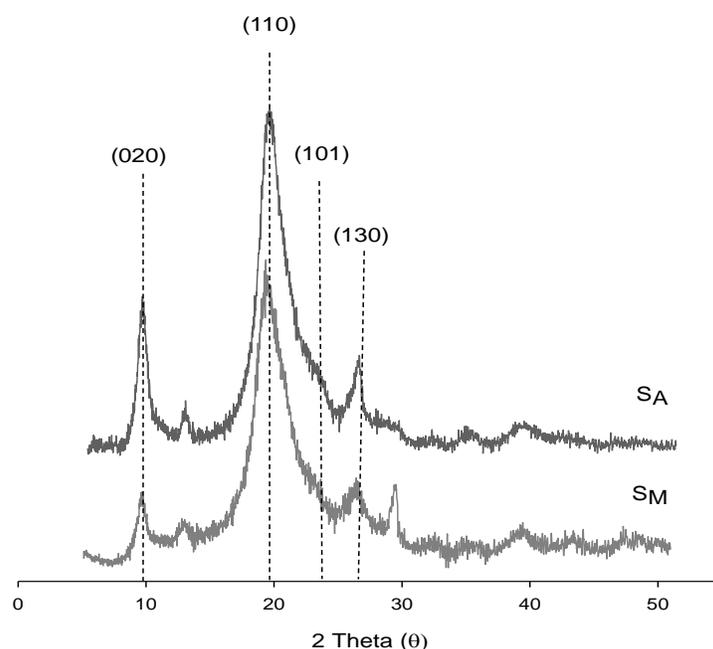


Figura 12. Patrones de difracción de rayos X de quitina y de las matrices porosas S_A y S_M .

En la figura 13, se aprecian los patrones de difracción de rayos X de las matrices porosas obtenidas a diferentes temperaturas y presiones con el estándar de quitina pura. Los materiales porosos obtenidos a diferentes temperaturas muestran más intensa su reflexión característica ($2\theta = 19-20^\circ$); sin embargo, la reflexión en 2θ entre $9-10^\circ$ disminuye en intensidad conforme aumenta la temperatura. Respecto a la presión, se presenta un efecto inversamente proporcional, lo cual se atribuyó a la escasa interacción entre las moléculas de CO_2 y la quitina bajo la forma de hidrogel debido a que, al incrementar la presión, las cadenas presentan una menor separación dificultando así la penetración de CO_2 y la estructura se mantiene intacta (Ye *et al.*, 2018). Por lo tanto, en el presente estudio se ha observado que tanto la temperatura como la presión presentan un efecto en la interacción entre el CO_2 y las cadenas de quitina a nivel molecular, tal como lo han reportado diversos autores.

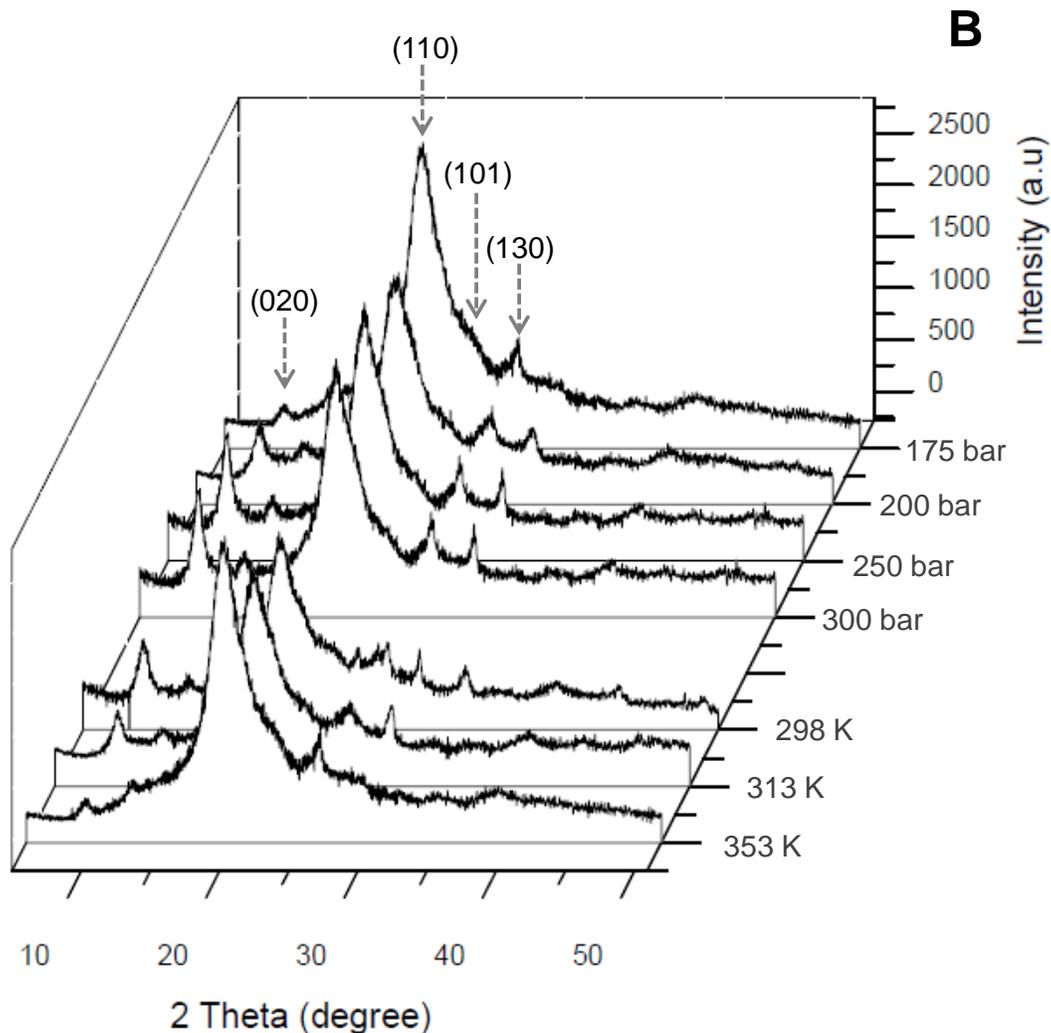


Figura 13. Patrones de difracción de rayos X de las matrices S_M obtenidas a diferentes condiciones de temperatura y presión.

En la tabla 4 se muestran detalles sobre la estructura cristalina final (índice de cristalinidad y tamaño aparente de cristal) de los materiales porosos obtenidos al usar diversas temperaturas y presiones después del proceso de espumado. Se pudo apreciar que el índice de cristalinidad y el tamaño de cristal aparente presentó cambios. Por otro lado, se analizó el grado de acetilación (DA) el cual también mostró cambios significativos mediante la comparación múltiple de medias por Tukey- Kramer en los tratamientos de presión y temperatura presentando una mayor desacetilación en las matrices porosas obtenidas a 353 K y a 175 bar con respecto a la quitina sin

tratamiento (Tabla 4). En un estudio reciente, Villa- Lerma *et al.* (2016) reportaron que el procesamiento de materiales mediante fluidos supercríticos favorece la desacetilación de polímeros como la quitina.

Comparando el DA de la muestra control con las matrices obtenidas, se apreció una reducción en dicho parámetro que va del 9% hasta el 22%. Villa- Lerma *et al.* (2016) reportaron cambios significativos en el I_{CR} y el DA, observando en este último una reducción de hasta el 25% en las muestras de quitina procesadas a diferentes temperaturas y presiones empleando 1,1,1,2-tetrafluoroetano como gas con respecto a la muestra control empleada (quitina sin tratamiento).

3.3 Caracterización superficial

3.3.1 Efecto del disolvente en la morfología de las matrices porosas de quitina

Morfológicamente, S_A mostró una superficie rugosa con presencia de poros distribuidos en forma heterogénea en toda la matriz de quitina (figura 14A). Así mismo, en algunas zonas de S_A se observó la formación de “grietas” (flechas negras) en la superficie que podrían beneficiar el crecimiento de microorganismos al permitir el almacenamiento de nutrientes (figura 14C). Mientras tanto, S_M mostró una superficie aún más rugosa que la de S_A y los poros observados en este material están mejor distribuidos en toda la superficie (figura 14B), lo cual se corroboró con las determinaciones de porosidad ($S_M = 62 \pm 0.71\%$ y $S_A = 21 \pm 7.03\%$) y las imágenes de SEM (figura 16B). Los poros también se hacen evidentes en la parte interna en S_M mostrando así la formación de poros interconectados (figura 14D).

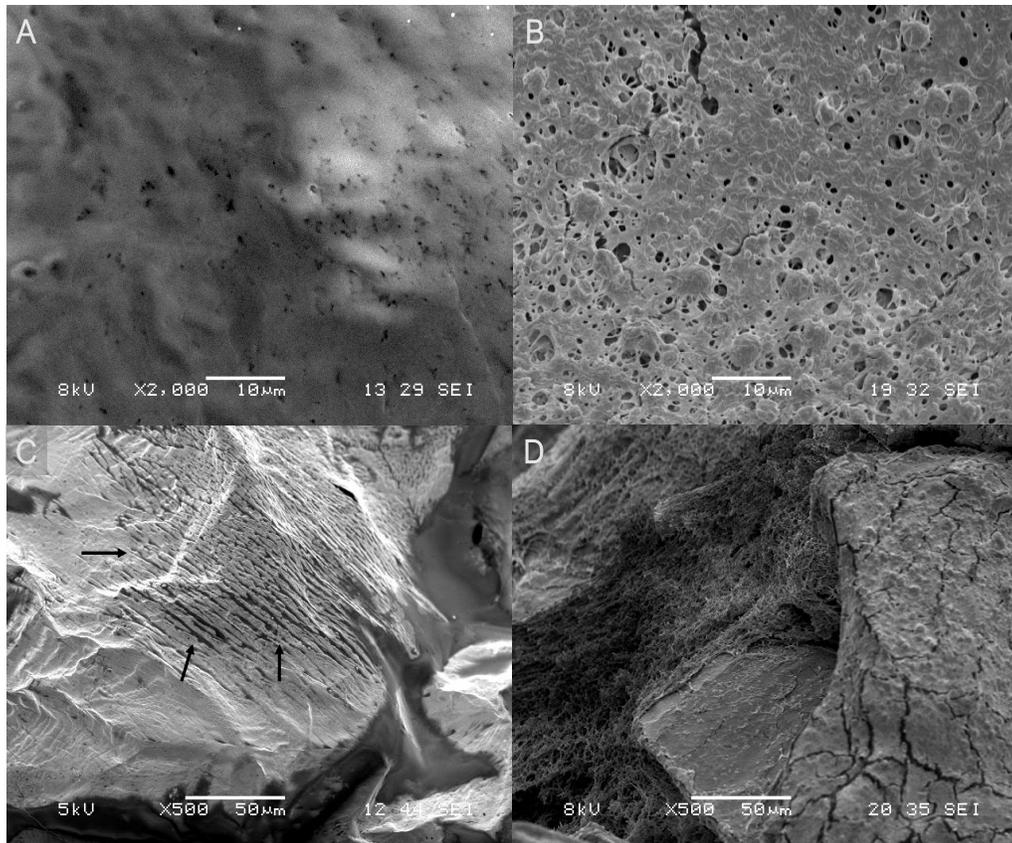


Figura 14. Micrografías de las matrices de quitina obtenidas a partir de hidrogeles sumergidos en MeOH y agua después del proceso con $scCO_2$. S_A (A: superficial, C: transversal); S_M (B: superficial, D: transversal).

La porosidad y el diámetro de poro son parámetros importantes que le confieren diversas características a las matrices porosas, como lo es la adecuada absorción de líquidos. Mediante las micrografías de SEM se realizó un conteo de poros formados en los materiales S_A y S_M apreciándose una mayor formación de poros en la matriz S_M , que es 1.58 veces más significativo que en la matriz S_A (figura 15).

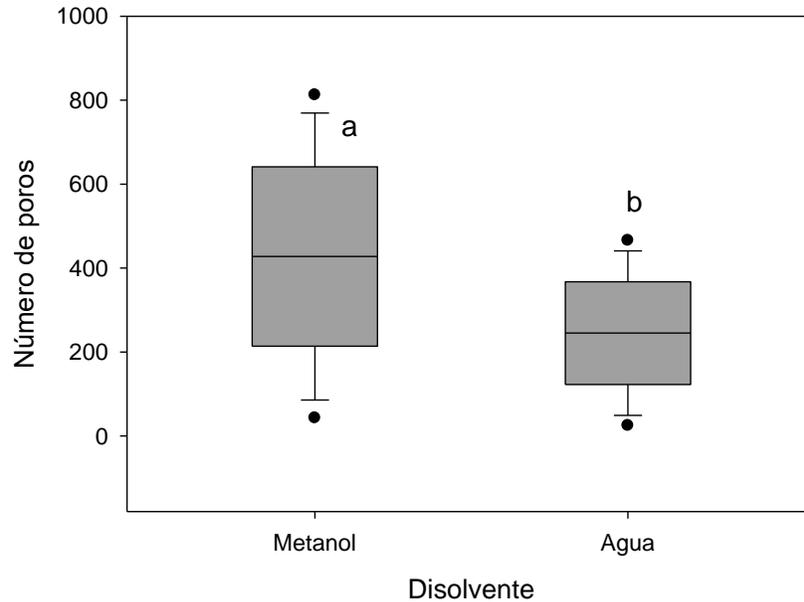


Figura 15. Diagrama de caja-bigotes de los poros formados en los materiales S_A y S_M después del proceso de espumado con $ScCO_2$. Las letras significan que son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) mediante la prueba de Tukey- Kramer (10 mediciones de cada material).

La matriz S_M presentó una porosidad de 62 ± 0.71 % y un diámetro de poro promedio de 0.96 ± 0.88 μm ; mientras que, S_A mostró una porosidad de 21 ± 7.03 % y un diámetro de poro promedio de 1.44 ± 2.40 μm notándose que el material M presentó una porosidad 3 veces mayor que la producida en el material A (figura 16A). En un estudio reciente, Diaz- Gómez *et al.* (2016) reportaron una porosidad similar a la observada en el presente estudio al producir andamios híbridos de policaprolactona-almidón, mencionando que sus mejores tratamientos presentaron una porosidad entre 62 y 64%.

El software empleado para el conteo de poros también proporcionó una distribución de los diámetros de los poros formados debido a la presencia del CO_2 en cada uno de los hidrogeles procesados. Se observó que la matriz M cuenta con una distribución de poros heterogénea tal como se aprecia en la figura 16B, en la cual predominan diversos valores de diámetros; a diferencia de la matriz A donde predominaron en mayor porcentaje los poros con diámetro entre 0.5 y 1.0 μm (figura 16B).

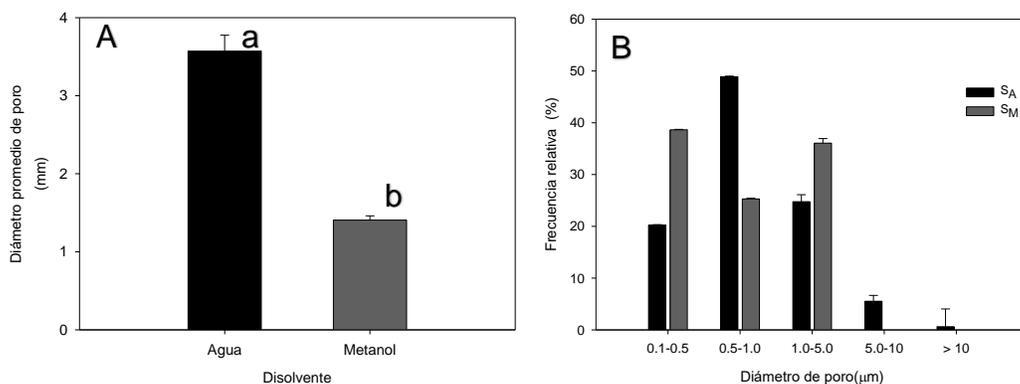


Figura 16. Diámetro promedio (A) y distribución de los poros (B) formados en las matrices de quitina procesados con agua y metanol. Las letras diferentes significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).

Se ha observado que la formación de poros en hidrogeles procesados mediante scCO_2 favorece fenómenos como la absorción (Chengdong *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016; Moghadam *et al.*, 2017) por lo que en el presente estudio se analizó dicho parámetro encontrándose que S_M presentó una mayor absorción la cual fue de $3.02 \pm 0.32 \text{ g agua} \cdot \text{g matriz}^{-1}$ respecto a S_A ($1.27 \pm 0.08 \text{ g agua} \cdot \text{g matriz}^{-1}$) y se atribuyó a la formación de poros que, al ser mayor en S_M , favoreció la absorción y retención de dicho líquido en la matriz porosa de quitina.

3.3.2 Efecto de la temperatura en la morfología de las matrices porosas de quitina

En diversos estudios se ha reportado que la temperatura tiene un efecto significativo en la producción de materiales espumados mediante fluidos supercríticos (Moghandam *et al.*, 2017; Yen *et al.*, 2018; Tai *et al.*, 2007). En el presente trabajo se analizó la morfología de las matrices M obtenidos a diferentes temperaturas, notándose una superficie rugosa con formación de múltiples poros de diferentes diámetros (figura 17).

En la figura 17A y 17B se observa que a 298 K los poros formados en la superficie son muy pequeños al igual que en la zona interna del material con un diámetro de poro promedio de $1.70 \pm 0.04 \mu\text{m}$, mientras que, en general el material tuvo una porosidad de $53 \pm 4.38 \%$. Esto concuerda con lo reportado por Ye *et al.* (2018), quienes en su estudio observaron que a temperatura ambiente se favoreció la formación de poros con

diámetro pequeño en materiales de policaprolactona-poli (óxido de etileno). Moghandam *et al.* (2017) han reportado que a temperaturas inferiores a 45 °C el material en cuestión no fluidifica completamente, por lo que la solubilidad en el polímero es baja y, por lo tanto, de porosidad inapropiada; mientras que, a temperaturas superiores a 45 °C, el polímero se fluidifica por completo, lo que aumenta la penetración de CO₂ en el polímero y provoca un incremento de la porosidad, no obstante, la distribución del diámetro de poro del material en este trabajo no fue uniforme.

A 313 K se apreció la formación de poros de diversos diámetros distribuidos en la superficie; no obstante, en la zona transversal la formación de poros fue uniforme alcanzando un diámetro de poro promedio de $2.02 \pm 0.14 \mu\text{m}$ y una porosidad de $33 \pm 2.57 \%$ (figura 17C y 17D). Los materiales obtenidos a 353 K presentaron una morfología similar a las de los tratamientos anteriores con una porosidad de $59 \pm 3.07 \%$ y un diámetro de poro promedio de $2.83 \pm 0.04 \mu\text{m}$; sin embargo, la formación de poros en la superficie y en la zona interna se aprecian uniformes e interconectados (figura 17E y 17F). Yen *et al.* (2018) observaron un comportamiento similar al producir matrices porosas de mezclas de policaprolactona / poli-(óxido de etileno), notando que al emplear temperaturas mayores a 25 °C se obtenían materiales con un tamaño de poro mayor. Por otro lado, Tai *et al.* (2007) al producir andamios de poli-(ácido DL-láctico-ácido co-glicólico) notaron que al incrementar la temperatura ($< 55 \text{ }^\circ\text{C}$) se formaron poros abiertos lo cual atribuyeron a la alta difusión que presentó el CO₂ en el polímero. En la figura 18A se puede observar que, al incrementar la temperatura, se tuvo un efecto significativo en el diámetro de poro promedio de las matrices de este trabajo.

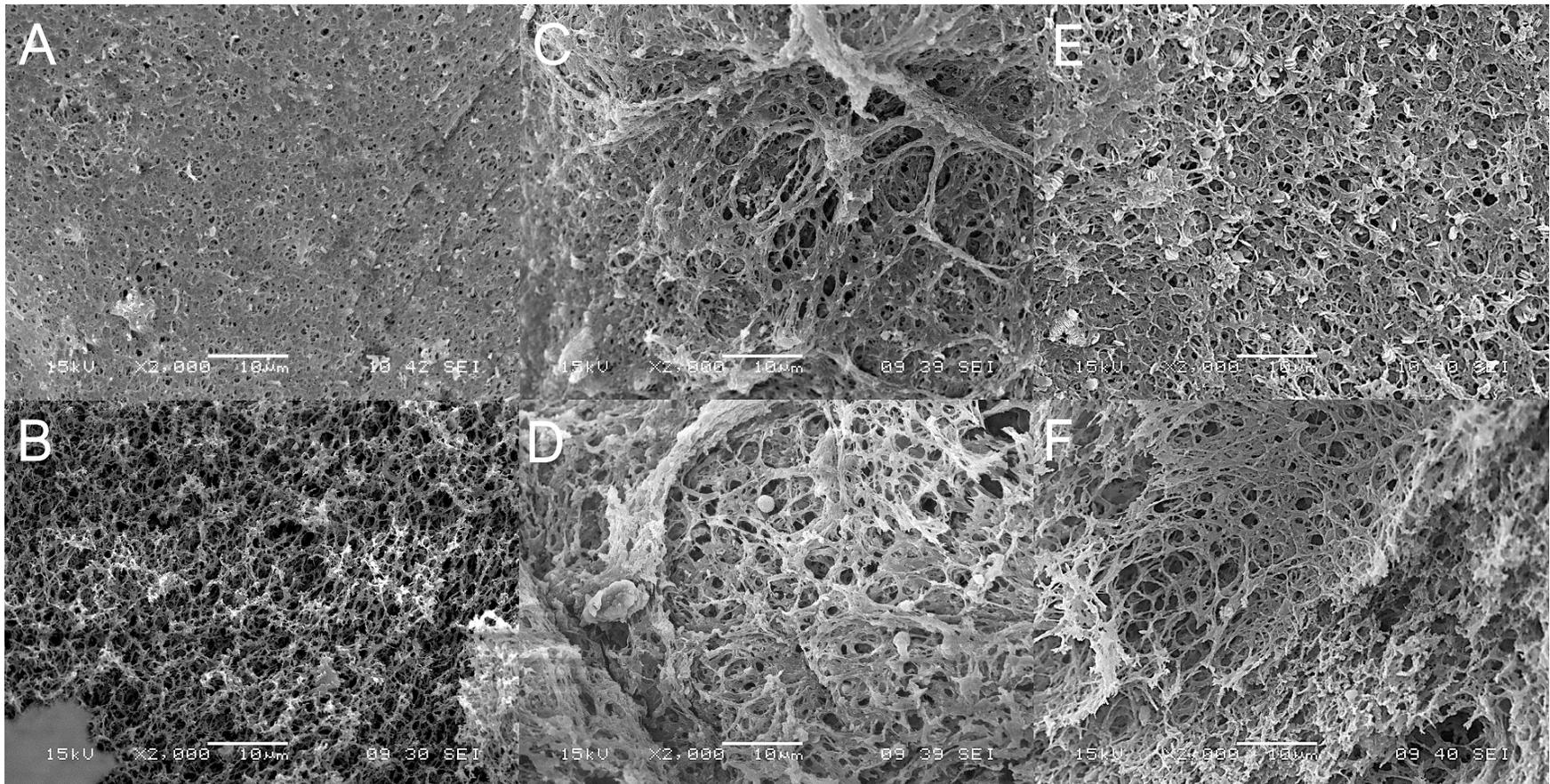


Figura 17. Micrografías de las matrices porosas de quitina después de $scCO_2$ a diferentes temperaturas. Superficial: (A) 298 K, (C) 313 K, (E) 353 K; transversal: (B) 298 K, (D) 313 K, (F) 353 K.

La distribución de los diámetros de poro en los materiales tiende a ser dispersa en los tres tratamientos; sin embargo, a 298 K se observó que la mayor parte de los poros producidos presentaron un diámetro entre 0.1 y 0.5 μm . A 313 K, la mayor parte de los poros formados en el material presentaron un diámetro entre 0.5 y 1.0 μm al igual que en la matriz tratada a 353 K (figura 18B).

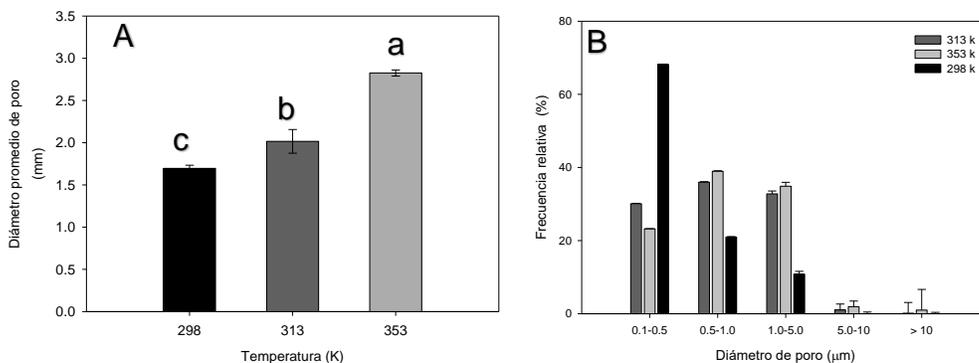


Figura 18. Diámetro promedio (A) y distribución de los poros (B) formados en las matrices porosas procesadas a diferentes temperaturas. Las letras diferentes significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).

Después del tratamiento con scCO_2 a distintas temperaturas, se observó que, conforme se incrementa la porosidad, también la capacidad de absorción por lo que a 353 K se presentó una mayor absorción ($2.99 \pm 0.12 \text{ g agua} \cdot \text{g matriz}^{-1}$) respecto al resto de los tratamientos evaluados.

