

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
02 de enero de 2020 (02.01.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2020/002737 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
C08B 15/08 (2006.01)

SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2019/070448

Publicada:
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(22) Fecha de presentación internacional:
27 de junio de 2019 (27.06.2019)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201830650 29 de junio de 2018 (29.06.2018) ES

(71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; Serrano, 117, 28006 MADRID (ES).

(72) Inventores: **BENITO GONZÁLEZ, Isaac**; Carrer del Catedrático Agustín, Escardino Benlloch, 7, 46980 Paterna (Valencia) (ES). **MARTÍNEZ SANZ, Marta**; Carrer del Catedrático Agustín, Escardino Benlloch, 7, 46980 Paterna (Valencia) (ES). **LÓPEZ RUBIO, Amparo**; Carrer del Catedrático Agustín, Escardino Benlloch, 7, 46980 Paterna (Valencia) (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta Rubén Darío, 4, 28010 MADRID (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING NANOCRYSTALS FROM LIGNOCELLULOSIC BIOMASS BY MEANS OF ACID TREATMENT

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA OBTENER NANOCRISTALES MEDIANTE TRATAMIENTO ÁCIDO A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

(57) Abstract: The present invention relates to a method for obtaining nanocrystals from lignocellulosic biomass, in particular from the residue of leaves of the marine plant Posidonia oceanica, which accumulate on beaches and coasts. The invention also relates to the nanocrystals obtained using the method and to their use.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de nanocristales a partir de biomasa lignocelulósica, particularmente del residuo de las hojas de la planta marina Posidonia oceanica que se acumulan en las playas y costas. Asimismo, la presente invención se refiere a los nanocristales obtenidos por dicho procedimiento y su uso.



WO 2020/002737 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA OBTENER NANOCRISTALES MEDIANTE TRATAMIENTO ÁCIDO A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

5

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de nanocristales mediante tratamiento ácido a partir de biomasa lignocelulósica, particularmente del residuo de las hojas de la planta marina Posidonia oceanica que se acumulan en las playas y costas. Asimismo, la presente invención se refiere a los nanocristales obtenidos por dicho procedimiento y su uso.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Numerosas plantas marinas se han utilizado históricamente como fuentes primarias de estructuras celulósicas debido al alto contenido en ellas al ser el principal componente estructural de tallos y hojas. Estos materiales son de gran utilidad en la industria del envasado por sus propiedades mecánicas, de permeabilidad y transparencia, cobrando especial relevancia en los últimos años al ser obtenidos a través de fuentes renovables, ahorrando así toda la problemática relativa a los plásticos.

20

En el caso de las hojas de Posidonia oceanica, se ha reportado un contenido de celulosa total de ~30%, obteniéndose un rendimiento de extracción aproximado al 28% (Bettaieb et al., Industrial Crops and Products 2015, 72, 175-182).

25

El proceso de purificación de celulosa a través de fuentes de biomasa más extendido está recogido por varios autores (Abe, Iwamoto and Yano Biomacromolecules, 2007, 8(10), 3276-3278; Martínez-Sanz, Vicente, Gontard, Lopez-Rubio and Lagaron, Cellulose 2015, 22(1), 535-551; Sun, Sun, Zhao and Sun Polymer Degradation and Stability 2004, , 84(2), 331-339), y resumidamente consiste en:

30

- Una etapa inicial de lavado con disolventes orgánicos (tolueno:etanol) durante 24 h en un sistema Soxhlet para eliminar los pigmentos, ácidos grasos y ceras.
- Un tratamiento ácido con NaClO₂ al 1,4% (pH=3) durante 5 h a 70° C.
- Un tratamiento básico con KOH al 5,0% durante 24 h en agitación a temperatura ambiente, más 2 h a 90°C.

35

La celulosa obtenida se trata con ácido sulfúrico (30% v/v) durante 1 h y media, obteniendo así los nanocristales convencionales con un rendimiento del 12%.

5 Por otra parte, son también conocidos nanocristales de alta pureza obtenidos a partir de celulosa bacteriana (BCNW) (Martínez-Sanz, Lopez-Rubio and Lagaron, Carbohydrate 2013 Polymers, 98(1), 1072-1082).

10 Como referencias a otras patentes ya publicadas, la patente US9896342 describe la obtención de nanoestructuras a partir de desechos agrícolas de hojas de Phoenix dactylifera mediante suspensión acuosa y calentamiento en autoclave por 2 horas a 180°C y un segundo calentamiento a 170°C durante 4 horas en condiciones básicas. El sólido resultante es blanqueado durante 90 minutos y tratado con ácido sulfúrico al 45% y 45°C durante 25 minutos. Posteriormente se mantiene a -80°C durante 1 hora, se lava con agua destilada y tras un tratamiento final de ultrasonidos de 10 minutos se
15 obtienen las nanoestructuras.

La patente KR20170113257A describe la obtención de nanocristales sin necesidad de usar ácido sulfúrico, con radiación ultravioleta.

20 La patente US2018016355A1 describe un método de obtención de nanocristales usando disolventes orgánicos y un fuerte tratamiento mecánico.

