

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

Evaluación y caracterización de productos del proceso de HTC de Celulosa Bacteriana.

Defensa del Proyecto Integrador Maestría en Ingeniería Circular

Jonathan Javier Sayavedra Delgado

**Herman Murillo, PhD.
Director de Trabajo de Titulación**

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito
para la obtención del título de Magister en Ingeniería Circular

Quito, 22 de julio de 2025

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Título Trabajo de Titulación

Jonathan Javier Sayavedra Delgado

Nombre del Director del Programa:	Frank Alexis
Título académico:	PhD
Director del programa de:	Maestría en Ingeniería Circular

Nombre del Decano del colegio Académico:	Eduardo Alba
Título académico:	PhD
Decano del Colegio:	Colegio de Ciencias e Ingenierías

Nombre del Decano del Colegio de Posgrados:	Dario Niebieskikwiat
Título académico:	PhD

Quito, Julio de 2025

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombre del estudiante: Jonathan Javier Sayavedra Delgado

Código de estudiante: 00343549

C.I.: 0502865850

Lugar y fecha: Quito, 22 de julio de 2025

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following graduation project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

DEDICATORIA

“Dicen que nada es imposible”. — José Madero

Dedicado al ser supremo porque todo con él y sin él es posible, también de forma especial a todos los que me apoyaron de una u otra forma, sin su ayuda, apoyo, palabras de aliento no hubiese logrado todo lo que tengo hasta ahora. Por y para ustedes mi familia, mis pilares y mi inspiración, 4 personas y 3 colitas.

Javier

AGRADECIMIENTOS

Con infinito agradecimiento a la Universidad San Francisco de Quito por el hecho de haber propuesto este programa y poder realizar parte de este trabajo en sus instalaciones. A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Sede Latacunga, en especial al complejo de Laboratorios de Petroquímica por el acceso a sus laboratorios para culminar este trabajo, con ayuda de mis grandes amigos, Carlos, Cris y Vero. Así también a Herman por su acompañamiento en este trabajo, su calidez de persona y conocimientos enriquecieron esta idea y sé que se puede continuar colaborando.

Gracias por la oportunidad.

RESUMEN

En el presente trabajo se buscó evaluar y caracterizar el subproducto de una fermentación aerobia de un SCOBY (Cultivo Simbiótico de Bacterias y Levaduras). Durante la fermentación se produce una capa superior que actúa de protección para este cultivo, se realizaron varios cultivos a fin de obtener la cantidad de materia prima para realizar los distintos análisis, se realizó un análisis de contenido de celulosa, dando un resultado de 82.5% de contenido y baja cantidad de lignina, relación que tiene un factor en la característica de los productos. El hidrocarbón obtenido luego del proceso de Carbonización Hidrotermal (HTC), se caracterizó analíticamente mediante espectroscopia Infrarroja dando como particularidad dos picos a 2925 y 2856 cm^{-1} , los cuales crecen con el aumento de temperatura del proceso de carbonización. Adicionalmente, se realizó un análisis TGA para la estimación de valores proximales, la muestra de materia prima tuvo un valor de 36.10%, la muestra de CB200 tiene un valor bajo de cenizas 7.895% a comparación de 12.93% para la muestra CB 220. El licor coproducto del proceso de HTC, mostraron cantidades considerables de furfural que disminuyó con el aumento de temperatura y se tuvo el efecto contrario en fenoles.

Palabras clave: HTC, Celulosa Bacteriana, Fermentación, Furfural.

ABSTRACT

In the present work, we sought to evaluate and characterize the by-product of aerobic fermentation of a SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts). During fermentation, an upper layer is produced that acts as protection for this crop, several cultures were carried out in order to obtain the amount of raw material to perform the different analyses, an analysis of cellulose content was carried out, giving a result of 82.5% content and low amount of lignin, a relationship that has a factor in the characteristics of the products. The hydrocarbon obtained after the Hydrothermal Carbonization (HTC) process was characterized analytically by Infrared spectroscopy, giving as a particularity two peaks at 2925 and 2856 cm^{-1} , which grow with the increase in temperature of the carbonization process. Additionally, a TGA analysis was performed for the estimation of proximal values, the raw material sample had a value of 36.10%, the CB200 sample has a low ash value of 7.895% compared to 12.93% for the CB 220 sample. The liquor co-product of HTC's process showed considerable amounts of furfural which decreased with increasing temperature and had the opposite effect on phenols.

Key words: HTC, Bacterial Cellulose, Fermentation, Furfural

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria	5
Agradecimientos	6
Resumen	7
Abstract.....	8
Tabla de contenido.....	9
índice de TABLAS.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
Introducción.....	12
Antecedentes	13
Justificación.....	14
Objetivos del proyecto.....	15
Revisión de la literatura.....	16
Metodología y diseño de la investigación	18
Obtención de la materia prima	18
Extracción y purificación.....	19
Secado y trituración	20
Proceso de HTC	20
Métodos analíticos	21
Análisis proximal	21
Determinación de contenido de lignina.....	21
Determinación de contenido de Holocelulosa.....	21
Contenido de celulosa.....	22
Evaluación de fenoles totales.....	22
Cuantificación de furfural	23
Prueba de Fehling	23
Caracterización de hidrochar	23
Análisis de datos	24
Conclusiones	34
Referencias	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Análisis de fracciones de lignina, holocelulosa y celulosa	24
Tabla 2 Comparación espectros Hidrocarbón CB200 y CB220	29
Tabla 3 Resumen de Furfural y Fenoles.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ejemplificación del proceso de obtención de CB	19
Figura 2 Ejemplificación del proceso de extracción y purificación	19
Figura 3 Ejemplificación del proceso de HTC	20
Figura 5 Termograma de CB	27
Figura 6 Espectro de FTIR de HTC de CB a 200 °C	28
Figura 8 TGA de Hidrocarbón CB200 y CB220.....	30
Figura 9 Curva de calibración para Fenoles Totales	31
Figura 10 Curva de calibración para Furfural	32
Figura 11 Prueba de Fehling	32

INTRODUCCIÓN

La dependencia de recursos provenientes del petróleo ha sido un fuerte apoyo para el desarrollo de la sociedad, sin embargo, esto ha ocasionado una generación de un sin número de contaminantes que tienen una repercusión muy grande en el ambiente. La búsqueda de sustitutos de los químicos obtenidos del petróleo es una prioridad en la actualidad donde se busca que todo material se enfoque en el desarrollo de la sostenibilidad. La biomasa es un recurso renovable y se podría decir que infinito, sin embargo, depende de la calidad de la tierra y de los recursos hídricos que cada vez son amenazados.

Los recursos poliméricos de origen natural, en su mayoría se encuentran en materiales lignocelulósicos, donde su constitución es en su mayoría de celulosa, hemicelulosa y lignina. El uso de este se da en nuevos procesos de transformación, como lo son procesos de pirolisis, carbonización hidrotermal y licuefacción hidrotermal.

Al incrementarse el interés en la producción de bebidas fermentadas probióticas, la producción de celulosa bacteriana va al alza, aunque sus procesos de producción en su mayoría son caseros, y en menor proporción a microescala e industrial. El relativo interés ha iniciado un enfoque en optimizar su obtención, especialmente como materia prima para procesos de carbonización hidrotermal orientados a la generación de biocombustibles, productos sólidos y otros productos de valor agregado. Buscando determinar las condiciones óptimas, donde se evalúan factores como la temperatura, el pH, el área superficial, el tipo de fuente de carbono (por ejemplo, sacarosa) y el volumen del medio de cultivo, que permitan acortar los tiempos de fermentación y, a su vez, incrementar el rendimiento en la síntesis de celulosa bacteriana, favoreciendo su aprovechamiento eficiente en procesos termoquímicos posteriores.