3.3.4 Efecto de la presión en la morfología de las matrices porosas de quitina

El proceso de espumado empleando scCO_2 permite producir materiales porosos 3D cuya estructura (porosidad, distribución del tamaño de poro e interconectividad) depende de los parámetros del proceso (White *et al.*, 2012). Superficialmente, las matrices porosas obtenidas a diferentes presiones cuentan con la rugosidad adecuada para sustentar el crecimiento y supervivencia de los microorganismos. En la figura 19, se observa la superficie de cada uno de los materiales, donde se puede apreciar que estos poseen una formación de poros uniforme en la superficie de tipo cerrado. Las

matrices aquí obtenidas empleando 200, 250 y 300 bar presentaron poros superficiales de diámetro pequeño de tipo cerrado (figura 19C, E, G); por el contrario, los materiales obtenidos a 175 bar presentaron poros superficiales con diámetro uniforme (figura 19A) y en la zona interna, estos se mostraron interconectados (figura 19B). En el resto de los tratamientos se observan poros de tipo cerrado con diámetros mayores y diversas zonas con poros abiertos (destruidos) donde no se alcanza a apreciar la formación de poros interconectados. La presencia de poros interconectados es importante para la aplicación de las matrices porosas como andamio celular, ya que permite que estas penetren en el interior de la matriz, y así se promueva la biocompatibilidad y el crecimiento de los tejidos (Savaris *et al.*, 2019).

Se ha reportado que la presión en sistemas supercríticos tiene un efecto significativo en la producción de soportes porosos el cual se ve reflejado en la porosidad y el diámetro de poro promedio de los materiales. En la figura 20A se aprecia el diámetro de poro promedio de los tratamientos evaluados, el cual disminuye conforme va incrementando la presión. Lo anterior concuerda con lo reportado por Moghamad *et al.*, (2017) quienes al producir andamios de policaprolactona observaron que al incrementar la presión se produjo un decremento en el diámetro de poro promedio asumiendo que a medida que se aumenta la presión también incrementa la temperatura de fusión y, en consecuencia, la viscosidad de la policaprolactona disminuye favoreciendo así una menor interacción entre el CO₂ y el polímero.

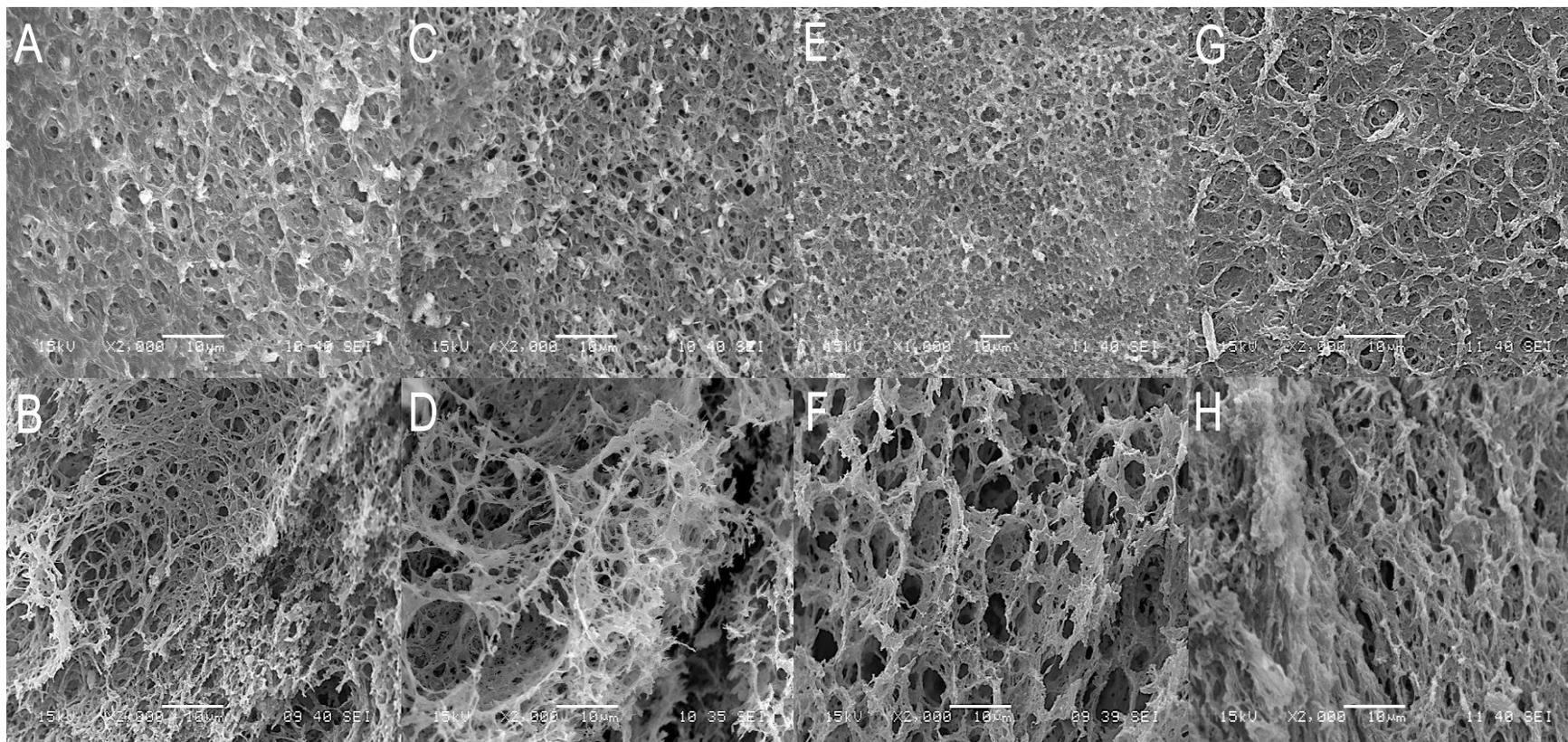


Figura 19. Micrografías de las matrices de quitina obtenidas a partir de hidrogeles M después de ScCO₂ a diferentes presiones. 175 bar (A: superficial, B: transversal); 200 bar (C: superficial, D: transversal); 250 bar (E: superficial, F: transversal); 300 bar (G: superficial, H: transversal)

Yen *et al.* (2018) reportaron un comportamiento similar en su estudio, notando que al aumentar la presión a más de 15 MPa se apreció un decremento el diámetro de poro en los materiales de policaprolactona / poli (óxido de etileno) lo cual atribuyeron a la movilidad de las cadenas moleculares del polímero que a presiones menores de 10 MPa es débil dificultando la penetración del CO₂. En la figura 20B se aprecia la distribución del diámetro de poros producidos al despresurizar el reactor, apreciándose que a mayor presión el diámetro de los poros formados se encuentra entre 0.1 y 0.5 μm y a medida que este parámetro va disminuyendo los poros que se produjeron presentaron un incremento en el diámetro; de este modo, los materiales S_M obtenidos con 175 bar presentaron, en mayor proporción, poros con un diámetro entre 1.0 y 5.0 μm.

De acuerdo con lo reportado por Tsiptsias y Panayiotou (2008) las interacciones entre el MeOH, como disolvente, y el CO₂ son las responsables de la porosidad de los materiales; mientras que, las interacciones entre el polímero y el CO₂ son las responsables de la estructura porosa que adquieren los hidrogeles después de su procesamiento. Las matrices obtenidas en este estudio presentaron diversas porosidades al evaluar diferentes presiones notándose una mayor porosidad en los materiales obtenidos a 175 bar (62 ± 5.33 %) seguido de los materiales a 200 y 250 bar (44 ± 1.89 %) y finalmente aquellos tratados a 300 bar (47 ± 9.77 %); mientras que, los materiales porosos evaluados a 175 bar (3.49 ± 0.72 g agua · g matriz⁻¹) presentaron una mayor absorción (1.60 veces mayor) respecto a los otros tratamientos por lo que la matriz S_M obtenida con 175 bar presenta una estructura adecuada que podría sustentar la proliferación de células al emplearse como andamio en ingeniería de tejidos (Díaz- Gómez *et al.*, 2016).

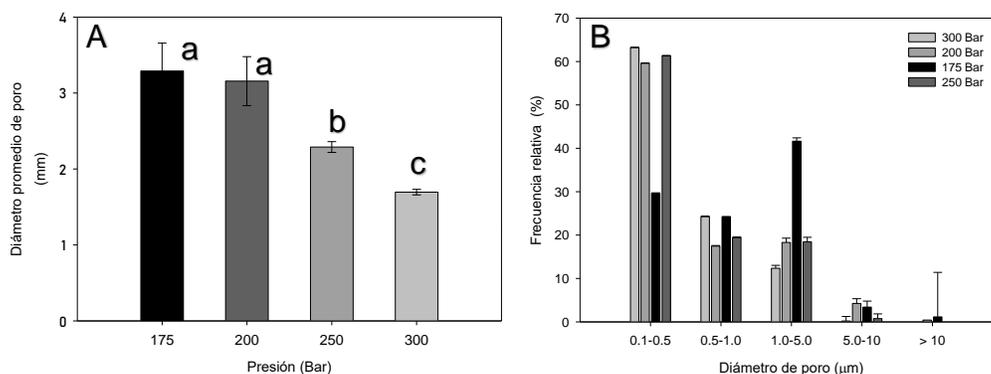


Figura 20. Diámetro promedio (A) y distribución de los poros (B) formados en las matrices procesadas a diferentes presiones. Las letras diferentes significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).

3.3.5 Hinchamiento, erosión, y ángulo de contacto

El ángulo de contacto permite conocer si una superficie es hidrofóbica o hidrofílica. La quitina es considerada un polímero de carácter hidrofóbico debido a los enlaces intra e intermoleculares (Casadidio et al., 2019) por lo cual no presenta solubilidad en agua ni en soluciones orgánicas más que en sistemas de *N*-dimetilacetamida en combinación con cloruro de litio (El Knidri *et al.*, 2018). En el presente estudio, se analizó la superficie de los materiales porosos obtenidos en cada uno de los tratamientos. En la figura 21 se puede apreciar que la gota de agua mantiene una forma esférica muestra control de quitina ($\theta = 100.05 \pm 3.10$), lo cual se atribuyó al carácter hidrofóbico de la quitina aun en forma de hidrogel. Las matrices obtenidas con diferentes disolventes a temperatura y presión constantes presentaron diferencias debidas a la formación de poros durante el proceso de espumado, para S_M que presentó una mayor porosidad que S_A , mostró un bajo ángulo de contacto significativamente (tabla 4). Los cambios mencionados son atribuidos a la rápida

absorción de la gota en la superficie de la matriz; mientras que, la gota permaneció en la superficie debido a la presencia de menos poros en S_A (figura 21).

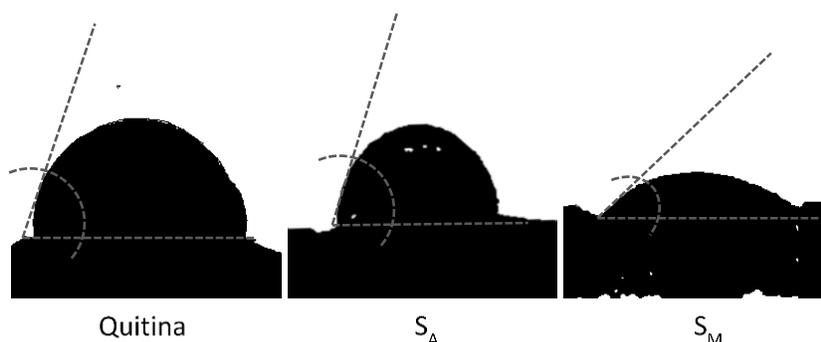


Figura 21. Determinación del ángulo de contacto de las matrices porosas de quitina obtenidas después del proceso de espumado con $ScCO_2$ empleando agua y MeOH como disolventes.

Las determinaciones de hinchamiento y erosión se observan en la figura 22, las cuales corroboran las diferencias mencionadas donde S_M presenta un mayor porcentaje de hinchamiento y erosión que S_A . Lo anterior concuerda con lo reportado por Ji *et al.* (2011), quienes al producir andamios de quitosano a partir de hidrogeles entrecruzados con glutaraldehído y genipina observaron que el tratamiento que exhibió un menor hinchamiento fue aquel cuya estructura carecía de porosidad.

Las variaciones en temperatura y presión en las matrices S_M influyeron en las determinaciones de ángulo de contacto observándose diferencias significativas (Anexo 6) en los tratamientos. Al aumentar la temperatura, el ángulo de contacto disminuyó en la superficie de las matrices S_M (tabla 4). En los tratamientos a diferentes presiones, se observó un efecto contrario presentándose un menor ángulo de contacto en las matrices S_M tratadas a 175 bar (tabla 4).

Tabla 4. Determinaciones de ángulo de contacto de las matrices S_M de quitina obtenidas después del proceso de espumado con $scCO_2$.

	Temperatura (K)			Presión (Bar)			
	298	313	353	175	200	250	300
Masa (g)	0.87 ± 0.14 ^a	0.91 ± 0.05 ^a	0.51 ± 0.09 ^b	0.52 ± 0.07 ^a	0.42 ± 0.02 ^c	0.45 ± 0.005 ^c	0.48 ± 0.02 ^b
Diámetro (cm)	4.53 ± 0.08 ^a	5.08 ± 0.12 ^a	4.55 ± 0.05 ^a	4.55 ± 0.05 ^a	4.43 ± 0.05 ^b	4.37 ± 0.08 ^b	4.58 ± 0.10 ^a
Grosor (mm)	1.10 ± 0.28 ^a	1.28 ± 0.15 ^a	1.21 ± 0.16 ^a	1.21 ± 0.16 ^b	1.19 ± 0.22 ^b	1.36 ± 0.13 ^a	1.46 ± 0.16 ^a
I_{CR} (%)	82.6	85.0	67.3	71.5	87.2	85	84.4
D_{ap} (nm)	3.9	5.7	3.4	4.89	5.58	5.92	5.42
DA (%)	90.5 ± 0.4 ^b	88.2 ± 0.4 ^c	84.8 ± 0.3 ^d	77.7 ± 0.2 ^d	87.8 ± 0.2 ^c	89.4 ± 0.2 ^b	90.2 ± 0.6 ^b
Ángulo de contacto (θ)	52.47 ± 4.48 ^c	79.91 ± 1.58 ^b	11.82 ± 2.41 ^a	37.46 ± 5.2 ^a	46.78 ± 5.9 ^b	56.20 ± 8.1 ^c	55.14 ± 2.8 ^c
Hinchamiento (%)	302 ± 3.5 ^c	324.7 ± 2.6 ^b	377 ± 1.1 ^a	355.1 ± 2.1 ^a	302.2 ± 3.1 ^b	245.8 ± 0.8 ^c	208.4 ± 0.6 ^d
Erosión (%)	14.2 ± 3.0 ^c	17.4 ± 0.9 ^b	20.6 ± 1.0 ^a	28.1 ± 3.3 ^a	25.5 ± 0.5 ^a	20.8 ± 0.9 ^b	19.5 ± 0.3 ^b
Módulo de Young (MPa)	43.1 ± 3.6 ^c	27.6 ± 4.7 ^b	12.5 ± 1.6 ^a	10.5 ± 3.0 ^c	20.4 ± 5.3 ^b	24.8 ± 6.9 ^b	41.9 ± 10.8 ^a

Las letras diferentes en las filas significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).

El hinchamiento de los materiales depende de aspectos como la porosidad del soporte, y de la estructura del material (cristalino o amorfo) (Moghadam *et al.*, 2017). La porosidad en biomateriales es un factor importante ya que influye en la aplicación de estos de estos; así mismo, la despresurización del reactor juega un papel clave ya que si ésta es alta entonces la formación de burbujas es rápida produciéndose así una gran cantidad de sitios de nucleación (White *et al.*, 2012). A continuación, se muestra en la Tabla 4 el porcentaje máximo de hinchamiento y de erosión de las matrices obtenidas por tratamientos con diferentes temperaturas y presiones donde se puede apreciar que el comportamiento en hinchamiento se encuentra en función del incremento de la porosidad; mientras que, los cambios en la erosión se atribuyeron a la estructura cristalina obtenida después del proceso de espumado con CO₂ (Anexo 7). Villa-Lerma *et al.* (2016) reportaron que la presión es un factor crítico para la modificación de la estructura cristalina en el procesamiento de polímeros tales como la quitina mediante SCF.

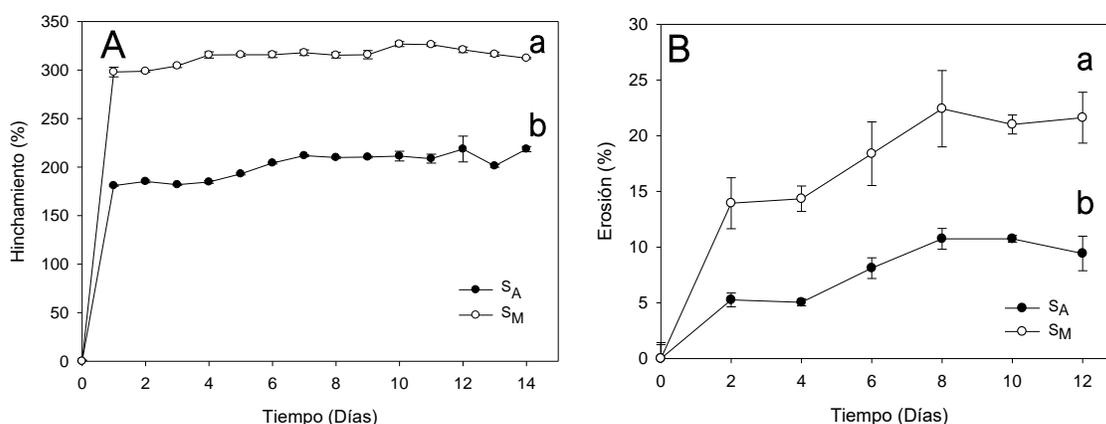


Figura 22. Perfil de hinchamiento (A) y de erosión (B) de las matrices porosas obtenidos empleando agua y metanol como disolventes. Las letras diferentes significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).

3.3.6 Propiedades mecánicas

Diversos autores han observado que la porosidad es un factor que juega un papel importante en las propiedades mecánicas y aplicaciones de materiales porosos (Bong Lee *et al.*, 2006; Moghamad *et al.*, 2017; Chakravarty *et al.*, 2018). Del mismo modo,

la despresurización es clave en la formación de poros tal como se menciona en la sección anterior.

El tipo de disolvente empleado presentó un papel importante en las propiedades mecánicas de los materiales tal como se aprecia en los perfiles de compresión de S_A y S_M (figura 23). Cabe destacar que S_M soportó una menor compresión fue respecto a S_A lo cual se atribuyó a la modificación de la estructura interna del mismo, ya que al tener una mayor porosidad se favoreció la fragmentación alcanzando un módulo elástico de 14.4 ± 1.4 MPa; mientras que, S_A alcanzó un módulo de 37.9 ± 8.2 MPa. Tal como lo menciona Ji *et al.* (2011), el módulo de compresión de los materiales depende de la naturaleza del material y el tamaño del poro.

En los anexos (anexo 8), se aprecia el perfil de deformación vs esfuerzo de las matrices S_M tratadas con diferentes temperaturas en el que se puede observar que el incremento de la temperatura tuvo un efecto en el esfuerzo de compresión. Cabe señalar que los materiales presentaron una menor deformación cuando la resistencia a la compresión fue menor; por lo que el módulo de Young también fue menor. En la tabla 4 se muestran los módulos elásticos alcanzados a diferentes temperaturas, las diferencias observadas se atribuyeron a las porosidades de los materiales. Esto es consistente con lo reportado por Ji *et al.* (2011) quienes reportaron un comportamiento similar al producir andamios de quitosano entrecruzados con glutaraldehído y genipina observando que los materiales presentaron un menor módulo elástico atribuyéndolo a la porosidad alcanzada debido a su procesamiento empleando CO_2 .

La presión también afectó las propiedades mecánicas de las matrices S_M , apreciándose que los materiales mostraron una menor deformación a mayor porosidad (Anexo 7). La matriz S_M tratada a 175 bar presentó un módulo de Young significativamente menor (tabla 4) que el resto de los tratamientos.

En diversos estudios se han reportado el uso de matrices porosas como andamios en ingeniería de tejidos para la proliferación de células como los fibroblastos de piel humana (Moghamad *et al.*, 2017) y las células madre mesenquimales humanas

(Chengdong *et al.*, 2011; Bong Lee *et al.*, 2004), donde se ha visto que tales matrices requieren propiedades mecánicas apropiadas para evitar la deformación bajo cargas fisiológicas con un módulo elástico superior a 10 MPa (Moghamad *et al.*, 2017), razón por la cual las matrices porosas producidas en el presente estudio podrían ser empleadas en el campo de la ingeniería de tejidos como andamios en la proliferación de células como los fibroblastos y osteoblastos (Liu *et al.*, 2016).

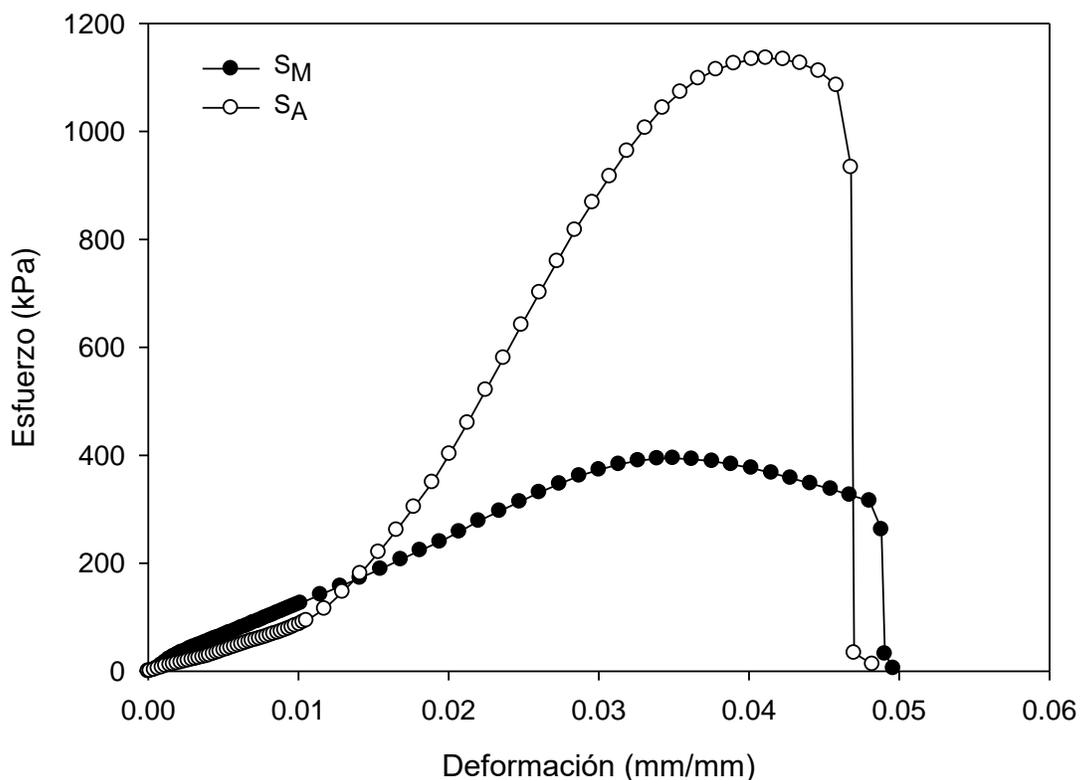


Figura 23. Curvas de esfuerzo-deformación de las matrices porosas de quitina obtenidas al emplear $scCO_2$ con agua y MeOH como disolventes a 353 K y 175 bar.

3.4 Cultivo celular y evaluación de las matrices de quitina en la proliferación de osteoblastos humanos

La viabilidad celular se evaluó por el método indirecto del ensayo MTT. El método MTT se basa en la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) por la enzima mitocondrial deshidrogenasa para formar cristales de formazán (Savaris *et al.*, 2019). En este trabajo se evaluó la viabilidad de osteoblastos

humanos en las matrices porosas de quitina empleados como andamios obtenidos mediante el proceso de espumado con $scCO_2$. Después de 2 días de incubación, se observó que el número de células no presentó diferencia significativa al crecer en ambos andamios. A los 7 días de incubación los osteoblastos siguieron proliferando en ambos materiales sin mostrar diferencias en ambos tipos de matrices; no obstante, al pasar 14 días las células incrementaron al doble tanto en el soporte S_M como en el S_A en comparación con los primeros 7 días incubación. Finalmente, a los 21 días de cultivo, el material poroso que permitió alcanzar una mayor proliferación celular fue el S_M obtenido a 175 bar y 353 K duplicando la densidad óptica lograda a los 14 días de incubación (figura 24).

