



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Mérida

DEPARTAMENTO DE FÍSICA APLICADA

**“Aprovechamiento del alga marina *Sargassum* spp. mediante
digestión anaerobia y tratamiento en medio ácido”**

TESIS

Que presenta

Luis Felipe Jiménez Contreras

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

en

Fisicoquímica

Director(es) de Tesis:

Dra. María Antonieta Fernández Herrera

Mérida, Yucatán, México

Agosto de 2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María Antonieta Fernández Herrera, mi asesora de tesis por su guía y los conocimientos compartidos conmigo, además de la paciencia y motivación a lo largo de la elaboración de esta tesis.

También al Dr. Antonio Azamar Barrios y al Dr. Rubén Marrero Carballo por formar parte del comité sinodal.

Agradezco a la Dra. Leticia Olivera Castillo y al Mtro. César Puerto Castillo del Laboratorio de Nutrición Acuícola del Departamento de Recursos del Mar del Cinvestav Mérida por la donación de *Sargassum* spp.

Algunos de los análisis fueron realizados en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales (LANNBIO) del Cinvestav Mérida, financiado por los proyectos FOMIX-Yucatán 2008-108160 y CONACYT LAB-2009-01-123913, 292692, 294643, 188345 y 204822. Extiendo mi agradecimiento a la Dra. Patricia Quintana Owen por el acceso al LANNBIO, al M.C. Daniel Aguilar Treviño por la difracción de Rayos X de muestras en polvo, al Dr. Víctor Rejón Moo por los análisis de microscopía electrónica, al Dr. Antonio Azamar Barrios por los análisis de espectroscopía infrarroja de muestras gaseosas y a los Dres. Gloria Hernández Bolio y Emanuel Hernández Núñez por los análisis de resonancia magnética nuclear.

Externo igualmente mi agradecimiento a la cervecera “La Ceiba” por la donación de las aguas residuales cerveceras.

Agradezco a mis padres Martín Jiménez y Geany Contreras por su apoyo incondicional y su motivación durante toda mi formación académica. A mis amigos que me apoyaron en todo momento en las dificultades que presenté y a mi novia María Guadalupe de los Santos López, por la motivación, ayuda y por creer en mí cuando yo dudaba.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo brindado a través de la beca 924632 para realizar estudios de maestría en el Departamento de Física Aplicada del Cinvestav Mérida.

RESUMEN

En los últimos años, la cantidad de algas marinas que arriban a las costas de los países que comparten el Caribe ha aumentado considerablemente. Esta macroalga representa un desastre ambiental, económico y también amenaza a la salud humana. Las algas marinas representan una rica fuente de biomasa y biopolímeros a la que pueden darse diversas aplicaciones, por ejemplo, en el ámbito de materiales o en el de energía. Entre los componentes poliméricos más abundantes presentes en las algas marinas se encuentra el alginato. Éste, es un polímero ramificado que se encuentra en la pared celular de las algas pardas, su función principal es otorgarles fuerza y flexibilidad. Entre las áreas de aplicación del alginato, destacan la biomedicina, la industria alimenticia, la farmacéutica y la textil. La extracción industrial del alginato genera un residuo orgánico que se utiliza principalmente como abono o fertilizante. Entonces, debido a la problemática que causan los arribazones de algas marinas y que de estas se pueden obtener productos con un amplio campo de aplicaciones, el presente trabajo de tesis se enfocó en la obtención y caracterización fisicoquímica del alginato de sodio proveniente del *Sargassum* spp. así como en el aprovechamiento del subproducto generado de la extracción como sustrato para la producción de biogás mediante digestión anaerobia. El alginato se extrajo con base en metodologías descritas en la literatura realizando algunos cambios en las metodologías para optimizar el proceso. El residuo orgánico generado por la extracción se colocó en un biodigestor que contenía un inóculo proveniente del agua residual de la industria cervecera y al finalizar se cuantificó la cantidad de biogás generado por el residuo. El alginato de sodio obtenido y los productos de la despolimerización se caracterizaron por resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , espectroscopía infrarroja, difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). El biogás se caracterizó por espectroscopía infrarroja. Los resultados muestran que la cantidad de biogás generado, al utilizar el residuo orgánico de la extracción, fue mayor que al emplear sacarosa como sustrato. Con los resultados obtenidos de este trabajo, se concluye que es posible conferir un valor agregado al sargazo de arribazón al extraer productos naturales de valor industrial como el alginato de sodio y aprovechar el residuo de la extracción como sustrato para la generación de biogás.

ABSTRACT

In recent years, the amount of seaweed reaching the coasts of the countries that share the Caribbean has considerably increased. This macro-alga represents an environmental, economic disaster and threatens human health. Marine algae represent a rich source of biomass and biopolymers that can be used for a variety of applications, for example, in the field of materials or energy. Among the most abundant polymeric components present in marine algae is alginate. Alginate is a branched polymer found in the cell wall of brown algae, being its primary function to give them strength and flexibility. The areas of application of alginate include biomedicine, the food industry, pharmaceuticals, and textiles. The industrial extraction of alginate generates an organic waste that is mainly used as a fertilizer. Therefore, due to the problems caused by the arrival of marine algae and the fact that such products with a wide range of applications can be obtained from them, the present thesis focused on the obtaining and physicochemical characterization of sodium alginate from *Sargassum* spp. Also, on the use of by-product generated from the extraction as a substrate to produce biogas through anaerobic digestion. The alginate was extracted based on methodologies described in the literature, performing some changes to optimize the process. The organic waste generated by the extraction was placed in a biodigester containing inoculum from the wastewater of the brewery industry. At the end, the amount of biogas produced by the waste was quantified. The sodium alginate and its depolymerization products obtained were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) of ^1H and ^{13}C , infrared spectroscopy, X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). The biogas was characterized by infrared spectroscopy. These results show that the amount of biogas produced employing the organic residue of the extraction was higher than using sucrose as a substrate. With the results obtained from this work, it is concluded that it is possible to confer an added value to the seaweed washed ashore by extracting natural products of industrial value such as sodium alginate and utilizing the extraction residue as a substrate for biogas production.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

DRX	Difracción de rayos X
g	Gramo
Hz	Hercio
MHz	Megahercio
IR	Infrarrojo
ml	Mililitro
ppm	Partes por millón
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
SEM	Microscopia electrónica de barrido (por sus siglas en ingles)
h	Horas
min	Minutos
3,6-AG	3,6-anhidro-galactosa
DCM	Diclorometano
Hex	Hexano
MM	Bloque homopolimérico de ácido β-D-manurónico
GG	Bloque homopolimérico de ácido α-L-gulurónico
MG	Bloque heteropolimérico ecuatorial-axial de ácido α-L-gulurónico y ácido β-D-manurónico
GM	Bloque heteropolimérico axial-ecuatorial de ácido α-L-gulurónico y ácido β-D-manurónico

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	11
2	ANTECEDENTES	13
2.1	Algas marinas.....	13
2.1.1	Agares	13
2.1.2	Carrageninas.....	14
2.2	Alginatos.....	16
2.2.1	Estructura de los alginatos.....	16
2.2.2	Hidrogeles de alginato	17
2.2.3	Extracción de alginatos	18
2.2.4	Aplicaciones industriales de los alginatos.....	19
2.3	Procesos de digestión anaerobia	20
2.4	Digestión anaerobia empleando algas marinas	22
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo general	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1	Extracción del alginato de sodio	24
4.1.1	Despolimerización del alginato de sodio	31
4.2	Digestión anaerobia del residuo de <i>Sargassum</i> spp.....	34
5	DESARROLLO EXPERIMENTAL	37
5.1	Generalidades	37
5.2	Alginato de sodio	38
5.2.1	Extracción del alginato de sodio.....	38
5.2.2	Despolimerización del alginato de sodio	38
5.3	Digestión anaerobia	39
6	CONCLUSIONES	41

7	PERSPECTIVAS	42
8	ANEXOS	43
9	REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. -Estructura general de un agar	14
Figura 2. - Estructura de la carragenina	15
Figura 3. - Estructura del alginato.....	17
Figura 4. - Formación de geles de alginato con cationes de calcio, formando la estructura "caja de huevo"	17
Figura 5. -Procedimiento para la extracción del alginato de sodio	18
Figura 6. - Principales pasos de la digestión anaerobia	21
Figura 7. - Espectro IR del alginato de sodio (muestra 4)	25
Figura 8. - Micrográficas SEM de la muestra 4 a 2000x (A), 5000x (B), 10000x (C) y 20000x (D). Micrográficas SEM del alginato de sodio a 500x (E), 2500x (F), 5000x (G)	26
Figura 9. -Micrografía SEM de la muestra 4 de alginato de sodio donde se muestran las tres regiones (A, B y C) en donde se realizó el análisis EDS.	27
Figura 10. - Patrón de difracción de la muestra 4 de alginato de sodio.....	28
Figura 11. -Espectro de RMN de ^{13}C de la muestra 4 de alginato de sodio.	29
Figura 12. - Espectro de RMN de ^1H de la muestra 4 de alginato de sodio.	30
Figura 13. - Espectro de RMN de ^1H de la muestra 4 de alginato de sodio a temperatura variable.	31
Figura 14. - Espectros apilados de RMN de ^{13}C de los fragmentos F3, F4, F5, F7 y F8 región 163-170 ppm.	32
Figura 15. - Espectros apilados de RMN de ^{13}C de los fragmentos F3, F4, F5, F7 y F8 región 60-67 ppm.	33
Figura 16. - Espectros apilados de RMN de ^1H de los fragmentos F3, F4, F5, F7 y F8 región 4-6 ppm.	33
Figura 17. - Volumen generado por diferentes sustratos. Blanco (B), control positivo (C+) y residuo de la extracción de alginato del <i>Sargassum</i> spp. (S). (Anova 1 vía, $\alpha=0.05$).....	35
Figura 18. - Espectro IR del biogás generado a partir de la muestra S.	36
Figura 19. -Sistema del montado para la captura del biogás	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. -Composición de los diferentes tipos de carragenina	15
Tabla 2. -Experimentos y sus variaciones en los parámetros	24
Tabla 3. - Porcentaje en peso de la muestra 4 en las zonas A, B y C	27
Tabla 4. - Asignación de carbonos de RMN de ^{13}C de la muestra 4 de alginato de sodio.....	28
Tabla 5. - Experimentos de la digestión anaerobia. Blanco (B), control positivo (C+) y el residuo de la extracción de alginato (S).....	34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A1. - Micrografías SEM de la muestra 2 a 5000x (izquierda) y 10000x (Derecha)	43
Anexo A2. - Micrografías SEM de la muestra 3 a 2000x (A), 5000x (B), 10000x (C) y 20000x (D).....	43
Anexo A3. -Espectros de RMN de ^{13}C de la muestra 4 en la región 171-180 ppm.	44
Anexo A4. -Espectros de RMN de ^{13}C de la muestra 4 en la región 46-92 ppm ...	44
Anexo A 5. -Espectros de RMN de ^{13}C de la muestra 4 en la región 90-110 ppm	45
Anexo A6. - Espectros de RMN de ^1H de la muestra 4 en la región 4-6 ppm	45

1 INTRODUCCIÓN

Las algas marinas se han aprovechado en las comunidades costeras durante siglos, proporcionando una fuente de alimento, combustibles, fertilizantes, aditivos para la alimentación animal además de sus aplicaciones médicas y biotecnológicas.¹ Se conocen aproximadamente 9000 especies de macroalgas, las cuales se clasifican, a grandes rasgos, en tres grupos principales en función de su pigmentación: feofíceas (algas pardas), rodófitas (algas rojas) y clorófitas (algas verdes). Las algas pardas o marrones son el segundo grupo más abundante con alrededor de 2000 especies, que alcanzan sus niveles máximos de biomasa en las costas rocosas de las zonas templadas.² En México hay una reserva de feofíceas, entre las cuales destacan por su abundancia las especies *Macrocystis pyrifera*, *Egrelia laevigata*, *Eisenia arborea* y *Sargassum* spp.³ Esta última se encuentra en las costas del Golfo de México, a lo largo del Golfo de California y en el Mar Caribe.⁴⁻⁶

En los últimos años, se ha incrementado la cantidad de algas marinas de arribazón en las costas de los países del Caribe. La presencia de esta macroalga no sólo representa un desastre ambiental y económico, sino también una amenaza a la salud humana debido a que producen gases como sulfuro de hidrógeno y amónico después de 48 h en la orilla del mar.⁷ En la actualidad, hay muchos procesos industriales para extraer los productos naturales presentes en las algas. Un ejemplo son los ficocoloides, polisacáridos hidrosolubles empleados para formar geles. Entre los tres tipos principales de ficocoloides están, el agar, la carragenina y los alginatos.⁸ Los alginatos tienen como función principal dar fuerza y flexibilidad a las algas, siendo uno de los principales componentes en la estructura de la pared celular de las algas feofíceas. En la naturaleza, los alginatos se encuentran presentes en forma de ácido algínico con sales de los cationes presentes en el agua de mar, principalmente Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ .⁹ El término alginato se refiere comúnmente a una familia de polisacáridos lineales que contienen cadenas de ácidos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G), unidos mediante enlaces $\beta(1,4)$.¹⁰ Los alginatos muestran diversas aplicaciones en biomedicina y las industrias alimenticia, farmacéutica y textil, esto se debe principalmente a cuatro de sus propiedades. La habilidad como espesante al ser disuelto en agua, produciendo un aumento en la viscosidad de la solución en la que se disuelve; la capacidad de formar geles a partir

de reacciones químicas de intercambio iónico dando lugar a formación de enlaces entre cadenas adyacentes del polímero; la capacidad de retención de agua y por último la formación de películas de alginato con metales, como el sodio o el calcio.⁹

Los rendimientos de extracción de alginato oscilan entre 16-29% en peso de la materia seca, dependiendo de la especie de alga.¹¹ Debido a esto, una cantidad sustancial de residuos de algas es generada anualmente. En principio, estos residuos se podrían emplear como alimento para animales y biofertilizantes, pero los procesos químicos industriales utilizados los hacen desfavorables para dichos propósitos.¹² Es decir, para aprovechar este residuo, se requiere de una reutilización sostenible, y la digestión anaerobia podría ofrecer una vía ambiental para esta materia prima.^{13,14}

La digestión anaerobia de algas además de producir biogás de forma económica, genera un subproducto que puede ser aprovechado como fertilizante, acondicionador de suelos y otras aplicaciones ambientales.¹⁵ El biogás es una fuente de energía renovable, constituido principalmente por una mezcla de metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) con pequeñas cantidades de otros gases.¹⁶ Puede ser recuperado de los desechos orgánicos que se descompusieron en ausencia de oxígeno y se le considera una fuente de energía renovable debido a su alto contenido de metano.¹⁷ La demanda energética, en su mayoría proveniente de combustibles fósiles, va en aumento debido al crecimiento poblacional e industrial. El biogás se perfila como una opción para poder disminuir la dependencia de los combustibles fósiles, debido a su origen biológico, es renovable y ampliamente aplicable.¹⁸

El presente trabajo se enfocó en el aprovechamiento de *Sargassum* spp. como fuente de materia prima para la extracción de alginato de sodio, su caracterización y el empleo de la biomasa generada de la extracción como sustrato para la producción de biogás mediante digestión anaerobia.

