



CONAHCYT



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN QUÍMICA APLICADA



2024
Felipe Carrillo
PUERTO

Saltillo, Coahuila a 9 de octubre de 2024

Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

Coordinación de Posgrado
Presente

Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por EDNA LIZBETH RODRÍGUEZ NIÑO titulado Proceso para la extracción y caracterización de alginato a partir de algas pardas, y su aplicación para apósitos el cual fue presentado el día 04 de octubre de 2024, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento adjunto corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

SINODALES

Dr. José Francisco Hernández Gámez
Presidente

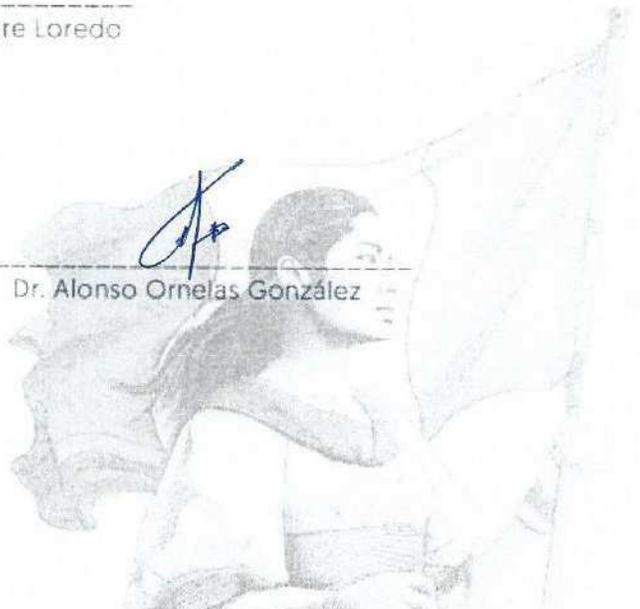
Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Secretario

Dra. Rocio Yaneli Aguirre Loredo
Vocal

ASESORES

Dr. Ernesto Hernández Hernández

Dr. Alonso Ornelas González



TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: EDNA LIZBETH RODRÍGUEZ NIÑO FIRMA 

TITULO: Proceso para la extracción y caracterización de alginato a partir de algas pardas, y su aplicación para apósitos

ASESORES: Dr. Ernesto Hernández Hernández FIRMA 

Dr. Alonso Ornelas González FIRMA 

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

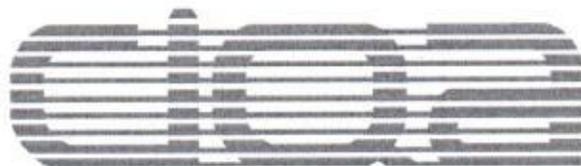
Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 04 de Octubre de 2024



Sello de la Institución


Dra. Julieta Torres González
Directora General del CIQA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

**Proceso para la extracción y caracterización de alginato a partir de algas
pardas, y su aplicación para apósitos**

Presentada por:

EDNA LIZBETH RODRÍGUEZ NIÑO

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dr. Ernesto Hernández Hernández
Dr. Alonso Ornelas González

Saltillo, Coahuila. México.

Octubre, 2024

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

**Proceso para la extracción y caracterización de alginato a partir de algas
pardas, y su aplicación para apósitos**

Presentada por:

EDNA LIZBETH RODRÍGUEZ NIÑO

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorado por:

**Dr. Ernesto Hernández Hernández
Dr. Alonso Ornelas González**

SINODALES



Dr. José Francisco Hernández Gámez
Presidente



Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez
Secretario



Dra. Rocío Yaneli Aguirre Loredo
Vocal

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 4 de octubre de 2024



EDNA LIZBETH RODRÍGUEZ NIÑO

Nombre y Firma



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

“Proceso para la extracción y caracterización de alginato a partir de algas pardas, y su aplicación para apósitos”

Presentada por:

ING. EDNA LIZBETH RODRÍGUEZ NIÑO

Para obtener el grado de:

Maestra en Tecnología de Polímeros

Asesorada por:

Dr. Ernesto Hernández Hernández

Dr. Alonso Ornelas González

Saltillo, Coahuila | Octubre 2024

DEDICATORIA

A mis padres por apoyarme y brindarme todo a lo largo de mi vida, por ayudarme a seguir adelante en los momentos difíciles, por siempre creer en mí. Todo lo que hago lo hago para ustedes.

A mis hermanos, por alegrar mi vida y por siempre estar a mi lado a lo largo de este camino.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores el Dr. Ernesto Hernández Hernández y el Dr. Alonso Ornelas González por guiarme y brindarme su conocimiento para la comprensión de este proyecto, ustedes me han hecho crecer profesional y académicamente. Gracias.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo parcial del proyecto 321156 y la beca de maestría otorgada que me permitió realizar mi posgrado.

Al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por permitirme cursar el posgrado, así como brindarme todas las facilidades para la realización de este trabajo.

Al Laboratorio Nacional en Innovación y Desarrollo de Materiales Ligeros para la Industria Automotriz (LANIAUTO) con No. 321156 por brindarme su experiencia, conocimiento y apoyo durante mi estadía en CIQA.

Agradezco sinceramente a Algas Marinas SA de CV por su generosa donación de algas marinas y el valioso conocimiento compartido, que fueron fundamentales para el desarrollo de la metodología química en esta tesis.

A la Dra. Zureima por brindarme su conocimiento y apoyo en la realización de mis análisis de resultados por RMN, además de su disponibilidad y ayuda durante la etapa experimental de este proyecto.

Al Dr. Luis Elizalde por su apoyo en las caracterizaciones de resonancia magnética nuclear en estado sólido.

A la LCQ. Julieta Sánchez por su apoyo y asistencia en las pruebas de caracterización por infrarrojo (FT-IR).

A la M.C. Myrna Salinas Hernández y Lic. María Guadalupe Méndez Padilla por su apoyo y asistencia en las pruebas de análisis termogravimétrico (TGA).

A mis sinodales, Dr. Antonio Ledezma, Dr. Francisco Hernández y Dra. Rocío Aguirre por enriquecer mi trabajo con sus sugerencias, comentarios y correcciones en el fortalecimiento del presente proyecto investigativo.

A mi familia, por su amor incondicional, apoyo y sacrificios. Gracias por estar siempre presentes en mi vida; sin ustedes no lo habría logrado.

A mis amigos de toda la vida, Milly, Jorge y Andrea que me apoyaron desde el principio en esta aventura académica. Su apoyo incondicional, su amor y su amistad han sido un regalo invaluable para mí, no puedo imaginarme una vida sin ustedes. Gracias por ser parte de mis recuerdos más felices. Los amo.

A Luis Rivera por brindarme su amor y apoyo incondicional. Tu presencia en mi vida ha sido un pilar esencial en la culminación de esta tesis. Gracias por hacer mis días más felices, Te amo.

A mis queridos amigos de la maestría: Yeltzin, Karla, Brenda, Nuca, Malagón, Orlando y Caro, por regalarme su amistad y apoyo en esta etapa de mi vida. Los momentos que pasamos juntos los atesoraré por siempre; sin ustedes no lo habría logrado.

A mi perrito Elliot, que siempre encuentra la manera de llenarme de alegría con su energía infinita, y que sus paseos diarios me ayudaron a distraerme y relajarme.

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se desarrollaron procesos de obtención de alginato de calcio a partir de algas pardas de la especie *Macrocystis pyrifera* por medio de la enzima Cellulase 10 XL y asistido por ultrasonido, comparándolos con el proceso químico tradicional. Además, se desarrolló la metodología para la fabricación de apósitos para heridas a partir de los alginatos obtenidos. De estos tres procesos se obtuvieron porcentajes de rendimiento de alginato, donde el proceso químico obtuvo un 16.86% y para los procesos enzimático y asistido por ultrasonido se alcanzaron porcentajes de 21.64 y 30.72%, respectivamente. Los alginatos fueron caracterizados mediante espectroscopía por transformada de Fourier (FT-IR), análisis termogravimétrico (TGA) y resonancia magnética nuclear en estado sólido (RMN ^{13}C). Se encontró que a partir de los procesos enzimático y ultrasónico los alginatos presentaron una mayor relación de bloques M en su estructura, mientras que en el proceso químico presentaron mayor relación de bloques G; siendo esto favorable para su aplicación en biomedicina. En cuanto a propiedades químicas, los alginatos presentaron comportamientos similares en comparación a los alginatos obtenidos por el procedimiento tradicional. Para la fabricación de apósitos se emplearon los alginatos obtenidos por el proceso asistido por ultrasonido debido a que presentaron un mayor rendimiento y un tiempo de producción menor en comparación al enzimático. Los apósitos presentan características favorables para su implementación en la biomedicina.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Algas	3
2.1.1. Algas pardas.....	4
2.1.2. <i>Macrocystis pyrifera</i>	4
2.2. Pared celular del alga	5
2.3. Alginato	6
2.3.1. Rigidez/flexibilidad, solubilidad y viscosidad del alginato.....	8
2.3.2. Formación de geles	9
2.4. Aplicaciones de los alginatos	11
2.4.1. Alimenticia	12
2.4.2. Biomedicina	13
2.4.3. Bioimpresión 3D.....	13
2.4.4. Adsorción de contaminantes.....	13
2.5. Apósitos	14

2.6. Alginato en apósitos.....	16
2.7. Métodos de extracción	17
2.7.1. Método enzimático.....	17
2.7.2. Método asistido por ultrasonido	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo General	20
3.2. Objetivos particulares.....	20
4. HIPÓTESIS.....	21
5. JUSTIFICACIÓN.....	21
6. METODOLOGÍA	21
6.1 Materiales y reactivos	21
6.2. Procedimiento químico.....	22
6.3. Procedimiento enzimático	24
6.4. Procedimiento asistido por ultrasonido	25
6.5. Fabricación de apósitos con los alginatos obtenidos	26
7. Técnicas de caracterización	28
7.1. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).....	28
7.2. Análisis termogravimétrico (TGA)	28
7.3. Resonancia magnética nuclear en estado sólido	28
8. RESULTADOS	29
8.1. Rendimiento de alginato	29
8.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	31
8.3. Análisis termogravimétrico (TGA)	33
8.4. Resonancia magnética nuclear en estado sólido	35

8.5. Prototipo de apósito de alginato de calcio extraído del alga <i>Macrocystis pyrifera</i>	38
9. CONCLUSIONES	41
10. PERSPECTIVAS FUTURAS	42
11. REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la pared celular de las algas pardas.....	6
Figura 2. Estructura química del alginato. Monómeros del alginato (ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico), estructura de la cadena de alginato mostrando la conformación de los enlaces y la composición de los bloques G, M y MG/GM... 8	8
Figura 3. Descripción gráfica del modelo “caja de huevo” para la gelificación del alginato (tomado y adaptado de la referencia [28]).	10
Figura 4. Esquema del mecanismo de unión en múltiples pasos de Ca^{2+} al alginato. Las líneas suaves y en zigzag representan los bloques M y G, respectivamente; y los puntos azules representan los iones de calcio (Tomado y adaptado de la referencia [25]).	11
Figura 5. Filtrado de la muestra con tela de manta.	23
Figura 6. Representación gráfica del procedimiento químico empleado para la extracción de alginato a partir de algas pardas de la especie <i>Macrocystis pyrifera</i>	23
Figura 7. Representación gráfica del procedimiento enzimático empleado para la extracción de alginato a partir de algas pardas de la especie <i>Macrocystis pyrifera</i>	25
Figura 8. Representación gráfica del procedimiento asistido por ultrasonido empleado para la extracción de alginato a partir de algas pardas de la especie <i>Macrocystis pyrifera</i>	26
Figura 9. Representación gráfica del procedimiento para la fabricación de apósitos de alginato a partir de algas pardas de la especie <i>Macrocystis pyrifera</i>	27
Figura 10. Gráfica de los promedios de rendimiento de extracción de alginato a partir de los procesos químico, enzimático y asistido por ultrasonido.	31

Figura 11. Espectros FT-IR de polvo de alga de la especie <i>Macrocystis pyrifera</i> y de los alginatos de calcio extraídos de los procesos químico, enzimático y asistido por ultrasonido.....	33
Figura 12. TGA del polvo de alga de la especie <i>Macrocystis pyrifera</i> y de los alginatos de calcio extraídos de los procesos químico, enzimático y asistido por ultrasonido.....	34
Figura 13. Derivada de la pérdida de peso del polvo de alga de la especie <i>Macrocystis pyrifera</i> y de los alginatos de calcio extraídos de los procesos químico, enzimático y asistido por ultrasonido.....	35
Figura 14. Espectro RMN ¹³ C en estado sólido de los alginatos de calcio extraídos de los procedimientos químico, enzimático y asistido por ultrasonido.	37
Figura 15. Estructura química del alginato con cada carbono enumerado.	37
Figura 16. Fotografías de experimentos repetidos de los apósitos no obtenidos rociando con aerógrafo la solución de CaCl ₂	38
Figura 17. Fotografías de experimentos repetidos de los apósitos no obtenidos vertiendo la solución de CaCl ₂ sobre la muestra.....	39
Figura 18. Apósitos de alginato de calcio extraídos del alga <i>Macrocystis pyrifera</i>	40
Figura 19. Apósitos secos de alginato de calcio extraídos del alga <i>Macrocystis pyrifera</i>	40

ABREVIATURAS

M: Ácido β -D-manurónico

G: Ácido α -L-gulurónico

HCl: Ácido clorhídrico

K₂CO₃: Carbonato de potasio

CaCl₂: Cloruro de calcio

FT-IR: Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

TGA: Análisis termogravimétrico

RMN: Resonancia magnética nuclear

1. INTRODUCCIÓN

Los alginatos son moléculas de alto interés en la industria farmacéutica y alimentaria debido a sus propiedades y su disponibilidad natural. Al ser polímeros comestibles, se degradan fácilmente en comparación con polímeros derivados del petróleo, lo que los convierte en una opción más amigable con el medio ambiente y añade un valor agregado a los productos obtenidos. El alginato extraído de las algas pardas se puede obtener por diferentes métodos de extracción. El método convencional emplea solventes orgánicos de naturaleza ácida o alcalina. Aunque ofrece un buen rendimiento y es un proceso confiable, presenta un impacto ecológico negativo debido a los solventes utilizados. Por lo tanto, es fundamental explorar métodos alternativos más ecológicos. Entre estas alternativas, se destacan el método enzimático y el asistido por ultrasonido, que podrían ofrecer soluciones más amigables con el medio ambiente sin sacrificar la eficiencia.

La aplicación de tecnologías emergentes que hacen uso de ultrasonido o enzimas han sido propuestas como una alternativa “verde” que puede solventar las desventajas ecológicas de los protocolos químicos. Sin embargo, pocas investigaciones han estudiado de manera comparativa los subproductos obtenidos con las metodologías actuales (químicas) y las emergentes (basadas en ultrasonido o enzimas). En este contexto, surge una oportunidad para caracterizar los extractos obtenidos mediante estas metodologías y estudiar tanto la cantidad como la calidad de los compuestos extraídos. Además, la aplicación de diferentes métodos de extracción “verde” para la obtención de alginato a partir de algas pardas muestra cambios significativos en diferentes propiedades químicas en comparación con el método convencional (químico).

Para la ciencia biomédica, el alginato es de suma importancia debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, su biocompatibilidad y no toxicidad; las cuales aportan múltiples beneficios en el desarrollo de materiales. El uso de alginato en apósitos para cuidado de heridas muestra beneficios significativos en comparación a los apósitos convencionales, como bloquear la aparición de

patógenos en heridas, así como un ambiente húmedo que ayuda a disminuir los riesgos por infección y acelera el proceso de cicatrización.