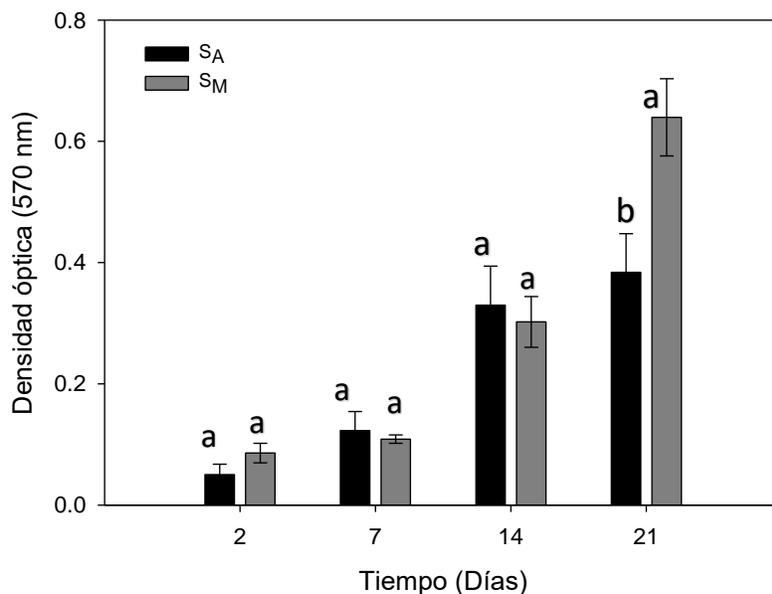


Figura 24. Proliferación celular de osteoblastos humanos incubados en matrices porosas de quitina producidos con $scCO_2$ empleando agua y MeOH como disolventes. Las letras diferentes en el histograma significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).

Lo anterior concuerda con lo reportado por Moghmad *et al.*, (2017) quienes al evaluar soportes porosos de policaprolactona de alto peso molecular e hidroxiapatita sobre la proliferación de células madre mesenquimales humanas de médula ósea, reportaron un incremento en la actividad metabólica de dichas células a través del tiempo lo cual atribuyeron a la biocompatibilidad del soporte empleado como andamio concluyendo

que el uso de materiales porosos promueven la proliferación y el crecimiento celular. Por su parte, Liu *et al.* (2016), observaron un incremento en el crecimiento celular de osteoblastos (MC3T3-E1) a través del tiempo el cual fue atribuido a la alta porosidad del soporte empleado como andamio que a su vez permitió que las células pudieran moverse libremente para tomar los nutrientes necesarios para su proliferación.

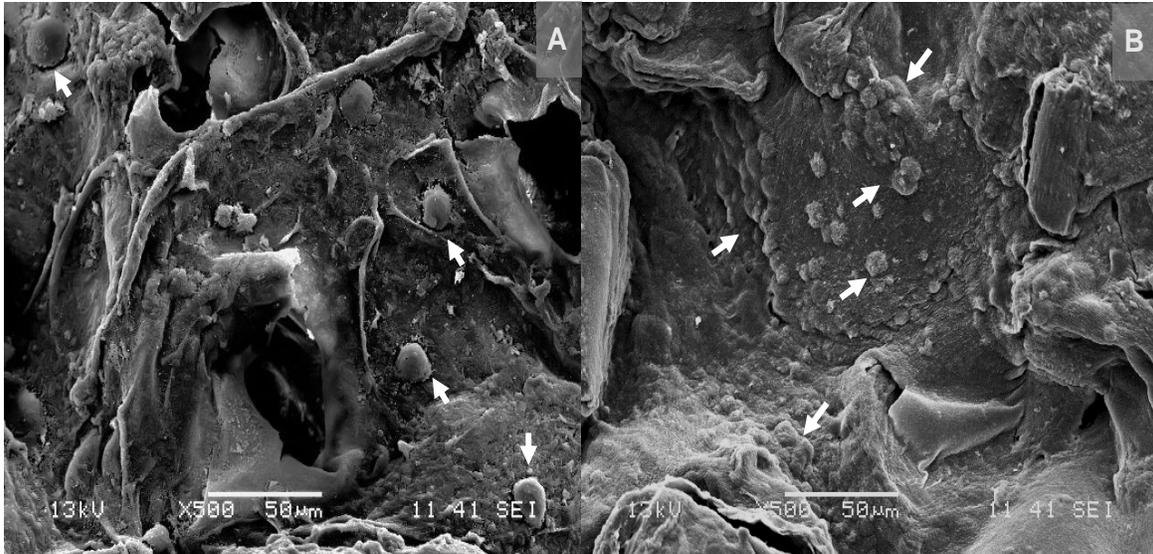


Figura 25. Micrografías de SEM de los osteoblastos humanos sembrados (flechas blancas) empleando matrices de quitina como andamios después de 21 días de cultivo. S_A (A) y S_M (B).

El tamaño de poro, la estructura interna y la interconectividad son propiedades que influyen en el comportamiento de un andamio. La morfología de los osteoblastos se estudió por microscopía electrónica de barrido. En la figura 25, se muestra la morfología del crecimiento celular después de 21 días en el cultivo sobre ambos andamios. Visiblemente, un mayor número de células se adhirieron al andamio S_M mostrando así la citocompatibilidad del material poroso permitiéndole a las células proliferar confirmándose así que la quitina favorece la estimulación del crecimiento y la viabilidad celular, además; estos resultados también evidencian que el empleo de matrices porosas de quitina como andamios producidos mediante el uso de $scCO_2$ hacen que este método de procesamiento sea compatible para la fabricación de andamios celulares.

4. CONCLUSIONES

El empleo de CO₂ en estado supercrítico permitió producir de manera eficiente matrices porosas de quitina logrando medir la desorción de dicho gas a través de la pérdida de masa del material. Se observó que el MeOH al emplearse como disolvente del CO₂ tuvo un efecto favorable en la formación de los soportes de quitina respecto al agua. Así mismo se determinó que tanto la presión como la temperatura tuvieron un efecto significativo en la formación de poros en los materiales evaluados. Por otro lado, la estructura química de la quitina empleada mostró cambios poco significativos en el espectro FTIR; no obstante, la estructura cristalina, el tamaño del cristal aparente y el grado de acetilación presentaron cambios relevantes al ser analizados mediante DRX y ¹H-RMN, respectivamente. Por lo tanto, la matriz S_M obtenida a 353 K y 175 bar resultó ser la mejor en cuanto a porosidad, diámetro promedio de poro e hinchamiento por lo que las matrices porosas de quitina producidas bajo estas condiciones fueron consideradas para posteriores aplicaciones haciendo factible el uso de los fluidos supercríticos empleando disolventes no tóxicos como el dióxido de carbono.

La producción de matrices porosas mediante fluidos supercríticos resultó eficiente al momento de aplicar estos materiales como sistemas de andamiaje en la proliferación de osteoblastos de periostio humano.

Es importante destacar que la porosidad y el diámetro de poro que presentaron las matrices S_M (353 K y 175 bar) desempeñaron un papel importante, el cual hizo factible su empleo al observarse un efecto significativo en la viabilidad de los osteoblastos durante 21 días de cultivo.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✎ Aranday-Garcia, R, Román Guerrero, A., Ifuku S., Shirai, K. (2017), Successive inoculation of *Lactobacillus brevis* and *Rhizopus oligosporus* on shrimp waste for recovery of chitin and added-value products, *Process Biochemistry*, 58: 12-24.
- ✎ Bong Lee, S., Han Kim, Y., Sang Chong, M., Moo Lee, Y. (2004)., Preparation and characteristics of hybrid scaffolds composed of β -chitin and collagen, *Biomaterials*, 25: 2309- 2317.
- ✎ Chakravarty, J., Fazlay Rabbi, Md., Bach, N., Chalivendra, V., Yang, C., Brigham, C. J. (2018), Fabrication of porous chitin membrane using ionic liquid and subsequent characterization and modelling studies, *Carbohydrate Polymers*, 198: 443-451.
- ✎ Chengdong, J., Nasim, A., Ali, K., Fariba, D. (2011), Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas CO₂, *Acta Biomaterialia*, 7: 1653- 1664.
- ✎ Diaz-Gómez, L., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., García-González, C. A. (2016), Growth factors delivery from hybrid PCL-starch scaffolds processed using supercritical fluid technology, *Carbohydrate polymers*, 142: 282-292.
- ✎ Duan, B., Huang, Y., Lu, A., Zhang, L. (2018), Recent advances in chitin-based materials constructed via physical methods, *Progress in Polymer Science*, 82: 1-33.
- ✎ El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., Lahsini, A. (2018), Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, 120: 1181-1189.
- ✎ Flores, R., Barrera, S., Shirai, K., Duran-de-Bazúa, C. (2006), Chitin Sponge, Extraction Procedure from Shrimp Wastes Using Green Chemistry, *Journal of Applied Polymer Science*, 3909-3916.
- ✎ Focher, B., Beltrame, P. L., Naggi, A. & Torri, G. (1990), Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications, *Carbohydrate polymers*, 12: 405- 418.

- ✎ Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczunski, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., Stepnowski, P. (2010), Application of spectronic methods for structural analysis of chitin and chitosan, *Marine Drugs*, 8: 1567-1636.
- ✎ Moghadam, M. Z., Hassanajilia, Sh, Esmaeilzadeh, F., Ayatollahi, M., Ahmadi, M. (2017), Formation of porous HPCL/LPCL/HA scaffolds with supercritical CO₂ gas foaming method, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 69: 115-127.
- ✎ Pillai, C.K.S, Paul, W. Sharma, C. (2009), Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation, *Progress in Polymer Science*, 34: 641-678.
- ✎ Savaris, M., Celi, C., Roesch-Elyb, M., Pêgas, J., Dos Santos V., Brandalisea R. (2019), Polyurethane/poly(D,L-lactic acid) scaffolds based on supercritical fluid technology for biomedical applications: Studies with L929 cells, *Materials Science & Engineering C*, 96: 539-551.
- ✎ Shen, X., Shamshina, J., Berton, P., Gurau, G., Rogers R. (2016), Hydrogels based on cellulose and chitin: fabrication, properties and applications, *Green Chemistry*, 18: 53-75.
- ✎ Tamura, H., Furuike, T., Nair, S.V., Jayakumar, R. (2011), Biomedical applications of chitin hydrogel membranes and scaffolds, *Carbohydrate Polymers*, 84: 820-824.
- ✎ Tsiptsias, C., Panayiotou, C. (2008), Foaming of chitin hydrogels processed by supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids*, 47: 302-308.
- ✎ Tsiptsias, C., Stefopoulos, A., Kokkinomalis, I., Papadopoulou, L., Panayiotou, C. (2008), Development of micro- and nano-porous composite materials by processing cellulose with ionic liquids and supercritical CO₂, *Green chemistry*, 10: 965- 971.
- ✎ Tsiptsias, C., Michailof, C., Staurooulos, G., Panayiotou, C. (2009), Chitin and carbon aerogels from chitin alcogels, *Carbohydrate Polymers*, 76:535-540.

- TSIOPTSIAS, C., PARASKEVOPOULOS, M., CHRISTOFILOS, D., ANDRIEUX, P., PANAYIOTOU, C. (2011), Polymeric hydrogels and supercritical fluids: The mechanism of hydrogel foaming, *Polymer*, 52: 2819-2826.
- TSIVINTZELIS, I., ANGELOPOULOU, A., PANAYIOTOU, C. (2007), Foaming of polymers with supercritical CO₂: An experimental and theoretical study, *Polymer*, 48: 5928- 5939.
- YE, J., LIAO, X., XIAO, W., LI, S., YANG, Q., LI, G. (2018), The effects of molecular weight and supercritical CO₂ on the phase morphology of organic solvent free porous scaffolds, *Journal of Supercritical Fluids*, 140: 279-289.
- VILLA-LERMA, G., GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, H., GIMENO, M., TROMBOTTO, S., DAVID, L., LFUKU, S., SHIRAI, K. (2016), Enzymatic hydrolysis of chitin pretreated by rapid depressurization from supercritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane toward highly acetylated oligosaccharides, *Bioresource Technology*, 209: 180-186.
- TAMURA, H., SAWADA, M., NAGAHAMA, H., HIGUCHI, T., TOKURA, S. (2006), Influence of amide content on the crystal structure of chitin, *Holzforchung*, 60: 480-484.
- LIU, M., ZHENG, H., CHEN, J., LI, S., HUANG, J., ZHOU, C. (2016), Chitosan-chitin nanocrystal composite scaffolds for tissue engineering, *Carbohydrate Polymers*, 152: 832-840.
- WHITE, L, HUTTER, V., TAI, H., HOWDLE, S., SHAKESHEFF, K. (2012), The effect of processing variables on morphological and mechanical properties of supercritical CO₂ foamed scaffolds for tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 8: 61- 71.
- TAI, H., MATHER, M., HOWARD, D., WANG, W., WHITE, L., CROWE, J., MORGAN, S., CHANDRA, A., WILLIAMS, D., HOWDLE, S., SHAKESHEFF, K. (2007), Control of pore size and structure of tissue engineering scaffolds produced by supercritical fluid processing, *European Cells and Materials*, 14: 64-77.
- TOKURA, S., NISHI, N., TAKAHASHI, K., SHIRAI, A., URAKI, Y. (1995), Novel drug delivery system by chitin derivative, *Macromolecular Symposia*, 99: 201- 208.

- ✎ Marin- Cervantes, M.C., Matsumoto, Y., Ramirez-Coutiño, L., Rocha-Pino, Z., Viniegra, G., Shirai, K. (2008), Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases, *Process Biochem.* 43 24–32.
- ✎ AlMarzooqi, F.A., Bilad, M.R., Mansoor, B., Arafat, H.A. (2016), A comparative study of image analysis and porometry techniques for characterization of porous membranes, *J. Mater. Sci.* 51 2017–2032.

ETAPA III

PRODUCCIÓN DE CELULOSA BACTERIANA EMPLEANDO
MATRICES POROSAS DE QUITINA COMO SOPORTE EN
CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO



1. INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles son redes poliméricas hidrofílicas tridimensionales que puede ser reticuladas física o químicamente y son capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos (Shen *et al.*, 2016). El uso de hidrogeles para el desarrollo de andamios poliméricos porosos ha mostrado tener un particular interés, debido a ello es que estos materiales presentan un amplio campo de aplicaciones de entre las cuales destacan los procesos de separación, como materiales de absorción, así como materiales biomédicos para hacer andamios (Tsiptsias *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2016). Debido a la importancia que han presentado los materiales porosos elaborados a base de polímeros, en el presente estudio se llevó a cabo la aplicación de matrices porosas S_M a base de quitina las cuales debido a las características fisicoquímicas que poseen (Chengdong *et al.*, 2011) fueron empleadas como sistema de andamiaje en la producción de BC en cultivo en estado sólido de *Gluconacetobacter xylinus*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

J.T. Baker (Estado de Ecatepec de México, México) suministró dextrosa anhidra, sulfito de sodio anhidro y monohidrato de ácido cítrico. BD Bioxon (Cuautitlan Izcalli, México) proporcionó extracto de levadura y agar bacteriológico. Peptona de caseína fue comprada con Dibico S.A. de C.V. (Cuautitlán Izcalli, México). Laboratorios Laitz (Ciudad de México, México) proporcionó carbonato de calcio. El fosfato de sodio dibásico anhidro, el hidróxido de sodio, el ácido clorhídrico, el hidrocloreuro de hidroxilamina, el ácido fosfórico, el cloruro férrico, el carbonato de calcio se compraron en Reactivos Química Meyer (Ciudad de México, México). Se adquirió ácido glucónico (solución al 53% en agua), ácido 3,5-dinitrosalicílico y el fluoróforo de calcofluor con Sigma-Aldrich (St. Louis, EE. UU.). El fenol se compró en Fermont (Nuevo León, México). La celulosa vegetal fue un obsequio de Derivados Macroquímicos (Ecatepec Morelos, México). El suero fetal bovino (FBS) se adquirió con Thermo Fisher Scientific (EUA), DMEM / F-12 ADCF DMEF con L-Glutamina y 15 mM HEPES se adquirió con Uniparts (Ciudad de México, México) 1% (v·v⁻¹) penicilina-estreptomina, 0.05% tripsina-EDTA, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, MTT. Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

2.2 Microorganismo y condiciones de cultivo

Gluconacetobacter xylinus ATCC 700187 fue resembrado en agar YGC #459 (Glucosa (50 g·L⁻¹), extracto de levadura (5 g·L⁻¹), y carbonato de calcio (12.5 g·L⁻¹) y agar bacteriológico (15 g·L⁻¹), se incubó a 30 °C durante 48 h y se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

2.3 Medio de cultivo

Se trabajó con el medio de cultivo reportado por Hestrin y Schramm (HS) el cual está compuesto por glucosa (20 g·L⁻¹), extracto de levadura (5 g·L⁻¹), fosfato de sodio dibásico anhidro (2.7 g·L⁻¹) y ácido cítrico monohidratado (1.15 g·L⁻¹) (1954).

2.4 Condiciones del cultivo en estado sólido empleando matrices porosas de quitina

Se llevaron a cabo microcultivos en placas de Petri y para ello se trabajó con matrices porosas cuyo volumen fue de 0.121 cm^3 y un peso seco inicial promedio entre $0.96 \pm 0.34 \text{ g}$. Previo a su uso, el medio de cultivo y las esponjas se esterilizaron. Se trabajó con un volumen de inóculo correspondiente al $15 \% (\text{v}\cdot\text{v}^{-1})$, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH inicial de 6 y una humedad relativa del 90% durante 6 días. Para la extracción de biomasa y celulosa, los microcultivos se sumergieron en H_2O di agitando cada 15 min durante 1 h hasta remover todo el cultivo de la matriz porosa. Posteriormente, se centrifugaron las muestras colectadas a 8000 rpm y $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min y se almacenaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Las determinaciones de biomasa y celulosa se realizaron mediante análisis gravimétrico.

2.5 Producción de celulosa empleando matrices porosas S_M y $15\% (\text{v}\cdot\text{v}^{-1})$ en cultivo en estado sólido

El medio de cultivo y el inóculo fueron absorbidos en las matrices S_M , se colocaron en placas de Petri a un pH inicial de 6.0. El cultivo se llevó a cabo a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y se realizó muestreo cada 4 h hasta las 24 h; posteriormente cada 24h hasta las 144 h. La biomasa y celulosa fueron determinadas como lo indica la sección 2.3.3.

2.6 Purificación de celulosa y caracterización

Se separó la biomasa de la celulosa mediante un tratamiento con solución de NaOH al $1\% (\text{p}\cdot\text{v}^{-1})$ a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 h. Después, se neutralizó con una solución de ácido acético al $5\% (\text{v}\cdot\text{v}^{-1})$. Finalmente, se lavó con agua destilada hasta pH 7 y se secó a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (Du *et al.*, 2018). Se analizó la estructura química de la celulosa mediante espectroscopia de infrarrojo a una longitud de onda entre $4,000\text{--}650 \text{ cm}^{-1}$ con 32 escaneos. La estructura cristalina fue analizada mediante difracción de rayos X de polvo y para ello la muestra seca se pulverizó y la intensidad de difracción se midió en 2θ entre 5 y 50° . El índice se calculó dividiendo la diferencia de las intensidades amorfa y cristalina; entre la intensidad cristalina multiplicado por 100 (Focher *et al.*, 1990). El

espectro de resonancia magnética nuclear (CP / MAS NMR) de polarización cruzada ^{13}C y ángulo mágico giratorio de BC se adquirió usando un espectrómetro (Avance II 300 Bruker BioSpin GmbH, Alemania) con un detector de banda ancha (BB-CPMAS) usando una resonancia frecuencia para ^{13}C de 75 MHz. Se utilizó un rotor de ZrO (óxido de circonio) de 4 mm de diámetro externo. El pulso de contacto fue de 1,5 ms (milisegundos), con una adquisición de 24,8 ms y un tiempo de espera entre repeticiones de 6 segundos. El espectro de BC se obtuvo con 4288 exploraciones, en un tiempo total de 7,14 h.

2.7 Análisis microscópicos

La proliferación bacteriana en las matrices porosas S_M de quitina se examinó mediante la tinción de células vivas y muertas. Las matrices sembradas con *G. xylinus* (4, 8, 12, 16, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h) se tiñeron empleando el kit de viabilidad bacteriana *Live/ Dead*TM *BacLight*TM (yoduro de propidio y SYTO 9) agregando 50 μL e incubándolas durante 15 min en ausencia de luz a 25 °C. Las muestras teñidas se visualizaron empleando un microscopio confocal (Olympus BX53, Japón). Las células vivas se tiñeron de verde fluorescente (SYTO 9) y las células muertas se tiñeron de rojo fluorescente (yoduro de propidio).

Por otro lado, para las observaciones mediante microscopía electrónica de barrido las muestras se fijaron en 2% ($\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$) de glutaraldehído durante 24 h a 4 °C. Posteriormente, se lavaron con amortiguador de fosfatos (pH 7.4, 0.1 M), y se tiñeron con 2% de tetraóxido de osmio en solución acuosa durante 2 h, y se volvieron a lavar con amortiguador de fosfatos (5 veces). Luego, se deshidrataron con un gradiente de solución de etanol (30, 40, 50, 70, 80, 90 and 100%) dos veces por 15 min. Después del lavado final con etanol al 100%, las muestras se secaron al punto crítico con CO_2 . Finalmente se fijaron con cinta de carbón y grafito coloidal y se recubrieron con oro previo a la visualización en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-7600F Fiel Emission, Tokio, Japón).

2.8 Análisis Estadístico

El programa NCSS en versión 7.0 (NCSS Inc., USA) se empleó para evaluar la significancia entre los tratamientos evaluados. Las medias se compararon con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey Kramer ($P \leq 0.05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Producción de celulosa bacteriana empleando matrices de quitina obtenidas mediante CO₂ en estado supercrítico.

Se evaluó el efecto de dos tipos de matrices de quitina en la producción de celulosa bacteriana en cultivo en estado sólido mediante microensayos. En la figura 26 se puede apreciar la producción de biomasa alcanzada a las 144 h. Empleando las diferentes matrices se pudo observar que al final del cultivo el soporte que favoreció un mayor crecimiento fue S_M alcanzando un máximo de 9.48 ± 0.52 g biomasa \cdot L⁻¹ el cual es 1.34 y 1.46 veces mayor a la producción de biomasa alcanzada con el material poroso S_A y con el hidrogel de quitina (control), respectivamente. La producción de celulosa, al igual que la biomasa, se vio favorecida al emplear el soporte S_M en SSC alcanzando una máxima producción de celulosa de 2.99 ± 0.32 g celulosa \cdot L⁻¹ la cual es 2.58 y 3.22 veces mayor a la producción alcanzada con la matriz S_A y el hidrogel control, respectivamente (figura 26).

Lo anterior se atribuyó a la porosidad que presentó la matriz S_M, la cual, al ser mayor que la de S_A y del hidrogel control, permitió una adecuada difusión del oxígeno a través de la matriz porosa facilitando así la biodisponibilidad de los nutrientes.

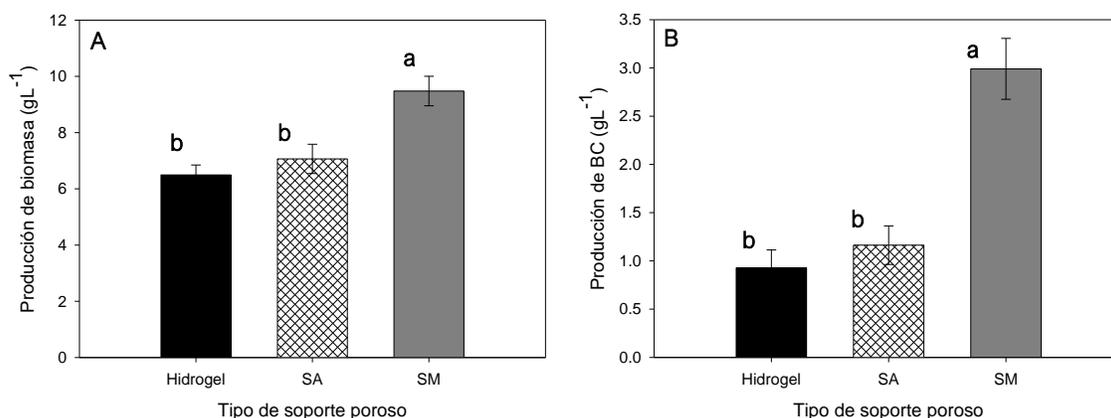


Figura 26. Producción de biomasa (A) y celulosa bacteriana (B) de *G. xylinus* empleando matrices de quitina en cultivo y 15% (v·v⁻¹) de inóculo inicial en estado sólido a las 144 h. Las letras diferentes en el histograma significan que son estadísticamente diferentes (Tukey-Kramer $p \leq 0.05$).

En la tabla 5, se observa una comparación de la producción de biomasa y celulosa al emplear diferentes matrices porosas como la espuma de poliuretano (etapa I) y las matrices porosas de quitina producidas en el presente estudio en cultivo en estado sólido. En este trabajo se obtuvo una mayor producción de biomasa la cual es 2.89 veces mayor respecto a la que reporta Quintana- Quirino (2015) empleando el cultivo sumergido. La producción de celulosa también resultó mayor usando matrices porosas de quitina (5.44 veces mayor) respecto a la que se reporta en cultivo líquido.

Tabla 5. Producción de biomasa y celulosa empleando *Gluconacetobacter xylinus* en cultivo en estado sólido y sumergido (SmC).

TIPO DE MATRIZ	CONCENTRACIÓN	
	(g Biomasa • L ⁻¹)	(g Celulosa • L ⁻¹)
Hidrogel	6.50 ± 0.35 ^b	0.93 ± 0.19 ^b
S _A	7.06 ± 0.52 ^b	1.16 ± 0.20 ^b
S _M	9.48 ± 0.52 ^a	2.99 ± 0.32 ^a
SmC	3.28 ± 0.02 ^c	0.55 ± 0.03 ^c

Las letras diferentes en las columnas significan que son estadísticamente diferentes (Tukey- Kramer $p \leq 0.05$).