Antecedentes

El estudio de nuevos materiales de origen renovable que puede ser vegetal, animal o por microorganismos, ha generado interés en su estudio y desarrollo. Los téis fermentados se han consumido desde los años su característica de bebida fermentada con un contenido bajo o nulo de alcohol, lo que lo hace un atractivo para su producción. El resultado de esta producción es una película sólida que resulta de un proceso intermitente de Kombucha (UI-Islam et al., 2019). Los estudios se enfocan en la caracterización y aislamiento de las bacterias que constituyen este cultivo simbiótico de levaduras y bacterias (SCOBY). (Harrison & Curtin, 2021). De forma general, las revisiones se enfocan en experiencias sensoriales y la evaluación de factores que ayuden a mejorar la calidad sensorial del producto de fermentación. (Ofer & Alistar, 2023)

Las biopelículas obtenidas del producto de la fermentación han sido estudiadas para reemplazar los cueros animales y de poliuretano. Pueden ser usadas como papel, empaque de comida (Bell et al., 2023). Los procesos de tratamiento térmico están siendo demandados debido a la generación de nuevos productos como son carbón, productos acuosos y gas. Estos procesos son de transformación como la pirolisis y la carbonización hidrotermal (HTC). Esta ultima tiene la ventaja de que la biomasa no debe estar completamente seca, ocurre en ambientes cerrados con temperaturas de hasta 250°C, con presión de hasta 9 MPa. El proceso de HTC por lo general reduce el hidrogeno y oxigeno que contiene la biomasa que se emplea transformando la masa orgánica en un sólido que posee alta energía y densidad (Salcedo-Puerto et al., 2024). El proceso de HTC tiene ventajas por su versatilidad en la inclusión de biomasa para estos procesos de conversión, es eficiente a comparación de la pirolisis ya que su temperatura de trabajo está entre los 180 a 250 °C, entre los productos que se obtiene es de

interés tratar de valorizar los licores o agua de proceso que contiene compuestos orgánicos de interés (Ponce et al., 2025).

Justificación

El uso de fuentes renovables ayudará a disminuir el uso de materiales, componentes y demás elementos de origen mineral. El cuidado ambiental y el uso responsable de recursos marcan una necesidad de investigación de nuevos materiales encaminados en la aplicación y desarrollo de nuevas tecnologías. La evaluación y caracterización de estos nuevos materiales debe ser enfocado en sustituir materiales contaminantes, buscando la aplicación directa en la industria. el objetivo 6 de desarrollo sostenible habla sobre Agua limpia y saneamiento y el 12 de producción y consumo responsables, este último se enfoca en la reducción de desechos y la optimización y generación de subproductos, aumentando así el empleo de materiales y productos naturales (Arora-Jonsson, 2023). Para este caso se va a emplear la utilización de un subproducto de la fermentación de bebidas, lo cual genera una capa de protección. Esta capa de protección está constituida por celulosa bacteriana, obtenida por el consumo de carbohidratos (azúcar, glucosa, fructuosa) y té. La protección es una barrera para conservar la simbiosis de bacterias y levaduras en la bebida.

Las enzimas de las levaduras hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa, produciendo etanol, mientras que las bacterias del ácido acético convierten la glucosa en ácido glucónico, la fructosa en ácido acético y producen celulosa. El ácido acético es producido como estimulante para que la levadura produzca etanol y este sea convertido en ácido acético por la misma bacteria. (Laavanya et al., 2021)

La biopelícula o capa de protección está constituida por celulosa producida por bacterias con características de que las fibras creadas son 100 veces más pequeñas a las creadas por plantas. El crecimiento en popularidad de las bebidas fermentadas como la kombucha, ha

llegado a ser de interés para la generación de nuevos materiales, cadenas de microorganismos y condiciones de fermentación, lo que varía los resultados de composición química. (Ramírez Tapias et al., 2020).

Objetivos del proyecto

Objetivo General

Sintetizar y caracterizar los productos obtenidos por HTC de Celulosa Bacteriana

Objetivos específicos

Evaluar el proceso de obtención de celulosa bacteriana.

Realizar la caracterización fisicoquímica de la biomasa.

Sintetizar y caracterizar los productos obtenidos por HTC

REVISIÓN DE LA LITERATURA

La biomasa es un material orgánico que puede su origen puede ser animal o vegetal, de igual manera puede ser o no lignocelulósica, que esta posee celulosa, hemicelulosa y lignina. En cambio, la no lignocelulósica puede estar formada por ácidos grasos, proteína, celulosa, de origen animal. La composición de biomasa depende netamente de la fuente, que puede ser de residuos municipales, de fuentes agrícolas o residuos agroindustriales, esta composición ronda el 20 al 40% de hemicelulosa, del 40 al 60% de celulosa y de un 10-25% de lignina (Heidari et al., 2019).

La celulosa y la lignina son lo componentes más abundantes, la celulosa es una cadena lineal polimérica compuesta por monómeros de glucosa con enlaces glucósidos que constituye la estructura principal de la biomasa agroforestal. La lignina por otro lado es un polímero aromático de unidades polidispersas de fenilpropano. Estos dos componentes dan lugar a la formación de nuevos productos que varían cada vez en función de la composición celulosa/lignina exista en la biomasa empleada (Liang et al., 2023).

Existe celulosa que, a diferencia de la derivada de plantas de madera, algodón o bambú, es sintetizada por diversos géneros de bacterias como: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Komagataeibacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina*; esto se conoce como celulosa bacteriana (CB) o celulosa microbiana (CM) (Choi et al., 2022). Por otro lado, investigaciones apuntan a que esta CB tiende a reproducirse como partículas nanométricas con alta cristalinidad mediante métodos ácidos o enzimáticos (Choi & Shin, 2020). En las revisiones coinciden en el uso de la CB en materiales de uso medicinal como la implementación en tejidos vivos y como material de recubrimiento, esto porque desde 1992, ha sido reconocido como como seguro con sus siglas “GRAS” en inglés, por la FDA por la Administración de Alimentos y Medicinas.

El proceso de carbonización hidrotermal se debe tener en cuenta la estructura que generalmente la constituye hemicelulosa, celulosa y lignina, donde los parámetros de temperatura, presión, tiempo, relación de biomasa agua, catalizadores. Durante el proceso de carbonización, se producen reacciones de descarboxilación, los grupos carboxilo y carbonilo se degradan y liberan CO_2 y CO . Una reacción de polimerización donde interactúan dos moléculas se combina, lo que da como resultado la formación simultánea de una molécula más grande y la liberación de una molécula como el agua.

De los productos que se pueden recuperar uno es el hidrochar incluyen un aumento en el contenido de carbono, menor relación H/C y O/C, y mayor hidrofobicidad, acercándose a las propiedades del carbón. La superficie específica y la porosidad también varían según las condiciones del proceso, influenciando su uso como combustible o adsorbente. El licor, por otro lado, que se obtiene del proceso de filtrado contiene compuestos solubles, incluyendo ácidos orgánicos, azúcares, fenoles y otros productos de descomposición. Su composición química depende de las condiciones del proceso y del tipo de biomasa, y puede ser utilizado para la producción de bioproductos o como insumo en otros procesos, aunque requiere tratamiento adicional para su aprovechamiento. Por lo tanto, la interacción de los principales componentes de la biomasa que es celulosa/lignina, relación de la cual dependerá las características en los productos, la celulosa rápidamente genera compuestos volátiles, a diferencia de la lignina que está constituida por estructuras aromáticas y estas son térmicamente estables y ayudan a generar mayor cantidad de producto sólido.

METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Obtención de la materia prima

La materia prima se obtuvo de forma inicial de un emprendimiento de bebidas fermentadas, este SCOBY junto con su líquido fermentado donde es un medio que alberga bacterias que pueden ser y levaduras en estado activo. Se realizan procesos de fermentación de forma intermitente (batch) para la generación de nuevos SCOBYs. El proceso se realizó en la ciudad de Latacunga, específicamente en el laboratorio de investigación y desarrollo, perteneciente al Complejo de laboratorios de Petroquímica de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Los insumos empleados son té verde y azúcar, cantidades específicas por cada litro de agua empleada. El tiempo general de fermentación varía debido a las condiciones medioambientales, donde se va a generar este cultivo, si la temperatura es mayor a 18 °C el tiempo de fermentación puede ser de al menos 10 días, pero en condiciones de altura, la temperatura promedio es de 12 °C. La principal condición del lugar donde se generó la fermentación es ser asilado de luz, pero con acceso a oxígeno hasta que se evidencie la presencia de la membrana (nuevo SCOBY). Este procedimiento se repite hasta generar una cantidad considerable de materia prima.

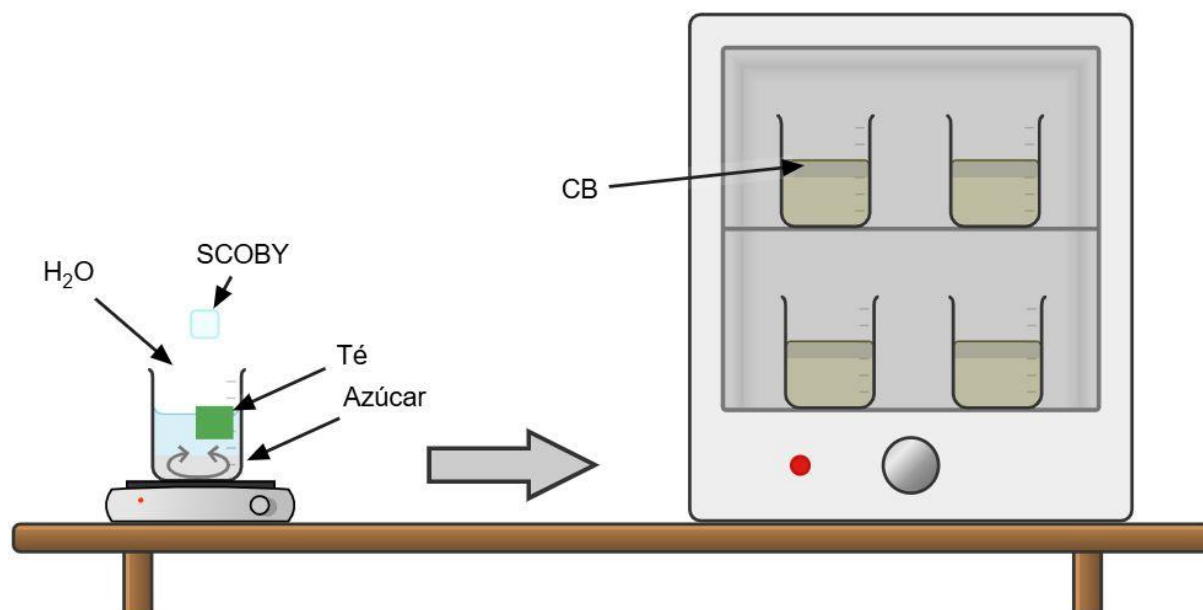


Figura 1 Ejemplificación del proceso de obtención de CB

Extracción y purificación.

Luego del proceso de fermentación se retira las biopelículas de celulosa bacteriana formadas en la interfase aire-medio de cultivo. En el proceso de purificación se realizó de forma alcalina, mediante el empleo de una solución de hidróxido de sodio a una concentración de 0.5 M. Se sumerge la película por completo en la solución y calentarla en una estufa a 80 °C durante una hora. El proceso tuvo la finalidad de eliminar las bacterias y células que se generaron durante el proceso de fermentación. Posterior se realiza unos lavados para la neutralización y eliminación de la solución alcalina empleada. (Amarasekara et al., 2020)

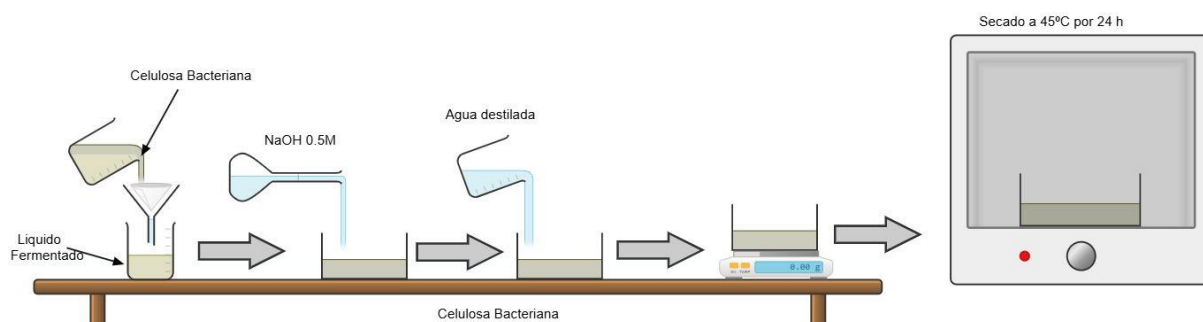


Figura 2 Ejemplificación del proceso de extracción y purificación

Secado y trituración

El proceso de secado se realizó en una estufa de convección forzada, a 40 °C para la eliminación de agua presente en las películas, cabe recalcar que el proceso de secado no se debe realizar, en elementos metálicos o plásticos para evitar un proceso de degradación. Cuando se obtuvo la celulosa seca se procedió a realizar un proceso de trituración para reducir el tamaño de partículas.

Proceso de HTC

Una vez la materia prima se haya reducido el tamaño se colocó en el reactor de alta presión TGYF-B5000ML de 0.5 L de capacidad, se evaluó las relaciones de biomasa y agua ingresada. Se establece la temperatura a (200 - 220 °C) y los tiempos de reacción de 60 min para este procedimiento. Posteriormente, se realizó una filtración para la separación de los elementos sólidos y líquidos. Los elementos sólidos se secan en una estufa a 105 °C durante 24 horas. Para culminar con el proceso de obtención del hidrochar, este se llevó a cabo una molienda en un equipo de molino de café, hasta obtener un material relativamente uniforme en para el tamaño de partícula.