2 ANTECEDENTES

2.1 Algas marinas

Las algas marinas son abundantes biomásas marinas renovables, que se encuentran prácticamente en todo el mundo. Han sido una parte importante de la dieta humana en muchos países asiáticos, y también se han empleado en la medicina tradicional desde la antigüedad.¹⁹ Las algas marinas son organismos capaces de realizar la fotosíntesis y obtener el carbono orgánico necesario aprovechando la energía de la luz solar.²⁰ Las algas marinas, también denominadas macroalgas, abarcan un extenso grupo de organismos marinos macroscópicos que comprenden aproximadamente unas 250 especies.^{21,22} De acuerdo con las diferencias en su pigmentación, las macroalgas se clasifican en tres grupos: feofíceas (algas pardas), que incluyen los pigmentos fucoxantina y clorofilas a y c; clorófitas (algas verdes), con los pigmentos clorofilas a y b junto con varias xantófilas características y rodófitas (algas rojas), que poseen pigmentos de ficoeritrina y ficocianina.²³

Tradicionalmente, las algas marinas se consumen por su alto valor nutricional y farmacéutico, es decir, se emplean como medicina herbaria para tratar cálculos biliares, dolencias estomacales, trastornos renales, sarna, arteriosclerosis, enfermedades cardíacas y enfermedades pulmonares, entre otras.²⁴⁻²⁷ Además, se utilizan como fertilizantes, fungicidas, herbicidas, condimentos, suplementos dietéticos y como recurso de ficocoloides, como el agar, la carragenina y el alginato para diversas aplicaciones industriales.²⁸⁻³⁰

2.1.1 Agares

En Japón, desde el siglo XVII se ha utilizado el agar, el cual se extrae de las algas rojas.³¹ Las fuentes de algas más explotadas para la extracción del agar (*agarofitas*) pertenecen a los géneros *Gelidium*, *Gracilaria* y *Pterocladia*. El género *Gelidium* se encuentra en Japón, Sur de África, Nueva Zelanda, México, Estados Unidos y Chile; el género *Gracilaria* en Sur de África y Canadá; el género *Pterocladia* en Japón y Nueva Zelanda.³² La pared celular de la especie *Gelidium* contiene entre un 20-30% de agar,³³ mientras que la especie *Gracilaria* un 15-20%.³⁴ El agar es un

polisacárido lineal de cadenas de galactosa ligadas mediante enlaces $\beta(1,3)$ y $\alpha(1,4)$ alternados, por lo que las unidades de repetición son disacáridos (Figura 1). El agar difiere de las carrageninas, la otra clase importante de polisacáridos de algas rojas, en la cadena ligada $\alpha(1,4)$ en el agar es el L-enantiómero, mientras que en las carrageninas es el D-enantiómero.^{32,35} Pueden estar presentes esteres de sulfato, ácido pirúvico y ácido D-gulurónico. El agar puede dividirse en dos subgrupos: la agarosa y la agarpectina. El primero es un polisacárido neutro y lineal, mientras que el segundo es un polímero ácido portador de grupos sulfato, metilo y piruvato de metilo.³⁵⁻³⁷

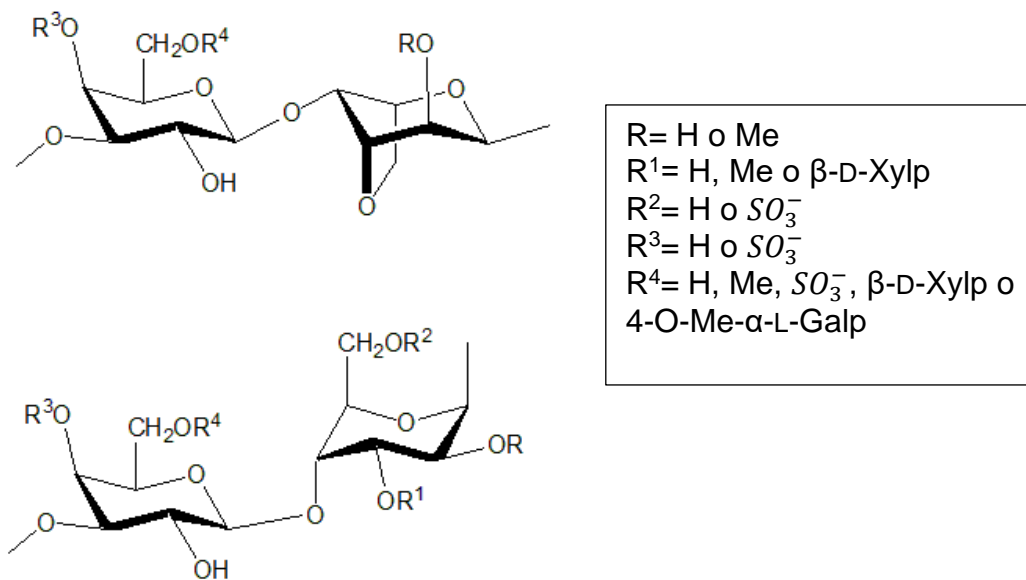


Figura 1.-Estructura general de un agar.³⁸

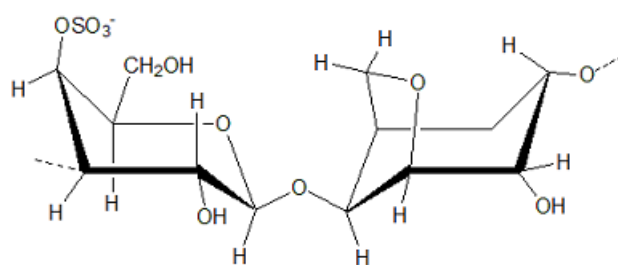
2.1.2 Carrageninas

Las carrageninas se extraen de las rodófitas. Las especies empleadas comercialmente son *Kappaphycus alvarezii* y *Eucheuma denticulatum*, las cuales se encuentran distribuidas en las costas de Indonesia, Filipinas y otras islas del Lejano Oriente.³⁹ La carragenina está formada por unidades alternas de D-galactosa y 3,6-anhidro-galactosa (3,6-AG) con uniones glucosídicas $\alpha(1,3)$ y $\beta(1,4)$. Las carrageninas se clasifican en varios tipos, entre ellos están λ , κ , i , ϵ y μ , los cuales presentan de 22-35% de sulfatación. Los nombres no reflejan estructuras químicas definidas, solo se diferencian de manera general en la composición y el grado de sulfatación en lugares específicos del polímero. Las principales diferencias que influyen en el tipo de carragenina son el número y la posición de los grupos de

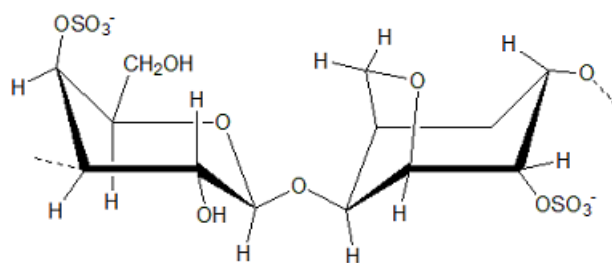
sulfato, así como el contenido de 3,6-AG. Las cantidades de sulfato y de 3,6-AG para cada tipo de carragenina se muestran en la Tabla 1 y las estructuras en la Figura 2.

Tabla 1.-Composición de los diferentes tipos de carragenina.⁴⁰

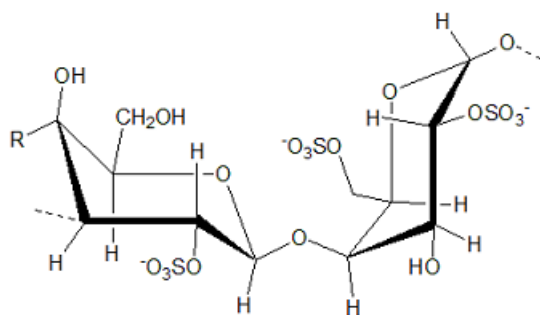
	K	I	λ
Sulfato	25-30%	28-30%	32-39%
3,6-AG	28-35%	25-30%	-



κ-carragenina



I-carragenina



λ-carragenina

Figura 2.- Estructura de la carragenina.⁴⁰

2.2 Alginatos

El alginato fue descrito por primera vez por el químico británico E.C.C Stanford en 1881.⁴¹ Los alginatos son abundantes en la naturaleza como un componente estructural de las feofíceas y comprenden hasta 40% de la biomasa seca. Estos se encuentran presentes en la matriz intercelular de las algas marrones brindándoles flexibilidad, impide la desecación y participa en el intercambio de iones de sodio, calcio, magnesio, estroncio y bario con el agua de mar.³² Varias especies se cultivan para la extracción de alginatos, entre ellas están: *Ascophyllum nodosum*, *Durvillaea antarctica*, *Durvillaea potatorum*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima*, *Laminaria japonica*, *Ecklonia maxima*, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia nigrescens*, *Lessonia trabeculata*, y *Sargassum* spp.^{32,36,42} En América del Norte, se encuentran las especies *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria*, *Sargassum* spp. y *Macrocystis pyrifera*; en Sudáfrica, Nueva Zelanda y Australia se recolecta la *Ecklonia* spp.; en Chile, la *Lessonia* spp.; la *Laminaria* spp. se encuentra en Japón y Europa septentrional.^{36,43}

2.2.1 Estructura de los alginatos

El alginato es un polisacárido lineal formado por dos ácidos urónicos monoméricos, ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G). Los dos ácidos urónicos están dispuestos en patrones asimétricos de proporciones variables de bloques de secuencias homopoliméricas (MM o GG) y heteropoliméricas (MG o GM).⁴⁴ Estas variaciones en los bloques se deben a la técnica de extracción, el tiempo de recolección, la edad y la especie de alga, así como la estación y el lugar de cosecha.^{45,46} La estructura de los bloques y su relación M/G tiene un gran impacto en las propiedades fisicoquímicas del alginato. El aumento en el contenido de G, puede inducir a geles de alginato más rígidos y quebradizos, mientras que una mayor cantidad de bloques M puede formar geles más flexibles.^{47,48} De acuerdo con la disposición de los segmentos del enlace glucosídico se denomina diecuatorial (MM), diaxial (GG), ecuatorial-axial (MG) o axial-ecuatorial (GM) (Figura 3).³² Las cavidades electronegativas formadas por dos moléculas consecutivas de GG pueden albergar cationes, los cuales actúan como zona de unión entre cadenas

adyacentes a través de interacciones electrostáticas, permitiendo la interacción entre cadenas.⁴⁹⁻⁵¹

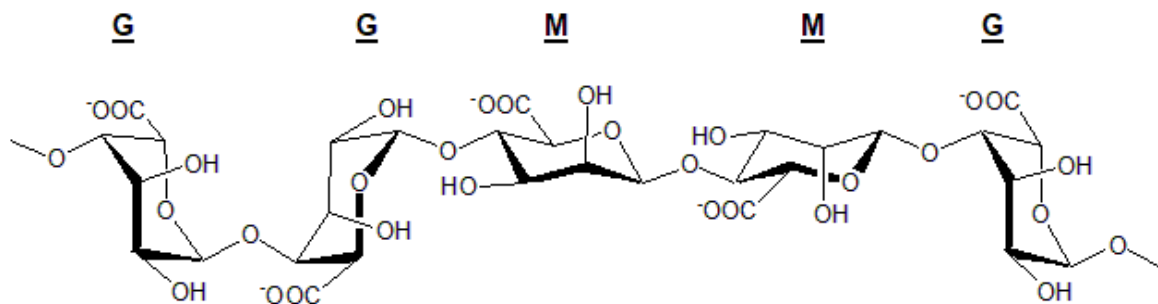


Figura 3.- Estructura del alginato.³²

2.2.2 Hidrogeles de alginato

Los hidrogeles son redes tridimensionales compuestas por alto contenido de agua y polímeros hidrófilos.^{52,53} Los hidrogeles suelen ser biocompatibles debido a que son estructuralmente similares a los componentes de base macromolecular del cuerpo y a menudo se pueden administrar en concentraciones relativamente bajas.⁵⁴ Entre los métodos empleados para la preparación de los hidrogeles de alginato, se encuentran el entrecruzamiento iónico, transición de fase, entrecruzamiento celular, polimerización de radicales libres y la reacción “clic”.⁵⁵ El método más común para preparar hidrogeles de alginato es combinar el alginato con cationes multivalentes, los cuales producen un intercambio de iones con los bloques G, estos se apilan de tal forma que su estructura tiene forma característica de “caja de huevos”, como se muestra en la Figura 4.⁵⁶ Como se mencionó en la sección anterior, los geles de alginatos con alto contenido del monómero G tienden a formar estructuras más fuertes, más rígidas y más porosas. Además, a mayor contenido de G, mayor es la restricción al transporte en solutos.⁵⁷

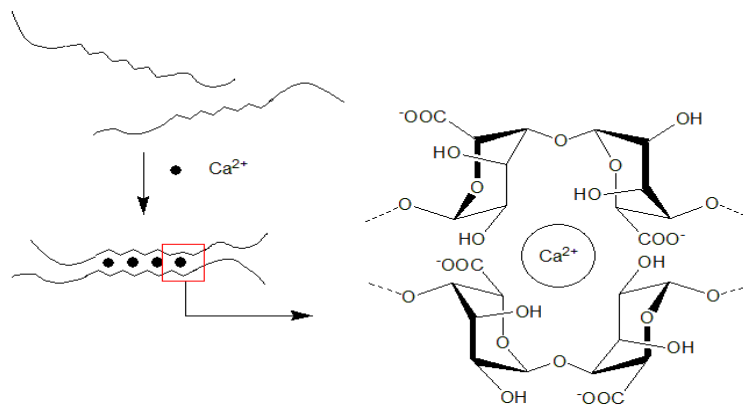


Figura 4.- Formación de geles de alginato con cationes de calcio, formando la estructura "caja de huevo".⁵⁷

2.2.3 Extracción de alginatos

Comercialmente, los alginatos se encuentran en diferentes tipos, el más común es el alginato de sodio. De forma general la extracción de los alginatos se realiza a partir de algas molidas que se agitan en una solución caliente de carbonato de sodio. La Figura 5 muestra un diagrama general para la obtención del alginato de sodio.⁵⁸

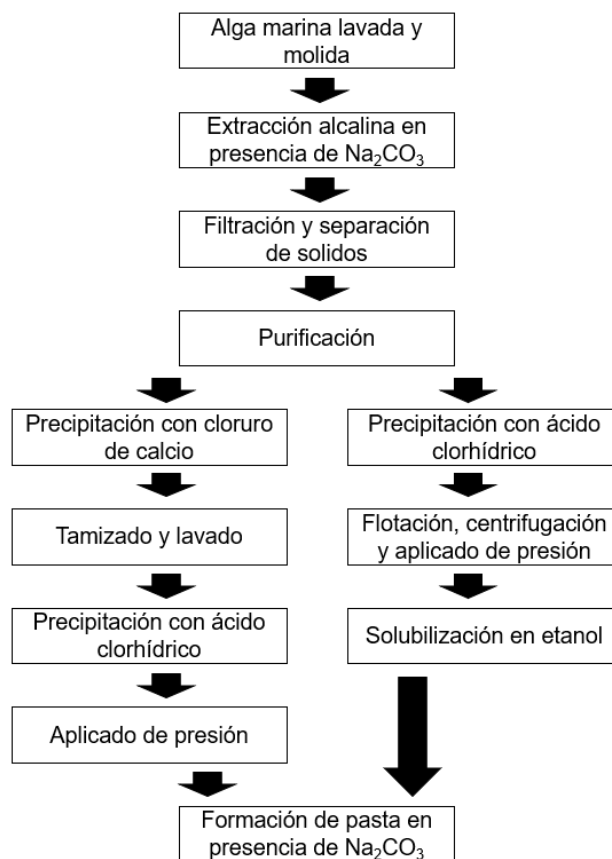


Figura 5.-Procedimiento para la extracción del alginato de sodio.⁵⁸

En 2010 Fenoradosoa et al.,⁵⁹ extrajeron alginato de la especie *Sargassum turbinarioides* con un rendimiento del 10% w/w, para el proceso de extracción realizaron un pretratamiento con formaldehído y HCl durante 24 h, para la extracción alcalina se utilizó Na_2CO_3 durante 3 h a 100 °C, precipitaron con etanol el alginato, purificaron con acetona y finalmente secaron a 65 °C.

En 2017 Fertah et al.,⁴⁸ extrajeron alginato de sodio proveniente de la especie *Laminaria digitata* con un rendimiento entre el 44-51% w/w, en el proceso de extracción alcalina utilizaron Na_2CO_3 durante 5 h a temperaturas variables (25-60

°C), obtuvieron que la temperatura con mayor rendimiento para esta especie fue de 40 °C. Posteriormente se indujo la precipitación del alginato presente en la solución con etanol repitiendo el proceso con metanol y acetona. El secado final se realizó a temperatura ambiente.

En 2014 Bertagnolli et al.,¹¹ utilizaron un proceso de extracción de alginato en el cual el tiempo de pretratamiento fue menor y obtuvieron un rendimiento del 17.2% w/w. Los autores reportaron que para la especie *Sargassum filipendula* se realizó un pretratamiento que consistió en remojar las algas previamente deshidratadas en una solución de formaldehído durante 30 min, después se vertió en una solución de HCl para permanecer así por 2 h. Para la extracción alcalina se utilizó una solución de Na₂CO₃ durante 5 h a una temperatura de 60 °C. La solución líquida se mezcló con etanol para inducir la precipitación del alginato. Finalmente, el alginato fue lavado con agua y se secó a 60 °C.

El tratamiento previo a la extracción alcalina en los artículos reportados por Fenoradosa et al. y Fertah et al., es el mismo, mientras que para el reportado por Bertagnolli et al., varió tanto en concentración como en tiempo, reportando que el tiempo que se requiere para este pretratamiento es menor del que está reportado en la literatura. Esta diferencia en el tiempo depende mucho de la especie y es proporcional al grosor del estipe. Estos procesos representan los métodos más comunes para la extracción del alginato.