Se evaluó la producción de biomasa y celulosa a través del tiempo empleando matrices porosas de quitina sumergidos en MeOH (S_M) con el 15 % (v • v⁻¹) de inóculo inicial durante 144 h. En la figura 27A se puede observar que durante las primeras 4 h el microorganismo se adaptó a las condiciones del medio de cultivo; posteriormente, la bacteria comenzó a crecer paulatinamente con una tasa de 0.035 h⁻¹, presentando su fase exponencial entre las 8 y 48 h logrando un máximo crecimiento de 8.94 g biomasa • L⁻¹ estimado por Gompertz (Anexo 9). Pasado este tiempo, *G. xylinus* detuvo su crecimiento debido a la ausencia de nutrientes comenzando así la fase estacionaria del cultivo manteniéndose constante hasta el final. El perfil de producción de celulosa a través del tiempo mostró un comportamiento similar a la producción de biomasa. La

bacteria comenzó a excretar celulosa pasadas las 8 h del cultivo con una tasa de 0.033 h^{-1} alcanzando su máximo a las 96 h (P_{max} de $3.43 \text{ g celulosa} \cdot \text{L}^{-1}$) (Anexo 10) manteniéndose constante hasta las 144 h (figura 27B).

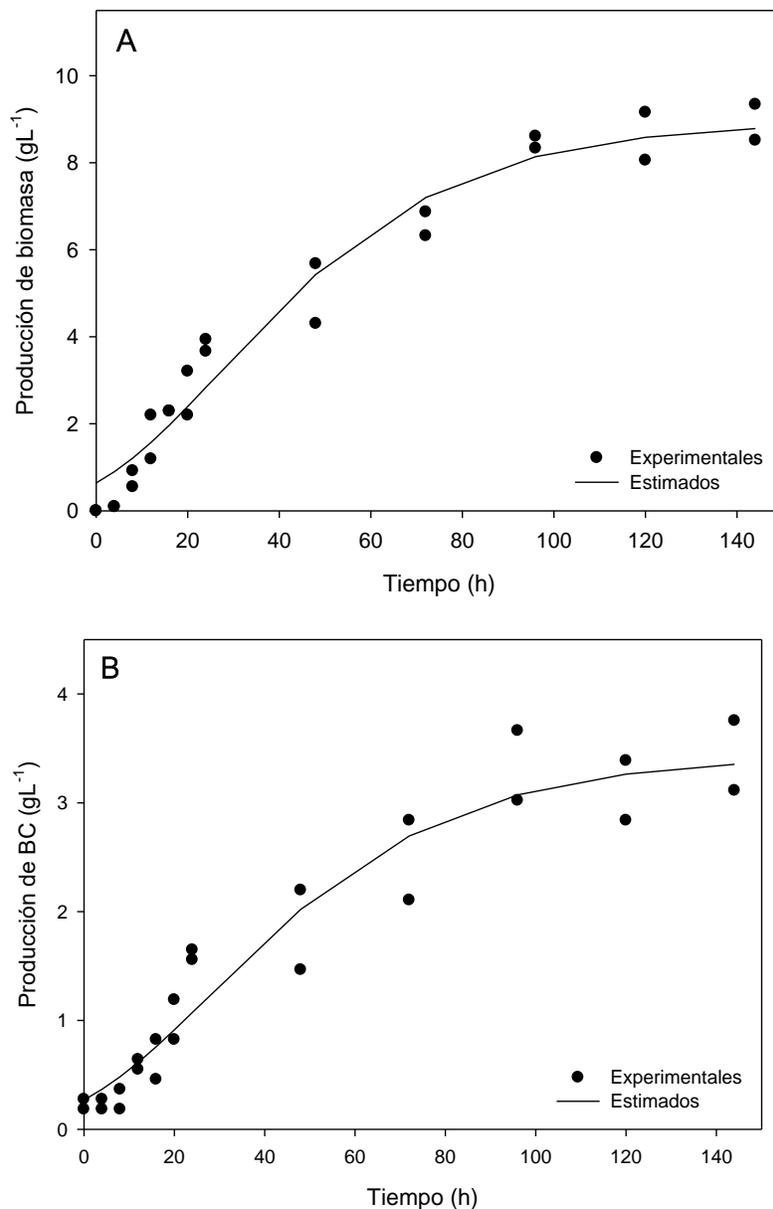


Figura 27. Producción de biomasa (A) y celulosa bacteriana (B) de *G. xylinus* empleando las matrices porosas S_M en cultivo en estado sólido y 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo inicial a las 144 h. Los datos experimentales se ajustaron empleando el modelo de Gompertz con un $R^2 > 0.96$ para la biomasa y 0.94 para la celulosa bacteriana.

En paralelo, al realizar la cinética de producción de celulosa bacteriana se estuvieron

realizando observaciones en microscopia confocal empleando el kit de viabilidad bacteriana *Live/ Dead*[™] BacLight[™] con el propósito de observar las bacterias vivas y muertas a través del tiempo al emplear las matrices porosas de quitina como soporte en el cultivo en estado sólido.

A las 4 h del cultivo se observó la presencia de células, las cuales se consideraron viables al mostrarse teñidas en color verde, indicativo de que la membrana celular de las bacterias permitió la absorción del colorante SYTO 9. Con el paso del tiempo, se apreció que la población bacteriana iba incrementando en la matriz porosa (8- 16 h) (figura 28). A las 24 h los microorganismos seguían apreciándose viables (verdes); sin embargo, a las 48 h, las bacterias no viables comenzaron a hacerse presentes ya que se pudo observar un incremento en las bacterias teñidas en color rojo (indicativo de no viabilidad). A las 72 h, la presencia de bacterias no viables, comenzaron a incrementar mientras que las viables aún se hacían presentes; no obstante, a las 120 h el microorganismo continuó creciendo, notando un ascenso en la presencia de bacterias viables manteniéndose constante hasta el final del cultivo (figura 5) atribuyendo este comportamiento al posible consumo de otros metabolitos como el ácido glucónico (Liu *et al.*, 2016).

En contraste, las observaciones obtenidas mediante microscopia confocal en cada tiempo mostraron una relación estrecha con el crecimiento bacteriano cuantificado (figura 27), cuando la bacteria comenzó su fase estacionaria y presentó su máximo crecimiento (entre las 72 y 120 h) se hizo más evidente el incremento en las células no viables con respecto a los tiempos inferiores.

Entre otros aspectos, la estructura química de la celulosa bacteriana se analizó mediante espectroscopia FTIR la cual al comparar con un estándar de celulosa vegetal mostró las bandas características de dicho polímero observándose la presencia de bandas a los 3341, 289, 1160 y 1029 cm^{-1} , las cuales se encuentran en las regiones características de la celulosa que van de los 3800 a los 2600, entre 1200 y 900 cm^{-1} ; que corresponden a las vibraciones de los grupos O-H, C-H, y C-O-C y C-O; respectivamente (Dayal *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2018). Adicionalmente, la muestra de

celulosa obtenida presentó una banda alrededor de los 1648 cm^{-1} que se encuentra en menor intensidad en el espectro del estándar. De acuerdo con Rani *et al.* (2011), dicha banda esta asignada a las moléculas de agua, esto se atribuye a que la celulosa de origen bacteriano tiene una mayor capacidad de absorción y retención, lo cual hace que esta atrape moléculas de agua entre sus cadenas mediante enlaces inter e intramoleculares (figura 29).

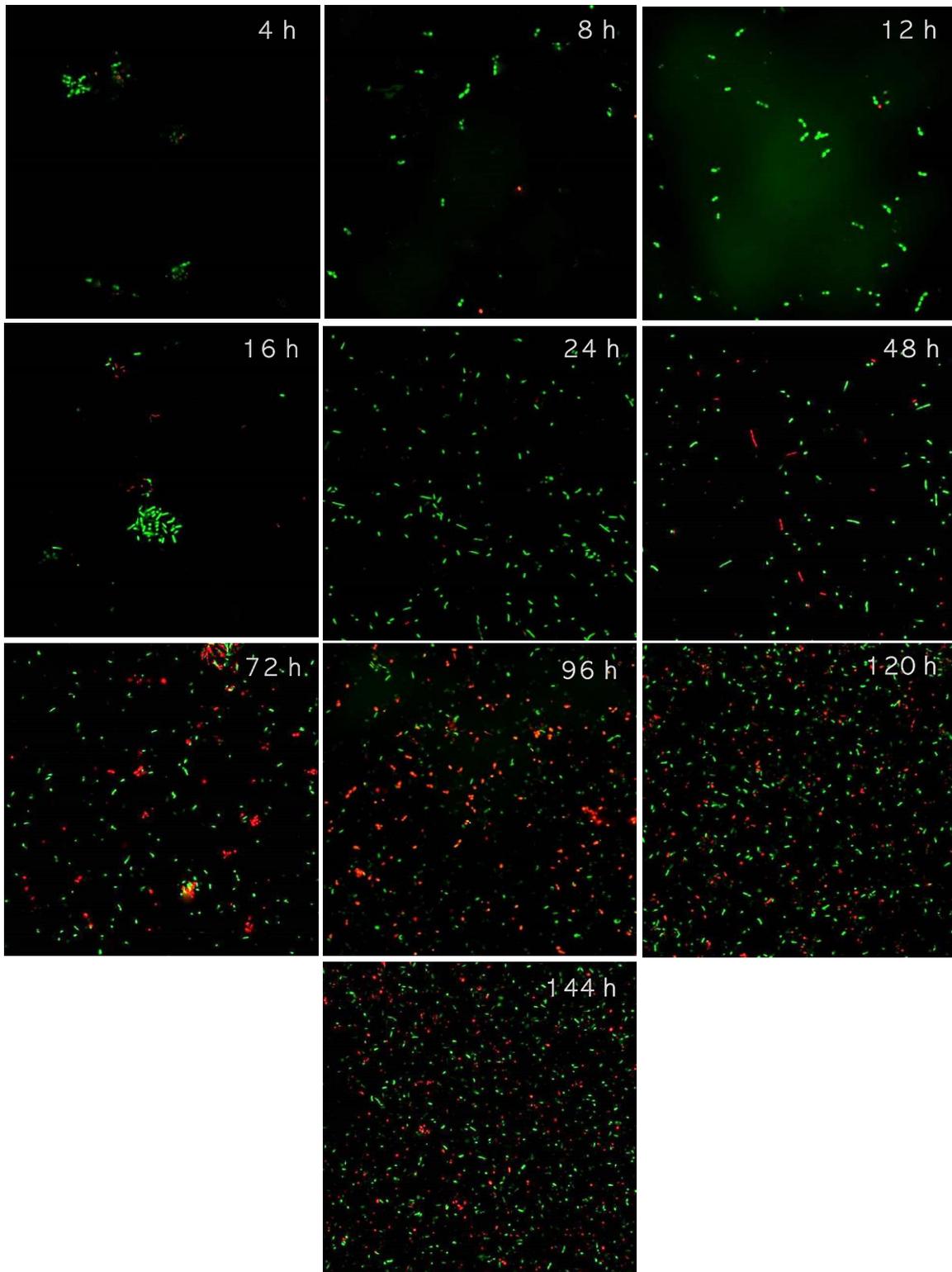


Figura 28. Imágenes de microscopía confocal de la viabilidad celular de *G. xylinus* empleando las matrices porosas S_M en cultivo en estado sólido y 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo inicial a las 144 h.

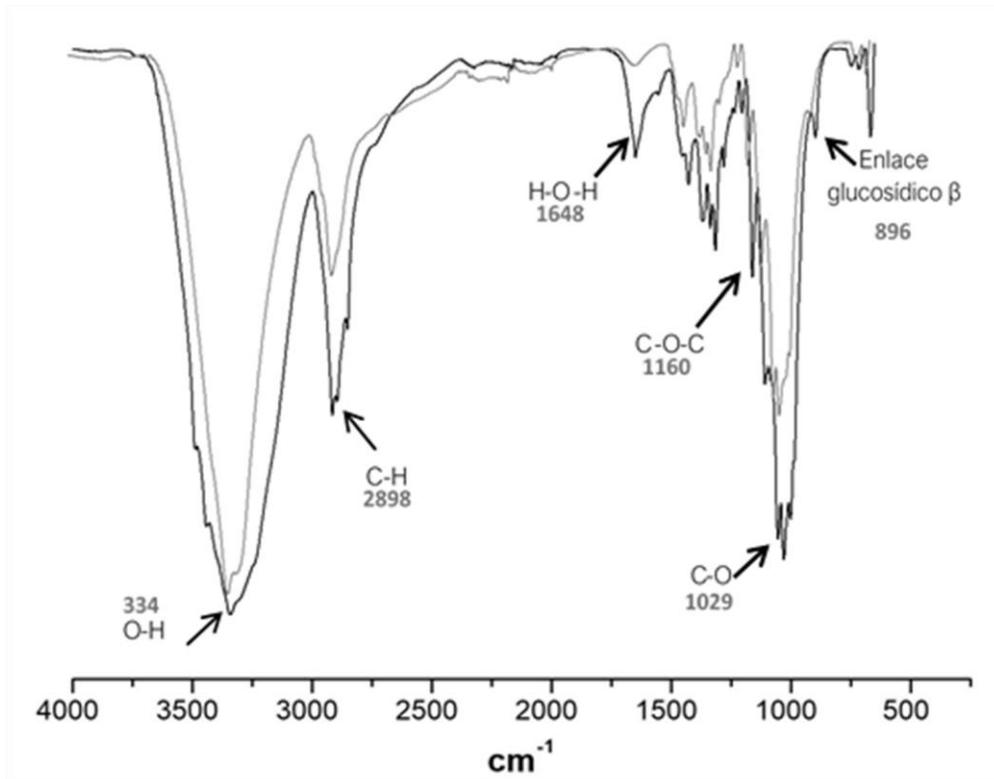


Figura 29. Espectros de infrarrojo de estándar de celulosa vegetal y celulosa bacteriana de *G. xylinus* empleando matrices porosas S_M de quitina con inóculo inicial del 15% ($v \cdot v^{-1}$).

La cristalinidad es un parámetro importante en polímeros como la celulosa ya que de ello dependen sus múltiples aplicaciones. En la figura 30 se muestra el patrón de difracción de la celulosa producida en cultivo en estado sólido, empleando las matrices porosas de quitina como soporte. El biopolímero producido presentó un índice de cristalinidad del 75.7% y cuenta con los dos picos principales a 14.81° y 22.82° los cuales corresponden a los planos cristalográficos (100) y (110). De acuerdo con lo reportado por Lee *et al.* (2015) la presencia de dichos planos es atribuido a la formación de celulosa tipo I la cual es producida por microorganismos como *G. xylinus*.

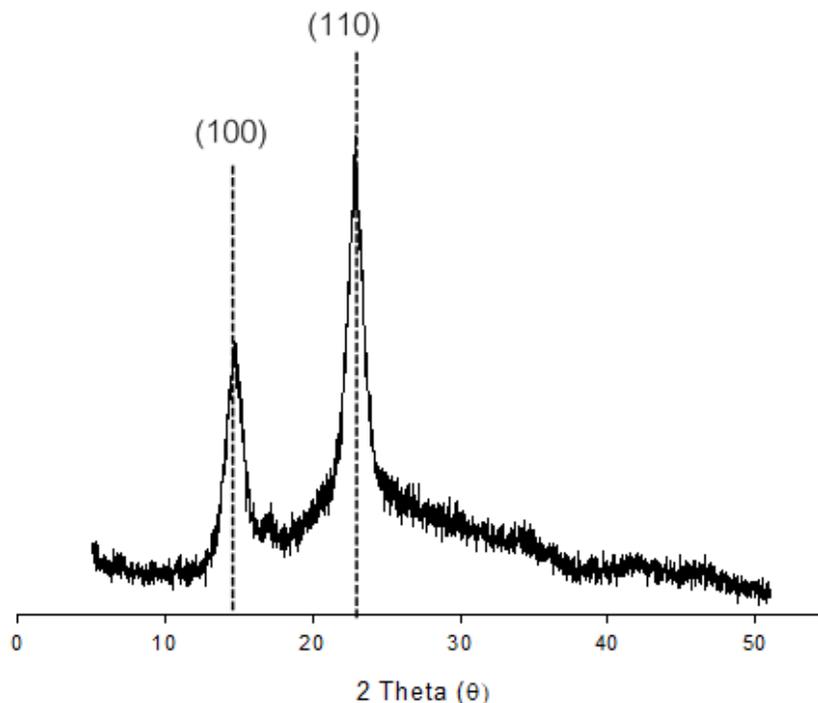


Figura 30. Patrón de difracción de rayos X de BC producida en cultivo en estado sólido de *G. xylinus* empleando matrices porosas S_M de quitina con inóculo inicial del 15% ($v \cdot v^{-1}$).

La celulosa bacteriana obtenida en cultivo en estado sólido con medio HS también se caracterizó mediante resonancia magnética nuclear de carbono. En la figura 31, se puede observar el espectro en el cual se aprecian los picos de los seis carbonos que constituyen una molécula de glucosa los cuales están indicados en el espectro con números del 1 al 6. Du *et al.* (2018) reportaron que al caracterizar la celulosa bacteriana obtenida en su estudio mediante resonancia magnética mostró señales para el carbono 1, 4 y 6 a 105.3, 89.2 y 65.7 ppm, respectivamente. Mientras que, para el carbono 2, 3 y 5 las señales se observaron entre 71 y 75 ppm. En este trabajo las señales para el carbono 2, 3 y 5 se observaron traslapadas por lo que resultó difícil diferenciar una de otra, no obstante, todas las señales observadas son similares a las que reporta Du *et al.* (2018). Por su parte, Quintana- Quirino *et al.* (2019) ha reportado que la presencia del carbono 4 corresponde a regiones amorfas así mismo menciona que la presencia de los picos correspondientes a los carbonos 1, 4 y 6 se atribuye a los polimorfos de la celulosa α .

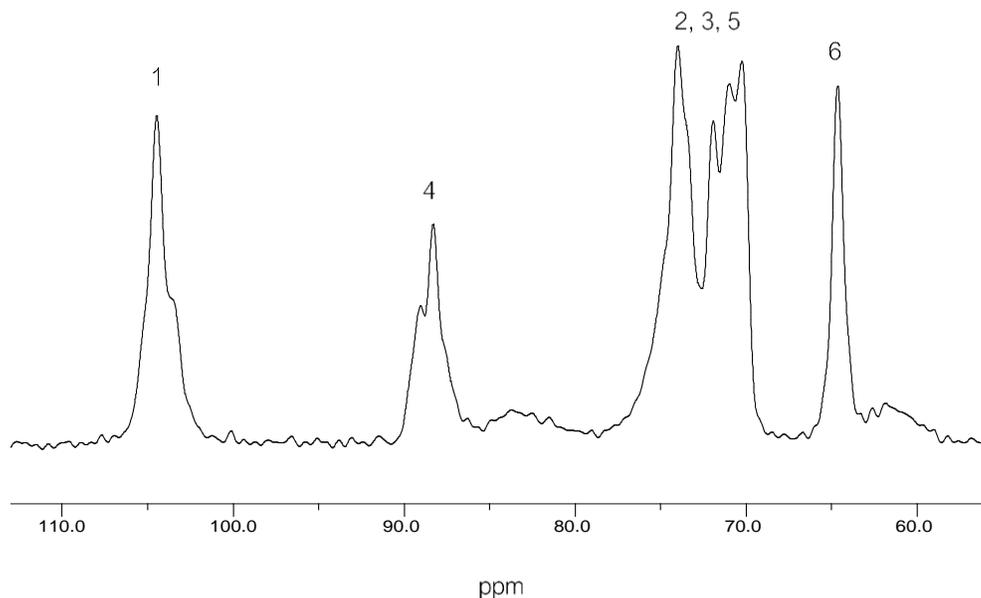


Figura 31. Espectro de ^{13}C CP / MAS RMN de celulosa producida por *G. xylinus* en cultivo en estado sólido con 15% ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$) de inóculo inicial empleando matrices porosas S_M de quitina.

Se analizó la morfología superficial durante la producción de celulosa bacteriana al emplear matrices porosas S_M y 15% ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$) de inóculo inicial mediante SEM. En la figura 32A se observa la morfología superficial de las matrices S_M empleada como sistema de andamiaje previo al experimento. Una vez inoculada la bacteria, esta creció sobre el soporte adhiriéndose a la superficie para disponer de los nutrientes necesarios para su crecimiento y secreción de la celulosa a lo largo del cultivo (figura 32B). En la figura 32C se puede apreciar la morfología bacteriana de *G. xylinus* notándose que ésta se encontraba agrupada en cadena, tal como lo hacen los microorganismos de su especie. Asimismo, en la figura 32C se logró observar la producción de celulosa por parte de la bacteria en forma de biopelícula alcanzándose a notar las microfibrillas que unen a las bacterias con la red tridimensional de la celulosa secretada en la superficie quedando embebida en el biopolímero. Lo observado anteriormente difiere de diversos estudios en los cuales han producido celulosa bacteriana en S_M estático o agitado y han apreciado la formación de una biopelícula suspendida en la superficie del medio o la formación de aglomerados; respectivamente (Krystynowicz *et al.*, 2002). Por otro lado, Quintana-Quirino *et al.* (2019) al producir celulosa bacteriana empleando PUF

cortada en cubos presentaron una morfología similar a la reportada en este estudio, logrando observar la deposición de las microfibras tanto en la zona interna como en la superficie del material empleado.

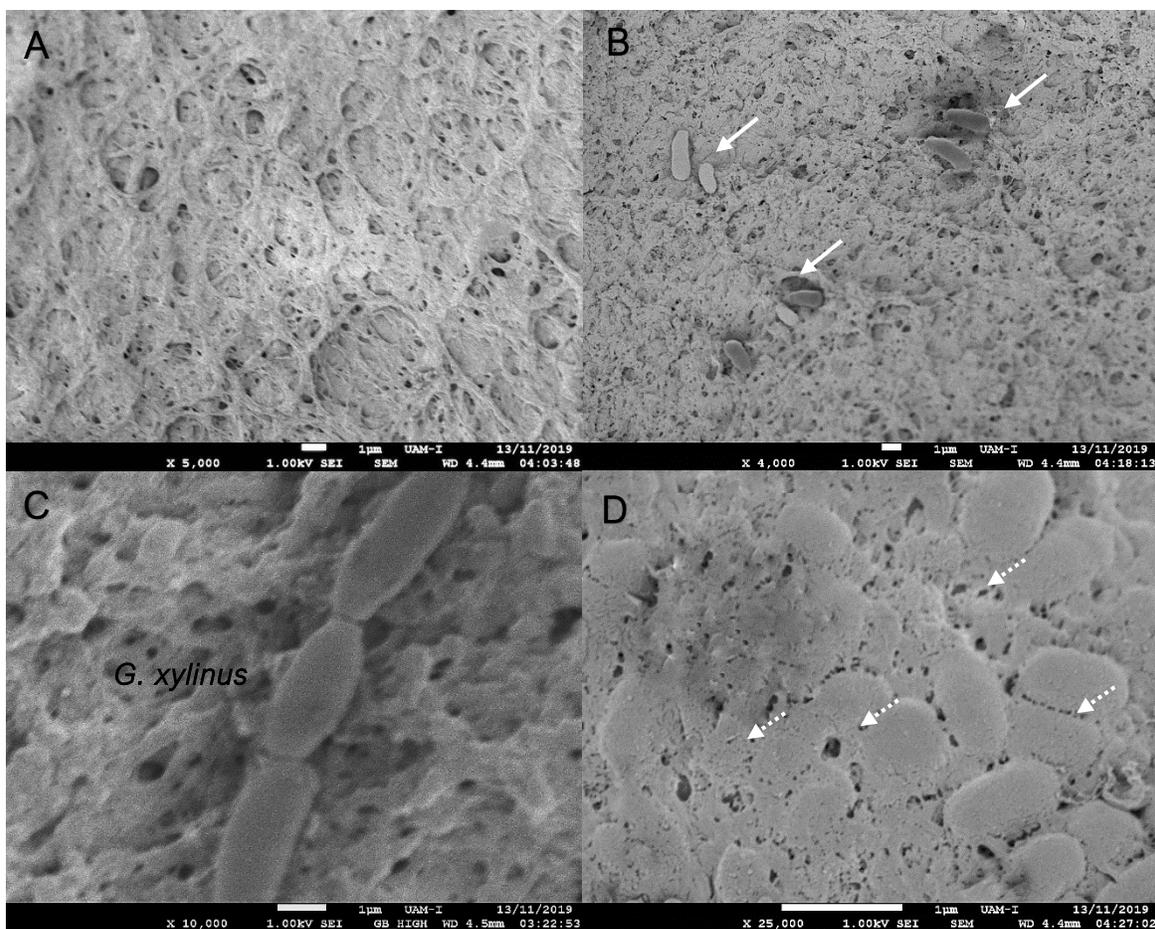


Figura 32. Micrografías de SEM de la producción de celulosa bacteriana de *G. xylinus* en SSC con 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo inicial empleando matrices porosas SM de quitina obtenidas mediante $scCO_2$ a las 96 h. Soporte S_M (A), crecimiento bacteriano (B), morfología de *G. xylinus* (C), secreción de fibrillas de celulosa bacteriana (flechas punteadas) (D).

4. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio en reportar la producción de celulosa bacteriana empleando matrices porosas de quitina como soporte obtenidas mediante el uso de fluidos en estado supercrítico.

La producción de matrices porosas inertes resultó eficiente al momento de aplicarlos como soportes en cultivo en estado sólido en la producción de polímeros naturales como la celulosa.

La estructura porosa de las matrices empleadas permitió el crecimiento de *Gluconacetobacter xylinus* y por consiguiente la producción de celulosa logrando observar la formación de una biopelícula y la morfología del microorganismo.

Por lo tanto, la producción de matrices porosas de quitina y su uso en cultivo en estado sólido

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✎ Shen, X., Shamshina, J., Berton, P., Gurau, G., Rogers, R. (2016), Hydrogels based on cellulose and chitin: fabrication, properties and applications, *Green Chemistry*, 18: 53-75.
- ✎ Tsiptsias, C., Paraskevopoulos, M., Christofilos, D., Andrieux, P., Panayiotou, C. (2011), Polymeric hydrogels and supercritical fluids: The mechanism of hydrogel foaming, *Polymer*, 52: 2819-2826.
- ✎ Tsvintzelis, I., Angelopoulou, A., Panayiotou, C. (2007), Foaming of polymers with supercritical CO₂: An experimental and theoretical study, *Polymer*, 48: 5928- 5939.
- ✎ Du, R., Zhao, F., Peng, Q., Zhou, Z., Han, Y., Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar, *Carbohydr. Polym.* 194 (2018) 200–207.
- ✎ Focher, B., Beltrame, P. L., Naggi, A. & Torri, G. (1990), Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications, *Carbohydrate polymers*, 12: 405- 418.
- ✎ Savaris, M., Celi, C., Roesch-Ely, M., Pêgas, J., Dos Santos, V., Brandalise, R. (2019), Polyurethane/poly(D,L-lactic acid) scaffolds based on supercritical fluid technology for biomedical applications: Studies with L929 cells, *Materials Science & Engineering C*, 96: 539-551.
- ✎ Moghadam, M. Z., Hassanajilia, Sh, Esmaeilzadeh, F., Ayatollahi, M., Ahmadi, M. (2017), Formation of porous HPCL/LPCL/HA scaffolds with supercritical CO₂ gas foaming method, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 69: 115-127.
- ✎ Liu, M., Zheng, H., Chen, J., Li, S., Huang, J., Zhou, C. (2016), Chitosan-chitin nanocrystal composite scaffolds for tissue engineering, *Carbohydrate Polymers*, 152: 832-840.
- ✎ Quintana-Quirino, M., Morales-Osorio, C., Viguera Ramírez, G., Vázquez-Torres, H., Shirai, K. (2019), Bacterial cellulose grows with a honeycomb

- geometry in a solid-state culture of *Gluconacetobacter xylinus* using polyurethane foam support, *Process biochemistry*, 82: 1-9.
- Dayal, M.S., Goswami, N., Sahai, A., Jain, V., Mathur, G., Mathur, A., Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter acetii* MTCC 2623, *Carbohydr. Polym.* 94 (2013) 12–16.
- Rani, M.U., Rastogi, N.K., Appaiah, K.A.A., Statistical optimization of medium composition for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk extract - an agro-industry waste, *J. Microbiol. Biotechnol.* 21 (2011) 739–745.
- Lee, C.M., Gu, J., Kafle, K., Catchmark, J., S.H. Kim, Cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strains ATCC 53524 and ATCC 23768: Pellicle formation, post-synthesis aggregation and fiber density, *Carbohydr. Polym.* 133 (2015) 270–276.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jezierska, A., Goncalves-Miskiewicz, M., Turkiewicz, M., Bielecki, S., Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose, *J. Ind. Microbiol. Biot.* 29 (2002) 189–195.
- Liu, M., Zhong, C., Zhang, Y.M., Xu, Z.M., Qiao, C.S, Ru Jia, S. (2016), Metabolic investigation in *Gluconacetobacter xylinus* and its bacterial cellulose production under a direct current electric field, *Frontiers in Microbiology*, 17: 331.

CONCLUSIÓN GENERAL

En general, este proyecto se estudiaron procesos cuya relevancia permitió la publicación de un artículo en una revista indizada; mientras que, un segundo artículo se encuentra en proceso. Con base en los resultados obtenidos, este estudio es el primero sobre la producción de celulosa bacteriana en cultivo en estado sólido empleando espuma de poliuretano y matrices porosas de quitina pura como soportes inertes.

El empleo de CO₂ como disolvente no tóxico en estado supercrítico hizo factible la producción de matrices porosas a base de quitina, los cuales mostraron tener potencial aplicación en la producción de celulosa bacteriana y en la viabilidad de osteoblastos de periostio humano lo que resulta de gran interés debido a los fines biotecnológicos que estos presentan.

Los resultados de este estudio permiten conocer las condiciones óptimas para la producción de celulosa bacteriana y para la producción de matrices porosas de quitina pura; además de brindar conocimiento sobre la potencial aplicación que presentan.

PERSPECTIVAS

Es posible dar continuidad a este trabajo produciendo matrices porosas de quitina empleando una metodología que involucre reactivos de bajo costo para favorecer su producción a mayor escala.

Por otro lado, al ser pioneros en la producción de celulosa en cultivo en estado sólido; con matrices porosas de quitina como soporte inerte y *Gluconacetobacter xylinus*, se da la oportunidad de estudiar diversos factores sobre la producción de este biopolímero con la finalidad de incrementar la producción de celulosa y favorecer su producción a mayor escala.

Respecto a la producción de materiales porosos, sería novedoso elaborar compositos de quitina con otro u otros materiales que mejoren la biocompatibilidad de estos con la finalidad de incrementar aún más la viabilidad de los osteoblastos a la que se reporta en este estudio.

TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS

PUBLICACIONES EN REVISTAS INDIZADAS

- ✎ Quintana- Quirino M., Morales-Osorio C., Viguera Ramírez G., Vázquez-Torres H., Shirai K. (2019). Bacterial cellulose grows with a honeycomb geometry in a solid-state culture of *Gluconacetobacter xylinus* using polyurethane foam support, *Process Biochemistry*, 82,1-9. DOI: [10.1016/j.procbio.2019.04.023](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.023)
- ✎ Quintana-Quirino M., Hernández-Rangel A., Silva- Bermúdez P., Domínguez-Hernández V., Araujo Monsalvo V., Gimeno M., Shirai K. Porous chitin scaffolds produced by supercritical carbon dioxide for the viability of human periosteum osteoblasts. *Carbohydrate Polymers*. SOMETIDO.



Bacterial cellulose grows with a honeycomb geometry in a solid-state culture of *Gluconacetobacter xylinus* using polyurethane foam support

Mariana Quintana-Quirino^a, Cindy Morales-Osorio^a, Gabriel Viguera Ramírez^b, Humberto Vázquez-Torres^c, Keiko Shirai^{a,*}

^a Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Biotechnology Department, Laboratory of Biopolymers and Pilot Plant of Bioprocessing of Agro-Industrial and Food By-Products, Av. San Rafael Atlixo No. 186, Iztapalapa 09840, Mexico City, Mexico

^b Universidad Autónoma Metropolitana-Guajalapa, Process and Technology Department, Av. Vasco de Quiroga No. 4671, Guajalapa 05300, Mexico City, Mexico

^c Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Physics Department Av. San Rafael Atlixo, No. 186, 09340, Mexico City, Mexico



ARTICLE INFO

Keywords
Gluconacetobacter xylinus
 Bacterial cellulose
 Solid-state culture
 Polyurethane foam
 Biofilm

ABSTRACT

The polyurethane foam (PUF) allowed the growth of *Gluconacetobacter xylinus* for prompt production of bacterial cellulose (BC) due to high water storage capacity that let high water activity, as well as diffusion of oxygen through the PUF pores. PUF was studied in two sizes cut (0.13 cm³) and mixed (0.08 cm³). Additionally, the study assessed the level of inoculum on the growth and the formation of BC. The highest yield of BC was 2.46 g L⁻¹ of cellulose achieved with cut foam and 15% inoculum at 96 h. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray powder diffraction (XRD) and solid state ¹³C cross polarization and magic angle spinning nuclear magnetic resonance (CP/MAS NMR) analyses evidence crystalline structure type I for the produced microbial cellulose. According to scanning electron microscopy (SEM) analysis, the bacteria synthesized the biopolymer as a biofilm adhered to the solid support; thereby BC displays a honeycomb geometry.

1. Introduction

The bacteria of the genera *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella* and *Sarcina* produce bacterial cellulose (BC) as a part of their metabolic process [1] to reach the oxygen-rich surfaces. The bacteria also synthesize BC as a primary metabolite for protection of UV-irradiation and to retaining water [2]. The BC has the same chemical structure of plant cellulose; but, it is free of lignin and hemicellulose, which implies simpler purification processes [3]. Among all the reports, the Gram-negative, strict aerobic bacterium *Gluconacetobacter xylinus* renders extracellular cellulose in cultures between 28 to 30 °C and pH ranging from 3 to 7 using a wide variety of carbon sources, such as glucose, fructose, sucrose, mannitol and with the medium enrichment with ethanol [2,4]. The production of BC has been carried out in submerged cultures (SmCs) of *Gluconacetobacter* spp. varying the carbon and nitrogen sources [5]. Additionally, there are several engineering approaches aim to increase BC yields [4,6–8]. Nevertheless, the main constraint in SmC for BC production is the limitation of oxygen transfer to the cell due to its low solubility and diffusion in an aqueous media [9–12].

Alternatively, solid-state culture (SSC) has the advantage of greater oxygen transfer than SmC [13,14]. The SSC employs solid substrates or supports impregnated with the nutrients to enhance the growth of the microorganisms, which also facilitates the recovering of concentrated products [15]. The substrates in SSC are usually agro-industrial by-products that have some disadvantages such as low porosity with inadequate internal structures that limit the aeration and offer poor heat removal. Therefore, inert supports such as polyurethane foam (PUF), in which nutrients dissolved in water are absorbed, displaying high porosity, low density, and excellent mechanical properties that prevent compaction and moreover, PUF allows quantification of biomass by direct methods [14,16].

Nonetheless, despite these advantages, there are no reports on the production of BC in SSC. Therefore, the aim of this work was the production of BC using PUF as inert support in SSC using *G. xylinus*, studying inoculum level and PUF size. In addition, it is presented valuable information on the influence of geometry of PUF as support on the production of BC.

* Corresponding author.

E-mail addresses: mariana.biotech@xanum.uam.mx (M. Quintana-Quirino), jviguera@correo.cia.uam.mx (G. Viguera Ramírez), hvto@xanum.uam.mx (H. Vázquez-Torres), smk@xanum.uam.mx (K. Shirai).

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.023>

Received 28 May 2018; Received in revised form 2 April 2019; Accepted 30 April 2019

Available online 01 May 2019

1359-5113/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

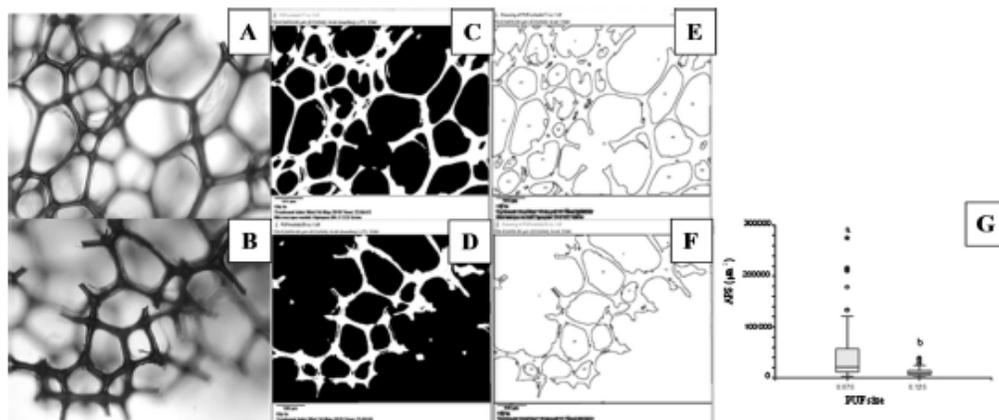


Fig. 1. Micrographs of PUF-C and PUF-M (A–B). Screenshots of micrographs converted to binary images (C, D) and analysis of particles of ImageJ (E, F). APS of PUF sizes (G). Different letter in the histogram means significant differences according to Tukey-Kramer test ($p \leq 0.05$).

Table 1

Multiple regression models for prediction of biomass and BC production with added several inoculum levels (% v⁻¹) and varying the PUF size.

Model	Biomass		BC	
	Regression coefficient	Significance level	Regression coefficient	Significance level
Constant	6.05 ± 0.12	0.000	1.83 ± 0.06	0.000
Inoculum	1.11 ± 0.11	0.000	0.49 ± 0.06	0.000
PUF _{size}	0.43 ± 0.08	0.000	0.16 ± 0.04	0.0005
Inoculum*PUF _{size}	0.54 ± 0.11	0.0001	0.13 ± 0.06	0.030
Inoculum ²	-1.89 ± 0.19	0.000	-0.77 ± 0.10	0.000
Multiple correlation coefficient	0.90		0.85	
Determination coefficient	0.92		0.90	

2. Materials and methods

2.1. Materials

J.T. Baker (Ecatepec State of Mexico, Mexico) supplied anhydrous dextrose, anhydrous sodium sulfite and citric acid monohydrate. Yeast extract and bacteriological agar were provided by BD Bioxon (Cuautitlan Izcalli, Mexico). Casein peptone purchased from Dificco S.A de C.V. (Cuautitlan Izcalli, Mexico). Laboratorios Laitz (Mexico City, Mexico) provided calcium carbonate. Dibasic sodium phosphate anhydrous, sodium hydroxide, hydrochloric acid, hydroxylamine hydrochloride, phosphoric acid, ferric chloride, calcium carbonate were purchased from Reactivos Quimica Meyer (Mexico City, Mexico). Gluconic acid (53% solution in water), 3,5-Dinitrosalicylic acid, and calcofluor white stain were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Phenol was purchased from Fermont (Nuevo Leon, Mexico). Plant cellulose was a kind gift from Derivados Macroquímicos (Ecatepec Morelos, Mexico). All reagents were analytical reagent grade.

2.2. Microorganisms and inoculum preparation

G. xylinus ATCC 700187 (American Type Culture Collection, USA) was stored on YGC 459 agar slants at 4 °C until needed. Composition of YGC 459 medium was: glucose (50 gL⁻¹), yeast extract (5 gL⁻¹), calcium carbonate (12.5 gL⁻¹) and bacteriological agar (15 gL⁻¹).

2.3. Culture medium

The composition of the Hestrin & Schramm [17] culture medium was: glucose (20 gL⁻¹), yeast extract (5 gL⁻¹), casein peptone (5 gL⁻¹), dibasic sodium phosphate anhydrous (2.7 gL⁻¹) and citric acid monohydrate (1.15 gL⁻¹).

2.4. Preparation and characterization of PUF

PUFs were either minced (PUF-M) or cut into cubes (PUF-C). PUF-M support was prepared using a grinder (Scienceware, USA) and then meshed until particle sizes were between 0.30 cm and 0.50 cm (average particle size of 0.08 cm³). PUF-C support had 0.50 cm x 0.50 cm x 0.50 cm size (0.13 cm³). All PUF foams were dried to constant weight at 70 °C for 24 h and then cooled in a desiccator to calculate water storage capacity (WSC) following Eq. 1 [16]. Each determination was carried out in triplicate.

$$WSC = \left(\frac{m_w - m_d}{m_d} \right) \quad (1)$$

where m_w is the mass of wet PUF; m_d mass of dried PUF.

Each foam volume was calculated considering height and diameter. PUF densities were calculated by dividing mass by volume.

2.4.1. Average pore size (APS) determination of PUF

APS was obtained by SEM of PUF-C and PUF-M from different regions and magnifications using ImageJ version 1.51j8 (National

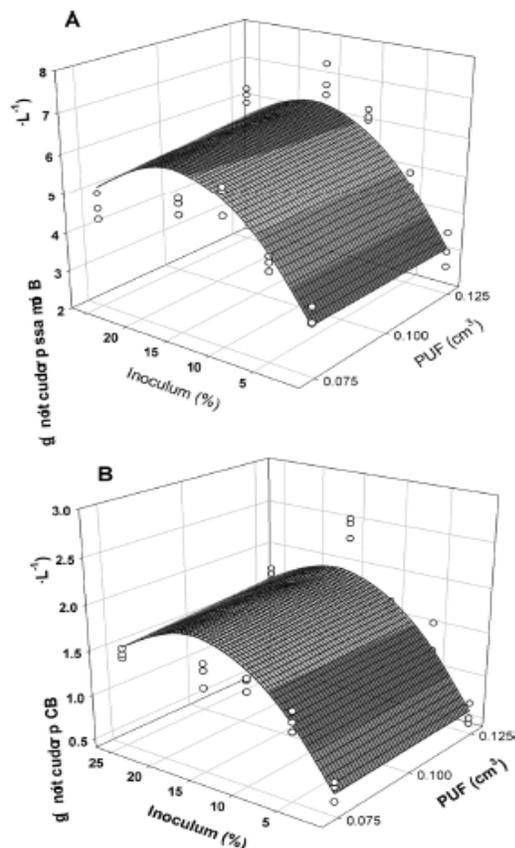


Fig. 2. Response surface plots for biomass (A) and BC (B) productions with variations of inoculum level and PUF size determined at 96 h in SSC of *G. xylinus* at 30 °C.

Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) software. SEM images were converted to 8-bit black and white images, in which the black areas represent the pores and white areas the solid surface. Binary images were analyzed as particles employing image analysis software (ImageJ) [18].

2.5. SSC conditions

Culture and inoculum were absorbed into PUF-M and PUF-C samples and SSC was carried out in 250 mL flasks with cotton plug taps at initial pH 6 and at 30 °C, during four days by duplicates for each condition. PUF and culture medium ratio was 0.09 with 90% water content and $a_w = 0.99 \pm 0.01$ and 1.00 ± 0.003 for PUF-M and PUF-C, respectively, as determined in a water activity meter (Aqualab CX-2, USA) at 20 °C. Inoculum levels were 0.5, 5, 10, 15 to 25% (v/v³). SSC was carried out at 30 °C, sampling was conducted every 4 h up to 24 h and subsequently every day until 96 h.

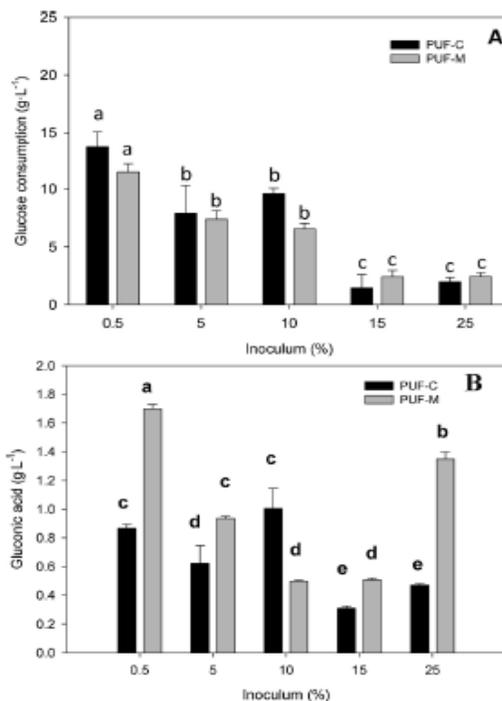


Fig. 3. Glucose consumption (A) and gluconic acid production (B) for BC production by *G. xylinus* with PUF-C and PUF-M at 96 h of SSC at 30 °C.

2.5.1. Analyses of samples

SSC was collected from each flask, mixed with their same weight of water and pressurized to 1,000 psi. Then, filtered and stored at -20 °C for further use. Dry weight determinations measured the bacterial growth. pH determinations were measured with a pHmeter (Hanna Instruments pH 216, Microprocessor pH meter, Italy). The reducing sugar method rendered the glucose concentration in the filtrates. The determination of gluconic acid was carried out by the hydroxamate method [19].

2.5.2. Determination of oxygen mass coefficient (k_{La}) of biofilm on PUF

The k_{La} in the biofilm of *G. xylinus* on heterogeneous system with PUF-C and 15% (v/v³) of inoculum was determined as reported Bonillas-Blancas et al. [20]. The heterogeneous respirometer (HR) consists of a 0.323 L glass column (30 cm x 3.7 cm internal diameter) packed with PUF (0.215 L of working volume). The HR was setup as closed-loop for gas stream using a pump (MiniPump YM02, YWFluid, China) with a gas flow of 200 mL·min⁻¹ and the liquid phase was maintained static. The oxygen and CO₂ concentrations were monitored in gas phase using the sensors (UV Flux 25%O₂ and K33-ICB 10%CO₂, CO₂Meter, USA) with a data acquisition system via USB interface. The measurements and graphics were processed by the software LabView (National Instrument, version 14.0, USA). The k_{La} was determined at 48 h of culture of *G. xylinus*. The HR was stabilized with a stream of air, and then the oxygen was stripped out by feeding helium. Once the oxygen was removed, the supply of fresh air to the system started and the oxygen concentration profiles were obtained. The assays were

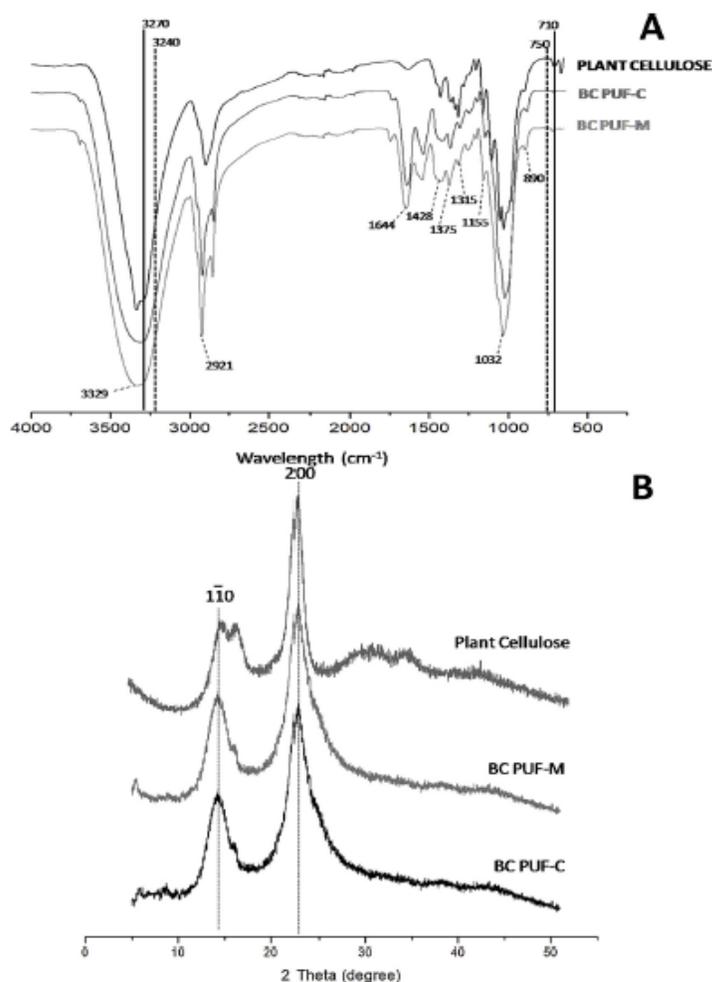


Fig. 4. Plant cellulose and BC produced by *G. xylinus* employing PUF-C and PUF-M with 15% (v/v) of inoculum at 96 h: Infrared spectra (A); XRD patterns (B).

performed by quintuplicate.

The oxygen uptake rate (OUR) was determined in SSC of *G. xylinus* performed in 0.5 L closed flask that contained PUF-C, culture medium and inoculum. The cultures were incubated at 30 °C and the CO₂ and O₂ concentrations were monitored. The assay was performed by triplicate.

2.6. BC purification and characterization

BC was purified from the filtrates after treatment with 1% (w/v) NaOH solution at 80 °C for 2 h. Then, BC was neutralized in acetic acid 5% (v/v) solution for 30 min. Then, it was centrifuged at 14,000 g at 4 °C for 15 min, washed with distilled water to pH 7 and dried at 50 °C [21]. Attenuated total-reflectance infrared spectra were acquired in Perkin Elmer 100 (UK) spectrometer at 24 °C and 30% relative humidity between 4,000–650 cm⁻¹ spectral range and 4 cm⁻¹ resolution with 32

scans. Samples were dried for 3 h at 50 °C, then grounded and sieved (120 μm) before analyses. Powder X-ray diffraction (XRD) spectra were acquired in the 5° ≤ 2θ ≤ 50° range with a Bruker D8 Advance diffractometer using Cu Kα radiation (λ = 1.54 Å) and goniometer speed of 0.5°(2θ) min⁻¹. Crystallinity percentages were obtained by integration of the corresponding crystalline and amorphous areas on the spectra.