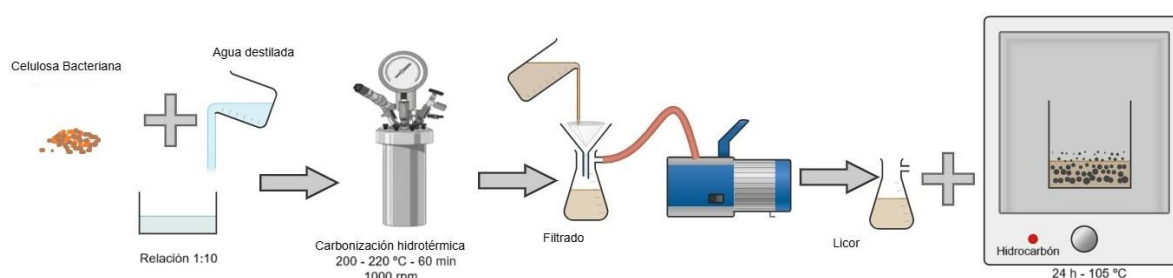


Figura 3 Ejemplificación del proceso de HTC

Métodos analíticos

Análisis proximal

Mediante este análisis se logró obtener los porcentajes de humedad, material volátil, carbono fijo y cenizas, con el uso de un equipo de análisis termogravimétrico, en función de la norma ASTM D7582-15. Para el ingreso del método en el equipo se introdujo 4 pasos: primero se introdujo un paso isotérmico, al mantener una temperatura de 20°C durante 1 min. Segundo se colocó una rapa de temperatura a una velocidad de 5 °C/min, hasta 750 °C, utilizando una atmósfera de nitrógeno a un caudal de 20 mL/min. Se hizo el cambio a una atmosfera oxidante (aire) con un caudal de 30 mL/min hasta alcanzar 975 °C. Finalmente se realizó un último paso isotérmico, manteniendo la temperatura final durante 1 min. (ASTM, 2015)

Determinación de contenido de lignina

Según lo descrito en la norma ASTM D1106, se pesó aproximadamente 1g de muestra en 3 vasos precipitados de 50 mL, se colocó 15 mL de solución de ácido sulfúrico al 72% en cada vaso se deja en agitación durante 2 h. Pasado este tiempo se dejó en un Erlenmeyer y se disolvió el ácido agregando agua destilada a cada matraz. Luego se calentó cada matraz hasta el punto de ebullición durante 4 h. el precipitado se filtró y se secó en una estufa a 105 °C (ASTM, 2001). Se estimó el porcentaje de lignina por:

$$\% \text{ lignina} = \frac{m_f}{m_o} \times 100\%$$

Determinación de contenido de Holocelulosa

El procedimiento se basa en la norma ASTM D1104, donde se pesó de 2 g, de 3 porciones de biomasa libre de extraíbles, se colocaron en matraces Erlenmeyer de 205 mL, se agregó 150 mL agua con 0.2 mL de ácido acético glacial y 1 g de clorito de sodio. Posterior se sometieron a calentamiento a baño maría a 75 °C durante 5h, se agregó cada hora 0.2 mL de

ácido acético junto con 1g de clorito de sodio. El contenido de matraz se trasvaso a uno de 1000 mL, para diluir la concentración de ácido acético y clorito de sodio. El contenido se filtró y se secó a 105 °C (ASTM, 2021). se estimó mediante la ecuación, donde m_f es la masa final y m_o la masa inicial:

$$\% \text{ Holocelulosa} = \frac{m_f}{m_o} \times 100\%$$

Contenido de celulosa.

El contenido de celulosa se realizó mediante el método ASTM D1103, al igual que la determinación anterior se pesaron 3 porciones de 2g y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, se agregó 50 mL de una solución de hidróxido sodio al 17.5% y se dejó reposar en un baño maría a 20 °C durante media hora con agitación, se añadió 50 mL de agua y se dejó a baño maría durante 5 min. Se filtro al vacío y se añadió 50 mL de Hidróxido de sodio (8.3%) al residuo, seguido de lavados con agua destilada caliente. Finalmente, el residuo solido se secó en una estufa a 105 °C y se almaceno en un desecador (ASTM, 1960). Se calculó mediante la expresión:

$$\% \text{ celulosa} = m_f \times \frac{\% \text{ holocelulosa}}{m_o}$$

Evaluación de fenoles totales

La evaluación de fenoles totales se realizó con la cuantificación con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se comprueba el espectro de absorbancia para determinar la longitud de onda donde se encuentra la mayor absorbancia. Se debe preparar una solución de carbonato de solio al 7.5 % en agua tipo I.

La curva de calibración se realizó con diferentes alícuotas en ppm de ácido gálico, que son los equivalentes con los cuales se compara la cantidad de fenoles.

Se tomo 2.5 mL de disolución para depositarse en un balón aforado de 10 mL. Se añadió 1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y se deja reaccionar por una hora. Luego se añade 5 mL de solución de carbonato de sodio (7,5 %) y completar el volumen con agua mili Q, se homogenizo con agitación y se deja reaccionar por una hora.(das Chagas et al., 2024)

Cuantificación de furfural

Para la cuantificación de furfural se utilizó el método de Seliwanoff, donde se emplea resorcinol 5% con ácido clorhídrico concentrado. Se realiza la preparación de más muestras en relación de 1 a 5. El escaneado se realizó en un equipo de UV-Vis de marca Ocean Optics, en un rango de 400 a 800 nm para determinar pico máximo de absorbancia. La curva de calibración se realizó con alícuotas de 0, 20, 40, 60, 100 ppm de un reactivo de furfural al 99.8% de pureza.(Besir et al., 2021)

Prueba de Fehling

La prueba de Fehling se realizó en los licores obtenidos del proceso de HTC, para determinar la presencia de azúcares reductores y algunos aldehídos, para realizar la prueba se hicieron diluciones de 1 a 25 de las muestras y se tomó 1mL de la muestra diluida, se añadió los reactivos de Fehling A y B, que contienen una sal de Cu (II) en un medio alcalino para poder reducirlo a Cu metálico, dando a la solución una tonalidad rojiza (Ibarra-Cervantes et al., 2024).(Jha, 2024)

Caracterización de hidrochar

El hidrochar se caracterizó mediante un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), en un equipo Perkin Elmer, Frontier. Con una longitud de onda de 500 a 4000 cm^{-1} , el equipo posee un accesorio ATR con cristal universal de diamante.

ANÁLISIS DE DATOS

La formación de películas se obtuvo mediante a la fermentación de un SCOBY, junto con una infusión de té, y sacarosa, las condiciones de crecimiento que influyen son la temperatura ambiente, cantidad de té para infusión, tipo de té para la infusión y finalmente la cantidad de sacarosa empleada, por lo que la generación de más biopelícula fue a unas condiciones de temperatura de 30 °C y una concentración de sacarosa de 250 g/L, disueltos en una infusión de té, para generar una cantidad de 2 litros, para un tiempo de fermentación de 7 días.

La cantidad de humedad en relación de base húmeda de las películas de celulosa bacteriana fue de 98.47% y en base seca de 6469.74%, lo que nos indica que estas fibrillas de celulosa retienen gran cantidad de agua.

Se caracterizó la materia prima, por métodos para la determinación de lignina, y celulosa (Tabla 1), para la primera determinación se realizó por triplicado dando un promedio de 3.97% con una desviación estándar de 1.98, posterior se hizo una extracción de celulosa obteniendo un valor de 82.5% con una desviación estándar de 2.04. De manera general, se ha venido manejado en los últimos años investigaciones con más enfoque en biomasa lignocelulósica obtenida de los cultivos y los residuos de procesamiento forestal contiene entre un 35 y un 60 % de celulosa, un 15-30 % de hemicelulosa y un 10-25 % de lignina (Liu et al., 2023). Por lo tanto, se puede ver que la cantidad de celulosa es mucho mayor a la biomasa lignocelulósica por lo cual se puede afirmar que se pueden mejorar procesos u materiales a partir de esta materia prima.