En esta tesis, se buscó desarrollar y comparar dos metodologías alternativas: enzimática y asistida por ultrasonido, para la extracción de alginato a partir de algas pardas de la especie *Macrocystis pyrifera*. Estas metodologías fueron comparadas con el método químico convencional, considerando el estándar de referencia. El extracto obtenido con cada metodología fue caracterizado para determinar sus propiedades químicas mediante diversas técnicas analíticas. Además, se desarrolló una metodología para la fabricación de apósitos a partir de los alginatos obtenidos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Algas

Las algas marinas son organismos que cumplen una función vital en el planeta, son capaces de aportar oxígeno, participando con cerca del 50% de la fotosíntesis[1]. Estos organismos viven adheridas a rocas o sustratos duros situados en zonas costeras, pudiendo ser cultivadas en diversos entornos naturales y cosechadas durante todo el año. Su clasificación puede realizarse de acuerdo con diversos criterios, siendo uno de ellos su coloración. En este sentido, se distinguen tres categorías principales: algas rojas (*Rhodophyta*), algas marrones (*Phaeophyta*) y algas verdes (*Chlorophyta*). Una de las principales características que distingue a cada uno de los tipos de algas es el entorno en el que crecen; mientras que las algas rojas y marrones se encuentran en el océano, las algas verdes crecen comúnmente en agua dulce (ríos y lagos).

Las algas marinas contienen múltiples compuestos que les permiten tener aplicaciones en distintas áreas entre las que destacan la farmacéutica y la alimenticia. Actualmente, y de acuerdo con su valor comercial se identifican alrededor de 300 especies de algas marinas, sin embargo, sólo 10 especies son cultivadas de forma extensiva. El mercado de algas en el mundo tiene un valor de más de USD 6 mil millones por año, donde cerca del 85% corresponde a algas destinadas al consumo humano [2].

Las algas marinas contienen un 80-90% de agua, el otro 10-20% corresponde a materia seca, de la cual los carbohidratos corresponden cerca del 40% y las proteínas entre el 15-47% [1], [2]. Dentro de los carbohidratos contenidos en las algas marinas podemos encontrar diversos hidrocoloides tales como el alginato, agar, carragenina, quitosano, celulosa y sus derivados. Estos hidrocoloides son polisacáridos que se caracterizan por ser hidrofílicos y al ser dispersados en agua tienen la capacidad de formar geles y/o dispersiones viscosas [3], propiedades que los hacen útiles en distintas industrias.

2.1.1. Algas pardas

Las algas pardas o algas marrones (*Phaeophyta*) cuentan con un amplio número de especies, las cuales van desde formas filamentosas de pequeño tamaño hasta algas marinas de gran tamaño. Los colores en los que se presentan varían desde un verde oliva a varios tonos de marrón que depende de la cantidad de fucoxantina presente en el alga. A diferencia de las demás especies de algas, las algas marrones son multicelulares [4]. De este tipo de alga se obtienen distintos compuestos polisacáridos como el alginato, el fucoidan y laminaran [5]. Estos polisacáridos se encuentran contenidos en las matrices de la pared celular de las algas pardas en donde sus composiciones y características físico-químicas están influenciadas por la especie, la ubicación geográfica de su cultivo, estación del año, edad de la población de algas y el método empleado para su extracción [6].

Hace apenas unos siglos, el cultivo de algas pardas se limitaba principalmente a Japón, Corea y China, y se realizaba principalmente para el consumo humano. En los últimos años, el desarrollo en nuevas aplicaciones en los sectores farmacéutico, alimentario e industrial (como por ejemplo en el aumento de rendimiento de las baterías de litio), ha generado una mayor demanda de algas pardas, haciendo que su cultivo se expanda en regiones templadas de todo el mundo [7], [8].

2.1.2. *Macrocystis pyrifera*

La *Macrocystis pyrifera*, o también llamada alga gigante, es un tipo de alga parda de gran tamaño nativa de Nueva Zelanda. Debido a sus características y su rápido crecimiento, es recolectada y cultivada en todo el mundo. En el 2012, Chile y México produjeron alrededor del 7% de la producción global de *Macrocystis pyrifera* en poblaciones naturales [2]. La importancia de su cultivo radica en que esta alga es rica en diversos polisacáridos sulfatados y también constituye una buena fuente de proteínas. La composición química de la *Macrocystis pyrifera* es mostrada en la Tabla 1.

Entre sus aplicaciones en el área de los alimentos, se encuentra la extracción del alginato para ser empleado como estabilizador en productos lácteos como helados, crema y yogur. Además, el alginato es usado como agente gelificante o emulsionante y se añade a alimentos para mejorar su contenido nutricional [2], [9]. La *Macrocystis pyrifera* también cuenta con aplicaciones en el área farmacéutica, donde se utiliza como apósitos para heridas, sistemas de liberación de medicamentos, y como tratamiento para aliviar la indigestión o el reflujo. Asimismo, se sabe contiene compuestos que actúan como un poderoso modulador inmunológico, así como agentes anti-diabetes y antioxidantes [10], [11], [12]. Otras aplicaciones en las que se ha empleado esta especie de alga son en la producción de metano y en cosméticos [2], [13].

Tabla 1. Composición química del alga parda *Macrocystis pyrifera* con base en materia seca [14].

Composición química	Extracto de algas
	Materia seca (%)
Lípidos	1.4 ± 0.1
Ceniza	51.5 ± 1.5
Proteína	15 ± 0.5
Carbohidratos	32 ± 1.0

2.2. Pared celular del alga

La pared celular es una capa resistente que se localiza en el exterior de la membrana plasmática en las células de plantas, bacterias, hongos y algas. La pared celular de las algas, al igual que la de las plantas, está compuesta por carbohidratos. Dependiendo del tipo de alga la pared celular presenta diferentes características; las algas verdes presentan mayor contenido de celulosa, xilanos y mananos o inclusive no presentan una pared celular. Las algas rojas presentan celulosa, xilanos y polisacáridos sulfatados en su pared celular, y las algas pardas contienen alginato, celulosa y fucoidan en su pared celular [15].

La pared celular de las algas pardas, algas rojas y la mayoría de las algas verdes están compuestas por un esqueleto fibrilar de celulosa y una fase amorfa exterior. Para las algas pardas esta fase exterior está compuesta por alginato (Figura 1). Las algas rojas y pardas en comparación a las verdes presentan una matriz amorfa más amplia, por lo tanto, presentan mayor contenido de polisacárido [16].

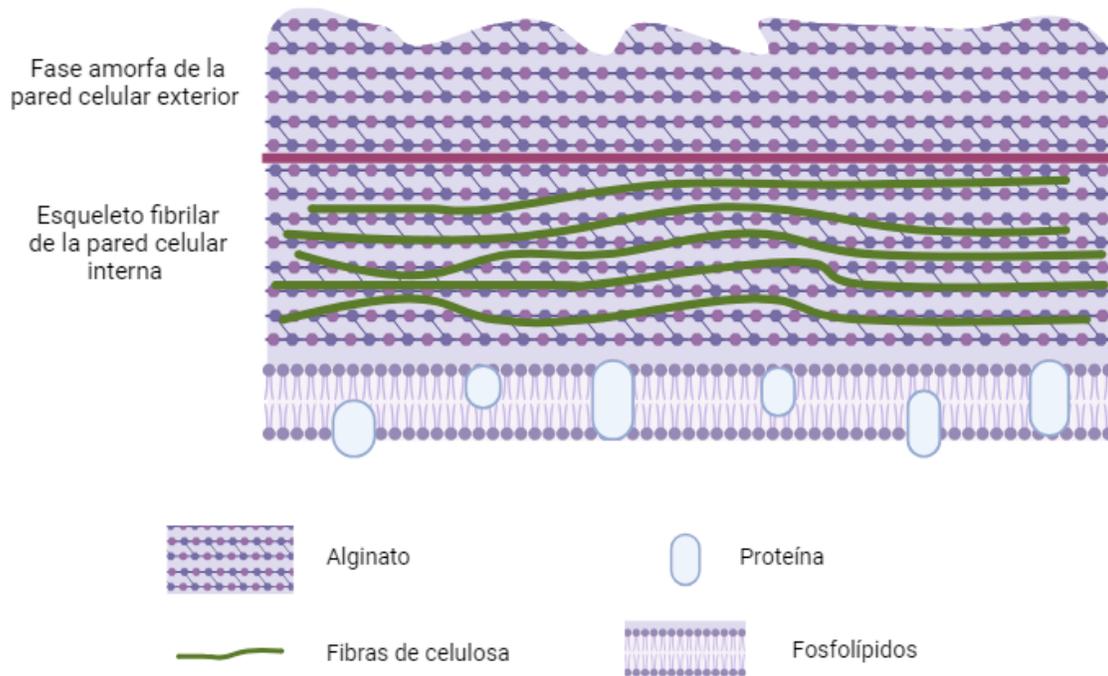


Figura 1. Estructura de la pared celular de las algas pardas.

2.3. Alginato

El alginato es un carbohidrato coloidal hidrofílico con características de biodegradabilidad y biocompatibilidad. Este biopolímero además de ser soluble en agua y no presenta toxicidad, es un producto renovable debido a que se extrae de algas pardas por medio de una solución alcalina diluida, pero también se puede extraer por medio de síntesis microbiana; siendo este último el menos empleado [1]. El químico británico E. Stanford fue el primero en realizar estudios sobre la extracción de alginato por medio de algas pardas en el año 1883 por medio del procedimiento de digestión de las algas con carbonato sódico obteniendo una

sustancia gelatinosa a la cual llamó “algina” debido a que provenía de las algas [17]. Las especies de algas pardas más utilizadas para la producción de alginato de forma comercial son *Laminaria hyperborea*, *Saccharina japónica*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera* [3].

Químicamente, los alginatos son macromoléculas hidrocarbonadas compuesto por una unidad monomérica de residuos de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) unidos por enlace (1 \rightarrow 4) [1]. Pueden estar compuestos por bloques G, bloques M y/o bloques MG/GM (Figura 2). Dentro de sus propiedades físicas, se destacan su capacidad de absorción de agua (hasta 200 a 300 veces su propio peso), su capacidad de ser utilizados como agentes estabilizantes, espesantes y formadores de geles. Sus aplicaciones se centran en las áreas alimentaria y farmacéutica, aunque también se utilizan en el sector textil, donde el alginato se emplea en el recubrimiento de tejidos y en la producción de tintes naturales. En bioingeniería, el alginato se utiliza en la fabricación de películas de polímero para aplicaciones como apósitos para heridas, sistemas de liberación controlada de medicamentos y matrices para cultivos celulares [18].

El alginato, al igual que otros biopolímeros, presentan limitaciones en sus aplicaciones debido a su baja resistencia mecánica y su alta solubilidad en agua. Estas limitaciones se deben a la estructura química del alginato. La presencia de un anillo de seis miembros impide la compactación de las cadenas, lo que resulta en una mayor rigidez. Sin embargo, mediante la unión covalente con grupos polares, se ha logrado aumentar la estabilidad de la estructura de la membrana del biopolímero, obteniendo una reducción de su naturaleza hidrofílica [19].

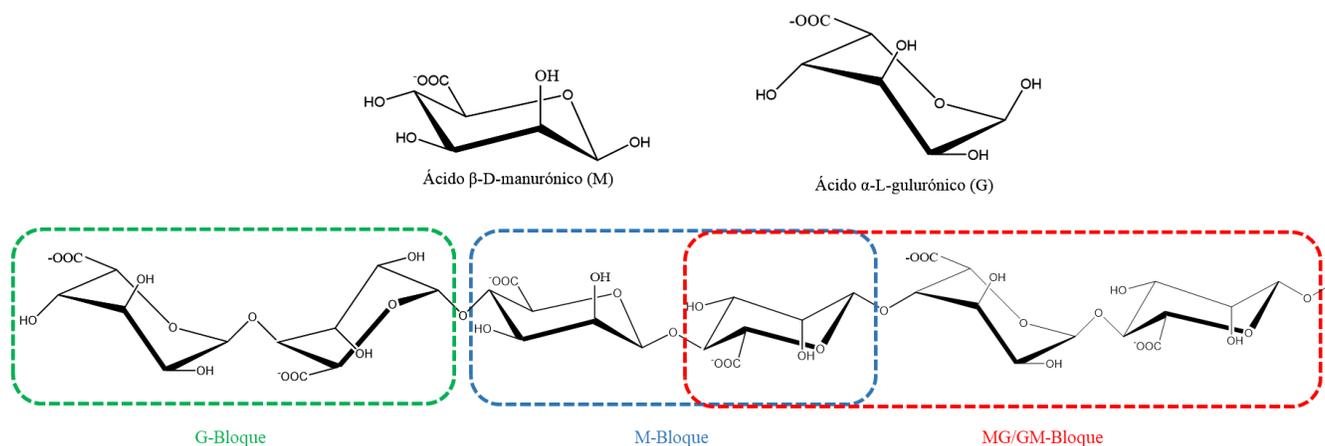


Figura 2. Estructura química del alginato. Monómeros del alginato (ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico), estructura de la cadena de alginato mostrando la conformación de los enlaces y la composición de los bloques G, M y MG/GM.

2.3.1. Rigidez/flexibilidad, solubilidad y viscosidad del alginato

El contenido de bloques M y G en los alginatos varía según el origen y el método de extracción utilizado para su obtención. Estas diferencias afectan las propiedades finales del alginato. Dependiendo de la estructura de los bloques, los alginatos pueden presentar diversos grados de rigidez o flexibilidad. Esto se debe a la mayor o menor interferencia de los anillos de glucosa presentes en la estructura, la restricción de rotación de los enlaces glucosídicos y la repulsión electrostática entre los grupos cargados en la cadena polimérica [20], [21]. En general, los alginatos con mayores porcentajes de bloques G son más rígidos en comparación a los alginatos con mayor presencia de bloques M; es decir, una mayor presencia de bloques M, resulta en alginatos más flexibles [18], [22].

Por otro lado, el peso molecular y la rigidez de la cadena polimérica son factores determinantes de la viscosidad intrínseca del alginato. A medida que aumenta la rigidez y el peso molecular del alginato, también lo hace su viscosidad. Además, otro factor que contribuye al aumento de la viscosidad intrínseca es la extensión de

la cadena polimérica, ya que la repulsión electrostática entre los grupos cargados en la cadena se incrementa [18].

2.3.2. Formación de geles

La propiedad más importante de los alginatos es su capacidad de gelificación inducida por iones, lo cual le da una amplia posibilidad de aplicaciones. El mecanismo general de gelificación del alginato fue propuesto por Grant et al. [23] en 1973, el cual es conocido como el modelo de “caja de huevo” (egg box en inglés) donde se describe la gelificación de alginato mediante Ca^{2+} . Este modelo consiste en que la red del gel está formada por la asociación intermolecular de cationes divalentes que se alojan en las cavidades formadas por dos cadenas poliméricas adyacentes que contienen bloques G en conformaciones helicoidales (Figura 3). El alginato también puede formar geles mediante gelificación inducida por iones empleando otros cationes divalentes o multivalentes como Ba^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} [18], [24]. Dependiendo del catión empleado el gel presenta diferentes características de resistencia, viscoelasticidad y biocompatibilidad.

Para inducir la formación de gel de alginato, los grupos carboxilo (principalmente bloques G) se entrecruzan con iones divalentes; los cuales son los más comúnmente utilizados en comparación a los iones multivalentes, excepto por Mg^{2+} y Hg^{2+} debido a que no inducen la gelación [20]. El Ca^{2+} es el ion divalente más estudiado para inducir la gelificación. Como se mencionó con anterioridad el mecanismo de unión entre alginato y Ca^{2+} para la obtención de geles consiste en el emparejamiento de bloques G sucesivos que forman una estructura doble formando cavidades para contener Ca^{2+} . El procedimiento de reticulación de Ca^{2+} con alginato se muestra en la Figura 4 donde se presentan los tres pasos del proceso de gelificación: (1) interacción de Ca^{2+} con una sola unidad de guluronato formando monocomplejos; (2) propagación y formación de dímeros de “caja de huevos” mediante el emparejamiento de estos monocomplejos; y (3) asociación lateral de los dímeros de la “caja de huevos”, generando multímeros, los cuales están mediados por

concentraciones de Ca^{2+} , moléculas de agua y enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y carboxilo de residuos G emparejados [25], [26], [27].