The solid state ¹³C cross polarization and magic angle spinning nuclear magnetic resonance (CP/MAS NMR) spectra of BC produced Hestrin & Schramm culture medium and with PUF-C in SSC were acquired using a spectrometer (Avance II 300 Bruker BioSpin GmbH, Germany) with a Broad Band detector (BB-CPMAS) using a resonance frequency for ¹³C of 75 MHz. A ZrO (zirconium oxide) rotor of 4 mm external diameter was used. The contact pulse was 1.5 ms (milliseconds), with an acquisition of 24.8 ms and a waiting time between

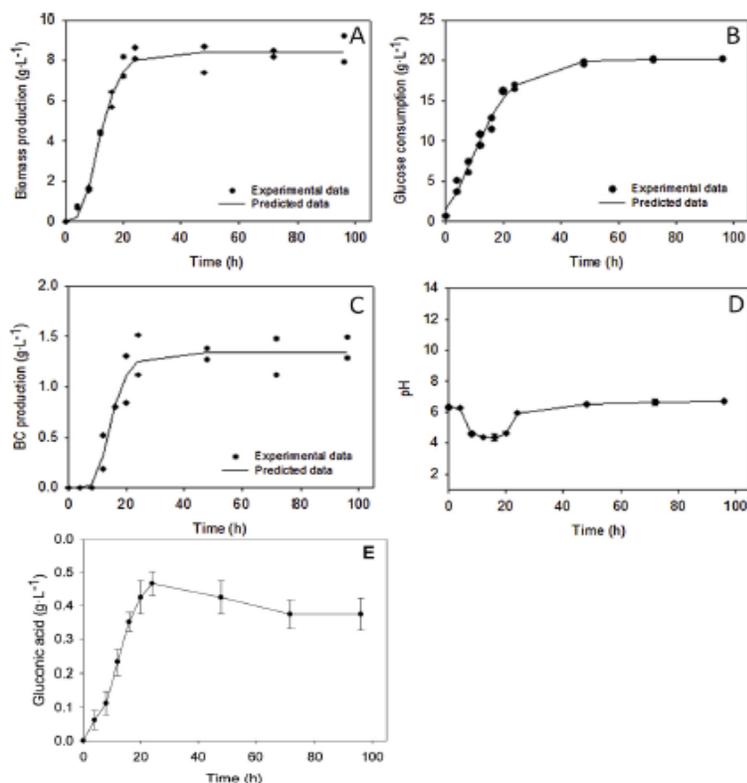


Fig. 5. Time course of SSC of *G. xylinus* using PUF-C as inert support and 15% (v/v) of inoculum: biomass (A); glucose consumption (B); BC (C); pH (D). Experimental data fitted to the Gompertz model with $R^2 > 0.97$.

repetitions of 6 seconds. The BC spectrum was obtained with 4288 scans, with a total time of 7.14 h.

2.7. Microscopic analyses

PUF samples from SSC (7 mg) were suspended in 3 mL of phosphate buffer (pH 7.2) with 30 μ L of calcofluor white-reagent (CW) and vortexed for 20 s. After 2 h, samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 min, and the pellet observed in a microscope with fluorescent light (Axiostar plus Carl Zeiss, Germany) and analyzed by ImageJ software [22]. Dried SSC samples were fixed with carbon film and treated with colloidal graphite. The preparations were dried for 24 h at 25 °C. Then, they were covered with gold before the examination in a SEM (JEOL JSM-5900 LV, Tokyo, Japan).

2.8. Statistical analysis

A randomized design was carried out in quadruplicate for experiments with different inoculum levels and PUF sizes in SSC of *G. xylinus*. The program NCSS [23] computed the analysis of variance with BC and biomass as response variables. The Tukey Kramer multiple means comparison test compared the means ($P \leq 0.05$). Multiple regression analysis was applied to evaluate the effect of inoculum level and PUF

size as independent variables on the dependent variable biomass and BC. Variables were coded according to Eq. 2.

$$X_i = \frac{x_i - \left[\frac{(x_{i \max} + x_{i \min})}{2} \right]}{\left[\frac{(x_{i \max} - x_{i \min})}{2} \right]} \quad (2)$$

where X_i is the encoded value; x_i is the actual value; $x_{i \max}$ and $x_{i \min}$ are the maximum and minimum values, respectively. The experimental data was adjusted by a second-order polynomial function applying multiple regression analysis, using the NCSS program (Eq. 3).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^{k-2} \beta_{ii} X_i^2 \quad (3)$$

where y is the predicted response (BC or biomass); β_0 , β_i , β_j , β_{ij} and β_{ii} are regression coefficients of the model for the intercept, linear, squared and interaction effect, respectively and X_i , X_j are the coded independent variables.

Determination of the inoculum level with PUF sizes was conducted by numerical optimization using Design-Expert program (Stat-Ease version 11, USA) following two criteria; maximizing BC and biomass, with the highest importance in each case [24].

Gompertz model (Eq. 4) fitted the experimental data of glucose consumption or biomass or cellulose concentration (y) at time (t), a is

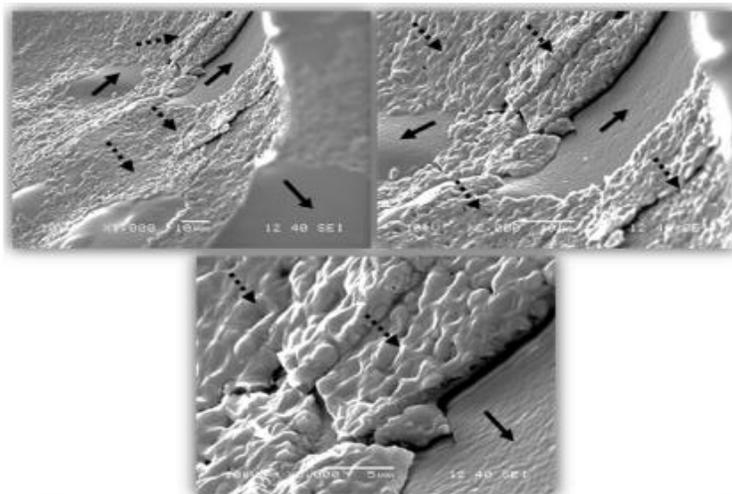


Fig. 6. Adherence of the BC in different zones of support (dotted arrows) during the production in SSC with 15% of initial inoculum in PUF-C (black arrows) at 96 h.

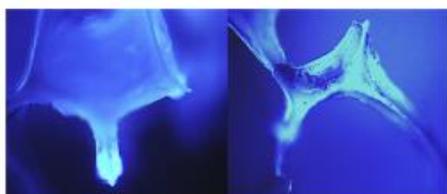


Fig. 7. Images of BC produced at 96 h in SSC with 15% of initial inoculum in PUF-C labeled with calcofluor white reagent observed in fluorescence microscopy.

the maximum biomass or cellulose concentration or glucose consumption at $t \rightarrow \infty$; b is a constant related to the initial conditions when $t = 0$, k is the cellulose constant production rate or glucose consumption rate or bacterial growth rate (h^{-1}).

$$y(t) = a_{\max} \exp(-b \exp(-kt)) \quad (4)$$

3. Results and discussion

3.1. PUF as support of *G. xylinus* growth for BC production

The initial PUF presented $5 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ of average density with a pentagonal cell structure as in PUF-C, while the PUF-M displayed irregular shapes due to mincing (Fig. 1). The destruction of the cells in PUF-M significantly lowered the WSC reaching a maximum absorption of $19.50 \text{ g H}_2\text{O g of PUF}^{-1}$ but PUF-C absorbed $21.60 \text{ g H}_2\text{O g of PUF}^{-1}$. There was also a significant decrease in porosity in PUF-M (0.65 ± 0.03) when compared to that for PUF-C (0.72 ± 0.01), which might affect the absorption of the culture media. The mincing, however, improved the average interstitial area as expected ($3.96 \times 10^4 \pm 2.26 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) which was near 4-fold higher than that measured for PUF-C ($1.07 \times 10^4 \pm 5.03 \times 10^3 \mu\text{m}^2$). Nonetheless, previous work on the production of chitinases by *Lecanicium lecanii* in SSC using PUF demonstrated that the interstitial area average increased

because the mincing alters the capillarity due to porosity reduction [16].

Other reports also characterized the structure of the PUF in SSC, and the authors explained their high productions by the relatively high PUF porosities. In this regard, Augusto-Ferrari et al. [14] reported the production of hyaluronic acid using PUF cylinders in a packed bed reactor with a density of $23 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Therein, the structure of PUF significantly improved the bacterial growth and metabolite production. This agrees with Zhang and Chen [13] in their production of xanthan by *Xanthomonas campestris* using PUF in cubes (0.13 , 1 and 3.38 cm^3) having a pore diameter of $700 \mu\text{m}$ and specific surface area of $4.50 \times 10^3 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ in a bioreactor with pulses of air. Similarly, the authors claimed that the high porosity and geometry of the cubic PUF was a crucial factor to achieve high yields of the targeted metabolite in addition to adequate oxygen transfer.

The selection of the best inoculum level is an experimental strategy to increase the productivity of BC by favoring microbial growth, usually, measured by the direct measurement of biomass using insoluble substrates. However, in SSC, this approach is often challenging. Alternatively, gravimetric determination from inert supports such as PUF provides readily and accurate data. By this method, the highest biomass production was at 96 h with PUF-C, inoculum level of 15%, and a concentration of $6.94 \pm 0.41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. For PUF-M with a 10% initial inoculum, the highest production required up to $5.70 \pm 0.38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Noteworthy, PUF-M shows the formation of agglomerates and they prevented an adequate diffusion (Fig. 1). Therefore, the concentration of biomass obtained with SSC and PUF-C was 1.21-fold higher than PUF-M.

The adjustment in the multiple regression analysis assessed the coefficients model based on the experimental data for biomass and BC. Table 1 shows the coefficients estimated by the quadratic model and the levels of significance that best explain the experimental data. However, the analyses rendered a statistical meaningfulness for all levels. On the other hand, estimated models predicted biomass and BC production when varying the *G. xylinus* inoculum level and PUF size (Table 1) to determine the maximum values. The response surface methodology plots in Fig. 2 show the optimal production of biomass and BC. As observed, the increase of the starter level after 5% ($\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$) enhanced the

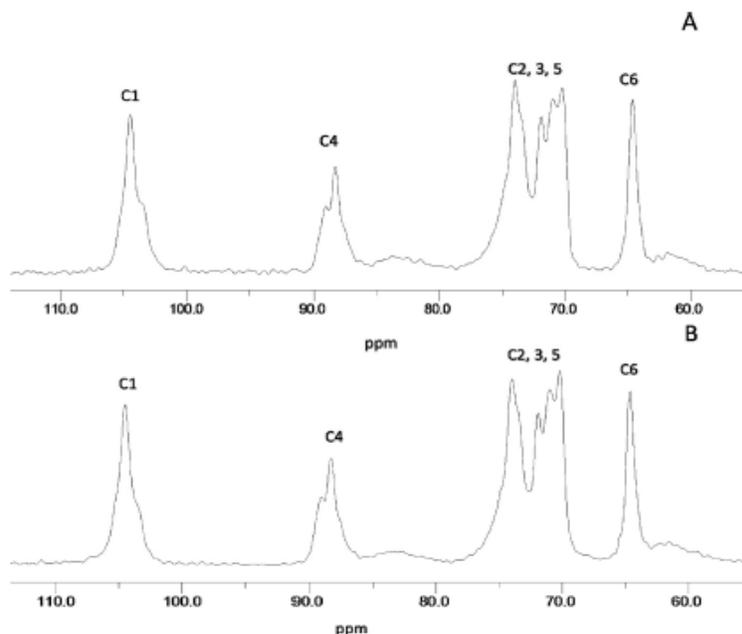


Fig. 8. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of BC produced by *G. xylinus* at 15% ($v\text{-}v^{-1}$) of inoculum employing PUF-C as support in SSC at 96 h (A); Hestrin & Schramm culture medium (B).

biomass and BC to their maximum value using 15% ($v\text{-}v^{-1}$) of inoculum (Fig. 2A). The best BC production coincides with that determined for biomass, i.e., 15% ($v\text{-}v^{-1}$) (Fig. 2B). The highest biomass and BC production were that for 15% inoculum and PUF-C displaying $6.94 \pm 0.41 \text{ gL}^{-3}$ and $2.46 \pm 0.12 \text{ gL}^{-3}$, respectively. The predicted values at these conditions were 6.32 gL^{-3} and 1.94 gL^{-3} , respectively. Nonetheless, SSC in PUF-M displayed maximum production of 1.51 gL^{-3} of BC with 10% of the inoculum level (Fig. 2).

For inoculum levels higher than 15% ($v\text{-}v^{-1}$) in SSC with PUF-C, the biomass production gradually decreased due to a decrease in the nutrients. Consequently, the BC synthesis also diminished. While for SSC at 96 h of culture with PUF-M and 10% ($v\text{-}v^{-1}$) of inoculum biomass and BC productions reached $5.70 \pm 0.38 \text{ gL}^{-3}$ and $1.51 \pm 0.11 \text{ gL}^{-3}$, respectively. The reduction of inoculum level ($< 10\%$) produced a steady decline in biomass although no adverse effect on the BC.

Noteworthy, the glucose was partially consumed with the inoculum level of 10% and non-significant differences for glucose consumption with inoculum level of 15 and 25% (Fig. 3A) with pH ranged 7.40–8.30 at 96 h of SSC (Supplementary data 1). The optimum pH for BC synthesis is from 4 to 6 related to the production of organic acids such as gluconic acid, acetic acid, and lactic acid, and subsequently, acidic pH (< 4) might inhibit the BC production [25,26]. In this study, the gluconic acid concentration was significantly higher in PUF-M than that with PUF-C thus at 25% ($v\text{-}v^{-1}$) of inoculum produced $1.35 \pm 0.05 \text{ gL}^{-3}$ (Fig. 3). The use of PUF-C with 15% ($v\text{-}v^{-1}$) of inoculum presented the lowest gluconic acid formation, $0.31 \pm 0.016 \text{ gL}^{-3}$, a plausible explanation is the more stressing environment for *G. xylinus* based on differences on PUF surface structure as it is shown in Fig. 1. Liu et al. [27] reported the accumulation of gluconic acid and lactic acid at the anode that produced reduction of cell growth for acid stress when a direct current electric field was applied in static culture of *G. xylinus* for

the lowering of oxygen concentration.

Herein, the formation of gluconic acid produced a negative impact on the synthesis of BC, hence as at high gluconic acid was present as low BC was produced (Figs. 2 & 3). This pattern can be related to glucose availability for BC production (Fig. 3A). It is also worth noting the relatively high $a_w > 0.90$ needed by the bacteria to sustain their growth [28]. In this regard, the a_w of SSC after 96 h accomplishes the bacterial requirements with 0.99 for PUF-C and PUF-M.

Fig. 4A shows the infrared spectra of BC compared to a plant cellulose sample. The characteristic bands of cellulose at $3400\text{--}2800 \text{ cm}^{-1}$ and between 1160 and 1000 cm^{-1} can be assigned to the vibrations of the functional groups O-H, C-H, and C-O-C and C-O, respectively. On the other hand, the presence of a band at 890 cm^{-1} is typical of these polymers and assigned to the stretching C-O-C of the β glycosidic bond of BC [29]. The band in 1428 cm^{-1} corresponds to the bending of the CH_2 group, which is a reference to a characteristic band for cellulose I [2,29]. Rani et al. [30] reported the presence of bands at 1428 and 1155 cm^{-1} to indicate the presence of cellulose type I like the major component of the structure. The bands at 1315 cm^{-1} and 1375 cm^{-1} are due to the wagging of CH_2 and the bending of the group C-H, respectively. Moreover, reports show the presence of these bands in samples of BC to point out the crystalline region within the cellulose structure [2,11]. The bands determined between 3700 and 3100 cm^{-1} according to the vibrations of the bending of O-H in cellulose, and bands in this region of the spectrum (Fig. 4) evidences the inter and intramolecular hydrogen bonding [29]. The band at 1644 cm^{-1} assigned to the vibration of water molecules is intense in BC samples and this evidences their bacterial origin, owing to increasing capacity of BC for water retention than plant cellulose [4,31].

The cellulose presents six polymorphs; the most abundant and studied is cellulose I [9]. Their structures denominated as I_a and I_b . The

cellulose produced by microorganisms are composed mostly of polymorph I_{α} , while in the plant cellulose polymorph, I_{β} is predominant [30]. According to Castro et al. [2], the absorption bands between 3240 and 750 cm^{-1} are due to the triclinic polymorph I_{α} , and the bands between 3270 and 710 cm^{-1} correspond to monoclinic polymorph I_{β} . This evidences that *G. xylinus* produces both polymorphs simultaneously [29].

On the other hand, crystallinity is important for BC properties and applicabilities and several works report diffraction patterns with two characteristic peaks at 14.30 and 22.6°, assigned to crystallographic planes 110 and 200, respectively [33]. Fig. 4B shows XRD ca. 14.50° and 22.80° which confirms the BC type I in agreement with the infrared spectra [12,32]. Regarding the percentage of crystallinity, the produced BC was 73% for PUF-C and 71% for PUF-M, which may relate to enhanced packaging of microfibrils in these supports [11]. Nonetheless, the crystallinity of the produced BC is in the range of other BG reported elsewhere between 73 and 85% [4,21,32].

3.2. Production of BC employing PUF-C as inert support and 15% of inoculum in SSC

The time course of BC production within PUF-C in an SSC inoculum of 15% (v/v) shows a fast adaptation of culture medium with a short lag phase (Fig. 5A). After 24 h, *G. xylinus* reached the α_{max} of $8.36 \pm 0.38 \text{ g of biomass} \cdot \text{L}^{-1}$ with a growth rate of 0.21 h^{-1} and R^2 of 0.99 (Fig. 5A). The glucose consumption and BC production are strongly related because bacteria assimilate the carbon source for growing and producing biopolymer protofibrils (Fig. 5B & C). Then, BC protofibrils assemble in microfibrils in a second stage, and later, it forms a bundle of interwoven ribbons [2]. The maximum glucose consumption was at 48 h (α_{max} of $20.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) with 0.11 h^{-1} ($R^2 = 0.99$) consumption rate (Fig. 5B), whereas for BC, the α_{max} ($1.32 \pm 0.28 \text{ g of BC} \cdot \text{L}^{-1}$) was achieved at 24 h with a production rate of 0.25 h^{-1} and R^2 of 0.97 (Fig. 5C).

Fig. 5D shows the time course of pH with an initial value of 6.30, which remained until 4 h of culture. Subsequently, the pH decreased to 4.60 at 8 h of culture and remained steady between 4.40 and 4.60 during 20 h (Fig. 5D). In liquid cultures, *Gluconoacetobacter* produces gluconic acid from glucose decreasing the pH (Fig. 5E); thereby, the BC production diminished [11], however, after 24 h of SSC, pH increased to 5.60, which might be due to the consumption of gluconic acid [27], leading to the optimum pH for BC production ($\text{pH} = 5.50$) [11].

Bilgi et al. [11] reported the production of BC in static or agitated SmC with *G. xylinus* where oxygen transfer was a limiting factor owing to rapid depletion of dissolved oxygen in the media, which in turn restricts the production of the biopolymer. In another related study, bacterial growth in static submerged culture for production of BC was $0.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, which was 22-fold lower than the biomass obtained with SSC in this study [5]. Others reported that the agitation improved the biomass production from 1.95 to $3.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ with several strains of *G. xylinus* [26], nevertheless, these data are lower than the obtained in the present study, thereby ascribing to the presence of oxygen as an essential factor in the proliferation during BC production.

The closest comparison using *G. xylinus* for BC production is in SmC with Hestrin-Schramm medium, as there are no reports on SSC for this biopolymer, and it was 2.70-fold higher than in the static SmC using the same medium [21]. In a recent work of Molina-Ramirez et al. [33], the BC yield from static SmC of *Komagataibacter medellinensis* improved when varying the glucose concentration, which agrees with our results. However, the required time for BC production in the earlier report is 8 days. Another study on SmC for BC production used agroindustrial by-products for their medium formulation, such as enzymatic hydrolysates of bagasse [34] where long fermentation times are needed. Therein, the BC output is 1.30-fold lower than in this study. As well, Uzyol et al. [1] had studied the BC production by *Komagataibacter hansenii* employing as carbon source an acid hydrolysate of algal starch in static SmC with a

BC production of 2.2-fold lower than that obtained in this work. Interestingly, Zywicka et al. [26] conducted SmC with an orbital shaker and a rocking roller where the stirred conditions favored bacterial growth but discouraged BC production. This report substantiates the explanation for the high BC yields in SSC with PUF-C based on the high oxygen transfer.

In this regard, the oxygen transfer explains this improved bacterial growth with PUF-C, as the estimated k_{La} was 9.04 h^{-1} (Supplementary data 2), which is similar to previous report on the improvement of BC productivity in viscous culture broth of *Acetobacter xylinum* in a robust stirred SmC process employing a screw with draft tube impeller at 500 rpm of agitation [35]. The OUR obtained was $17.49 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (OUR specific of $2.85 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{g biomass}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) at 24 h, corresponding to the end of the deceleration phase when stationary phase started (Fig. 5A), which is higher than the reported by Kormmann et al. [36] in a study of the effect of ethanol addition on the growth of *G. xylinus* in SmC in stirred bioreactor with an OUR of ca. $10 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ at stationary phase after 30 h at the stirring rate of 800 rpm. These results show that PUF as support material in SSC presented adequate oxygen diffusion that permit the growth of *G. xylinus* and the production of BC with a lower cost and saving energy.

3.3. BC characterization

The morphology of the interconnected pores of the PUF in which the bacteria was adhered and proliferated was observed by SEM (Fig. 1). During the culture, the bacteria secreted BC forming a biofilm with honeycomb geometry. These differ from other reports for BC produced in the static SmC that forms a suspended pellicle in the air-liquid interface. In agitated cultures, the oxygen supply favors the formation of BC in the form of flocks [3]. In the present study, Fig. 6 shows the formation of a biofilm in the PUF pores. It is worth mentioning that bacteria discharge microfibrils to an embedded cellulose matrix. On the contrary, in the work of Augusto-Ferrari et al. [14] to produce hyaluronic acid in SSC using PUF, the authors observed the secretion of that metabolite and deposition in the internal structure of the support, where the culture media was absorbed.

Fig. 7 shows PUF samples obtained at 96 h of culture and dyed with CW. The fluorescent zones are evidence of interaction between CW and BC that remained adhered in the structure of PUF during the SSC. Worth to note, CW presents high affinity for polysaccharides with glycosidic bonds β -(1,3) and β -(1,4) such as cellulose or chitin and it can interact in the formation process of microfibrils of structural polysaccharides to give a bright blue coloration under UV [37].

Fig. 8 shows the ^{13}C NMR spectra of BC produced in PUF-C with 15% of inoculum at 96 h of SSC and Hestrin & Schramm culture medium, in which can be seen that both spectra are similar and peaks of the six carbons of the glucose unit are indicated as C1 to C6. The ^{13}C NMR spectra of BC produced with and without PUF as support presented the singlet of C1 at 104.5 ppm, as well as C4 and C6 at 86.90 and 64.60 ppm, respectively. The peak at 86.9 ppm corresponds to amorphous regions of C4. The chemical shifts of 70 and 75 ppm are assigned to C2, 3 and 5, which are overlapped as BC spectra of previous report [32]. The peaks at 104.50 and 64.60 ppm, as well as amorphous regions at 86.90 and 64.60 ppm (C4 and C6) had been attributed to cellulose Ia polymorphs [2,9].

4. Conclusions

A BC has been successfully produced using SSC of *G. xylinus*. The work concludes that this fermentation system improves the production of this biopolymer from bacteria by offering increased oxygen availability towards BC production. Importantly, the BC produced follows the geometry of the PUF with honeycomb geometry. Therefore, SSC has the potential to produce BC with controlled physical structures. Moreover, the PUF support enhanced the recovery of the biomass and

BC during culture compared to other biotechnological approaches.

Acknowledgments

The authors would like to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for funding Project No. 237292 and scholarship grant (MQQ). Mr. Ricardo Rosas is greatly acknowledged for his assistance in XRD studies. Dr. Attilano Gutierrez and Dr. Marco Antonio Vera for their assistance in ^{13}C NMR studies carried out in the Laboratory of Nuclear Magnetic Resonance at UAM Ms. Claudia H. Barrera is greatly acknowledged for diligent proofreading of this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at [doi:https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.023](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.023).