Tabla 1 Análisis de fracciones de lignina, holocelulosa y celulosa

Fracción	Resultado	Referencia

Lignina	3.97±1.98%	10-25%
Celulosa	82.5±2.04%	35-60%

Nota. Los valores reportados en la columna de resultados se calcularon en base seca y libre de extraíbles.

Se realizó un análisis FTIR de la celulosa bacteriana triturada que fue la materia prima para la alimentación de HTC, en el análisis se realizó con celulosa bacteriana seca, se determinó como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** el pico característico a 3391.01 cm^{-1} , para la presencia de grupos hidroxilos con vibraciones de estiramiento, y formación de enlaces inter e intramoleculares de hidrogeno. A 2900 se tiene el estiramiento de C-H, en 1636.49 cm^{-1} representa una vibración de H₂O con absorción de flexión OH, en cuanto en el ancho de banda 1403.90 cm^{-1} existe flexión del CH₂O, mientras tanto en el intervalo de banda 1338.35 cm^{-1} hace referencia a la flexión de CH (Fuller et al., 2018). Los monómeros carbohidratos se encuentra entre los anchos de banda de 1108.63 cm^{-1} a $1019,63\text{ cm}^{-1}$ y estas enlazados a un polímero mediante bandas de estiramiento de COC y CO. Finalmente, el pico 638.95 cm^{-1} expresa el -OH con deformación fuera del plano.(Larkin, 2011) Estos espectros fueron muy similares a los obtenidos anteriormente para la nanocelulosa bacteriana, que es el componente principal de las muestras. En ambos espectros mostrados, se pudo identificar una primera banda de absorción en la región de $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ atribuida a la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo (OH-) debido al agua y los carbohidratos. La siguiente banda de absorción en la zona de $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ se relacionó con los modos de estiramiento simétrico y antisimétrico de C-H en los grupos funcionales metil (CH₃) y metileno (CH₂) asociados a la celulosa. En el rango de $1800\text{ a }1200\text{ cm}^{-1}$, la banda a 1641 cm^{-1} se asignó a la contribución de polifenoles y también a la flexión de los enlaces O-H en las moléculas de agua absorbidas (Coma et al., 2019). Los picos alrededor de 1428 cm^{-1} y 1340 cm^{-1} se

observaron en la celulosa bacteriana (Cerrutti et al., 2016), presentó dos picos distintivos a 1730 cm^{-1} y 1232 cm^{-1} , correspondientes al estiramiento de C=O y C-O-C de los grupos acetato, respectivamente. Otros autores indicaron que en la región de 1800 a 1200 cm^{-1} , la presencia de impurezas, como proteínas, ácidos nucleicos y residuos de células en las muestras, contribuye a la absorbancia total y podría superponerse con las bandas de celulosa en esa región. La región de 1200 - 940 cm^{-1} que contiene los picos asignados principalmente a los modos de estiramiento de las macromoléculas de carbohidratos y los grupos laterales (C-O-C, C-OH, C-H), los picos en esta región se asociaron con los modos vibracionales de la glucosa de la estructura de la celulosa.

El análisis termogravimétrico se realizó mediante el análisis de termograma de la Figura 4 permitió la obtención de los parámetros de un análisis proximal, donde la humedad, materia volátil, carbono fijo y cenizas, se obtuvieron los valores de 2.829, 50.686, 10.374, 36.102%, respectivamente. Adicionalmente, la gráfica de TGA, se muestra 5 inflexiones de degradación. En la primera inflexión muestra una variación de peso del 2.829% desde temperatura ambiente hasta los $186.43\text{ }^{\circ}\text{C}$ que hace referencia a la evaporación y deshidratación de agua retenida en la muestra de CB. La segunda y tercera se evaluaron en el intervalo de $186.43\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $316.29\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde se presenta una reducción de peso del 50.686% esto se debe a una degradación térmica provocando una ruptura de cadenas de celulosa y degradación de la CB por ruptura de enlace intermoleculares de hidrógeno. En cuanto a la cuarta pérdida de 29.20% se encuentra en el rango de temperatura de $316.29\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $557.21\text{ }^{\circ}\text{C}$ evidenciando la descomposición de los enlaces glucosa y reordenándolos para dar lugar a la formación de grupos carbonilo y carboxilo (Avcioglu et al., 2021). Finalmente, la quinta etapa comprende desde $557.29\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $638.73\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una pérdida de peso de 5,66 % y la formación de residuos de carbono. (Cerrutti et al., 2016)

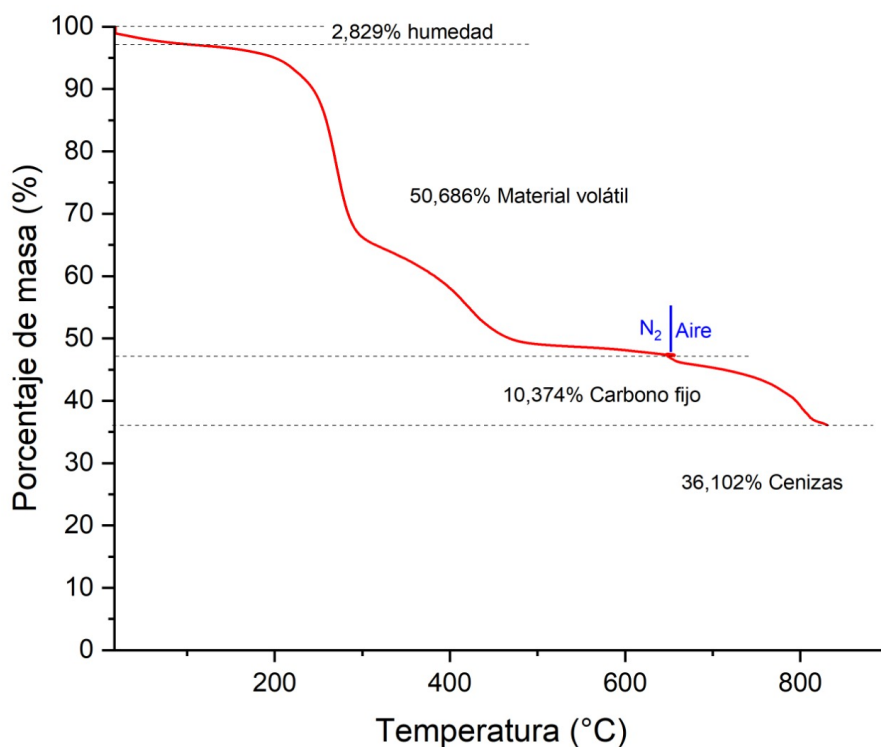


Figura 4 Termograma de CB

El proceso de HTC, se realizó una prueba con una relación de 1 a 20 para la cantidad de CB utilizada y cantidad de agua empleada se llevó a cabo a una temperatura de 220 °C. Luego se estableció la variación de 1 factor a diferentes condiciones de temperatura 200 y 220 °C, manteniendo constante el peso de la CB (10 g) y el volumen total de agua del reactor 100 mL, nombrándolas CB200 y CB220. Luego del proceso de HTC, se evaluó el rendimiento de hidrochar de 6.4901 y 6.9679 g para las muestras de CB200 y CB220. De igual manera el valor de licor obtenido fue de 104 y 102 mL. Un aumento obvio del contenido de C en la celulosa ocurrió a 220 °C (del 0.4778), que se asoció con la desoxidación severa de la celulosa.