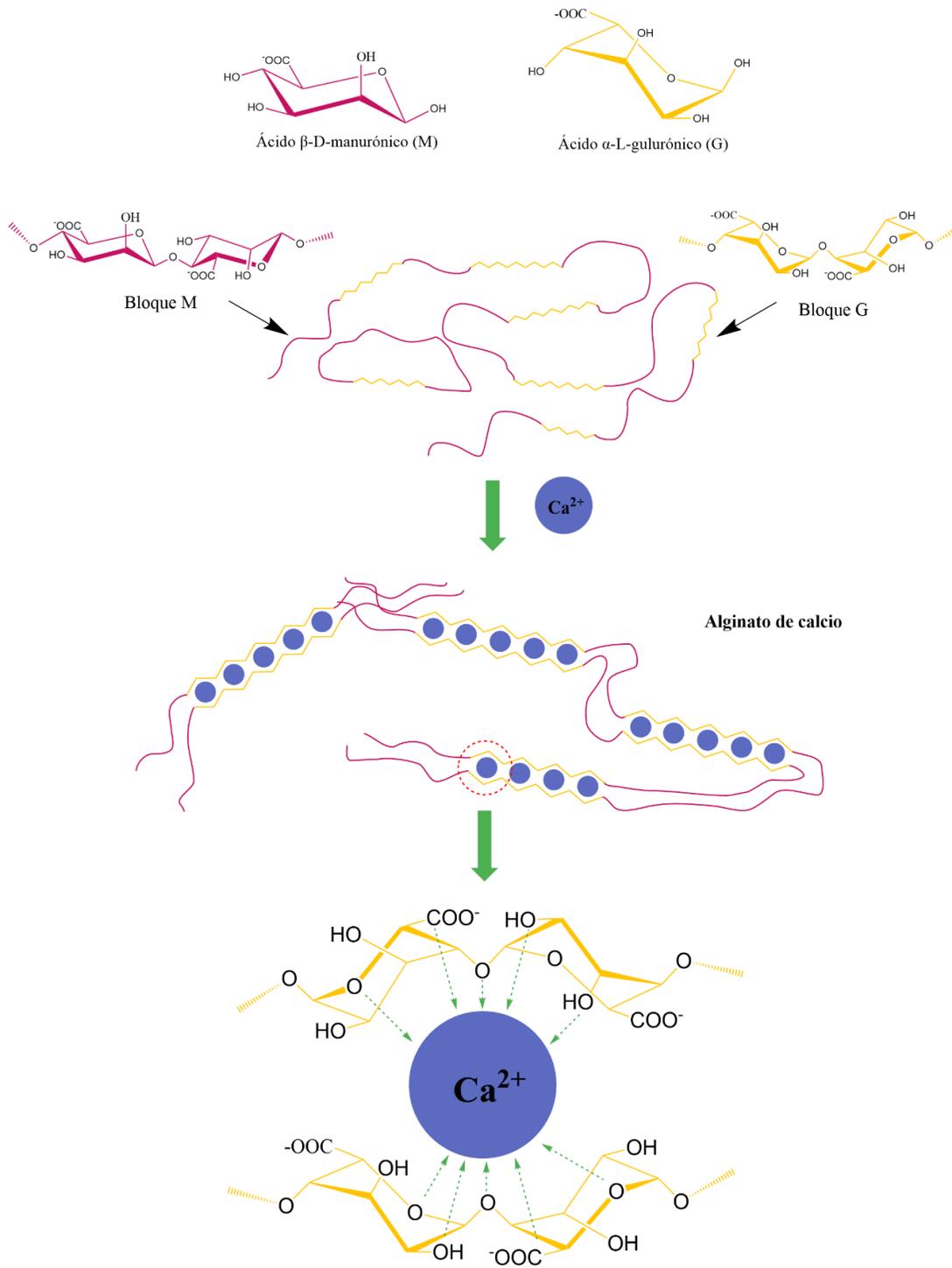


Figura 3. Descripción gráfica del modelo “caja de huevo” para la gelificación del alginato (tomado y adaptado de la referencia [28]).

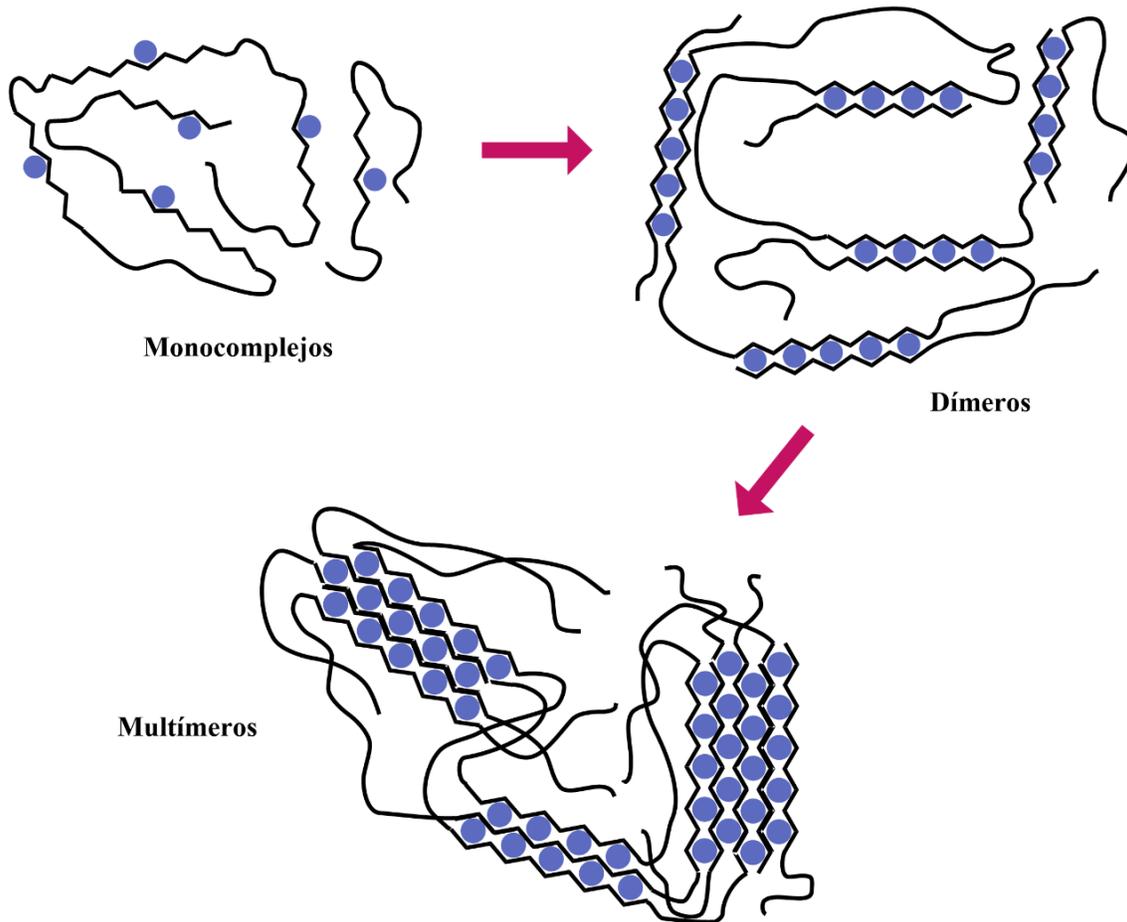


Figura 4. Esquema del mecanismo de unión en múltiples pasos de Ca^{2+} al alginato. Las líneas suaves y en zigzag representan los bloques M y G, respectivamente; y los puntos azules representan los iones de calcio (Tomado y adaptado de la referencia [25]).

2.4. Aplicaciones de los alginatos

Los alginatos presentan una amplia y creciente gama de aplicaciones en la industria debido a sus múltiples propiedades como: su habilidad de formar geles, su capacidad de encapsular agentes activos, retener agua y viscosidad. Sus principales áreas de aplicación incluyen la industria alimenticia, farmacéutica, biomedicina, nutrición, cosméticos y textil. Entre sus aplicaciones se usan como

estabilizadores, espesantes, geles o aditivos farmacéuticos que están relacionadas su distribución de monómeros a lo largo de la cadena polimérica y a la relación M/G.

2.4.1. Alimenticia

Los alginatos son comúnmente usados en el área alimenticia en la modificación de las propiedades de los alimentos como lo es su capacidad de retención de agua, espesante y agente estabilizante. Como agente espesante, el alginato presenta ventajas en términos de adhesividad en comparación a espesantes comerciales [29]. Por lo tanto, es usado para mejorar la textura de los alimentos, las propiedades organolépticas y características que favorezcan a la aceptación del consumidor. Por ejemplo, el alginato es comúnmente utilizado en el yogurt para mantener y mejora la forma cuajada y evitar que la viscosidad caiga durante la esterilización, la cual se realiza a altas temperaturas, obteniendo así una textura más cremosa, asiéndola más agradable para el consumidor [30]. Otros ejemplos donde es utilizado como agente espesante y gelificante son en salsas, mermeladas, jarabes, tartas de frutas y alimentos para animales [31]. Como agente estabilizante, el alginato se puede agregar a la cerveza para mantener y estabilizar la espuma [32].

El alginato de calcio se usa en la producción de helado para estabilizar y disminuir los cristales de hielo y así brindar una sensación agradable al momento de consumirlo [33]. En la industria cárnica las estructuras de alginato de calcio se emplean como alternativa a las tripas naturales de animales [31].

El alginato también es utilizado para el recubrimiento de alimentos. Por ejemplo, se aplica un recubrimiento de alginato en frutas y verduras para reducir la oxidación de lípidos, la pérdida de nutrientes y crecimiento microbiano. Además, previene la descomposición durante el transporte y almacenamiento, ayudando a mantener los alimentos frescos por más tiempo [34], [35]. Otra de las aplicaciones del alginato en el área alimenticia es como agente encapsulante de nutrientes específicos, como la vitamina C, vitamina B1 y vitamina B12; lo cual proporciona a los alimentos una mayor nutrición [36], [37], [38].

2.4.2. Biomedicina

Debido a su buena biocompatibilidad y biodegradabilidad el alginato es comúnmente empleado en la industria biomédica y farmacéutica. Una de sus aplicaciones es como agente aglutinante para sistemas de liberación controlada y liberación inmediata de fármacos. Al encapsular ciertas sustancias activas (células, enzimas, fármacos, proteínas, etc.) en sustrato de alginato protege los fármacos retrasando su liberación y prevenir la inactividad prematura para que los fármacos alcancen el sitio de destino para completar la terapia dirigida [18]. Recientemente se ha demostrado que los alginatos pueden usarse como una matriz para cultivos de tejidos tridimensionales, trasplantes de células en diabetes y fabricación de medicamentos a base de alginato en el tratamiento de enfermedades neurológicas [39]. Otra de sus aplicaciones en esta área es como regeneración de hueso, donde se demostró que el gel de alginato de calcio proporciona células formadoras de hueso en modelos animales, lo cual puede conducir a la regeneración ósea mediante la administración de factores de crecimiento [40]. El gel de alginato de calcio también se puede utilizar para hacer moldes de impresión dental [41].

2.4.3. Bioimpresión 3D

Otra área de aplicación en la que el alginato ha tomado lugar es en la bioimpresión 3D; la cual es una nueva tecnología de fabricación aditiva para la fabricación de estructuras que se asemejan en arquitectura al tejido biológico nativo [18]. El alginato se puede cargar en un andamio híbrido de bioimpresión 3D que se aplica para la regeneración o remplazo de tejidos y órganos [42].

2.4.4. Adsorción de contaminantes

El alginato se ha empleado en la adsorción de iones metálicos en aguas residuales contaminadas. Se ha demostrado que los hidrogeles basados en alginato, reforzados con materiales inorgánicos o mezclas de redes poliméricas, son eficientes para la remoción de metales pesados (Ni^{2+} , Cr^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} y Cd^{2+})

presentes en ecosistemas acuáticos [43], [44], [45]. Por lo tanto, el alginato forma parte en el tratamiento de la contaminación ambiental de aguas residuales.

2.5. Apósitos

Una herida es una alteración en la continuidad del revestimiento epitelial de la piel resultado de un daño físico o térmico [46]. Las heridas se clasifican en agudas y crónicas, dependiendo de la duración y del proceso de curación. Las heridas agudas se caracterizan por ser lesiones en la piel que se producen por un accidente o una lesión quirúrgica y se curan en un periodo de tiempo predecible dependiendo del tamaño, profundidad y extensión del daño en la epidermis y en la dermis. Las heridas crónicas no siguen el proceso normal de curación y no pueden sanar de manera organizada y oportuna; estas heridas suelen ser causadas por úlceras de decúbito, úlceras en las piernas y quemaduras. Para promover la curación de heridas agudas y crónicas, es crucial proporcionar un entorno adecuado [47], [48], [49]. Por lo tanto, el uso de apósitos para heridas favorece el proceso de curación.

Los apósitos son utilizados para cubrir y proteger heridas para evitar más lesiones o infecciones, además facilitan la cicatrización y promueven un entorno óptimo para la curación. Los apósitos son realizados a partir de biopolímeros, polímeros sintéticos y biomateriales. Algunos de los biopolímeros más utilizados son el alginato, el quitosano, el fucoïdan, ácido hialurónico, entre otros; esto debido a que presentan propiedades de no toxicidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad y no inmunogénicos. La selección de apósitos para el cuidado de heridas es crucial para una curación efectiva. Algunas de las características que presentan los apósitos son [48], [50]:

1. Manejo de exudado: Los apósitos deben absorber el exudado de la herida con el fin de promover la cicatrización.
2. Promoción de factores de curación:

- Migración epidérmica: Para mejorar la migración epidérmica el apósito debe mantener la temperatura adecuada del tejido para mejorar el flujo sanguíneo, y así favorecer a la regeneración del tejido.
 - Angiogénesis: Algunos apósitos promueven el crecimiento de vasos sanguíneos (angiogénesis).
 - Intercambio de gases: Los apósitos deben permitir el intercambio de gases entre la herida y el entorno.
3. No adherentes: Los apósitos no deben adherirse a la herida para ser fáciles de retirar sin traumatizar la herida ni el tejido circundante.
 4. Estéril, no tóxica y no alérgica: Los apósitos deben cumplir con estas propiedades para propiciar un ambiente adecuado para el tratamiento de la curación de heridas.

Los apósitos se clasifican en tradicionales, basados en biomateriales y artificiales. Los apósitos tradicionales son comúnmente de gasa o compuestos de gasa y algodón y se emplean para proteger las heridas del contacto con el entorno y detener el sangrado [51]. Se caracterizan por poseer una alta capacidad de absorción; sin embargo, la filtración de exudados puede provocar infecciones bacterianas y pueden llegar a adherirse a la herida. Los apósitos basados en biomateriales son apósitos naturales con estructuras de tipo colágeno, un ejemplo de estos son los injertos de fragmentos de piel de algún donante [48], [52]. Los apósitos artificiales se realizan a partir de biopolímeros (alginato, quitosano, fucoidan, ácido hialurónico) y polímeros sintéticos (poliuratanos, teflón, proplast, metacrilato de metilo, silicón). Presentan características ideales para el tratamiento de heridas y quemaduras. Se clasifican en películas/membranas, hidrogeles, espumas, aerosoles, composites y sistemas de partículas [53].