References

- [1] H.K. Uryol, M.T. Sacan, Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* using algae-based glucose, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2016) 1–9.
- [2] C. Castro, R. Zuluaga, J.L. Pataux, G. Caro, I. Mondragon, P. Galán, Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Glucoacetobacter zwirgati* sp. from Colombian agro-industrial wastes, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 96–102.
- [3] A. Kryszynowicz, W. Czaja, A. Wiktorowska-Jezierska, M. Goncalves Miśkiewicz, M. Tuskiewicz, S. Bielecki, Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose, *J. Ind. Microbiol. Biot.* 29 (2002) 189–195.
- [4] R.T.A. Machado, J. Gutierrez, A. Tercejk, E. Trovanti, F.G.M. Ushib, G. Padua Moreno, A.P. Nascimento, A.A. Berreta, S.J.L. Ribeiro, H.S. Barud, *Komagataeibacter rharticus* as an alternative bacteria for cellulose production, *Carbohydr. Polym.* 152 (2016) 841–849.
- [5] E.P. Coban, H. Bilyik, Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HB85, *Adv. J. Biotechnol.* 10 (2011) 534–535.
- [6] S.C. Wu, M.H. Li, Production of bacterial cellulose membranes in a modified airlift bioreactor by *Glucoacetobacter xylinus*, *J. Biosci. Bioeng.* 120 (2015) 44–49.
- [7] D. Tian, F. Shen, J. Hu, S. Renneckar, J.N. Saddler, Enhancing bacterial cellulose production via adding mesoporous hollow nanotubes in the culture medium, *Carbohydr. Polym.* 198 (2018) 191–196.
- [8] M. Ul Islam, M.W. Ullah, S. Khan, N. Shan, J.K. Park, Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 1166–1173.
- [9] B.V. Mohite, S.V. Patil, Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529, *Carbohydr. Polym.* 106 (2014) 132–141.
- [10] R. Kose, N. Sunagawa, M. Yoshida, K. Tajima, One-step production of nanofibrillated bacterial cellulose (NFBC) from waste glycerol using *Glucoacetobacter intermedius* NEDO-01, *Cellulose* 20 (2013) 2971–2979.
- [11] E. Bilgi, E. Bayir, A. Sendemis-Urkmez, E.E. Hames, Optimization of bacterial cellulose production by *Glucoacetobacter xylinus* using carob and haricot bean, *Int. J. Biol. Macromol.* 90 (2016) 2–10.
- [12] C.M. Lee, J. Gu, K. Kafle, J. Catchmark, S.H. Kim, Cellulose produced by *Glucoacetobacter xylinus* strains ATCC 53524 and ATCC 23768: Pellicle formation, post-synthesis aggregation and fiber density, *Carbohydr. Polym.* 133 (2015) 270–276.
- [13] Z.G. Zhang, H.Z. Chen, Xanthan production on polyurethane foam and its enhancement by air pressure pulsation, *App. Biochem. Biotechnol.* 162 (2010) 2244–2258.
- [14] F. Augusto-Ferrari, F. Lopes Motta, R. Gaspar Bastos, M.H. Andrade Santana, The solid-state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in polyurethane foam as a strategy for the production of hyaluronic acid, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170 (2013) 1491–1502.
- [15] R.R. Singhania, A.K. Patel, C.R. Soccol, A. Pandey, Recent advances in solid-state fermentation, *Biochem. Eng. J.* 44 (2009) 13–18.
- [16] M.C. Marin-Cervantes, Y. Matsumoto, I. Ramirez-Coutiño, Z. Rocha-Pino, G. Viniegra, K. Shirai, Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Leuconidium leonii* on the production profiles of chitinases, *Process Biochem.* 43 (2008) 24–32.
- [17] S. Hestrin, M. Schramm, Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*, *Biochem. J.* 58 (1954) 345–352.
- [18] F.A. AlMazooqi, M.R. Bilad, B. Mansoor, H.A. Arafa, A comparative study of image analysis and porometry techniques for characterization of porous membranes, *J. Mater. Sci.* 51 (2016) 2017–2032.
- [19] O.G. Lien, Determination of gluconolactone, galactonolactone and their free acids by the hydroxamate method, *Anal. Chem.* 31 (1959) 1363–1365.
- [20] W. Bonilla-Blanco, M. Mora, S. Revah, J.A. Baza, J. Lafuente, X. Gamisans, D. Gabriel, A. González-Sánchez, Application of a novel respirometric methodology to characterize mass transfer and activity of H_2S -oxidizing biofilms in biotrickling filter beds, *Biochem. Eng. J.* 99 (2015) 24–34.
- [21] F. Mohanmadkazemi, M. Azin, A. Ashori, Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media, *Carbohydr. Polym.* 117 (2015) 518–523.
- [22] R. Gallardo-Rivera, M.A. Aguilar-Santamaría, P. Silva-Bermúdez, J. García-López, A. Tecante, C. Velasco, A. Román-Guerrero, C. Pérez-Alonso, H. Vázquez-Torres, K. Shirai, Polyelectrolyte complex of Aloe vera, chitosan, and alginate produced fibroblast and lymphocyte viabilities and migration, *Carbohydr. Polym.* 1992 (2018) 84–94.
- [23] J. Hintze, NCSG 2007, NCSG, LLC, Kaysville, UT, USA, 2007.
- [24] B. Flores-Albino, L. Arias, J. Gómez, A. Castelló, M. Gimeno, K. Shirai, Chitin and L-(+)-lactic acid production from crab (*Gallinaster bellionus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp. B2 using sugar cane molasses as a carbon source, *Bioproc. Biosyst. Eng.* 35 (2012) 1193–1200.
- [25] S.M. Keshik, K. Sameshima, Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production, *Adv. J. Biotechnol.* 4 (2005) 478–482.
- [26] A. Zywida, D. Pełtler, R. Rakoczy, M. Konojacki, M. Kordas, K. Fijałkowski, The effect of different agitation modes on bacterial cellulose synthesis by *Glucoacetobacter xylinus* strains, *Acta Sci. Pol. Zootechnica* 14 (2015) 137–150.
- [27] M. Liu, C. Zhong, Y.M. Zhang, Z.M. Xu, C.S. Qiao, S. Ru Jia, Metabolic investigation in *Glucoacetobacter xylinus* and its bacterial cellulose production under a direct current electric field, *Front. Microbiol.* 17 (2016) 331.
- [28] L. Thomas, C. Laroche, A. Pandey, Current developments in solid-state fermentation, *Biochem. Eng. J.* 81 (2013) 146–161.
- [29] M.S. Dayal, N. Goswami, A. Sahai, V. Jain, G. Mathur, A. Mathur, Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter acet* MTCC 2623, *Carbohydr. Polym.* 94 (2013) 12–16.
- [30] M.U. Razi, N.K. Rastogi, K.A.A. Appalish, Statistical optimization of medium composition for bacterial cellulose production by *Glucoacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk extract - an agro-industry waste, *J. Microbiol. Biotechnol.* 21 (2011) 739–745.
- [31] M. Akerholm, B. Hinnermoiser, L. Salmén, Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 569–578.
- [32] R. Du, F. Zhao, Q. Peng, Z. Zhou, Y. Han, Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Glucoacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar, *Carbohydr. Polym.* 194 (2018) 200–207.
- [33] C. Molina-Ramírez, M. Castro, M. Osorio, M. Torres-Tabora, B. Gómez, R. Zuluaga, C. Gómez, P. Galán, O. Rojas, C. Castro, Effect of different carbon sources on bacterial nanocellulose production and structure using the low pH resistant strain *Komagataeibacter medellinensis*, *Materias 10* (2017) 1–13.
- [34] G.X. Qi, M.T. Luo, C. Huang, H.J. Guo, X.F. Chen, L. Xiong, B. Wang, X.Q. Lin, F. Peng, X.D. Chen, Comparison of bacterial cellulose production by *Glucoacetobacter xylinus* on bagasse acid and enzymatic hydrolysates, *J. Appl. Polym. Sci.* 134 (2017) 1–7.
- [35] T. Kouda, H. Yano, F. Yoshinaga, Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture, *J. Ferment. Bioeng.* 83 (1997) 371–376.
- [36] H. Kornmann, P. Duboc, P. Niederberger, I. Marison, U. von Stockar, Influence of residual ethanol concentration on the growth of *Glucoacetobacter xylinus* 12281, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 (2003) 168–173.
- [37] E. Jofré, J.P. Lauadot, D. Medost, A. Becker, Monitoring succinoglycan production in single *Sinorhizobium meliloti* cell by Calcicola with MCR staining and time-lapse microscopy, *Carbohydr. Polym.* 181 (2018) 918–922.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

INTERNACIONALES

- Ponente con el cartel «Comparison of Gluconacetobacter xylinus cellulose produced by submerged and solid culture» • 10th International Conference on Fiber and Polymer Biotechnology • Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil (Abril, 2018).
- Ponente con el cartel «Human Osteoblasts proliferation of on chitin scaffolds produced with supercritical carbon dioxide» • TERMIS- AM ANNUAL CONFERENCE AND EXHIBITION • Orlando, Florida, Estados Unidos de América (Diciembre, 2019).

NACIONALES

- Ponente con el cartel «Efecto del nivel de inóculo y tamaño de partícula de espuma de poliuretano en cultivos en estado sólido para la producción de celulosa de Gluconacetobacter xylinus» • XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería • Puerto Vallarta, Jalisco, México (Junio, 2017).
- Ponente con el cartel «Determinación de porosidad de espumas de quitina obtenidos mediante el uso de fluidos supercríticos» • XXXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ • San José del Cabo, B.C.S, México (Mayo, 2018).
- Ponente con el cartel «Efecto de la presión en la producción de esponjas de quitina obtenidas mediante el uso de fluidos supercríticos» • XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería • León, Guanajuato, México (Junio, 2019).
- Ponente con el cartel «Efecto del tamaño de partícula de la espuma de poliuretano en la producción de celulosa bacteriana en estado sólido de Gluconacetobacter xylinus» • XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería • León, Guanajuato, México (Junio, 2019).
- Ponente con el cartel «Efecto de la temperatura en la producción de esponjas de quitina pura obtenidas empleando dióxido de carbono como agente de espumado en estado supercrítico» • 8° Simposio: Perspectivas en Biotecnología • UAM- Iztapalapa • Ciudad de México, México (Septiembre, 2019).

ANEXOS



Anexo 1. Metodología para el análisis de azúcares reductores y curva patrón de glucosa.

Se pesaron y disolvieron los reactivos de la Tabla 1, posteriormente se aforaron a 100 mL.

Tabla 6. Composición del reactivo de ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS).

REACTIVO	CANTIDAD (g)
Ácido 3,5 dinitrosalicílico	1
NaOH	1
Na ₂ SO ₃ Anhidro	0.05
C ₆ H ₆ O	0.02

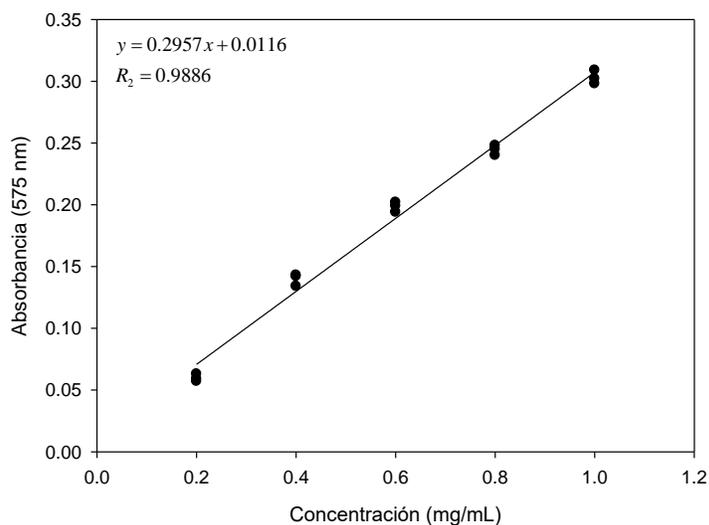


Figura 33. Curva patrón para el análisis de glucosa por el método de DNS.

Anexo 2. pH final en la producción de BC en cultivo en estado sólido a las 96 h.

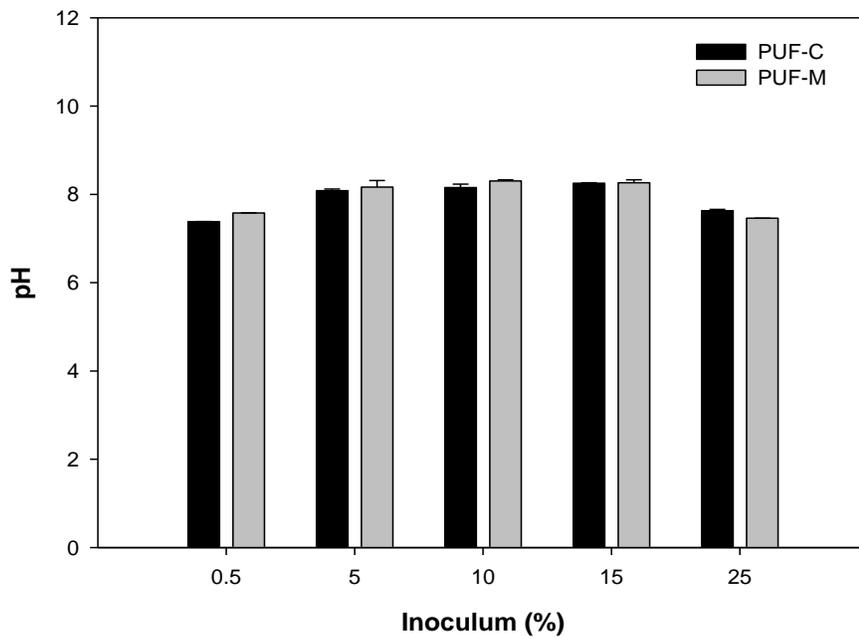


Figura 34. Determinación de pH variando el nivel de inóculo de *G. xylinus* para la producción de BC empleando dos tamaños de PUF de 0.125 cm³ (PUF-C) y 0.075 cm³ (PUF-M) a las 96 h de SSC.

Anexo 3. Determinación del diámetro de poro promedio y su distribución en las matrices porosas de quitina.

El software ImageJ es un programa que está diseñado para el conteo de estructuras. Para determinar el diámetro de poro promedio y la distribución de estos se procesaron las imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido de la siguiente manera:

1. Duplicado de imagen original

Inicialmente se duplicó la imagen a analizar con la finalidad de conservar la imagen original como respaldo tal como se aprecia en la figura 35.

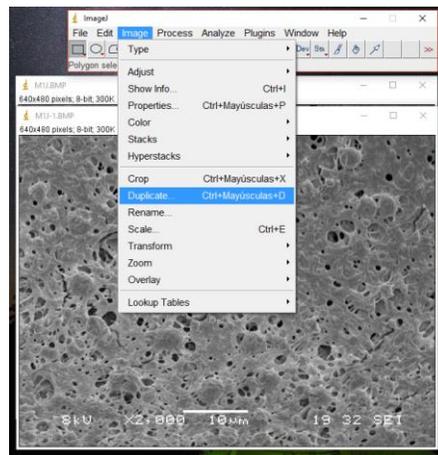


Figura 35. Duplicación de imagen original.

2. Calibración del software ImageJ

La calibración es necesaria para obtener los parámetros deseados en las unidades correctas y para ello se debe emplear un patrón con medida conocida, En este caso se hizo uso de la escala proporcionada por las imágenes de SEM y empleando una herramienta del mismo software se trazó una línea recta sobre dicha escala tal como se aprecia en la figura 36. Luego, a través del submenú “Measure” del menú “Analyze” se conoció la medida en pixeles de la línea trazada (círculo rojo) sobre la escala de la imagen de SEM (fig. 36A). Finalmente, se estableció una relación entre los pixeles y las micras de la imagen a procesar mediante el submenú “Set Scale” (fig. 36B).

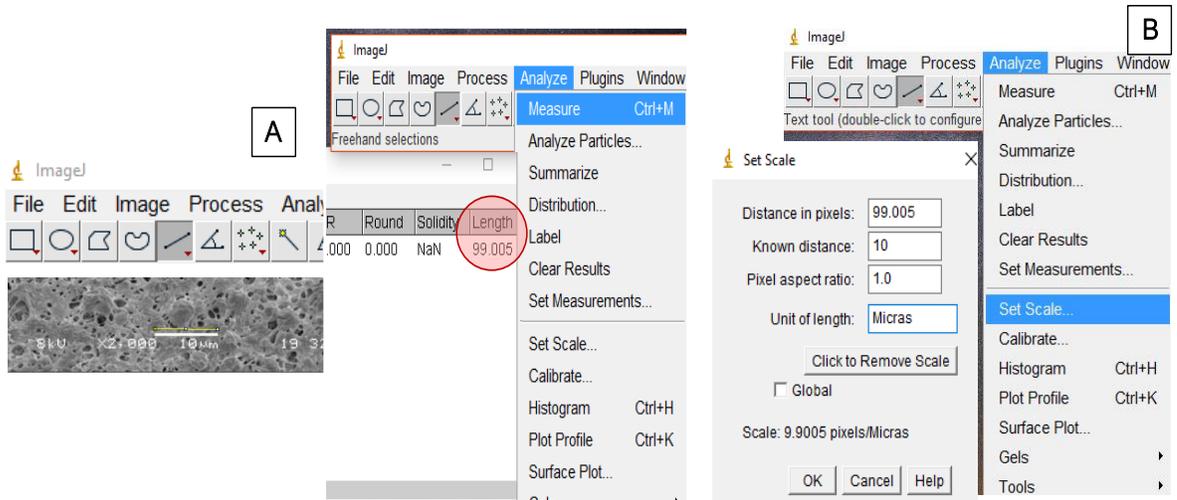


Figura 36. Generación de patrón con medida conocida(A) y establecimiento de la escala con base en el patrón generado (B).

3. Delimitación de estructuras

Las imágenes de SEM se transformaron en imágenes en blanco y negro de 8 bits (imágenes binarias) al emplear el submenú secundario “Threshold”, en las que las áreas negras representan los poros y las áreas blancas en la superficie sólida tal como se aprecia en la figura 37.

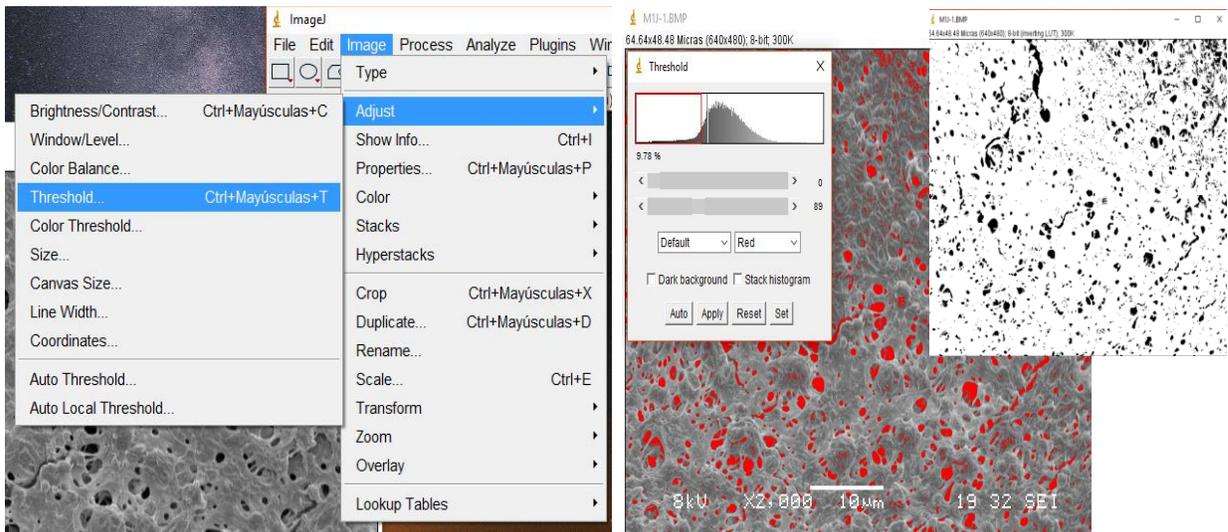


Figura 37. Conversión de imágenes de SEM a imágenes binarias de 8 bits.

4. Selección de parámetros y análisis de imagen

Previo al análisis, en el submenú “Set Measurements” del software se indicaron los parámetros a analizar (figura 38A); posteriormente, las imágenes binarias se analizaron como partículas al seleccionar el submenú “Analyze particles”, donde también se indicó la forma de presentación de los datos (figura 38B). Finalmente, al presionar “OK” en el cuadro de diálogo del submenú “Analyze particles” el programa analiza las estructuras delimitadas bajo los criterios indicados mostrando los resultados en forma detallada (“Results”) y resumida (“Summary”) (figura 38C).

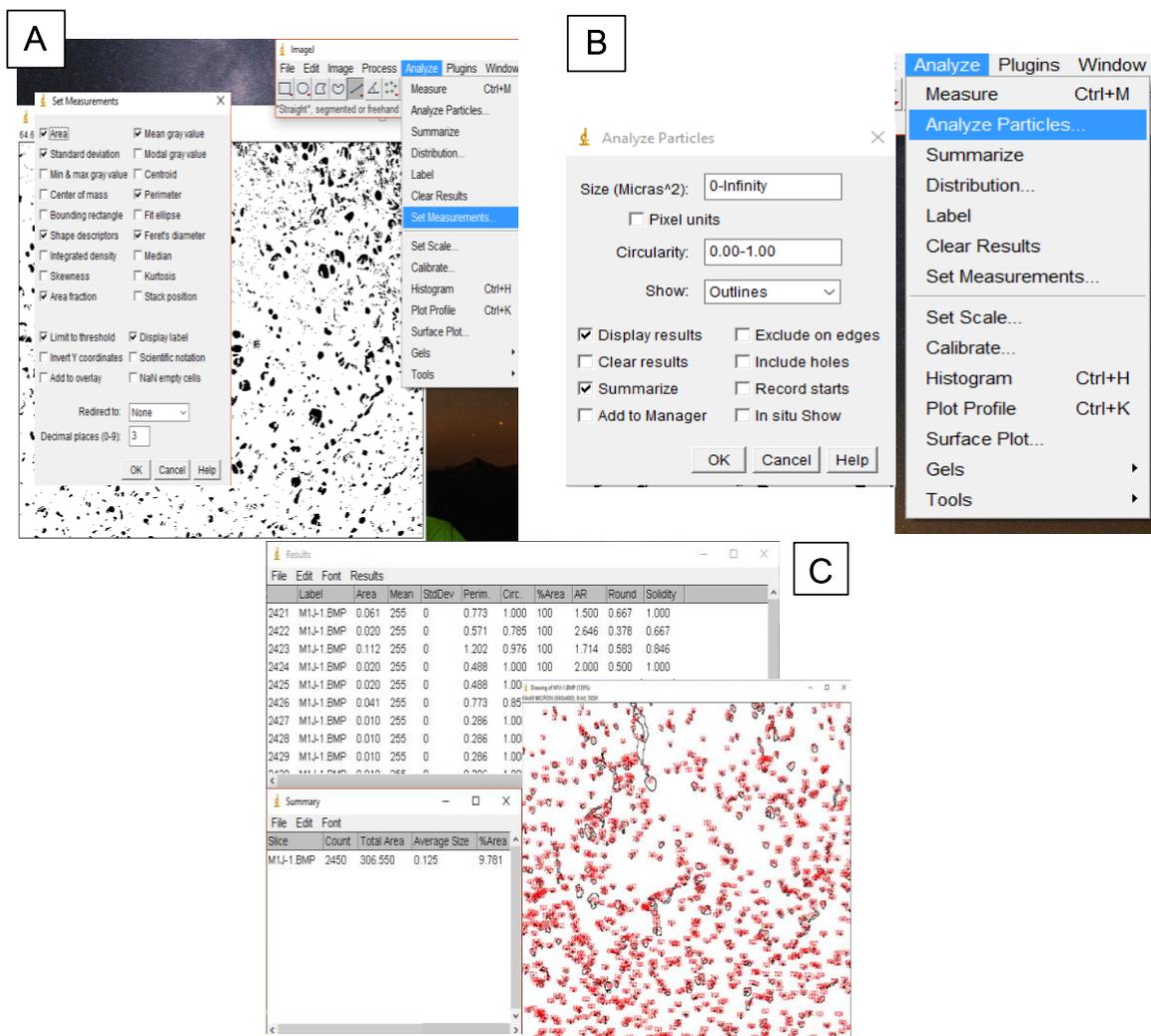


Figura 38. Selección de parámetros (A), análisis de imágenes binarias (B) e informe detallado de los resultados (C).

