

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTÉCNOLOGÍA

TEMA:

Extracción y caracterización de celulosa a partir de los residuos forestales de la Estación Experimental 'Tunshi' utilizando *Bacillus subtilis*

Autor:

Dennis Renato Manzano vela

Director:

Diego Geovany Barzallo Granizo

Milagro, 2024

Derechos de autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Dennis Renato Manzano Vela** en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magisteren Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación **Innovación a través de bioproductos para su producción industria** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Informe de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior. El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 18 de febrero de 2024



Dennis Renato Manzano Vela

0603945155

Aprobación del tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **Diego Geovanny Barzallo Granizo** en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por **Dennis Renato Manzano Vela** cuyo tema es **Extracción y caracterización de celulosa a partir de los residuos forestales de la Estación Experimental 'Tunshi' utilizando *Bacillus subtilis***, que aporta a la Línea de Investigación **Innovación a través de bioproductos para su producción industria**, previo a la obtención del GradoMagister en biotecnología, Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo APRUEBO, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 18 de febrero de 2024



Diego Geovanny Barzallo Granizo

0603923095

Aprobación del tribunal calificador

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DIRECCIÓN DE POSGRADO CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING MANZANO VELA DENNIS RENATO**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CELULOSA A PARTIR DE LOS RESIDUOS FORESTALES DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL 'TUNSHI' UTILIZANDO BACILLUS SUBTILIS", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	59.00
SUSTENTACIÓN	40.00
PROMEDIO	99.00
EQUIVALENTE	Excelente



JOSE HUMBERTO VERA
RODRIGUEZ

Mgs VERA RODRIGUEZ JOSE HUMBERTO
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



VIVIANA LORENA
SANCHEZ VASQUEZ

Ing. SANCHEZ VASQUEZ VIVIANA LORENA
VOCAL



MARIA FERNANDA
GARCES MONCAYO

Msc GARCES MONCAYO MARIA FERNANDA
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

Resumen

El presente estudio abordó la problemática de acumulación de residuos forestales sin un uso efectivo en la Estación Experimental Tunshi y el aprovechamiento sostenible de los mismos para la extracción de celulosa usando *Bacillus Subtilis*. El objetivo fue cuantificar, caracterizar y aprovechar integralmente estos residuos para la obtención de celulosa bacteriana. La investigación experimental evaluó el efecto de la temperatura de incubación, humedad de biomasa y concentración de inóculo bacteriano sobre el rendimiento y pureza de la celulosa obtenida. Se trabajó con 8 experimentos según un diseño factorial 2^3 . Los resultados indicaron una disponibilidad entre 1500-2500 kg/mes de residuos forestales para su aprovechamiento. El análisis ANOVA detectó diferencias significativas entre experimentos ($p < 0.05$) atribuibles a los distintos niveles de factores aplicados. La combinación de 30°C, 60% de humedad y relación de inóculo 1:1 maximizó el rendimiento de extracción al 34,63%. Los análisis FTIR y microscopía óptica confirmaron la obtención de celulosa bacteriana, validando la efectividad del proceso biotecnológico propuesto para el aprovechamiento sostenible de los residuos forestales disponibles.

Palabras clave: residuos forestales, celulosa bacteriana, *Bacillus subtilis*, biotecnología.

Abstract

The present study addressed the problem of accumulation of forest residues without an effective use in the Tunshi Experimental Station and the sustainable use of these residues for cellulose extraction using *Bacillus Subtilis*. The objective was to quantify, characterize and take full advantage of these residues to obtain bacterial cellulose. The experimental research evaluated the effect of incubation temperature, biomass moisture and bacterial inoculum concentration on yield and purity of the cellulose obtained. Eight experiments were carried out according to a factorial design. ANOVA analysis detected significant differences between experiments ($p < 0.05$) attributable to the different levels of factors applied. The combination of 30°C, 60% humidity and 1:1 inoculum ratio maximized the extraction yield at 34.63%. FTIR analysis and optical microscopy confirmed that cellulose confirmed the obtaining of bacterial cellulose, validating the effectiveness of the biotechnological process for the sustainable use of the available forest residues.

Keywords: forest waste, bacterial cellulose, *Bacillus subtilis*, biotechnology.

Lista de Figuras

Figura 1. Puntos de recolección y muestreo en la estación experimental tunshi	27
Figura 2. Análisis FTIR biomasa empleada en la extracción.....	35
Figura 3. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 1	36
Figura 4. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 1.....	37
Figura 5. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 2.....	38
Figura 6. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 2.....	39
Figura 7. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 3.....	40
Figura 8. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 3.....	41
Figura 9. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 4.....	42
Figura 10. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 4.....	43
Figura 11. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 5.....	44
Figura 12. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 5.....	45
Figura 13. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 6.....	46
Figura 14. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 6.....	46
Figura 15. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 7	48
Figura 16. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 7.....	49
Figura 17. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 8.....	50
Figura 18. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 8.....	51
Figura 19. Análisis FTIR biomasa empleada y celulosa obtenida	52

Lista de Tablas

Tabla 1. Diseño factorial de experimentos	22
Tabla 2. Especies vegetales de poda en la estación experimental Tunshi.....	28
Tabla 3. Celulosa bacteriana obtenida por experimento	29
Tabla 4. Resultado prueba de normalidad de datos.....	31
Tabla 5. Resultados análisis ANOVA.....	32
Tabla 6. Prueba post-hoc de Tukey	32
Tabla 7. Comparación de métodos de extracción de celulosa bacteriana.....	55

Índice / Sumario

Derechos de Autor	ii
Aprobación del tutor del trabajo de titulación	iii
Aprobación del tribunal calificador.....	iv
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas	viii
Índice / Sumario	ix
Introducción.....	3
Capítulo I: El problema de la investigación	3
1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.2. Delimitación del problema	5
1.3. Formulación del problema	5
1.4. Preguntas de investigación	6
1.5. Determinación del tema	6
1.6. Objetivo general	6
1.6.1. Objetivos específicos	6
1.7. Hipótesis	7
1.8. Declaración de las variables.....	7
1.9. Justificación.....	8
1.10. Alcance y limitaciones.....	8
CAPÍTULO II: Marco teórico referencial	11
2.1. Antecedentes.....	11
2.2. Contenido teórico que fundamenta la investigación.....	12
2.2.1. Residuos forestales.....	12

CAPÍTULO III: Diseño metodológico	22
3.1. Tipo y diseño de investigación	22
3.2. La población y la muestra	23
3.2.1. Características de la población	23
3.2.2. Delimitación de la población.....	23
3.2.3. Tipo de muestra	23
3.2.4. Tamaño de la muestra	24
3.2.5. Proceso de selección de la muestra.....	24
3.3. Los métodos y las técnicas	24
3.4. Procesamiento estadístico de la información.....	25
CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados.....	27
4.1. Análisis de los resultados	27
4.1.1 Disponibilidad de residuos forestales producidos en la Estación Experimental Tunshi	27
4.1.2 Cantidad de celulosa extraída	29
4.1.3 Análisis sobre la cantidad de celulosa extraída.....	30
4.1.4 Análisis de la biomasa.....	34
4.1.5 Caracterización de la celulosa extraída.....	35
4.1.5.1 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 1	35
4.1.5.2 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 1.....	36
4.1.5.3 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 2	37
4.1.5.4 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 2.....	38
4.1.5.5 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 3	39
4.1.5.6 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 3.....	40
4.1.5.7 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 4	41
4.1.5.8 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 4.....	42
4.1.5.9 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 5	43

4.1.5.10 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 5	44
4.1.5.11 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 6	45
4.1.5.12 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 6	46
4.1.5.13 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 7	47
4.1.5.14 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 7	48
4.1.5.15 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 8	49
4.1.5.16 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 8	50
4.1.6 Análisis de la biomasa y celulosa bacteriana	51
4.2. Interpretación de los resultados	52
CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones	57
5.1. Conclusiones	57
5.2. Recomendaciones	59
Bibliografía	60
Anexos	67

Introducción

En el panorama actual de la biotecnología y la gestión ambiental, la extracción eficiente y sostenible de celulosa de fuentes renovables es una prioridad en ascenso. Esta investigación explora la utilización de residuos forestales de la Estación Experimental 'Tunshi' como fuente de celulosa, empleando *Bacillus subtilis* en el proceso. Esta estrategia promete una solución ecológica para la gestión de residuos y una innovación en la producción de celulosa, crucial en varias industrias (Del Pilar Casas-Martínez et al., 2022).

La celulosa es el biopolímero más abundante en la naturaleza y tiene un alto potencial de aprovechamiento en diversas industrias (alimentos, textil, papelera, etc.). Sin embargo, la degradación eficiente de la celulosa es un desafío biotecnológico, dado que las fuentes naturales de este polímero se encuentran fuertemente ligadas con otros componentes como lignina y hemicelulosa en la pared celular de materiales lignocelulósicos (Amaral et al., 2019).

En los últimos años, la búsqueda de métodos sostenibles para el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos ha cobrado gran interés por su potencial para generar productos de alto valor agregado. Los residuos forestales representan una importante fracción de estos residuos ricos en celulosa, pero con frecuencia son desechados o quemados en campo abierto por los altos costos que implica su recolección y transporte (Vargas-García et al., 2021).

A la vez la Estación Experimental Tunshi perteneciente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo gestiona diversas plantaciones forestales enfocadas a la investigación. Sin embargo, aún no se han cuantificado ni caracterizado los residuos forestales que se generan en sus operaciones. Teniendo en cuenta que más del 50% de la biomasa forestal puede corresponder a residuos durante la cosecha, estos residuos podrían constituir una materia prima prometedora para la extracción de celulosa.

Bajo este contexto actual de la biotecnología y la gestión ambiental, la extracción eficiente y sostenible de celulosa de fuentes renovables es una prioridad en ascenso. Esta investigación explora la utilización de residuos forestales de la Estación Experimental 'Tunshi' como fuente de celulosa, empleando *Bacillus subtilis* en el proceso. Esta estrategia promete una solución ecológica para la gestión de residuos y una innovación en la producción de celulosa, crucial en varias industrias (Lugo et al., 2022).

El estudio se articula en torno a tres objetivos específicos: primero, la cuantificación de los residuos forestales de la estación, que servirá de base para evaluar su potencial como fuente de celulosa. Segundo, la identificación de un método eficaz para extraer celulosa de estos residuos utilizando *Bacillus subtilis*, un microorganismo conocido por su eficiencia en la degradación de material vegetal. Finalmente, se busca caracterizar detalladamente la celulosa obtenida, evaluando sus propiedades y potencial de aplicación industrial.

La estructura de la tesis se presenta en capítulos que abarcan desde una revisión exhaustiva de la literatura relevante hasta los detalles metodológicos, resultados y discusiones. Este formato asegura un tratamiento integral de cada aspecto de la investigación, facilitando así una comprensión profunda y coherente del estudio. Siendo así se presenta a continuación los capítulos correspondientes al trabajo de estudio:

Capítulo I: El Problema de la Investigación - Define el problema y establece la justificación de la investigación.

Capítulo II: Marco Teórico Referencial - Ofrece una revisión de la literatura y teorías relevantes

Capítulo III: Diseño Metodológico - Detalla los métodos y técnicas empleados en la investigación.

Capítulo IV: Análisis e Interpretación de Resultados - Presenta y discute los hallazgos

del estudio.

Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones - Resumen de los resultados y sugerencias para futuras investigaciones.

Esta investigación no solo aborda un desafío ambiental significativo, sino que también contribuye al avance de la biotecnología aplicada en la producción sostenible de materiales. A través de este estudio, se espera abrir nuevas vías de investigación y aplicación de técnicas biotecnológicas para el aprovechamiento de recursos renovables.

Capítulo I: El problema de la investigación

1.1. Planteamiento del problema

En las últimas décadas, la generación de residuos lignocelulósicos provenientes de actividades agrícolas y forestales ha aumentado de forma considerable. Se estimó que en el año 2016 se generaron alrededor de 5.2 mil millones de toneladas métricas de estos residuos a nivel mundial (Corredor & Pérez, 2018). Si estos residuos no son gestionados adecuadamente, pueden provocar problemas ambientales asociados a emisiones de gases de efecto invernadero y contaminación del suelo y fuentes hídricas.

Al mismo tiempo la creciente demanda de fibras vegetales, pulpa de papel y otros productos derivados de fuentes renovables ha generado gran interés en el aprovechamiento integral de residuos lignocelulósicos (España Espinoza & España Espinoza, 2020). Estos residuos representan una materia prima atractiva por su amplia disponibilidad y bajo costo. Además, mediante el empleo de bioprocesos sostenibles, se pueden obtener subproductos de alto valor agregado como etanol combustible, enzimas, y celulosa con aplicaciones comerciales en diferentes sectores (Alcaraz et al., 2022).

En el Ecuador se han realizado investigaciones referentes a la extracción de celulosa a partir de residuos forestales o agroindustriales, en los cuales el papel preponderante lo tienen los procesos químicos inorgánicos, sin embargo, no se llevan a cabo extracciones de celulosa a gran escala debido a que los procesos químicos pueden resultar en efluentes con contenidos de sales o ácidos difíciles de tratar para el saneamiento del recurso hídrico (Maribel et al., 2021).

Dentro de la Estación Experimental Tunshi existe un desaprovechamiento de los residuos forestales, una cuestión ambiental y biotecnológica significativa. Si bien una parte de los residuos son utilizados como abono en los cultivos estos generan

cambios en la relación carbono nitrógeno del suelo y la aparición de vectores. De esta manera se observó que estos residuos, potencialmente ricos en celulosa, se acumulan sin un uso efectivo, representando un desafío para la gestión sostenible del ecosistema. La exploración del uso de *Bacillus subtilis* para la extracción de celulosa de estos residuos presenta una oportunidad para convertir un problema ambiental en un recurso valioso. Sin embargo, la falta de investigación específica en este ámbito deja un vacío en la comprensión y el desarrollo de procesos biotecnológicos eficientes y ecológicamente sostenibles para tal fin.

1.2. Delimitación del problema

La Estación Experimental Tunshi perteneciente a la Escuela Superior de Chimborazo, dentro de sus instalaciones realiza investigación ligada al sector agroforestal y los recursos naturales renovables. En sus operaciones se generan diversos residuos lignocelulósicos provenientes de podas, aclareos y aprovechamiento de diferentes especies forestales.

En tanto la investigación se restringe a la extracción de celulosa de los residuos forestales específicos de la Estación Experimental 'Tunshi'. La delimitación incluye la selección de *Bacillus subtilis* como agente biotecnológico clave, excluyendo otros microorganismos o enfoques químicos. Además, se delimita el estudio a condiciones específicas de laboratorio y procesos controlados, descartando la aplicación en escenarios industriales o a gran escala en esta fase inicial. Esta delimitación permite un enfoque concentrado y profundo en las variables, esencial para la validez y precisión de los resultados.

1.3. Formulación del problema

¿De qué manera se pueden cuantificar, caracterizar y aprovechar los residuos lignocelulósicos generados en la Estación Experimental Tunshi para la obtención de celulosa?

Esta pregunta guía la investigación hacia un entendimiento detallado de la interacción entre el microorganismo y los residuos forestales, así como la identificación de

factores críticos que influyen en la eficiencia del proceso de extracción

1.4. Preguntas de investigación

¿Qué cantidad de residuos lignocelulósicos se generan en la Estación Experimental Tunshi a partir de las actividades silviculturales realizadas en sus plantaciones?

¿El empleo de la bacteria *Bacillus subtilis* representa una alternativa sostenible y eficiente para extraer celulosa a partir de los residuos forestales?

¿La celulosa obtenida a partir de los residuos forestales de la Estación Experimental Tunshi presenta una elevada pureza de para su aprovechamiento en aplicaciones de la industria?

¿Cómo influye *Bacillus subtilis* en la descomposición y extracción de celulosa de estos residuos?

¿Qué condiciones ambientales y nutricionales favorecen la acción de *Bacillus subtilis* en este proceso?

1.5. Determinación del tema

El tema se elige por su relevancia en el campo de la biotecnología y la sostenibilidad ambiental. Se determina investigar la extracción de celulosa utilizando *Bacillus subtilis* en residuos forestales, dada la importancia de desarrollar tecnologías sostenibles para la gestión de residuos y la producción de materiales renovables. Este enfoque promete no solo abordar una problemática ambiental, sino también explorar nuevas fronteras en la biotecnología aplicada y la ingeniería de materiales, con potencial para influir significativamente en la industria y la conservación del medio ambiente.

1.6. Objetivo general

Extraer celulosa a partir de los residuos forestales de la Estación Experimental 'Tunshi' utilizando *Bacillus subtilis*

1.6.1. Objetivos específicos

Determinar la disponibilidad de residuos forestales producidos en la Estación

Experimental Tunshi

Establecer un medio para la extracción de celulosa a partir de los residuos forestales producidos en la estación experimental Tunshi utilizando *Bacillus subtilis*

Caracterizar la celulosa obtenida de residuos forestales de la Estación Experimental Tunshi mediante análisis físico-químico instrumental.

1.7. Hipótesis (de existir)

Hipótesis Nula (H0): no es posible extraer celulosa a partir de los residuos forestales de la Estación Experimental 'Tunshi utilizando *Bacillus subtilis*

Hipótesis Alternativa (H1): es posible extraer celulosa a partir de los residuos forestales de la Estación Experimental 'Tunshi utilizando *Bacillus subtilis*

1.8. Declaración de las variables (operacionalización)

Variables independientes:

- Porcentaje de humedad de la biomasa residual forestal (% bh): esta variable determinará la cantidad de agua presente en la biomasa al inicio del proceso de extracción.
- Temperatura de incubación (°C): temperatura a la que se realizará el cultivo de *Bacillus subtilis* para la producción de enzimas que degradarán la lignina y hemicelulosa
- Concentración de inóculo de *Bacillus subtilis* (UFC/mL): cantidad de unidades formadoras de colonias de *Bacillus subtilis* que se inocularán por mililitro al inicio del proceso para degradar lignina y hemicelulosa.

Variables dependientes:

- Rendimiento de celulosa (g celulosa/100 g materia seca inicial): cantidad de celulosa pura que se obtiene al final del proceso de extracción en base a la cantidad inicial de biomasa residual forestal.