Por último, en la patente US2017260692A1 se recoge un tratamiento de agua caliente en un rango de 150-250°C para obtener nanocristales a partir de residuos de madera.
25

Por tanto, sería deseable disponer de un procedimiento de obtención de nanocristales con un rendimiento mayor que el descrito hasta la fecha, en un tiempo menor y sin la necesidad de emplear disolventes orgánicos potencialmente perjudiciales para el medioambiente.

30 Asimismo, sería deseable disponer de nanocristales que diesen lugar a films o películas con propiedades mecánicas mejoradas o con una mejor transparencia o permeabilidad al agua.

35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de nanocristales mediante tratamiento ácido a partir de biomasa lignocelulósica, preferiblemente procedente de las hojas de *Posidonia oceanica*, con un contenido de lignina de entre el 5 y el 40%, que comprende las etapas de:

- (a) tratamiento de la biomasa lignocelulósica con NaClO_2 a una concentración de entre el 0,5% y el 3%, preferiblemente del 1,4%, a un pH de entre 2,5 y 3,5, preferiblemente a un pH de 3, a una temperatura entre 65 y 75°C, preferentemente a 70 °C, para obtener holocelulosa (definida como una mezcla de celulosa y hemicelulosas); y
- (b) tratamiento ácido de la holocelulosa obtenida en la etapa (a) con un ácido fuerte (definido como un ácido que se disocia casi por completo en solución acuosa para ganar electrones) de una concentración de entre el 20 y 70%, preferiblemente ácido sulfúrico al 30% (v/v), y a una temperatura de entre 40 y 60 °C, preferiblemente a 50°C.

Así pues, el procedimiento de la presente invención evita tanto el primer paso de tratamiento con disolventes orgánicos (previo a la etapa (a)) como el posterior tratamiento básico de la biomasa (previo a la etapa (b)), pasando el proceso de constar de cuatro etapas (método tradicional) a un proceso de dos etapas (método de la invención).

En otra realización la invención se refiere a un procedimiento de obtención de nanocristales mediante tratamiento ácido a partir de biomasa lignocelulósica con un contenido de lignina de entre el 5 y el 40%, que comprende las etapas de:

- (a) tratamiento de la biomasa lignocelulósica con NaClO_2 a una concentración de entre el 0,5% y el 3%, preferiblemente del 1,4% para obtener holocelulosa (definida como una mezcla de celulosa y hemicelulosas), a un pH de entre 2,5 y 3,5, preferiblemente a un pH de 3, a una temperatura entre 65 y 75°C, preferentemente a 70 °C; y
- (b) tratamiento ácido de la holocelulosa obtenida en la etapa (a) con un ácido fuerte de una concentración de entre el 20 y 70%, preferiblemente ácido sulfúrico al 30% (v/v) y a una temperatura de entre 40 y 60 °C, preferiblemente a 50°C.

caracterizado porque:

no se lleva a cabo un tratamiento con disolventes orgánicos previo a la etapa (a); y

no se lleva a cabo un tratamiento básico posterior a la etapa (a) y previo a la etapa (b).

- 5 A lo largo de la invención, el material resultante de la etapa (a), es decir, la holocelulosa (hemicelulosas + celulosa) es nombrado como F2A. Y el material resultante de la etapa (b), es decir, los nanocristales es nombrado como NANO F2A.

- 10 A lo largo de la invención el término “ácido fuerte” se refiere a un ácido que se disocia casi por completo en solución acuosa para ganar electrones. Ejemplos incluyen, entre otros, ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorhídrico (HCl), y ácido nítrico (HNO_3).

- En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente donde en la etapa (a), se utiliza un ácido seleccionado de entre ácido acético, ácido
15 fosfórico, ácido nítrico, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, para mantener el pH entre 2,5 y 3,5, y preferiblemente es el ácido acético y el pH es de 3.

- En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, donde el ácido fuerte de la etapa (b) se selecciona entre ácido sulfúrico, ácido nítrico y
20 ácido clorhídrico, y preferiblemente donde en la etapa (b) el ácido fuerte es H_2SO_4 a una concentración de entre el 20 y 50%, y preferiblemente a una concentración del 30%.

- En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, que
25 además comprende una etapa (a1), intermedia a la etapa (a) y la etapa (b), en la que se lleva a cabo una centrifugación a una temperatura de entre 10 y 30 °C.

- Esta centrifugación de la etapa (a1) se lleva a cabo para separar la biomasa
lignocelulósica tratada de la disolución de NaClO_2 .

- 30 En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, que además comprende una etapa (a2), posterior a la etapa (a1), en la que se lleva a cabo un lavado de la biomasa lignocelulósica centrifugada obtenida en (a1) utilizando agua destilada hasta alcanzar pH neutro.

- 35

En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, que además comprende una etapa (c), posterior a la etapa (b), en la que se lleva a cabo la centrifugación a una temperatura de entre 15 y 30 °C, preferiblemente a 15 °C.

- 5 La centrifugación de la etapa (c) se lleva a cabo para separar los nanocristales del disolvente.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, donde la centrifugación de la etapa (c) se lleva a cabo al menos a 10000 rpm, preferiblemente a 12500 rpm, y durante al menos 10 minutos, preferiblemente durante 20 minutos.

En otra realización la invención se refiere a procedimiento definido anteriormente que además comprende una etapa (d), posterior a la etapa (c), de re-dispersión de los nanocristales obtenidos de la etapa (c), y preferiblemente en agua destilada de la etapa (c).

