



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y
MECÁNICA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN PETROQUÍMICA**

**TEMA: ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS
ORGÁNICOS Y POLISACÁRIDOS A PARTIR DE
TRATAMIENTOS HIDROTERMALES EMPLEANDO AGUA DE
MAR**

AUTOR: JONATAN ISRAEL GORDÓN SALGADO

DIRECTOR: DR. ROMAN RODRÍGUEZ, PH.D.

LATACUNGA

2018



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA
CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el proyecto de investigación, “**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y POLISACÁRIDOS A PARTIR DE TRATAMIENTOS HIDROTERMALES EMPLEANDO AGUA DE MAR**” realizado por **JONATAN ISRAEL GORDÓN SALGADO**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a **JONATAN ISRAEL GORDÓN SALGADO** para que lo sustente públicamente.

Latacunga, 9 de Marzo del 2018



ROMAN NICOLAY RODRIGUEZ MAECKERS
DIRECTOR



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA
CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA**

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Jonatan Israel Gordón Salgado**, con cédula de ciudadanía N° 0501982813 declaro que el presente proyecto de investigación, **“ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y POLISACÁRIDOS A PARTIR DE TRATAMIENTOS HIDROTERMALES EMPLEANDO AGUA DE MAR”** ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Latacunga, 09 de Marzo del 2018

Jonatan Israel Gordón Salgado

C.C.: 0501982813



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA
CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA**

AUTORIZACIÓN

Yo, **JONATAN ISRAEL GORDÓN SALGADO**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la Biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y POLISACÁRIDOS A PARTIR DE TRATAMIENTOS HIDROTERMALES EMPLEANDO AGUA DE MAR**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Latacunga, 09 de Marzo del 2018

Jonatan Israel Gordón Salgado

C.C.: 0501982813

DEDICATORIA

A:

Dios principalmente, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

Mi familia, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo.

Mis amigos, Johana, Estefanía y Jose Alberto porque fueron indispensables para llegar a cumplir este escalón tan importante de mi vida.

Mis profesores, gracias por su tiempo, por su apoyo, así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mis estudios.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, doy infinitamente gracias a Dios, por brindarme fuerza y valor para culminar esta etapa de mi vida.

A mis padres Gustavo y Anita, mi hermano Paúl por su gran amor y apoyo constante en mi vida. A mi familia, por su cariño y por brindarme una sonrisa siempre.

A Eduardo Vymheister por su colaboración en este proyecto, así como también en mi formación universitaria y profesional.

A Johana, Estefanía y Jose Alberto, por su apoyo, comprensión y por todos los agradables momentos compartidos.

Al Dr. Román Rodríguez e Ing. David Luna, Director y Co Director de mi tesis, por su aporte científico, sus enseñanzas y por estar siempre predispuestos a responderme, escucharme y ayudarme.

Y a todas las personas que directa o indirectamente aportaron para el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi

CAPÍTULO I

GENERALIDADES.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Descripción del problema.....	2
1.3. Propuesta.....	3
1.4. Objetivos.....	4
1.4.1. Objetivo General.....	4
1.4.2. Objetivos Específicos.....	4

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA Y ESTADO DEL ARTE.....	6
2.1. Fundamentación Teórica.....	6
2.1.1. Algas Marinas.....	6
2.1.2. División Phaeophyta (algas pardas).....	8
2.1.3. Polisacáridos de las Algas Pardas.....	9
a) Fucoïdanos.....	12
b) Ácido Algínico y Alginato.....	14

c)	Laminaranos	18
2.1.4.	Tratamientos Hidrotermales	19
2.1.5.	Ácidos Orgánicos	21
2.1.6.	Ácido Láctico	23
2.1.7.	Ácido Acético	24
2.1.8.	Agua de Mar	25
2.1.9.	Diseño Experimental	27
2.1.10.	Metodología de Superficie de Respuesta.....	29
a)	Diseños centrales compuestos	30
b)	Diseños de Box-Behnken	30
2.2.	Estado del Arte	31

CAPÍTULO III

	METODOLOGÍA.....	34
3.1.	Materiales y Reactivos	34
3.1.1.	Reactivos	34
3.1.2.	Equipos	35
3.2.	Métodos	35
3.2.1.	Recolección, tratamiento y transporte de las Algas Pardas	35
3.2.2.	Extracción de Polisacáridos.....	36
3.2.3.	Producción de Ácidos Orgánicos.....	40
3.2.4.	Selección del Diseño Experimental	41
3.3.	Métodos analíticos.....	42
3.3.1.	Espectroscopia vibracional FT-IR ATR	42
3.3.2.	Análisis Termogravimétrico (TGA)	44
3.3.3.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	45
3.3.4.	Espectrometría de Movilidad de Iones (IMS)	45

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
4.1. Extracción de polisacáridos.....	47
4.1.1. Análisis espectroscópico FT-IR ATR.....	48
a) Determinación del radio M/G.....	54
4.1.2. Análisis Termogravimétrico (TGA).....	55
4.1.3. Calorimetría Diferencial de Barrido.....	58
4.2. Producción de Ácidos Orgánicos	61

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	78
5.1. Conclusiones	78
5.2. Recomendaciones	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Alga Marina Parda del género Padina	8
Figura 2 Forma de terminación característica del género Padina.	9
Figura 3 Estructura de la pared celular del alga parda (Kloareg)	11
Figura 4 Estructura de la pared celular de algas pardas	12
Figura 5 Unidad estructural de fucoidanos	13
Figura 6 Estructura de las dos unidades monoméricas del ácido alginico.....	15
Figura 7 Estructura del Alginato	16
Figura 8 Estructura del laminarano	18
Figura 9 Productos obtenidos del tratamiento hidrotérmico de alginato	22
Figura 10 Propuesta de vía de reacción para la conversión hidrotermal de alginato.24	
Figura 11 Modelo de un Proceso o Sistema.....	29
Figura 12 Diagrama diseño de Box-Behnken de tres factores.....	31
Figura 13 Algas pretratadas y tamizadas de la playa de Machalilla	37
Figura 14 Sistema extracción de polisacáridos (alginato).	38
Figura 15 Espectro FTIR de referencia del alginato de sodio de Sigma-Aldrich.	49
Figura 16 Espectro FTIR común entre experimentos al 1,5% de Na ₂ CO ₃	51
Figura 17 Espectro FTIR común entre experimentos al 3% de Na ₂ CO ₃	51
Figura 18 Espectro FTIR común entre experimentos al 0% de Na ₂ CO ₃	53
Figura 19 Termograma para el alginato referente de Sigma Aldrich.	55
Figura 20 Termograma para experimentos al 1,5% de Na ₂ CO ₃	56
Figura 21 Termograma para experimentos al 3% de Na ₂ CO ₃	57
Figura 22 Termograma para experimentos al 0% de Na ₂ CO ₃	58
Figura 23 Curva DSC para el alginato de referencia.	59
Figura 24 Curva DSC para los experimentos al 1,5% de Na ₂ CO ₃	59

Figura 25 Curva DSC para los experimentos al 3% de Na ₂ CO ₃	60
Figura 26 Curva DSC para los experimentos al 0% Na ₂ CO ₃	61
Figura 27 Curva de Calibración del ácido acético.	62
Figura 28 Curva de Calibración del ácido láctico.	62
Figura 29 Señales para la curva de calibración del ácido láctico.	63
Figura 30 Señales para la curva de calibración del ácido acético.	63
Figura 31 Graficas de Superficie de Respuesta para el ácido láctico	68
Figura 32 Graficas de Superficie de Respuesta para el ácido láctico	71
Figura 33 Graficas de Superficie de Respuesta para el ácido acético	73
Figura 34 Graficas de Superficie de Respuesta para el ácido acético	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de algunas de las algas más importantes.	7
Tabla 2. Métodos de extracción y composición química de fucoïdanos.....	14
Tabla 3. Procesos Hidrotermales para la conversi3n de biomasa.	20
Tabla 4. Principales constituyentes del agua de mar.....	26
Tabla 5. Experimentos para la extracci3n de polisacárido.....	39
Tabla 6. Matriz de Tratamientos Box-Behnken para Ácidos Orgánicos.	42
Tabla 7. Experimentos y rendimientos de extracci3n de polisacáridos.	47
Tabla 8. Grupos funcionales y frecuencias de absorci3n de polisacáridos.	48
Tabla 9. Longitudes de Onda y bandas características	52
Tabla 10. Relaci3n M/G para las tres muestras analizadas usando FTIR.	54
Tabla 11. Zonas e intervalos característicos para análisis TGA de alginato.....	56
Tabla 12. Comparaci3n entre termogramas de las muestras analizadas.....	58
Tabla 13. Comparaci3n entre termogramas DSC de las muestras analizadas.	60
Tabla 14. Rendimiento de los experimentos con alga para el ácido láctico.....	64
Tabla 15. Rendimiento de los experimentos con alginato de sodio para ácido láctico.....	65
Tabla 16. Rendimiento de los experimentos con alga para el ácido acético.	65
Tabla 17. Rendimiento de los experimentos con alginato de sodio para el ácido acético. .	66
Tabla 18. Tabla ANOVA para producci3n de ácido láctico a partir de alga ..	69
Tabla 19. Tabla de optimizaci3n para producci3n de ácido láctico a partir de alga.	70
Tabla 20. Tabla ANOVA para producci3n de ácido láctico a partir de alginato de sodio.....	71
Tabla 21. Tabla de optimizaci3n para producci3n de ácido láctico a partir de alginato ...	72
Tabla 22. Tabla ANOVA para producci3n de ácido acético a partir de alga parda..	74
Tabla 23. Tabla de optimizaci3n para producci3n de ácido acético a partir de alga parda.	75
Tabla 24. Tabla ANOVA para producci3n de ácido acético a partir de alginato	76

Tabla 25. Tabla de optimización para producción de ácido acético a partir de alginato ... 77

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Salinidad.....	27
Ecuación 2. Rendimiento	40

RESUMEN

La producción, desarrollo e investigación en áreas relacionadas a la biomasa y su uso se encuentra en pleno auge. Existe tanto un inconveniente económico, como un problema en términos de la falta de añadir valor agregado a productos naturales como las algas pardas en el Ecuador. Es de primordial interés tanto nacional e incluso hasta internacional estudiar a fondo la factibilidad de que en el país se produzcan ácidos orgánicos y polisacáridos los cuales puedan servir como materias primas alternativas en la petroquímica para ser empleados en la elaboración de productos (como por ejemplo biopolímeros) de modo que permitan así modificar la matriz productiva del país. En este trabajo de titulación, tanto los ácidos orgánicos y polisacáridos se extrajeron a partir de algas pardas marinas ecuatorianas (Pheophyta/Padina). Mediante información bibliográfica se determinaron las condiciones para la extracción de polisacáridos (alginato de sodio) empleando como medio agua dulce para posteriormente emplear en este estudio el mismo método extractivo realizando variaciones tanto en el medio (agua de mar) y concentración de catalizador (Na_2CO_3) al 0% ,1.5% y 3% de concentración. Así como también para la obtención de ácidos orgánicos se empleó metodología de superficie de respuesta (MSR), para obtener condiciones de extracción óptimas; se procedió a cambiar el medio por agua de mar empleando dos rutas: con alginato de sodio procedente de Sigma Aldrich y con algas pardas ecuatorianas pre-tratadas. Se empleó un diseño experimental de Box Behken, en donde, temperatura, tiempo de digestión, salinidad del agua y cantidad de catalizador (CaO) fueron las variables. Los productos extraídos se analizaron analíticamente mediante: Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IFTR-ATR), Análisis Termogravimétrico (TGA) y el Escaneo Calorimétrico Diferencial (DSC), para los polisacáridos; así como para los ácidos orgánicos, Espectrofotometría de Movilidad Jónica (GC-JMS).