- Pureza de celulosa (% celulosa en extracto sólido final): porcentaje de celulosa presente en el extracto sólido obtenido después de completar el proceso de extracción y purificación. Indica qué proporción del extracto sólido total está compuesto por celulosa.

1.9. Justificación

La obtención de celulosa a partir de fuentes alternativas y sostenibles es de gran importancia estratégica para Ecuador, dado que esta materia prima es esencial para el desarrollo de la industria nacional de pulpa, papel y cartón, en la cual el país aún depende casi en su totalidad de importaciones (Allaica., 2018).

Los resultados del presente trabajo de titulación representan un aporte para la gestión integral de residuos agroforestales en la región y promoverán la valorización sostenible de estos residuos, agregando valor económico a la biomasa residual, disminuyendo los impactos ambientales asociados a su acumulación o quema no controlada, y reduciendo la presión sobre bosques naturales como fuente de materia prima (Ibarra Islas, 2019).

De esta manera se busca generar un aporte significativo a la gestión de residuos forestales dentro de la Estación Experimental Tunshi, ofreciendo una solución sostenible y ecológicamente responsable. Al explorar la extracción de celulosa con *Bacillus subtilis*, el estudio apunta a reducir la dependencia de métodos tradicionales, menos sostenibles y más costosos. Esta investigación, además, podría abrir un nuevo campo de aplicaciones biotecnológicas, demostrando cómo los microorganismos pueden ser utilizados eficientemente en la industria para mejorar los procesos de producción, reduciendo el impacto ambiental y elevando la sostenibilidad.

1.10. Alcance y limitaciones

La presente investigación comprende la cuantificación y caracterización de los residuos forestales generados en la Estación Experimental Tunshi, la selección de condiciones óptimas para la extracción de celulosa utilizando *Bacillus subtilis*, y la caracterización fisicoquímica de la celulosa obtenida en términos de rendimiento y pureza. Se espera determinar el potencial de dichos residuos como materia prima sostenible para la obtención de celulosa y otros productos de valor agregado.

Siendo así el alcance del estudio se concentra en la eficacia de *Bacillus subtilis* para la extracción de celulosa en condiciones de laboratorio, lo que proporciona un control preciso sobre las variables experimentales. Sin embargo, este enfoque conlleva limitaciones, como la incertidumbre en la extrapolación de los resultados a escenarios de producción a gran escala. La variabilidad en la composición de los residuos forestales podría afectar la generalización de los resultados. Además, al centrarse exclusivamente en *Bacillus subtilis*, el estudio no explora el potencial de otros microorganismos o enfoques alternativos, limitando el alcance de sus conclusiones a un solo agente biológico. Estas limitaciones son cruciales para entender el contexto y la aplicabilidad de los hallazgos, y destacan la necesidad de investigaciones adicionales para explorar y validar los resultados en diferentes condiciones y con diferentes organismos

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial

2.1. Antecedentes

En el marco de los antecedentes referentes al tema del presente estudio, se abordaron estudios sobre la cuantificación y aprovechamiento de residuos forestales para la extracción de celulosa, destacando contribuciones notables en Ecuador y a nivel internacional. Dichas investigaciones proporcionan una base sólida para comprender las metodologías, resultados y potencial de los residuos forestales en la producción de celulosa y otros compuestos valiosos.

Según González et al. (2023) en su trabajo realizado en la Amazonía ecuatoriana resalta la riqueza de los residuos de especies como *Piptocoma discolor* y *Morella pubescens*, demostrando su considerable potencial energético. La meticulosa caracterización física, química y térmica de estos residuos subraya su utilidad en contextos de energía renovable (González et al., 2023).

Por otro lado, un estudio realizado en Cuenca, Ecuador, ofrece un enfoque innovador para valorar los residuos forestales urbanos como fuente de energía, revelando su capacidad para contribuir significativamente a la matriz energética urbana (Yáñez-Iñiguez et al., 2020).

Los estudios sobre la extracción de celulosa exploran el uso de residuos lignocelulósicos como bagazo de caña y cascarilla de arroz. Estos trabajos no solo demuestran cómo se pueden obtener fibras de celulosa de alta calidad, sino también cómo estos residuos pueden ser transformados en productos útiles y sostenibles, como los geopolímeros y materiales de construcción (Vidales-Carrillo, 2019; Zambrano et al., 2021)

En conjunto, estos antecedentes resaltan la relevancia y versatilidad de los residuos forestales, abriendo caminos para su aprovechamiento sostenible en la biotecnología

y la producción de energía renovable (Dávila Jiménez et al., 2022). Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de la innovación y el desarrollo sostenible en el tratamiento de residuos forestales, ofreciendo perspectivas valiosas para futuras investigaciones en el campo de la extracción de celulosa y sus aplicaciones (Anchundía Cedeño & Santana Toapante, 2023).

2.2. Contenido teórico que fundamenta la investigación

2.2.1. Residuos forestales

- Concepto y clasificación

Los residuos forestales son recursos sobrantes que se generan durante el manejo y aprovechamiento de árboles maderables. Incluyen desechos de aserrado, tabloncillos rotos, cajones viejos, cortezas, virutas, recortes de carpintería y algunos rechazos de procesamiento de madera como maderas teñidas agotadas, cortezas curtientes, rechazos sin blanquear, residuos de tratamientos de efluentes, finos de astillas, fibras quebradas de celulosa blanqueada, lodos y residuos de lignina (Ayala-Mendivil et al., 2018).

Estos residuos pueden ser una alternativa viable para convertir energía en combustibles, electricidad o calor. Comparados con otras fuentes de bioenergía de segunda generación, no compiten con alimentos, son relativamente baratos, abundantes en áreas ricas en bosques y, lo que es más importante, su balance energético es cercano a cero (Villela-Suárez et al., 2018).

Los residuos se pueden clasificar en: residuos forestales, residuos de procesamiento y corte, y residuos peligrosos. Cada uno de estos materiales tiene una composición química particular y propiedades físicas variables.

Bajo un modelo de economía circular no existen desechos no reutilizables, es decir, cualquier material remanente de un proceso puede ser materia prima para alimentar otro sistema. Este concepto es crucial en el contexto de los residuos forestales, dado que poseen el potencial para ser al menos reciclados hacia abajo, pero posiblemente

también reciclados o mejorados para aplicaciones de mayor valor agregado (Martínez, 2022)

- Composición química y valorización de residuos forestales

La composición química de los residuos forestales puede variar dependiendo del tipo de árbol y tejido vegetal (madera, corteza, acículas de coníferas) así como de la materia mineral presente. Un estudio determinó que la composición elemental de carbono, nitrógeno, azufre, oxígeno y contenido de cenizas en residuos forestales difiere de la de otros tipos de biomasa. El análisis estadístico mostró que los residuos forestales y astillas de madera energética forman dos grupos homogéneos separados. El poder calorífico de los residuos forestales fue de $15,78 \pm 0,39$ MJ/kg (Ayala-Mendivil et al., 2018).

La recuperación de residuos forestales involucra la recolección de árboles pequeños, ramas, copas y madera no aprovechable que queda en el bosque luego de limpiezas, aclareos o tala definitiva. Se distinguen tres fuentes principales: desechos de tala definitiva, desechos y árboles pequeños de aclareos y limpiezas, y madera no comercializable (González et al., 2023).

Existen diferentes métodos para la recuperación como astillado en terreno, astillado en patios de acopio (generalmente a lado de caminos), astillado en terminales y astillado en planta. En Suecia, la cadena de suministro predominante en los últimos 20 años es el astillado a lado de caminos, pasando de aprox. 40% a inicios de los 90' a 75-80% hoy en día (Corredor & Pérez, 2018).

Estos residuos pueden usarse como combustible sin tratamientos intermedios. La mayoría de astillas forestales comercializadas en Suecia se consumieron en plantas de calefacción urbana. La recuperación de residuos forestales es importante para la gestión forestal sostenible y contribuye al modelo de economía circular (Encinas et al., 2018).

- Métodos de cuantificación de residuos en operaciones forestales

Existen varios métodos para cuantificar los residuos generados en operaciones forestales:

Muestreo Destructivo: Este método consiste en seleccionar aleatoriamente una muestra representativa de áreas de operación forestal, para luego cosechar manualmente los residuos y biomasa contenidos en parcelas de medición estandarizadas. Mediante pesaje se obtiene un factor de generación de residuos por unidad de superficie, el cual se extrapola al total del área operada (Arias, 2019).

Ecuaciones Alométricas: Relacionan dimensiones de árboles como diámetro y altura con su biomasa mediante modelos matemáticos. Se aplican a inventarios forestales para estimar residuos en grandes extensiones (Serrano Cardona, 2020).

Análisis de Flujo de Materiales (AFM): Contabiliza entradas, salidas y acumulación de materiales en cada etapa del sistema productivo forestal. Permite identificar ineficiencias en uso de recursos y generación de residuos (Martínez Rivera, 2018).

Método estadístico: Utiliza bases de datos históricas de generación de residuos y tasas de aprovechamiento de biomasa por hectárea según tipo de bosque y operación forestal (González Cedeño, 2019).

Otros métodos: Incluye valorización in situ, análisis de ciclo de vida, modelado con variables y sistemas de clasificación. Sus ventajas y limitaciones son específicas a los objetivos y recursos de cada estudio. Se recomienda combinar varios métodos para obtener mejores estimaciones (Díaz García, 2020).

2.2.2 Celulosa bacteriana

- Estructura y propiedades de la celulosa

La celulosa bacteriana (CB) es un biomaterial natural sintetizado por bacterias. Posee una estructura única compuesta por una red reticulada tridimensional de nanofibras de celulosa (Azeredo et al., 2019). Aunque las estructuras químicas de distintos tipos de CB son similares, se observa que la CB obtenida mediante fermentación en goteo presenta una mayor asociación de grupos -OH, así como superior grado de polimerización, pureza, capacidad de retención de agua, porosidad y estabilidad térmica en comparación con la obtenida mediante fermentación estática y en agitación (Vázquez et al., 2021).

La CB destaca por su alta resistencia mecánica, elevada cristalinidad y gran capacidad de retención de agua. Estas características la hacen útil en diversas industrias, incluyendo alimentación, fabricación de papel, farmacéutica y aplicaciones en ingeniería de tejidos (Valera González et al., 2021). Además, la CB puede utilizarse para crear aerogeles de nanofibras de carbono ultraligeros, flexibles y resistentes al fuego (Horue, 2020). La cristalinidad y el tamaño de grano cristalino de la CB varían según el método de fermentación, siendo menores en la fermentación en goteo que en la estática, pero mayores que en la fermentación en agitación y en la fibra vegetal (Pacheco et al., 2004).

- Celulosa bacteriana: Biosíntesis y mecanismos de degradación

La celulosa bacteriana (CB) es un biopolímero sintetizado por ciertas bacterias, incluyendo *Gluconacetobacter xylinus*. La biosíntesis de CB involucra dos mecanismos principales: la síntesis de uridina difosfoglucosa (UDPGlucosa), seguida por la polimerización de la glucosa en cadenas largas y sin ramificaciones (cadena β -1 \rightarrow 4 glucano) mediante la celulasa sintasa (Tuya Salas et al., 2021).

Este proceso está finamente regulado e incluye dos vías operantes anfibólicas: el ciclo de las pentosas fosfato también llamado vía de las hexosas monofosfato (HMP) para la oxidación de carbohidratos, y el ciclo de Krebs también llamado ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para la oxidación de ácidos orgánicos y compuestos relacionados. En cuanto a los mecanismos de degradación, no se mencionan explícitamente en los resultados de búsqueda. Sin embargo, la degradación de la celulosa normalmente involucra procesos enzimáticos llevados a cabo por celulasas, que son enzimas capaces de descomponer la celulosa en azúcares más simples. Estas enzimas son producidas por ciertas bacterias, hongos y otros microorganismos (Martínez Vergara & Mercadal Guillén, 2020).

- *Bacillus subtilis*: taxonomía, hábitats y aplicaciones biotecnológicas

Bacillus subtilis es una bacteria en forma de bastón Gram-positiva, formadora de esporas y anaerobia facultativa. Es la especie tipo del género *Bacillus* y se encuentra comúnmente en diversos ambientes que van desde el suelo hasta el tracto gastrointestinal del ganado y humanos. También se le conoce como *Bacillus* del heno

o hierba dado que está muy extendida en distintos tipos de pastos y fuentes de heno (Robles Montoya et al., 2020).

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae* según análisis filogenéticos de secuencias del gen ARNr 16S. El género *Bacillus* consiste en más de 100 especies diferentes que están agrupadas en conjuntos más manejables y mejor definidos. *B. subtilis* se clasifica further en dos subespecies: *Bacillus subtilis subsp. subtilis* y *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii* (Galindo et al., 2020), tiene una distribución ubicua facilitada por la resistencia de la bacteria al frío, calor y desinfectantes comunes. Es la especie de *Bacillus* más comúnmente aislada de muestras ambientales (González-León et al., 2022).

Se considera una bacteria industrial esencial dado que se utiliza ampliamente en biotecnología debido a la mejorada expresión y secreción de enzimas. Se ha utilizado extensamente para la producción de proteínas heterólogas. Secretan numerosas enzimas para degradar diversos sustratos, permitiendo la supervivencia bacteriana en ambientes cambiantes (Santos & Samudio, 2020). Esta especie y parientes cercanos tienen excelente capacidad de secreción de proteínas, por lo que son importantes para producir proteínas medicinales y enzimas industriales. Algunos productos notables e innovaciones recientes en la ingeniería de *B. subtilis* incluyen enzimas, antibióticos, nucleótidos de purina, vitaminas, ácido poliglutámico y D-Ribosa (Carrasco et al., 2023).

- Condiciones de cultivo de *B. subtilis* para producción de celulasas

Correspondiente al medio la bacteria se cultiva típicamente en un medio líquido que contiene 2% de carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na) (Bautista-Ortega et al., 2022).

- La temperatura óptima para la producción de celulasa es de 37°C.
- El pH óptimo para la producción de celulasa es de aproximadamente 5,4.
- La bacteria se incuba típicamente durante 72 horas.
- Se recomienda una velocidad de agitación de 180 rpm(Carrasco et al., 2023).

Estas condiciones son óptimas para la producción de celulasa, pero pueden variar según la cepa específica de *B. subtilis* y la aplicación deseada de la enzima. También

es importante destacar que la enzima producida bajo estas condiciones resultó ser termofílica, con estabilidad deseable de temperatura y pH para uso industrial. Se confirmó mediante análisis zimográfico que la enzima es capaz de hidrolizar celulosa. La actividad enzimática se aceleró con $ZnSO_4$, $MnSO_4$ y $MgSO_4$; y se inhibió significativamente con EDTA y moderadamente con β -mercaptoetanol y urea. Lo anterior convierte a *B. subtilis* en un candidato prometedor para aplicaciones industriales, particularmente en la conversión de biomasa en combustibles y otros productos (Heredia et al., 2023).

2.2.3 Extracción y caracterización de celulosa

- Métodos de extracción de celulosa y purificación

Los métodos de extracción y purificación de celulosa pueden variar dependiendo de la fuente de celulosa y la pureza deseada. La preparación de materia prima considerando que la fuente puede ser madera, pasto, residuos de biomasa o incluso algas, se prepara para la extracción. Esto suele implicar limpieza y posible procesamiento mecánico para aumentar el área superficial (Wu & He, 2019).

La celulosa se extrae del material de origen y suele involucrar cocción de la materia lignocelulósica en una mezcla química, como hidróxido de sodio (NaOH) y sulfuro de sodio (Na_2S), más agua (Manzano Vela et al., 2023). Otros métodos incluyen el uso de líquidos iónicos, hidrólisis enzimática o tratamiento ultrasónico. La celulosa extraída se purifica luego para eliminar materiales no celulósicos remanentes. Puede requerir tratamientos químicos adicionales, lavados y secado (Manzano Vela & Novillo Logroño, 2022).

Finalmente se caracteriza para determinar la pureza y propiedades físicas y químicas del polímero obtenido mediante técnicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectroscopía infrarroja. Es importante destacar que los métodos específicos pueden variar ampliamente según la fuente y propiedades deseadas de la celulosa. Por ejemplo, se podrían utilizar métodos distintos para extraer celulosa de madera comparado con algas. Adicionalmente, los métodos de extracción y purificación pueden tener un impacto significativo en las propiedades finales como cristalinidad y grado de polimerización (Maribel et al., 2021).

- Análisis estructural y pureza de celulosa

El análisis estructural y pureza de la celulosa se puede determinar mediante varios métodos dentro de los cuales los más usuales son:

Cristalinidad: La estructura cristalina de la celulosa se mantiene por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. El grado de cristalinidad, uno de los parámetros microestructurales más importantes que afectan las propiedades mecánicas de fibras vegetales, se puede determinar con técnicas como difracción de rayos X (DRX) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Emenike et al., 2023).

Estructuras Moleculares y Supramoleculares: La celulosa está formada por una unidad de D-glucosa en un extremo y un grupo C4-OH en el extremo no reductor, mientras que el grupo terminal es C1-OH con una estructura aldehído. Algunas celulosas técnicas contienen grupos carbonilo y carboxilo adicionales (Basuki, 2019).

Pureza: La pureza de la celulosa se determina removiendo componentes no celulósicos como lignina, hemicelulosa y pectina. La celulosa restante se puede analizar con técnicas como espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) para identificar los grupos funcionales presentes (Fuller et al., 2018).

Análisis de Contenido: El contenido de celulosa se puede determinar con diversas técnicas analíticas. Por ejemplo, el método de Kürschner-Hoffer se puede usar para determinar el contenido de celulosa en muestras de madera y pulpa (Singh et al., 2019).

Morfología: La forma y tamaño de las fibras de celulosa determinan propiedades físicas y químicas, como la resistencia mecánica, la reactividad química, la porosidad y la densidad. Estas propiedades impactan el comportamiento y las aplicaciones de la celulosa en diferentes áreas como la producción de papel, textiles, materiales de construcción, biocombustibles y productos farmacéuticos. La microscopía electrónica permite estudiar la

morfología de la celulosa a diferentes escalas, brindando información crucial para el desarrollo de nuevos materiales y aplicaciones (Emenike et al., 2023).