En la etapa (d) el precipitado se re-dispersa en agua destilada.

- 20 En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, donde se lleva a cabo una segunda etapa (c) (etapa (c')) y una segunda etapa (d) (etapa (d')), consecutivas y posteriores a la etapa (d).

La etapa (d') se realiza tras la etapa (c') de centrifugación.

25 El material obtenido tras llevar a cabo la etapa (d) o la etapa (d) y (d') es neutralizado con NaOH en agitación y, mediante una última centrifugación (etapa (e)), se separan los nanocristales obtenidos en forma de precipitado parcialmente hidratado.

- 30 En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, que además comprende una etapa (e), posterior a la etapa (d) o (d'), de neutralización de los nanocristales mediante tratamiento con NaOH y posterior centrifugación.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, donde el ratio biomasa/disolución ácida de NaClO₂ de la etapa (a) es de entre 0,8 a

1,2 g por cada 100 ml de disolución, preferentemente 1g por cada 100 ml de disolución.

5 En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, donde el ratio biomasa lignocelulósica/disolución de ácido sulfúrico es de entre 10 y 15g de materia seca por cada 1000ml, y preferiblemente de 15g de materia seca por cada 1000ml.

10 En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, que además comprende un tratamiento previo a la etapa (a) de limpieza de la biomasa lignocelulósica, y preferiblemente con agua.

15 El tratamiento de limpieza previo a la etapa (a) del procedimiento descrito anteriormente se lleva a cabo lavando la biomasa lignocelulósica, preferentemente hojas de Posidonia oceánica, con agua para eliminar los restos de arena y sales, y posteriormente secándolas en estufa y moliéndolas.

20 En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, que además comprende un tratamiento de secado posterior a la etapa de limpieza previa a la etapa (a) de la biomasa lignocelulósica a una temperatura de entre 50 y 70 °C hasta la eliminación completa del agua.

25 En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde la biomasa lignocelulósica procede de las hojas de Posidonia oceanica.

En otra realización la presente invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde las hojas de Posidonia oceanica están molidas.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a los nanocristales obtenidos por el procedimiento descrito anteriormente.

Los nanocristales obtenidos se pueden utilizar para fabricar films, nanorefuerzos y distintos tipos de geles, así como, por ejemplo, vehículos de liberación de compuestos en aplicaciones principalmente biomédicas.

En la presente invención “film” se refiere a películas continuas del material puro o combinado con otros materiales poliméricos o biopoliméricos (tales como el ácido poliláctico) que pueden servir para desarrollar estructuras de envasado o transporte, así como materiales para ingeniería de tejidos o incluso para aplicaciones electrónicas.

5 Ejemplos incluyen, entre otros, el desarrollo de películas para el envasado de alimentos, papeles conductores, sistemas de almacenamiento de energía, o materiales para favorecer el crecimiento de tejidos celulares (Grishkewich, Mohammed, Tang and Tam, Current Opinion in Colloid & Interface Science, 29, 32-45).

10 El término “nanorefuerzo” se refiere a aditivos de tamaño nanométrico que, al incorporarse en matrices poliméricas o biopoliméricas, mejoran sus propiedades (en concreto suelen tener un impacto positivo en la estabilidad térmica, propiedades mecánicas y propiedades de barrera a gases y vapores). Ejemplos incluyen entre otros la incorporación de los nanocristales en matrices de almidón para aumentar su rigidez
15 y resistencia mecánica, así como aumentar la barrera a vapor de agua.

El término “geles” se refiere a un sistema coloidal donde la fase continua es sólida y la dispersa es líquida o gaseosa. Aunque su estructura se asemeja a la de un sólido, su comportamiento es completamente diferente. Dependiendo de la fase dispersa, los
20 geles se dividen en hidrogeles (agua), organogeles u oleogeles (disolvente orgánico o aceite) y aerogeles o xerogeles (aire). Como ejemplo, los aerogeles son estructuras de porosidad muy elevada (>95%) que son capaces de sorber grandes cantidades de distintos líquidos como agua o aceite, así como de liberarlos al cambiar las condiciones del medio recuperando así su estructura inicial. Se ha visto que aerogeles
25 formados a partir de celulosa o nanocelulosa son capaces de sorber y liberar grandes cantidades de agua (>500%) y, por tanto, han sido utilizados para tratamiento de aguas debido a sus altas capacidades de absorción, adsorción y floculación.

Además los nanocristales de celulosa son útiles para liberación controlada de
30 medicamentos, así como encapsulación de éstos (por la excelente estabilidad coloidal de los nanocristales), o como biosensores, al ser capaces de ser internalizados por una célula.

Así pues, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los nanocristales
35 para fabricar films, nanorefuerzos, geles, cápsulas para medicamentos y biosensores,

preferiblemente para fabricar films, nanorefuerzos, geles, y más preferiblemente films.

Otro aspecto de la invención se refiere a un film, un nanorefuerzo, un gel, una cápsula para medicamento o un biosensor, y preferiblemente un film, un nanorefuerzo o un gel
5 que comprendan un nanocristal obtenido por el procedimiento descrito anteriormente.