Se realizó un análisis FTIR de las muestras de Hidrochar (Figura 5) para CB200. El espectro FTIR revela la presencia de grupos hidroxilo y carbonilo (O-H y C=O), lo que indica compuestos oxigenados como ácidos carboxílicos, alcoholes y cetonas, probablemente formados a partir de la descomposición de celulosa, hemicelulosa y lignina. Los picos alifáticos

a 2925 y 2856 cm^{-1} apuntan a cadenas saturadas de $-\text{CH}_2-$, lo que sugiere lípidos residuales o estructuras no carbonizadas. Las bandas aromáticas distintivas (1601, 1506, 875 cm^{-1}) son un signo claro de anillos aromáticos, que se encuentran comúnmente en los productos derivados de la lignina. Por último, las bandas C-O-C y C-O ($\sim 1260\text{-}1030$ cm^{-1}) sugieren la presencia de estructuras residuales de polisacáridos u otros compuestos de biomasa oxigenados (Liu et al., 2023).

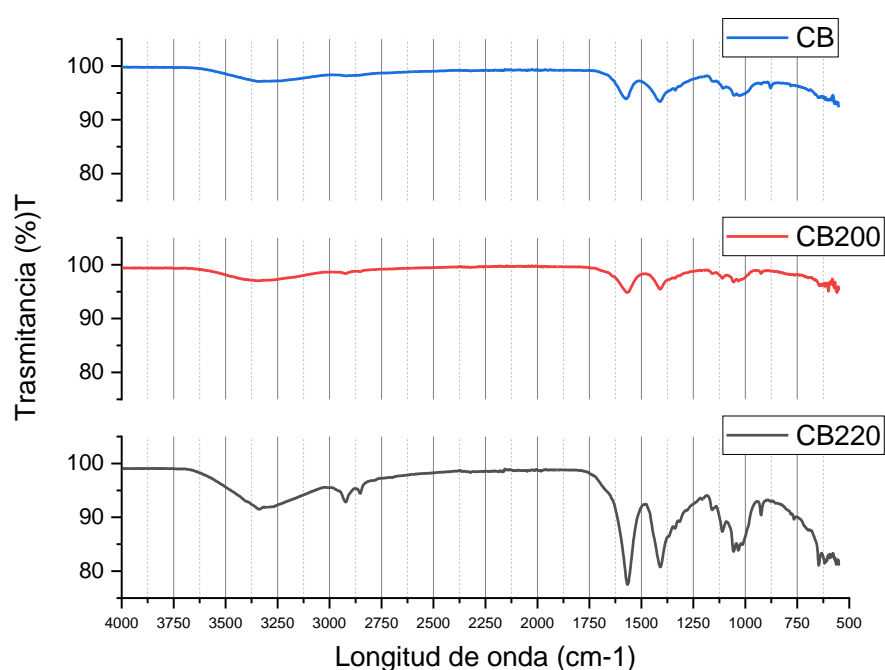


Figura 5 Espectro de FTIR de HTC de CB a 200 °C

En **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** para CB220, comparten los mismos picos en el espectro presentado, pero a diferencia del espectro de materia prima, sobresalen 2 picos el primero a 2928 cm^{-1} , que puede indicar que debido a la celulosa hay presencia de polisacáridos alifáticos, por lo tanto, este pico representa la presencia de cadenas alifáticas ($-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$), lo que sugiere materia orgánica no completamente carbonizada o estructuras tipo polisacáridos residuales. Adicional el pico de 2856 cm^{-1} que representaría un

estiramiento simétrico de $-\text{CH}_2-$ debido a componentes de igual manera que no se hayan degradado completamente de cadenas más largas (Ischia et al., 2024).

A temperaturas más altas (220 °C vs 200 °C), el material muestra una disminución del contenido de O-H (3345 cm^{-1}) y C-H (2925 y 2856 cm^{-1}), lo que indica deshidratación y pérdida parcial de cadenas alifáticas debido a la descomposición o carbonización. Si bien persisten algunos grupos C = O (1713 cm^{-1}), hay un aumento relativo en los picos aromáticos (1601 , 1506 , 875 cm^{-1}), lo que sugiere una mayor aromatización. Además, una ligera disminución de C-O-C y C-O (~ 1260 - 1030 cm^{-1}) apunta a una descomposición parcial de polisacáridos o éteres (Coma et al., 2019).

Tabla 2 Comparación espectros Hidrocarbón CB200 y CB220

Banda (cm^{-1})	Asignación	Grupo funcional / Vibración	CB200	CB220	Cambio observado
3345	$\nu(\text{O-H})$	Hidroxilos, agua, alcoholes, fenoles	Alta	Media	Disminución (menor contenido de O-H)
2925	$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$	Estiramiento asimétrico de $-\text{CH}_2-$ alifáticos	Alta	Media	Disminución (menos cadenas alifáticas)
2856	$\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$	Estiramiento simétrico de $-\text{CH}_2-$	Alta	Media	Disminución
1713	$\nu(\text{C=O})$	Carbonilos: ácidos, cetonas, aldehídos, ésteres	Alta	Alta	Similar (persisten grupos C=O)
1601	$\nu(\text{C=C})$ aromático / $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$	Aromáticos, carboxilatos	Media	Alta	Aumento (mayor aromatización)
1506	$\delta(\text{C-H})$ aromático	Deformación C-H en anillos aromáticos	Media	Alta	Aumento (polisacáridos /aromatización)
1423	$\delta(\text{CH}_2)$	Flexión de metileno	Media	Media	Sin cambios notables
1263	$\nu(\text{C-O})$	Ácidos carboxílicos, ésteres, fenoles	Media	Baja	Disminución (ruptura de C-O)
1115	$\nu(\text{C-O-C})$	Enlaces éter (polisacáridos/lignina)	Media	Baja	Disminución
1033	$\nu(\text{C-O})$	Alcoholes primarios/secundarios, polisacáridos	Alta	Media	Reducción (menor contenido oxigenado)
875	$\delta(\text{C-H})$ aromático (fuera de plano)	C-H en anillos aromáticos	Baja	Media	Aumento (aromatización creciente)

En la Tabla 2, se realiza una comparación de los picos más sobresalientes de los espectros, mismos que como se discute anteriormente hacen énfasis en el cambio de temperatura del proceso de HTC.

En el análisis de TGA de los hidrocarbones obtenidos que se puede ver en la Figura 6, se puede ver que en contenido de humedad el CB200 ha retenido menos contenido de humedad que el CB220, por otro lado, con el aumento de temperatura del proceso, se tiene menos contenido de material volátil en el CB220, al igual que las cenizas.