Estos métodos proveen un análisis integral de la estructura y pureza de la celulosa, crucial para sus diversas aplicaciones en industrias como textil, papel y biocombustibles.

- Rendimiento del proceso

El rendimiento de extracción de celulosa se refiere a la cantidad obtenida a partir de una cantidad dada de materia prima. El rendimiento es un parámetro crítico para evaluar la eficiencia y viabilidad a escala industrial. La Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) ha estandarizado un método para su cálculo (TAPPI, 2002).

Este método TAPPI T-203 cm-99 involucra cortar la muestra seca de materia prima en partículas pequeñas y tratarla con una solución de etanol-benceno para remover extractos como resinas y ácidos grasos. Luego se realizan sucesivos tratamientos alcalinos con hidróxido de sodio, ácido acético y clorito de sodio en ebullición, intercalando lavados con agua entre cada paso. Esto permite solubilizar y eliminar lignina, hemicelulosas y otros componentes no celulósicos (TAPPI, 2012).

El residuo restante después de los tratamientos se considera celulosa cruda. Se determina su peso seco constante y se calcula el rendimiento de extracción como la relación porcentual entre masa de celulosa cruda obtenida respecto a la masa inicial de materia prima. Este valor indica la eficiencia del proceso en recuperar la fracción celulósica disponible en el material de partida. El método TAPPI permite determinar y comparar rendimientos de extracción a partir de diferentes fuentes de biomasa residual y empleando distintas variantes en las condiciones de proceso. Su estandarización posibilita evaluar y optimizar la viabilidad de implementar la extracción de celulosa a escala industrial de forma eficiente. Puede variar según la fuente y método de extracción. En este punto la pureza de la celulosa extraída es crítica y se determina removiendo componentes no celulósicos y analizando la celulosa restante con técnicas como espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) (Fei et al., 2017).

Es relevante la integridad estructural de la celulosa, especialmente para aplicaciones que requieren materiales de alta resistencia. técnicas como (DRX) y (RMN) permiten analizar cristalinidad y estructura molecular. A la vez es necesario analizar el impacto ambiental del proceso de extracción. Se han desarrollado métodos ecoamigables que posibilitan la obtención de fibras de celulosa de forma más sostenible así como los factores como costos de materias primas, reactivos y energía en el proceso (Ko et al., 2020).

2.2.4 Aplicaciones de la celulosa bacteriana

- Usos actuales y potenciales

La celulosa bacteriana tiene diversas aplicaciones debido a sus propiedades únicas como alta absorción de agua, alta cristalinidad y resistencia a la tracción. Se utiliza en varias industrias incluyendo biomedicina, textil, papel, alimentos, liberación de fármacos y cosmética entre los siguientes:

Industria Alimentaria: La celulosa bacteriana se ha utilizado desde hace décadas en Filipinas para la elaboración artesanal de la nata de piña, un postre gelatinoso dulce hecho a partir de jugo de piña fermentado con cultivos bacterianos productores de celulosa. Recientemente, la celulosa bacteriana ha despertado interés por sus potenciales usos como aditivo alimentario y agente estabilizante, espesante o gelificante de alimentos, así como sustrato para el crecimiento controlado de cultivos probióticos en productos funcionales (Yomara & Sánchez, 2021).

Aplicaciones Biomédicas: La biocompatibilidad, capacidad de bioadhesión, permeabilidad al oxígeno y resistencia mecánica de la celulosa bacteriana la convierten en un material muy prometedor para curación avanzada de heridas, liberación controlada transdérmica de fármacos, ingeniería de tejidos para regenerar piel, cartílagos u órganos, y para desarrollar vasos sanguíneos y parches cardiacos artificiales (Miranda Altamirano, 2020).

Aplicaciones Industriales: Además de usos biomédicos, la celulosa bacteriana tiene excelentes prestaciones como refuerzo de nanocompuestos en aplicaciones tan diversas como papel resistente a la grasa, textiles ignífugos o antibacterianos,

baterías de litio más seguras, sistemas de purificación de agua, empaques protectores ultrafinos y dispositivos electrónicos flexibles (Andrea et al., 2022).

Aplicaciones Ambientales: Los hidrogeles y películas de celulosa bacteriana tienen utilidad para la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con metales pesados. También poseen un gran potencial como sustratos de inmovilización de microorganismos descontaminantes y para recubrir semillas en agricultura sostenible (Dávila Jiménez et al., 2022).

Cosmética: Las propiedades excepcionales de pureza, suavidad, capacidad emulsionante y bioadhesividad de la celulosa bacteriana la posicionan como un ingrediente multifuncional de alto valor para el desarrollo de productos cosméticos naturales avanzados, como mascarillas hidratantes y anti edad, así como champús protectores del color y cremas de alta tolerancia para pieles sensibles o lesionadas (Bautista-Ortega et al., 2022).

Estas aplicaciones aprovechan las propiedades únicas de la CB como su alto grado de polimerización y cristalinidad, singular red de fibras en la micro o nano-escala, y elevada relación superficie/volumen

CAPÍTULO III: Diseño metodológico

3.1. Tipo y diseño de investigación

La presente investigación corresponde a un estudio experimental de tipo cuantitativo, orientado a la optimización de un proceso biotecnológico.

Específicamente, se evaluó el efecto de tres variables independientes: porcentaje de humedad de la biomasa forestal residual, temperatura de incubación y concentración inicial de inóculo bacteriano de *Bacillus subtilis*; sobre dos variables respuesta: rendimiento de extracción de celulosa y pureza de la celulosa obtenida a partir de residuos forestales.

Se aplicó un diseño factorial completo 2^3 con tres factores y dos niveles por factor, requiriendo un total de 8 corridas experimentales tal como se aprecia en la tabla 1. Las variables independientes y sus niveles son:

- Humedad de biomasa forestal residual: 60% y 80% bh
- Temperatura de incubación: 25°C y 30°C
- Cantidad de inóculo bacteriano: relación 1:10 y 1:1

Tabla 1. Diseño factorial de experimentos

Experimento	Humedad de Biomasa (%)	Temperatura (°C)	Inóculo (relación)
1	60	25	1:10
2	60	25	1:5
3	60	30	1:10
4	60	30	1:5
5	80	25	1:10
6	80	25	1:5
7	80	30	1:10
8	80	30	1:5

3.2. La población y la muestra

La población objetivo corresponde a la totalidad de residuos forestales generados por las actividades silvícolas de poda en la Estación Experimental Tunshi de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Considerando que no se disponía de un registro histórico sistematizado de la cantidad de residuos producidos, se realizó una caracterización preliminar mediante muestreo aleatorio simple en las principales zonas de poda durante un periodo de 4 meses. Se aplicó la metodología de cuantificación de residuos forestales por el Método del Factor de Generación de Residuos, teniendo en cuenta que estos factores de generación de residuos deben ser determinados empíricamente y pueden variar significativamente dependiendo de las condiciones específicas in situ (Villela-Suárez et al., 2018).

3.2.1. Características de la población

La población está conformada por residuos forestales generados en la Estación Experimental Tunshi de la ESPOCH, producto de actividades rutinarias de poda de árboles y arbustos en las zonas verdes del campus. Dichos residuos consisten principalmente en ramas, hojas, cortezas y secciones de tallos pertenecientes a diversas especies nativas y exóticas de la serranía ecuatoriana.

3.2.2. Delimitación de la población

La población se circunscribe únicamente a los residuos vegetales generados dentro del campus de la Estación Experimental Tunshi, recolectados en 4 meses de caracterización. Se excluyeron residuos de otras fuentes, lugares o periodos de tiempo.

3.2.3. Tipo de muestra

Se utilizó un muestreo probabilístico aleatorio simple para la selección de muestras de residuos forestales que fueron empleadas como materia prima en los experimentos de extracción de celulosa. Esto asegura la representatividad de la muestra respecto a la población definida.

3.2.4. Tamaño de la muestra

En base a la disponibilidad mensual de residuos forestales caracterizada previamente, se trabajó con muestras de tamaño fijo de 500 g de biomasa seca y triturada. Esto permite realizar los experimentos por duplicado considerando la capacidad instalada de equipos a nivel de laboratorio (Supo, 2014).

3.2.5. Proceso de selección de la muestra

La selección de las muestras de 500 g de residuos forestales se llevó a cabo siguiendo un procedimiento detallado:

- Se recolectaron residuos forestales de distintas zonas del campus Tunshi, formando una pila de aproximadamente 50 kg.
- Para garantizar la homogeneidad, se homogenizó la pila de residuos siguiendo la norma UNE-EN 14780:2017, aplicando el método de cuarteo sucesivo.
- Tras homogeneizar la pila, se procedió al cuarteo final para obtener una submuestra representativa.
- La submuestra se trituró en un molino de cuchillas hasta obtener partículas menores a 20 mm, resultando en biomasa seca y triturada.
- Se extrajeron muestras de 500 g de esta biomasa, almacenándolas en bolsas herméticamente selladas para mantener constante la humedad (UNE-EN ISO 14780:2018, 2018).

Este método aseguró la representatividad y homogeneidad de las muestras respecto a la población total de residuos forestales.

3.3. Los métodos y las técnicas

- Pretratamiento de la biomasa forestal residual

La biomasa forestal residual recolectada se sometió a un pretratamiento estandarizado consistente en: secado hasta lograr un peso constante en estufa a 60°C, molienda en un molino de cuchillas para reducción granulométrica, seguido de un tamizaje en una criba, lavado alcalino con NaOH al 4% p/v y un último secado hasta peso constante previo a la extracción de celulosa. Este pretratamiento buscó mejorar la digestibilidad de la lignocelulosa en el posterior tratamiento biológico.

- Extracción bacteriana de celulosa

Las muestras pretratadas de biomasa forestal se acondicionaron a la humedad de ensayo mediante adición de agua destilada y estéril en relación másica. Se inocularon con *Bacillus subtilis* en las concentraciones establecidas en el diseño experimental. Las suspensiones inoculadas se incubaron a cada temperatura de estudio durante 72 horas, tiempo establecido como óptimo en estudios previos con esta bacteria.

Posteriormente se filtraron al vacío para separar los sólidos remanentes. Se concentró la solución filtrada de celulosa mediante evaporación a 40°C en un evaporador rotativo. Se realizaron lavados con agua destilada estéril para eliminar impurezas solubles y finalmente se secó en estufa a 50°C por 24 horas para obtener la película de celulosa extraída.

- Caracterización de la celulosa bacteriana

La pureza y características estructurales de la celulosa bacteriana obtenida se evaluó mediante microscopía óptica y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), comparando los espectros con celulosa bacteriana a nivel bibliográfico.

3.4. Procesamiento estadístico de la información.

El análisis estadístico de los resultados experimentales de rendimiento y pureza de celulosa se realizó mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) factorial con un nivel de confianza del 95%. Esta técnica permitió determinar si existieron diferencias significativas en las variables respuesta evaluadas, atribuibles a los distintos niveles de los factores estudiados.

Previo al ANOVA, se comprobó el cumplimiento de supuestos paramétricos en los casos en que se detectaron diferencias significativas entre niveles de un factor, se aplicó la prueba post-hoc de Tukey para determinación de medias con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Adicionalmente, se efectuó un análisis estadístico descriptivo, determinando medidas de tendencia central (media aritmética, mediana) y de dispersión (desviación estándar, coeficiente de variación porcentual) para las variables respuesta.

CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados

4.1. Análisis de los resultados

4.1.1 Disponibilidad de residuos forestales producidos en la Estación Experimental Tunshi

La cuantificación preliminar de residuos forestales disponibles se realizó mediante el muestreo aleatorio de 5 parcelas circulares de 50 m², ubicadas en las zonas de mayor generación de desechos de poda dentro de la Estación Experimental Tunshi y con la mayor densidad vegetal.

En la figura 1 se aprecia cada zona donde se delimitaron al azar 5 parcelas circulares de 50 m², donde se colectaron, clasificaron y pesaron todos los residuos encontrados, determinando valores promedio de biomasa residual forestal generada por unidad de superficie. Extrapolando en función del área total podada se estimaron entre 1500 - 2500 kg/mes de residuos disponibles como materia prima para la presente investigación.

Figura 1. Puntos de recolección y muestreo en la estación experimental tunshi



Las principales especies de las cuales se generan residuos forestales de poda se aprecian en la tabla 2, de dichas especies fueron constantes durante los 4 meses de muestreo dentro de la investigación.

Tabla 2. Especies vegetales de poda en la estación experimental Tunshi

Familia	Nombre Científico	Nombre Común
<i>Asteraceae</i>	<i>Taraxacum officinale</i>	Diente de león
<i>Asteraceae</i>	<i>Baccharis latifolia</i>	Chilca
	<i>Bidens andicola</i>	Ñachag
<i>Brassicaceae</i>	<i>Raphanus spp.</i>	Falso nabo
<i>Cactaceae</i>	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Tuna
<i>Caprifoliaceae</i>	<i>Sambucus nigra</i>	Sauco
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucurbita ficifolia</i>	Zambo
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Ricinus communis</i>	Higuerilla
<i>Fabaceae</i>	<i>Pisum sativum</i>	Arveja
<i>Fabaceae</i>	<i>Trifolium repens</i>	Trébol blanco
<i>Fabaceae</i>	<i>Medicago lupulina</i>	Lupulina
<i>Fabaceae</i>	<i>Melilotus indicus</i>	Meliloto
<i>Fabaceae</i>	<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa
<i>Fabaceae</i>	<i>Lupinus pubescens</i>	Falso chocho
<i>Myrtaceae</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto
<i>Papaveraceae</i>	<i>Argemone mexicana</i>	
<i>Poaceae</i>	<i>Zea mays</i>	Maíz
<i>Polygonaceae</i>	<i>Rumex obtusifolius</i>	Lengua de vaca
<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	Llánten
<i>Rosaceae</i>	<i>Prunus serótina</i>	Capulí
<i>Rosaceae</i>	<i>Rubus spp.</i>	Mora silvestre
<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Buddleja incana</i>	Quishuar
<i>Solanaceae</i>	<i>Physalis peruviana</i>	Uvilla
<i>Solanaceae</i>	<i>Solanum nigrum</i>	Hierba mora
<i>Verbenaceae</i>	<i>Lantana megapotamica</i>	Lantana morada

Dichos residuos lignocelulósicos pueden aprovecharse como materia prima en los experimentos planteados de extracción de celulosa mediante tratamiento con *Bacillus subtilis*. Para ello se trabajó con muestras de 500 g que fueron recolectadas aleatoriamente de los patios de acopio, según capacidad analítica instalada en el laboratorio.

4.1.2 Cantidad de celulosa extraída

Se realizaron 8 experimentos de extracción de celulosa a partir de 10 g de biomasa forestal residual en cada ensayo, mediante el tratamiento con el inóculo de *Bacillus subtilis* (ver anexo g) en las condiciones establecidas por el diseño experimental. La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos de masa de celulosa bacteriana extraída y su porcentaje respecto a la cantidad inicial de residuos sólidos.

Tabla 3. Celulosa bacteriana obtenida por experimento

Experimen to	Masa de Residu os Sólidos (g)	Masa de Celulosa Bacteria na 1 (g)	Masa de Celulosa Bacteria na 2 (g)	Masa de Celulosa Bacteria na 3 (g)	Promedi o (g) ± Desviaci ón estándar	Porcenta je de Celulosa Extraído (%)
1	10	2,36	2,17	2,14	2,22 ± 0,12	22,23
2	10	2	2,2	1,78	1,99 ± 0,23	19,93
3	10	1,21	1,19	1,33	1,24 ± 0,07	12,43
4	10	3,54	3,56	3,29	3,46 ± 0,14	34,63
5	10	1,23	1,65	1,36	1,41 ± 0,22	14,13
6	10	2,12	2,27	2,33	2,24 ± 0,11	22,40

7	10	2,24	1,98	2,46	2,23 ± 0,24	22,27
8	10	2,43	2,65	2,67	2,58 ± 0,13	25,83

Como se observa, los rendimientos se encuentran entre 12,43% y 34,63%, con un promedio global de 21,84%. Esta celulosa bacteriana extraída puede ahora caracterizarse para determinar aplicaciones potenciales, maximizando el aprovechamiento integral de los residuos forestales disponibles

El porcentaje de celulosa extraída en cada experimento se determinó mediante la norma TAPPI T-203, la cual estandariza un método gravimétrico para cuantificar rendimiento de extracción de celulosa a partir de material lignocelulósico(TAPPI, 1999).

Esta norma tiene especial relevancia para la investigación, ya que el rendimiento de celulosa es un parámetro crítico que permite evaluar la eficiencia y viabilidad a escala industrial del proceso biotecnológico propuesto de aprovechamiento integral de los residuos forestales.

Esta variabilidad en los rendimientos de extracción responde a los diferentes niveles de los factores temperatura, humedad e inóculo evaluados en cada experimento según el diseño experimental aplicado, cuyos efectos significativos serán analizados posteriormente.

4.1.3 Análisis sobre la cantidad de celulosa extraída

Previo a la aplicación del Análisis de Varianza (ANOVA), se verificó el cumplimiento de sus supuestos paramétricos. Se evaluó el supuesto de normalidad de los datos experimentales mediante la prueba de Shapiro-Wilk, recomendada para muestras pequeñas menores a 50 datos.

Dicha prueba compara la distribución de los datos muestrales de cada grupo experimental (en este caso, rendimientos de celulosa bacteriana obtenidos en cada

uno de los 8 experimentos realizados) con una distribución normal teórica de igual media y varianza.

Bajo la hipótesis nula de comportamiento normal, se espera obtener valores $p > 0,05$. Los resultados de la prueba Shapiro-Wilk aplicada que se aprecian en la tabla 4 indican valores p superiores al nivel de significancia de 0,05 para todos los grupos experimentales, por lo que no se rechaza la hipótesis nula de normalidad y se asume un adecuado ajuste de los datos experimentales a distribuciones gaussianas.