Así pues, la presente invención proporciona un procedimiento de obtención de nanocristales a través de biomasa lignocelulósica, preferentemente del residuo de hojas de Posidonia oceanica respetuoso con el medio ambiente al eliminar los
10 disolventes orgánicos (tales como el tolueno y el etanol) y evitar el tratamiento básico posterior reduciendo, por tanto, el número de etapas necesarias para la obtención de estos materiales.

Los nanocristales obtenidos presentan unas excelentes propiedades mecánicas, de
15 barrera a vapor de agua y de transparencia similar o incluso superior al método convencional, además de aumentar el rendimiento entre un 50% y un 100%.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o
20 pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. Imágenes representativas obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de: **(A)** nanocristales obtenidos mediante el método de la invención (NANO F2A) y **(B)** nanocristales obtenidos por el método convencional (NANO F3).
30

FIGURA 2. Transparencia de los films obtenidos a partir de nanocristales producidos mediante el método convencional (NANO F3) y a través del método de la invención (NANO F2A).
35

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

5

Las siguientes siglas y abreviaturas se han utilizado en los ejemplos:

F2A: holocelulosa (celulosa + hemicelulosas) de la invención

F3: celulosa convencional

10

NANO F2A: nanocristales de la invención

NANO F3: nanocristales convencionales

BCNW: nanocristales de celulosa bacteriana (bacterial cellulose nanowhiskers)

MFC: celulosa microfibrilada (microfibrillated cellulose)

PLA: ácido poliláctico (polylactic acid)

15

TPCS: Almidón de maíz termoplástico (thermoplastic corn starch)

Materiales y métodos

Materias primas

20

El material de desecho de biomasa consistente en hojas de Posidonia oceanica se recolectó directamente en la costa en Calpe, Alicante (España) en Febrero-Marzo de 2017. El material se lavó repetidas veces con agua para eliminar la arena y las sales y se almacenó en la nevera hasta su uso.

25

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Una gota (8 μ L) de una suspensión acuosa al 0,001% de los diferentes nanocristales obtenidos se dejó secar en una rejilla recubierta con carbono (malla 200). Las muestras fueron teñidas con acetato de uranilo. El TEM se realizó utilizando un JEOL 1010 a un voltaje de aceleración de 80 kV.

30

Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

35

La permeabilidad directa al agua se determinó a partir de la pendiente de las curvas de ganancia de peso frente al tiempo a 25°C. Los films se intercalaron entre una parte superior de aluminio (junta tórica abierta) e inferior (depósito para la sílice) de una celda de permeabilidad específicamente diseñada con tornillos de fijación. Se colocó

una junta tórica de caucho Viton entre el film y la parte inferior de la celda para mejorar la capacidad de sellado. Estas celdas de permeabilidad que contienen sílice se colocaron a continuación en una cabina de humedad relativa equilibrada a 75% de HR y 25°C. Las ganancias de peso a través de un área de film de 0,001 m² se monitorizaron y representaron en función del tiempo. Se usaron células con films de aluminio (con un espesor de aproximadamente 11 μm) como muestras de control para estimar la ganancia de peso a través del sellado. Las pruebas se realizaron como mínimo por triplicado.

10 Propiedades ópticas

La transparencia de los films se determinó a través de los espectros de reflectividad superficial en un espectrocolorímetro CM-3600d (Minolta Co., Tokio, Japón) con un área de muestra iluminada de 10 mm. Las mediciones se tomaron por duplicado para cada muestra al usar un fondo blanco y otro negro.

15

La transparencia de los films se evaluó a través de la transmitancia interna (Ti) (0-1, rango teórico) mediante la aplicación de la teoría de Kubelka-Munk para dispersión múltiple a los datos de reflexión. La transmitancia interna (Ti) de los films se cuantificó usando la ecuación (1). En esta ecuación, R₀ es la reflectancia del film sobre un fondo negro ideal. Los parámetros a y b se calcularon mediante las ecuaciones (2) y (3), donde R es la reflectancia de la capa de muestra respaldada por una reflectancia conocida R_g.

20

$$T_i = \sqrt{(a - R_0)^2 - b^2} \quad (1)$$

25

$$a = \frac{1}{2} \left(R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 R_g} \right) \quad (2)$$

$$b = (a^2 - 1)^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

Propiedades mecánicas

Los ensayos de tracción se llevaron a cabo en condiciones ambientales en una máquina Mecmesin MultiTest 1-i (1 kN) (Virginia, EE. UU.) Con el software EmperorTM. Se cortaron especímenes preconditionados de forma rectangular con una longitud de calibre inicial de 8 cm y 1 cm de ancho directamente de los films. Se

30

utilizó una velocidad de cruceta fija de 10 mm / min en todos los casos. El módulo elástico (E), la tensión a rotura (TS) y el alargamiento a la rotura (ϵ_B) se determinaron a partir de las curvas de tensión-deformación, estimadas a partir de los datos de fuerza-distancia obtenidos para los diferentes films. Se tomaron al menos 3 medidas de cada tipo de film para obtener resultados estadísticamente significativos.