2.2.4 Aplicaciones industriales de los alginatos

El alginato actúa como estabilizador y espesante en alimentos, bebidas, gelatinas, helados, postres, entre otros. Esto debido a sus propiedades quelantes con los iones metálicos para formar soluciones altamente viscosas.⁶⁰ Las soluciones de alginato pueden formar geles estables al calor en presencia de iones de calcio a temperatura ambiente. El alginato, al ser hidrofílico, con olor y sabor agradable, su facilidad para mezclarse, su bajo costo y con uso efectivo en presencia de saliva, es adecuado para su aplicación en materiales de impresión dental.⁶¹ También presenta aplicaciones en el área biomédica como la ingeniería de tejidos debido a que posee características como biodegradabilidad, biocompatibilidad, no es inmunógeno y es de bajo costo.⁶² Algunos estudios reportan que los materiales de curación de heridas basados en alginato (como el Kaltostat®) pueden mejorar la

cicatrización de las heridas al estimular a los monocitos como la interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral- α .⁶³ De acuerdo con Wang et al.,⁶⁴ las membranas complejas de alginato con quitosano facilitan la remodelación de tejido cicatrizado. Además, el alginato se ha utilizado en bioimpresiones en 3D para fabricar sustitutos de tejidos vasculares, hueso y cartílago.⁶⁵ El alginato ha sido adoptado como portador para inmovilizar o encapsular drogas, moléculas bioactivas, proteínas y células por su naturaleza biodegradable y biocompatible.^{66,67}

2.3 Procesos de digestión anaerobia

Los tratamientos biológicos presentan una alternativa para los desechos orgánicos. Estas tecnologías pueden maximizar el reciclaje y la recuperación de componentes de los residuos. Entre los diversos tratamientos biológicos se encuentra la digestión anaerobia, la cual se reporta como la más rentable, debido a la alta recuperación de energía y el menor impacto ambiental que genera.⁶⁸ La digestión anaerobia es un proceso biológico de degradación de la materia orgánica proveniente de residuos (animales y vegetales) por microorganismos específicos en ausencia de oxígeno. Los productos generados por digestión anaerobia son el biogás y el digestato. El primero es una mezcla de dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4) con elementos minoritarios como hidrógeno (H_2), nitrógeno (N_2) y sulfuro de hidrógeno (H_2S), mientras que el segundo son los residuos sólidos y líquidos estabilizados de la digestión, los cuales contienen nitrógeno mineral en alta proporción en forma de amonio.^{69,70} El proceso de degradación depende de las características fisicoquímicas del sustrato, así como de la concentración y calidad del consorcio microbiano responsable de cada paso de la digestión anaerobia.⁷¹ La microbiología de la digestión anaerobia comprende varios procesos complicados, pero se distinguen cuatro pasos principales: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.⁷² Los pasos requieren de tres grupos principales de bacterias, las hidrolíticas-fermentativas, las acetilénicas y las metanogénicas.⁷³ La Figura 6, señala los pasos durante la conversión del material orgánico complejo en CH_4 .⁷⁴

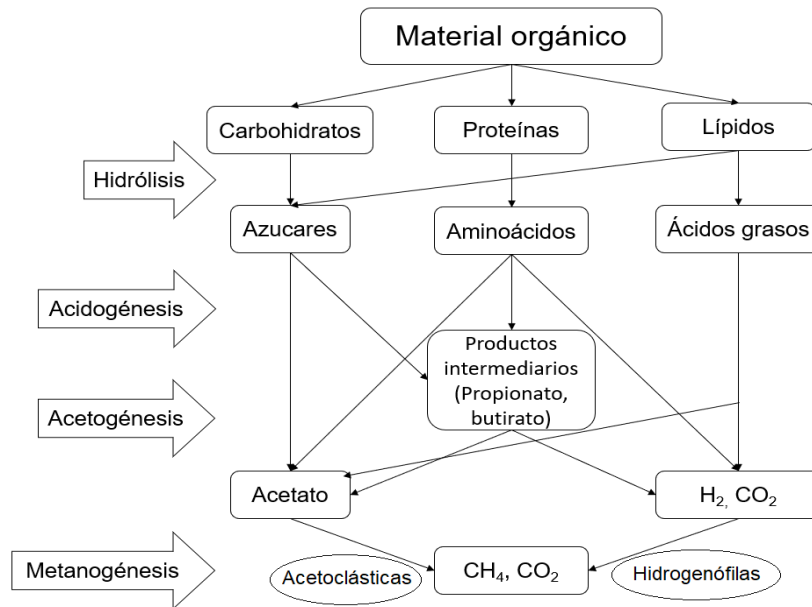


Figura 6.- Principales pasos de la digestión anaerobia.⁷⁴

El proceso de hidrólisis hace referencia a la solubilización de materia insoluble y a la descomposición biológica de materia orgánica compleja particulada (por ejemplo, biopolímeros, proteínas, carbohidratos, lípidos) en moléculas simples (monómeros o dímeros), que pueden atravesar la membrana celular.^{75,76} Los productos de la hidrólisis son azúcares, aminoácidos, ácidos grasos de cadena larga y glicerol.⁷⁷ Estas moléculas al ser más simples se solubilizan más fácilmente en el medio. Los compuestos solubles resultantes de la etapa de hidrolisis se transforman por la acción de microorganismos y bacterias fermentativas a través del proceso de acidogénesis. A este proceso también se le conoce como fermentación. En la acidogénesis, los ácidos grasos volátiles son los principales productos obtenidos y provienen de la conversión de las bacterias sintetizadoras de ácidos.⁷⁸ Las bacterias convierten los azúcares, aminoácidos y ácidos grasos en ácidos orgánicos y alcoholes.⁷⁹ La etapa de acidogénesis se considera generalmente la más rápida de las etapas individuales del proceso anaerobio.⁷⁷ En la acetogénesis los compuestos intermedios resultantes de la etapa acidogénica son transformados por las bacterias acetogénicas, convierten los ácidos orgánicos y los alcoholes principalmente en acetato (CH_3CO_2^-), CO_2 y H_2 , los cuales son los sustratos para las bacterias metanogénicas.⁸⁰ Con la presencia del acetato, H_2 y CO_2 se forman en el medio los microorganismos encargados de la metanogénesis. Esta etapa se considera la etapa limitante de las reacciones metabólicas de la digestión anaerobia, debido a la

lenta tasa de crecimiento de las bacterias metanogénicas.⁸⁰ Las bacterias metanogénicas dependen de las acetogénicas para proporcionarles acetato, H₂ y carbonato, mientras que las bacterias acetogénicas dependen de las metanogénicas para eliminar el H₂.⁸¹

2.4 Digestión anaerobia empleando algas marinas

En 2013, Vanegas y Bartlett obtuvieron biogás empleando como sustrato cinco especies de algas marinas de las aguas irlandesas: *Saccorhiza polyschides*, *Ulva* sp., *Laminaria digitata*, *Fucus serratus* y *Saccharina latissima*.⁸² Los autores utilizaron purines de bovino como inóculo y se incubaron a 35 °C. También reportaron que la especie *Saccharina latissima* brindó el mayor rendimiento de CH₄, seguido de *Saccorhiza polyschides* y *Laminaria digitata*, con un porcentaje de CH₄ y CO₂ entre el 50-72% y 10-45%, respectivamente. En 2015, Barbot et al.,⁸³ obtuvieron biogás utilizando como sustrato residuos sin procesar de baja calidad de la especie *Laminaria japonica* en la cual el porcentaje de CH₄ fue del 55% y de CO₂ fue del 38%. Además, sugirieron que el digestato que se obtiene posee un atractivo potencial para ser utilizado como biofertilizante. En 2018, Tedesco y Daniels reportaron que los residuos de algas marinas exhiben un gran potencial para producir CH₄.⁸⁴ En 2019, Osman et al.,⁸⁵ realizaron una comparación entre el CH₄ producido utilizando residuos de la extracción del alginato y residuos a los cuales no se le extrajo el alginato, ambos de la especie *Laminaria japonica*. Los resultados obtenidos mostraron que el mayor rendimiento de biogás fue a partir de residuos extraídos del alginato en combinación con un 67% de paja de arroz. El rendimiento de CH₄ para el residuo de la extracción del alginato con paja de arroz y el residuo sin extraer con paja de arroz fue de 78 y 88%, respectivamente, agregándole mayor valor al residuo del alga laminaria de la extracción del alginato.

La mayoría de los estudios examina el residuo de las algas sin la extracción del alginato, mientras que muy pocos reportan como sustrato el residuo de la extracción del alginato. Debido a esto, en este trabajo de tesis se propone el empleo de los residuos de la extracción del alginato de la especie *Sargassum* spp. como sustrato para la digestión anaerobia dando así un valor agregado a una especie que se encuentra de manera abundante en los arribazones de las costas del Caribe y que además contamina severamente las playas del Caribe mexicano.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Extraer el alginato de sodio presente en algas de arribazón *Sargassum* spp. y aprovechar el residuo de la extracción del alginato para generar biogás mediante el proceso de digestión anaerobia.

3.2 Objetivos específicos

- Extraer alginato de sodio del alga feofíceca (parda) *Sargassum* spp.
- Caracterizar el alginato de sodio obtenido por espectroscopía infrarroja, microscopía electrónica de barrido con detector de energía dispersa, difracción de Rayos X y resonancia magnética nuclear.
- Despolimerizar el alginato de sodio extraído para evidenciar su extracción y caracterizar los productos obtenidos.
- Cuantificar la cantidad de biogás empleando el método de desplazamiento.
- Caracterizar el biogás obtenido por espectroscopía infrarroja.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción del alginato de sodio

Para la extracción del alginato de sodio de *Sargassum* spp. se utilizó el método de extracción reportado por Fertah et al.,⁴⁸ con algunas modificaciones. Este método se eligió debido a que está reportado que se pueden obtener rendimientos hasta de 44%. El primer paso consistió en secar 30 g de *Sargassum* spp. en una estufa a 60 °C durante 24 h. El pretratamiento de la muestra seca consistió en hidratar en solución de formaldehído al 4% durante 30 h, con la finalidad de ablandar los tejidos y evitar la pigmentación del alginato. El formaldehído reacciona con los compuestos fenólicos que se encuentran en el alga generando productos insolubles. Al terminar la hidratación, se realizó una extracción en medio ácido empleando una solución 0.2 M de HCl durante 2 h con la finalidad de eliminar las sales externas presentes en las algas. La extracción alcalina se llevó a cabo utilizando una solución de Na₂CO₃ al 2% durante 3 h a 90 °C. El sobrenadante se filtró al vacío y la solución filtrada se precipitó con etanol al 96%. El alginato obtenido finalmente se lavó con etanol, acetona y se secó a temperatura ambiente.

La Tabla 2 muestra los parámetros en los que varió la metodología y las muestras a los que estos cambios pertenecen. La muestra 4 fue la que presentó mayor rendimiento.

Tabla 2.-Experimentos y sus variaciones en los parámetros

Muestra	CH ₂ O	HCl	Na ₂ CO ₃	
	Tiempo (min)	Tiempo (min)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)
1	30	30	5	60
2	30	120	3	80
3	1800	1800	3	80
4	30	120	3	90

El alginato de sodio que se extrajo de la muestra 4 después del secado a temperatura ambiente se obtuvo con un rendimiento del 12.3% w/w. El espectro de IR del alginato de sodio extraído del *Sargassum* spp. se muestra en la Figura 7. En este espectro se observa una banda ancha a 3462 cm^{-1} la cual se debe a las vibraciones de los enlaces O-H. En 3051 cm^{-1} se observa una banda que corresponde a las vibraciones de los enlaces C-H alifáticos y en 1685 cm^{-1} las vibraciones asimétricas del carboxilato O-C-O. La banda en 1410 cm^{-1} se asignó a la vibración de deformación C-OH con la contribución de la vibración simétrica de O-C-O del grupo de carboxilato. La banda en 947 cm^{-1} corresponde a la vibración del C-O de los residuos del ácido urónico. De acuerdo con Faidi et al.,⁸⁶ las bandas $1685\text{-}1457\text{ cm}^{-1}$ pertenecen a los grupos carboxilato.

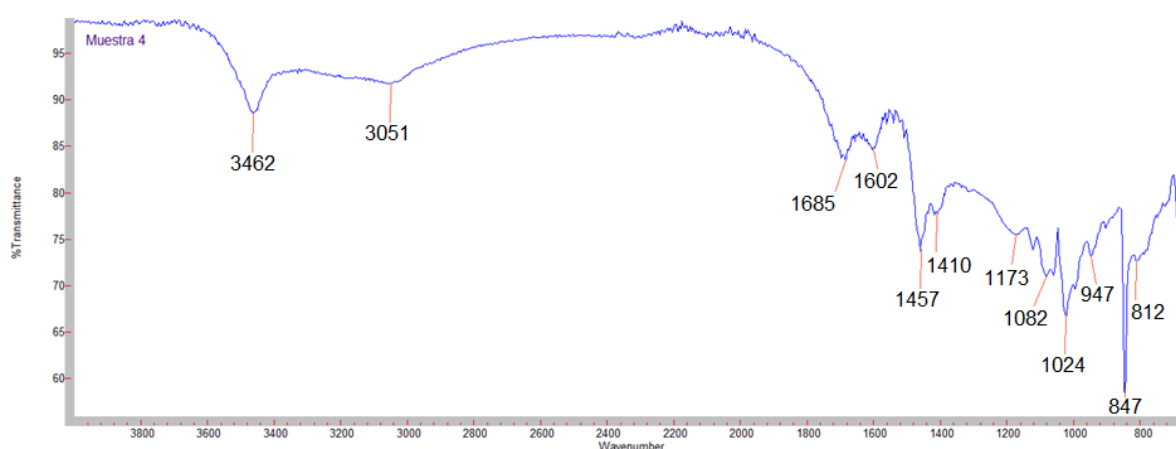


Figura 7.- Espectro IR del alginato de sodio (muestra 4)

Las muestras de alginato de sodio se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) para determinar su morfología. La Figura 8 muestra las micrografías SEM del alginato de sodio a diferentes magnitudes. En general, se observan partículas definidas alargadas en forma predominantemente de barra con bordes lisos. Akin e Isiklan reportan la estructura del alginato de sodio por SEM en la que observan estructuras rugosas (Figura 8).⁸⁷ Es muy importante observar la morfología del alginato debido a que si se presentan secciones con estructura compacta y lisa esto podría indicar la presencia de material de biomasa lignocelulósica proveniente de la macroalga.⁸⁸

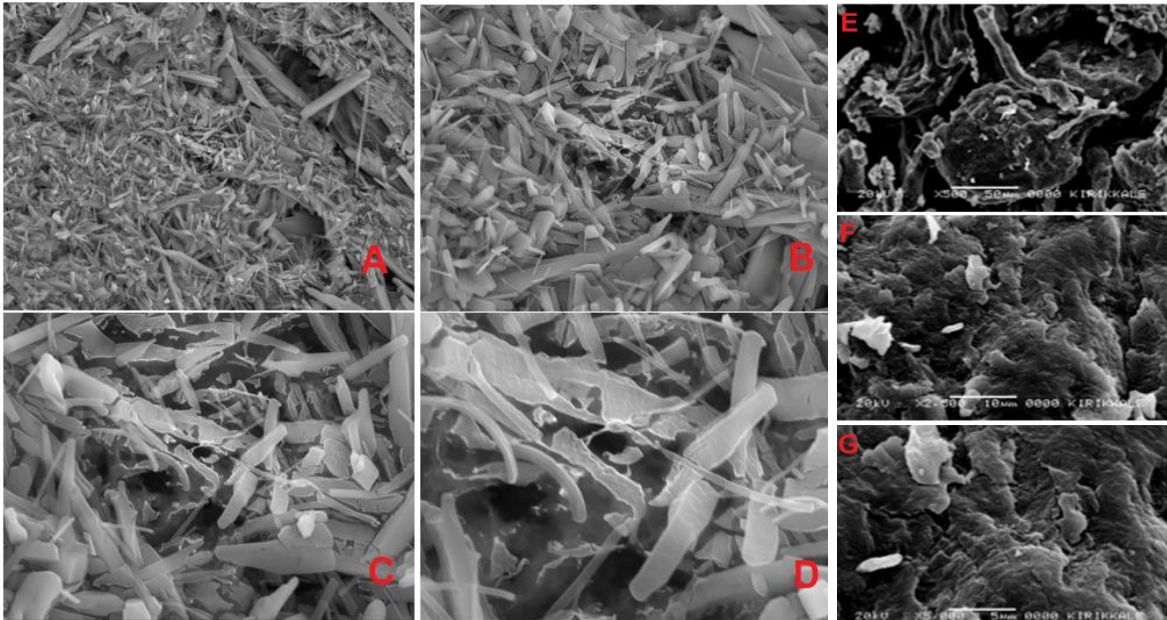


Figura 8.- Micrografías SEM de la muestra 4 a 2000x (A), 5000x (B), 10000x (C) y 20000x (D).
Micrografías SEM del alginato de sodio a 500x (E), 2500x (F), 5000x (G).⁸⁷

El análisis elemental de diversas regiones de la muestra 4 se obtuvo de la micrografía que se muestra en la Figura 9. En esta figura se resaltan 3 regiones, A, B y C que presentan pequeñas diferencias en su morfología. La región A muestra una estructura mucho más grande que las demás en esa misma región, con bordes lisos, las regiones B y C muestran partículas de menor tamaño, pero igualmente alargadas y lisas. Estas tres regiones se eligieron para el análisis de composición elemental por ser representativas de las diferencias observadas en esta micrografía. El análisis determinó la presencia de carbono, oxígeno y sodio en proporciones similares (Tabla 3) en las regiones A, B y C por lo que se determina que a pesar de las diferencias morfológicas todas las regiones presentan los mismos elementos que conforman la estructura del alginato de sodio.

Tabla 3.- Porcentaje en peso de la muestra 4 en las zonas A, B y C

Elemento	% Peso		
	Zona A	Zona B	Zona C
C	33.38	21.67	20.02
O	43.31	46.86	46.85
Na	23	31.35	33.13

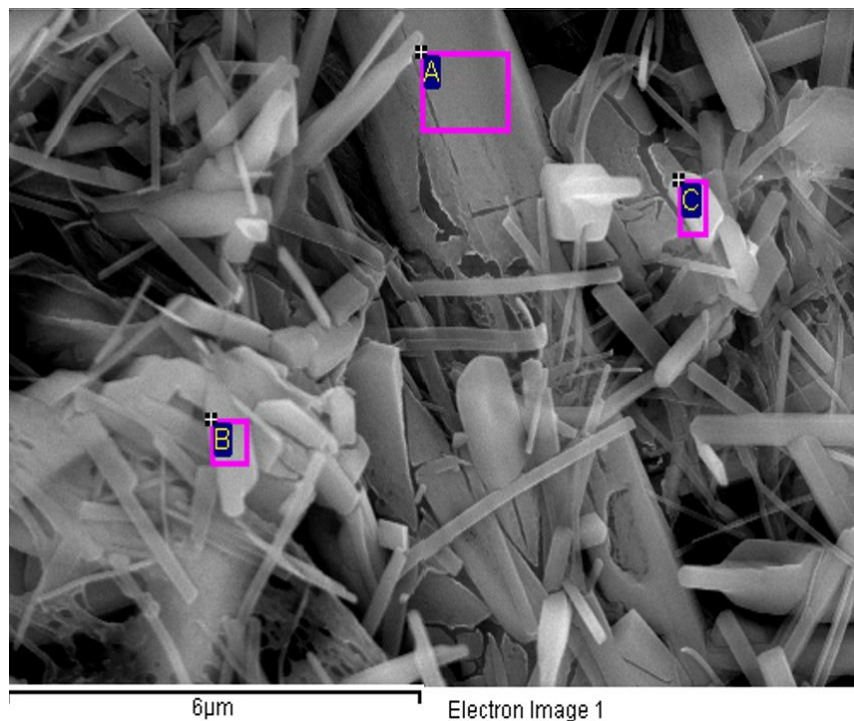


Figura 9.-Micrografía SEM de la muestra 4 de alginato de sodio donde se muestran las tres regiones (A, B y C) en donde se realizó el análisis EDS.