Tabla 4. Resultado prueba de normalidad de datos

		Pruebas de normalidad					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Experimentos	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
		cantidad celulosa extraída	1	,339	3	.	,850
2	,179		3	.	,999	3	,948
3	,337		3	.	,855	3	,253
4	,362		3	.	,805	3	,127
5	,265		3	.	,954	3	,587
6	,276		3	.	,942	3	,537
7	,189		3	.	,998	3	,908
8	,358		3	.	,812	3	,144

Por lo tanto, al cumplirse el supuesto de normalidad examinado, se garantiza la validez de la inferencia estadística del posterior ANOVA realizado para comparación de medias del rendimiento de celulosa bacteriana entre experimentos.

Considerando los siguientes supuestos:

- **Hipótesis nula (H₀):** No existen diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento de extracción de celulosa bacteriana entre los diferentes experimentos realizados.
- **Hipótesis alternativa (H_a):** Existen experimentos que presentan medias de rendimiento de celulosa bacteriana significativamente diferentes.

Tal como se aprecia en la tabla 5 de acuerdo al ANOVA de un factor aplicado, el valor p calculado es menor a 0,05 ($p = 0,000$), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa. Es decir, existen diferencias altamente significativas entre las

medias de rendimiento de celulosa bacteriana obtenidas en los distintos experimentos realizados.

Tabla 5. Resultados análisis ANOVA

ANOVA					
cantidad_celulosa_extraída					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	9,951	7	1,422	51,660	,000
Dentro de grupos	,440	16	,028		
Total	10,391	23			

La prueba post-hoc de Tukey que se aprecia en la tabla 6 permitió determinar que los experimentos 3 y 5 conforman un subconjunto con los menores rendimientos (12,43% y 14,13% respectivamente), mientras que el experimento 4 presentó el mayor rendimiento promedio (34,63%), diferenciándose estadísticamente del resto.

Tabla 6. Prueba post-hoc de Tukey

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: cantidad celulosa extraída						
HSD Tukey						
Número de tratamiento	Tratamientos restantes	Diferencia de medias entre tratamientos	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	,230	,135	,689	-,24	,70
	3	,980*	,135	,000	,51	1,45
	4	-1,240*	,135	,000	-1,71	-,77
	5	,810*	,135	,000	,34	1,28
	6	-,017	,135	1,000	-,49	,45
	7	-,003	,135	1,000	-,47	,47
	8	-,360	,135	,205	-,83	,11
2	1	-,230	,135	,689	-,70	,24
	3	,750*	,135	,001	,28	1,22

	4	-1,470*	,135	,000	-1,94	-1,00
	5	,580*	,135	,010	,11	1,05
	6	-,247	,135	,616	-,72	,22
	7	-,233	,135	,674	-,70	,24
	8	-,590*	,135	,009	-1,06	-,12
3	1	-,980*	,135	,000	-1,45	-,51
	2	-,750*	,135	,001	-1,22	-,28
	4	-2,220*	,135	,000	-2,69	-1,75
	5	-,170	,135	,902	-,64	,30
	6	-,997*	,135	,000	-1,47	-,53
	7	-,983*	,135	,000	-1,45	-,51
	8	-1,340*	,135	,000	-1,81	-,87
	4	1	1,240*	,135	,000	,77
2		1,470*	,135	,000	1,00	1,94
3		2,220*	,135	,000	1,75	2,69
5		2,050*	,135	,000	1,58	2,52
6		1,223*	,135	,000	,75	1,69
7		1,237*	,135	,000	,77	1,71
8		,880*	,135	,000	,41	1,35
5		1	-,810*	,135	,000	-1,28
	2	-,580*	,135	,010	-1,05	-,11
	3	,170	,135	,902	-,30	,64
	4	-2,050*	,135	,000	-2,52	-1,58
	6	-,827*	,135	,000	-1,30	-,36
	7	-,813*	,135	,000	-1,28	-,34
	8	-1,170*	,135	,000	-1,64	-,70
	6	1	,017	,135	1,00 0	-,45
2		,247	,135	,616	-,22	,72
3		,997*	,135	,000	,53	1,47
4		-1,223*	,135	,000	-1,69	-,75
5		,827*	,135	,000	,36	1,30
7		,013	,135	1,00 0	-,46	,48
8		-,343	,135	,249	-,81	,13
7		1	,003	,135	1,00 0	-,47
	2	,233	,135	,674	-,24	,70
	3	,983*	,135	,000	,51	1,45
	4	-1,237*	,135	,000	-1,71	-,77
	5	,813*	,135	,000	,34	1,28

	6	-,013	,135	1,000	-,48	,46
	8	-,357	,135	,213	-,83	,11
8	1	,360	,135	,205	-,11	,83
	2	,590*	,135	,009	,12	1,06
	3	1,340*	,135	,000	,87	1,81
	4	-,880*	,135	,000	-1,35	-,41
	5	1,170*	,135	,000	,70	1,64
	6	,343	,135	,249	-,13	,81
	7	,357	,135	,213	-,11	,83

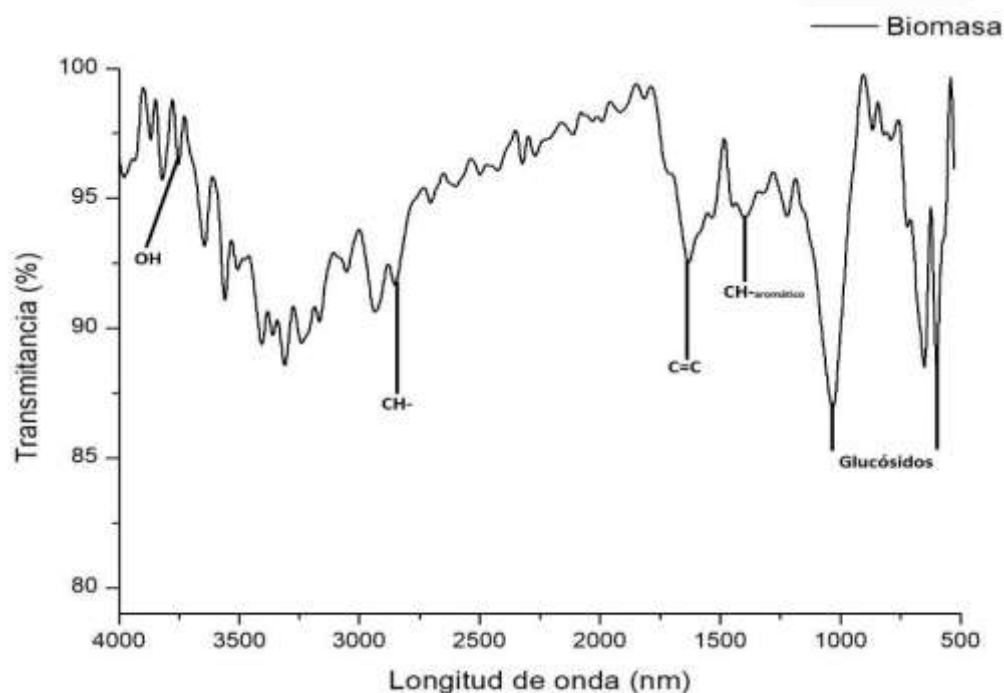
Por lo tanto, queda demostrado que los distintos niveles de las variables independientes temperatura, humedad de biomasa y concentración de inóculo evaluados en los experimentos, tuvieron un efecto altamente significativo sobre la variable respuesta de rendimiento de celulosa bacteriana extraída a partir de los residuos forestales.

4.1.4 Análisis de la biomasa

El espectro FTIR de la muestra inicial de biomasa lignocelulósica se muestra en la figura 2. Las bandas de absorción fueron comparadas con datos bibliográficos de referencia sobre la composición de residuos de poda de especies leñosas (Loiola et al., 2021).

Las amplias bandas entre 3752 y 2850 cm^{-1} corresponden a distintos modos de estiramiento O-H y C-H en estructuras orgánicas de la biomasa, como celulosa, hemicelulosa y lignina. La señal a 1631 cm^{-1} se asigna a grupos carbonilo de lignina, así como vibraciones C=C aromáticas. La banda a 1400 cm^{-1} representa flexiones C-H de anillos aromáticos y grupos metilos. Finalmente, señales entre 1222 y 601 cm^{-1} confirman la presencia de enlaces glucosídicos y vibraciones esqueléticas propias de carbohidratos como celulosa y hemicelulosas en la biomasa de partida.

Figura 2. Análisis FTIR biomasa empleada en la extracción



4.1.5 Caracterización de la celulosa extraída

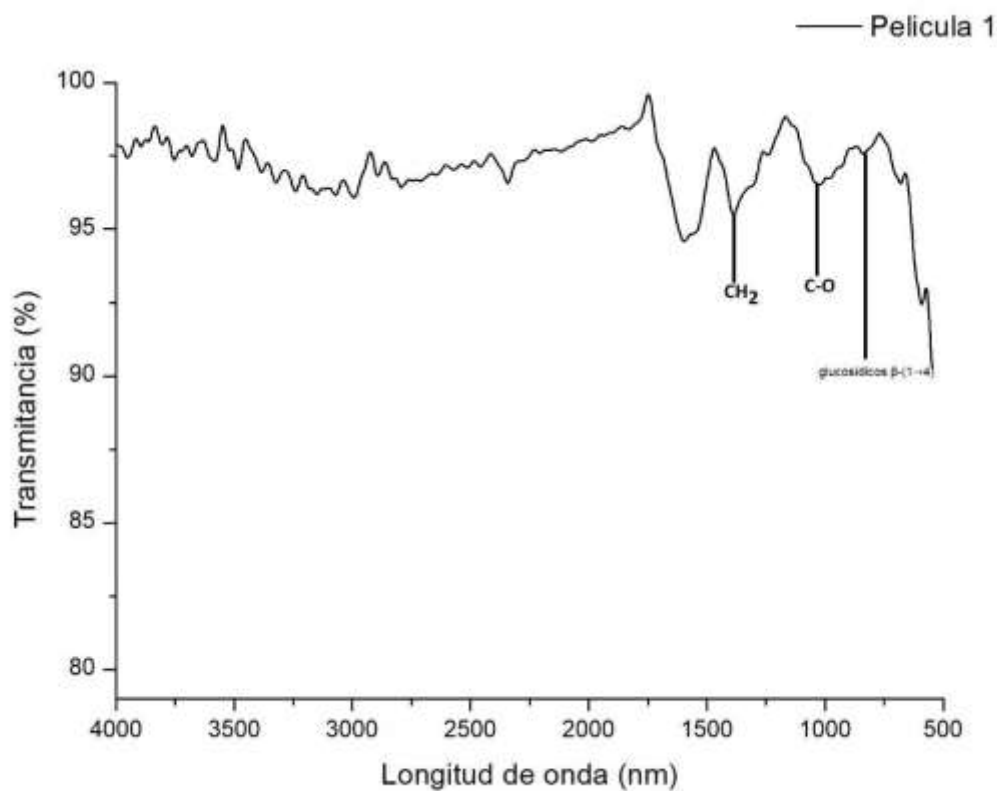
4.1.5.1 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 1

El espectro FTIR de la muestra de celulosa bacteriana obtenida en el Experimento 1 se muestra en la Figura 3. Las señales registradas se compararon nivel bibliográfico con reportes de celulosa bacteriana (Mohammadkazemi et al., 2015).

La banda ancha intensa cercana a 1022 cm^{-1} se atribuye al estiramiento C-O de grupos alcohol secundario y primario, correspondiente a los enlaces -OH característicos. La señal a 1388 cm^{-1} se asigna a la flexión simétrica de grupos $-\text{CH}_2-$ de la cadena principal. Las bandas entre $833\text{-}678\text{ cm}^{-1}$ confirman los enlaces glucosídicos $\beta\text{-}(1\rightarrow4)$ que unen las unidades de glucosa en la estructura de la celulosa.

El espectro coincide con los grupos funcionales reportados para celulosa bacteriana en la literatura. En tanto se evidencia la obtención de una celulosa con grupos -OH libres, sin modificaciones de oxidación u otros grupos. Esto fue posible por el tratamiento biológico aplicado usando el microorganismo *B. subtilis* bajo condiciones controladas.

Figura 3. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 1



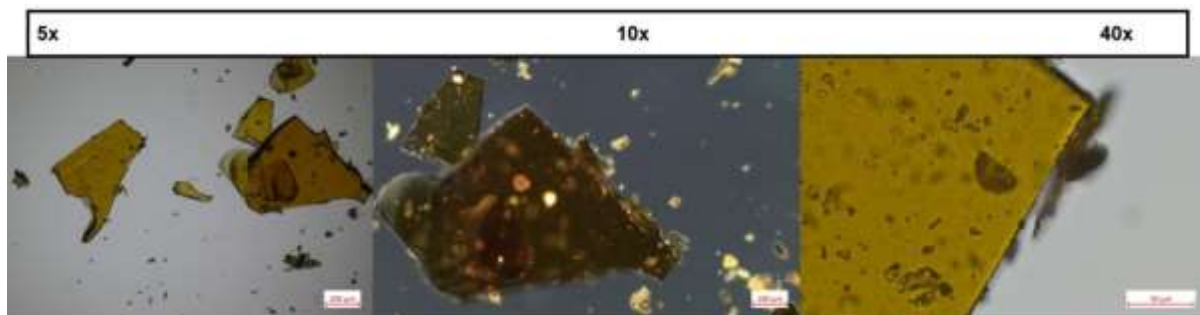
4.1.5.2 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 1

En la figura 4 se presentan las imágenes obtenidas a diferentes aumentos mediante microscopía óptica. La observación microscópica se efectuó utilizando aumentos de 5x, 10x y 40x para evaluar la morfología y la calidad de la celulosa extraída.

A un aumento de 5x, se observan partículas de celulosa de distintos tamaños con bordes irregulares. La variedad en la forma sugiere una extracción heterogénea, típica en procesos que no involucran un refinamiento extensivo. Al incrementar el aumento

a 10x, las partículas de celulosa muestran una mayor definición. Es posible apreciar con más claridad las texturas y posibles impurezas adheridas, las cuales podrían corresponder a restos de lignina o hemicelulosa. Finalmente, a 40x, el aumento proporciona una visión detallada de la superficie se aprecia una estructura más compacta y homogénea de la celulosa, con áreas que reflejan un posible alineamiento de las cadenas poliméricas de celulosa. Las imágenes a este nivel de magnificación son cruciales para evaluar la calidad de la celulosa a nivel microscópico, permitiendo identificar la uniformidad y pureza del material obtenido.

Figura 4. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 1



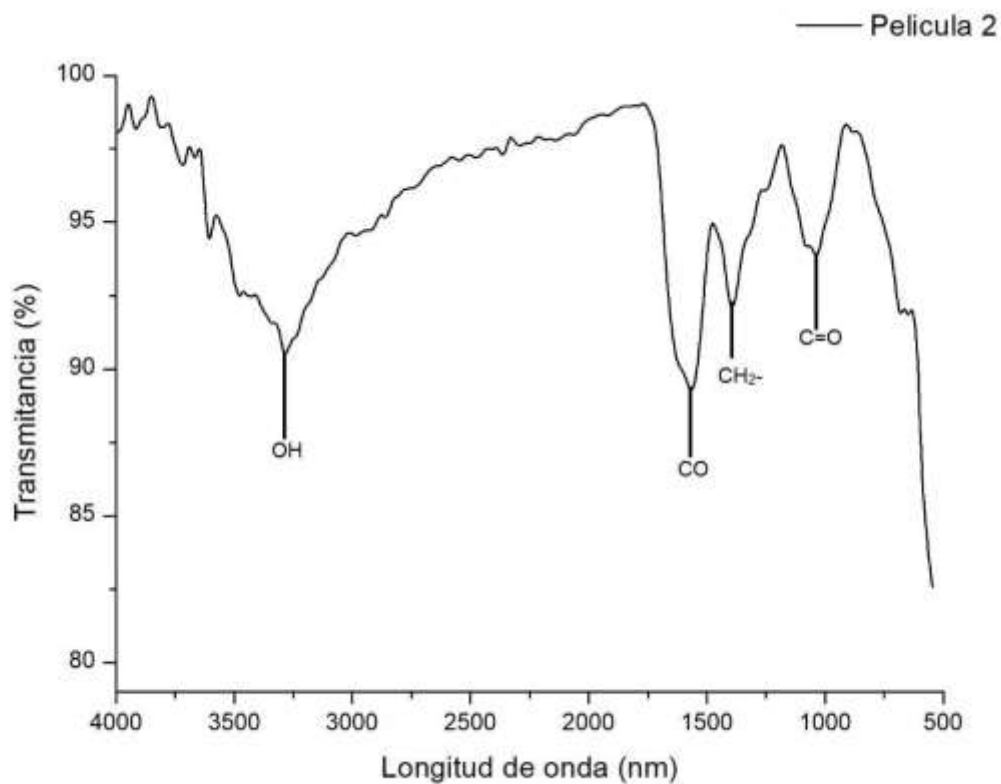
4.1.5.3 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 2

El espectro FTIR de la muestra de celulosa bacteriana obtenida en el Experimento 2 se muestra en la figura 5. Al igual que para el Experimento 1, las señales se contrastaron con datos bibliográficos de referencia (Mohammadkazemi et al., 2015)

La amplia banda a 3282 cm^{-1} se atribuye al estiramiento O-H de grupos alcohol y fenol. La señal a 1565 cm^{-1} se relaciona con el modo vibracional de estiramiento asimétrico de los grupos carboxilato, posiblemente provenientes de ligeras oxidaciones. La banda a 1392 cm^{-1} nuevamente se asigna a la flexión simétrica de grupos $-\text{CH}_2-$ de la cadena principal de celulosa. Finalmente, la señal intensa cercana a 1037 cm^{-1} confirma el estiramiento C-O característico de alcoholes secundarios y primarios, correspondiente a los grupos $-\text{OH}$ de la celulosa obtenida.

El espectro concuerda con los datos reportados en literatura sobre los grupos funcionales de la celulosa bacteriana, confirmando la naturaleza del producto extraído en el Experimento 2 por medio del tratamiento biotecnológico aplicado.