Ejemplo 1: Procedimiento de obtención de los nanocristales a partir de Posidonia oceanica

10 Procedimiento de obtención de NANO F2A

Obtención de la fracción holocelulósica (F2A)

Las hojas de Posidonia oceanica cuyo contenido de lignina es de entre el 16% y 20% (Benito-González, I., López-Rubio, A., Martínez-Sanz, M. International Journal of Biological Macromolecules 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.052>) son inicialmente lavadas con agua para eliminar los restos de arena y sales, y posteriormente secadas en estufa y molidas. El polvo resultante se añade a una disolución de NaClO₂ al 1,4% (pH =3) durante 5h a 70°C, en un ratio 1:100 (g Posidonia oceanica/ mL disolución). Posteriormente la muestra se enfría para parar la reacción y se centrifuga a 12500 rpm durante 20 minutos a 4°C con los consiguientes lavados en agua destilada hasta que el pH obtenido sea neutro. El material resultante contiene fundamentalmente holocelulosa, es decir, una mezcla de celulosa y hemicelulosas (fracción F2A).

Obtención de nanocristales de holocelulosa (NANO F2A)

El material obtenido tras el primer tratamiento con NaClO₂ es sometido a un segundo tratamiento ácido con H₂SO₄ al 30% durante 1h y media y a 50°C, con un ratio de 15g (peso seco) / L disolución. Con el objetivo de separar los nanocristales del solvente, se centrifugan a 12500 rpm y 15°C durante 20 minutos. Tras la centrifugación, se elimina el solvente y el precipitado se re-dispersa en agua destilada. Este paso se realiza una segunda vez tras una nueva etapa de centrifugación. El material obtenido (NANO F2A) es neutralizado con NaOH en agitación y, mediante una última centrifugación, se separan los nanocristales, obtenidos en forma de precipitado parcialmente hidratados (80-90% agua) y se almacenan en el refrigerador hasta su posterior uso.

Procedimiento de obtención de NANO F3

Obtención de la fracción celulósica precursora (F3)

- Las hojas de *Posidonia oceanica* se someten a una extracción Soxhlet inicial utilizando una mezcla de tolueno:etanol en un ratio 2:1 durante 24h para eliminar pigmentos y lípidos, seguido de un tratamiento con NaClO_2 al 1,4% durante 5h a 70°C para eliminar la lignina y un tratamiento alcalino final con KOH durante 24h en agitación + 2h a 90°C para eliminar las hemicelulosas (fracción F3).

Obtención de nanocristales de celulosa (NANO F3)

- La fracción celulósica F3 se sumerge en una disolución de H_2SO_4 (30% v / v), con una relación de 1,5 g de fracción seca / 100 ml de H_2SO_4 , a 50°C y se mantiene en agitación durante 1 h y media. Después de eso, el material se somete a varios ciclos de centrifugación y lavado para eliminar el ácido y el pH se ajusta a 7 con NaOH y, mediante una última centrifugación, se separan los nanocristales, obtenidos en forma de precipitado parcialmente hidratados (80-90% agua). El material obtenido (NANO F3) se almacena en el refrigerador hasta su uso posterior.

Ejemplo 2: Propiedades de NANO F2A

- Se evaluó la morfología de los nanocristales (nuevos y convencionales) mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los resultados se recogen en la Figura 1, donde se aprecia claramente que en los nanocristales obtenidos mediante el método de la invención, aparecen impurezas lipídicas y hemicelulosas que quedan mayormente teñidas disminuyendo el contraste de los nanocristales. En la Tabla 1 se muestran las medidas de los nanocristales obtenidas a partir de una media de 50 medidas. En este caso, vemos que los nuevos nanocristales poseen un menor ratio longitud/anchura, pero manteniéndose ambos (los nanocristales obtenidos por el método tradicional y los obtenidos por el método de la invención) por encima de 30, que sería el valor óptimo para la aplicación de éstos como nanorefuerzos.

Tabla 1. Tamaño (longitud y anchura) y ratio aparente de los nanocristales.

	Ancho (nm)	Longitud (nm)	Ratio largo/anchura
NANO F2A	14,9 ± 4,7	499,0 ± 96,1	33,5
NANO F3	10,8 ± 2,2	514,0 ± 82,5	47,6

Se produjeron films (películas continuas), partiendo de los nanocristales, mediante la adición de 0,25 g de los nanocristales a 50 ml de agua destilada y se dispersaron mediante homogeneización con el ultra-turrax seguido de sonicación suave (5 minutos) hasta obtener suspensiones homogéneas. Estos se filtraron luego al vacío usando filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) con un tamaño de poro de 0,2 μm para eliminar el agua. El material sólido que quedaba en el filtro se secó luego a temperatura ambiente durante la noche (aproximadamente 20°C, 40% de humedad relativa). Los films obtenidos se almacenaron en cabinas de humedad relativa equilibrada a 0% humedad relativa y 25°C durante tres días antes de su caracterización. De estos materiales se caracterizaron sus propiedades mecánicas, de barrera a vapor de agua y de transparencia. Respecto a las propiedades mecánicas (Tabla 2) podemos apreciar que los films obtenidos a partir de los nuevos nanocristales no sólo son superiores a otros polímeros ampliamente utilizados (PLA, MFC y TPCS) sino que incluso presentan mejores propiedades que los films de nanocristales convencionales (NANO F3) y de nanocristales bacterianos (BCNW), aumentando sobre todo la tensión a rotura y la elongación, lo cual es interesante ya que los convierte en un material más rígido y a la vez más elástico.