Otras muestras de alginato de sodio (2 y 3) presentaron morfología esférica o de hilos, probablemente por la recristalización en etanol y acetona (ver Figuras A1 y A2 en el anexo)

Para continuar con la caracterización del sólido, se empleó la técnica de difracción de rayos X de polvos (DRX). En la Figura 10, se observa el difractograma de la muestra 4 de alginato de sodio extraído de *Sargassum* spp. En ella se observan los patrones de rayos X para el alginato de sodio comparados con la

biblioteca del difractómetro. El alginato de sodio se caracteriza por dos picos cristalinos aproximadamente en 2θ a 13 y 22.^{87,89}

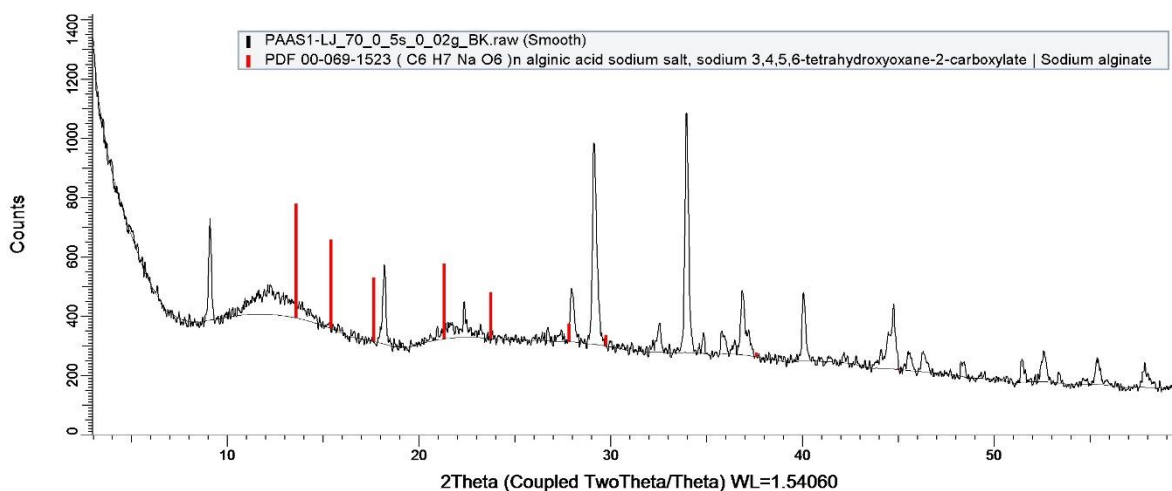


Figura 10.- Patrón de difracción de la muestra 4 de alginato de sodio.

Los alginatos son copolímeros lineales binarios de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico con uniones 1 \rightarrow 4. En la Figura 11 se observa la presencia de los desplazamientos en 67.4 ppm, 70.3 ppm, 80.4 ppm, 101.1 ppm y 175.7 ppm que se asignaron al C-3 de GG, C-3 de MM, C-4 de GG, C-1 de MM y C-6 de MM respectivamente (ver Figuras A3, A4 y A5 en los anexos). Gómez et al.,⁹⁰ reportan espectros de RMN de ^{13}C para el alginato de sodio los cuales fueron divididos en tres regiones: carbonos base OH de las piranosas (60-90 ppm), carbonos anoméricos (90-110 ppm) y carbonilos (170-180 ppm). En la Tabla 4 se comparan los desplazamientos obtenidos con los reportados en la literatura.

Tabla 4.- Asignación de carbonos de RMN de ^{13}C de la muestra 4 de alginato de sodio.

δ ppm	Asignación de carbono
67.4 (67.3) ⁹¹	C-3 de GG
70.3 (70.1) ⁹¹	C-3 de MM
80.4 (80.8) ⁹¹	C-4 de GG
101.1 (100.7) ⁹¹	C-1 de MM
175.7 (176.4) ⁹¹	C-6 de MM

Es importante analizar el espectro de RMN de ^{13}C debido a que los desplazamientos de los carbonos nos ayudan a identificar las correspondientes unidades atribuibles a G y M del alginato.⁸⁹ Fertah et al., reportan que la temperatura de análisis afecta positivamente a la viscosidad reduciendo la amplitud del pico, por lo que en la literatura reportan el análisis del alginato a una temperatura de 80 °C.^{48,59}

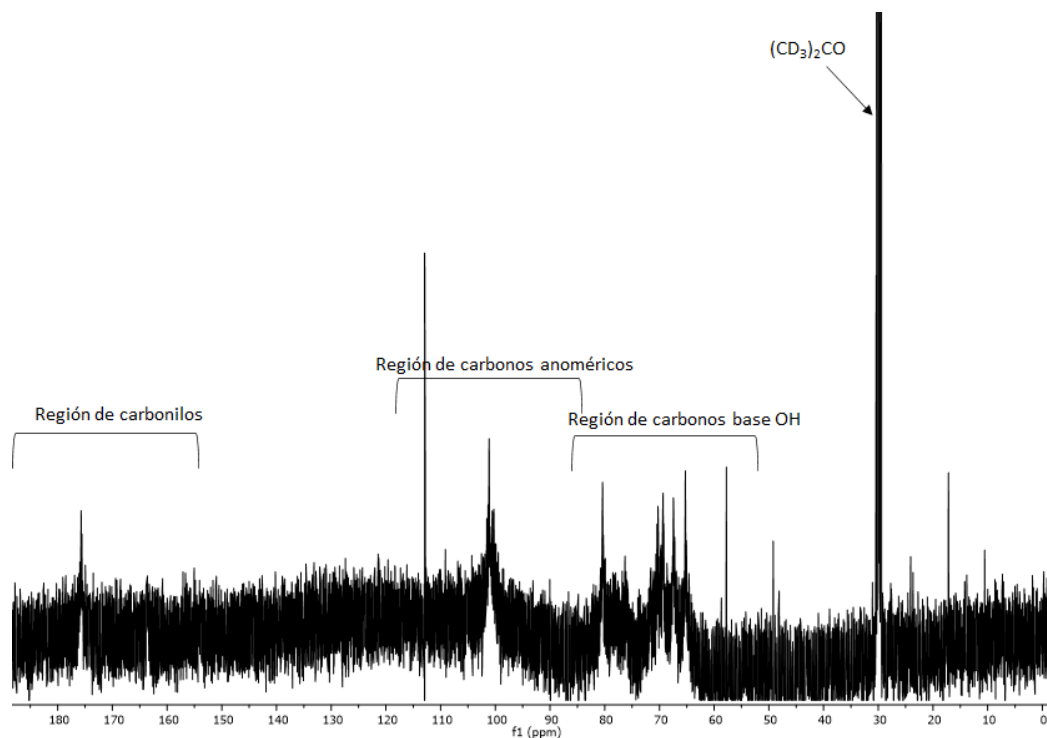


Figura 11.-Espectro de RMN de ^{13}C de la muestra 4 de alginato de sodio.

En la Figura 12 se presenta el espectro de RMN de ^1H del alginato a temperatura ambiente en él se observan las señales principales que conforman a los grupos de cadenas M y G. En este espectro se observan las señales características del protón anomérico del ácido gulurónico en 4.94 ppm, el H-5 del ácido gulurónico en 4.33 ppm y el protón anomérico del ácido manurónico en 4.72 ppm.⁹² Salomonsen et al.,⁹³ reportan los espectros de RMN de ^1H en los cuales se observa en 5.07 el protón anomérico de ácido gulurónico, en 4.70 ppm el protón anomérico del ácido manurónico y en 4.46 ppm el H-5 de las unidades G adyacentes a M.^{10,48}

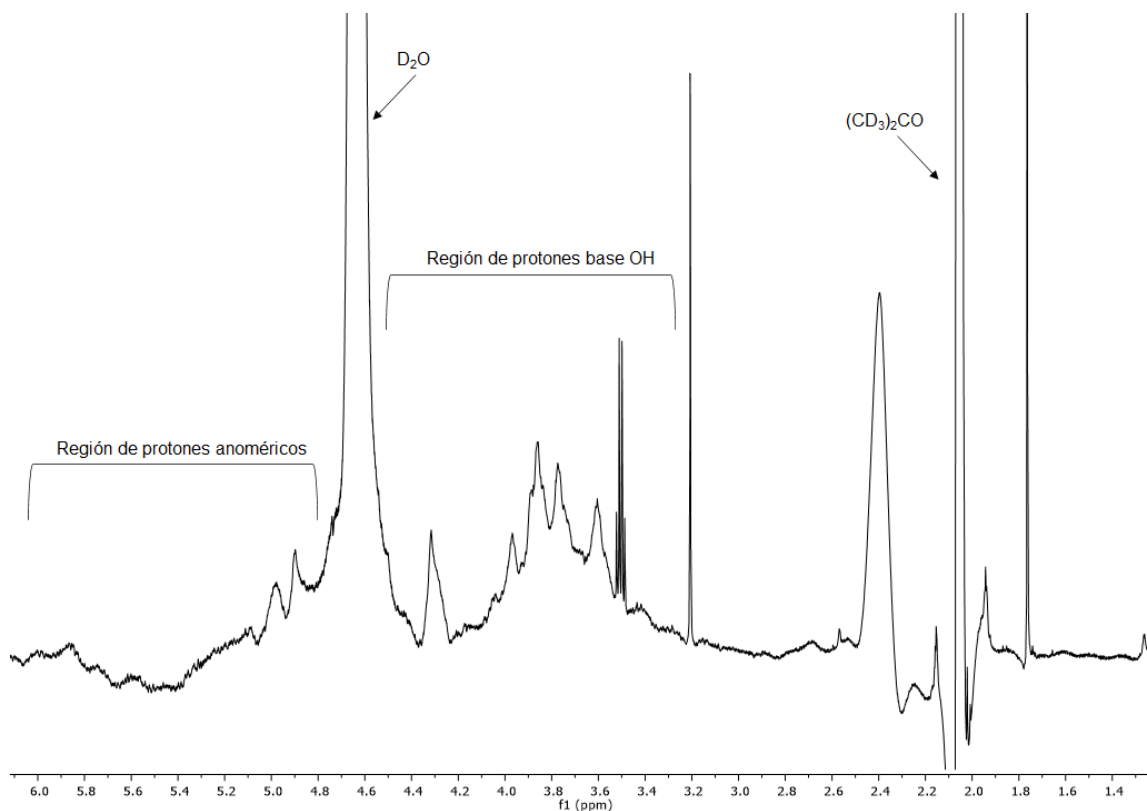


Figura 12.- Espectro de RMN de ^1H de la muestra 4 de alginato de sodio.

En la Figura 13 se presentan los espectros de RMN de ^1H del alginato de sodio a temperatura variable desde 40 hasta 70 °C. En esta figura se observa que las señales presentan una mayor definición al aumentar la temperatura, esto se vuelve más evidente a 70 °C. La importancia de la espectroscopia de RMN radica en que representa un método fiable para la determinación de las estructuras del polímero y la composición de los bloques de moléculas del alginato.⁹² A 70 °C se observan las señales en 4.51, 4.61, 4.94 y 5.15 ppm que se asignaron al protón G-5 del ácido gulurónico, al protón anomérico del ácido manurónico M-1, al protón de bloques alternos GM-5 y al protón anomérico del ácido gulurónico G-1.⁴⁸ (Ver anexos, Figura A6)

Los resultados que se discutieron previamente nos indican la presencia de bloques heteropoliméricos G y M. Además, en el espectro de la Figura 12 de RMN de ^1H se observa la presencia de bloques alternos GM-5 (en 5.15 ppm), indicativo de que la muestra de alginato de sodio presenta dichas uniones heteropoliméricas de bloques GM.

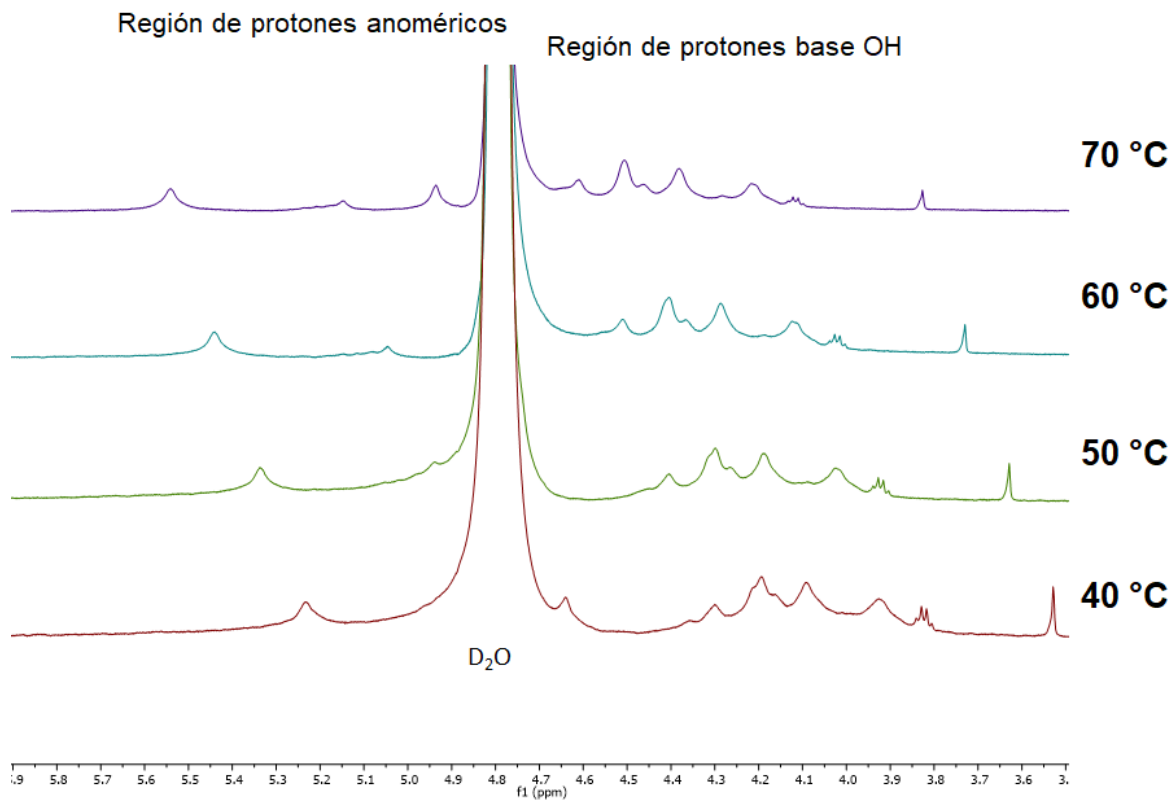


Figura 13.- Espectro de RMN de ^1H de la muestra 4 de alginato de sodio a temperatura variable.

4.1.1 Despolimerización del alginato de sodio

El proceso de despolimerización del alginato de sodio se utiliza para caracterizar la composición y la distribución de los dos residuos de ácidos, es útil para el trabajo cuantitativo cuando solo se dispone de pequeñas cantidades de material. Chandía et al.,⁹⁴ realizaron la despolimerización por medio de hidrólisis total con H_2SO_4 , la cual consistió en mezclar el alginato de sodio con H_2SO_4 al 80% en frío y dejarlo en agitación durante 18 h a temperatura ambiente, posteriormente enfriar a $0\text{ }^\circ\text{C}$, para añadir agua a la mezcla resultante y finalmente llevar a reflujo durante 6 h. Panikkar y Brasch realizaron la hidrólisis total con ácido fórmico, para este procedimiento disolvieron el alginato de sodio en ácido fórmico al 90% en tubos sellados y se calentaron durante 2, 4 o 6 h a $100\text{ }^\circ\text{C}$ en un horno, posteriormente se diluyeron en agua destilada y se hidrolizaron durante 2 h a $100\text{ }^\circ\text{C}$. La solución se evaporó en vacío y el exceso de ácido se eliminó mediante evaporaciones repetidas con agua destilada, el residuo se redisolvió en agua destilada y se le agregó trietilamina.⁹⁵ Para la hidrólisis parcial, Chandía et al., utilizaron una solución acuosa de alginato de sodio al 1% y agregaron HCl 3 M, calentaron durante media hora a

100 °C. El precipitado se recuperó por centrifugación, se suspendió en agua y finalmente se disolvió hasta una concentración final de 1%. La solución se ajustó a un pH de 2.85 por adición de HCl 1M.⁹⁴ Salomonsen et al., realizaron una hidrólisis parcial en la cual disolvieron alginato de sodio humedecido con etanol en HCl, ajustaron el pH a 5 mediante la adición de NaOH e hidrolizaron a 100 °C bajo reflujo durante 10 min, la mezcla se enfrió y el pH se ajustó a 3 con HCl para calentar nuevamente a reflujo durante 20 min. Finalmente, la mezcla se neutralizó a pH 7 mediante la adición de NaOH y se precipitó en etanol. Para este trabajo se realizó la despolimerización por hidrólisis parcial ácida como se reportan comúnmente en los estudios descritos.^{59,93–96}

En la despolimerización del alginato se obtuvieron 8 fracciones las cuales tienen la nomenclatura de F1 a F8, etc. Las fracciones que presentan las señales que destacan la presencia de fragmentos de alginato fueron F3, F4, F5, F7 y F8. En la Figura 14 se observa la comparación de los espectros entre los fragmentos en la región de los carbonilos, en ellos se aprecia una señal en 167.8 ppm en F3, F4, F5 y F8 a esta señal se le asigna C-6 del ácido gulurónico⁹¹ y el pico en 165.8 ppm no ha sido reportado en la literatura. En la Figura 15 se observa la comparación entre las regiones de carbonos base OH, la señal en 64.8 ppm en F4, F5, F7 y F8 se asigna al C-2 del bloque GG del ácido gulurónico⁹¹, las señales en 65.8 y 62.0 ppm no han sido reportadas en la literatura.