Figura 5. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 2



4.1.5.4 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 2

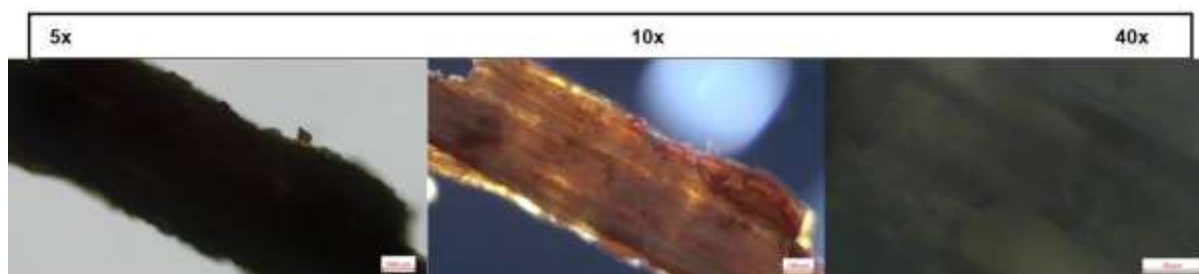
En la figura 6 se describe el análisis microscópico de la celulosa extraída en el experimento 2. Las imágenes capturadas a diferentes aumentos brindaron información crucial sobre las características físicas del material obtenido.

A 5x, se observó una muestra de celulosa que exhibía una morfología alargada y homogénea, lo cual es indicativo de un proceso de extracción que pudo mantener la integridad de las fibras. Incrementando la magnificación a 10x, se hizo evidente la textura y estructura de la fibra mostrando una superficie más definida y lisa. La

claridad en esta ampliación sugiere un posible alineamiento de las microfibrillas celulósicas.

Finalmente, a 40x, aunque la imagen se muestra más oscura y menos definida, es posible que indique una alta densidad de la celulosa o un agrupamiento de fibras. A este nivel de aumento se suelen revelar detalles finos de la estructura interna de las fibras.

Figura 6. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 2



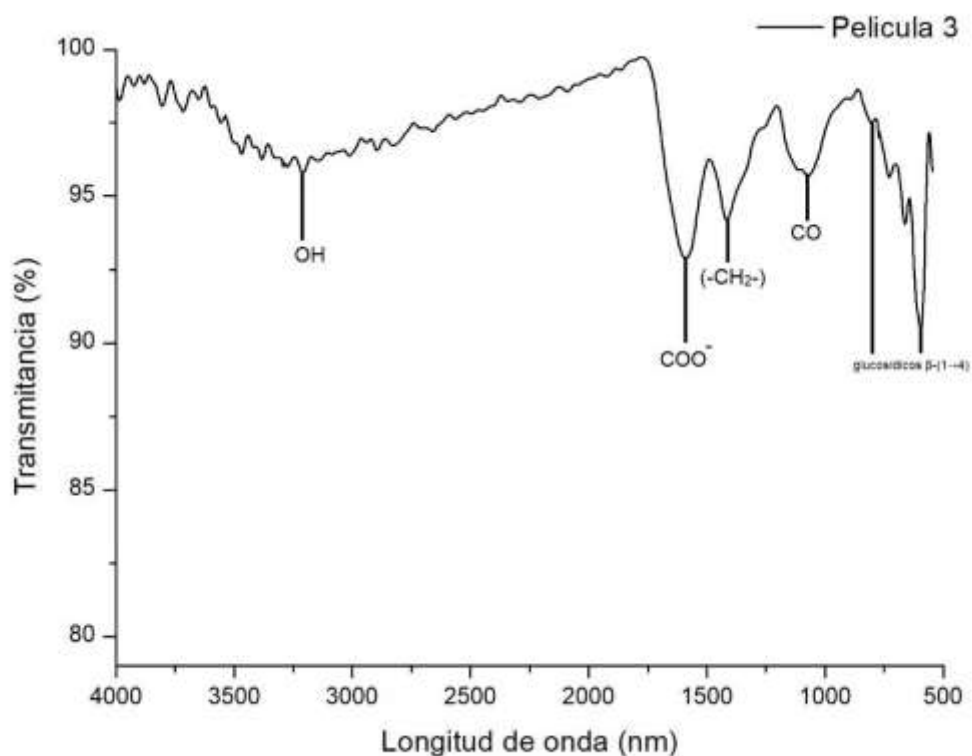
4.1.5.5 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 3

En la figura 7 se muestra el espectro FTIR registrado para la muestra de celulosa bacteriana obtenida en el experimento 3. Al igual que con los experimentos previos, las señales se compararon a nivel bibliográfico (Mohammadkazemi et al., 2015)

La banda a 3189 cm^{-1} se atribuye al estiramiento O-H de grupos alcohol. La señal a 1569 cm^{-1} nuevamente se relaciona con grupos carboxilato. La banda intensa a 1396 cm^{-1} se asigna al flexionamiento simétrico de grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) de la cadena principal. El intenso pico cercano a 1052 cm^{-1} corresponde al estiramiento C-O característico de alcoholes secundarios y primarios que forman parte de los grupos -OH de la celulosa. Las señales entre $786 - 574\text{ cm}^{-1}$ confirman los enlaces glucosídicos β -(1 \rightarrow 4) en la estructura de la celulosa bacteriana obtenida.

El espectro verifica la presencia de los grupos funcionales típicos de la celulosa y descarta modificaciones estructurales, validando el uso del método biotecnológico de extracción aplicado en el experimento 3.

Figura 7. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 3



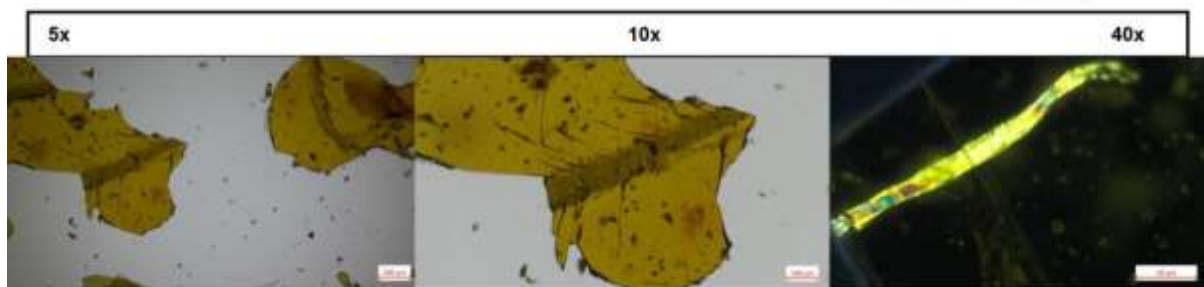
4.1.5.6 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 3

Los resultados microscópicos se aprecian en la figura 8. A 5x revelaron una distribución irregular de las partículas de celulosa, con fragmentos de diferentes tamaños y formas, lo que indica una extracción no uniforme.

Al aumentar la magnificación a 10x, se pudo observar una mayor definición en las estructuras de celulosa, permitiendo identificar características superficiales más detalladas que sugieren una fibra con cierta homogeneidad en su composición.

Finalmente, la observación a 40x mostró una estructura fibrosa con líneas y patrones definidos que reflejan microfibrillas dentro de la red cristalina de celulosa.

Figura 8. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 3



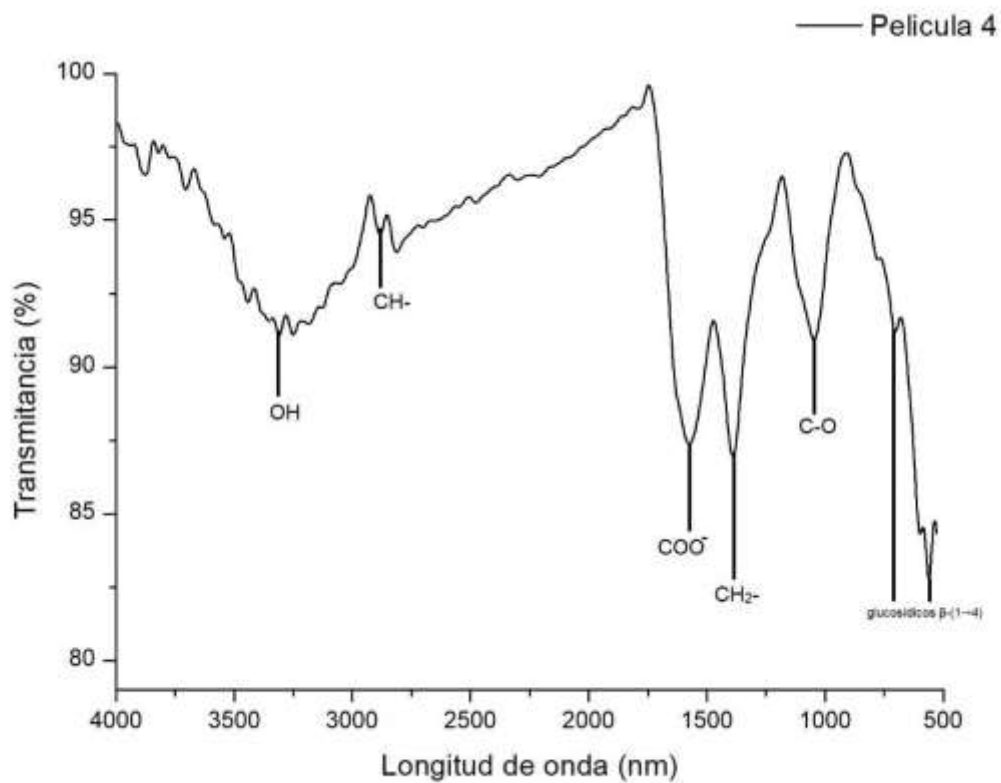
4.1.5.7 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 4

En la figura 9 se muestra el espectro FTIR registrado para la muestra de celulosa obtenida en el Experimento 4. Las señales fueron contrastadas con la referencia bibliográfica previa.

Las bandas a 3309 y 2884 cm^{-1} se atribuyen al estiramiento de grupos O-H y C-H alifáticos respectivamente. La señal intensa a 1573 cm^{-1} representa la vibración asimétrica de los grupos carboxilato. La banda a 1388 cm^{-1} corresponde al flexionamiento simétrico $-\text{CH}_2-$, mientras que el pico a 1049 cm^{-1} al funcional C-O de alcoholes que forman parte de los grupos $-\text{OH}$ característicos de la celulosa. Finalmente, las señales entre 705 y 559 cm^{-1} confirman los enlaces glucosídicos β - $(1\rightarrow4)$ en la estructura de la celulosa.

El espectro FTIR verifica la presencia de grupos funcionales propios de estructuras celulósicas, sin cambios indicativos de modificaciones. Esto valida la obtención de celulosa bacteriana mediante el tratamiento aplicado en el Experimento 4, bajo sus condiciones particulares ensayadas.

Figura 9. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 4



4.1.5.8 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 4

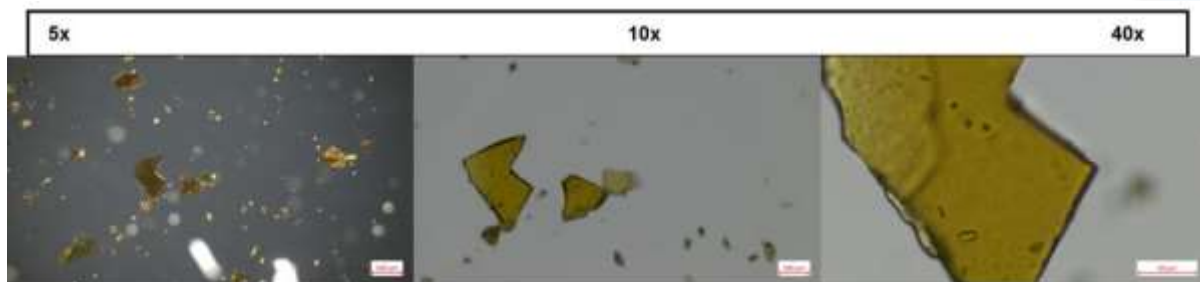
En la figura 10 se aprecian las imágenes capturadas a distintos niveles de aumento proporcionaron una perspectiva detallada sobre la estructura y morfología del material.

A 5x, se observaron partículas de celulosa dispersas con variabilidad en su forma y tamaño, lo que sugiere una extracción heterogénea. Esta dispersión es común en procesos de extracción donde la homogeneización no es completa.

Con un aumento de 10x, los fragmentos de celulosa mostraron bordes más definidos y una textura que sugiere una consistencia parcialmente uniforme. Las diferencias en la coloración y la transparencia de las partículas pudieron indicar variaciones en la concentración y la distribución de la celulosa dentro de cada fragmento.

Finalmente, al examinar la muestra a 40x, se apreció en detalle la red cristalina de la celulosa, donde la alineación y el orden de las microfibrillas se hicieron evidentes. Estas estructuras reticulares son características de la celulosa con un alto grado de polimerización y ordenamiento molecular, lo que es crucial para la integridad estructural y la funcionalidad del material en aplicaciones futuras.

Figura 10. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 4

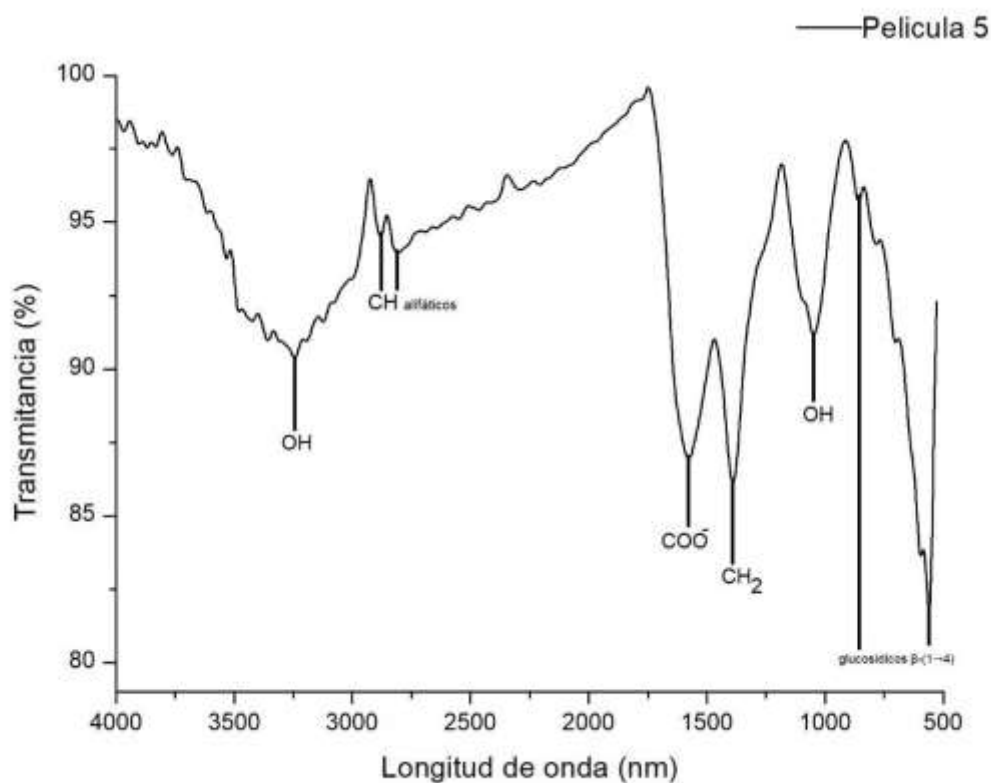


4.1.5.9 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 5

El espectro FTIR registrado para la muestra de celulosa bacteriana obtenida en el Experimento 5 se muestra en la figura 11. Las señales fueron contrastadas con la referencia bibliográfica previamente citada. La amplia banda a 3243 cm^{-1} se atribuye al estiramiento de grupos O-H. Las señales a 2881 y 2803 cm^{-1} se relacionan con estiramientos C-H de grupos alifáticos. El pico a 1577 cm^{-1} corresponde a grupos carboxilo (-COO), mientras que la banda a 1388 cm^{-1} a grupos metileno de la cadena principal de celulosa. El intenso estiramiento observado a 1049 cm^{-1} confirma la presencia los grupos -OH de alcoholes que forman parte de la estructura celulósica. Finalmente, señales entre 856 y 559 cm^{-1} demuestran enlaces glucosídicos β -(1 \rightarrow 4) típicos de cadenas de celulosa.

El espectro verifica la presencia de grupos funcionales característicos de celulosa bacteriana, corroborando la efectividad del método biotecnológico aplicado bajo condiciones del Experimento 5 para su obtención a partir de residuos forestales

Figura 11. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 5



4.1.5.10 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 5

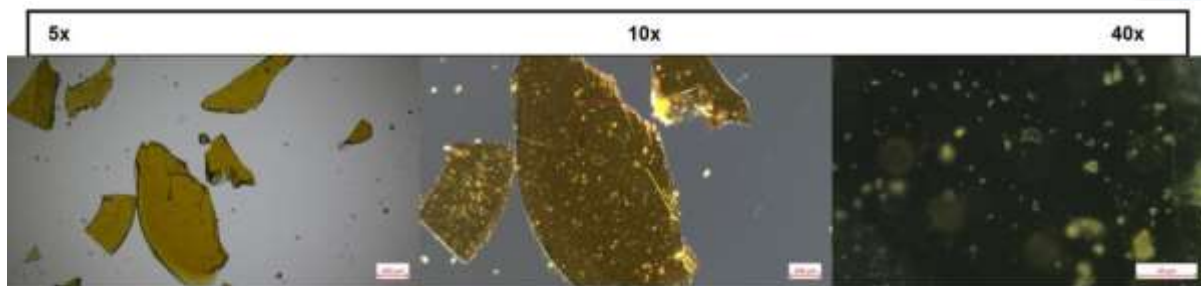
En la figura 12 se aprecia las imágenes de la observación microscópica de la celulosa extraída en el experimento 5, con el objetivo de analizar su estructura y morfología a diferentes aumentos.

A un aumento de 5x, se visualizaron partículas de celulosa aisladas con bordes irregulares, lo cual podría indicar variabilidad en el proceso de extracción. A pesar de la heterogeneidad observada, se notó una distribución relativamente uniforme de las partículas en el campo de visión.