PALABRAS CLAVE:

- **ALGAS PARDAS**
- **AGUA DE MAR**
- **POLISACÁRIDOS**
- **ÁCIDOS ORGÁNICOS**

ABSTRACT

The production, development and research in areas related to biomass and its use is in full swing. There is both an economic disadvantage, and a problem in terms of the lack of adding value to natural products such as brown algae in Ecuador. It is of primary interest both national and even international to study in depth the feasibility of producing organic acids and polysaccharides in the country, which can serve as alternative raw materials in the petrochemical industry to be used in the production of products (such as biopolymers).) so that they allow to modify the productive matrix of the country. In this titulation project, both organic acids and polysaccharides were extracted from Ecuadorian marine brown algae (Pheophyta / Padina). By means of bibliographic information, the conditions for the extraction of polysaccharides (sodium alginate) were determined using fresh water as a medium to later use the same extractive method in this study, making variations both in the medium (seawater) and catalyst concentration (Na_2CO_3) 0%, 1.5% and 3% concentration. As well as for obtaining organic acids, response surface methodology (MSR) was used to obtain optimal extraction conditions; the medium was exchanged for seawater using two routes: with sodium alginate from Sigma Aldrich and with brown seaweed pre-treated. An experimental design of Box Behken was used, where temperature, digestion time, water salinity and amount of catalyst (CaO) were the variables. The extracted products were analyzed analytically by: Fourier transform infrared spectroscopy (IFTR-ATR), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Calorimetric Scanning (DSC), for polysaccharides; as well as for organic acids, Ionic Mobility Spectrophotometry (GC-JMS).

KEYWORDS:

- **BROWN ALGAE**
- **SEAWATER**
- **POLYSACCHARIDES**
- **ORGANIC ACIDS**

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1. Introducción.

Probablemente, uno de los recursos marinos mejor aprovechados a nivel industrial, de donde se extraen los más variados productos que sirven como fuente de materia prima para diversas industrias, son las algas (biomasa), ya que, dentro de los recursos renovables del mar, tienen una elevada importancia económica.

Los polisacáridos presentes en la matriz celular de las algas marinas, tales como alginatos, agar y carragenina, son biocompuestos con un alto valor económico debido a los potenciales usos que se les puede dar. Este tipo de compuestos son también conocidos como hidrocoloides, los que se obtienen a partir de algas marinas roja y café.

El alginato, un componente importante de las algas pardas (empleadas en este estudio), ha sido ampliamente utilizado en diversos campos industriales y científicos. Las sales de metal alcalino de alginato, tales como alginato de sodio y alginato de calcio, son aditivos útiles para alimentos que contribuyen a la forma, textura y viscosidad. La biocompatibilidad del alginato ha sido explotada para diversas aplicaciones, incluyendo la construcción del sustrato biológico y la administración de fármacos. (Jeon et al., 2015)

La producción de ácidos orgánicos a partir de productos de biomasa es de gran importancia en las industrias futuras considerando la inminente escasez de petróleo. Métodos actuales para producir ácido orgánico de la biomasa, como la conversión de la biomasa a la glucosa, seguido de la fermentación de la glucosa hasta ácidos orgánicos. Debido a las diferencias estructurales entre biomasa y el ácido orgánico deseado, la conversión química a estos ácidos orgánicos no se produce fácilmente. (Aida et al., 2012)

El tratamiento hidrotérmico con agua produce productos químicos de biomasa en agua caliente comprimida y se ha demostrado como una alternativa útil, ya que

pueden realizarse en pocas horas usando un procedimiento relativamente simple. Además, el proceso de conversión hidrotérmica es barato, sostenible y respetuoso con el medio ambiente debido a su uso de agua en lugar de disolventes orgánicos costosos y tóxicos. (Jeon et al., 2015)

1.2. Descripción del problema.

Desde un punto de vista tecnológico e industrial, los ácidos orgánicos y polisacáridos constituyen productos de alto valor agregado, cuyo rango de aplicaciones se extiende cada vez más. En los últimos años se ha intensificado el interés en el uso para la producción de biopolímeros, principalmente propiciado por las propiedades únicas de estas macromoléculas y la posibilidad de obtener un producto con una calidad constante.

En la actualidad dentro del Ecuador la producción de ácidos orgánicos y polisacáridos a partir de biomasa por diferentes vías o métodos es muy escasa, a pesar de poseer la materia prima necesaria para llevar a cabo este tipo de procesos que generan productos amigables ambientalmente. Es por ello que es importante desarrollar o investigar nuevas alternativas o métodos de producción empleando otro tipo de recursos, en este caso en particular a partir de algas pardas ecuatorianas que también son una fuente importante de biomasa y aún no han sido explotadas como tal para producir tanto ácidos orgánicos y polisacáridos, los cuales se pretenden obtener para este estudio empleando agua de mar que también podría considerarse un elemento que dispone nuestro país al cual tampoco se le ha dado gran importancia dentro de este tipo de procedimientos.

Hoy en día a pesar de que se promueve la concientización en lo que respecta al cuidado del agua en general, aun no existe un grado aceptable a nivel global por lo que también es uno de los problemas que se ha considerado en este estudio al emplear agua de mar en sustitución al agua dulce que se emplea convencionalmente en este tipo de procesos, ya que el agua de mar existe en mayor proporción (96,5%) que el agua dulce (3,5%) en el planeta, y esta última es la de mayor uso como parte de la vida diaria de la humanidad, es por ello que preservar y promover el cuidado de este recurso vital es de gran importancia.

También considerando la localización de la materia prima (playas ecuatorianas) empleada como parte de este estudio (algas pardas), sería aún más factible el uso de agua de mar.

1.3. Propuesta.

El presente proyecto propone evaluar dos rutas de producción de ácidos orgánicos: Producción de ácidos orgánicos directamente a partir de macroalgas (algas pardas ecuatorianas) o a partir de alginato de sodio (polisacárido) derivado de las mismas algas. En ambas vías se utilizará agua de mar a condiciones elevadas de presión y temperatura.

Se aplicará agua de mar en forma directa a las algas pardas las cuales fueron previamente tratadas (lavadas con agua corriente y posteriormente destilada, secadas a 60°C en un horno, molidas y tamizadas) y catalizador (CaO) para analizar una posible conversión de algas a ácidos orgánicos (ácido láctico de mayor interés) sin la necesidad de pasar por la extracción de alginato de sodio, el cual es uno de los pasos a desarrollarse dentro del método convencional. Si los resultados no son técnicamente favorables, se procederá a emplear alginato de sodio comercial de la marca Sigma Aldrich para luego ser tratado con agua de mar a condiciones elevadas de presión, temperatura y así probablemente obtener los ácidos orgánicos.

De igual forma se extraerá polisacáridos de las algas empleando el método de extracción de alginato de sodio ya establecido en investigaciones anteriormente mencionadas, realizando diferentes experimentaciones (con y sin carbonato de sodio a diferentes concentraciones en el agua de mar) y análisis químicos a través de diferentes equipos analíticos (Espectrómetro infrarrojo FT-IR, Analizador Termo gravimétrico y Calorímetro Diferencial de Barrido DSC) a los productos obtenidos que nos permitirán determinar si se produjeron polisacáridos (alginato de sodio, fucoidanos, laminaranos , etc.) . Si se llegara a obtener alginato de sodio en las experimentaciones se realizará un análisis comparativo con el que es obtenido convencionalmente, así como también el resto de posibles polisacáridos productos (azúcares por ejemplo) serán analizados y caracterizados.

El enfoque del presente trabajo es estudiar la producción de ácidos orgánicos y polisacáridos, evaluando la factibilidad de usar agua de mar dentro del proceso para cada ruta establecida.

1.4. Objetivos.

1.4.1. Objetivo General

- Estudiar la producción de ácidos orgánicos a partir de macroalgas y sus polisacáridos utilizando agua de mar.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Realizar investigación bibliográfica sobre la obtención de ácidos orgánicos a partir de macroalgas y alginato derivado de las mismas a través de diferentes fuentes, para poder establecer rutas alternativas en cuanto respecta a los procedimientos convencionales.
- Estudiar la producción de ácidos orgánicos a partir de la intervención directa de las algas con agua de mar así como también del alginato de sodio en presencia o no de CaO como catalizador de acuerdo al diseño experimental, para lograr optimizar e innovar el proceso tradicional.
- Estudiar la obtención de polisacáridos a partir del procedimiento para la obtención de alginato de sodio de las macroalgas pardas ecuatorianas empleando como medio agua de mar para su posterior caracterización.
- Evaluar la producción de ácidos orgánicos empleando agua de mar en las rutas establecidas, utilizando como diseño experimental la Metodología de Superficie de Respuesta para lograr determinar un nuevo método de obtención.