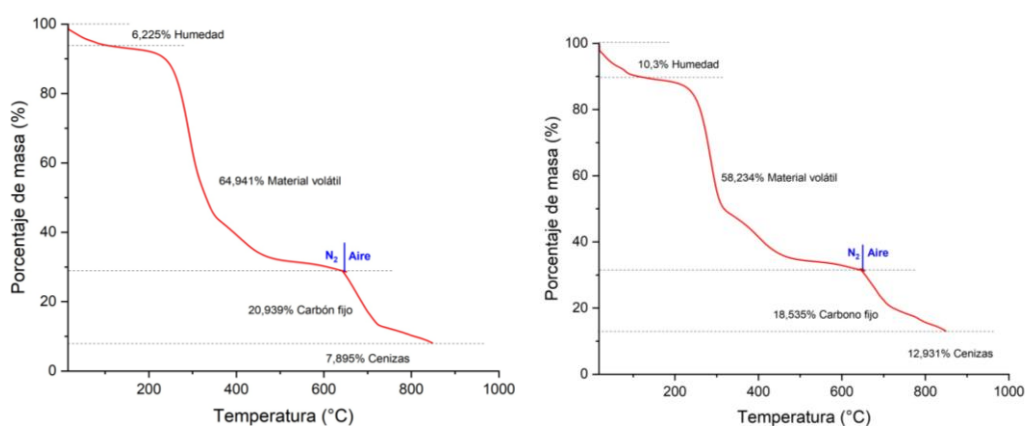


Figura 6 TGA de Hidrocarbón CB200 y CB220

De los licores obtenidos se evaluó el contenido de fenoles y de furfural en las muestras, para el primer análisis de fenoles totales se obtuvo valores de los valores en equivalentes de ácido gálico para lo cual se realizó una curva de calibración de 5 puntos como se puede apreciar en la Figura 7, posterior se realizó una dilución de la muestra de 1 a 100, al momento de realizar la medición y luego de haber hecho la corrección del factor de dilución se obtuvo los siguientes valores: 129.6059 ug AG/mL muestra de prueba, de 170.47 ug AG/mL para CB200 y 587 ug de furfural por mL para CB 220.

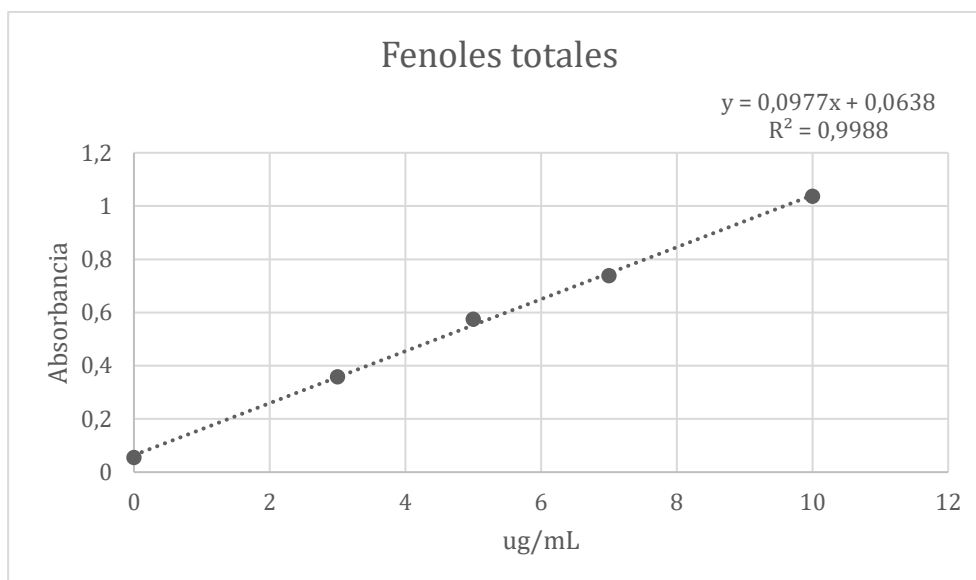
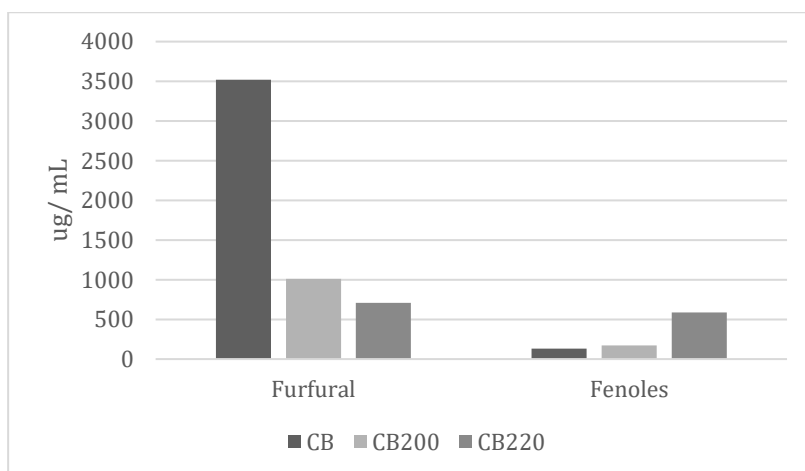


Figura 7 Curva de calibración para Fenoles Totales

En la cuantificación de Furfural se realizó mediante el uso del reactivo de Seliwanoff, donde se realizó la curva de calibración de 4 puntos (Figura 8), con un coeficiente de regresión de 0.996 que es un valor bastante aceptable para realizar las mediciones. Para la medición de los valores de prueba se realizó una dilución de 1 en 10. En la primera muestra de prueba se obtuvieron valores de 3518 ug furfural/mL, para las muestras con variación de HTC se obtuvo para la muestra de CB200 un valor de 1012.75 ug de furfural /mL y para la muestra de CB220 un valor de 709 ug de furfural/mL, estos valores una vez se ajustó con el factor de dilución.

Tabla 3 Resumen de Furfural y Fenoles



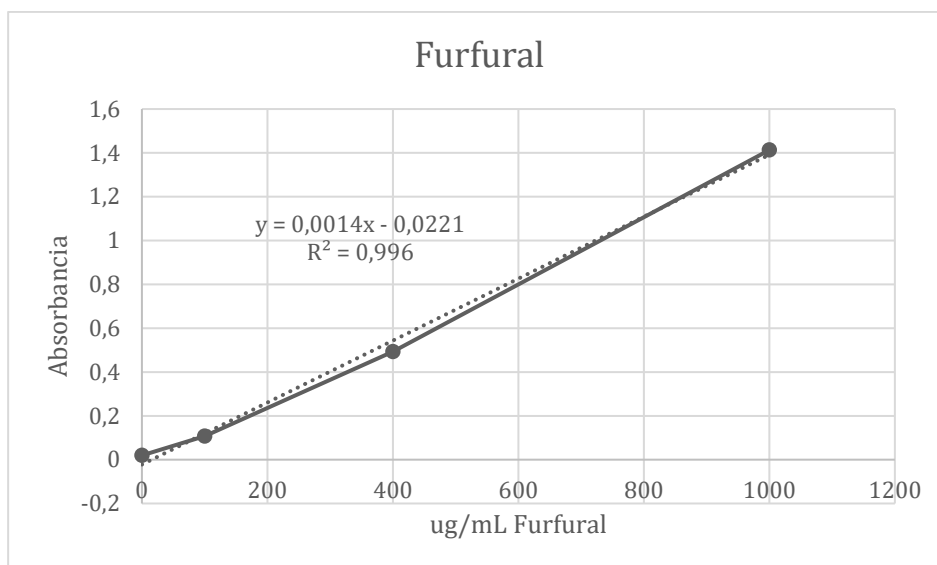


Figura 8 Curva de calibración para Furfural

La determinación de azúcares reductores mediante la prueba de Fehling, resultó negativa para las muestras de CB200 y CB220, debido a que al ser una prueba cualitativa no se produjo el cambio de tonalidad con los reactivos de Fehling, como se puede apreciar en la Figura 9, que no existe cambio de tonalidad. El cambio de tonalidad nos podría indicar la presencia de 5-Hidroximetil Furfural.