Ejemplo 3: Obtención de films a partir de NANO F2A y propiedades de los mismos

Se produjeron films (películas continuas), partiendo de los nanocristales, mediante la adición de 0,25 g de los nanocristales a 50 ml de agua destilada y se dispersaron mediante homogeneización con el ultra-turrax seguido de sonicación suave (5 minutos) hasta obtener suspensiones homogéneas. Estos se filtraron luego al vacío usando filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) con un tamaño de poro de 0,2 μm para eliminar el agua. El material sólido que quedaba en el filtro se secó luego a temperatura ambiente durante la noche (aproximadamente 20°C, 40% de humedad relativa). Los films obtenidos se almacenaron en cabinas de humedad relativa equilibrada a 0% humedad relativa y 25°C durante tres días antes de su caracterización. De estos materiales se caracterizaron sus propiedades mecánicas, de barrera a vapor de agua y de transparencia. Respecto a las propiedades mecánicas (Tabla 2) podemos apreciar que los films obtenidos a partir de los nuevos nanocristales no sólo son superiores otros polímeros ampliamente utilizados (PLA, MFC y TPCS) sino que incluso presentan mejores propiedades que los films de

nanocristales convencionales (NANO F3) y los bacterianos (BCNW), aumentando sobre todo la tensión a rotura y la elongación, lo cual es interesante ya que los convierte en un material más rígido y a la vez más elástico.

- 5 **Tabla 2.** Propiedades mecánicas (módulo de elasticidad, tensión a rotura y elongación a rotura) de los films producidos a partir de los nanocristales obtenidos.

	Módulo de Young (GPa)	Tensión a rotura (MPa)	ϵ_b (%)
NANO F2A	10,5 ± 1,4	124,7 ± 7,2	2,4 ± 0,4
NANO F3	11,5 ± 1,1	98,0 ± 6,8	1,1 ± 0,3
BCNW	7,9 ± 0,1	74,6 ± 11,5	1,0 ± 0,1
MFC	2,1 ± 0,1	39,0 ± 8,0	2,8 ± 0,9
PLA	1,9 ± 0,1	53,8 ± 1,2	4,9 ± 0,5
TPCS	0,1 ± 0,0	11,2 ± 0,8	7,3 ± 1,9

- Curiosamente, la barrera a vapor de agua también aumentó en el caso de los films producidos a partir de los nuevos nanocristales respecto a los convencionales (NANO F3) o bacterianos (BCNW) como podemos ver en la Tabla 3. Además, los films obtenidos a partir de los nuevos nanocristales también fueron menos permeables que el resto de polímeros (TPCS, MFC) a excepción del PLA, que presenta unos valores ligeramente inferiores.

- 15 **Tabla 3.** Permeabilidad a vapor de agua de los films obtenidos a partir de los nanocristales y otros biopolímeros ampliamente usados en la industria del envasado alimentario.

	Permeabilidad a vapor de agua·10¹³ (kg·m/s·m²·Pa)
NANO F2A	1,8 ± 0,1
NANO F3	2,7 ± 0,4
BCNW	3,6 ± 1,1
MFC	3,8
PLA	1,3 ± 0,1
TPCS	15,5 ± 0,1

Por último, como se puede apreciar en la Figura 2, la transparencia no disminuye en

los films obtenidos a partir de los nuevos nanocristales, manteniéndose en el nivel óptimo de los films de nanocristales convencionales (NANO F3) y siendo, por tanto, un material ideal para el envasado de alimentos.

5 Ejemplo 4. Rendimiento de extracción

Respecto al rendimiento de extracción, los diferentes datos reportados previamente en literatura, muestran valores de entre 12 y 14% de rendimiento final respecto a la materia prima (biomasa lignocelulósica). Estas pequeñas variaciones pueden deberse
10 al tipo de materia prima de partida o a pequeños cambios en las condiciones de obtención, como tiempo de hidrólisis o concentración total de ácido sulfúrico (como se muestra a continuación)

Rendimiento convencional → 12% con ácido sulfúrico (30% v/v) y 14% (sulfúrico 64%
15 v/v) (Fortunati et al., Industrial Crops and Products 2015, 67, 439-477).