- Evaluar en forma analítica mediante cromatografía de movilidad iónica la presencia de ácidos orgánicos empleando el equipo GC- IMS FlavourSpec con las muestras obtenidas en las experimentaciones del diseño experimental, así como también caracterizar los polisacáridos que se puedan llegar a obtener a través del Espectrómetro infrarrojo FT-IR accesorio de muestreo universal ATR-PerkinElmer, modelo Frontier , el Analizador Termogravimétrico – Perkin Elmer, modelo Pyris 1 TGA y el Calorímetro Diferencial de Barrido DSC- Mettler Toledo.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA Y ESTADO DEL ARTE

2.1. Fundamentación Teórica.

2.1.1. Algas Marinas.

A un numeroso y diverso conjunto de organismos que tienen en común poseer clorofila y la capacidad de realizar la fotosíntesis se aplica el término “algas”. Están formadas por una célula o multicelulas y también tienen una organización de tipo protofítica o talofítica. La gran mayoría vive en medio acuático o en ambientes húmedos ya que dependen del agua para su reproducción. (Bold & Wynne, 1985; Rabanal Atalaya, 2015)

Las algas marinas macroscópicas, multicelulares o bentónicas, se unen al fondo de aguas costeras relativamente poco profundas. Crecen en las profundidades marinas, estuarios y en aguas negras de hasta 180 metros y sobre sustratos sólidos como rocas, corales muertos, guijarros, conchas y otros materiales vegetales (Pal, Kamthania, & Kumar, 2014). Se categorizan en tres clases principales, y son clasificadas de acuerdo a su color predominante por ejemplo algas verdes, rojas, verdes y marrones (pardas).

Los caracteres más importantes para clasificar a las algas son la naturaleza de sus pigmentos fotosintéticos y la composición química de la pared celular. Según (Bold & Wynne, 1985) podemos mencionar: las algas rojas (Rhodophyta), pardas (Phaeophyta), verdes (Chlorophyta), verde-azuladas (Cyanophyta), euglenoides (Euglenophyta), doradas (Chrysophyta), y diatomeas (Bacillariophyta), entre otras. Una característica común a todos los tipos de algas es la presencia de clorofila *a*. Sin embargo, la presencia de otros fotopigmentos diferentes de la clorofila *a* (por ejemplo, clorofilas *b*, *c* y *d*, ficobiliproteínas, etc.) y la composición química de los productos de reserva son los que caracterizan a cada división algal en particular. (Davis, Volesky, & Mucci, 2003; Rabanal Atalaya, 2015)

Tabla 1.
Características de algunas de las algas más importantes.

División	Nombre Común	Pigmentos	Productos Reserva	Pared Celular
<i>Clorophyta</i>	Algas verdes	Clorofila <i>a</i> , <i>b</i> ; α -, β - y γ -carotenoides y varias xantofilas.	Almidón (amilosa y amilopectina).	En muchos celulosa, hidroxiprolina glucosidada, xilanos y mananos; o ausencia de pared, en algunos casos calcificada.
<i>Phaeophyta</i>	Algas pardas	Clorofila <i>a</i> , <i>c</i> ; β -carotenoide, fucoxantina y otras xantofilas.	Laminaranos y manitol.	Celulosa, ácido algínico, y polisacáridos sulfatados (fucoidanos).
<i>Rhodophyta</i>	Algas rojas	Clorofila <i>a</i> (<i>d</i> en algunas Florideophyceae); R- y C-ficocianina, aloficocianina; R- y B-ficoeritrina; α y β - carotenoides y varias xantofilas.	Almidón de florideas.	Celulosa, xilanos y galactanos sulfatados, calcificación y alginatos en Corallinales.

Fuente: (Bold & Wynne, 1985)

Las algas marinas son la fuente de producción de fitoquímicos, compuestos químicos como agar-agar, carragenano y alginatos, principalmente se utilizan para el consumo humano, alimentación animal, estiércol (en muchos países), industria alimentaria, textil, láctea, papelera y confitería. (Pal et al., 2014)

2.1.2. División Phaeophyta (algas pardas).

Las algas pardas tienen apariencia filamentosa y formas muy variadas, en forma general morfológicamente presentan coloración marrón u oliváceo; pigmentos que cubren parcialmente la clorofila. Las algas marinas pardas son generalmente grandes, y van desde los 20 m de largo (algas gigantes), hasta 30-60 cm de largo que son las especies más pequeñas.

Son un grupo de algas pertenecientes a la clase Phaeophyceae, en el reino Chromalveolata, clasificadas en 265 géneros con más de 1500 especies principalmente marinas, y sólo seis géneros de agua dulce. (Davis et al., 2003). Según (Bold & Wynne, 1985) las algas pardas se clasifican en 13 órdenes.

La especie de interés para el presente trabajo, son las algas pardas referidas del género *Padina* (Figura 1), perteneciente a la familia Dictyotaceae que a su vez pertenece al orden de las Dictyotales. Los Dictyotales, Fucales, Laminariales entre otras son órdenes dentro de la clase Phaeophyceae que pertenecen a la división Phaeopyhta.



Figura 1 Alga Marina Parda del género *Padina*

Fuente: (AlgaeBase, 2017)

Generalmente su estructura inicia con una base, seguido de un tallo no definido, mientras que en la parte superior poseen forma de paleta, que puede ser filiforme o expandido, con talos en forma de abanico o reniforme con terminaciones del tipo correa o redondeado (Figura 2).



Figura 2 Forma de terminación característica del género Padina.

Fuente: (AlgaeBase, 2017)

2.1.3. Polisacáridos de las Algas Pardas.

Un polisacárido es una macromolécula que está conformado por una gran cantidad de restos de monosacáridos (azúcares simples) unidos entre sí por enlaces. Los polisacáridos compuestos de un solo tipo de monosacárido se denominan homopolisacáridos (homoglucanos). Si dos o más tipos diferentes de unidades monoméricas están presentes, serán heteropolisacáridos (heteroglicanos).

Los polisacáridos cumplen una diversidad de funciones biológicas esenciales como, por ejemplo, almacenamiento de energía en el caso del almidón y del glucógeno, o estructural en el caso de la celulosa y la quitina. El desarrollo del ser humano ha estado íntimamente ligado al uso de polisacáridos desde la antigüedad. Por ejemplo, la celulosa de las plantas ha tenido innumerables aplicaciones en sus diversas formas como madera, papel, fibras, etc. (León, 2015)

Los principales componentes de las algas son los polisacáridos, los cuales pueden ser de almacenamiento (materiales de reserva), por lo general polisacáridos complejos, sulfatados y no sulfatados; o estructurales (elementos estructurales de las

paredes celulares, tejidos intercelulares y matriz mucilaginosas). (Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Rabanal Atalaya, 2015).

Las algas pardas contienen principalmente alginato, laminarano y fucoidan, que representan del 40 al 80% (una gran cantidad de polisacáridos biológicamente activos) de la biomasa de algas secas (Sinurat, Peranginangin, & Saepudin, 2016). Las algas pardas en general presentan polisacáridos como: celulosa, citin, ácido algínico, fucoidan, laminaran. El contenido de nitrógeno generalmente es de 1.6 – 3.80 %.

Los polisacáridos sulfatados constituyen un tipo muy común de polisacárido estructural y cambia de acuerdo al tipo de alga, orden, familia, género y especie (Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Rabanal Atalaya, 2015).

La ultra estructura precisa del ácido algínico y los fucoidanos sulfatados es aún desconocida, especialmente en el caso de los fucoidanos, a pesar de que ya han sido estudiadas estructura química, propiedades fisicoquímicas y las actividades biológicas. La caracterización de la estructura fina de los polisacáridos puede contribuir a comprender la ultra estructura de la pared celular de las algas pardas. (Andrade et al., 2004; Rabanal Atalaya, 2015)

La composición del azúcar entre las especies de algas marinas pardas varía, generalmente consta de (1,3) y (1,4) sulfato de L-fucosa como componentes principales conjuntamente con pequeñas cantidades de ácido urónico y otros azúcares como galactosa, manosa, xilosa y glucosa. (Sinurat et al., 2016)

Existen dos modelos que intentan explicar la estructura de polisacáridos de la pared celular de las algas (Rabanal Atalaya, 2015): El primero (Figura 3) propone que la pared celular está compuesta por una estructura de multicapas microfibrilares de celulosa, la cual se encuentra embebida por una matriz amorfa de polisacáridos ácidos unidos entre ellos por proteínas (Kloareg, Demarty, & Mabeau, 1986; Rabanal Atalaya, 2015). Los polisacáridos ácidos están compuestos principalmente por ácido algínico o sus sales de sodio, potasio, magnesio y/o calcio y por fucoidanos sulfatados.

Al alginato, se lo conoce como copolímero lineal del ácido β -(1 \rightarrow 4)-D-manurónico y su epímero en C-5, el ácido α -(1 \rightarrow 4)-L-gulurónico (Haug, Larsen, & Smidsrod, 1967); los fucoidanos, según la International Union of Pure and Applied

Chemistry (IUPAC), son polisacáridos sulfatados que contienen principalmente L-fucosa sulfatada, que poseen otros monosacáridos como manosa, galactosa y xilosa (menos del 10%).