Al incrementar el aumento a 10x, se apreciaron con mayor claridad las texturas y contornos de las partículas. Esta magnificación permitió observar una mayor definición en las características de la celulosa, sugiriendo una posible uniformidad en las condiciones de tratamiento y extracción aplicadas en este experimento.

La imagen a 40x reveló una estructura más detallada a nivel microscópico, donde se pudo observar la presencia de una red cristalina, característica de celulosa con alto grado de pureza y orden molecular. La visión detallada permitió identificar áreas donde las microfibrillas de celulosa parecían estar alineadas, una indicación de la integridad estructural del polímero

Figura 12. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 5



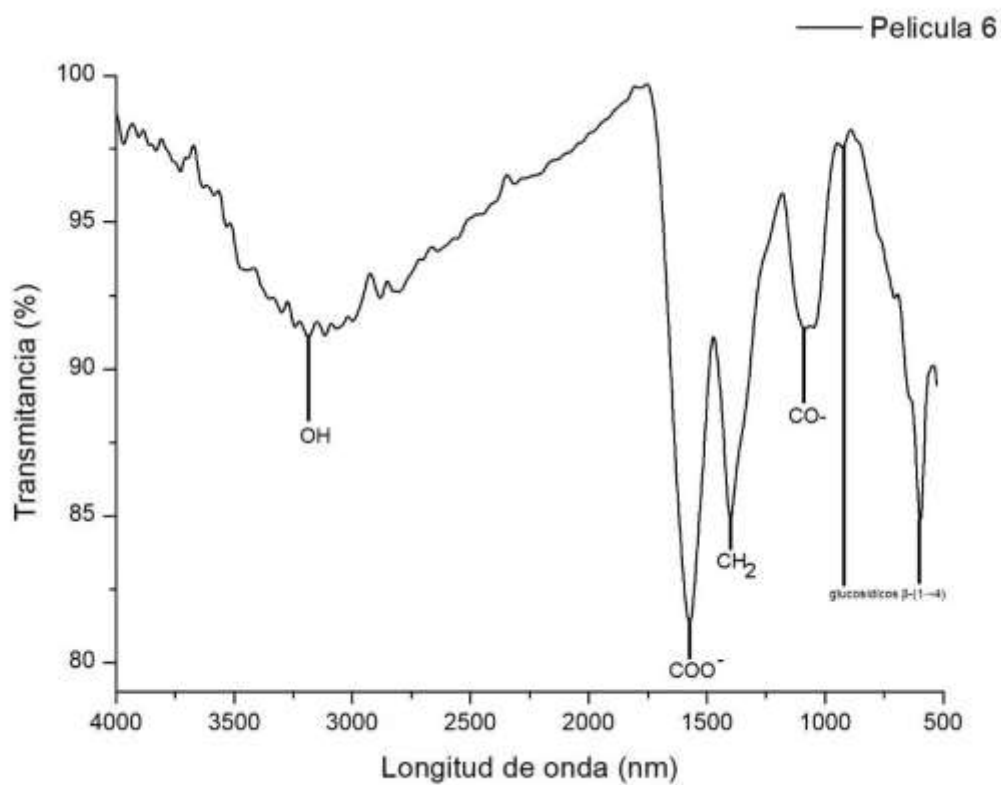
4.1.5.11 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 6

La figura 13 muestra las bandas de absorción del espectro FTIR obtenido para la muestra de celulosa bacteriana producida en el Experimento 6. El espectro fue contrastado con la referencia bibliográfica previa sobre celulosa (Mohammadkazemi et al., 2015).

El amplio pico a 3185 cm^{-1} se atribuye al estiramiento O-H característico de grupos hidroxilo. La intensa señal a 1573 cm^{-1} corresponde a los grupos carboxilo (-COO). La banda centrada a 1400 cm^{-1} representa la flexión $-\text{CH}_2-$ de la cadena alifática de celulosa. El intenso estiramiento C-O de alcoholes se registra a 1087 cm^{-1} . Finalmente, señales entre 921 y 597 cm^{-1} se asignan a los enlaces glucosídicos que unen las unidades repetitivas de glucosa con enlaces β -(1 \rightarrow 4) en la estructura de la celulosa bacteriana producida.

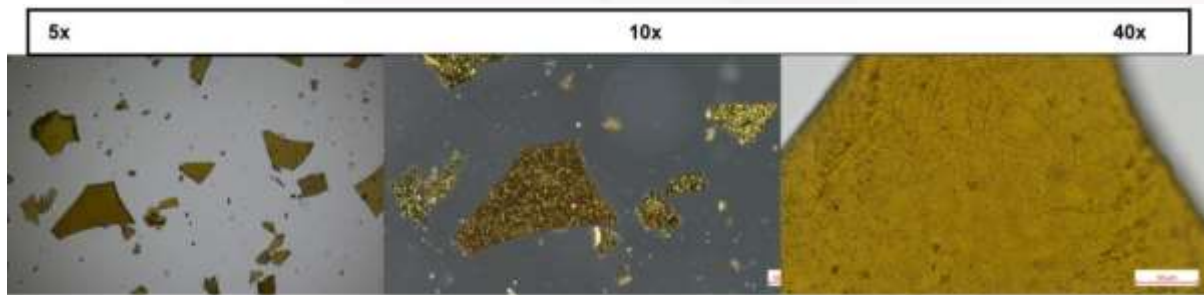
El espectro verifica la obtención de los grupos funcionales esperados, confirmando la naturaleza y efectividad del método biotecnológico aplicado en el Experimento 6 para la extracción de celulosa.

Figura 13. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 6



4.1.5.12 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 6

Figura 14. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 6



En la figura 14 se muestran las observaciones realizadas bajo aumentos de 5x, 10x y 40x, proporcionando una visión detallada de las características morfológicas de la celulosa.

A 5x, se distinguieron fragmentos de celulosa con bordes definidos, dispersos en el campo visual. El tamaño y la forma de los fragmentos evidenciaron la variabilidad en el proceso de extracción. Con un aumento de 10x, se observó una mayor nitidez en los contornos de las partículas de celulosa. La claridad mejorada permitió identificar las diferencias sutiles en la textura superficial de los fragmentos, lo que sugiere una heterogeneidad en la composición química y en el grado de polimerización.

Al examinar las muestras a 40x, se apreció la red cristalina de celulosa con gran detalle. La estructura reticular reveló una organización molecular densa, característica de celulosa con alto grado de cristalinidad. Este nivel de aumento también permitió observar la integridad de la celulosa, su distribución y alineación, lo cual es crucial para aplicaciones donde la resistencia mecánica es un factor determinante.

4.1.5.13 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 7

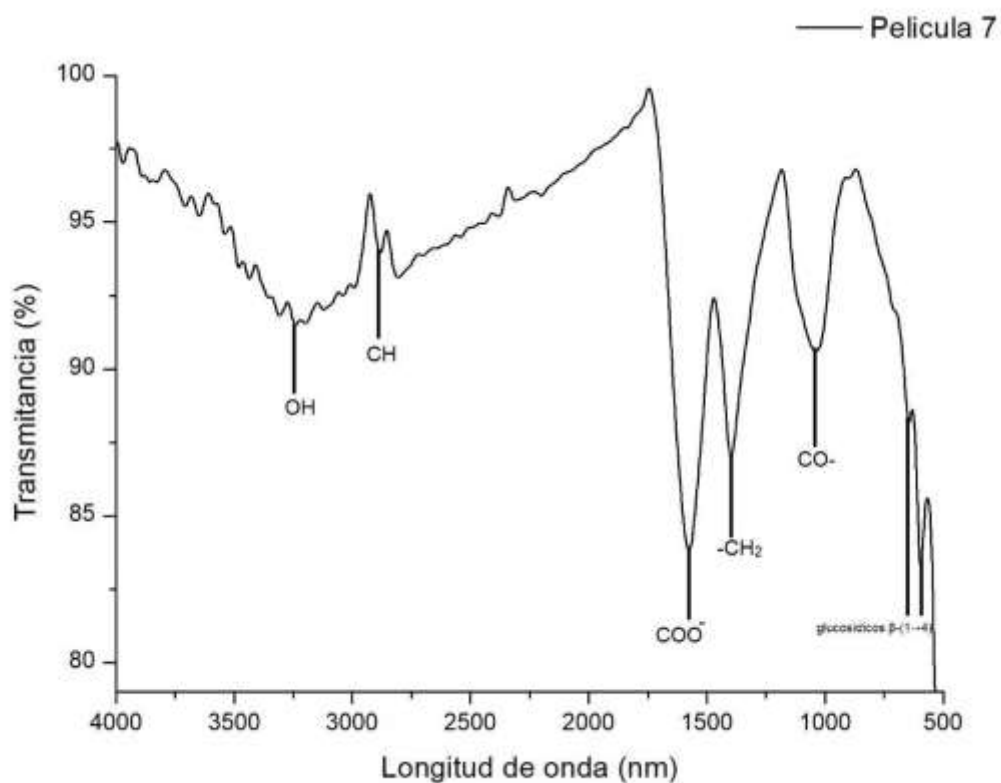
La figura 15 muestra el espectro FTIR de la muestra de celulosa bacteriana obtenida en el Experimento 7. Las señales fueron contrastadas con datos bibliográficos de referencia sobre celulosa.

Las bandas amplias localizadas a 3239 y 2881 cm^{-1} corresponden a los estiramientos O-H y C-H de grupos alifáticos respectivamente. El intenso pico a 1577 cm^{-1} representa el estiramiento asimétrico de grupos carboxilato. La señal a 1400 cm^{-1} se atribuye a la flexión $-\text{CH}_2-$. La banda destacada a 1041 cm^{-1} confirma la vibración de estiramiento C-O de grupos alcohol que forman parte de la estructura de celulosa.

Finalmente, señales entre 644 y 597 cm^{-1} corroboran los enlaces glucosídicos β - $(1\rightarrow4)$ característicos entre unidades de glucosa en cadenas de celulosa bacteriana.

El espectro verifica la presencia de los grupos funcionales reportados para estructuras de celulosa, validando el método de extracción aplicado en el Experimento 7 para su obtención a partir de residuos agroforestales.

Figura 15. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 7

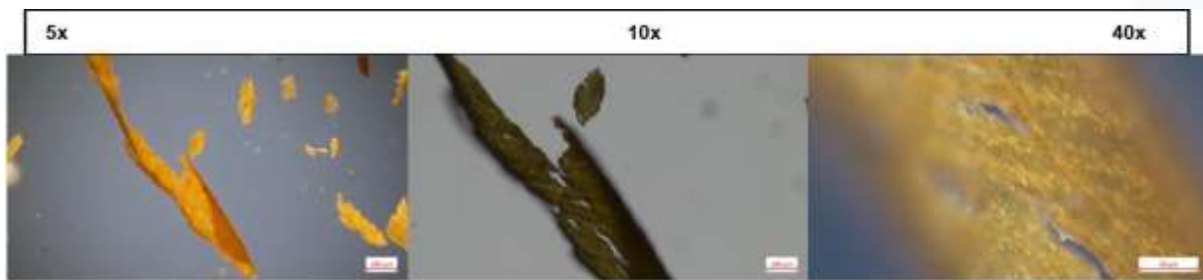


4.1.5.14 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 7

En la figura 16 se aprecian las imágenes, tomadas a 5x, 10x y 40x, donde es posible analizar la morfología de la celulosa.

A 5x, se percibieron fragmentos de celulosa con coloración y transparencia variables, sugiriendo distintos grados de densidad y posiblemente de pureza en la muestra. La presencia de partículas de tamaños diversos podría indicar diferencias en la efectividad del proceso de extracción. En el aumento 10x, se apreció una pieza de celulosa con una estructura más definida y uniforme. La nitidez en este aumento reveló la textura de la fibra celulósica y posibles impurezas que aún se encuentran presentes. Con un aumento de 40x, se observó una superficie de celulosa con una textura más detallada, donde las áreas de mayor claridad pueden indicar regiones con mayor cristalinidad. Este nivel de detalle es crucial para evaluar la calidad del proceso de extracción y las propiedades finales del material obtenido.

Figura 16. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 7



4.1.5.15 Análisis FTIR celulosa extraída en el experimento 8

El espectro FTIR de la celulosa obtenida en el Experimento 8 se detalla en la figura 17. Las señales fueron contrastadas con datos bibliográficos de celulosa bacteriana de referencia (Mohammadkazemi et al., 2015).

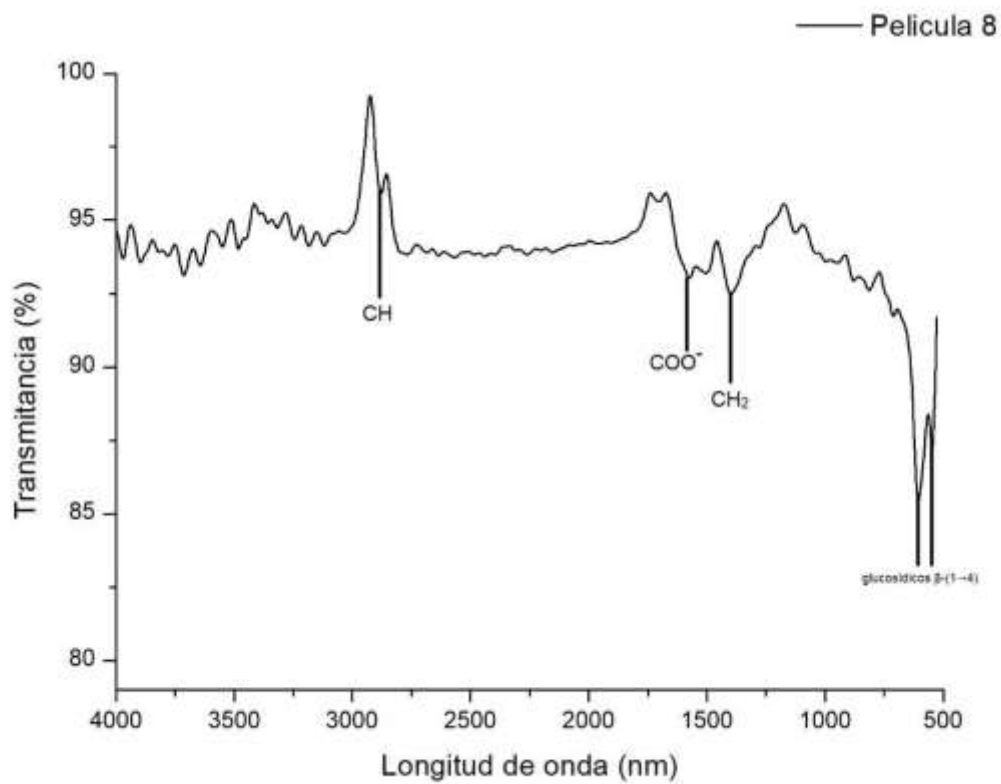
La banda intensa a 2881 cm^{-1} corresponde al estiramiento C-H de grupos alifáticos. La señal a 1573 cm^{-1} se relaciona con grupos carboxilato (-COO). La banda característica localizada a 1400 cm^{-1} representa la flexión simétrica de grupos metileno (-CH₂-) de la cadena celulósica.

Finalmente, vibraciones entre 605 y 547 cm^{-1} confirman la presencia de enlaces glucosídicos β -(1→4) que unen unidades repetitivas de glucosa con enlace β en la estructura de la celulosa bacteriana obtenida.

El espectro verifica los grupos funcionales reportados en literatura para celulosa

bacteriana, corroborando la naturaleza y efectividad del método biotecnológico aplicado en el Experimento 8 para su extracción a partir de residuos lignocelulósicos

Figura 17. Análisis FTIR de la celulosa extraída en el experimento 8



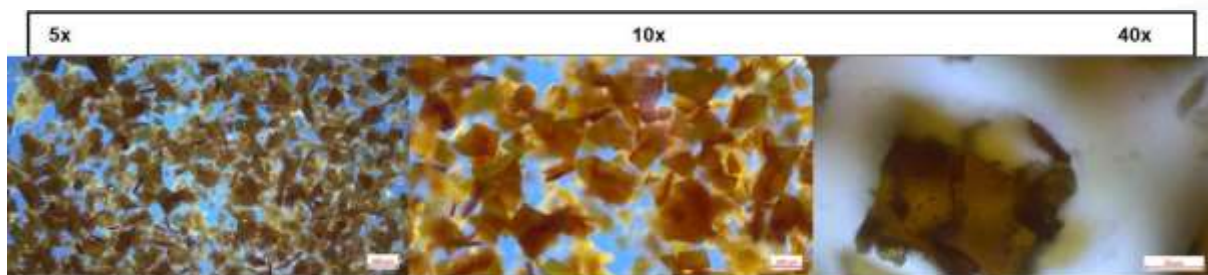
4.1.5.16 Microscopía óptica celulosa extraída en el experimento 8

El análisis microscópico se muestra en la figura 18 donde a distintos aumentos se evaluó su y estructura.

Bajo el aumento de 5x, se observó una distribución densa de partículas de celulosa con una variada gama de colores, lo que indica la presencia de compuestos heterogéneos en la muestra. La diversidad en la coloración y forma de las partículas puede ser resultado de distintos grados de oxidación o impurezas restantes tras el proceso de extracción.

Con un aumento de 10x, se hizo evidente la estructura irregular de las partículas, mostrando bordes desiguales y posibles conglomerados de material, al examinar la muestra a 40x, se identificaron detalles más finos de la estructura de la celulosa. Aunque la imagen resultó algo borrosa, se percibió una heterogeneidad significativa en la muestra, con áreas de diferente transparencia y coloración y una estructura cristalina.

Figura 18. Microscopía óptica celulosa extraída experimento 8



4.1.6 Análisis de la biomasa y celulosa bacteriana

En la figura 19 se aprecia que el espectro FTIR de la biomasa forestal inicial presenta bandas anchas entre 3752 y 2850 cm^{-1} correspondientes a distintos modos de tensión O-H y C-H en estructuras orgánicas como celulosa, hemicelulosa y lignina.