El rendimiento del nuevo método varía entre un 21 y un 26%, indicando una mejora en el rendimiento de extracción con respecto al método tradicional de entre un 50 y un 100%, lo cual de nuevo pone en valor el nuevo proceso de esta invención, ya que
20 reduce los pasos necesarios para su obtención, mejora sustancialmente el rendimiento de extracción y proporciona nanocristales que dan lugar a materiales con mejores propiedades que las reportadas para nanocristales obtenidos por el método tradicional.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de nanocristales mediante tratamiento ácido a partir de biomasa lignocelulósica con un contenido de lignina de entre el 5 y el 40%, que
5 comprende las etapas de:
 - (a) tratamiento de la biomasa lignocelulosa con NaClO_2 a una concentración de entre el 0,5% y el 3%, a un pH de entre 2,5 y 3,5, a una temperatura entre 65 y 75°C, para obtener holocelulosa; y
 - (b) tratamiento ácido de la holocelulosa obtenida en la etapa (a) con un ácido
10 fuerte a una concentración de entre el 20 y 70% y a una temperatura de entre 40 y 60 °C.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde en la etapa (a) se utiliza un ácido
15 seleccionado de entre ácido acético, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico para mantener el pH entre 2,5 y 3,5.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, donde el ácido es el ácido acético.
4. Procedimiento según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 3, donde el ácido fuerte
20 de la etapa (b) se selecciona entre ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido clorhídrico.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, donde el ácido fuerte de la etapa (b) es el ácido sulfúrico.
- 25 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende una etapa (a1), intermedia a la etapa (a) y la etapa (b), en la que se lleva a cabo una centrifugación a una temperatura de entre 10 y 30°C.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que además
30 comprende una etapa (a2), posterior a la etapa (a1), en la que se lleva a cabo un lavado de la biomasa lignocelulósica centrifugada obtenida en (a1) utilizando agua destilada hasta alcanzar pH neutro.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que además
35 comprende una etapa (c), posterior a la etapa (b), en la que se lleva a cabo la centrifugación a una temperatura de entre 15 y 30 °C.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, que además comprende una etapa (d), posterior a la etapa (c), de re-dispersión de los nanocristales obtenidos de la etapa (c).
- 5 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde se lleva a cabo una segunda etapa (c) (etapa (c')) y una segunda etapa (d) (etapa (d')), consecutivas y posteriores a la etapa (d).
- 10 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que además comprende una etapa (e), posterior a la etapa (d) o posterior a la etapa (d'), de neutralización de los nanocristales mediante tratamiento con NaOH y posterior centrifugación.
- 15 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el ratio biomasa/disolución ácida de NaClO_2 de la etapa a) es de entre 0,8 a 1,2 g por cada 100ml de disolución.
- 20 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que además comprende un tratamiento previo a la etapa (a) de limpieza de la biomasa lignocelulósica.
- 25 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que además comprende un tratamiento de secado posterior a la etapa de limpieza previa a la etapa (a) de la biomasa lignocelulósica a una temperatura de entre 50 y 70 °C hasta la eliminación completa del agua.
- 30 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la biomasa lignocelulósica procede de las hojas de Posidonia oceanica.
- 35 16. Procedimiento según la reivindicación 15, donde las hojas de Posidonia oceanica están molidas.
17. Nanocristales obtenidos por el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
18. Uso de los nanocristales de la reivindicación 17 para fabricar films, nanorefuerzos, geles, cápsulas para medicamentos y biosensores.