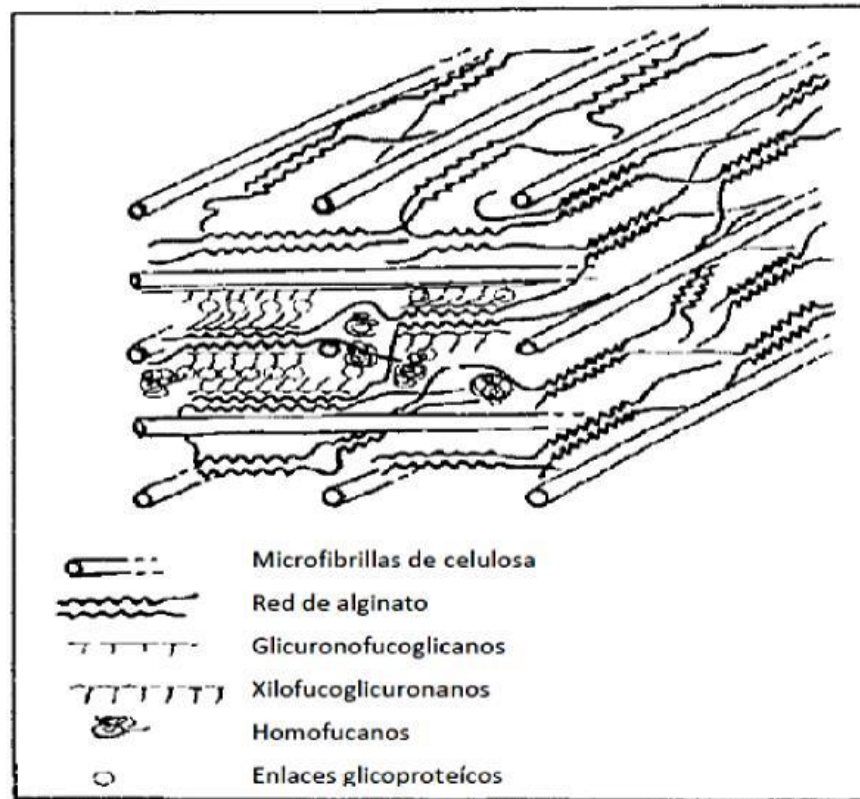


Figura 3 Estructura de la pared celular del alga parda propuesto por Kloareg y colaboradores

Fuente: (Kloareg et al., 1986)

El segundo (Figura 4) propone que dos capas diferentes: la capa interna, esqueleto de microfibrillas (constituidas por celulosa, glucano basado de glucosa con uniones β -(1 \rightarrow 4) sin ramificaciones) que brinda rigidez a la pared celular, y la capa externa, una matriz amorfa, poco cristalina, en la cual está embebido el conjunto de microfibrillas, pero que no penetra las fibras, sino que se mantiene unida a esta capa a través de puentes de hidrógeno, constituyen la pared celular. Finalmente, el alginato además de impartirle flexibilidad contribuye a darle fuerza a la pared celular del alga parda. La celulosa continúa siendo el principal componente estructural, aún si el alginato está presente en la capa interna, (Davis et al., 2003; Rabanal Atalaya, 2015)

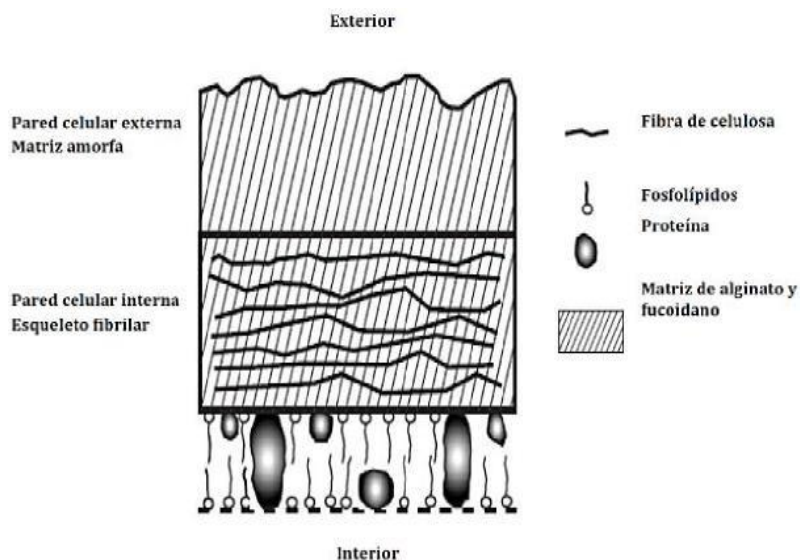


Figura 4 Estructura de la pared celular de algas pardas

Fuente: (Davis et al., 2003)

El ácido algínico y el fucano sulfatado se encuentran en estructuras trabeculares de acuerdo a un estudio de microscopía de transmisión electrónica (TEM) de todo el polisacárido realizado por (Andrade et al., 2004), debido a que los iones calcio se unen fuertemente a los grupos carboxilo del ácido algínico, mientras que los átomos de azufre son parte de los grupos sulfato de los fucanos. (Rabanal Atalaya, 2015)

a) **Fucoidanos.**

En 1913, Kylin fue el primero en aislar un grupo de polisacáridos que contenían fucosa a los que denominó “fucoidina” (Kylin, 1913); 50 años después aproximadamente, McNeely cambió el termino fucoidina por fucoidano. (Rabanal Atalaya, 2015)

El contenido de fucoidan en algas pardas está influenciado por: la estación y las especies, el método de extracción, el crecimiento. Factores que afectan las características y bioactividad del fucoidan (Sinurat et al., 2016). Contiene porcentajes sustanciales de L-fucosa y grupos éster sulfato.

Los fucoidanos (Figura 5) son polisacáridos α -L-fucosa que poseen grupos sulfato y monosacáridos menores como D-galactosa, D-xylosa, D-glucosa, D-

manosa y D-ácido urónico. Sus estructuras son complejas, los polímeros son heterogéneos y no se ha observado una regularidad definida. (Kusaykin et al., 2008)

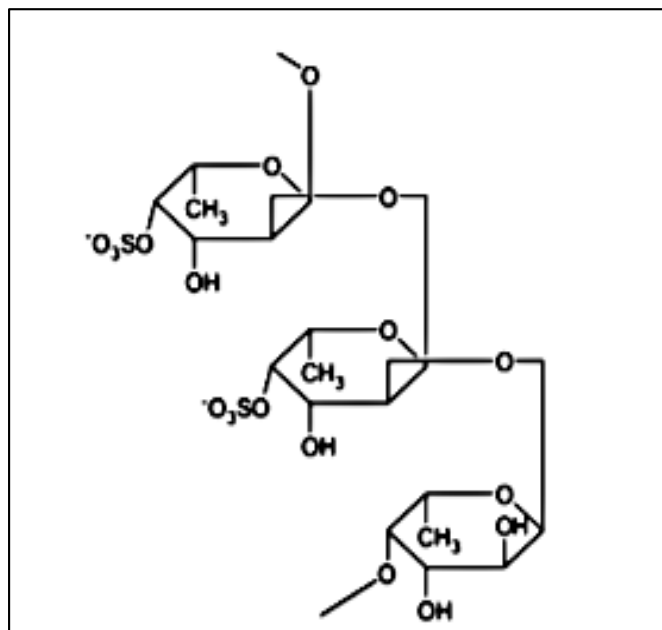


Figura 5 Unidad estructural de fucoidanos

Fuente: (Gupta & Abu-Ghannam, 2011)

El alga debe ser primero secada a temperatura ambiente y luego molida para obtener una mayor superficie del material para la obtención de fucoidanos. (Hahn, Lang, Ulber, & Muffler, 2012). Para evitar la coextracción de otros compuestos como el ácido algínico, laminaranos y proteínas tiene la finalidad realizar un pretratamiento. (Rabanal Atalaya, 2015). Los fucoidanos poseen una alta afinidad por los fenoles y flavonoides.

(Kylin, 1913) fue el primero quien extrajo con ácido acético diluido los polisacáridos sulfatados. El fucoidano además de contener fucosa (azúcar neutro), también contenía como contaminantes manitol, ácido algínico y laminaranos. A continuación, se puede observar en la Tabla 2 algunos de los principales métodos de extracción y composición química.

Tabla 2.
Métodos de extracción y composición química de fucooidanos.

ORDEN	ESPECIE ALGAL	METODO DE EXTRACCIÓN	COMPOSICIÓN
Dictyotales	Padina pavonia	H2O a t. amb. y a 100 °C	Fuc (1%), Xil, Gal y Glc en tz, GlcA (90%)
Dictyotales	Padina tetrastomatica	H2O (pH 6,5-7, 30-37 °C)	Fuc (54%), Xil (18%), Man (9%), Gal (9%), Glc (9%) y Rha (2%) y AU (14%) ^b

Fuente: (Awad, Motawe, Selim, & Matloub, 2009; Karmakar et al., 2009)

Comprende un espectro complejo de monosacáridos dependiendo de la especie algal, método y tiempo de extracción, temperatura, solventes, lugar de colecta, estación del año y crecimiento del alga, el aislamiento y composición de los polisacáridos conteniendo fucosa ha sido muy diverso, demostrando que no es posible asignar una supuesta composición constante a los fucooidanos. (Rabanal Atalaya, 2015)

Los fucooidanos presentan actividad antiviral que radica en impedir que los receptores celulares interactúen con los receptores virales, impidiendo de esta forma, el comienzo de la infección del virus. (Bilan et al., 2002)

b) Ácido Algínico y Alginato.

El ácido algínico es un compuesto químico que se encuentra en la pared celular de las algas marinas pardas. Los alginatos son sales del ácido algínico que pueden estar constituidas con Na, K, Mg, Ca, entre otros, produciendo sales con distintos grados de solubilidad en agua, obteniendo varios grados de viscosidad. Stanford en 1883, por medio de procedimientos de digestión de las algas pardas con carbonato

sódico, presenció la formación de una sustancia gelatinosa a la cual le otorgo el término de “algina”, por derivarse de algas. (Avendaño-Romero, López-Malo, & Paolu, 2013)

El ácido algínico es un polímero biodegradable y biocompatible en su forma salina, produce geles en presencia de iones calcio con facilidad. Por su gran versatilidad, es utilizado como estabilizador, aglutinante, espesante, gelificante y formador de películas delgadas en superficies (Avendaño-Romero et al., 2013). Es un polisacárido lineal conformado por dos unidades monoméricas, el ácido β -D-manurónico (M) y el ácido α -L-gulurónico (G). Estos se agrupan en bloques secuenciales MM y MG, unidos entre sí por enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 4) y bloques GG y GM, enlazados por uniones α -(1 \rightarrow 4). La Figura 6, muestra los dos monómeros que constituyen el ácido algínico como bloques de secuencias homopoliméricas (MM y GG) y bloques heteropoliméricos (GM y MG). (Percival, 1979)

Su composición (dada por la relación característica manurónico/gulurónico M/G) y secuencias cambian dependiendo de la fuente proveniente del polisacárido. A los grupos carboxilo que aparecen a lo largo de la cadena, este polímero debe su carácter polianiónico. La composición y extensión de las secuencias así como también el peso molecular determinan las propiedades físicas de los alginatos. (AvendañoRomero et al., 2013)

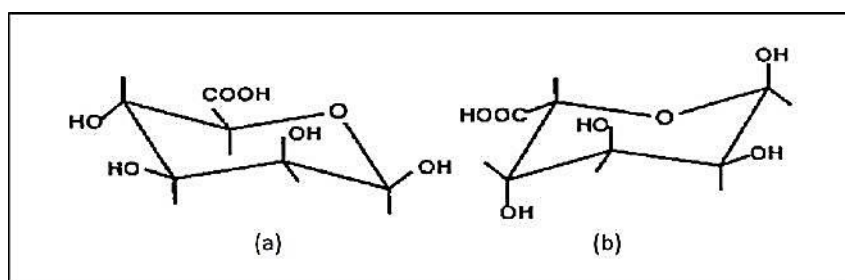


Figura 6 Estructura de las dos unidades monoméricas del ácido algínico. (a) Ácido β -D-manurónico y (b) Ácido α -L-gulurónico.