2.6. Alginato en apósitos

Los apósitos para heridas deben contar con capacidades de detener hemorragias, reducir infecciones, absorber exudados y mejorar la cicatrización. El alginato al ser un biopolímero con propiedades de biocompatibilidad y no toxicidad, tiene una amplia variedad de aplicaciones en el área biomédica. Debido a esto, el alginato ha sido empleado para la fabricación de apósitos en forma de hidrogeles, nanofibras, membranas, esponjas, películas y espumas. En comparación con los apósitos tradicionales para tratar heridas, los apósitos a base de alginato se caracterizan por una alta absorción de agua, poseer una mayor porosidad y mejorar la actividad antibacteriana. Los apósitos a base de alginato se preparan por medio de la formación de un gel, mediante la reticulación iónica de iones de calcio, magnesio, bario, cadmio, entre otros [10], [53].

El efecto inmunogénico de los apósitos de alginato esta influenciado por la cantidad de bloques M. Es decir, que los alginatos con mayor contenido de bloques M son mucho más potentes para inducir la producción de citoquinas en comparación con los alginatos con mayor contenido de bloques G [54]. La cicatrización de heridas es el resultado de interacciones entre citoquinas, factores de crecimiento y la matriz extracelular [48]. Se han propuesto varios mecanismos por los cuales los bloques M influyen en la producción de citocinas, uno de ellos es la interacción con receptores celulares, en el que los bloques M interactúan con receptores específicos en las células inmunitarias, desencadenando una cascada de señalización que afecta la producción de citocinas. Otro de los mecanismos propuestos es que los bloques M modifican las propiedades fisicoquímicas del microambiente, lo que a su vez influye en la función de las células inmunitarias [55]. Por lo tanto, inducir la producción de citoquinas promueve la curación de heridas.

Los apósitos de hidrogel tienen la capacidad de absorber una gran cantidad de agua, cargar y liberar agentes bioactivos, y se pueden adaptar para que sean químicamente estables o se degraden al contacto con fluidos biológicos en un periodo de tiempo [53]. Sin embargo, presentan una mala estabilidad mecánica en estado hinchado y llegan a deshidratarse si no se cubren [56]. Los apósitos de

alginato en películas además de proteger la herida de infecciones bacterianas tienen la capacidad de permeabilidad al vapor de agua, dióxido de carbono y oxígeno, y puede combinarse con otros polímeros para mejorar sus propiedades mecánicas; su limitante es que no son muy eficaces para heridas con exudados excesivos [53], [56]. Los apósitos de nanofibras de alginato imitan la matriz extracelular propiciando la formación de tejido nuevo y sus mallas nanofibrosas promueven la hemostasia de los tejidos lesionados. Sin embargo, las propiedades de las nanofibras pueden variar dependiendo del método de preparación [57].

2.7. Métodos de extracción

Existen distintos tipos de metodologías para la extracción de alginato de algas marinas. El método convencional consiste en aislar el alginato mediante el uso de soluciones ácidas y alcalinas que permiten convertir su forma insoluble (presente en la pared celular) en una forma soluble. A pesar de ser un método en el que se obtiene un buen rendimiento con producto de calidad, a través de un proceso confiable, presenta ciertas desventajas ya que se requieren altas temperaturas y largos tiempos de aislamiento [58]. Además, el uso de solventes orgánicos impacta de forma negativa en el ecosistema. Debido a esto, se han propuesto otras técnicas de extracción tales como la extracción basada en enzimas, asistida por ultrasonido y microondas, las cuales buscan minimizar el impacto ambiental de los métodos químicos.

2.7.1. Método enzimático

El método de extracción enzimático consiste en el uso de enzimas que degradan las paredes celulares del alga, liberando su contenido a través de un proceso orgánico, es decir, amigable con el medio ambiente [59]. Estas enzimas pueden digerir los carbohidratos y las proteínas que forman redes estructurales en el alga, de esta forma, permiten liberar las sustancias ahí contenidas sin degradarlas [60], [61]. Para la extracción se emplean enzimas hidrolíticas y proteasas, estas enzimas

se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo: Viscozima, alcalasa, celluclast y termamyl [62].

Los métodos enzimáticos presentan ventajas tales como un bajo costo de operación, bajo requerimiento de solvente, mayor rendimiento, y la particularidad de ser amigable con el medio ambiente [61], [63]. No obstante, dichas técnicas presentan algunos inconvenientes ya que el método requiere de largos tiempos de incubación en procesos de tipo batch, lo que alarga el proceso de extracción. Diferentes parámetros se deben de considerar en los métodos de extracción enzimática tales como la temperatura, el pH, tiempo y la concentración de la enzima en la muestra. Este método de extracción afecta el peso molecular de los polisacáridos extraídos, por lo tanto, modificando el pH del proceso de extracción se obtienen componentes de bajo peso molecular [61], [62]. Los porcentajes de extracción de alginato reportados por medio de esta metodología varían de un 6% a un 22% dependiendo del tipo de alga [64], [65], [66].

2.7.2. Método asistido por ultrasonido

El método de extracción asistido por ultrasonido consiste en exponer la biomasa del alga estando en un medio acuoso a frecuencias de ultrasonido mayores a 20 KHz. Estas frecuencias generan la formación de burbujas que se expanden y contraen debido a la propagación de ondas dando como resultado un aumento de la presión y la temperatura de la muestra. Para la liberación de contenido intracelular en el solvente, las burbujas deben implosionar cerca de las paredes celulares, por lo que, reducir el tamaño de partículas del alga ayuda a mejorar el proceso de extracción [61]. Al ser un método de extracción rápida, tener un menor tiempo de procesamiento, simplicidad y bajo costo, ha ganado interés como una alternativa a los métodos actuales para la extracción de compuestos de algas [67].

Es importante definir y optimizar las condiciones de extracción asistido por ultrasonido, ya que su eficiencia se verá afectada por la temperatura, tiempo, potencia, proporción del solvente y el compuesto que se desea extraer del alga. Por

medio de esta técnica se pueden obtener modificaciones estructurales como el peso molecular [63]. Para el caso particular de extracción de alginato el pH es un factor importante que considerar para establecer las condiciones óptimas [61]. Los porcentajes de extracción de alginato reportados por medio de esta metodología varían de un 15% a un 54% dependiendo del contenido de carbohidratos; los cuales varían dependiendo del tipo de alga [68], [69].

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Desarrollar una metodología para la extracción de alginato de algas pardas mediante el método enzimático y asistido por ultrasonido, y compararlo con el método químico tradicional. A la par su caracterización química y probar los alginatos para apósitos.

3.2. Objetivos particulares

1. Desarrollar métodos para la extracción de alginato de algas pardas de la especie *Macrocystis pyrifera* mediante el uso de enzimas y asistido por ultrasonido.
2. Comprender las propiedades estructurales y térmicas de los alginatos extraídos por los procedimientos químico, enzimático y asistido por ultrasonido a través de espectroscopia de infrarrojo (FT-IR), resonancia magnética de sólidos (RMN) y análisis termogravimétrico (TGA).
3. Determinar el porcentaje de rendimiento de alginato a partir de los procedimientos enzimático y asistido por ultrasonido.
4. Desarrollar una metodología para la elaboración de apósitos a partir de alginatos extraídos del alga *Macrocystis pyrifera*.
5. Estudiar el efecto del método de extracción a partir de enzimas y asistido por ultrasonido en la relación de bloques M y G en la estructura química del alginato.

4. HIPÓTESIS

La extracción de alginato a partir de algas pardas a través del método enzimático y/o asistido por ultrasonido presentará mayor rendimiento en comparación al método tradicional (químico), además se espera que las propiedades químicas de los alginatos sean similares.

5. JUSTIFICACIÓN

El continuo deterioro del medio ambiente causado por el uso indiscriminado de los combustibles fósiles y sus derivados no biodegradables ha traído consigo la búsqueda de productos biodegradables obtenidos de fuentes naturales. Las algas marinas son una fuente rica de biopolímeros con aplicaciones en distintas industrias que no ha sido explotada por completo. La presente propuesta de tesis plantea un estudio comparativo que busca la implementación de tecnologías emergentes para la extracción de alginato de algas, su caracterización y pruebas para la fabricación de apósitos.

6. METODOLOGÍA

6.1 Materiales y reactivos

En la Tabla 2 se enlistan los materiales y reactivos utilizados para la obtención de alginato de calcio y la fabricación de apósitos.

Tabla 2. *Materiales y reactivos utilizados.*

Materiales	Reactivos
<ul style="list-style-type: none">▪ Parrilla de agitación▪ Agitador magnético	<ul style="list-style-type: none">▪ Alga <i>Macrocystis pyrifera</i> seca (cosechadas en Salsipuedes,

<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vasos de precipitados ▪ Matraz Erlenmeyer ▪ Matraz Kitasato ▪ Embudo Büchner ▪ Sonicador ultrasónico QSonica modelo Q500 ▪ Baño de hielo ▪ Termómetro ▪ Papel filtro ▪ Filtro de café ▪ Tela de manta ▪ Estufa 	<p>BC, donadas por Algas Marinas S.A. de C.V.)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ácido clorhídrico (HCl, 99%) ▪ Carbonato de potasio (K₂CO₃) ▪ Cloruro de calcio (CaCl₂) ▪ Enzima Cellulase 10 XL ▪ Hidróxido de sodio (NaOH) ▪ Ácido acético (CH₃COOH) ▪ Agua destilada
--	--

6.2. Procedimiento químico

Se pesó 5 g de polvo fino de alga parda (*Macrocystis pyrifera*) previamente tratada para eliminar impurezas y reducir el tamaño de partícula. Después, se agregaron 50 mL de agua destilada y 0.85 mL de ácido clorhídrico (HCl) y se calentó la muestra a 60 °C por 30 minutos con agitación. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente para posteriormente filtrarla al vacío utilizando un filtro de café. Se lavó el filtrado con agua destilada y se recuperó la fracción sólida. Para la solubilización con carbonato de potasio se colocó el sólido filtrado en un vaso de precipitado y se adicionaron 100 mL de agua destilada y 0.75 g de carbonato de potasio (K₂CO₃), y se calentó la solución a 60 °C por dos horas. Transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente y se realizó un filtrado por medio de tela de manta como se muestra en la Figura 5. Después de 24 horas, se realizó un lavado con agua destilada para continuar el proceso con la fracción líquida. Posteriormente, el líquido se precipitó como fibras de alginato de calcio. Para esto, se pesó 1 g de cloruro de calcio y se disolvió en 50 mL de agua destilada. Se mezcló esta solución con el líquido filtrado de la muestra y se agitó por 10 minutos. Después, se filtró al vacío con papel filtro para recuperar las fibras de alginato de calcio. Se lavó la muestra con agua destilada para posteriormente retirarla del papel filtro. Se secó en una estufa a 70 °C hasta obtener un peso constante. En la Figura 6 se muestra la metodología utilizada.



Figura 5. Filtrado de la muestra con tela de manta.

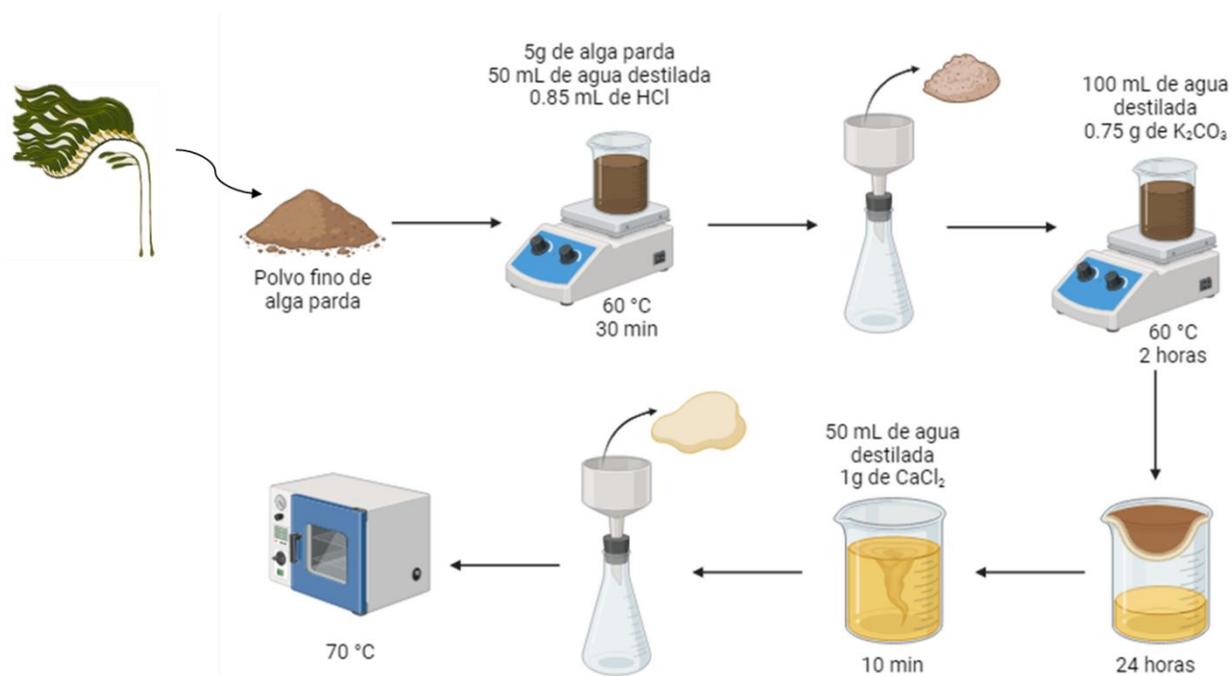


Figura 6. Representación gráfica del procedimiento químico empleado para la extracción de alginato a partir de algas pardas de la especie *Macrocystis pyrifera*.

6.3. Procedimiento enzimático

Se pesó 5 g de polvo fino de alga parda (*Macrocystis pyrifera*) previamente tratada para eliminar impurezas y reducir el tamaño de partícula. Después, se agregaron 50 mL de agua destilada y 0.85 mL de ácido clorhídrico (HCl) y se calentó la muestra a 60 °C por 30 minutos con agitación. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente para posteriormente filtrarla al vacío utilizando un filtro de café. Se lavó el filtrado con agua destilada y se recuperó la fracción sólida. Para el tratamiento enzimático, el sólido resultante es suspendido en 20 mL de agua destilada y transferido a un matraz Erlenmeyer. Posteriormente, se ajustó el pH a 5.5 utilizando hidróxido de sodio si el pH era menor o ácido acético si era mayor. Después, se calentó la solución a 55 °C con agitación. Una vez estabilizada la temperatura, se adicionó 0.15 mL de la enzima Cellulase 10XL. Se dejó incubar esta solución por 20 horas cuidando que la temperatura se mantenga en el intervalo de 53-58 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se aumentó la temperatura hasta 80 °C por 5 minutos y posteriormente se enfrió la solución en baño de hielo para inactivar la enzima. Se adicionaron 0.750 g de carbonato de potasio (K_2CO_3) y se agitó para obtener una solución homogénea. Se realizó un filtrado por medio de tela de manta colocada en un vaso de precipitado (Figura 5). Después de dejar la muestra filtrándose 24 horas, se realizó un lavado con agua destilada para continuar el proceso con el líquido filtrado. Con lo que respecta a la parte de la precipitación de las fibras de alginato como alginato de calcio se pesó 1 g de cloruro de calcio y se disolvió en 50 mL de agua destilada. Se mezcló esta solución con el líquido filtrado de la muestra y se agitó por 10 minutos. Después, se filtró al vacío con papel filtro para recuperar las fibras de alginato de calcio. Se lavó la muestra con agua destilada para posteriormente retirarla del papel filtro. Se secó en una estufa a 70 °C hasta obtener un peso constante. En la Figura 7 se muestra la metodología utilizada.