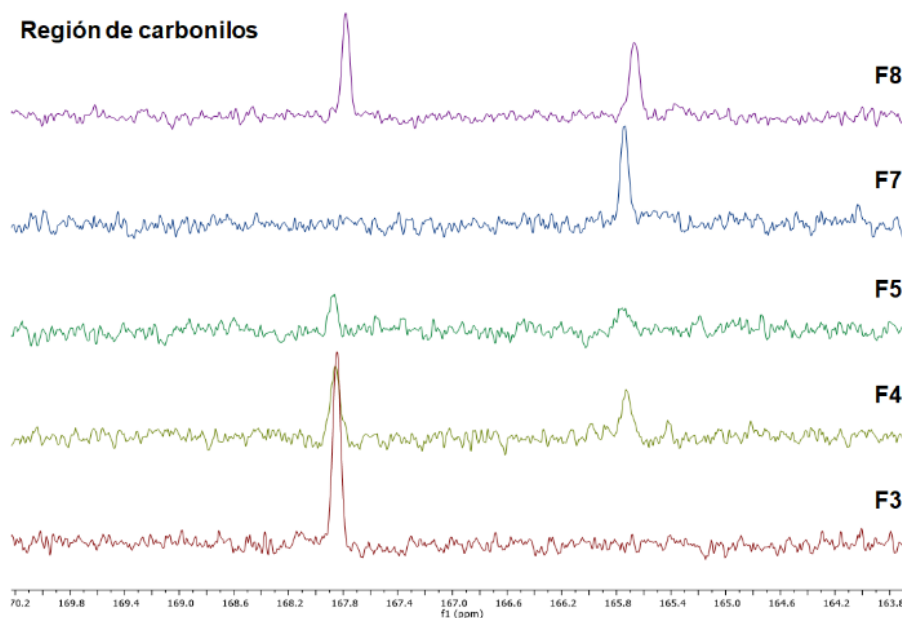


Figura 14.- Espectros apilados de RMN de ¹³C de los fragmentos F3, F4, F5, F7 y F8 región 163-170 ppm.

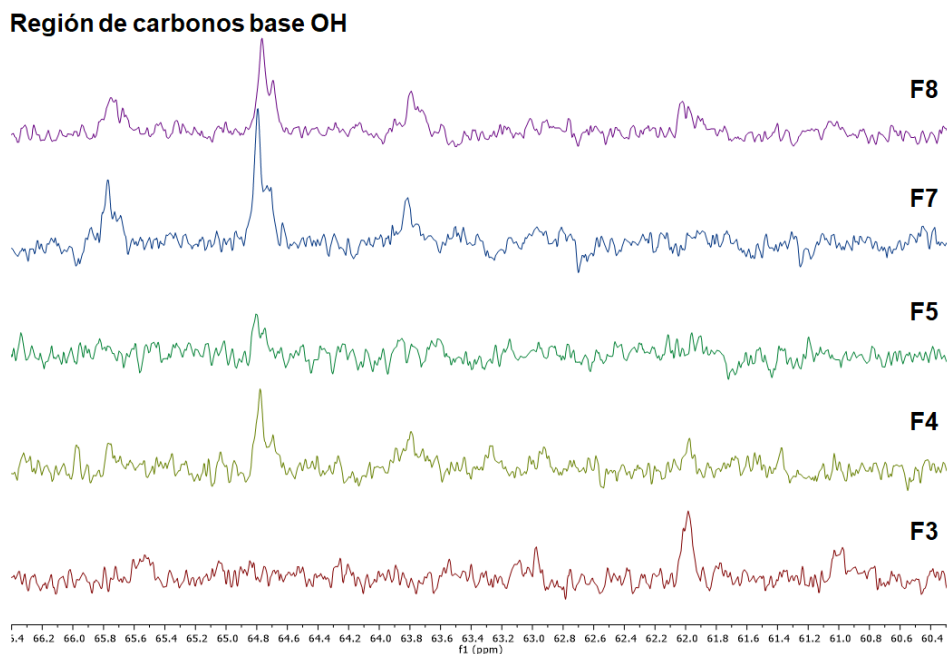


Figura 15.- Espectros apilados de RMN de ^{13}C de los fragmentos F3, F4, F5, F7 y F8 región 60-67 ppm.

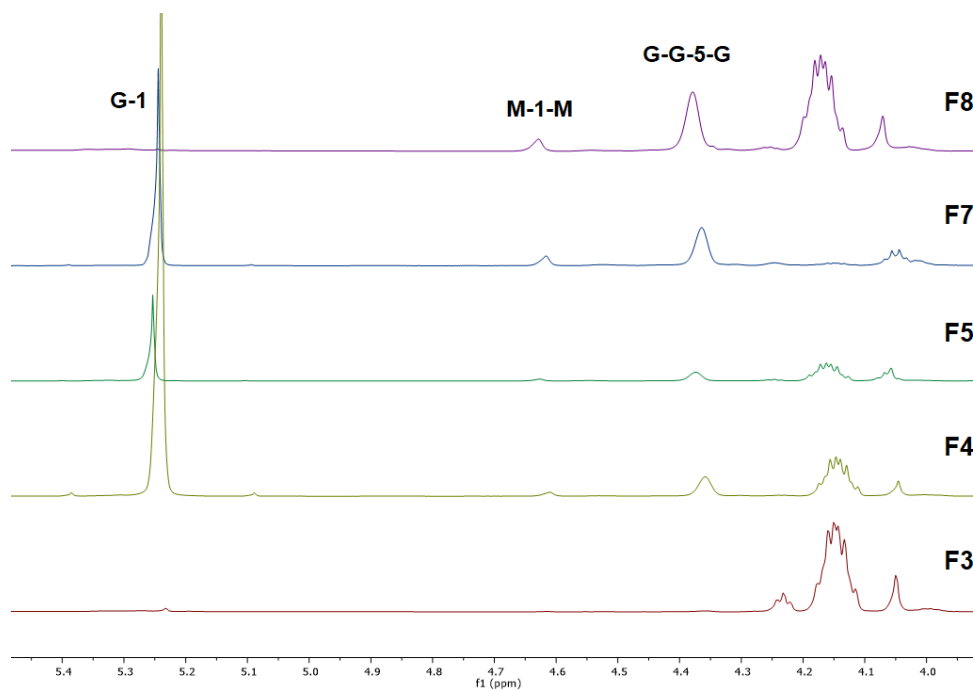


Figura 16.- Espectros apilados de RMN de ^1H de los fragmentos F3, F4, F5, F7 y F8 región 4-6 ppm.

De acuerdo con Kam et al., las señales que se presentan entre 5.2 y 5.3 ppm representan restos del ácido gulurónico del carbono anomérico,^{90,97} mientras que las señales cercanas a 4.60 ppm denotan la señal del protón anomérico de un residuo de ácido manurónico que tiene como vecino a otro ácido manurónico en un

bloque MM, la señal cercana a 4.40 ppm representa el H-5 protón central del ácido gulurónico en una triada GGG.⁹⁷ Salomonsen et al., reportan la señal cercana a 4.40 ppm como la señal del protón anomérico del ácido gulurónico.^{94,98} En la Figura 16 podemos observar los picos que representan a los protones característicos de los ácidos manurónico y gulurónico.

4.2 Digestión anaerobia del residuo de *Sargassum* spp.

Para la digestión anaerobia se consideró un biodigestor tipo Batch a una temperatura de 37 °C y se ensambló el sistema como lo reportan Lozada y Perez.⁹⁹ El reactor tipo Batch es el tipo de reactor que se utiliza comúnmente en la literatura como biodigestor.^{100–104} Los experimentos consistieron en utilizar como inóculo agua residual de la industria cervecera y tres diferentes sustratos, la Tabla 5 muestra los experimentos realizados.

Tabla 5.- Experimentos de la digestión anaerobia. Blanco (B), control positivo (C+) y el residuo de la extracción de alginato (S)

Muestra	Sustrato	Inóculo
B	-	Agua residual cervecera
C+	Sacarosa	Agua residual cervecera
S	Residuo de la extracción de alginato de sodio	Agua residual cervecera

La cantidad de biogás generado se evaluó por el método volumétrico en cada uno de los experimentos que se realizaron. Las ventajas de esta técnica son la precisión y la sencillez para la cuantificación del biogás.⁹⁹

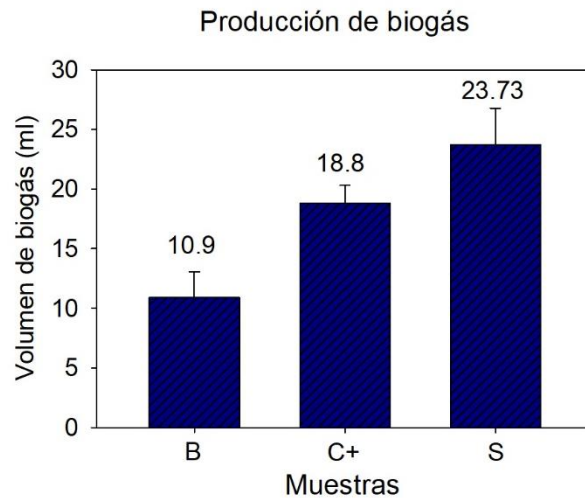


Figura 17.- Volumen generado por diferentes sustratos. Blanco (B), control positivo (C+) y residuo de la extracción de alginato del *Sargassum* spp. (S). (Anova 1 vía, $\alpha=0.05$)

El blanco (B) se empleó para poder determinar el biogás que genera el consorcio microbiano cuando no contiene un sustrato. El control positivo (C+) se realizó para la comparación entre un sustrato “simple” en este caso la sacarosa y el residuo de la extracción del alginato del *Sargassum* spp (S). De acuerdo con los resultados que se presentan en la Figura 17 la muestra S fue la que produjo más biogás, ya que mostró una diferencia significativa (Anova 1 vía, post hoc Tukey) en comparación con el C+. Por lo que se puede determinar que el volumen generado por la muestra compleja es mayor que un sustrato de fácil degradabilidad bacteriana, dando indicios de ser una materia prima promisoría para la generación de biogás.

Un método eficaz para el análisis de componentes múltiples y análisis espectral de especies desconocidas es la espectroscopía infrarroja, ya que este método permite la detección *in situ* de gas con alta sensibilidad y resolución espectral.¹⁰⁵ Además de que es una técnica no destructiva con menor o ningún requisito de preparación y proporciona una rápida medición de las cantidades relativas de las especies.^{106,107} Por este motivo el biogás que se generó se caracterizó por espectroscopía infrarroja. En la Figura 18 se observan los enlaces característicos de algunos compuestos.

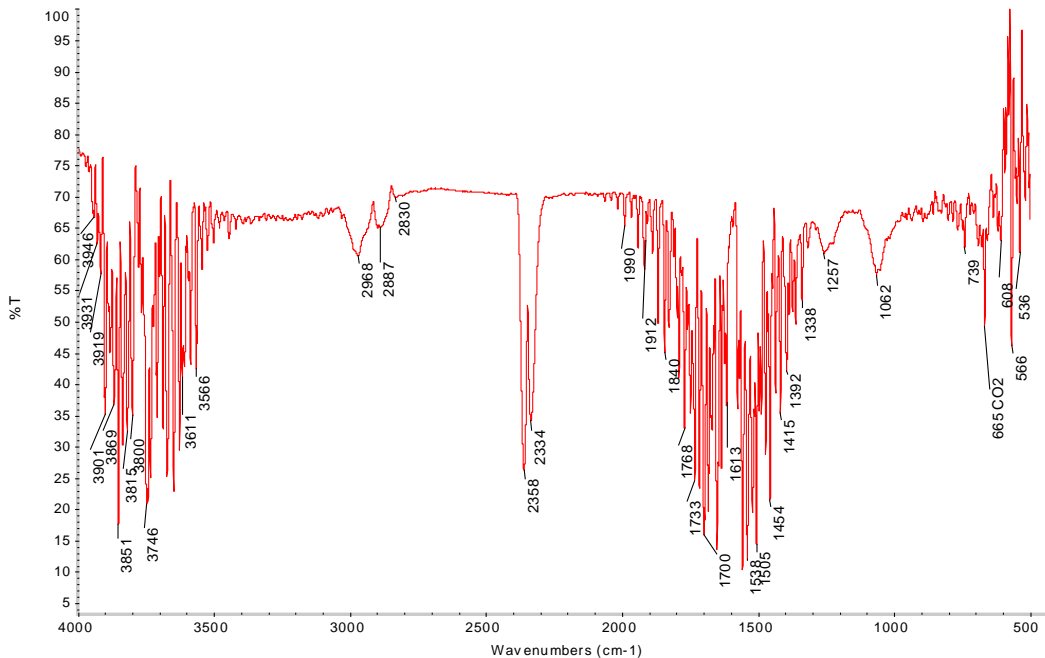


Figura 18.- Espectro IR del biogás generado a partir de la muestra S.

El CO₂ presenta dos picos fundamentales en las regiones de 2380-2350 cm⁻¹ y 2350-2310 cm⁻¹ los cuales corresponden a los picos en 2358 y 2334 cm⁻¹ respectivamente. También se observa la presencia de vapor de agua debido a los picos en las regiones 3750-3530, 1805-1695, 1545 y 1395 cm⁻¹. En 2900 cm⁻¹ se observan las vibraciones típicas del enlace C-H. En la región 3500 a 4000 cm⁻¹ se observan vibraciones O-H y N-H probablemente de tipo aromático, en la región 1990 a 1338 cm⁻¹ grupos carbonilo, posiblemente carboxilo y aminas primarias aromáticas, en 1257 y 1062 cm⁻¹ fosfatos orgánicos, en 665 cm⁻¹ una banda que también corresponde a CO₂. Las bandas en la región 2830-2970 y 1338-1454 cm⁻¹ indican la presencia del CH₄.¹⁰⁸

5 DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1 Generalidades

Los espectros de infrarrojo para el alginato de sodio se registraron en un espectrofotómetro de infrarrojo Agilent Cary 630 utilizando la técnica ATR (Attenuated Total Reflection, por sus siglas en inglés), los espectros de infrarrojo para el biogás se registraron en un espectrofotómetro NEXUS 670 Thermo Nicolet utilizando IGS gas cells, ambos datos se expresan en cm^{-1} (número de onda). Los análisis elementales se realizaron por SEM-EDS en un microscopio electrónico de la marca JEOL JSM-7600 F. Las muestras fueron previamente colocadas en una cinta de cobre y se recubrieron de una mezcla de 80% oro/20% paladio durante 40 s. Los análisis de difracción de rayos X de polvos se realizaron en un Difractómetro Bruker D-8 Advance con un ánodo de cobre en las siguientes condiciones: 40kV, 30 mA, paso de 0.02° y tiempo de paso de 0.5 segundos. Los experimentos de resonancia magnética nuclear se realizaron en un espectrómetro Varian 600 MHz AR Premium Compact con sonda de líquidos OneNMR $^1\text{H}/^{19}\text{F}/^{15}\text{N}-^{31}\text{P}$ 5mm con gradiente de campo pulsado (PFG). El registro de ^1H se llevó a cabo a 600 MHz, mientras que el de ^{13}C se llevó a cabo a 150 MHz. Como disolventes se utilizaron cloroformo deuterado (CDCl_3), acetona deuterada (CD_3COCD_3) y óxido de deuterio (D_2O). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz). Los experimentos a temperatura variable se realizaron en un rango de 40 hasta 70 $^\circ\text{C}$. El procesamiento de los espectros se realizó con ayuda del software MestReNova versión 12.0.0 de MestreLab Research S. L. Las muestras de *Sargassum* spp. se secaron en una estufa Lindberg Blue BF51842PBC marca Thermo Scientific. La cromatografía en capa fina se realizó con placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor que contienen indicador de fluorescencia (F_{254}), para su revelado se utilizó la calcinación, previo tratamiento con molibdato de amonio/sulfato de cerio. La cromatografía en columna se realizó en una columna de vidrio empacada con gel de sílice grado 60. El *Sargassum* spp. fue donado por la Dra. Leticia Olivera Castillo y el Mtro. César Puerto Castillo del Laboratorio de Nutrición Acuícola. Las aguas residuales de la industria cervecera fueron proporcionadas por la empresa “La

Ceiba” ubicada en Mérida, Yucatán. Los reactivos y disolventes empleados fueron adquiridos en Merck/Sigma-Aldrich y Conquimex en grado reactivo.

5.2 Alginato de sodio

5.2.1 Extracción del alginato de sodio

Las muestras se lavaron con agua de grifo para eliminar los residuos de arena. Posteriormente, las algas se introdujeron en una máquina de lavado ultrasónico Branson 3800 marca Emerson con agua destilada durante 30 min. Al finalizar el lavado se secaron a 60 °C durante 24 h. Finalmente se trituraron y almacenaron en una bolsa de plástico a 3 °C.