Fuente: (Percival, 1979)

Los alginatos son los componentes estructurales de la pared celular de las algas, cuya función principal es dar rigidez, elasticidad, flexibilidad y capacidad de enlazar agua, son los polisacáridos más abundantes presentes en las algas marinas, comprenden hasta 40% de su peso seco. (Avendaño-Romero et al., 2013; Hernández-Carmona, McHugh, Arvizu-Higuera, & Rodríguez-montesinos, 1998)

En la naturaleza, los alginatos (Figura 7) están como una mezcla de sales de los cationes que comúnmente se localizan en el agua de mar, principalmente Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ . De acuerdo a su composición, así como de la selectividad de enlace de los cationes alcalinotérreos por el alginato dependen las proporciones en las que estos iones están unidos al alginato (Avendaño-Romero et al., 2013; Yabur, Bashan, & Hernández-Carmona, 2007)

El alginato es un copolímero lineal, y consiste en unidades de los ácidos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G), unidos por enlaces glicosídicos 1 \rightarrow 4 y dispuestos de manera homo- y heteropolimérica (Figura 7). Existen 3 formas estructurales del enlace glicosídico: bloque GG, estructura abultada o capsular; bloque MM, estructura tipo cinta plana; y bloque MG, estructura tipo escalera. Entre los carbonos ecuatoriales C-1 y C-4 se forma el enlace glicosídico en un bloque MM, por otra parte entre los carbonos axiales C-1 y C-4 se forma un bloque GG. Son factores determinantes en las propiedades del alginato el radio M/G como la cantidad relativa de determinados bloques. (León, 2015)

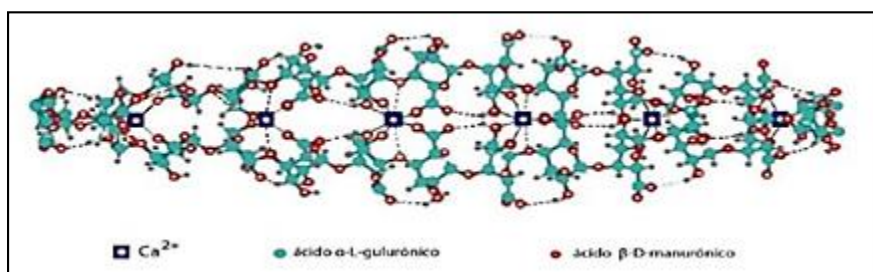


Figura 7 Estructura del Alginato

Fuente: (Avendaño-Romero et al., 2013)

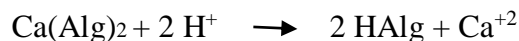
Las fuentes comerciales más comunes son los géneros de algas *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis*, *Sargassum* y *Turbinaria*. Se extraen alginatos con distintas propiedades, debido a la variación del radio M/G y de la composición estructural principalmente. De hecho, en una misma alga se pueden encontrar diferencias en la composición del alginato según las partes del alga. (León, 2015)

Para la obtención del alginato, luego de ser recolectada el alga, se la puede

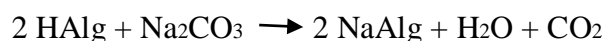
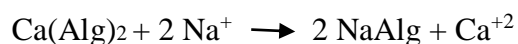
almacenar húmeda o seca. El alga húmeda se corta en pequeños pedazos, se trata con solución diluida de formol y se almacena en tanques de concreto por varios meses. El alga también puede secarse al ambiente, triturarse y almacenarse por meses. Cuando va a ser usada, se la hidrata remojándola por varias horas. Por otro lado, algunos productores emplean el alga húmeda intacta para la extracción. (McHugh, 1987) (León, 2015). La trituración permite un manejo más sencillo del alga e incrementa la superficie de reacción en los tratamientos.

El alginato se encuentra generalmente en el alga como la sal de calcio, la cual es insoluble en agua, y en menor cantidad como sales de sodio, potasio, magnesio, estroncio y bario (Hernández-Carmona et al., 1998).

Según (McHugh, 1987) y (Hernández-Carmona et al., 1998), en el pre-tratamiento, para remover los compuestos fenólicos que le dan un color oscuro indeseable se trata el alga con una solución de formol, posteriormente se remoja en ácido clorhídrico diluido por periodos cortos de tiempo para convertir el alginato de calcio a ácido algínico, según la reacción (León, 2015):



Se pretende remover la mayor cantidad de calcio (la conversión no es total) sin degradar el alginato. Luego, la extracción del alginato como su sal de sodio se efectúa con un tratamiento alcalino con una solución de carbonato de sodio (Hernández-Carmona, McHugh, & López-Gutiérrez, 1999; McHugh, 1987). Se producen procesos de intercambio iónico y neutralización ácido-base:



Por las condiciones de reacción, la viscosidad final del alginato se ve afectada. (Hernández-Carmona et al., 1999)

La habilidad para formar soluciones viscosas en agua es la propiedad más importante del alginato. El gel de alginato de calcio es usado en la adsorción de los iones de metales pesados divalentes como Pb^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , etc. (Naja,

Murphy, & Volesky, 2010; Rabanal Atalaya, 2015). Es empleado como aditivo de los alimentos para cambiar, espesar y estabilizar su textura; así como también es muy utilizado en las industrias textil, papelería, farmacéutica, y cosmética.(Rabanal Atalaya, 2015). Disminuye los triglicéridos, el colesterol total y está asociado a lipoproteínas de baja densidad (Mao, Li, Gu, Fang, & Xing, 2004). Posee gran actividad antiviral por lo que sus eventuales aplicaciones en el área biomédica son muy prometedoras. (Vilella Romanos et al., 2002)

c) Laminaranos

Dos tipos de cadenas (cadenas M o G) como se puede observar en la Figura 8, poseen los laminaranos, de 20-25 residuos de glucosa con enlaces β -(1 \rightarrow 3) y con ramificaciones β -(1 \rightarrow 6) posee aproximadamente la cadena G, y peso molecular aproximadamente de 5000 Da. Por otro lado, la cadena M presenta residuos terminales de manitol. (Rabanal Atalaya, 2015)

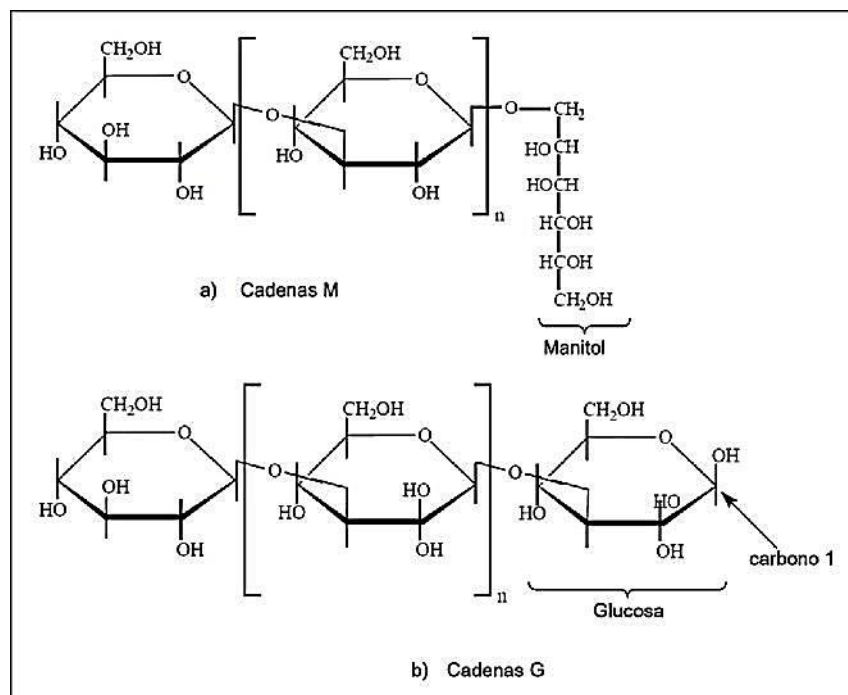


Figura 8 Estructura del laminarano a) El manitol se une al extremo reductor (cadenas M); b) Cadenas de glucosa (cadenas G)

Fuente:(Rabanal Atalaya, 2015)

En agua fría los laminaranos pueden ser “solubles” (laminarano altamente ramificado) e “insolubles”, aunque ambos son solubles en agua caliente. Pueden

obtenerse usando una solución de ácido clorhídrico diluida en frío o a 70 °C (Rabanal Atalaya, 2015). El grado de ramificación influencia la solubilidad.

Los laminaranos de la clase pavonia (Mian & Percival, 1973) poseen residuos de glucosa enlazados β -(1→3), y de proporciones menores de residuos de glucosa enlazados β -(1→6).

En forma general, las algas pardas tienen polisacáridos y se clasifican en dos grandes grupos: los que forman parte de la pared celular, tejidos mucilaginosos y matriz amorfa, y los de almacenamiento o de reserva. De los últimos se hace referencia el carbohidrato de bajo peso molecular más importante, el manitol (alditol). También existen polisacáridos como el almidón, que es un glucano basado de glucosa con enlaces α -(1→4), con ramificaciones en O-6 y los laminaranos, que también son glucanos pero con enlaces β -(1→3) que forman parte de los elementos de reserva o de almacenamiento. Además, están polisacáridos como el alginato o sus sales, cuyos monómeros son el ácido manurónico y gulurónico, en proporciones que dependen de varios factores como: especie algal, salinidad, temperatura, estación, grado de desarrollo del alga; y el fucoidano, principalmente contiene fucosa (desoxiazúcar), con proporciones menores de galactosa, xilosa, manosa y glucosa y en ínfimas proporciones arabinosa y ramnosa, que constituyen parte de la pared estructural de las algas. (Rabanal Atalaya, 2015)

2.1.4. Tratamientos Hidrotermales

La búsqueda de tecnologías para descomponer los constituyentes de la biomasa en productos definidos que puedan ser utilizados como materia prima para la producción de combustible y productos químicos para el campo industrial representa un gran desafío.