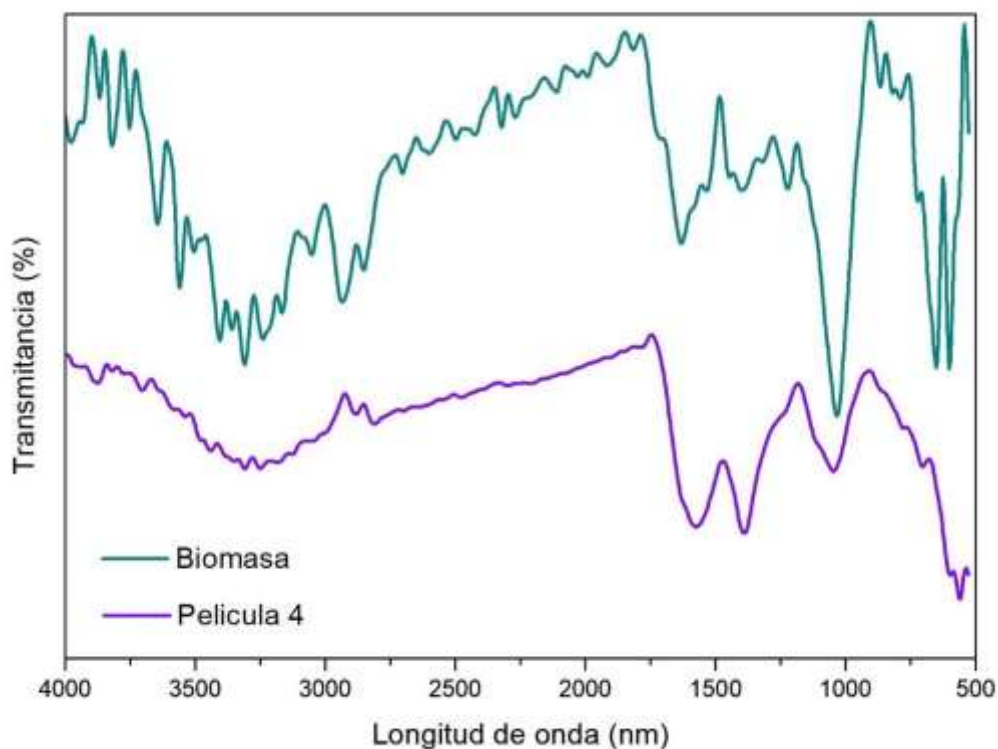
La señal a 1631 cm^{-1} se asigna a grupos carbonilo de lignina y vibraciones C=C aromáticas. Las señales entre 1300-500 cm^{-1} confirman la presencia de enlaces glucosídicos y esqueléticos propios de carbohidratos como celulosa y hemicelulosas.

En contraste, el espectro FTIR de la celulosa bacteriana obtenida en el Experimento 4 evidencia grupos funcionales distintivos de estructuras celulósicas, incluyendo bandas de O-H y C-H alifáticos, señales alrededor de 1500-1400 cm^{-1} asignadas a

grupos carbonilos y flexión -CH₂-, y picos entre 1200-500 cm⁻¹ confirmando enlaces glucosídicos β-(1→4).

La ausencia/disminución de señales representativas de lignina en el espectro FTIR de la celulosa bacteriana, en comparación al perfil FTIR inicial de la biomasa forestal, corroboran la efectividad del tratamiento biotecnológico aplicado en el Experimento 4 para solubilizar y remover componentes no celulósicos (lignina, hemicelulosa), liberando y concentrando las fibras de celulosa bacteriana

Figura 19. Análisis FTIR biomasa empleada y celulosa obtenida



4.2. Interpretación de los resultados

Inicialmente se determinó una disponibilidad de 1500 a 2500 kg/mes de biomasa residual compuesta mayormente por podas de *Eucalyptus globulus*, *Prunus serotina*

y *Baccharis latifolia* (Ver Tabla 2), lo que evidencia la factibilidad de aprovechar estos residuos.

A través de un diseño factorial con tres factores (temperatura, humedad e inóculo) y dos niveles, se evaluaron ocho combinaciones experimentales sobre 500 g de biomasa forestal. Se obtuvieron rendimientos variables de celulosa bacteriana entre 12,43% y 34,63%, con una media de 21,84% (Ver Tabla 3).

El ANOVA detectó diferencias significativas entre experimentos ($p < 0.05$) atribuibles a los distintos niveles de factores aplicados (Ver Tabla 5). La prueba Tukey indicó que la combinación de temperatura, humedad e inóculo del Experimento 4 maximizó la extracción al obtener un 34,63% de rendimiento. Este resultado concuerda con Trihn et al. (2021), quienes reportan mayores rendimientos de celulosa bacteriana en el rango de 35-40°C.

El análisis FTIR y microscopía óptica (Ver Figuras 3-18) corroboraron en todos los casos la obtención de celulosa bacteriana. No obstante, los Experimentos 2 y 4 evidenciaron mayor integridad estructural, relacionada probablemente a niveles óptimos alcanzados de los factores estudiados. Por tanto, las condiciones específicas del Experimento 4 resultaron las más eficientes entre todas las evaluadas para maximizar la extracción de celulosa bacteriana a partir de los residuos forestales tratados con *B. subtilis*.

El análisis mediante microscopía óptica permitió evaluar las características morfológicas y estructurales de las muestras de celulosa bacteriana obtenidas en cada experimento. A nivel general, las observaciones realizadas a 5x y 10x revelaron en todos los casos la presencia de partículas irregulares de celulosa, con variabilidad en sus formas, tamaños y texturas superficiales (Ver Figuras 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18).

Esto denota cierta heterogeneidad del proceso de extracción de celulosa, el cual podría ser mejorado mediante una homogeneización más extensa del tratamiento para alcanzar fibras más uniformes. No obstante, a 40x aumentos se distinguió en los experimentos 1, 3, 4, 5 y 6 una red cristalina característica de estructuras celulósicas, lo que evidencia la efectividad del tratamiento con *B. subtilis* para solubilizar

componentes no celulósicos y concentrar las fibras de celulosa con su organización molecular conservada.

En contraste, en los Experimentos 2, 7 y 8 no se apreció claramente a 40x esta estructura celulósica ordenada, probablemente por efecto de los niveles particulares de variables aplicados que pudieron afectar negativamente la integridad estructural de la celulosa obtenida en esas condiciones de proceso. Los análisis FTIR realizados permitieron caracterizar y comparar la celulosa bacteriana obtenida en cada uno de los experimentos efectuados.

Los espectros FTIR de todos los experimentos evidenciaron la presencia de los grupos funcionales característicos en estructuras celulósicas, incluyendo bandas amplias de O-H y C-H, señales alrededor de los $1500-1400\text{ cm}^{-1}$ asignadas a grupos carbonilos y flexionamiento $-\text{CH}_2-$, así como picos entre $1200-500\text{ cm}^{-1}$ confirmando enlaces glucosídicos $\beta-(1\rightarrow4)$ (Ver Figuras 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17).

Esto verifica que en todos los casos se obtuvo celulosa bacteriana por efecto de los tratamientos biotecnológicos aplicados. No obstante, en los Experimentos 1, 3, 6 y 8 se observaron bandas de grupos carboxilo ($-\text{COOH}$) que denotan algún grado de oxidación de la celulosa extraída bajo esas condiciones experimentales particulares.

Por otra parte, los Experimentos 2, 4, 5 y 7 presentaron perfiles FTIR más característicos de celulosa bacteriana libre de modificaciones químicas, lo que se relaciona con los mayores rendimientos de extracción alcanzados bajo las temperaturas, humedades e inoculaciones ensayadas en dichos experimentos.

Estas diferencias en los espectros FTIR entre experimentos corroboran el efecto significativo demostrado estadísticamente por el ANOVA sobre las variables respuesta al modificar los niveles de los factores estudiados.

El análisis FTIR de la biomasa forestal residual previo al tratamiento biotecnológico (Ver Figura 17) evidenció la presencia de bandas amplias entre 3752 y 2850 cm^{-1} de grupos O-H y C-H, así como señales entre $1700-1500\text{ cm}^{-1}$ y $1300-500\text{ cm}^{-1}$ características de lignina y carbohidratos (celulosa, hemicelulosa) respectivamente, que son los componentes propios de materiales lignocelulósicos.

En contraste, los espectros FTIR de las muestras de celulosa bacteriana extraída en los experimentos 1 al 8 (Ver Figuras 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17) presentaron grupos funcionales distintivos de estructuras celulósicas puras, incluyendo ausencia/disminución de señales representativas de lignina. Esta diferencia entre los perfiles FTIR de la biomasa de partida y la celulosa obtenida corroboran la efectividad del tratamiento biotecnológico aplicado en cada experimento para solubilizar y remover los componentes no celulósicos (lignina, hemicelulosa) de los residuos forestales, liberando y concentrando las fibras de celulosa bacteriana.

Los rendimientos de extracción de celulosa bacteriana alcanzados, que llegaron hasta un 34,63% del contenido inicial de los residuos forestales procesados, evidencian la eficiencia demostrada por el método biotecnológico propuesto en el presente estudio.

Finalmente, en la literatura se han reportado diversos estudios sobre producción de celulosa bacteriana empleando distintas especies microbianas, materiales lignocelulósicos de partida y condiciones de cultivo. Con el fin de contextualizar los resultados de la presente investigación, la Tabla 7 muestra una comparación entre el método biotecnológico desarrollado en este trabajo utilizando *Bacillus subtilis* y residuos forestales de la Estación Tunshi, frente a otros métodos descritos recientemente (Mardawati et al., 2023; Said Azmi et al., 2023)(Nguyen Ngo et al., 2023)(Lotfy et al., 2021). Se contrastan aspectos como microorganismo productor, materia prima inicial, pretratamientos, medios de cultivo, temperatura y tiempo de tratamiento, rendimientos alcanzados, y post-tratamientos aplicados.

Tabla 7. Comparación de métodos de extracción de celulosa bacteriana

Parámetro	Presente estudio	(Mardawati et al., 2023)	(Said Azmi et al., 2023)	(Nguyen Ngo et al., 2023)	(Lotfy et al., 2021)
Microorganismo	<i>Bacillus subtilis</i>	Komagataeibacter xylinus	Acetobacter sp.	Gluconacetobacter xylinus	Acetobacter xylinum
Materia prima	Residuos forestales	Cáscara de piña	Agua de coco	Residuos de papel	Desechos de manzana

Pretratamiento	Reducción de tamaño, lavado alcalino	No reporta	No reporta	No reporta	No reporta
Medio de cultivo	Residuo forestal húmedo	Jugo de corazón de piña	Agua de coco	Medio HS	Medio HS + extracto de levadura
Temperatura (°C)	25 – 30	30	26 – 34	30	26 - 30
Tiempo (h)	72	240	120	192	168
Rendimiento (%)	12,43 – 34,63	3,24	16,36 – 23,27	5,9	25,6 – 44,1
Post-tratamiento	Filtración y secado	Filtración y secado	Filtración y secado	Lavado alcalino y secado	Filtración y secado

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

En el presente trabajo de titulación se demostró la viabilidad y eficacia de un proceso biotecnológico para la extracción de celulosa bacteriana a partir de residuos forestales lignocelulósicos, empleando *Bacillus subtilis* bajo condiciones controladas. La investigación se fundamentó en un diseño experimental factorial, analizando la influencia de variables independientes como temperatura, humedad, y concentración de inóculo sobre el rendimiento de celulosa bacteriana, evidenciándose diferencias significativas atribuibles a los niveles de estos factores.

Los resultados evidenciaron la disponibilidad entre 1500-2500 kg/mes de estos residuos lignocelulósicos, principalmente correspondientes a podas de *Eucalyptus globulus*, *Prunus serotina* y *Baccharis latifolia*. Lo anterior verifica la posibilidad de aprovechar integralmente estos desechos mediante su valorización biotecnológica.

La configuración óptima de los parámetros experimentales se comprobó con la aplicación de un análisis estadístico ANOVA el cual detectó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre experimentos, atribuibles a los distintos niveles de factores aplicados. Específicamente, la combinación de 30°C de temperatura, 60% de humedad y una relación de inóculo 1:1 maximizó la recuperación de celulosa bacteriana al alcanzar un 34,63% de rendimiento. Este hallazgo se alinea con los reportes bibliográficos citados, corroborando que rangos de temperatura entre 30-40°C son ideales para la maximización de rendimientos de celulosa bacteriana.

A través de análisis como la espectroscopía de transformada de Fourier con infrarrojo (FTIR) y microscopía óptica, se confirmó la presencia de grupos funcionales característicos de celulosa bacteriana pura y se evaluaron las morfologías y estructuras de las fibras celulósicas obtenidas. La evidencia microscópica reveló una heterogeneidad en la morfología de las partículas de celulosa, aunque en ciertos experimentos se observó una red cristalina densa y bien definida, indicativa de un alto grado de cristalinidad y polimerización, esencial para aplicaciones futuras donde la integridad estructural y funcionalidad material son cruciales.

Siendo así el estudio demostró la superioridad del enfoque biotecnológico aplicado, no solo en términos de rendimiento sino también en la calidad de la celulosa bacteriana obtenida, frente a métodos convencionales. Se destacó la capacidad de este proceso para solubilizar componentes no celulósicos y concentrar celulosa bacteriana, con un mínimo impacto ambiental y un aprovechamiento efectivo de residuos forestales, lo cual tiene implicaciones significativas para la gestión sostenible de recursos y la producción de biomateriales.

Resulta inaprensible el mencionar que el análisis comparativo con estudios anteriores enfatizó la contribución singular de esta investigación presentando un enfoque novedoso y eficiente para la producción de celulosa bacteriana con aplicaciones potenciales en campos como la ingeniería de tejidos, la fabricación de materiales compuestos biodegradables, y la industria del embalaje. La

investigación futura deberá enfocarse en la optimización de parámetros de proceso no explorados, la escalabilidad del método, y la exploración de aplicaciones funcionales de la celulosa bacteriana extraída, abriendo nuevos horizontes en la biotecnología aplicada y la ingeniería de materiales.

5.2. Recomendaciones

En correspondencia con los resultados obtenidos en la presente investigación al extraer celulosa bacteriana a partir de residuos forestales mediante la acción de *Bacillus subtilis*, se plantean las siguientes recomendaciones:

Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y estructurales de la celulosa bacteriana obtenida, incluyendo contenido de humedad, solubilidad en agua y solventes orgánicos, grado de polimerización, resistencia mecánica, entre otros parámetros relevantes. Lo anterior permitirá identificar aplicaciones potenciales del material.

Evaluar experimentalmente el desempeño de la celulosa bacteriana extraída en posibles aplicaciones como refuerzo de papel, cartón y compuestos, soporte para inmovilización de enzimas y células, sustrato para impresión 3D, liberación controlada de fármacos y el empaque de alimentos.

Optimizar las variables de tamaño de partícula de la biomasa forestal empleada y tiempo de pretratamiento alcalino, buscando maximizar la digestibilidad del material lignocelulósico y con ello los rendimientos de extracción de celulosa.

Escalamiento del proceso biotecnológico a nivel piloto empleando biorreactores con el fin de evaluar la viabilidad técnico-económica de implementación a escala industrial.

Bibliografía

- Alcaraz, E., Nitiu, D., & Mallo, A. (2022). Caracterización de fibras vegetales en papeles usados en restauración: Abacá y Papel Japón. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 57(1), 91–100. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722022000100091&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Allaica., J. C. M. (2018). La ecología industrial y la economía circular. Retos actuales al desarrollo de industrias básicas en el Ecuador. *Dilemas Contemporáneos: Educación, Política y Valores*. <https://dilemascontemporaneoseducacionpoliticayvalores.com/index.php/dilemas/article/view/44>
- Amaral, H. R., Cipriano, D. F., Santos, M. S., Schettino, M. A., Ferreti, J. V. T., Meirelles, C. S., Pereira, V. S., Cunha, A. G., Emmerich, F. G., & Freitas, J. C. C. (2019). Production of high-purity cellulose, cellulose acetate and cellulose-silica composite from babassu coconut shells. *Carbohydrate Polymers*, 210, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.061>
- Anchundía Cedeño, V. J., & Santana Toapante, J. D. (2023). *Extracción de Celulosa Por El Método De Santanocito A Partir Del Bagazo De Cebada De La Industria Cervecera Para Elaboración De Papel Biodegradable*. 31–41.
- Andrea, Y., Tapias, R., Victoria, M., Monte, D., Delgado, J. F., Peltzer, M. A., & Salvay, A. G. (2022). Celulosa bacteriana de kombucha: producción, caracterización y obtención de películas naturales y procesadas. *IV Workshop de Polímeros Biodegradables y Biocompuestos*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/189249>
- Arias, J. M. (2019). *Cuantificación del volumen de percolación de lixiviados mediante el balance de humedad de los residuos sólidos*. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/106046>
- Ayala-Mendivil, N., Sandoval, G., Ayala-Mendivil, N., & Sandoval, G. (2018). Bioenergía a partir de residuos forestales y de madera. *Madera y Bosques*, 24(SPE). <https://doi.org/10.21829/MYB.2018.2401877>
- Azeredo, H. M. C., Barud, H., Farinas, C. S., Vasconcellos, V. M., & Claro, A. M. (2019). Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging

- Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2019.00007>
- Basuki, K. (2019). Cellulose and Cellulose Derivates. In *ISSN 2502-3632 (Online) ISSN 2356-0304 (Paper) Jurnal Online Internasional & Nasional Vol. 7 No.1, Januari – Juni 2019 Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta (Vol. 3)*. www.journal.uta45jakarta.ac.id
- Bautista-Ortega, P. I., Hernández-Hernández, I., Pérez-Pérez, R., Soria-Leal, S.-L. L. Y., & Chávez-Avilés, M. N. (2022). Modulación diferencial de la actividad enzimática lítica de la pared celular entre *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* durante el biocontrol de *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 6(6), 732–768. https://doi.org/10.37811/CL_RCM.V6I6.3568
- Carrasco, B., Torres, R., Moreno-Del Álamo, M., Ramos, C., Ayora, S., & Alonso, J. C. (2023). Processing of stalled replication forks in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAD065>
- Corredor, Y. A. V., & Pérez, L. I. P. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 1(1), 59–72. <https://doi.org/10.18359/RFCB.3108>
- Dávila Jiménez, M. J., Granja Salazar, M. P., López Peña, M. J., Zambrano Suárez, V. S., & Erazo Morocho, E. A. (2022). Elaboración de hidrogeles para la remoción de residuos de agua a base de celulosa extraída del residuo de frutas. *Tierra Infinita*, 8(1), 158–163. <https://doi.org/10.32645/26028131.1160>
- Del Pilar Casas-Martínez, Y., Tatiana Fuquen-Fúquene, L., Lorena Ramírez-Torres, D., & Marcela Gómez-Rodríguez, A. (2022). Avances en Biotecnología Ambiental. *I3+*, 4(2). <https://doi.org/10.24267/23462329.939>
- Díaz García, K. E. (2020). *Cuantificación de las emisiones de gases efecto invernadero producto de incendios forestales utilizando métodos indirectos*.
- Emenike, E. C., Iwuzor, K. O., Saliu, O. D., Ramontja, J., & Adeniyi, A. G. (2023). Advances in the extraction, classification, modification, emerging and advanced applications of crystalline cellulose: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 6, 100337. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100337>
- Encinas, F. C., Barrio, M. D. H., Rodriguez, D. D., & Leal, A. U. (2018). Procesos