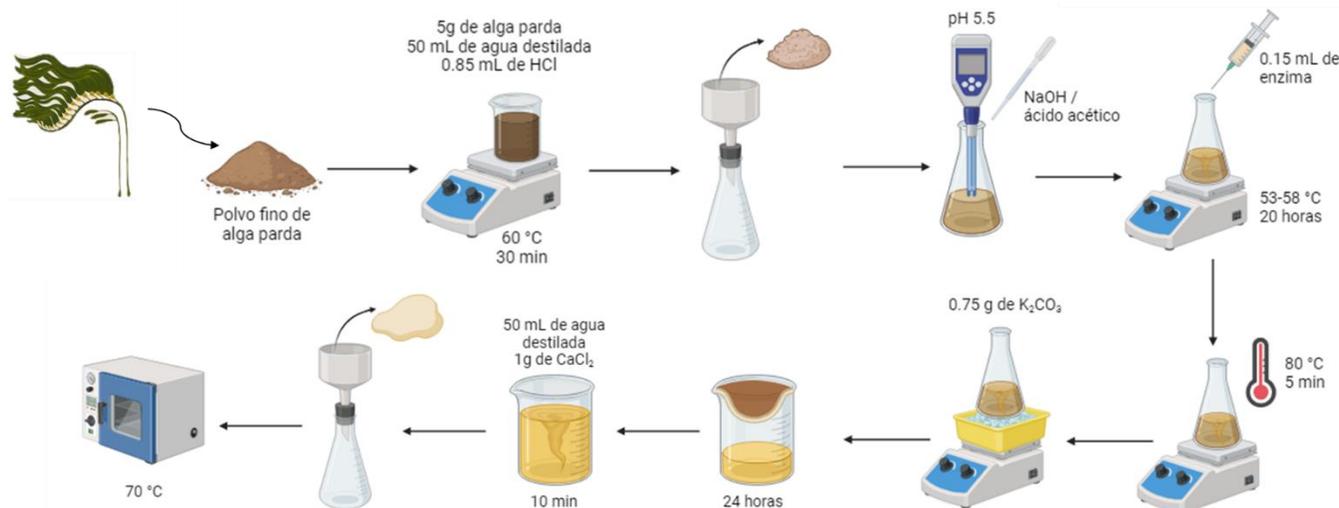


Figura 7. Representación gráfica del procedimiento enzimático empleado para la extracción de alginato a partir de algas pardas de la especie *Macrocystis pyrifera*.

6.4. Procedimiento asistido por ultrasonido

Se pesó 5 g de polvo fino de alga parda (*Macrocystis pyrifera*) previamente tratada para eliminar impurezas y reducir el tamaño de partícula. Después, se agregaron 50 mL de agua destilada y 0.85 mL de ácido clorhídrico (HCl). Se agitó esta solución por 45 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se filtró al vacío la solución con papel filtro y se realizó un lavado con agua destilada. Posteriormente, se colocó la fracción sólida en un vaso de precipitado y se agregó 0.750 g de carbonato de potasio (K_2CO_3) y 500 mL de agua destilada. Posteriormente, esta solución fue sonicada usando una amplitud del 100% sumergiendo el sonotrodo en el líquido 4 cm por 60 min. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente y se realizó un filtrado por medio de tela de manta (Figura 5). Después de dejar la muestra filtrándose 24 horas, se realizó un lavado con agua destilada para continuar el proceso con el líquido filtrado. Posteriormente, el líquido se precipitó como fibras de alginato de calcio. Para esto, se pesó 1 g de cloruro de calcio y se disolvió en 50 mL de agua destilada. Se mezcló esta solución con el líquido filtrado de la muestra y se agitó por 10 min. Después, se filtró al vacío

con papel filtro para recuperar las fibras de alginato de calcio. Se lavó la muestra con agua destilada para posteriormente retirarla del papel filtro. Se secó en una estufa a 70 °C hasta obtener un peso constante. En la Figura 8 se muestra la metodología utilizada.

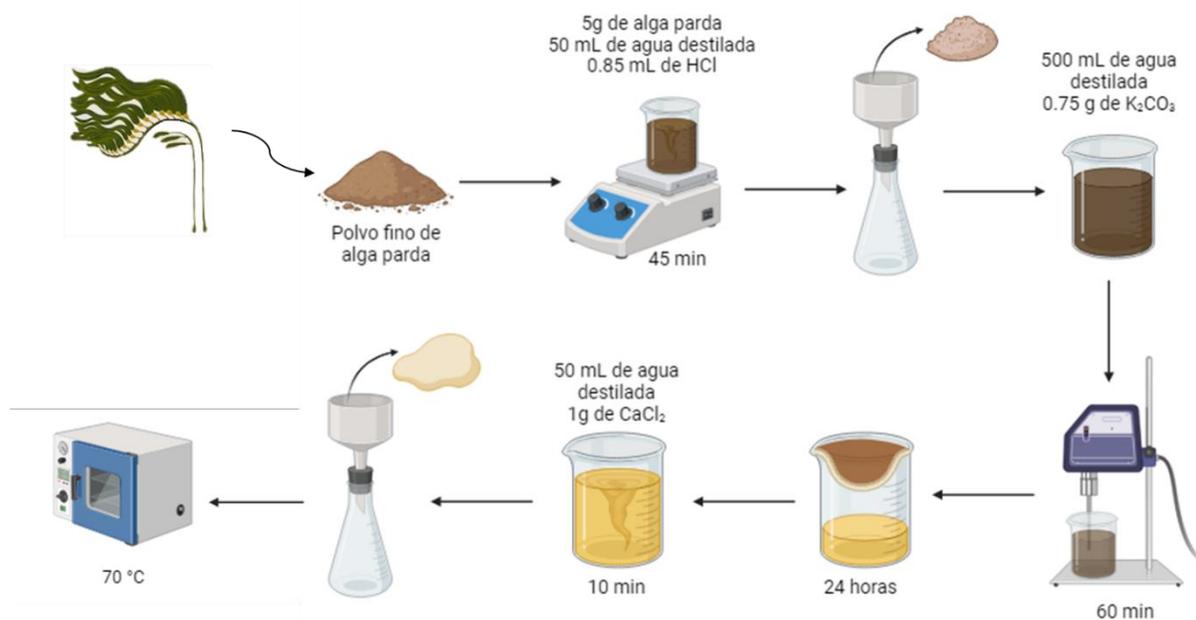


Figura 8. Representación gráfica del procedimiento asistido por ultrasonido empleado para la extracción de alginato a partir de algas pardas de la especie *Macrocystis pyrifera*.

6.5. Fabricación de apósitos con los alginatos obtenidos

Se pesó 20 g de polvo fino de alga parda (*Macrocystis pyrifera*) previamente tratada para eliminar impurezas y reducir el tamaño de partícula. Después, se agregaron 200 mL de agua destilada y 3.4 mL de ácido clorhídrico (HCl). Se agitó esta solución por 45 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se filtró al vacío la solución con papel filtro y se realizó un lavado con agua destilada. Posteriormente, se colocó la fracción sólida en un vaso de precipitado y se agregó 3 g de carbonato de potasio (K_2CO_3) y 500 mL de agua destilada. Posteriormente, esta solución fue sonicada usando una amplitud del 100% sumergiendo el sonotrodo en el líquido por

60 min. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente y se realizó un filtrado por medio de tela de manta (Figura 5). Después de dejar la muestra filtrándose 24 horas, se realizó un lavado con agua destilada para continuar el proceso con el líquido filtrado. Posteriormente, el líquido se precipitó como fibras de alginato de calcio. Para esto, se pesó 4 g de cloruro de calcio y se disolvió en 200 mL de agua destilada. Se mezcló esta solución con el líquido filtrado de la muestra y se agitó por 10 min. Después, se filtró al vacío con papel filtro para recuperar las fibras de alginato de calcio. Se dejó filtrando hasta que las fibras de alginato se compactaron y se obtuviera una membrana delgada. Se colocó la membrana cuidadosamente en un vidrio de reloj y se secó en una estufa a 70 °C por dos horas para eliminar la humedad excedente. En la Figura 9 se muestra la metodología utilizada.

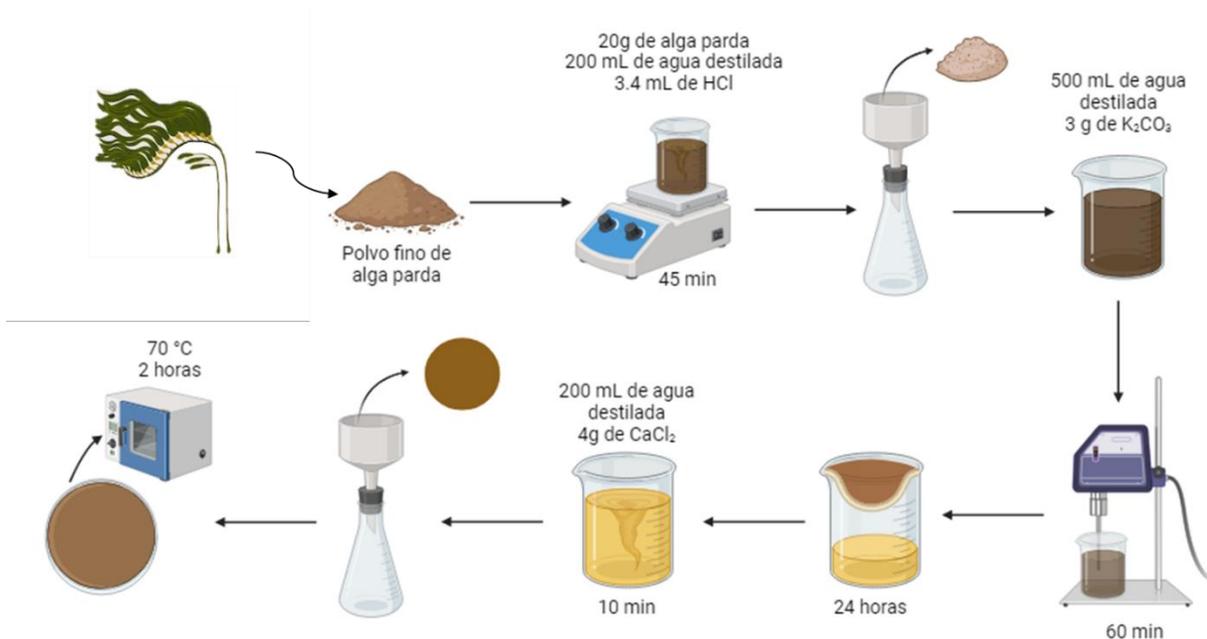


Figura 9. Representación gráfica del procedimiento para la fabricación de apósitos de alginato a partir de algas pardas de la especie *Macrocystis pyrifera*.

7. Técnicas de caracterización

7.1. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

La técnica de IR proporcionó información sobre los distintos enlaces químicos de las muestras de alginato. El estudio se realizó en un espectrofotómetro de Nicolet Is50 en un rango de longitud de onda de 4000 a 500 cm^{-1} .

7.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

Con la técnica de TGA se determinó la estabilidad térmica del alga y de los alginatos extraídos a través de los procedimientos químico, enzimático y asistido por ultrasonido. Para el análisis térmico fue utilizado el analizador termogravimétrico TGA Q 500 V6.7 en un rango de temperaturas de 25 °C hasta 700 °C con inyección de oxígeno a 600 °C.

7.3. Resonancia magnética nuclear en estado sólido

La técnica se usó para obtener un análisis de la relación de los bloques M/G de la estructura de los alginatos obtenidos por los procedimientos químico, enzimático y asistido por ultrasonido. Estas mediciones se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker 500MHz Avance III con sonda de sólidos corridos en un rotor de óxido de zirconio de 4mm ID a 10 KHz.

8. RESULTADOS

8.1. Rendimiento de alginato

En la Tabla 3 se presentan los tres rendimientos promedio de alginato extraído a partir de 5 g de polvo de alga de los procedimientos químico, enzimático y asistido por ultrasonido; así como los rendimientos obtenidos del escalamiento a 20 g de polvo de alga. De acuerdo con estos datos, el método de extracción de alginato asistido por ultrasonido es el que mayor rendimiento genera (30.72%). Esto es debido a que la energía generada por las ondas ultrasónicas fragmenta la pared celular y las fibras de celulosa, las cuales se encuentran dentro de la pared celular liberando el alginato externo y una mayor cantidad de alginato interno. Este fenómeno se facilita por la relación agua/alga de 100/1 generando una mayor cantidad de burbujas que implosionan sobre la superficie de la pared celular y las fibras de celulosa del alga. Para el caso del método enzimático, el porcentaje de extracción es mayor con respecto al método químico; lo cual se puede explicar debido a que la enzima tiene la capacidad de degradar tanto a la pared celular como las fibras de celulosa liberando alginato externo e interno. En lo que respecta al método químico el porcentaje de extracción del alginato es menor debido a que el HCl puede fragmentar o solo reblandecer la pared celular liberando el alginato externo y parte del alginato interno; es por esta razón que los porcentajes de rendimiento tienden a variar. Esta reportado que el porcentaje de alginato contenido en el alga *Macrocystis Pyrifera* es de 29-38% en peso seco [31], siendo esta especie la más rica en contenido de este polisacárido en comparación con otras especies cuyo contenido varía entre 16-19% [22], el cual varía debido a factores relacionados al cultivo del alga.

En la Figura 10 se presenta la gráfica con los promedios de cada procedimiento con sus respectivas desviaciones estándar, donde se puede observar que estadísticamente los procesos químico y enzimático al toparse sus desviaciones estándar presentan los mismos rangos de porcentaje de rendimiento de alginato.

Sin embargo, el proceso asistido por ultrasonido estadísticamente es el que presenta un aumento significativo en el rendimiento de alginato.

Tabla 3. Rendimiento de extracción de alginato de las muestras tratadas a partir de los procedimientos químico, enzimático y asistido por ultrasonido.