19. Un film que comprende los nanocristales de la reivindicación 17.

20. Un nanorefuerzo que comprende los nanocristales de la reivindicación 17.

5

21. Un gel que comprende los nanocristales de la reivindicación 17.

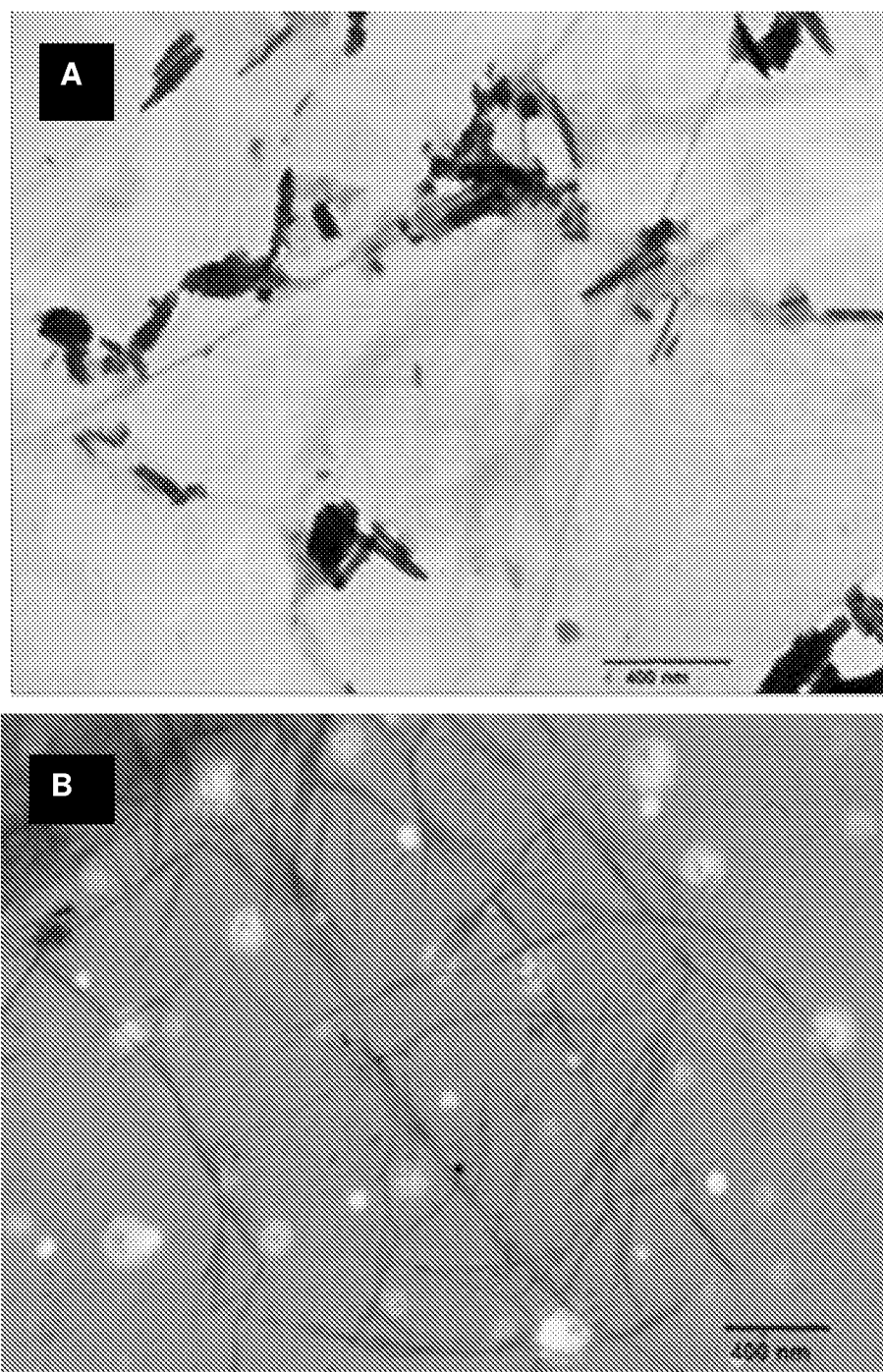


Figura 1

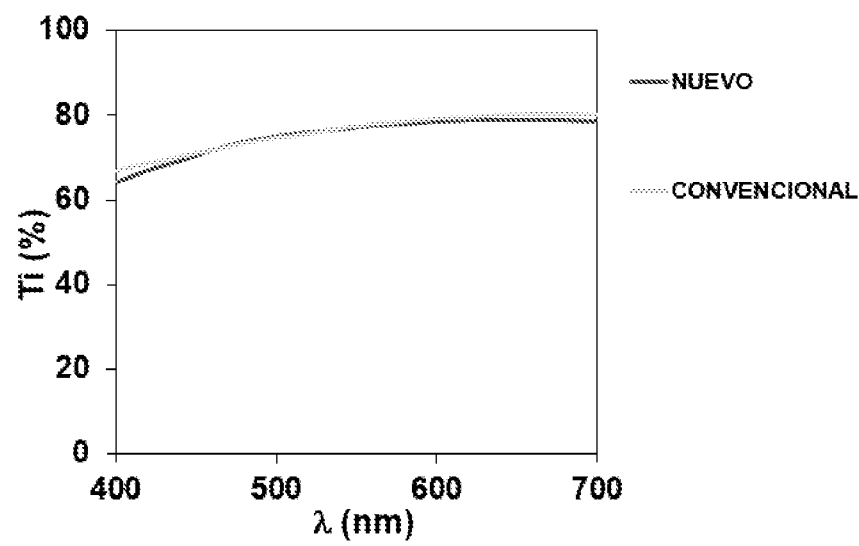


Figura 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2019/070448

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08B15/08 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, XPESP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEI, W. et al. Preparation and Characterization of Hydroxyapatite-Poly(Vinyl Alcohol) Composites Reinforced with Cellulose Nanocrystals. BioResources, 2014, Vol. 9, N° 4, Pages 6087-6099 [on line][retrieved on 04/04/2019]. Experimental part.	1-21
A	BENITO-GONZÁLEZ, I. et al. Potential of lignocellulosic fractions from Posidonia oceanica to improve barrier and mechanical properties of bio-based packaging materials.. International Journal of Biological Macromolecules, 20/06/2018, Vol. 118, Pages 542-551 [on line][retrieved the 04/04/2019].	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01/08/2019

Date of mailing of the international search report
(01/08/2019)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
B. Aragón Urueña

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493277

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2019/070448

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BASU P. Biomass Gasification, Pyrolysis and Torrefaction: Practical Design and Theory. 2013, Pages 486 [on line][retrieved on 04/04/2019].	1
A	LUZI, F. et al. Modulation of Acid Hydrolysis Reaction Time for the Extraction of Cellulose Nanocrystals from Posidonia oceanica. J. Renew. Mater, 06/2016, Vol. 4, N° 3, Pages 190-198	1-21

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2019/070448

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C08B15/08 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08B

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, XPESP

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WEI, W. et al. Preparation and Characterization of Hydroxyapatite-Poly(Vinyl Alcohol) Composites Reinforced with Cellulose Nanocrystals. BioResources, 2014, Vol. 9, Nº 4, Páginas 6087-6099 [en línea][recuperado el 04/04/2019]. Parte experimental	1-21
A	BENITO-GONZÁLEZ, I. et al. Potential of lignocellulosic fractions from Posidonia oceanica to improve barrier and mechanical properties of bio-based packaging materials. International Journal of Biological Macromolecules, 20/06/2018, Vol. 118, Páginas 542-551 [en línea][recuperado el 04/04/2019].	1-21

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
01/08/2019

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
01 de agosto de 2019 (01/08/2019)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
B. Aragón Urueña
Nº de teléfono 91 3493277

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2019/070448

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	BASU P. Biomass Gasification, Pyrolysis and Torrefaction: Practical Design and Theory. 2013, Páginas 486 [en línea][recuperado el 04/04/2019].	1
A	LUZI, F. et al. Modulation of Acid Hydrolysis Reaction Time for the Extraction of Cellulose Nanocrystals from Posidonia oceanica. J. Renew. Mater, 06/2016, Vol. 4, Nº 3, Páginas 190-198	1-21