- Termoquímicos: Alternativa Sostenible De Valorización De Residuos. *DYNA (Bilbao)*, 14–14. <https://recyt.fecyt.es/index.php/DY/article/view/62574>
- España Espinoza, J. M., & España Espinoza, J. M. (2020). Las fibras vegetales: materiales ancestrales para un futuro sostenible en el desarrollo de productos. *Cuadernos Del Centro de Estudios En Diseño y Comunicación. Ensayos*, 87, 212–228. <https://doi.org/10.18682/CDC.VI87.3767>
- Fei, P., Liao, L., Cheng, B., & Song, J. (2017). Quantitative analysis of cellulose acetate with a high degree of substitution by FTIR and its application. *Analytical Methods*, 9(43), 6194–6201. <https://doi.org/10.1039/c7ay02165h>
- 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>
- Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C. R., Allende, R., Balderas, K., Patiño, M., Trejo, M., Wong, M. A., Rayo, E., Isauro, D., & Jurado, C. (2020). Vicisitudes de la transferencia tecnológica en México: arenas epistémicas, coproducción y uso social de la bacteria *Bacillus subtilis*. *Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad - CTS*, 15(45), 131–161. <https://doi.org/10.2225/VOL16-ISSUE3-FULLTEXT-6>
- González Cedeño, G. C. (2019). *Plan de gestión de desechos en Planta de Procesamiento y Producción de Harina de Pescado y Camarón, Posorja-Guayas*. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/39600>
- González, J. E., Ledesma, R. D., & Abreu Naranjo, R. (2023). Energía Limpia Evaluación de residuos forestales de especies potenciales para la obtención del carbono como energía limpia de la Amazonia Ecuatoriana. *Enfoque UTE*. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.889>
- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Angel Anducho-Reyes, M., Mercado-Flores, Y., Moreno, P., & La Reforma, C. (2022). *Bacillus subtilis y Trichoderma: Características generales y su aplicación en la agricultura*. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Heredia, J., Sanchez, E., & Castel, B. (2023). Evaluación de microorganismos y sustratos obtenidos a partir de residuos orgánicos para la producción de celulasas. *Biología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 21(2), 50–

61. <https://doi.org/10.18684/RBSAA.V21.N2.2023.2165>
- Horue, M. (2020). *Desarrollo y optimización de los procesos biotecnológicos de producción de celulosa bacteriana para potencial tratamiento de afecciones dérmicas*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/114268>
- Ibarra Islas, A. (2019). *Aprovechamiento de residuos agroforestales en el cultivo de hongos Basidiomicetos*. <http://www.repositorio.unadmexico.mx:8080/xmlui/handle/123456789/192>
- Ko, C. H., Yang, B. Y., Lin, L. D., Chang, F. C., & Chen, W. H. (2020). Impact of pretreatment methods on production of bioethanol and nanocrystalline cellulose. *Journal of Cleaner Production*, 254, 119914. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.119914>
- Loiola, P. L., Klitzke, R. J., da Rocha, M. P., & Vidaurre, G. B. (2021). FT-IR analysis of Eucalyptus grandis and Pinus caribaea var. hondurensis biomass. *Floresta*, 51(2), 354–362. <https://doi.org/10.5380/RF.V51I2.68955>
- Lotfy, V. F., Basta, A. H., Abdel-Monem, M. O., & Abdel-Hamed, G. Z. (2021). Utilization of bacteria in rotten Guava for production of bacterial cellulose from isolated and protein waste. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2(March), 100076. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100076>
- Lugo, J. A. F., García, A. L. F., Portillo, M. D. T., Mascareño, M. F. Á., García, K. P. C., Vidales, A. D. M., Cota, F. I. P., & Villalobos, S. de los S. (2022). Celulosa bacteriana producida por *Gluconacetobacter xylinus*: una alternativa sostenible para la tala de árboles en la industria papelera. *Investigaciones y Estudios - UNA*, 13(2), 59–75. <https://doi.org/10.47133/IEUNA22206b>
- Manzano Vela, D. R., & Novillo Logroño, F. A. (2022). Preparation and Characterization of Cellulose Acetate and Cellulose Nitrate Prepared from Cellulose Extracted from *Calamagrostis intermedia*. *Asian Journal of Chemistry*, 34(8), 2099–2104. <https://doi.org/10.14233/AJCHEM.2022.23862>
- Manzano Vela, D. R., Zabala Vizuete, R. F., & Flores Mancheno, A. C. (2023). Implications of Particle Size in the Extraction of Cellulose from the *Calamagrostis intermedia* Species. *Bionatura*, 8(3). <https://doi.org/10.21931/RB/2023.08.03.57>
- Mardawati, E., Rahmah, D. M., Rachmadona, N., Saharina, E., Pertiwi, T. Y. R., Zahrad, S. A., Ramdhani, W., Srikandace, Y., Ratnaningrum, D., Endah, E. S., Andriani, D., Khoo, K. S., Pasaribu, K. M., Satoto, R., & Karina, M. (2023).

- Pineapple core from the canning industrial waste for bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus*. *Heliyon*, 9(11), e22010. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22010>
- Maribel, E., Guasgua, C., Alexandra, K., Chinche, A., Rashel, A., Naranjo, S., Fernando, B., Merino, N., Rodrigo, C., & Pilco, J. (2021). TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE CELULOSA EN RESIDUOS AGROINDUSTRIALES. *Revista Pertinencia Académica*. ISSN 2588-1019, 5(3), 93–104. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5739370>
- Martínez, J. (2022). El régimen jurídico forestal sostenible: residuos forestales, biomasa y bioeconomía. *Revista Catalana de Dret Ambiental*, 13(2), 1–40. <https://doi.org/10.17345/rcda3314>
- Martínez Rivera, A. (2018). *Biorremediación bacteriana de suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación mediante diferentes métodos*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/63429>
- Martínez Vergara, M., & Mercadal Guillén, J. (2020). Celulosa bacteriana biodegradable. *Revista de Plásticos Modernos: Ciencia y Tecnología de Polímeros*, ISSN 0034-8708, Vol. 119, Nº. 757, 2020 (Ejemplar Dedicado a: Polímeros Naturales y de Fuentes Renovables), 119(757), 5. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7489915&info=resumen&idioma=SPA>
- Miranda Altamirano, A. (2020). Uso de apósitos en quemaduras. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, 46, 31–38. <https://doi.org/10.4321/S0376-78922020000200008>
- Mohammadkazemi, F., Azin, M., & Ashori, A. (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydrate Polymers*, 117, 518–523. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.10.008>
- Nguyen Ngo, T. T., Phan, T. H., Thong Le, T. M., Tu Le, T. N., Huynh, Q., Trang Phan, T. P., Hoang, M., Vo, T. P., & Nguyen, D. Q. (2023). Producing bacterial cellulose from industrial recycling paper waste sludge. *Heliyon*, 9(7), e17663. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17663>
- Pacheco, J. L. C., Yee, S. K. M., Pacheco, J. L. C., Zentella, M. L. C., & Marvan, J. E. E. (2004). Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinum*: Biosíntesis y aplicaciones. *Revista Especializada En Ciencias Químico - Biológicas* 7(1):18-

25. <http://repositorio.pediatrica.gob.mx:8180/handle/20.500.12103/3137>
- Robles Montoya, R. I., Chaparro Encinas, L. A., Parra Cota, F. I., Santos Villalobos, S. de los, Robles Montoya, R. I., Chaparro Encinas, L. A., Parra Cota, F. I., & Santos Villalobos, S. de los. (2020). Mejorando rasgos biométricos de plántulas de trigo con la inoculación de un consorcio nativo de *Bacillus*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(1), 229–235. <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V11I1.2162>
- Said Azmi, S. N. N., Samsu, Z. 'Asyiqin, Mohd Asnawi, A. S. F., Ariffin, H., & Syed Abdullah, S. S. (2023). The production and characterization of bacterial cellulose pellicles obtained from oil palm frond juice and their conversion to nanofibrillated cellulose. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 5(February), 100327. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100327>
- Santos, A., & Samudio, A. (2020). EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE *Bacillus subtilis* EN EL pH, ALUMINIO INTERCAMBIABLE Y DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO EN UN ULTISOL. *Revista Investigaciones Agropecuarias*, 2(2), 15–30. <https://doi.org/10.48204/J.IA.V2N2A2>
- Serrano Cardona, C. M. (2020). *Estudio y caracterización de los polifenoles provenientes de los residuos de la exploración forestal del nogal*. <http://hdl.handle.net/10459.1/71314>
- Singh, A., Ranawat, B., & Meena, R. (2019). Extraction and characterization of cellulose from halophytes: next generation source of cellulose fibre. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1160-6>
- Supo, J. (2014). *Cómo elegir una muestra* (BIOESTADISTICO EIRL, Ed.; 1st ed.). Biblioteca Nacional del Perú.
- TAPPI. (1999). Alpha- , beta- and gamma-cellulose in pulp. In *Test Methods T 203 cm-99*. Atlanta: Technical Association of the Pulp and Paper Industry.
- TAPPI. (2002). Forming handsheets for physical tests of pulp. Test Method TAPPI/ANSI T 205. *Tappi*, 1–9.
- TAPPI. (2012). Solvent extractives of wood and pulp T 204 cm-97. In *Chemical Properties RELATED*. <https://doi.org/10.5772/916>
- Tuya Salas, J., Gutiérrez Moreno, S., Merino Rafael, F., Tuya Salas, J., Gutiérrez Moreno, S., & Merino Rafael, F. (2021). Ensayos preliminares para producción de celulosa por bacterias aisladas de caña de azúcar. *Revista de La Sociedad*

- Química Del Perú*, 87(2), 128–136. <https://doi.org/10.37761/RSQP.V87I2.339>
- UNE-EN ISO 14780:2018, Pub. L. No. 14780, UNE-EN ISO 14780:2018 Biocombustibles sólidos. Preparación de muestras. 1 (2018). <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0060316>
- Valera González, E., Donohué Cornejo, A., García Calderón, A. G., Osornio Rojas, J. L., Guzmán Gastelum, D. A., Cuevas González, J. C., Espinosa Cristóbal, L. F., González Calderón, R. E., Peralta Estrada, R., & Tovar Carrillo, K. L. (2021). Elaboración de matrices de celulosa con propiedades antimicrobianas para su aplicación en periodoncia. *Revista Mexicana de Periodontología*, 12(1–3), 7–11. <https://doi.org/10.35366/102953>
- Vargas-García, Y., Pazmiño-Sánchez, J., Dávila-Rincón, J., Vargas-García, Y., Pazmiño-Sánchez, J., & Dávila-Rincón, J. (2021). Potencial de Biomasa en América del Sur para la Producción de Bioplásticos. Una Revisión. *Revista Politécnica*, 48(2), 7–20. <https://doi.org/10.33333/RP.VOL48N2.01>
- Vázquez, M., Velazquez, G., & Cazón, P. (2021). Películas con protección UV de celulosa bacteriana, glicerol y quitosano. Parte 2: Estructura, permeabilidad al vapor de agua, propiedades espectrales y térmicas. *CYTA - Journal of Food*, 19(1), 115–126. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1870565>
- Vidales-Carrillo, H. (2019). *Métodos de extracción de nanocelulosa a partir de residuos de Agave spp.* 28–34.
- Villela-Suárez, J. M., Aguirre-Calderón, O. A., Treviño-Garza, E. J., Vargas-Larreta, B., Villela-Suárez, J. M., Aguirre-Calderón, O. A., Treviño-Garza, E. J., & Vargas-Larreta, B. (2018). Disponibilidad de residuos forestales y su potencial para la generación de energía en los bosques templados de El Salto, Durango. *Madera y Bosques*, 24(3). <https://doi.org/10.21829/MYB.2018.2431529>
- Wu, J. H., & He, C. Y. (2019). Advances in Cellulose-Based Sorbents for Extraction of Pollutants in Environmental Samples. In *Chromatographia* (Vol. 82, Issue 8, pp. 1151–1169). Friedr. Vieweg und Sohn Verlags GmbH. <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03708-x>
- Yáñez-Iñiguez, L., Urgilés-Urgilés, E., Zalamea-León, E., & Barragán-Escandón, A. (2020). Potencial de los residuos forestales para la contribución a la matriz energética urbana. *La Granja*, 32(2), 42–53. <https://doi.org/10.17163/lgr.n32.2020.04>

Yomara, Y., & Sánchez, J. (2021). APLICACIÓN DE LA CELULOSA BACTERIANA EN EL DISEÑO DE PRODUCTOS: UN CAMINO A LA SUSTENTABILIDAD. *DISEÑO ARTE Y ARQUITECTURA*, 11(11), 41–57.

<https://doi.org/10.33324/DAYA.VI11.458>

Zambrano, G., Cedeño, C., Garcia, V., & Ulbio, A. (2021). Aprovechamiento de la cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) para la obtención de fibras de celulosa Use of rice husk (*Oryza sativa*) for the production of cellulose fibres Uso de casca de arroz (*Oryza sativa*) para obtenção de fibras de celulose *Cienciasde nat. Polo Del Conocimiento*, 6(4), 415–437. <https://doi.org/10.23857/pc.v6i4.2572>

Anexos

a.- Localización espacial estación experimental tunshi.



b.- Parcelas de recolección de residuos



c.- Recolección de residuos de Poda





d.- Pesaje residuos forestales



e- Pretratamiento residuos forestales



f.- Películas de celulosa bacteriana obtenidas



g. ficha técnica del inoculo *Bacillus subtilis*

LABORATORIO MCP		
FICHA TÉCNICA		
Nombre Comercial	Bacillus subtilis	
Descripción	<i>Bacillus subtilis</i>	
Propiedades fisicoquímicas	Olor	Suigéneris
	Estado	Líquido
	Color	Amarillento - beige
	pH	7
Control de calidad biológico	Concentración	≥ 1x10 ⁸ unidades formadoras de colonias
	Pureza	≥ 95%
	Viabilidad	≥ 95%
Mecanismos de acción	Bacillus subtilis provee un control efectivo de enfermedades causadas por hongos y bacterias. El compuesto bioquímico presente en este producto combate los agentes patógenos por su modo de acción. Posee alto espectro de acción. Aplicación foliar y radicular. <ul style="list-style-type: none"> • Prevención de enfermedades causadas por hongos y bacterias • Producto no tóxico para insectos benéficos • Este producto es usado como tratamiento en el control de un amplio espectro de patógenos de las plántulas que causan el mal de la pudrición de la raíz • Los organismos antagonísticos crecen y se multiplican alrededor del área de la raíz de los cultivos, ellos compiten con los patógenos que atacan las nuevas raíces emergentes y en consecuencia reducen el riesgo de infestación 	
Objetivos biológicos	Acción fungicida y bactericida de amplio espectro: Pudrición sureña, Sclerotium rolfsii, Mildew, Mancha púrpura, Roya de la hoja, Puccinia Porri, Alternaria porri, Pudrición coronaria de la raíz, Peronospora destructor, Tizón bacteriano, Antracnosis, Colletotrichum spp, Erwinia, Cenicillas, Oidium, Erisyphe, Sphaerotheca macularis, Alternaria solanii, Phytophthora, Moho blanco entre otros	
Dosis y aplicación	Foliar o Suelo: El líquido se disuelve 1 L en 100-200 L de agua para 1 hectárea. / Semillas: 1 l para 15-20 kg de semilla / Plántulas: 250 ml en 2,5 litros. Frecuencia recomendada: Cada 8-15 días para rápida colonización. Más información consultar con el técnico responsable Debido a que se trata de un organismo vivo, es necesario que exista un mínimo de materia orgánica en el suelo, si esta se encuentra baja, se recomienda repetir al menos una vez	
Formas de aplicación	Vía	Líquida
	Recomendación	Las aplicaciones siguientes se deben realizar a partir de la primera, a ritmo regular, en dependencia siempre de la velocidad de desarrollo del cultivo (aparición de nuevas áreas no protegidas) y de las condiciones ambientales existentes Agite bien el producto antes de su uso. Es recomendable su aplicación a una temperatura óptima mayor a los 20°C con una Humedad Relativa entre el 70-80%
Estabilidad	El producto permanece estable durante 90 días bajo condiciones de refrigeración, almacenamiento y manejo establecidos	
Compatibilidad	El producto no es compatible con fertilizantes, fungicidas o plaguicidas químicos. El producto puede ser aplicado con otros productos biológicos y abonos orgánicos, siempre en cuando el pH sea entre 5-7 para hongos y 6-7 para bacterias.	
Aviso al comprador	El fabricante garantiza la composición y calidad del producto. No se responsabiliza por el uso imprudente, excesivo o indebido por parte del consumidor	
Categoría toxicológica	IV (Franja verde)	
Se prohíbe la reproducción parcial o total de este documento. Derechos Reservados Laboratorio MCP Ecuador		
PÁGINA WEB: www.microbiolabecuador.com EMAIL: microbiolabecuador@gmail.com CELULAR: +593 995 612 043		
CONTACTOS Microbióloga María Esther Cortez Pazmiño No Registro 1027-12-1174412		
Edición 04		
Fecha actualización diciembre 2018		

UNEMI
UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