Anexo 4. Curvas representativas de sorción de CO₂

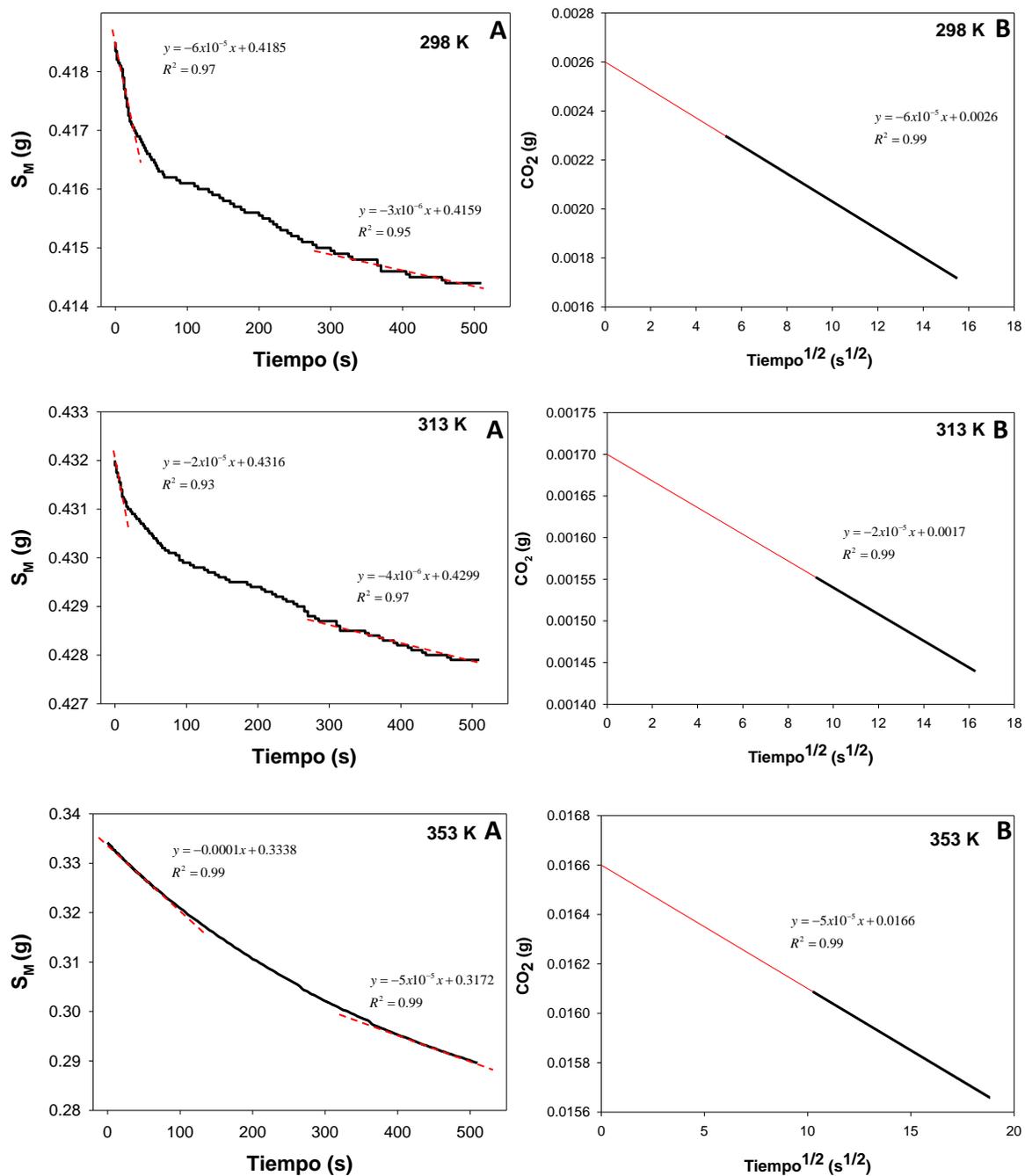


Figura 39. Curvas representativas de desorción (A) y sorción de CO₂ (B) de las matrices S_M procesadas a diferentes temperaturas después del proceso de espumado.

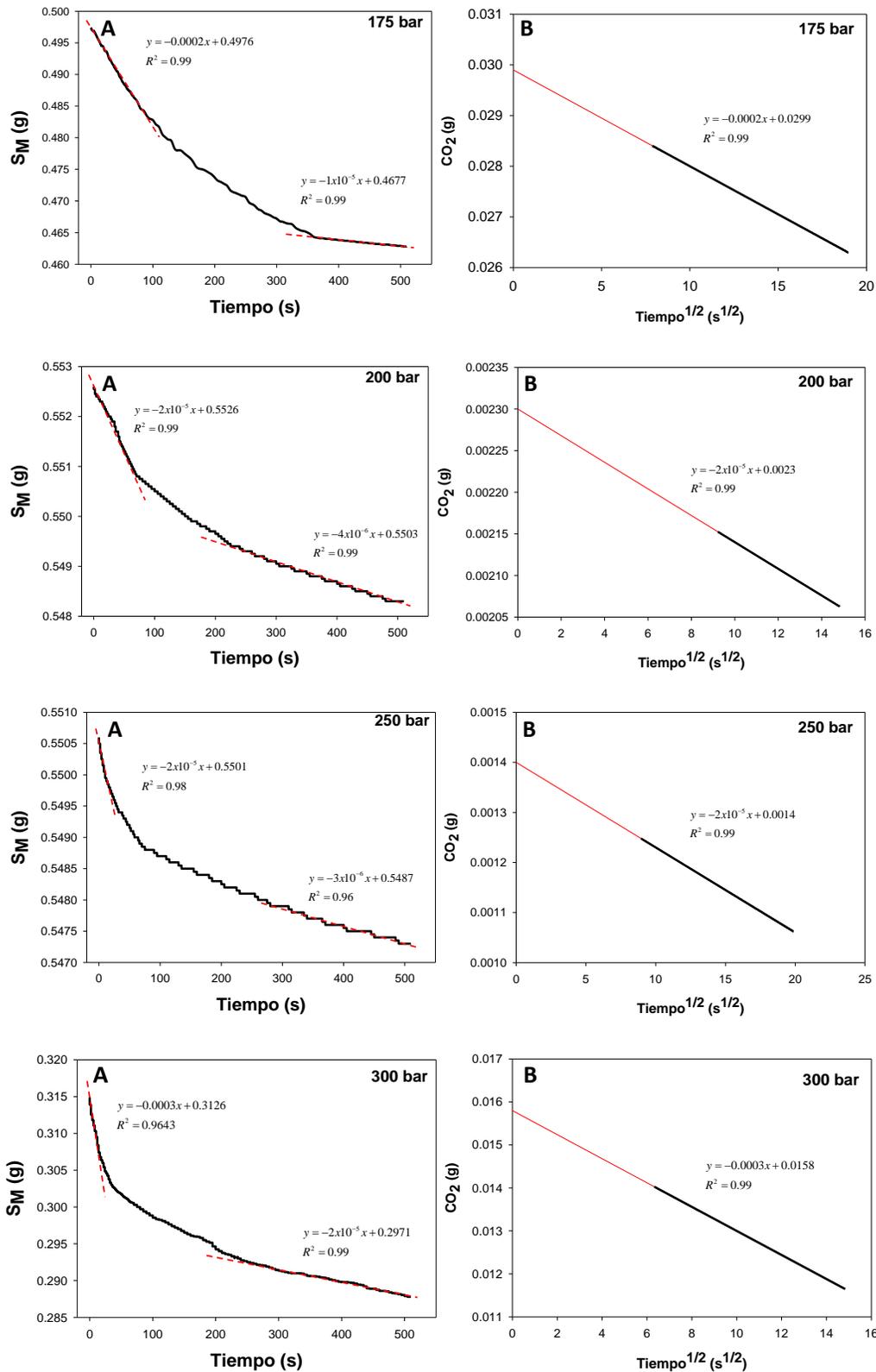


Figura 40. Curvas representativas de desorción (A) y sorción de CO₂ (B) de las matrices S_M procesadas a diferentes presiones después del proceso de espumado.

Anexo 5. Espectros de infrarrojo de las matrices S_M obtenidas con diferentes temperaturas y presiones después del procesamiento con CO_2

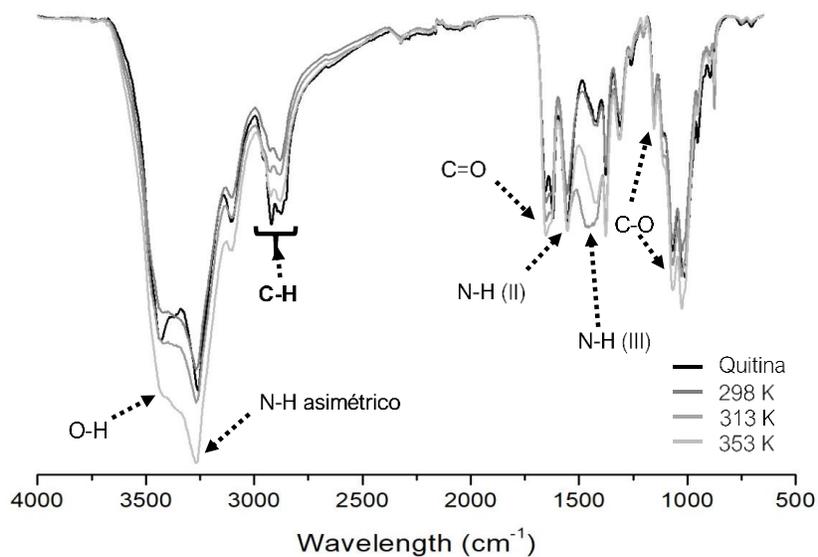


Figura 41. Espectros de infrarrojo de quitina y S_M a diferentes temperaturas después del tratamiento con scCO_2 .

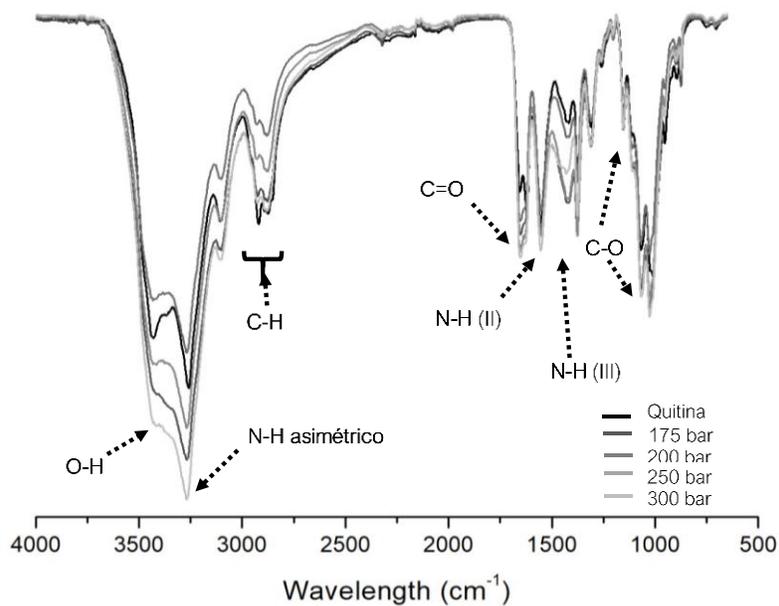


Figura 42. Espectros de infrarrojo de quitina y S_M a diferentes presiones después del tratamiento con scCO_2 .

Anexo 6. Determinaciones de ángulo de contacto de las matrices porosas S_M de quitina después del tratamiento con $ScCO_2$.

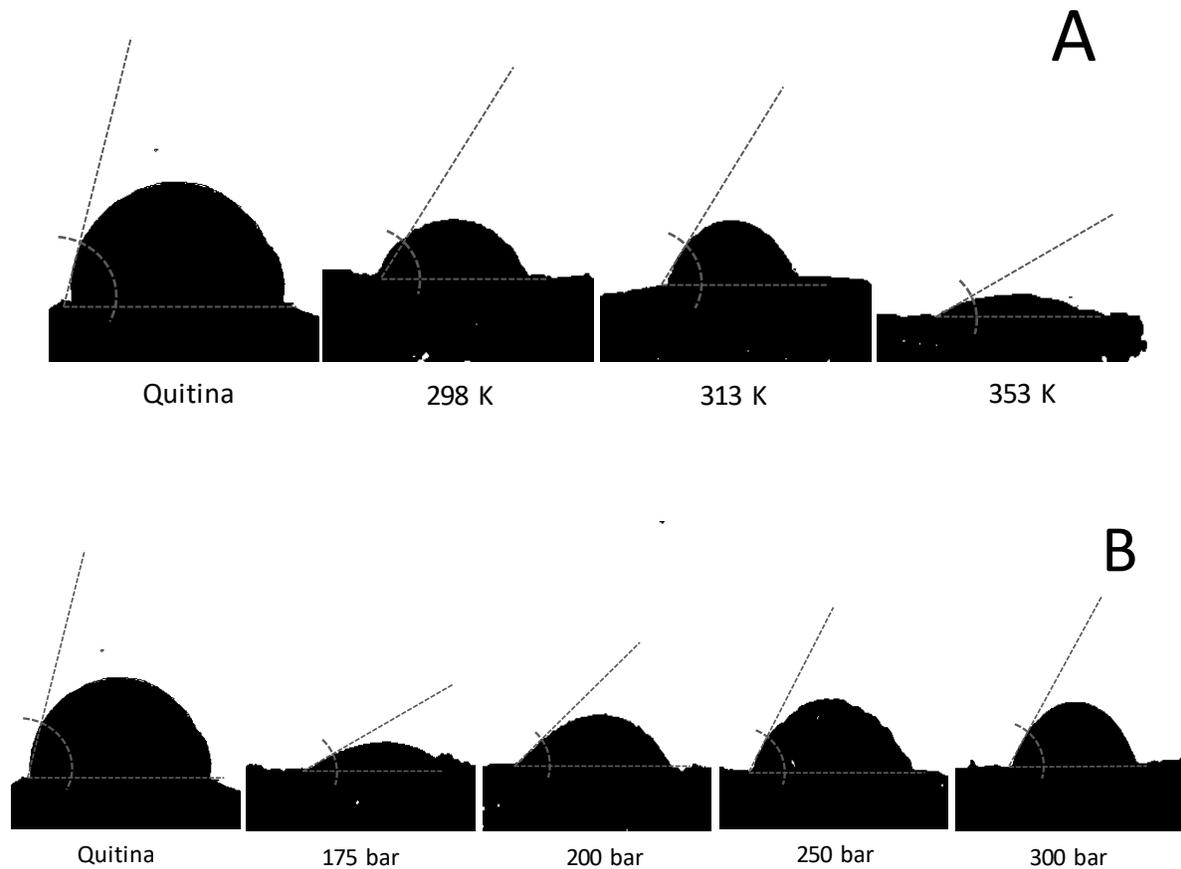


Figura 43. Determinación del ángulo de contacto de las matrices porosas de quitina obtenidos después del proceso de espumado con $scCO_2$ a diferentes temperaturas (A) y presiones (B).

Anexo 7. Determinaciones de hinchamiento y erosión de las matrices porosas S_M de quitina después del tratamiento con $scCO_2$.

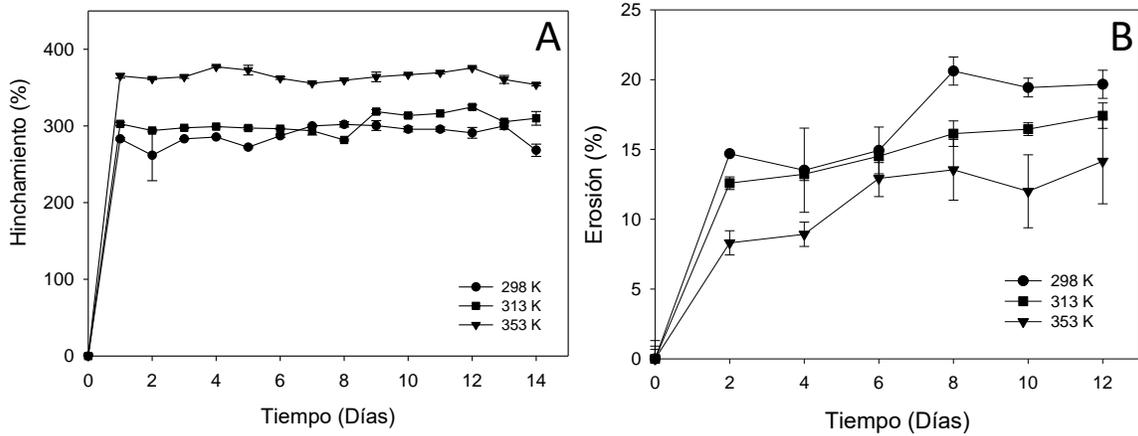


Figura 44. Perfil de hinchamiento (A) y de erosión (B) de las matrices porosas S_M después del proceso de espumado a diferentes temperaturas.

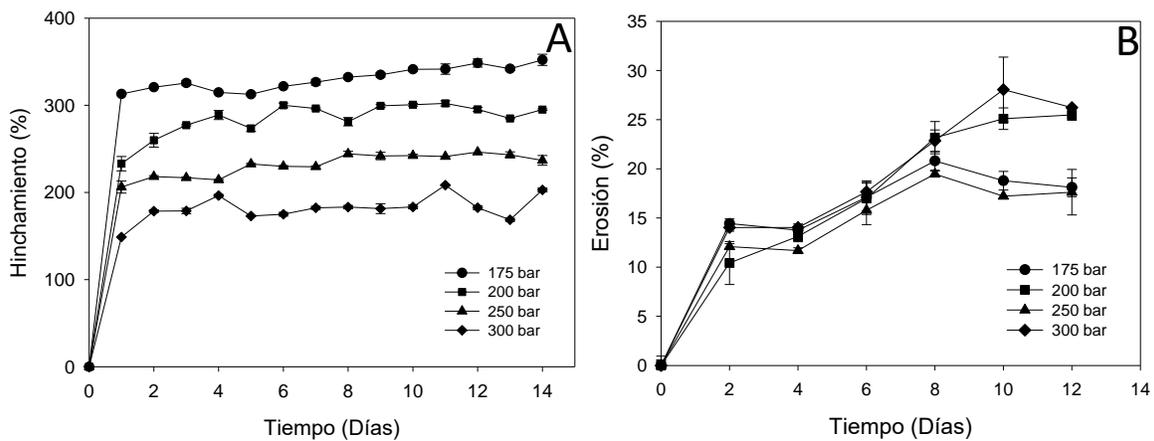


Figura 45. Perfil de hinchamiento (A) y de erosión (B) de las matrices porosas S_M después del proceso de espumado a diferentes presiones.

Anexo 8. Curvas de esfuerzo- deformación de las matrices porosas S_M de quitina después del tratamiento con $scCO_2$.

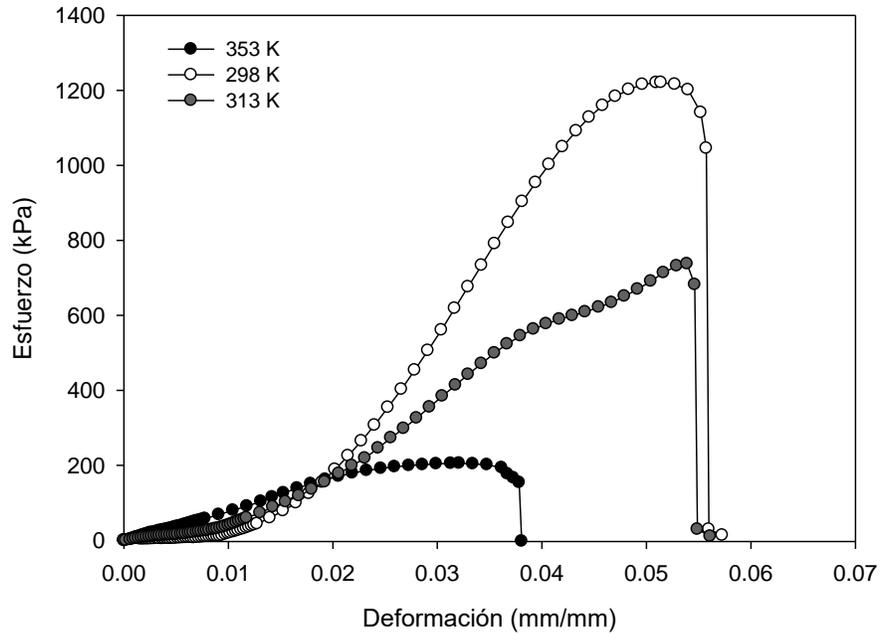


Figura 46. Curvas de esfuerzo- deformación de las matrices S_M de quitina procesadas con $scCO_2$ empleando diferentes temperaturas y 175 bar.

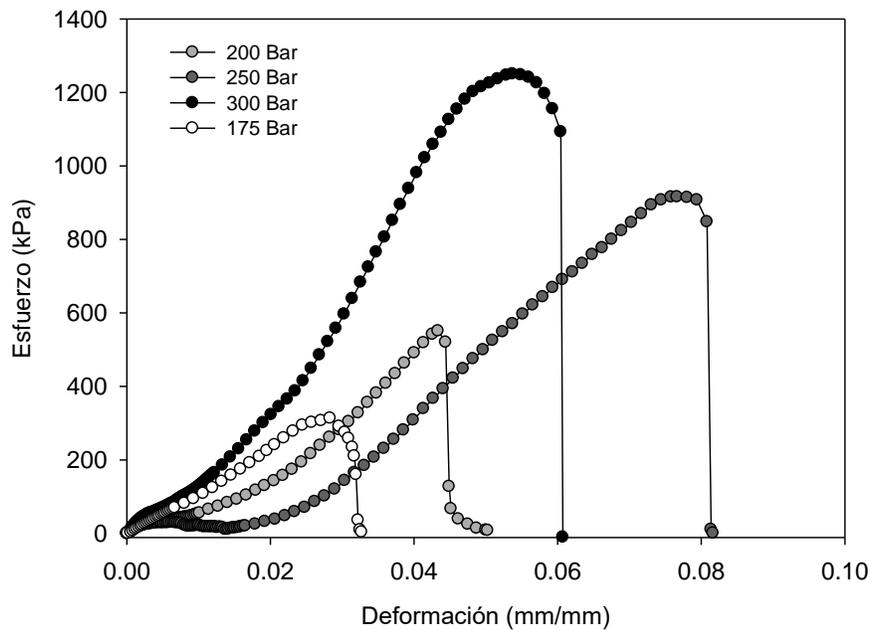
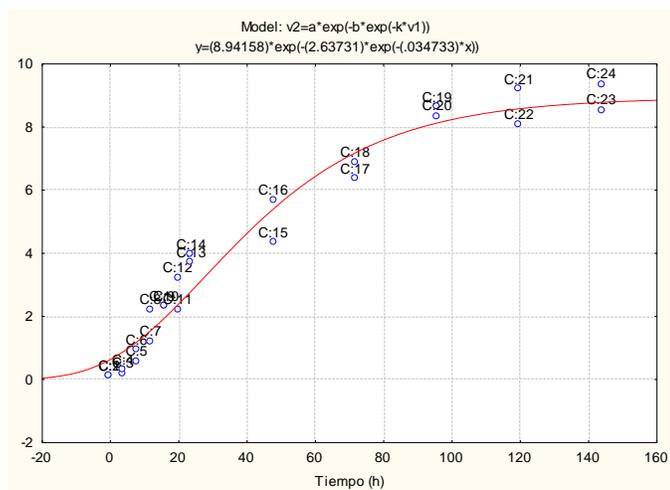


Figura 47. Curvas de esfuerzo- deformación de las matrices de quitina procesadas con $scCO_2$ empleando diferentes presiones y 353 K.

Anexo 9. Ajuste de los datos experimentales empleando el modelo de Gompertz de la producción de biomasa con el 15% ($v \cdot v^{-1}$) de inóculo inicial y matrices porosas de quitina S_M en cultivo en estado sólido.

Observed data	Predicted data
0.091544	0.639804
0.091544	0.639804
0.183089	0.900775
0.274633	0.900775
0.549267	1.213149
0.915445	1.213149
1.190078	1.571956
2.197068	1.571956
2.288612	1.969566
2.288612	1.969566
2.197068	2.396612
3.204057	2.396612
3.661780	2.842954
3.936413	2.842954
4.302591	5.434950
5.675759	5.434950
6.316570	7.202291
6.865837	7.202291
8.605182	8.139493
8.330549	8.139493
9.154449	8.583809
8.055915	8.583809
8.513638	8.784341
9.337538	8.784341

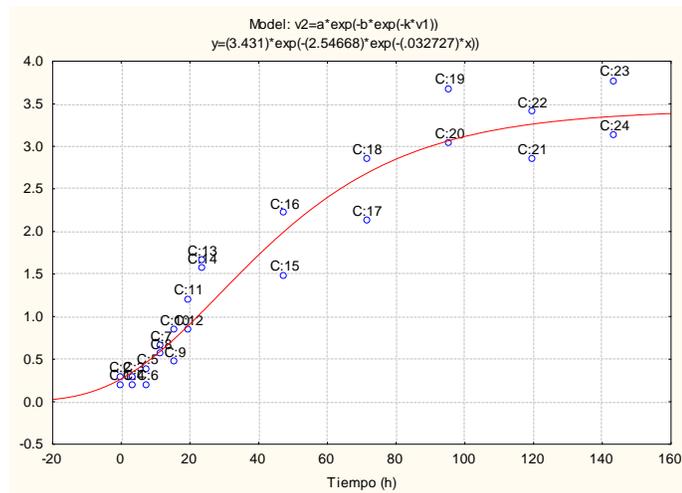
Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz.	
a	8.94
b	2.64
k	0.035
R ²	0.9647



Anexo 10. Ajuste de los datos experimentales empleando el modelo de Gompertz de la producción de celulosa con el 15% (v·v⁻¹) de inóculo inicial y matrices porosas de quitina S_M en cultivo en estado sólido.

Observed data	Predicted data
0.183089	0.268790
0.274633	0.268790
0.274633	0.367385
0.183089	0.367385
0.366178	0.483258
0.183089	0.483258
0.640811	0.614650
0.549267	0.614650
0.457722	0.759033
0.823900	0.759033
1.190078	0.913377
0.823900	0.913377
1.647801	1.074423
1.556256	1.074423
1.464712	2.020821
2.197068	2.020821
2.105523	2.695312
2.837879	2.695312
3.661780	3.073516
3.020968	3.073516
2.837879	3.263132
3.387146	3.263132
3.753324	3.353420
3.112513	3.353420

Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz.	
a	3.43
b	2.55
k	0.033
R ²	0.9338





"Estudio del procesamiento de polímeros naturales para la producción de materiales porosos y su aplicación como soportes de crecimiento de *Gluconacetobacter xylinus*"



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 3 del mes de julio del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. MIQUEL GIMENO SECO
DR. JUAN GABRIEL VIGUERAS RAMIREZ
DRA. DIANA ALONSO SEGURA
DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MARIANA QUINTANA QUIRINO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

MARIANA QUINTANA QUIRINO
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARALUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. MIQUEL GIMENO SECO

VOCAL

DR. JUAN GABRIEL VIGUERAS RAMIREZ

VOCAL

DRA. DIANA ALONSO SEGURA

SECRETARIO

DR. HUMBERTO VAZQUEZ TORRES