Entre varios procesos de conversión de biomasa, el proceso hidrotermal es uno de los procesos más prometedores para la conversión de biomasa en productos químicos, porque agua a altas temperaturas y altas presiones se comporta como un medio de reacción teniendo propiedades excepcionales. (F. Jin et al., 2007)

El tratamiento hidrotérmico con agua caliente es un proceso económico y respetuoso con el medio ambiente para la valorización de carbohidratos derivados de biomasa, ya que las moléculas de agua se ionizan a protones y aniones hidroxilo que juegan como catalizadores ácidos y bases, respectivamente, bajo condiciones hidrotérmicas. (Möller, Nilges, Harnisch, & Schröder, 2011)

Para la transformación hidrotermal de la biomasa, se utiliza una diversidad de términos generales, como la conversión hidrotermal, descomposición hidrotérmica, degradación hidrotérmica, hidrotermólisis y mejora hidrotérmica. La naturaleza del proceso de conversión es una función de la reacción temperatura como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3.
Procesos Hidrotermales para la conversión de biomasa.

PROCESO	TEMPERATURA (°C)
Carbonización Hidrotérmica	100 – 200
Licuefacción Hidrotérmica	200 – 350 (5 – 28 MPa)
Gasificación Hidrotérmica	350 - 750

Fuente: (Möller et al., 2011)

En general, los productos sólidos, líquidos y gaseosos se forman a todas las temperaturas. Sin embargo, la extensión de la formación del producto principal respectivo cambia de productos sólidos (a baja temperatura) a través de líquidos (temperatura media) a gases (a temperaturas elevadas). Por lo tanto, a temperaturas por debajo de aproximadamente 200 °C, el producto de reacción principal es carbono sólido. Entre 200 y 350 °C, domina la formación de productos líquidos. Este proceso a menudo se conoce como licuefacción hidrotérmica. Por encima de esta ventana de temperatura, prevalece la gasificación. Es necesario mencionar que pueden existir desviaciones de temperatura, que pueden depender de la naturaleza de la biomasa y del uso de catalizadores. (Girisuta, Janssen, & Heeres, 2006; Zhang, von Keitz, & Valentas, 2008)

2.1.5. Ácidos Orgánicos

Los ácidos orgánicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza como constituyentes habituales de plantas y tejidos animales. Son compuestos oxigenados que se presentan en diversas formas y concentraciones. En la actualidad, los ácidos orgánicos son ampliamente utilizados en diferentes industrias de interés para la humanidad, entre las que se incluyen la industria alimenticia, agrícola, acuícola y química. (Ng, Koh, Sudesh, & Siti-Zahrah, 2009) como es el caso del ácido benzoico, poseen bajo potencial de disociación en agua al tener un alto peso molecular. Por el contrario, compuestos como el ácido fórmico y láctico son miscibles en agua debido a su bajo peso molecular. (Llanos Fernández, Bajaña, Jesenia, & Chávez Alcívar, 2015; Ng et al., 2009; Ramayoni, Martín, & Calvo Torras, 2007)

Los ácidos orgánicos son sustancias que tienen propiedades ácidas, entre los más comunes tenemos los ácidos carboxílicos, cuya acidez se relaciona con su grupo carboxilo $-\text{COOH}$, los ácidos sulfónicos, que contienen el grupo $-\text{SO}_2\text{OH}$ son ácidos relativamente fuertes (Ramayoni et al., 2007). Han sido sintetizados por procesos industriales diversos ácidos orgánicos, aislados en primer orden de fuentes naturales (plantas o animales); entre los cuales están: ácido cítrico, fórmico, acético, málico, tartárico, salicílico, oxálico y los ácidos grasos. (Llanos Fernández et al., 2015)

Se producen de diversas maneras. Entre las principales se pueden citar:

- Producidos a través de síntesis química: oxidación de alquilbencenos, oxidación de alcoholes primarios, oxidación de alquenos, organometálicos con CO_2 , hidrólisis de nitrilos.
- Producidos a partir de la extracción de productos naturales: Trata de la extracción de ácidos orgánicos de fuentes naturales mediante destilación para posteriormente separarlos mediante vaporización y condensación. (Sánchez-Machado, López-Cervantes, & Martínez-Cruz, 2008)
- Producidos por fermentación en procesos industriales: microorganismos tales como levaduras, hongos o bacterias realizan un proceso metabólico en el cual los azúcares se transforman en ácidos, gases y/o alcohol. (Llanos

Fernández et al., 2015)

El ácido fórmico, ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, ácido sórbico y ácido fumárico se encuentran entre los principales ácidos orgánicos que se usan en la industria, y que son producidos químicamente. (Llanos Fernández et al., 2015)

(Aida et al., 2012) describió la producción de monómeros y ácidos orgánicos en condiciones de agua subcrítica y supercrítica, mediante la investigación de los efectos de la temperatura de reacción (150-400 °C) en la conversión de alginato en sus monómeros y ácidos orgánicos derivados de monómeros (Figura 9), como ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos. Como son: ácido fórmico, ácido acético, ácido glicólico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido málico, ya que los compuestos químicos de C1-C5 son considerados químicos de valor agregado por los químicos industriales. (Jeon et al., 2015)

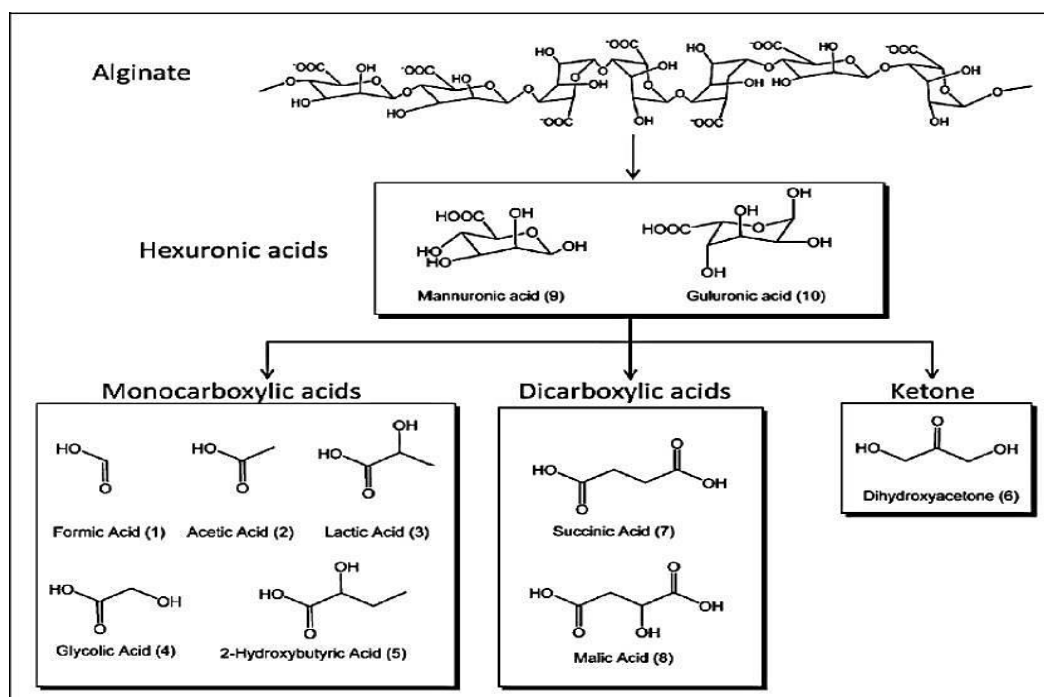


Figura 9 Productos obtenidos del tratamiento hidrotérmico de alginato en agua a alta temperatura a 350 y 400 °C.

Fuente: (Aida et al., 2012)

2.1.6. Ácido Láctico

El ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropiónico) es un producto químico básico con un mercado en crecimiento. Es el monómero del ácido poliláctico (nuevo polímero biodegradable), que poseen una gran relevancia económica como materia prima industrial. Además, se utiliza en alimentos (conservantes, sabor ácido suave, regulación del pH) y en la industria química (solvente ambientalmente seguro, lactato de etilo, químico de plataforma). (Bicker, Endres, Ott, & Vogel, 2005; Skory, 2003)

Es un ácido carboxílico orgánico y natural de fórmula química $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$. Siendo un líquido incoloro puede tener una ligera tonalidad en ocasiones. Se puede producir por síntesis química o fermentación.

Ópticamente tiene dos formas activas y una inactiva (dextro, levo) y racémica respectivamente, siendo esta última la forma comercial. Algún tiempo atrás ya se han venido realizando estudios que se proyectan en la producción de ácido láctico a partir de materias residuales y su posterior transformación en compuestos químicos intermedios, disolventes, plastificantes y resinas. (Munilla & Carracedo, 2005)

La síntesis química de ácido láctico se basa principalmente en la hidrólisis de lactonitrilo por ácidos fuertes, que proporcionan solo la mezcla racémica de ácido D y L-láctico (Madhavan Nampoothiri, Nair, & John, 2010). Otras posibles rutas de síntesis química probadas para el ácido láctico incluyen la degradación catalizada por bases de azúcares; oxidación de propilenglicol; reacción de acetaldehído a temperaturas y presiones elevadas, monóxido de carbono y agua; oxidación de propileno. (John, Nampoothiri, & Pandey, 2007; Madhavan Nampoothiri et al., 2010)

El interés en la producción de ácido láctico a través de otras rutas como la conversión hidrotermal del alginato de sodio (Figura 9) se ha incrementado debido a las perspectivas de respeto al medio ambiente y al uso de recursos renovables en lugar de petroquímicos. La producción de ácido láctico por vías alternas ofrece varias ventajas en comparación con la síntesis química como bajo costo de sustratos, baja temperatura de producción, y bajo consumo de energía.