El alginato se extrajo de acuerdo con el procedimiento descrito por Fenoradosoa et al.,⁵⁹ con algunas modificaciones. Para el primer experimento, se pesaron 10 g de muestra y se colocaron en un vaso de precipitados que contenía una solución de formaldehído (CH₂O) al 4%, esta mezcla se mantuvo en agitación constante a 350 rpm. La fase sólida se extrajo filtrando al vacío y se lavó tres veces con agua destilada. Nuevamente, el sólido se colocó en un vaso de precipitados el cual contenía ahora una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.2 M. Las muestras fueron nuevamente filtradas al vacío y lavadas con agua destilada. El sólido resultante se colocó en una solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 2% a temperatura y tiempo variable (ver Tabla 2). Al finalizar este tiempo, se filtraron al vacío y se centrifugaron a 4500 rpm durante 30 min en una centrifugadora Sorvall ST 8 marca Thermo Fisher Scientific para eliminar el sobrenadante. La solución que se obtuvo se mezcló con etanol 96% v/v para precipitar el alginato de sodio. Tras este tratamiento, se realizó una filtración al vacío para la obtención del alginato de sodio y se lavó con etanol y acetona (1 x 100 ml). Finalmente, el producto se secó a temperatura ambiente. Otros experimentos fueron realizados modificando algunos de los parámetros de la extracción del alginato de sodio. En la Tabla 2 se muestran las variaciones de los parámetros en cada experimento.

5.2.2 Despolimerización del alginato de sodio

Para el experimento de despolimerización, se pesaron 30 mg de alginato de sodio obtenido de la metodología descrita en la sección 5.2.1 (muestra 4), se disolvieron en agua destilada hasta obtener una solución al 0.1% w/v y el pH se

ajustó a 5.6 adicionando HCl 0.1 M. La mezcla se llevó a reflujo a 100 °C durante 1 h con agitación constante. Al finalizar el reflujo, se neutralizó a un pH de 7 utilizando solución saturada de bicarbonato de sodio. La fase orgánica se extrajo con diclorometano y acetato de etilo, por separado, en un embudo de separación. Ambas fases se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron y concentraron a presión reducida en un rotavapor. El crudo de reacción obtenido se secó a alto vacío y se purificó por cromatografía en columna empleando un sistema de disolventes Hex/AcOEt (1:1), DCM/MeOH (95:5) y DCM/MeOH (9:1). Los productos obtenidos se caracterizaron por RMN de ^1H y ^{13}C .

5.3 Digestión anaerobia

La cantidad de biogás generada se determinó empleando dos tipos de sustrato como fuentes de carbono. Para calcular la producción de biogás se empleó el método volumétrico el cual se basa en la cuantificación del volumen de gas producido mediante el uso de una sustancia que se desplaza, en este caso se empleó una solución acuosa de NaOH al 3%. El empleo de la solución de NaOH se debe a que reacciona con el CO_2 presente en el biogás para formar Na_2CO_3 , permitiendo una medición más aproximada del volumen del CH_4 producido.

El equipo experimental se elaboró como muestra la Figura 19. En el reactor 1 (R1) se depositaron las muestras por triplicado como se señala a continuación:

- Experimento 1. Blanco de agua cervecera (B). Sólo se utilizaron 10 ml de agua cervecera para poder cuantificar la cantidad de biogás que se produce sin ninguna modificación.
- Experimento 2. Control positivo (C+). En esta condición, se utilizó 1 g de sacarosa como fuente de carbono y se agregaron 10 ml de agua residual cervecera. La finalidad de este experimento fue contar con un marco referencial de producción de biogás que se puede generar con una cadena de carbono corta (disacárido) y de fácil adquisición.
- Experimento 3 (S). En esta condición, se utilizó como sustrato 1 g del residuo de la extracción del alginato del *Sargassum* spp. El sustrato se lavó con agua destilada y posteriormente se secó a 60 °C durante 48 h para finalmente ser molido.

Cada una de las muestras se agitó durante 30 min, posteriormente el pH se ajustó a 7 y se sellaron los viales.

Una vez sellados los viales se calentaron a una temperatura constante de 37 °C con agitación magnética a 500 rpm durante 5 días. El reactor 2 (R2) en todos los casos contenía 100 ml de una solución de NaOH al 3% con 20 gotas de fenolftaleína, la cual se emplea como revelador de la reacción de la base con el CO₂ presente en el biogás.

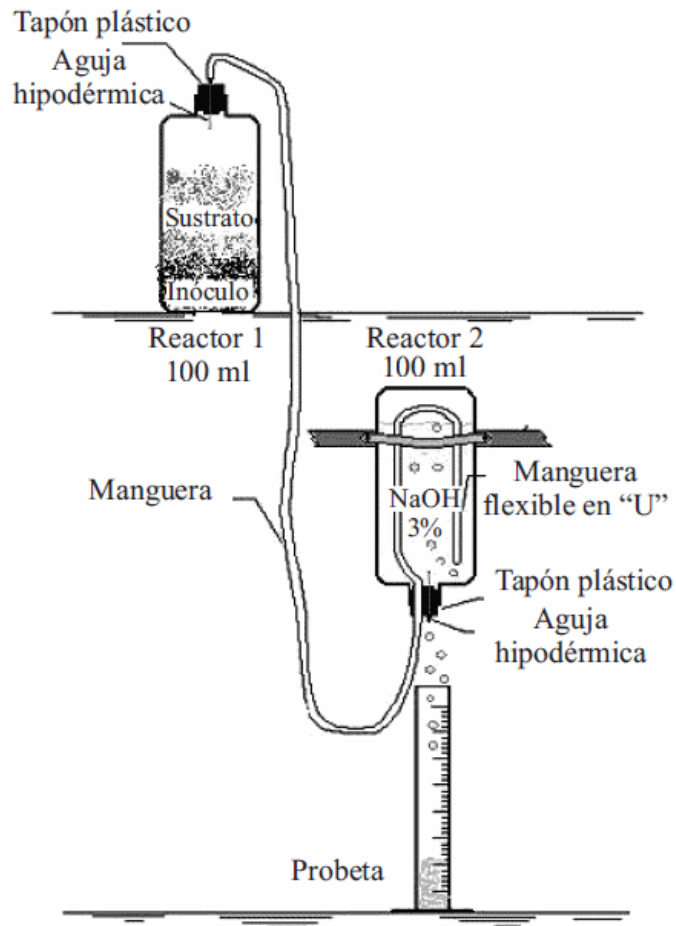


Figura 19.-Sistema del montaje para la captura del biogás.⁹⁹

6 CONCLUSIONES

El alginato de sodio se extrajo exitosamente del *Sargassum* spp. con un rendimiento de 12.3 w/w que es ligeramente inferior que el rendimiento de alginato obtenido de la especie *Sargassum filipendula* (referencia). El mayor rendimiento se obtuvo con la metodología que incluye la hidratación con una solución de formaldehído al 4% durante 30 minutos y una extracción en medio ácido con HCl (0.2 M) durante 2 h. Para la especie *Sargassum* spp., se encontró que el mayor rendimiento (12.3 w/w) en la extracción alcalina fue a 100 °C durante 3 horas.

Los análisis de espectroscopia de IR, RMN, así como la difracción de rayos X resaltan la presencia de señales características de bloques de ácido gulurónico y ácido manurónico los cuales son indicadores de la presencia de alginato de sodio. El análisis de RMN de ^1H y ^{13}C del alginato de sodio despolimerizado presenta desplazamientos característicos que representan restos del ácido gulurónico del carbono anomérico y señales que denotan el protón anomérico del residuo de ácido manurónico indicando la presencia de los fragmentos que conforman al alginato de sodio evidenciando su extracción.

Por otro lado, la espectroscopia de IR para el gas generado en la digestión anaerobia indicó la presencia de señales del metano junto con dióxido de carbono y vapor de agua, con esto se confirma que es posible obtener biogás a partir de los residuos de la extracción del alginato de sodio del *Sargassum* spp.

Además, el agua residual de la industria cervecera mostró ser un medio idóneo para la degradación de residuos orgánicos dándole un valor agregado a un subproducto considerado desecho.

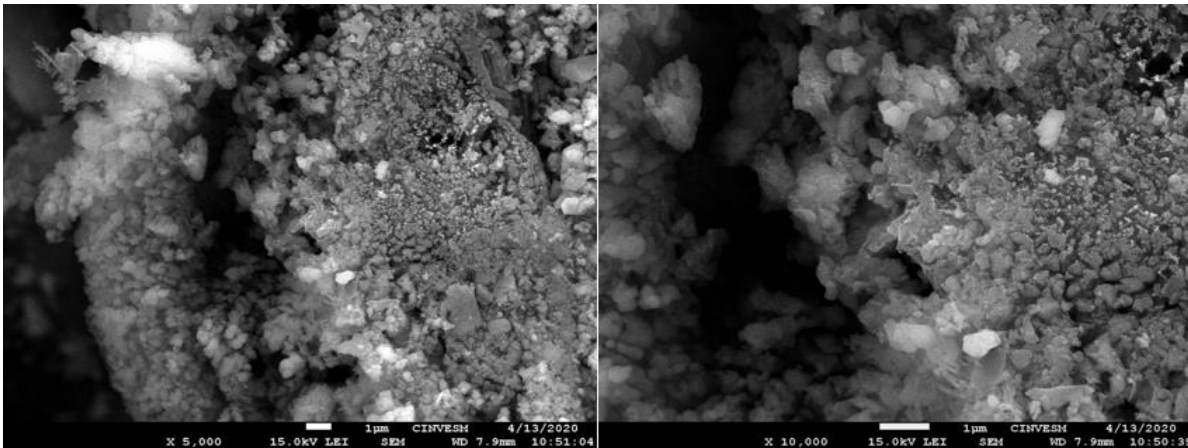
En general, los residuos orgánicos de la extracción del alginato de sodio del *Sargassum* spp. mostraron ser una materia prima promisoría para la producción de energías alternas, ayudando a la formación de economías circulares.

7 PERSPECTIVAS

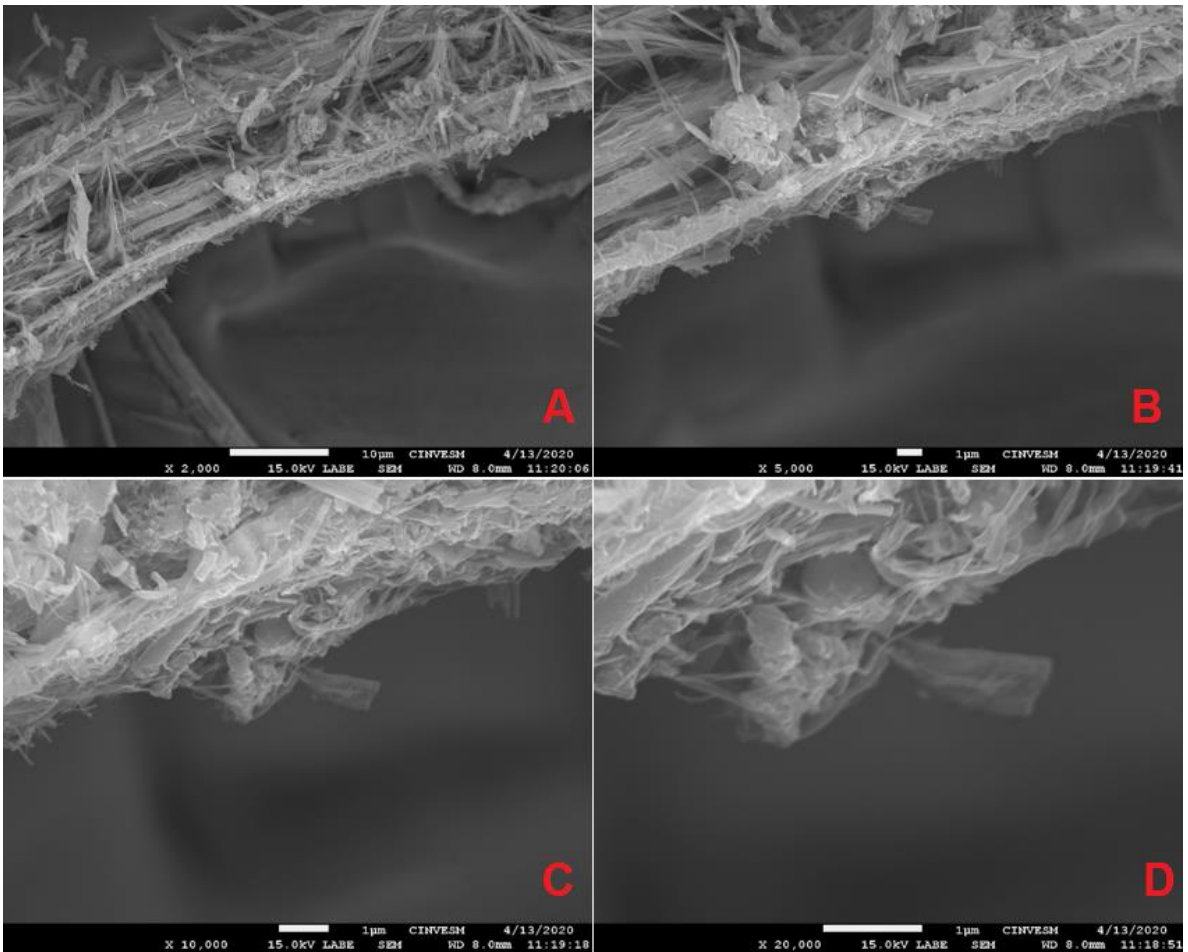
A partir de los experimentos y discusiones presentados en la tesis, las perspectivas son las siguientes:

- Probar distintas formas de extracción, purificación y cristalización del alginato de sodio.
- Analizar el biogás por cromatografía de gases para realizar una caracterización cuantitativa de sus componentes.
- Enriquecer el consorcio microbiano para aumentar la producción de metano y ensayar el uso de cosustratos para aumentar la generación de biogás.

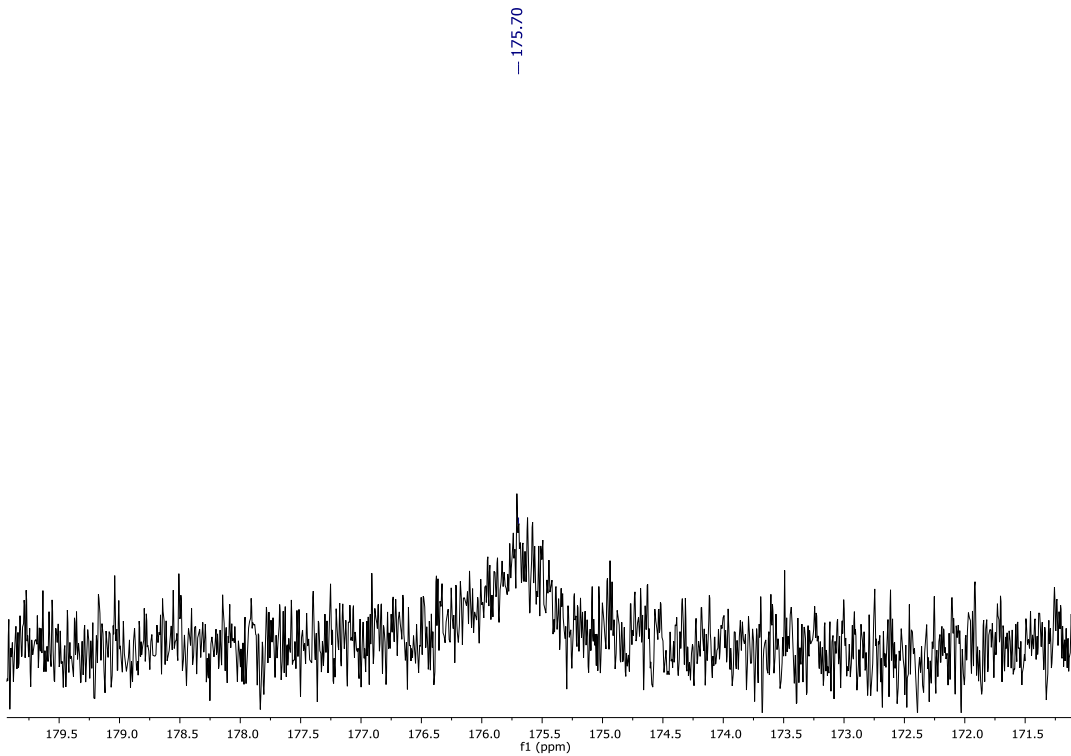
8 ANEXOS



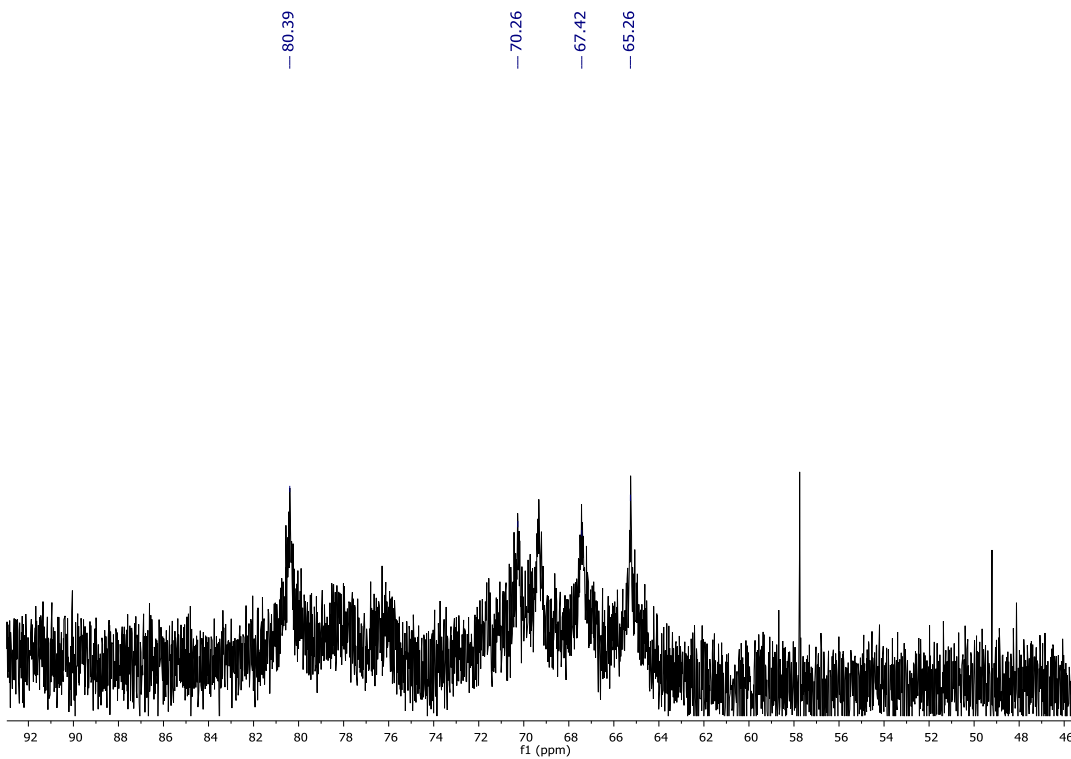
Anexo A1.- Micrografías SEM de la muestra 2 a 5000x (izquierda) y 10000x (Derecha)