Figura 9 Prueba de Fehling

Se realizó como última prueba el dopado del hidrochar con una solución de 0.5M de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de solución junto con 10g de CB, para la impregnación de coloco

en el reactor de HTC a una temperatura de 250 °C, por un tiempo de 3 H. El Hidrocarbón impregnado con Fe en primeras pruebas tiene una capacidad magnética alta en comparación con otros materiales obtenidos por el mismo método, se hizo la prueba para un proceso de oxidación (Fenton) con azul de metileno, no dando resultados.

CONCLUSIONES

Se obtuvo la materia prima del proceso de fermentación, donde se evaluaron temperaturas y cantidades para obtener más cantidad de CB, además se realizó un proceso de HTC de CB, donde los productos obtenidos los cuales presentaron características que pueden ser estudiadas más a fondo, esto por la gran presencia de celulosa ($82.5 \pm 2.04\%$) en esta materia prima. Además, que la principal característica de esta celulosa es su fibrilla que es muy resistente en base a estudios realizados. El rendimiento de hidrocarbón está rondando valores de 6 a 7 g de un total de 10 gramos empleados para este proceso. La temperatura con su incremento tuvo un efecto de promotor de fenoles pero inhibidor de furfural. Así mismo, los licores presentan valores de furfural que puede ser empleado en nuevos procesos para obtención de nuevos elementos como también el uso de este como liquido en procesos de impregnación en HTC. El material impregnado con hierro dio características magnéticas mayores a otros materiales empleados con el mismo método, se debe buscar a futuro una aplicación y realizar más análisis para determinar la finalidad.

REFERENCIAS

- Amarasekara, A. S., Wang, D., & Grady, T. L. (2020). A comparison of kombucha SCOBY bacterial cellulose purification methods. *SN Applied Sciences*, 2(2), 240. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-1982-2>
- Arora-Jonsson, S. (2023). The sustainable development goals: A universalist promise for the future. *Futures*, 146, 103087. <https://doi.org/10.1016/j.futures.2022.103087>
- ASTM. (1960). *ASTM-D1103 / Method of Test for Alpha-Cellulose*.
- ASTM. (2001). *ASTM D1106 / Standard Test Method for Acid-Insoluble Lignin in Wood*.
- ASTM. (2015). *ASTM D7582 / Standard Test Methods for Proximate Analysis of Coal and Coke by Macro Thermogravimetric Analysis*.
- ASTM. (2021). *ASTM-D1104 / Method of Test for Holocellulose in Wood*.
- Bell, F., Chow, D., Choi, H., & Alistar, M. (2023). SCOBY BREASTPLATE: SLOWLY GROWING A MICROBIAL INTERFACE. *Proceedings of the Seventeenth International Conference on Tangible, Embedded, and Embodied Interaction*, 1–15. <https://doi.org/10.1145/3569009.3572805>
- Besir, A., Yazici, F., Mortas, M., & Gul, O. (2021). A novel spectrophotometric method based on Seliwanoff test to determine 5-(Hydroxymethyl) furfural (HMF) in honey: Development, in house validation and application. *LWT*, 139, 110602. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110602>

Cerrutti, P., Roldán, P., García, R. M., Galvagno, M. A., Vázquez, A., & Foresti, M. L. (2016). Production of bacterial nanocellulose from wine industry residues: Importance of fermentation time on pellicle characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(14). <https://doi.org/10.1002/app.43109>

Choi, S. M., Rao, K. M., Zo, S. M., Shin, E. J., & Han, S. S. (2022). Bacterial Cellulose and Its Applications. In *Polymers* (Vol. 14, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym14061080>

Choi, S. M., & Shin, E. J. (2020). The nanofication and functionalization of bacterial cellulose and its applications. In *Nanomaterials* (Vol. 10, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nano10030406>

Coma, M. E., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., & Salvay, A. G. (2019). Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *European Polymer Journal*, 120, 109234. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109234>

das Chagas, E. G. L., Zamarian, F. C., de Souza, H. F., Kamimura, E. S., Boffo, E. F., & Ambrozin, A. R. P. (2024). Extraction of polyphenols and antioxidant compounds from SCOBY, as a by-product of Kombucha, using different types of extraction. *Discover Food*, 4(1), 54. <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00106-7>

Fuller, M. E., Andaya, C., & McClay, K. (2018). Evaluation of ATR-FTIR for analysis of bacterial cellulose impurities. *Journal of Microbiological Methods*, 144, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.10.017>

Harrison, K., & Curtin, C. (2021). Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America. *Microorganisms*, 9(5), 1060. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051060>

Heidari, M., Dutta, A., Acharya, B., & Mahmud, S. (2019). A review of the current knowledge and challenges of hydrothermal carbonization for biomass conversion. In *Journal of the Energy Institute* (Vol. 92, Issue 6, pp. 1779–1799). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.joei.2018.12.003>

Ibarra-Cervantes, N. F., Vázquez-Núñez, E., Gómez-Solis, C., Fernández-Luqueño, F., Basurto-Islas, G., Álvarez-Martínez, J., & Castro-Beltrán, R. (2024). Green synthesis of ZnO nanoparticles from ball moss (*Tillandsia recurvata*) extracts: characterization and evaluation of their photocatalytic activity. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(9), 13046–13062. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-31929-7>

Ischia, G., Sudibyo, H., Miotello, A., Tester, J. W., Fiori, L., & Goldfarb, J. L. (2024). Identifying the Transition from Hydrothermal Carbonization to Liquefaction of Biomass in a Batch System. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 12(11), 4539–4550. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.3c07731>

Jha, P. (Ed.). (2024). *Practical Biochemistry*. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. <https://doi.org/10.2174/97898151658521240101>

Laavanya, D., Shirkole, S., & Balasubramanian, P. (2021). Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 295, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>

Larkin, P. (2011). *IR and Raman Spectroscopy Principles and Spectral Interpretation* (1st ed., Vol. 1). Elsevier.

Liu, Z., Zhao, L., Yao, Z., Jia, J., Wang, Z., & Liu, Z. (2023). Behaviors and interactions during hydrothermal carbonization of protein, cellulose and lignin. *Chemical Engineering Journal*, 476, 146373. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.146373>

Ofer, N., & Alistar, M. (2023). Felt Experiences with Kombucha Scoby: Exploring First-person Perspectives with Living Matter. *Proceedings of the 2023 CHI Conference on Human Factors in Computing Systems*, 1–18. <https://doi.org/10.1145/3544548.3581276>

Ponce, S., Alomoto, R., Cordero, E., Armijos, D., Loyo, C., Vizuite, K., Debut, A., Cortés-Rojas, E., Gaibor-Chávez, J., Ducos, P., Niebieskikwiat, D., & Murillo, H. A. (2025). Fe-impregnated hydrochar catalysts prepared using liquor from hydrothermal carbonization of biomass as the reaction medium. *Materials Chemistry and Physics*, 342, 130980. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2025.130980>

Ramírez Tapias, Y. A., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., & Salvay, A. G. (2020). Kombucha Tea By-product as Source of Novel Materials: Formulation and Characterization of Films. *Food and Bioprocess Technology*, 13(7), 1166–1180. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02471-4>

Salcedo-Puerto, O., Mendoza-Martinez, C., Saari, J., & Vakkilainen, E. (2024). Hydrothermal carbonization of industrial kraft lignin: Assessment of operational parameters. *Fuel*, 373, 132389. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2024.132389>

Ul-Islam, M., Khan, S., Ullah, M. W., & Park, J. K. (2019). Comparative study of plant and bacterial cellulose pellicles regenerated from dissolved states. *International*

Journal of Biological Macromolecules, 137, 247–252.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.232>