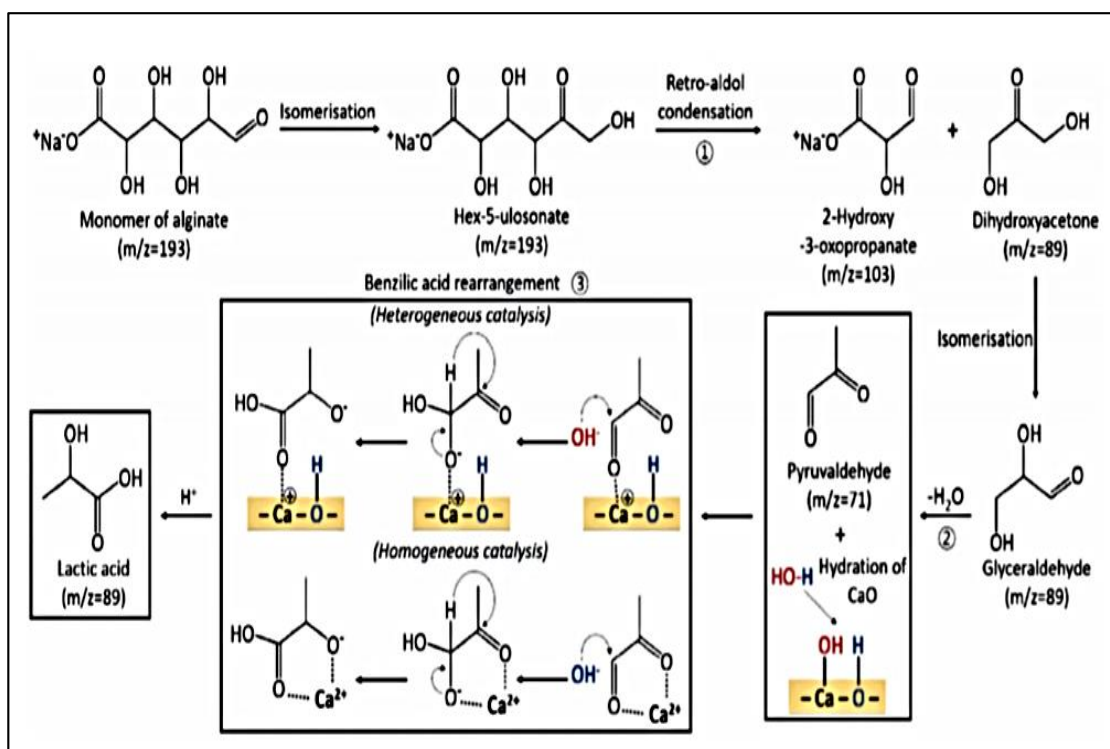


Figura 10 Propuesta de vía de reacción para la conversión hidrotérmica de alginato en ácido láctico sobre catalizadores de CaO.

Fuente: (Jeon, Ban, Park, Kim, et al., 2016)

2.1.7. Ácido Acético

También llamado ácido metilcarboxílico o ácido etanoico. Naturalmente se encuentra en el vinagre, siendo el responsable de su sabor y olor agrios característicos. Su fórmula es $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$).

Es también una importante plataforma química. La mayor parte del ácido acético producido se utiliza para síntesis de poli (acetato de vinilo), que se usa en pinturas, revestimientos y plásticos, y para la síntesis de acetato de celulosa (producción de fibras de acetato). El ácido acético y sus ésteres son disolventes ampliamente usados. Una aplicación novedosa es su uso para la producción de acetato de Ca / Mg, un eliminador de contaminación ambientalmente amigable. (Möller et al., 2011)

El ácido acético se obtiene por fragmentación de 1,6-anhidro-b-d glucopiranososa o por descomposición de eritosa. Dado que el ácido acético se puede

obtener fácilmente mediante otros métodos bien conocidos (por ejemplo, fermentación microbiana y rutas químicas sintéticas tales como carbonilación de metanol y oxidación en fase líquida de butano, nafta o acetaldehído), no era una molécula apta para el procesamiento de aguas subcríticas. Por lo tanto, los pocos informes que consideran los ácidos acéticos se derivan principalmente de la oxidación húmeda de la biomasa celulósica (cáscaras de arroz, almidón de patata, polvo de papel de filtro y glucosa) en presencia de H_2O_2 . (Cheung, Tanke, & Torrence; Fangming Jin et al., 2005)

Para mejorar la producción de ácido acético a partir de biomasa de carbohidratos, se propuso un nuevo proceso de dos pasos, que consiste en una reacción hidrotermal sin suministro de oxígeno (la primera etapa de reacción) y una reacción de oxidación (la segunda etapa de reacción). Se demostró que el rendimiento de ácido acético se incrementó mediante el proceso de dos pasos y la viabilidad del proceso de conversión hidrotérmica. (F. Jin et al., 2007)

2.1.8. Agua de Mar

La composición química exacta del agua de mar real se desconoce en la actualidad, pero es posible determinar la estequiometría de la sal marina de referencia utilizando los últimos pesos atómicos y las mejores estimaciones de los principales componentes. (Millero, Feistel, Wright, & McDougall, 2008)

Las primeras investigaciones extensas de los principales componentes inorgánicos del agua de mar fueron hechas por Forchhammer en 1865. Él determinó las concentraciones de Cl^- , SO_4^{2-} , Mg^{+2} , Ca^{+2} y K^+ directamente y Na^+ por diferencia. Hizo estas mediciones en varias muestras de agua superficial de todas partes del mundo. En base a estos análisis, determinó que la proporción de sales principales en muestras de agua de mar de varios lugares fue casi constante, consistente con la especulación anterior por Marcet (1819). (Millero et al., 2008)

El agua de mar al contener sales disueltas produce grandes interferencias físicas y espectrales, es una muestra medio ambiental que presenta dificultades para el análisis. (González, Ahumada, Medina, Neira, & González, 2004). Sin embargo, la constancia relativa de la composición y el entorno iónico del agua de mar tienen

la ventaja de que un método generalmente será aplicable a las aguas de todas las salinidades normales. (Strickland & Parsons, 1972)

El agua de mar está compuesta en promedio de un 96.5% de agua y el 3.5% de sustancias disueltas (mayormente sales). Los iones más abundantes en el agua de mar son Cloro, Sodio, Calcio, Potasio, Magnesio y Sulfato y se encuentran en proporciones constantes debido a que su concentración, está controlada por la adición o remoción de ellos hacia la columna de agua. Por esta razón, estas sustancias se han denominado iones conservativos. En cambio, otros compuestos y elementos presentes en el agua de mar no se encuentran en proporciones constantes, ya que sus concentraciones son alteradas por procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren en la columna de agua y sedimentos. Estas sustancias químicas se denominan no conservativas, aunque la mayoría de las sustancias en el agua de mar son no conservativas, ellas conforman una pequeña fracción de la masa total de sales del océano (Werlinger, Alveal, & Romo, 2004). El contenido de los iones de Cl^- , SO_4^{-2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , K^+ y Na^+ representa más del 99% del total de sales en el océano. El ión de sodio es el catión más abundante en agua de mar (aproximadamente 30.66%), mientras que el ión cloruro es el anión principal (aproximadamente 55.02%). Los constituyentes del agua de mar están indicados en la Tabla 4.

Tabla 4.
Principales constituyentes del agua de mar.

	Símbolo	g/Kg (Agua de Mar)	% (en peso)
Cationes	Na^+	10,77	30,66
	K^+	0,4	1,13
	Ca^{+2}	0,41	1,17
	Mg^{+2}	1,29	3,65
Aniones	Cl^-	19,35	55,02
	SO_4^{-2}	2,71	7,71
	HCO_3^-	0,12	0,3

Fuente: (Werlinger et al., 2004)

El contenido de sales disueltas en agua de mar se expresa generalmente como salinidad (contenido de sal), S%, es el peso de las sales inorgánicas en un kg de agua

de mar si todo el Bromo y Yodo son reemplazados por una cantidad equivalente de Cloro y todos los carbonatos son reemplazados por una cantidad equivalente de óxidos. (Werlinger et al., 2004). En la práctica, la ecuación de Knudsen define la salinidad en términos de clorinidad (Strickland & Parsons, 1972):

$$S\% = 0.030 + 1.8050 \text{ Cl}\% \quad \text{Ecuación 1 Salinidad}$$

Esta ecuación es únicamente una definición y no tiene aplicabilidad universal en ningún sentido químico práctico. El agua de mar de tiene una salinidad de referencia de exactamente 35.16504 g/Kg. (Millero et al., 2008).

Dado que la determinación del contenido total de sales requiere de análisis químicos que consumen mucho tiempo, se utilizan en substitución métodos indirectos para estimar la salinidad. Se puede determinar la salinidad de un cuerpo de agua a base de determinaciones de: conductividad, densidad, índice de refracción o velocidad del sonido en agua (Clesceri, Greenberg, & Trussell, 1996). La medición de la conductividad eléctrica del agua de mar es el método más confiable para cuantificar este parámetro. (Werlinger et al., 2004)

El agua de mar contiene concentraciones de ácidos grasos volátiles de 5 a 50 $\mu\text{g} / \text{l}$. Obviamente, el tipo de agua de mar, como la estuarina, la costera, el océano abierto (profunda y superficial) hace una gran diferencia en la concentración y disponibilidad biológica de ácidos grasos volátiles. Generalmente, el carbono orgánico disuelto es un buen indicador de ácidos grasos volátiles; cuanto mayor sea la concentración de DOC, mayor será la concentración de ácidos grasos volátiles. (Thurman, 1985)

(Koyama & Thompson, 1964) obtuvieron ácidos orgánicos mediante extracción continua con cloroformo o éter del agua de mar. Acético (0.07 a 2.8 mg / litro), fórmico (0.03 a 1.0mg / litro), láctico (0.00 a 0.13mg /litro) y ácido glicólico (0.00 a 1.4 mg / litro) fueron identificados y determinados por cromatografía de partición en una columna de gel de sílice en muestras del noreste del Pacífico.

2.1.9. Diseño Experimental

Es un conjunto de métodos que se debe incorporar al proceso investigativo

para manipular un proceso con el fin de obtener información de cómo mejorarlo. (Díaz, 2009; Garza Villegas, 2013)

Las variables experimentales se asignan con la elaboración de un plan de acción, con el cual se asignan a los diferentes grupos o condiciones experimentales, el diseño experimental genera previamente la operativa en la que serán comparados estos parámetros y según la naturaleza de los datos, el tipo de análisis estadístico que es el más indicado.