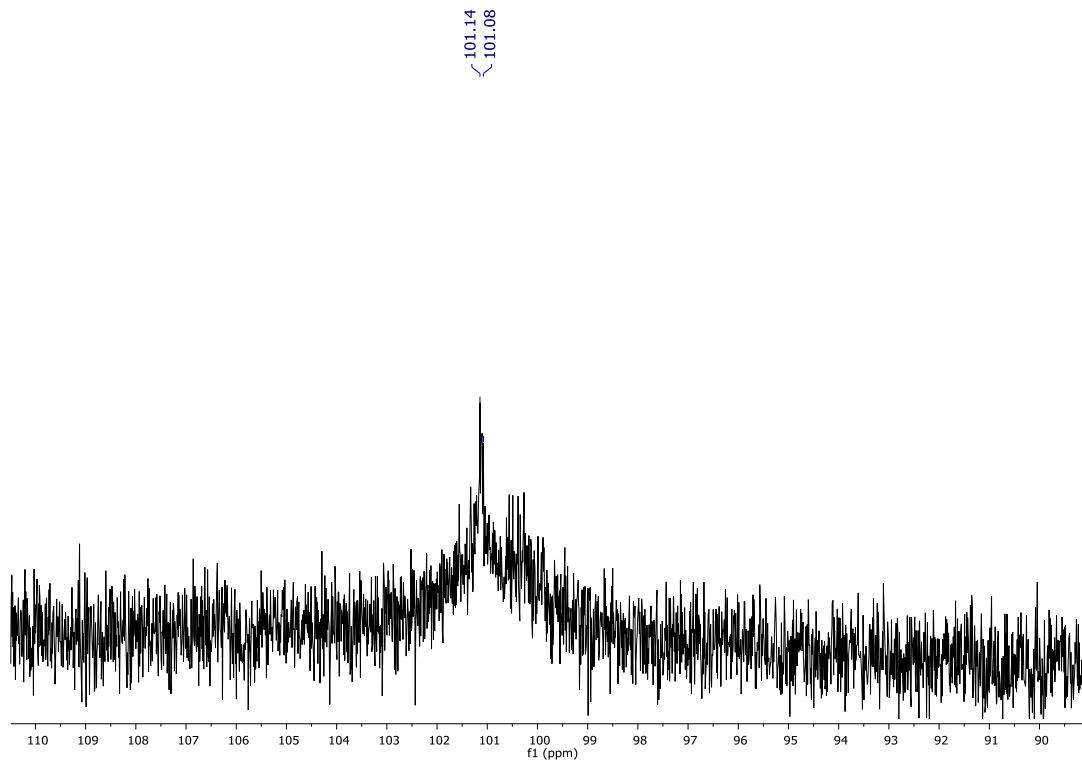
Anexo A2.- Micrografías SEM de la muestra 3 a 2000x (A), 5000x (B), 10000x (C) y 20000x (D).



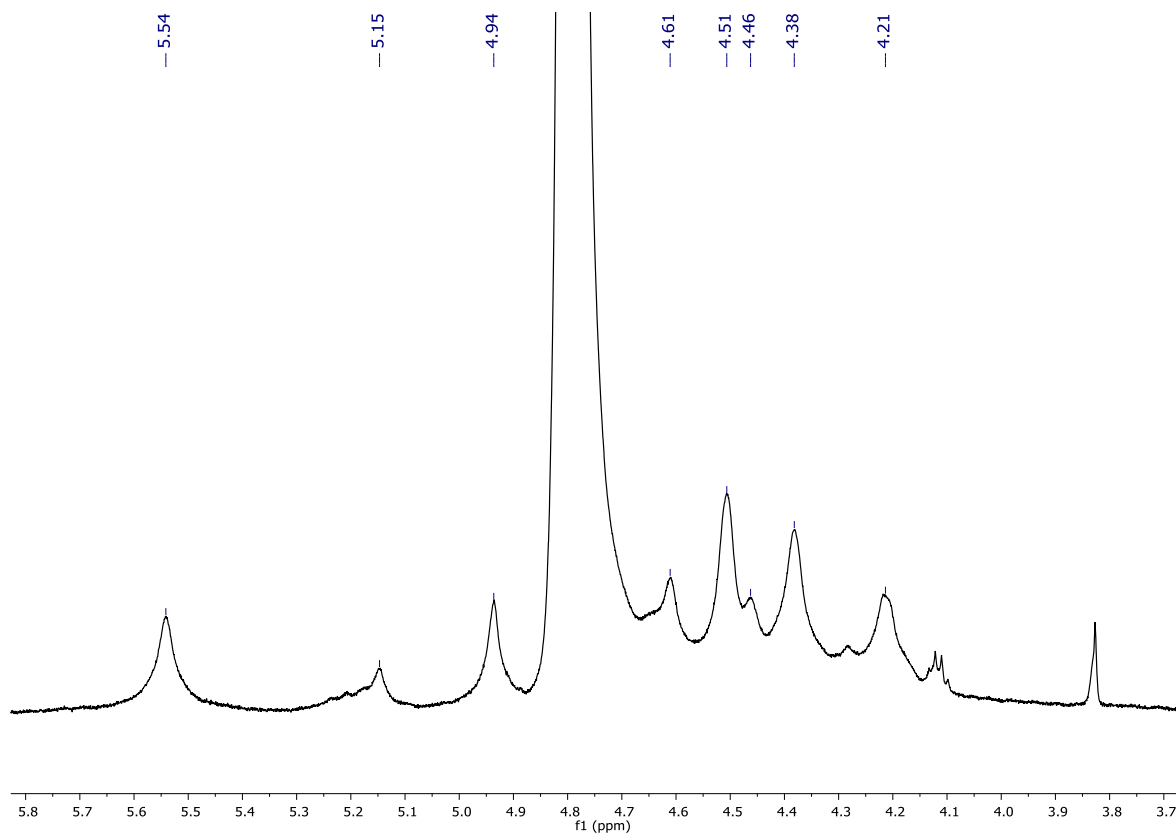
Anexo A3.-Espectros de RMN de ¹³C de la muestra 4 en la región 171-180 ppm.



Anexo A4.-Espectros de RMN de ¹³C de la muestra 4 en la región 46-92 ppm



Anexo A 5.- Espectros de RMN de ^{13}C de la muestra 4 en la región 90-110 ppm



Anexo A6.- Espectros de RMN de ^1H de la muestra 4 en la región 4-6 ppm

9 REFERENCIAS

- (1) Rebours, C.; Marinho-Soriano, E.; Zertuche-González, J. A.; Hayashi, L.; Vásquez, J. A.; Kradolfer, P.; Soriano, G.; Ugarte, R.; Abreu, M. H.; Bay-Larsen, I.; Hovelsrud, G.; Rødven, R.; Robledo, D. Seaweeds: An Opportunity for Wealth and Sustainable Livelihood for Coastal Communities. *Journal of Applied Phycology* **2014**, *26* (5), 1939–1951. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0304-8>.
- (2) Khan, W.; Rayirath, U. P.; Subramanian, S.; Jithesh, M. N.; Rayorath, P.; Hodges, D. M.; Critchley, A. T.; Craigie, J. S.; Norrie, J.; Prithiviraj, B. Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *Journal of Plant Growth Regulation* **2009**, *28* (4), 386–399. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>.
- (3) Muñetón Gómez, M. del S.; Hernández Carmona, G. Crecimiento estacional de *Sargassum horridum* (Setchell y Gardner) Phaeophyta, en la bahía de La Paz. *Investigaciones marinas CICIMAR* **1993**, *8* (1), 24-31.
- (4) Rooker, J.; Turner, J.; Holt, S. Trophic Ecology of Sargassum-Associated Fishes in the Gulf of Mexico Determined from Stable Isotopes and Fatty. *Marine Ecology Progress Series* **2006**, *313*, 249–259. <https://doi.org/10.3354/meps313249>.
- (5) Ávila, E.; Blancas-Gallangos, N. I.; Riosmena-Rodríguez, R.; Paul-Chávez, L. Sponges Associated with *Sargassum* Spp. (Phaeophyceae: Fucales) from the South-Western Gulf of California. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **2010**, *90* (1), 193–202. <https://doi.org/10.1017/S0025315409990580>.
- (6) Van Tussenbroek, B. I.; Hernández Arana, H. A.; Rodríguez-Martínez, R. E.; Espinoza-Avalos, J.; Canizales-Flores, H. M.; González-Godoy, C. E.; Barba-Santos, M. G.; Vega-Zepeda, A.; Collado-Vides, L. Severe Impacts of Brown Tides Caused by *Sargassum* Spp. on near-Shore Caribbean Seagrass Communities. *Marine Pollution Bulletin* **2017**, *122* (1–2), 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.057>.
- (7) Resiere, D.; Valentino, R.; Nevière, R.; Banydeen, R.; Gueye, P.; Florentin, J.; Cabié, A.; Lebrun, T.; Mégarbane, B.; Guerrier, G.; Mehdaoui, H. *Sargassum* Seaweed on Caribbean Islands: An International Public Health Concern. *The*

- Lancet* **2018**, 392 (10165), 2691. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32777-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32777-6).
- (8) Villa Arce, M. Á. Rendimiento y calidad de alginato de alga café Eularia fistulosa (Postel y Ruprecht) M.J. Wynne de las islas aleutianas, Alaska. Tesis licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, Baja California Sur, 2013.
- (9) Yabur Pacheco, R.; Hernández Carmona, G. Producción y propiedades de alginato de *Sargassum sinicola* (Setchell y Gardner) y su aplicación en inmovilización celular. Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional, La Paz, Baja California Sur, 2005.
- (10) Rhein-Knudsen, N.; Ale, M. T.; Ajalloueiian, F.; Meyer, A. S. Characterization of Alginates from Ghanaian Brown Seaweeds: *Sargassum* Spp. and *Padina* Spp. *Food Hydrocolloids* **2017**, 71, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.016>.
- (11) Bertagnolli, C.; Espindola, A. P. D. M.; Kleinübing, S. J.; Tasic, L.; Silva, M. G. C. da. *Sargassum Filipendula* Alginate from Brazil: Seasonal Influence and Characteristics. *Carbohydrate Polymers* **2014**, 111, 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.024>.
- (12) Riaño, B.; Molinuevo, B.; García-González, M. C. Potential for Methane Production from Anaerobic Co-Digestion of Swine Manure with Winery Wastewater. *Bioresource Technology* **2011**, 102 (5), 4131–4136. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.077>.
- (13) Carpentier, B.; Festino, C.; Aubart, C. Anaerobic Digestion of Flotation Sludges from the Alginic Acid Extraction Process. *Biological Wastes* **1988**, 23 (4), 269–278. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(88\)90015-8](https://doi.org/10.1016/0269-7483(88)90015-8).
- (14) Kerner, K. N.; Hanssen, J. F.; Pedersen, T. A. Anaerobic Digestion of Waste Sludges from the Alginate Extraction Process. *Bioresource Technology* **1991**, 37 (1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90107-U](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90107-U).
- (15) Soto, M.; Vázquez, M. A.; de Vega, A.; Vilariño, J. M.; Fernández, G.; de Vicente, M. E. S. Methane Potential and Anaerobic Treatment Feasibility of *Sargassum muticum*. *Bioresource Technology* **2015**, 189, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.074>.

- (16) Morero, B.; Gropelli, E.; Campanella, E. A. Life Cycle Assessment of Biomethane Use in Argentina. *Bioresource Technology* **2015**, *182*, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.077>.
- (17) Sitorus, B.; Sukandar; Panjaitan, S. D. Biogas Recovery from Anaerobic Digestion Process of Mixed Fruit -Vegetable Wastes. *Energy Procedia* **2013**, *32*, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.05.023>.
- (18) Mao, C.; Feng, Y.; Wang, X.; Ren, G. Review on Research Achievements of Biogas from Anaerobic Digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2015**, *45*, 540–555. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>.
- (19) Pereira, L. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. *Nova Science Publishers* 2011, *33*, pp 15-38.
- (20) Álvarez, D. L.; Silva, C. F. C.; Almaráz, P. H.; Tejera, H. L. *Géneros de algas marinas tropicales de México I. Algas Verdes*, Primera edición.; Universidad Nacional Autónoma de México; Ciudad de México, 2017.
- (21) Kumari, P.; Kumar, M.; Gupta, V.; Reddy, C. R. K.; Jha, B. Tropical Marine Macroalgae as Potential Sources of Nutritionally Important PUFAs. *Food Chemistry* **2010**, *120* (3), 749–757. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.006>.
- (22) Kim, S.-K.; Ravichandran, Y. D.; Khan, S. B.; Kim, Y. T. Prospective of the Cosmeceuticals Derived from Marine Organisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2008**, *13* (5), 511–523. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0113-5>.
- (23) O'Sullivan, L.; Murphy, B.; McLoughlin, P.; Duggan, P.; Lawlor, P. G.; Hughes, H.; Gardiner, G. E. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. *Marine Drugs* **2010**, *8* (7), 2038–2064. <https://doi.org/10.3390/md8072038>.
- (24) Besada, V.; Andrade, J. M.; Schultze, F.; González, J. J. Heavy Metals in Edible Seaweeds Commercialised for Human Consumption. *Journal of Marine Systems* **2009**, *75* (1–2), 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2008.10.010>.
- (25) Cruz-Suárez, L. E.; León, A.; Peña-Rodríguez, A.; Rodríguez-Peña, G.; Moll, B.; Ricque-Marie, D. Shrimp/Ulva Co-Culture: A Sustainable Alternative to

- Diminish the Need for Artificial Feed and Improve Shrimp Quality. *Aquaculture* **2010**, 301 (1–4), 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.021>.
- (26) Lee, J.-B.; Takeshita, A.; Hayashi, K.; Hayashi, T. Structures and Antiviral Activities of Polysaccharides from *Sargassum Trichophyllum*. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 86 (2), 995–999. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.059>.
- (27) Ortiz, J.; Romero, N.; Robert, P.; Araya, J.; Lopez-Hernández, J.; Bozzo, C.; Navarrete, E.; Osorio, A.; Rios, A. Dietary Fiber, Amino Acid, Fatty Acid and Tocopherol Contents of the Edible Seaweeds *Ulva Lactuca* and *Durvillaea Antarctica*. *Food Chemistry* **2006**, 99 (1), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.027>.
- (28) Mabeau, S.; Fleurence, J. Seaweed in Food Products: Biochemical and Nutritional Aspects. *Trends in Food Science & Technology* **1993**, 4 (4), 103–107. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90091-N](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90091-N).
- (29) Peña-Rodríguez, A.; Mawhinney, T. P.; Ricque-Marie, D.; Cruz-Suárez, L. E. Chemical Composition of Cultivated Seaweed *Ulva Clathrata* (Roth) C. Agardh. *Food Chemistry* **2011**, 129 (2), 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.104>.
- (30) Yaich, H.; Garna, H.; Besbes, S.; Paquot, M.; Blecker, C.; Attia, H. Chemical Composition and Functional Properties of *Ulva Lactuca* Seaweed Collected in Tunisia. *Food Chemistry* **2011**, 128 (4), 895–901. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.114>.
- (31) Armisen, R. World-Wide Use and Importance of *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* **1995**, 7 (3), 231–243. <https://doi.org/10.1007/BF00003998>.
- (32) Stephen, A. M., Phillips, G. O., Williams, P. A., Eds. Food Polysaccharides and Their Applications, Segunda edición; Food science and technology; CRC/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, 2006, pp 217-334
- (33) Freile-Pelegrín, Y.; Robledo, D. R.; García-Reina, G. Seasonal Agar Yield and Quality In *Gelidium Canariensis* (Grunow) Seoane-Camba (Gelidiales, Rhodophyta) from Gran Canaria, Spain. *Journal of Applied Phycology* **1995**, 7 (2), 141–144. <https://doi.org/10.1007/BF00693060>.
- (34) Santelices, B.; Doty, M. S. A Review of *Gracilaria* Farming. *Aquaculture* **1989**, 78 (2), 95–133. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90026-4).