Peso del alga (g)	Peso alginato seco (g)	Rendimiento (%)	Promedio (%)	Desviación estándar (%)
Proceso químico				
5	1.037	20.74		
5	0.759	15.18		
5	0.733	14.66	15.89	±3.36
20	2.6	13		
Proceso enzimático				
5	1.144	22.88		
5	1.062	21.24		
5	1.04	20.8	20.60	±2.25
20	3.5	17.5		
Proceso asistido por ultrasonido				
5	1.513	30.26		
5	1.621	32.42		
5	1.475	29.50	30.60	±1.26
20	6.046	30.23		

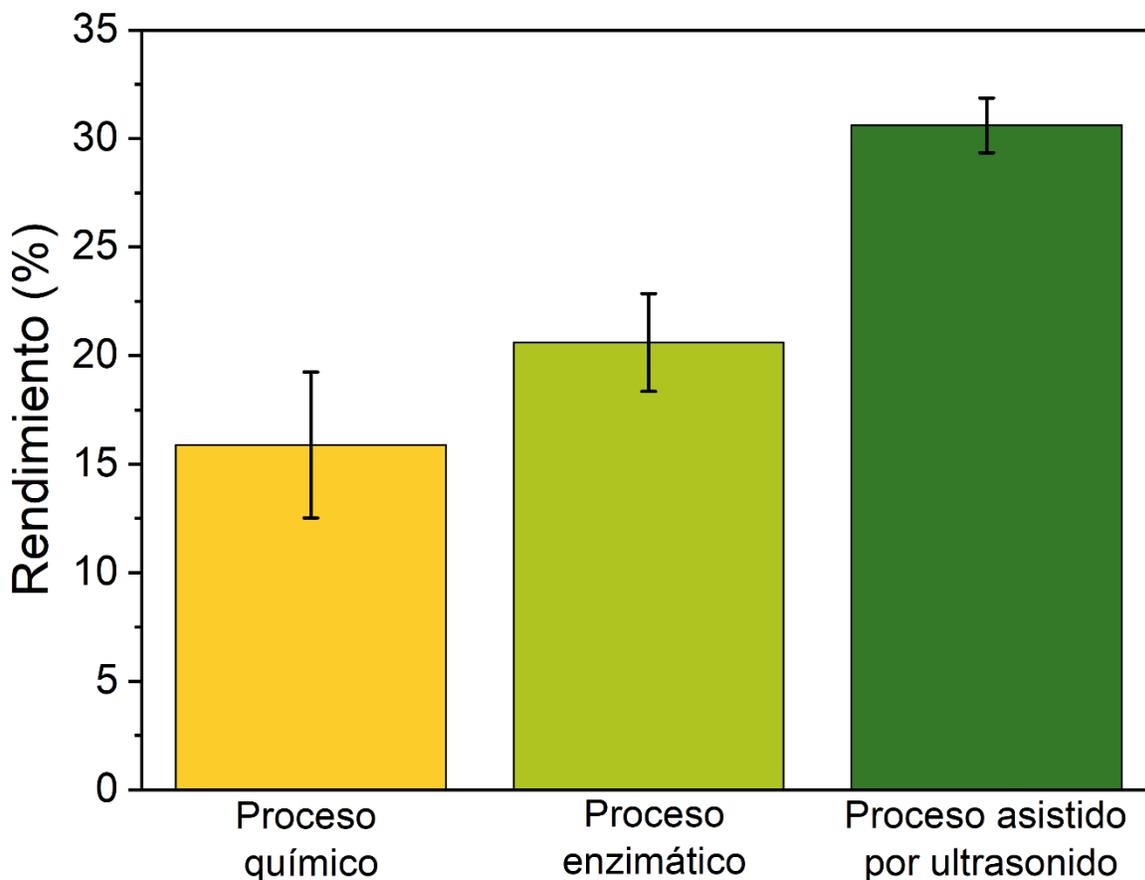


Figura 10. Gráfica de los promedios de rendimiento de extracción de alginato a partir de los procesos químico, enzimático y asistido por ultrasonido.

8.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros FT-IR del alga y de los alginatos extraídos de algas pardas de la especie *Macrocystis pyrifera* por los tres métodos (químico, enzimático y asistido por ultrasonido) se presentan en la Figura 11. Tomando como referencia el espectro obtenido del alga sin ningún tratamiento se puede observar que se presentan las mismas señales características que en los espectros de los alginatos obtenidos de los tres métodos. La banda de absorción en aproximadamente 3349 cm^{-1} corresponde al estiramiento del grupo OH, la señal de baja intensidad a 2926 cm^{-1} se atribuye a la vibración de estiramiento C-H. Para el caso de las muestras de alginato se observa que esta señal (OH) tiende a ser más ancha con respecto a la

del alga; esto es una evidencia del cambio químico del que están rodeados los grupos OH. Las señales asimétricas y simétricas de los grupos COO se presentan aproximadamente a 1602 y 1422 cm^{-1} respectivamente [70]. La intensidad de la señal simétrica del alginato extraído por el método químico y del alga es baja con respecto al alginato extraído por el método enzimático y asistido por ultrasonido; lo cual es un indicativo de una mayor presencia de calcio para el método químico y del alga [71]. En la región entre 962 y 1200 cm^{-1} corresponde a las bandas de absorción de vibración de los anillos monoméricos de los carbohidratos [70], [72]; esta región está conformada por un grupo de tres señales las cuales al desplazarse a menores números de onda es un indicativo a mayor presencia de calcio debido al debilitamiento de los enlaces C-C y C-O los cuales se comparten con el ion de calcio [71]. La señal presentada en 938 cm^{-1} se debe a la vibración de estiramiento de CO de los residuos de ácido urónico [73]; y en 876 cm^{-1} que es mucho más intensa para el método enzimático y asistido por ultrasonido corresponde a la existencia de un anillo vibratorio de α -L-gulurónico [74]. El residuo del ácido β -D-manurónico se observa en 818 cm^{-1} donde esta señal es más intensa en el procedimiento químico. La señal ubicada en 700 cm^{-1} puede estar atribuida a la vibración en modo flexión fuera del plano del C-O. Esta vibración se activa probablemente debido al incremento del volumen libre en el entorno de la estructura de bloques M, y es por esto por lo que en el procedimiento asistido por ultrasonido se intensifica en mayor medida.

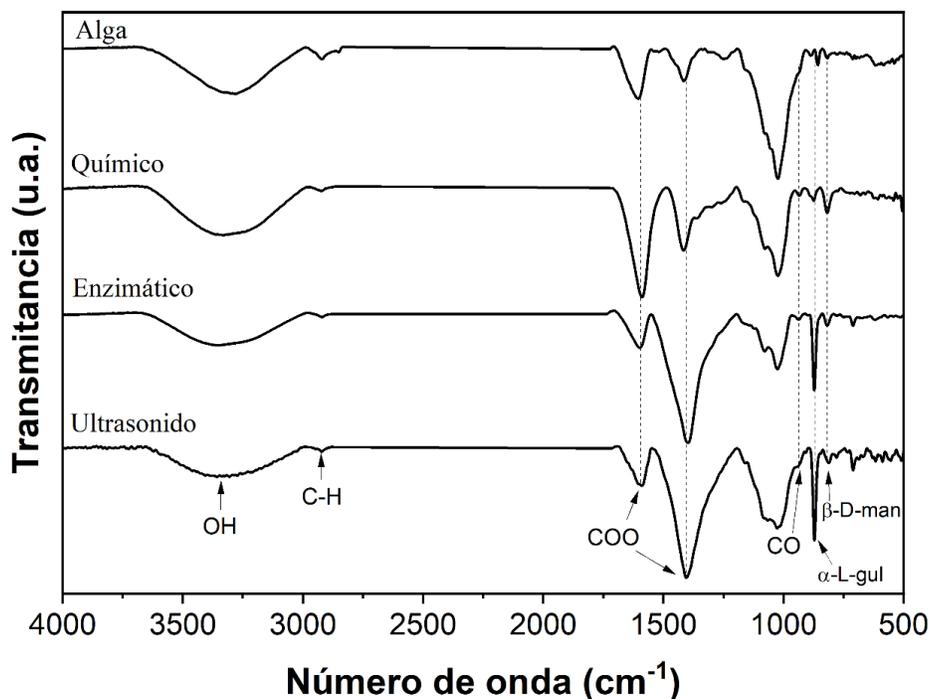


Figura 11. Espectros FT-IR de polvo de alga de la especie *Macrocyctis pyrifera* y de los alginatos de calcio extraídos de los procesos químico, enzimático y asistido por ultrasonido.

8.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Se realizó el análisis termogravimétrico para determinar la estabilidad térmica del alginato extraído a través de los diferentes procedimientos; los cuales se presentan en la Figura 12. Para la muestra del alga parda en polvo de la especie *Macrocyctis pyrifera* se presenta una pérdida de humedad de aproximadamente 11% a una temperatura aproximada de 150 °C. De 200-350 °C presenta dos pérdidas de peso; donde la primera pérdida de 24% a 250 °C es atribuida a la degradación de las hemicelulosas, y la segunda pérdida a 320 °C con un valor de 21% a la degradación de la celulosa [75]. El alga presenta un residuo de 40% de material inorgánico debido al alto contenido de sales y otras impurezas.

Para los tres procedimientos la primera pérdida de peso con un valor aproximado de 9 % se observa en un rango de temperaturas de 22-180 °C el cual se atribuye a la pérdida de agua [76]. La siguiente pérdida de peso con valores de 20%, 9% y

12% para los procedimientos químico, enzimático y asistido por ultrasonido, respectivamente está asociada con el rompimiento de los enlaces glicosídicos el cual ocurre en un rango de temperaturas de 160-230 °C, así como la pérdida de peso con valor aproximado de 20 % observado en el rango de temperaturas de 230-340 °C; dichas pérdidas de peso se presentan como las señales más intensas en la Figura 13 representando un máximo de pérdida de peso [77]. Aproximadamente el 50 % restante de las tres muestras corresponde a material carbónico intermedio. En el rango de temperaturas de 380-560°C se presenta una pérdida de peso de 7% asociada con la oxidación del material carbónico intermedio previamente formado [76]. A los 600 °C se le realizó inyección de oxígeno para degradar los residuos carbonosos. La descomposición del carbonato de calcio dio como resultado la formación de dióxido de carbono y óxido de calcio atribuyendo el residual del 40 % en 650 °C para las muestras del procedimiento químico y enzimático, y de un 16% para el proceso asistido por ultrasonido.

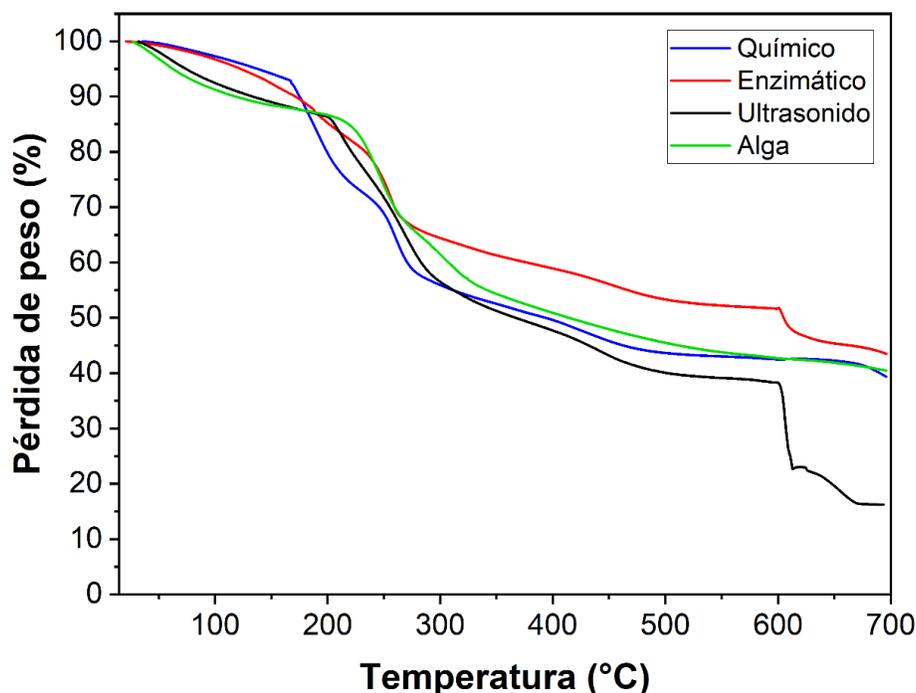


Figura 12. TGA del polvo de alga de la especie *Macrocystis pyrifera* y de los alginatos de calcio extraídos de los procesos químico, enzimático y asistido por ultrasonido.

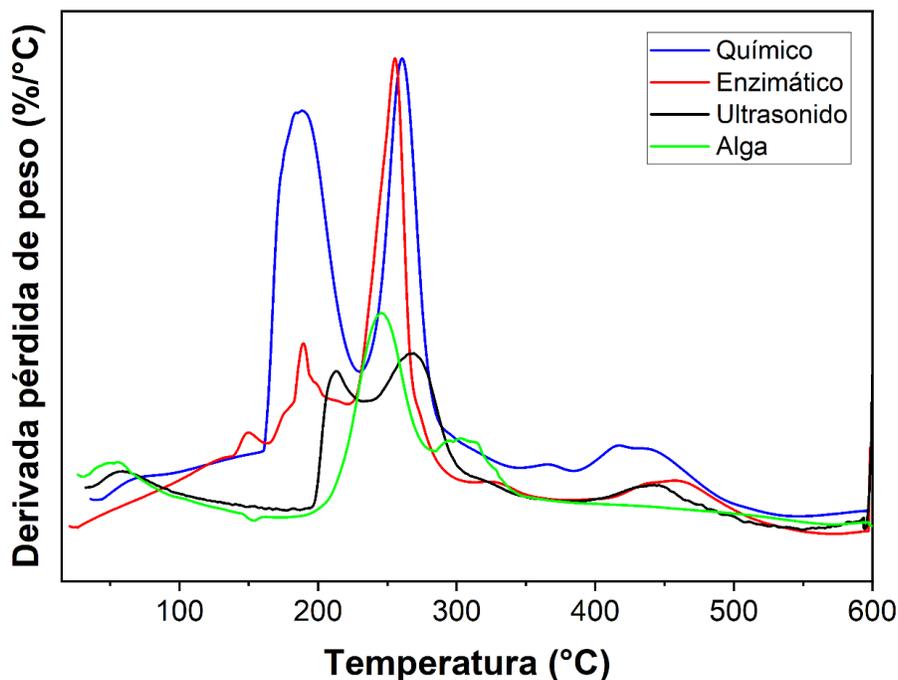


Figura 13. Derivada de la pérdida de peso del polvo de alga de la especie *Macrocystis pyrifera* y de los alginatos de calcio extraídos de los procesos químico, enzimático y asistido por ultrasonido.

8.4. Resonancia magnética nuclear en estado sólido

En la Figura 14 se muestra el espectro de RMN ^{13}C en estado sólido de los alginatos de calcio extraídos por los procedimientos químico, enzimático y asistido por ultrasonido, y en la Figura 15 se presenta la estructura química del alginato con cada carbono enumerado. Los espectros obtenidos se pueden separar en tres regiones: la región piranosa de 60-90 ppm, la región anomérica que comprende de 90-115 ppm y la región de los grupos carboxilatos entre 170-190 ppm [78], [79], [80]. Las señales de ^{13}C de los monómeros M y G en las regiones piranosa y anomérica presentan anchos de línea e intensidades comparables; con las cuales se puede determinar la relación M/G de las muestras de alginato de calcio. La región anomérica evalúa los carbonos presentes en el puente glicosídico el cual determina la interacción y la formación de los bloques (M y G) [81]. Como se puede observar en el espectro, los carbonos G_1 presentan mayor intensidad para los procedimientos

químico y enzimático, mientras que para el procedimiento asistido por ultrasonido los carbonos M_1 son los que presentan mayor intensidad. En la región piranosa, las señales de los carbonos G_4 y M_4, M_5 tienden a desaparecer al incrementar el contenido de calcio [71], [78]. Es por esta razón que las señales de los carbonos M_2, M_3 y G_3, G_5 son las que comúnmente se emplean para determinar la relación M/G, es decir, si hay más presencia de bloques G o bloques M. En el procedimiento químico al poseer señales más intensas en G_3, G_5 y G_1 nos dice que los alginatos obtenidos poseen mayor cantidad de bloques G en su estructura. Para los alginatos extraídos por el procedimiento enzimático al poseer señal más intensa en M_2, M_3 en comparación a la señal de los carbonos G_3, G_5 es un indicativo a que posee una mayor cantidad de bloques M. En el procedimiento asistido por ultrasonido al tener señales más intensas en M_1 y M_2, M_3 en comparación a las señales G_1 y G_3, G_5 respectivamente, los alginatos por este procedimiento tienen mayor presencia de bloques M [82].

Según la literatura el carbono de la piranosa G_2 no se ve afectado significativamente por una relación M/G diferente, debido a que estas señales no se encuentran en posiciones estratégicas con respecto a posibles cambios químicos del entorno relacionados con la estructura primaria del polisacárido; es decir, la secuencia de los monómeros M y G [78].

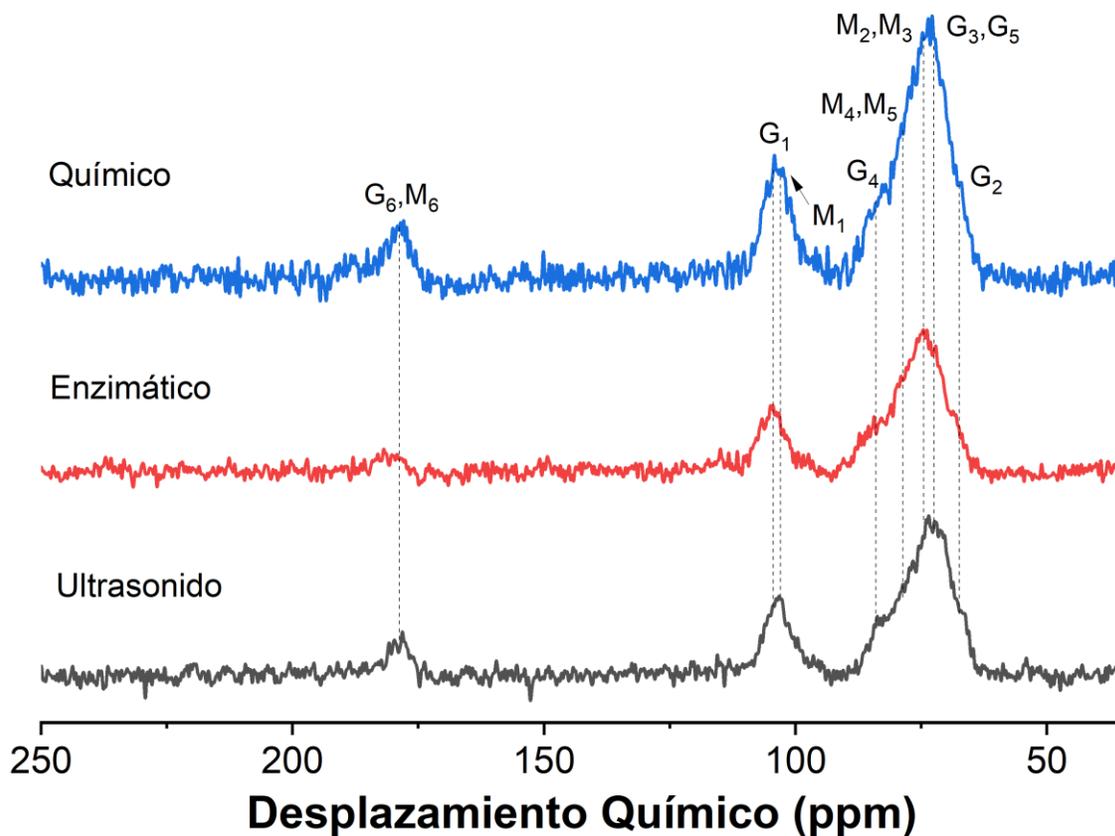


Figura 14. Espectro RMN ^{13}C en estado sólido de los alginatos de calcio extraídos de los procedimientos químico, enzimático y asistido por ultrasonido.

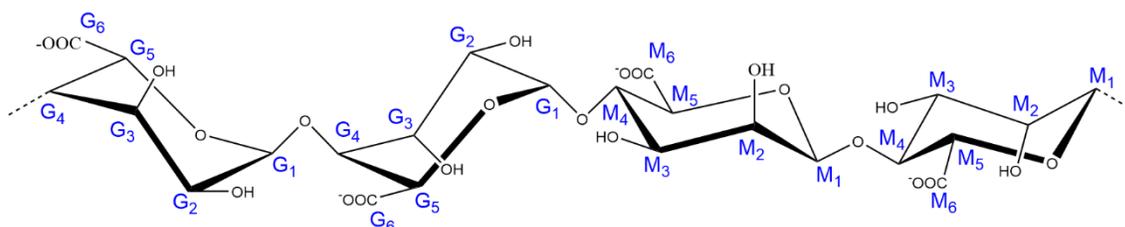


Figura 15. Estructura química del alginato con cada carbono enumerado.

8.5. Prototipo de apósito de alginato de calcio extraído del alga *Macrocystis pyrifera*

Para la fabricación de apósitos se empleó el alginato extraído a partir del método asistido por ultrasonido debido a que este presentó mayor porcentaje de rendimiento y menor tiempo de producción en comparación a los procedimientos enzimático y químico. Además, en base a los análisis realizados se encontró que el procedimiento asistido por ultrasonido presenta una mayor cantidad de bloques M en comparación a los bloques G, lo cual hace que estos alginatos según la literatura presenten en mayor medida características favorables para la curación y cicatrización de heridas.

Al realizar la precipitación de las fibras de alginato como alginato de calcio en el procedimiento asistido por ultrasonido se roció por medio de un aerógrafo la solución de cloruro de calcio (CaCl_2) para la obtención del apósito, lo cual dio como resultado que la estructura no fuera uniforme y solo la parte superior se gelificara. En la Figura 16 se muestran fotografías de las muestras con resultados inadecuados por medio de esta metodología.



Figura 16. Fotografías de experimentos repetidos de los apósitos no obtenidos rociando con aerógrafo la solución de CaCl_2 .

Al comprobar que con el aerógrafo no se lograban obtener los apósitos, se optó por verter la solución de CaCl_2 sobre la muestra. Se observó la formación de una

película delgada uniforme, pero debido al alto contenido de humedad el apósito se fragilizó. En la Figura 17 se muestran fotografías de experimentos inesperados para la obtención de apósitos por medio de esta metodología.

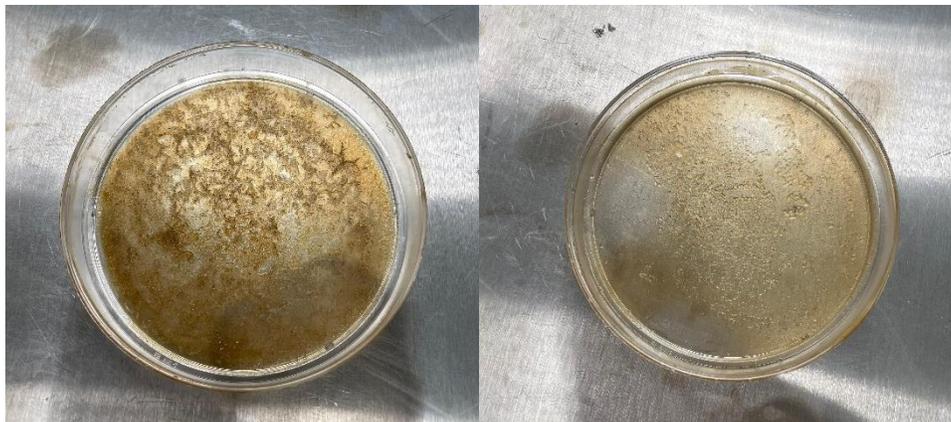


Figura 17. *Fotografías de experimentos repetidos de los apósitos no obtenidos vertiendo la solución de CaCl_2 sobre la muestra.*

Para obtener películas con mayor espesor, se optó por escalar el procedimiento asistido por ultrasonido a 20 g de alga con el fin de obtener un mayor contenido de alginato y para disminuir el contenido de agua, se filtró la muestra después de agregar la solución de CaCl_2 . En la Figuras 18 y 19 se muestran los apósitos húmedos y secos obtenidos por medio de esta metodología. Bajo este procedimiento se logró obtener exitosamente los apósitos de alginato extraídos a partir de la metodología asistida por ultrasonido.



Figura 18. Apósitos de alginato de calcio extraídos del alga *Macrocystis pyrifera*.



Figura 19. Apósitos secos de alginato de calcio extraídos del alga *Macrocystis pyrifera*.

9. CONCLUSIONES

1. Se desarrollaron exitosamente las metodologías para la extracción de alginato a partir de algas pardas mediante el método enzimático y asistido por ultrasonido con rendimientos mayores al procedimiento tradicional (químico). Además, las propiedades químicas fueron similares en comparación a los alginatos extraídos por el proceso químico.
2. Los procedimientos enzimático y asistido por ultrasonido pueden eliminar el uso de soluciones ácidas que se usa para reblandecer la pared celular, y así minimizando el impacto ambiental de las extracciones del alginato.
3. El procedimiento asistido por ultrasonido para la extracción de alginato de calcio es el más eficiente en comparación a los procedimientos químico y enzimático debido a que presenta un mayor porcentaje de rendimiento y un menor tiempo de extracción. Este procedimiento tiene el potencial de escalarse a nivel piloto y a nivel industrial.
4. Para obtener un incremento en el rendimiento de extracción del alginato; se tiene que fragmentar la pared celular y las fibras de celulosa del alga para liberar el alginato interno y externo, lo cual se logra con el uso de enzimas y ultrasonido.
5. El tipo de proceso de extracción de alginato tiene un efecto en la relación de bloques M y G de la estructura del alginato. Los alginatos extraídos por el método químico poseen mayor cantidad de bloques G y los extraídos por los métodos enzimático y asistido por ultrasonido su relación de bloques M es mayor.
6. Se desarrolló una metodología exitosa para la fabricación apósitos a partir del alga parda *Macrocystis pyrifera* usando el método asistido con ultrasonido.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

Además de los resultados obtenidos en este proyecto de investigación, se proponen estudios adicionales que abran paso al planteamiento de proyectos futuros y mejoras en el sistema planteado de esta tesis:

1. Realizar pruebas de tensión, absorción y determinar propiedades reológicas de los apósitos obtenidos.
2. Combinar el alginato con otros biopolímeros y/o aditivos funcionales para mejorar las características de los apósitos.
3. Optimizar la metodología para la obtención de los apósitos.
4. Desarrollar una metodología para la extracción de alginato empleando enzimas y ultrasonido.
5. Determinar el peso molecular de los alginatos extraídos.

11. REFERENCIAS

-
- [1] H. P. S. Abdul Khalil *et al.*, “Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material,” *Express Polym Lett*, vol. 11, no. 4, pp. 244–265, 2017, doi: 10.3144/expresspolymlett.2017.26.
- [2] D. Purcell-Meyerink, M. A. Packer, T. T. Wheeler, and M. Hayes, “Aquaculture Production of the Brown Seaweeds *Laminaria digitata* and *Macrocystis pyrifera*: Applications in Food and Pharmaceuticals,” *Molecules*, vol. 26, no. 5, p. 1306, Feb. 2021, doi: 10.3390/molecules26051306.
- [3] G. A. Martău, M. Mihai, and D. C. Vodnar, “The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector—Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability,” *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 11, p. 1837, Nov. 2019, doi: 10.3390/polym11111837.
- [4] J. D. Wehr, “Brown Algae,” in *Freshwater Algae of North America*, Elsevier, 2015, pp. 851–871. doi: 10.1016/B978-0-12-385876-4.00019-0.
- [5] M. I. Rushdi, I. A. M. Abdel- Rahman, H. Saber, E. Zekry Attia, and U. Ramadan Abdelmohsen, “The Natural Products and Pharmacological Biodiversity of Brown Algae from the Genus *Dictyopteris*,” *J Mex Chem Soc*, vol. 66, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.29356/jmcs.v66i1.1639.
- [6] V. Stiger, E. Deslandes, and C. E. Payri, “Phenolic contents of two brown algae, *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangarevense* on Tahiti (French Polynesia): interspecific, ontogenic and spatio-temporal variations,” *Botanica Marina*, vol. 47, no. 5, Jan. 2004, doi: 10.1515/BOT.2004.058.
- [7] A. H. Buschmann *et al.*, “The Status of Kelp Exploitation and Marine Agronomy, with Emphasis on *Macrocystis pyrifera*, in Chile,” 2014, pp. 161–188. doi: 10.1016/B978-0-12-408062-1.00006-8.

- [8] I. Kovalenko *et al.*, “A Major Constituent of Brown Algae for Use in High-Capacity Li-Ion Batteries,” *Science* (1979), vol. 334, no. 6052, pp. 75–79, Oct. 2011, doi: 10.1126/science.1209150.
- [9] D. J. McHugh, “A Guide to the Seaweed Industry,” *Food & Agriculture Org*, 2003.
- [10] Y. Qin, “Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management,” *Polym Int*, vol. 57, no. 2, pp. 171–180, Feb. 2008, doi: 10.1002/pi.2296.
- [11] W. Zhang, T. Oda, Q. Yu, and J.-O. Jin, “Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* Has Powerful Immune-Modulatory Effects Compared to Three Other Fucoidans,” *Mar Drugs*, vol. 13, no. 3, pp. 1084–1104, Feb. 2015, doi: 10.3390/md13031084.
- [12] A. Leyton *et al.*, “Identification and efficient extraction method of phlorotannins from the brown seaweed *Macrocystis pyrifera* using an orthogonal experimental design,” *Algal Res*, vol. 16, pp. 201–208, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.algal.2016.03.019.
- [13] A. ; G. D. Copp, “*Macrocystis pyrifera* Derived Health and Wellness Products and Methods of Using the Same,” WO 2011/044267 A1, Apr. 14, 2011
- [14] K. Véliz, P. Toledo, M. Araya, M. F. Gómez, V. Villalobos, and F. Tala, “Chemical composition and heavy metal content of Chilean seaweeds: Potential applications of seaweed meal as food and feed ingredients,” *Food Chem*, vol. 398, p. 133866, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133866.
- [15] T. A. Davis, B. Volesky, and A. Mucci, “A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae,” *Water Res*, vol. 37, no. 18, pp. 4311–4330, Nov. 2003, doi: 10.1016/S0043-1354(03)00293-8.

- [16] S. Schiewer and B. Volesky, "Biosorption by Marine Algae," in *Bioremediation*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2000, pp. 139–169. doi: 10.1007/978-94-015-9425-7_8.
- [17] L. M. A. y P. E. Avendaño Romero G. C., "Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos," *Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla*, 2013.
- [18] H. Zhang, J. Cheng, and Q. Ao, "Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine," *Mar Drugs*, vol. 19, no. 5, p. 264, May 2021, doi: 10.3390/md19050264.
- [19] F. Sokhandan, M. Homayoonfal, and M. Hajheidari, "Sodium alginate coating: A strategy to fabricate a membrane surface resistant against sodium alginate fouling," *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 176, pp. 202–217, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.cherd.2021.10.010.
- [20] M. George and T. E. Abraham, "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review," *Journal of Controlled Release*, vol. 114, no. 1, pp. 1–14, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.jconrel.2006.04.017.
- [21] S. Pina, J. M. Oliveira, and R. L. Reis, "Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review," *Advanced Materials*, vol. 27, no. 7, pp. 1143–1169, Feb. 2015, doi: 10.1002/adma.201403354.
- [22] N. Rhein-Knudsen, M. T. Ale, F. Ajalloueian, and A. S. Meyer, "Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: *Sargassum* spp. and *Padina* spp.," *Food Hydrocoll*, vol. 71, pp. 236–244, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.05.016.
- [23] G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith, and D. Thom, "Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model," *FEBS Lett*, vol. 32, no. 1, pp. 195–198, May 1973, doi: 10.1016/0014-5793(73)80770-7.