- (35) Lahaye, M.; Rochas, C. Chemical Structure and Physico-Chemical Properties of Agar. *International workshop on gelidium* **1991**, 137-148.
- (36) Imeson, A. *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. John Wiley & Sons, 2011, pp 31-88.
- (37) Marinhosoriano, E. Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria Dura* (Gracilariales, Rhodophyta). *Bioresource Technology* **2005**, 96 (3), 379–382. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.04.012>.
- (38) Usov, A. I. Polysaccharides of the Red Algae. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*; Elsevier, 2011; 65, pp 115–217. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385520-6.00004-2>.
- (39) Imeson, A. P. Carrageenan and Furcellaran. In *Handbook of Hydrocolloids*; Elsevier, 2009; pp 164–185. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.164>.
- (40) Necas, J.; Bartosikova, L. Carrageenan: A Review. *Veterinarni Medicina* **2013**, 58 (4), 187–205. <https://doi.org/10.17221/6758-VETMED>.
- (41) Stanford, E.C.C. New Substance Obtained from Some of the Commoner Species of Marine Algae: Algin. *Chemistry News* **1883**, 47, 254–257.
- (42) Zhu, B.; Yin, H. Alginate Lyase: Review of Major Sources and Classification, Properties, Structure-Function Analysis and Applications. *Bioengineered* **2015**, 6 (3), 125–131. <https://doi.org/10.1080/21655979.2015.1030543>.
- (43) Nussinovitch, A.; Hirashima, M. *Cooking Innovations: Using Hydrocolloids for Thickening, Gelling, and Emulsification*; Taylor & Francis, 2013, pp 12-64.
- (44) Zubia, M.; Payri, C.; Deslandes, E. Alginate, Mannitol, Phenolic Compounds and Biological Activities of Two Range-Extending Brown Algae, *Sargassum Mangarevense* and *Turbinaria Ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). *Journal of Applied Phycology* **2008**, 20 (6), 1033–1043. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9303-3>.
- (45) Rhein-Knudsen, N.; Ale, M.; Meyer, A. Seaweed Hydrocolloid Production: An Update on Enzyme Assisted Extraction and Modification Technologies. *Marine Drugs* **2015**, 13 (6), 3340–3359. <https://doi.org/10.3390/md13063340>.
- (46) Valdez, B. *Food Industrial Processes: Methods and Equipment*; IntechOpen, 2012, pp 27.
- (47) Szekalska, M.; Puciłowska, A.; Szymańska, E.; Ciosek, P.; Winnicka, K. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and

- Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science* **2016**, 1–17.
<https://doi.org/10.1155/2016/7697031>.
- (48) Fertah, M.; Belfkira, A.; Dahmane, E. montassir; Taourirte, M.; Brouillette, F. Extraction and Characterization of Sodium Alginate from Moroccan *Laminaria Digitata* Brown Seaweed. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, *10*, S3707–S3714. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.003>.
- (49) Augst, A. D.; Kong, H. J.; Mooney, D. J. Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromolecular Bioscience* **2006**, *6* (8), 623–633. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600069>.
- (50) Yang, J.-S.; Xie, Y.-J.; He, W. Research Progress on Chemical Modification of Alginate: A Review. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *84* (1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.048>.
- (51) Pawar, S. N.; Edgar, K. J. Alginate Derivatization: A Review of Chemistry, Properties and Applications. *Biomaterials* **2012**, *33* (11), 3279–3305. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.007>.
- (52) Hou, Q.; De Bank, P. A.; Shakesheff, K. M. Injectable Scaffolds for Tissue Regeneration. *Journal of Materials Chemistry* **2004**, *14* (13), 1915. <https://doi.org/10.1039/b401791a>.
- (53) Drury, J. L.; Mooney, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering: Scaffold Design Variables and Applications. *Biomaterials* **2003**, *24* (24), 4337–4351. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00340-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5).
- (54) Sakiyama-Elbert, S.; Hubbell, J. Functional Biomaterials: Design of Novel Biomaterials. *Annual Review of Materials Research* **2001**, *31* (1), 183–201. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.31.1.183>.
- (55) Tan, H.; Marra, K. G. Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Materials* **2010**, *3* (3), 1746–1767. <https://doi.org/10.3390/ma3031746>.
- (56) Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science* **2012**, *37* (1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
- (57) Paques, J. P.; van der Linden, E.; van Rijn, C. J. M.; Sagis, L. M. C. Preparation Methods of Alginate Nanoparticles. *Advances in Colloid and*

- (58) McHugh, D. J. *A Guide to the Seaweed Industry*; FAO fisheries technical paper; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, 2003.
- (59) Fenoradosoa, T. A.; Ali, G.; Delattre, C.; Laroche, C.; Petit, E.; Wadouachi, A.; Michaud, P. Extraction and Characterization of an Alginate from the Brown Seaweed *Sargassum Turbinarioides* Grunow. *Journal of Applied Phycology* **2010**, *22* (2), 131–137. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9432-y>.
- (60) Aliste, A. J.; Vieira, F. F.; Mastro, N. L. D. Radiation Effects on Agar, Alginates and Carrageenan to Be Used as Food Additives. *Radiation Physics and Chemistry* **2000**, *57*, 305-308.
- (61) Madhavan, S.; Abirami, D. A Review on Hydrocolloids-Agar and Alginate. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2015**, *7*(9), 704-707.
- (62) Venkatesan, J.; Bhatnagar, I.; Manivasagan, P.; Kang, K.-H.; Kim, S.-K. Alginate Composites for Bone Tissue Engineering: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, *72*, 269–281. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008>.
- (63) Murakami, K.; Aoki, H.; Nakamura, S.; Nakamura, S.; Takikawa, M.; Hanzawa, M.; Kishimoto, S.; Hattori, H.; Tanaka, Y.; Kiyosawa, T.; Sato, Y.; Ishihara, M. Hydrogel Blends of Chitin/Chitosan, Fucoidan and Alginate as Healing-Impaired Wound Dressings. *Biomaterials* **2010**, *31* (1), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.031>.
- (64) Wang, L.; Khor, E.; Wee, A.; Lim, L. Y. Chitosan-Alginate PEC Membrane as a Wound Dressing: Assessment of Incisional Wound Healing. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *63* (5), 610–618. <https://doi.org/10.1002/jbm.10382>.
- (65) Axpe, E.; Oyen, M. Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17* (12), 1976. <https://doi.org/10.3390/ijms17121976>.
- (66) Cao, Y.; Shen, X.; Chen, Y.; Guo, J.; Chen, Q.; Jiang, X. PH-Induced Self-Assembly and Capsules of Sodium Alginate. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (4), 2189–2196. <https://doi.org/10.1021/bm0501510>.

- (67) Abbah, S.-A.; Liu, J.; Lam, R. W. M.; Goh, J. C. H.; Wong, H.-K. In Vivo Bioactivity of RhBMP-2 Delivered with Novel Polyelectrolyte Complexation Shells Assembled on an Alginate Microbead Core Template. *Journal of Controlled Release* **2012**, *162* (2), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.027>.
- (68) Mata-Alvarez, J.; Macé, S.; Llabrés, P. Anaerobic Digestion of Organic Solid Wastes. An Overview of Research Achievements and Perspectives. *Bioresource Technology* **2000**, *74* (1), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00023-7).
- (69) Herout, M.; Malaťák, J.; Kučera, L.; Dlabaja, T. Biogas Composition Depending on the Type of Plant Biomass Used. *Research in Agricultural Engineering* **2011**, *57* (No. 4), 137–143. <https://doi.org/10.17221/41/2010-RAE>.
- (70) Makdi, M.; Tomcsik, A.; Orosz, V. Digestate: A New Nutrient Source - Review. In *Biogas*; Kumar, S., Ed.; InTech, 2012, pp 295-307. <https://doi.org/10.5772/31355>.
- (71) Ma, J.; Frear, C.; Wang, Z.; Yu, L.; Zhao, Q.; Li, X.; Chen, S. A Simple Methodology for Rate-Limiting Step Determination for Anaerobic Digestion of Complex Substrates and Effect of Microbial Community Ratio. *Bioresource Technology* **2013**, *134*, 391–395. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.014>.
- (72) Zhang, C.; Su, H.; Baeyens, J.; Tan, T. Reviewing the Anaerobic Digestion of Food Waste for Biogas Production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2014**, *38*, 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.038>.
- (73) Castells, X. E.; Ripoll, X. F.; Pozuelo, E. C. *Procesos Biológicos. La Digestión Anaerobia y El Compostaje: Tratamiento y Valorización Energética de Residuos*; Editorial Díaz de Santos, S.A., 2012, pp 619.
- (74) Wang, P.; Wang, H.; Qiu, Y.; Ren, L.; Jiang, B. Microbial Characteristics in Anaerobic Digestion Process of Food Waste for Methane Production—A Review. *Bioresource Technology* **2018**, *248*, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.152>.
- (75) Kim, M.; Gomec, C. Y.; Ahn, Y.; Speece, R. E. Hydrolysis and Acidogenesis of Particulate Organic Material in Mesophilic and Thermophilic Anaerobic

- Digestion. *Environmental Technology* **2003**, *24* (9), 1183–1190. <https://doi.org/10.1080/09593330309385659>.
- (76) Pavlostathis, S. G.; Giraldo-Gomez, E. Kinetics of Anaerobic Treatment: A Critical Review. *Critical Reviews in Environmental Control* **1991**, *21* (5–6), 411–490. <https://doi.org/10.1080/10643389109388424>.
- (77) Vavilin, V. A.; Fernandez, B.; Palatsi, J.; Flotats, X. Hydrolysis Kinetics in Anaerobic Degradation of Particulate Organic Material: An Overview. *Waste Management* **2008**, *28* (6), 939–951. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.03.028>.
- (78) De La Rubia, M. A.; Raposo, F.; Rincón, B.; Borja, R. Evaluation of the Hydrolytic–Acidogenic Step of a Two-Stage Mesophilic Anaerobic Digestion Process of Sunflower Oil Cake. *Bioresource Technology* **2009**, *100* (18), 4133–4138. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.001>.
- (79) Franke-Whittle, I. H.; Walter, A.; Ebner, C.; Insam, H. Investigation into the Effect of High Concentrations of Volatile Fatty Acids in Anaerobic Digestion on Methanogenic Communities. *Waste Management* **2014**, *34* (11), 2080–2089. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.07.020>.
- (80) Adekunle, K. F.; Okolie, J. A. A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **2015**, *06* (03), 205–212. <https://doi.org/10.4236/abb.2015.63020>.
- (81) Chynoweth, D. P.; Turick, C. E.; Owens, J. M.; Jerger, D. E.; Peck, M. W. Biochemical Methane Potential of Biomass and Waste Feedstocks. *Biomass and Bioenergy* **1993**, *5* (1), 95–111. [https://doi.org/10.1016/0961-9534\(93\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0961-9534(93)90010-2).
- (82) Vanegas, C. H.; Bartlett, J. Green Energy from Marine Algae: Biogas Production and Composition from the Anaerobic Digestion of Irish Seaweed Species. *Environmental Technology* **2013**, *34* (15), 2277–2283. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.765922>.
- (83) Barbot, Y.; Thomsen, C.; Thomsen, L.; Benz, R. Anaerobic Digestion of Laminaria Japonica Waste from Industrial Production Residues in Laboratory- and Pilot-Scale. *Marine Drugs* **2015**, *13* (9), 5947–5975. <https://doi.org/10.3390/md13095947>.

- (84) Tedesco, S.; Daniels, S. Optimisation of Biogas Generation from Brown Seaweed Residues: Compositional and Geographical Parameters Affecting the Viability of a Biorefinery Concept. *Applied Energy* **2018**, *228*, 712–723. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.06.120>.
- (85) Osman, M.; Xiaohou, S.; Zhao, D.; Basheer, A.; Jin, H.; Zhang, Y. Methane Production from Alginate-Extracted and Non-Extracted Waste of *Laminaria Japonica*: Anaerobic Mono- and Synergetic Co-Digestion Effects on Yield. *Sustainability* **2019**, *11* (5), 1269. <https://doi.org/10.3390/su11051269>.
- (86) Faidi, A.; Lassoued, M. A.; Becheikh, M. E. H.; Touati, M.; Stumbé, J.-F.; Farhat, F. Application of Sodium Alginate Extracted from a Tunisian Brown Algae Padina Pavonica for Essential Oil Encapsulation: Microspheres Preparation, Characterization and in Vitro Release Study. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *136*, 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.023>.
- (87) Akin, A.; Işiklan, N. Microwave Assisted Synthesis and Characterization of Sodium Alginate-Graft-Poly(N,N'-Dimethylacrylamide). *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, *82*, 530–540. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.050>.
- (88) Tapia-Tussell, R.; Avila-Arias, J.; Domínguez Maldonado, J.; Valero, D.; Olguin-Maciel, E.; Pérez-Brito, D.; Alzate-Gaviria, L. Biological Pretreatment of Mexican Caribbean Macroalgae Consortia Using Bm-2 Strain (*Trametes Hirsuta*) and Its Enzymatic Broth to Improve Biomethane Potential. *Energies* **2018**, *11* (3), 494. <https://doi.org/10.3390/en11030494>.
- (89) Sarker, B.; Papageorgiou, D. G.; Silva, R.; Zehnder, T.; Gul-E-Noor, F.; Bertmer, M.; Kaschta, J.; Chrissafis, K.; Detsch, R.; Boccaccini, A. R. Fabrication of Alginate–Gelatin Crosslinked Hydrogel Microcapsules and Evaluation of the Microstructure and Physico-Chemical Properties. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2* (11), 1470. <https://doi.org/10.1039/c3tb21509a>.
- (90) Gomez, C. G.; Rinaudo, M.; Villar, M. A. Oxidation of Sodium Alginate and Characterization of the Oxidized Derivatives. *Carbohydrate Polymers* **2007**, *67* (3), 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.05.025>.
- (91) Chhatbar, M.; Meena, R.; Prasad, K.; Siddhanta, A. K. Microwave Assisted Rapid Method for Hydrolysis of Sodium Alginate for M/G Ratio Determination.

- Carbohydrate Polymers* **2009**, *76* (4), 650–656.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.033>.
- (92) Torres, M. R.; Sousa, A. P. A.; Silva Filho, E. A. T.; Melo, D. F.; Feitosa, J. P. A.; de Paula, R. C. M.; Lima, M. G. S. Extraction and Physicochemical Characterization of *Sargassum Vulgare* Alginate from Brazil. *Carbohydrate Research* **2007**, *342* (14), 2067–2074.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.05.022>.
- (93) Salomonsen, T.; Jensen, H. M.; Larsen, F. H.; Steuernagel, S.; Engelsen, S. B. Alginate Monomer Composition Studied by Solution- and Solid-State NMR – A Comparative Chemometric Study. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23* (6), 1579–1586. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.11.009>.
- (94) Chandía, N. Alginic Acids in *Lessonia Trabeculata*: Characterization by Formic Acid Hydrolysis and FT-IR Spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* **2001**, *46* (1), 81–87. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00286-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00286-1).
- (95) Panikkar, R.; Brasch, D. J. Biosynthetic Implications of NMR Analyses of Alginate Homo- and Heteropolymers from New Zealand Brown Seaweeds. *Carbohydrate Research* **1997**, *300* (3), 229–238.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00053-0).
- (96) Larsen, B.; Salem, D. M. S. A.; Sallam, M. A. E.; Mishrikey, M. M.; Beltagy, A. I. Characterization of the Alginates from Algae Harvested at the Egyptian Red Sea Coast. *Carbohydrate Research* **2003**, *338* (22), 2325–2336.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00378-1).
- (97) Kam, N.; Park, Y. J.; Lee, E. Y.; Kim, H. S. Molecular Identification of a PolyM-Specific Alginate Lyase from *Pseudomonas* Sp. Strain KS-408 for Degradation of Glycosidic Linkages between Two Mannuronates or Mannuronate and Guluronate in Alginate. *Canadian Journal of Microbiology* **2011**, *57* (12), 1032–1041. <https://doi.org/10.1139/w11-106>.
- (98) Salomonsen, T.; Jensen, H. M.; Stenbæk, D.; Engelsen, S. B. Chemometric Prediction of Alginate Monomer Composition: A Comparative Spectroscopic Study Using IR, Raman, NIR and NMR. *Carbohydrate Polymers* **2008**, *72* (4), 730–739. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.10.022>.

- (99) Lozada, P. T.; Pérez, A. Actividad metanogénica específica: una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente* **2010**, 9, 5-14.
- (100) Pham Van, D.; Hoang, M. G.; Pham Phu, S. T.; Fujiwara, T. A New Kinetic Model for Biogas Production from Co-Digestion by Batch Mode. *Global Journal of Environmental Science and Management* **2018**, 4 (3). <https://doi.org/10.22034/GJESM.2018.03.001>.
- (101) Tewelde, S.; Eyalarsan, K.; Radhamani, R.; Karthikeyan, K. Biogas Production from Co-Digestion of Brewery Wastes [BW] and Cattle Dung [CD]. *International Journal of Latest Trends in Agriculture and Food Sciences* **2012**, 2 (2), 90-93.
- (102) Guendouz, J.; Buffière, P.; Cacho, J.; Carrère, M.; Delgenes, J.-P. Dry Anaerobic Digestion in Batch Mode: Design and Operation of a Laboratory-Scale, Completely Mixed Reactor. *Waste Management* **2010**, 30 (10), 1768–1771. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.12.024>.
- (103) Eskicioglu, C.; Ghorbani, M. Effect of Inoculum/Substrate Ratio on Mesophilic Anaerobic Digestion of Bioethanol Plant Whole Stillage in Batch Mode. *Process Biochemistry* **2011**, 46 (8), 1682–1687. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.04.013>.
- (104) Widiassa, I. N.; Johari, S. The Kinetic of Biogas Production Rate from Cattle Manure in Batch Mode. *Journal of Chemical and Biological Engineering* **2010**, 3(1), 39-45.
- (105) Shemshad, J.; Aminossadati, S. M.; Kizil, M. S. A Review of Developments in near Infrared Methane Detection Based on Tunable Diode Laser. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, 171–172, 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.06.018>.
- (106) Visser, T. FT-IR Detection in Gas Chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2002**, 21 (9–10), 627–636. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00812-9](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00812-9).
- (107) Berjonneau, J.; Langlais, F.; Chollon, G. Understanding the CVD Process of (Si)–B–C Ceramics through FTIR Spectroscopy Gas Phase Analysis. *Surface and Coatings Technology* **2007**, 201 (16–17), 7273–7285. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2007.01.039>.

(108) Linstrom, P. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database 69, 1997. <https://doi.org/10.18434/T4D303>.