- [24] S. Thakur, B. Sharma, A. Verma, J. Chaudhary, S. Tamulevicius, and V. K. Thakur, "Recent progress in sodium alginate based sustainable hydrogels for environmental applications," *J Clean Prod*, vol. 198, pp. 143–159, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.06.259.
- [25] Y. Fang *et al.*, "Multiple Steps and Critical Behaviors of the Binding of Calcium to Alginate," *J Phys Chem B*, vol. 111, no. 10, pp. 2456–2462, Mar. 2007, doi: 10.1021/jp0689870.
- [26] M. Borgogna, G. Skjåk-Bræk, S. Paoletti, and I. Donati, "On the Initial Binding of Alginate by Calcium Ions. The Tilted Egg-Box Hypothesis," *J Phys Chem B*, vol. 117, no. 24, pp. 7277–7282, Jun. 2013, doi: 10.1021/jp4030766.
- [27] P. Sikorski, F. Mo, G. Skjåk-Bræk, and B. T. Stokke, "Evidence for Egg-Box-Compatible Interactions in Calcium–Alginate Gels from Fiber X-ray Diffraction," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 7, pp. 2098–2103, Jul. 2007, doi: 10.1021/bm0701503.
- [28] H. Bojorges, A. López-Rubio, A. Martínez-Abad, and M. J. Fabra, "Overview of alginate extraction processes: Impact on alginate molecular structure and techno-functional properties," *Trends Food Sci Technol*, vol. 140, p. 104142, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.tifs.2023.104142.
- [29] A. M. Leon, J. M. Aguilera, and D. J. Park, "Mechanical, rheological and structural properties of fiber-containing microgels based on whey protein and alginate," *Carbohydr Polym*, vol. 207, pp. 571–579, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.11.094.
- [30] Hu JiaJie *et al.*, "Study on thickening agent on the sensory and rheological properties of yogurt," 2019.
- [31] R. Abka-khajouei, L. Tounsi, N. Shahabi, A. K. Patel, S. Abdelkafi, and P. Michaud, "Structures, Properties and Applications of Alginates," *Mar Drugs*, vol. 20, no. 6, p. 364, May 2022, doi: 10.3390/md20060364.

- [32] C. Hu, W. Lu, A. Mata, K. Nishinari, and Y. Fang, “Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications,” *Int J Biol Macromol*, vol. 177, pp. 578–588, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.086.
- [33] I. A. Brownlee, C. J. Seal, M. Wilcox, P. W. Dettmar, and J. P. Pearson, “Applications of Alginates in Food,” 2009, pp. 211–228. doi: 10.1007/978-3-540-92679-5_9.
- [34] L. Zhang, S. Li, Y. Dong, H. Zhi, and W. Zong, “Tea polyphenols incorporated into alginate-based edible coating for quality maintenance of Chinese winter jujube under ambient temperature,” *LWT*, vol. 70, pp. 155–161, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.lwt.2016.02.046.
- [35] J. G. de Oliveira Filho *et al.*, “Active food packaging: Alginate films with cottonseed protein hydrolysates,” *Food Hydrocoll*, vol. 92, pp. 267–275, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.01.052.
- [36] I. C. Carlan, B. N. Estevinho, and F. Rocha, “Production of vitamin B1 microparticles by a spray drying process using different biopolymers as wall materials,” *Can J Chem Eng*, vol. 98, no. 8, pp. 1682–1695, Aug. 2020, doi: 10.1002/cjce.23735.
- [37] A. Gupta, J. Bhasarkar, M. R. Chandan, A. H. Shaik, B. Kiran, and D. K. Bal, “Diffusion Kinetics of Vitamin B₁₂ from Alginate and Poly(vinyl acetate) Based Gel Scaffolds for Targeted Drug Delivery,” *Journal of Macromolecular Science, Part B*, vol. 59, no. 11, pp. 713–730, Nov. 2020, doi: 10.1080/00222348.2020.1800246.
- [38] L. George, M. C. Bavya, K. V. Rohan, and R. Srivastava, “A therapeutic polyelectrolyte–vitamin C nanoparticulate system in polyvinyl alcohol–alginate hydrogel: An approach to treat skin and soft tissue infections caused by *Staphylococcus aureus*,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 160, pp. 315–324, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.09.030.
- [39] N. Shaedi, I. Naharudin, C. Y. Choo, and T. W. Wong, “Design of oral intestinal-specific alginate-vitexin nanoparticulate system to modulate blood

- glucose level of diabetic rats,” *Carbohydr Polym*, vol. 254, p. 117312, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117312.
- [40] G. Majmudar, D. Bole, S. A. Goldstein, and J. Bonadio, “Bone cell culture in a three-dimensional polymer bead stabilizes the differentiated phenotype and provides evidence that osteoblastic cells synthesize type III collagen and fibronectin,” *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 6, no. 8, pp. 869–881, Aug. 1991, doi: 10.1002/jbmr.5650060813.
- [41] A. Al Shikh and A. Milosevic, “Effectiveness of Alcohol and Aldehyde Spray Disinfectants on Dental Impressions,” *Clin Cosmet Investig Dent*, vol. Volume 12, pp. 25–30, Feb. 2020, doi: 10.2147/CCIDE.S233336.
- [42] S. Naghieh, M. D. Sarker, E. Abelseth, and X. Chen, “Indirect 3D bioprinting and characterization of alginate scaffolds for potential nerve tissue engineering applications,” *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 93, pp. 183–193, May 2019, doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.02.014.
- [43] T. Lu *et al.*, “Post-crosslinking towards stimuli-responsive sodium alginate beads for the removal of dye and heavy metals,” *Carbohydr Polym*, vol. 133, pp. 587–595, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.07.048.
- [44] N. G. Burciaga-Montemayor, J. A. Claudio-Rizo, L. F. Cano-Salazar, A. Martínez-Luévanos, and P. Vega-Sánchez, “Compósitos en estado hidrogel con aplicación en la adsorción de metales pesados presentes en aguas residuales,” *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 23, Mar. 2020, doi: 10.22201/fesz.23958723e.2020.0.211.
- [45] H. Jiang *et al.*, “Preparation of a novel bio-adsorbent of sodium alginate grafted polyacrylamide/graphene oxide hydrogel for the adsorption of heavy metal ion,” *Science of The Total Environment*, vol. 744, p. 140653, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140653.
- [46] M. C. Robson, D. L. Steed, and M. G. Franz, “Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories,” *Curr Probl Surg*, vol. 38, no. 2, pp. A1-140, Feb. 2001, doi: 10.1067/msg.2001.111167.

- [47] S. Schreml, R. M. Szeimies, L. Prantl, S. Karrer, M. Landthaler, and P. Babilas, "Oxygen in acute and chronic wound healing," *British Journal of Dermatology*, vol. 163, no. 2, pp. 257–268, Aug. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09804.x.
- [48] S. Dhivya, V. V. Padma, and E. Santhini, "Wound dressings – a review," *Biomedicine (Taipei)*, vol. 5, no. 4, p. 22, Dec. 2015, doi: 10.7603/s40681-015-0022-9.
- [49] G. S. Lazarus *et al.*, "Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing.," *Arch Dermatol*, vol. 130, no. 4, pp. 489–93, Apr. 1994.
- [50] P. Beldon, "How to select and choose appropriate wound dressings," *Nurse Prescribing*, vol. 11, no. 10, pp. 487–492, Oct. 2013, doi: 10.12968/npre.2013.11.10.487.
- [51] A. Demir and E. Cevher, "Biopolymers as Wound Healing Materials: Challenges and New Strategies," in *Biomaterials Applications for Nanomedicine*, InTech, 2011. doi: 10.5772/25177.
- [52] M. Heidarzadeh *et al.*, "Regenerative Medicine: A Review of Solutions in the Treatment of Skin Defects," *Open Journal of Regenerative Medicine*, vol. 12, no. 02, pp. 97–113, 2023, doi: 10.4236/ojrm.2023.122007.
- [53] B. Aderibigbe and B. Buyana, "Alginate in Wound Dressings," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 2, p. 42, Apr. 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10020042.
- [54] M. Szekalska, A. Puciłowska, E. Szymańska, P. Ciosek, and K. Winnicka, "Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications," *Int J Polym Sci*, vol. 2016, pp. 1–17, 2016, doi: 10.1155/2016/7697031.
- [55] M. Otterlei, K. Østgaard, G. Skjåk-Bræk, O. Smidsrød, P. Soon-Shiong, and T. Espevik, "Induction of Cytokine Production from Human Monocytes

- Stimulated with Alginate,” *Journal of Immunotherapy*, vol. 10, no. 4, pp. 286–291, Aug. 1991, doi: 10.1097/00002371-199108000-00007.
- [56] E. A. Kamoun, E.-R. S. Kenawy, and X. Chen, “A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings,” *J Adv Res*, vol. 8, no. 3, pp. 217–233, May 2017, doi: 10.1016/j.jare.2017.01.005.
- [57] M. Abrigo, S. L. McArthur, and P. Kingshott, “Electrospun Nanofibers as Dressings for Chronic Wound Care: Advances, Challenges, and Future Prospects,” *Macromol Biosci*, vol. 14, no. 6, pp. 772–792, Jun. 2014, doi: 10.1002/mabi.201300561.
- [58] S. Jeddi, M. Rezaei, and M. Alboofetileh, “Impact of green extraction methods on the structural, morphological, physico-mechanical, and thermal properties of alginate films of *Sargassum ilicifolium*,” *J Food Process Preserv*, vol. 46, no. 11, Nov. 2022, doi: 10.1111/jfpp.17081.
- [59] M. Gomaa, M. A. Fawzy, A. F. Hifney, and K. M. Abdel-Gawad, “Optimization of enzymatic saccharification of fucoidan and alginate from brown seaweed using fucoidanase and alginate lyase from the marine fungus *Dendryphiella arenaria*,” *J Appl Phycol*, vol. 31, no. 3, pp. 1955–1965, Jun. 2019, doi: 10.1007/s10811-018-1685-x.
- [60] S. Charoensiddhi, A. J. Lorbeer, J. Lahnstein, V. Bulone, C. M. M. Franco, and W. Zhang, “Enzyme-assisted extraction of carbohydrates from the brown alga *Ecklonia radiata* : Effect of enzyme type, pH and buffer on sugar yield and molecular weight profiles,” *Process Biochemistry*, vol. 51, no. 10, pp. 1503–1510, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.procbio.2016.07.014.
- [61] G. Rajauria and Y. V. Yuan, *Recent Advances in Micro and Macroalgal Processing*. Wiley, 2021. doi: 10.1002/9781119542650.
- [62] H. H. C. Lakmal, J.-H. Lee, and Y.-J. Jeon, “Enzyme-Assisted Extraction of a Marine Algal Polysaccharide, Fucoidan and Bioactivities,” in

- Polysaccharides*, Cham: Springer International Publishing, 2014, pp. 1–11.
doi: 10.1007/978-3-319-03751-6_46-1.
- [63] A. Dobrinčić *et al.*, “Advanced Technologies for the Extraction of Marine Brown Algal Polysaccharides,” *Mar Drugs*, vol. 18, no. 3, p. 168, Mar. 2020, doi: 10.3390/md18030168.
- [64] Z. Rostami, M. Tabarsa, S. You, and M. Rezaei, “Relationship between molecular weights and biological properties of alginates extracted under different methods from *Colpomenia peregrina*,” *Process Biochemistry*, vol. 58, pp. 289–297, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.procbio.2017.04.037.
- [65] A. F. Hifney, M. A. Fawzy, K. M. Abdel-Gawad, and M. Gomaa, “Upgrading the antioxidant properties of fucoidan and alginate from *Cystoseira trinodis* by fungal fermentation or enzymatic pretreatment of the seaweed biomass,” *Food Chem*, vol. 269, pp. 387–395, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.026.
- [66] N. J. Borazjani, M. Tabarsa, S. You, and M. Rezaei, “Effects of extraction methods on molecular characteristics, antioxidant properties and immunomodulation of alginates from *Sargassum angustifolium*,” *Int J Biol Macromol*, vol. 101, pp. 703–711, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.128.
- [67] J. Chandrapala, C. M. Oliver, S. Kentish, and M. Ashokkumar, “Use of Power Ultrasound to Improve Extraction and Modify Phase Transitions in Food Processing,” *Food Reviews International*, vol. 29, no. 1, pp. 67–91, Jan. 2013, doi: 10.1080/87559129.2012.692140.
- [68] L. Youssouf *et al.*, “Ultrasound-assisted extraction and structural characterization by NMR of alginates and carrageenans from seaweeds,” *Carbohydr Polym*, vol. 166, pp. 55–63, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.01.041.
- [69] N. Flórez-Fernández, H. Domínguez, and M. D. Torres, “A green approach for alginate extraction from *Sargassum muticum* brown seaweed using

ultrasound-assisted technique,” *Int J Biol Macromol*, vol. 124, pp. 451–459, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.232.

- [70] C. Thomas-Busani, J. A. Sarabia-Sainz, J. García-Hernández, T. J. Madera-Santana, L. Vázquez-Moreno, and G. Ramos-Clamont Montfort, “Synthesis of alginate–polycation capsules of different composition: characterization and their adsorption for [As($\text{As}(\text{III})$)] and [As($\text{As}(\text{V})$)] from aqueous solutions,” *RSC Adv*, vol. 10, no. 48, pp. 28755–28765, 2020, doi: 10.1039/D0RA05135G.
- [71] C. Sartori, D. S. Finch, B. Ralph, and K. Gilding, “Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR spectroscopy,” *Polymer (Guildf)*, vol. 38, no. 1, pp. 43–51, Jan. 1997, doi: 10.1016/S0032-3861(96)00458-2.
- [72] D. Leal, B. Matsuhiro, M. Rossi, and F. Caruso, “FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds,” *Carbohydr Res*, vol. 343, no. 2, pp. 308–316, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.carres.2007.10.016.
- [73] Helmiyati and M. Aprilliza, “Characterization and properties of sodium alginate from brown algae used as an ecofriendly superabsorbent,” *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*, vol. 188, p. 012019, Apr. 2017, doi: 10.1088/1757-899X/188/1/012019.
- [74] E. Yudiati and A. Isnansetyo, “Characterizing the Three Different Alginate Type of *Sargassum siliquosum*,” *Ilmu Kelaut*, vol. 22, no. 1, p. 7, Mar. 2017, doi: 10.14710/ik.ijms.22.1.7-14.
- [75] M. Bulota and T. Budtova, “PLA/algae composites: Morphology and mechanical properties,” *Compos Part A Appl Sci Manuf*, vol. 73, pp. 109–115, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.compositesa.2015.03.001.
- [76] J. Zhang, Q. Ji, X. Shen, Y. Xia, L. Tan, and Q. Kong, “Pyrolysis products and thermal degradation mechanism of intrinsically flame-retardant calcium alginate fibre,” *Polym Degrad Stab*, vol. 96, no. 5, pp. 936–942, May 2011, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2011.01.029.

- [77] N. Patel, D. Lalwani, S. Gollmer, E. Injeti, Y. Sari, and J. Nesamony, “Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation,” *Prog Biomater*, vol. 5, no. 2, pp. 117–133, Jul. 2016, doi: 10.1007/s40204-016-0051-9.
- [78] G. Mollica, F. Ziarelli, S. Lack, F. Brunel, and S. Viel, “Characterization of insoluble calcium alginates by solid-state NMR,” *Carbohydr Polym*, vol. 87, no. 1, pp. 383–391, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.07.066.
- [79] T. Salomonsen, H. M. Jensen, F. H. Larsen, S. Steuernagel, and S. B. Engelsen, “Direct quantification of M/G ratio from ^{13}C CP-MAS NMR spectra of alginate powders by multivariate curve resolution,” *Carbohydr Res*, vol. 344, no. 15, pp. 2014–2022, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.carres.2009.06.025.
- [80] M. El Hariri El Nokab, A. Lasorsa, K. O. Sebakhy, F. Picchioni, and P. C. A. van der Wel, “Solid-state NMR spectroscopy insights for resolving different water pools in alginate hydrogels,” *Food Hydrocoll*, vol. 127, p. 107500, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.107500.
- [81] Y. Ore B., E. R. Pichilingue L, and A. C. Valderrama Negrón, “EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ALGINATO DE SODIO DE LA MACROALGA *Macrocystis pyrifera*,” *Revista de la Sociedad Química del Perú*, vol. 86, no. 3, pp. 276–287, Sep. 2020, doi: 10.37761/rsqp.v86i3.300.
- [82] T. Salomonsen, H. M. Jensen, F. H. Larsen, S. Steuernagel, and S. B. Engelsen, “Alginate monomer composition studied by solution- and solid-state NMR – A comparative chemometric study,” *Food Hydrocoll*, vol. 23, no. 6, pp. 1579–1586, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.11.009.