En el campo de la ingeniería el diseño experimental es una herramienta de importancia fundamental para optimizar el desempeño de un proceso de manufactura. Así como también en el desarrollo de nuevos procesos (Montgomery, 2004). Por lo tanto:

- El rendimiento de un proceso es mejorado.
- Con los requerimientos nominales o proyectados, reduce la variabilidad y conformidad más cercana.
- El tiempo de desarrollo es reducido.
- Los costos globales son reducidos.
- Permite comparar y evaluar configuraciones de diseños básicos.
- Puedes evaluar materiales alternativos.
- Permite seleccionar y determinar parámetros de diseño.

Los experimentos estudian el desempeño de procesos y sistemas. Con el gráfico de la Figura 11, el proceso se puede concebir como una combinación de máquinas, métodos, personas u otros recursos que transforman cierta entrada (frecuentemente un material) en una salida que posee una o más respuestas observables. Algunas variables del proceso son controlables (X_1, X_2, \dots, X_p), mientras que otras Z_1, Z_2, \dots, Z_q son no controlables (para fines de una prueba podrían serlo) (Montgomery, 2004)

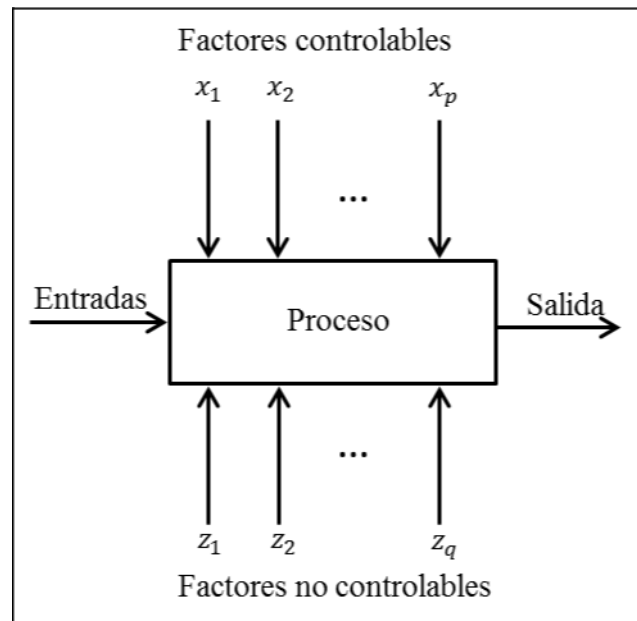


Figura 11 Modelo de un Proceso o Sistema

Fuente: (Montgomery, 2004)

2.1.10. Metodología de Superficie de Respuesta

Conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DOE) que le ayudan a comprender mejor y optimizar la respuesta. Es muy empleada refinando modelos después de haber identificado los factores o variables importantes utilizando diseños de cribado o factoriales, principalmente si se predice que existe curvatura en la superficie de respuesta. (Minitab, 2000)

Una ecuación de superficie de respuesta y una ecuación de un diseño factorial se diferencian en la adición de los términos elevados al cuadrado (o cuadráticos), los cuales hacen posible modelar la curvatura en la respuesta, lo que la hace útil para:

- Modelar los cambios en las variables que afectan una respuesta de interés.
- Determinar los niveles de las variables que optimizan una respuesta.
- Escoger las condiciones operativas para cumplir con las especificaciones.

Existen dos tipos principales de diseños de superficie de respuesta:

a) Diseños centrales compuestos

Pueden ajustarse a un modelo cuadrático completo. Se emplean cuando el plan del diseño necesita de un experimento secuencial, se puede incluir información de un experimento factorial planificado perfectamente. Son un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales (también denominados puntos de estrella) que permiten estimar la curvatura. Se pueden usar para:

- Los términos de primer orden y segundo estimarlos eficientemente.
- Agregar puntos centrales y axiales a un diseño factorial previamente ejecutado modelando una variable de respuesta con curvatura.

b) Diseños de Box-Behnken

Este tipo de diseño no tiene un diseño factorial o factorial fraccionado incrustado. Generalmente poseen menos puntos de diseño que los diseños centrales compuestos, son menos costoso ejecutarlos con el mismo número de factores. Estiman eficientemente los coeficientes de primer y segundo orden; pero no pueden incluir corridas de un experimento factorial.

Estos diseños siempre presentan 3 niveles por factor, en relación con los diseños centrales compuestos, que pueden poseer hasta 5. Otra diferencia es que los diseños de Box-Behnken jamás incluyen corridas en las cuales todos los factores estén en su valor límite o tope (ejemplo todos los valores de configuración bajos).

Presentan combinaciones de tratamiento que se localizan en los puntos medios de los bordes del espacio experimental y necesitan al menos tres factores continuos. La Figura 12 muestra un diseño de Box-Behnken de tres factores. Los puntos del diagrama representan las corridas experimentales que se realizan:

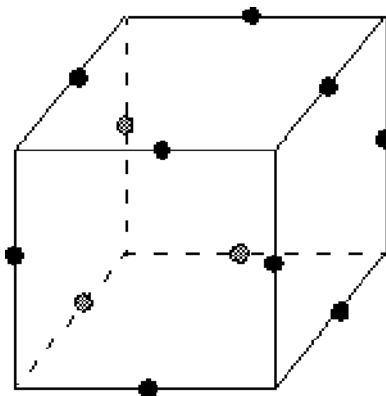


Figura 12 Diagrama diseño de Box-Behnken de tres factores

Fuente: (Minitab, 2000)

Debido a que estos diseños no presentan un diseño factorial incrustado, no son adecuados para experimentos secuenciales.

Si se conoce la zona de operación segura de un proceso los diseños de Box-Behnken también pueden ser útiles. No poseen puntos axiales, por lo que todos los puntos del diseño se encuentran dentro de su zona de operación segura. También aseguran que no se determinan todos los factores en sus niveles altos al mismo tiempo. (Minitab, 2000)

2.2. Estado del Arte

Se destacan varias investigaciones a nivel mundial en cuanto se refiere a la producción de ácidos orgánicos y polisacáridos. Entre los que podemos mencionar:

“Hydrothermal conversion of macroalgae-derived alginate to lactic acid catalyzed by metal oxides.”. En el cual, evaluaron diversos óxidos metálicos como catalizadores en la conversión hidrotérmica de alginato y demostraron que el CaO puede catalizar la producción de ácido láctico mejor que con el catalizador tradicional, NaOH, con un rendimiento máximo de ácido láctico (14,66%) a 200 ° C después de 6 h. Relacionando así este trabajo con el presente estudio en el uso de un catalizador para la producción de ácidos orgánicos a partir de alginato en un proceso hidrotérmico.(Jeon, Ban, Park, Woo, & Kim, 2016)

“Production of organic acids from alginate in high temperature water”. Realizan un tratamiento hidrotérmico sobre alginato con el fin de obtener ácidos orgánicos: fórmico, acético, láctico, glicólico, hidroxibutírico, ácido succínico,

ácido málico, manurónico y ácido gulurónico. El rendimiento total de los ácidos orgánicos fue del 46%. La formación de ácidos, sugiere que la estructura del grupo carboxilo del alginato se preservó durante la descomposición hidrotérmica del alginato. La formación de ácidos dicarboxílicos es prueba de que las reacciones de oxidación ocurren durante el tratamiento hidrotérmico, introduciendo grupos carboxilo en los productos de descomposición. La reacción de alginato a los ácidos orgánicos procede probablemente a través de la formación de ácido hexurónico (ácido manurónico y Gulurónico) bajo condiciones hidrotérmicas. En relación al presente estudio podemos mencionar el uso de alginato y reactores a temperaturas elevadas (150°C y 350 a 400°C) para la obtención de los ácidos orgánicos, así como también nos permite conocer cuáles podrían ser los posibles ácidos que se llegarían a formar con las rutas que se establecerán para este caso en particular y las condiciones en las que se desarrolla. (Aida et al., 2012)

“Catalytic hydrothermal conversion of macroalgae-derived alginate: effect of pH on production of furfural and valuable organic acids under subcritical water conditions”. Efectúan la descomposición hidrotérmica de alginato de sodio en agua subcrítica en función del pH con el fin de investigar los efectos de los catalizadores en la producción de productos químicos de valor agregado. Una base catalizada a pH 13 promovió la descomposición del alginato, dando como resultado la producción de ácido láctico, ácido fumárico y ácido málico como especies principales. A pH 1, los monómeros (ácido manurónico y ácido gulurónico), furfural y ácido glicólico se produjeron predominantemente por el catalizador ácido. Demostraron que la optimización de la temperatura y pH de la reacción es crítica para la conversión eficiente de la biomasa derivada de las algas marinas en productos valiosos. Esta investigación hace relación al presente estudio en que se necesita de un pH básico para que se pueda llegar a formar los ácidos orgánicos deseados, el agua de mar cumple con esa característica. (Jeon et al., 2015)

“Extraction of alginate from *Sargassum muticum*: process optimization and study of its functional activities”. Obtuvieron alginato de la alga marina *Sargassum muticum* mediante Metodología de la Superficie de Respuesta. El diseño (DCC) se realizó para reducir y optimizar la temperatura de extracción, la concentración de álcali y el consumo de disolvente. Se estudiaron diferentes efectos de interacción de

tres factores de extracción: temperatura (60-100 ° C), álcali (1-5%) y etanol acuoso (70- 100%). El resultado mostró que el rendimiento óptimo de extracción (13,57%) se obtuvo con temperatura de 86°C, álcali al 3% y etanol al 93%. Para el estudio a realizarse se toma como referencia la metodología y condiciones empleadas por los autores, así como también la metodología de diseño experimental empleada (Superficie de Respuesta). (Mazumder et al., 2016)

“Pilot plant scale extraction of alginate from *Macrocystis pyrifera*. 1. Effect of pre-extraction treatments on yield and quality of alginate.” A nivel de planta piloto, se realizaron extracciones (1) usando tratamiento con formalina antes del tratamiento de pre-extracción con ácido (2) usando diferentes tratamientos de ácido de manera que los iones de calcio intercambiados variaron del 83% al 4%. El uso de tratamiento con formalina dio un producto con menos color. La extracción directa de alginato cálcico a alginato sódico es posible porque se utilizaron condiciones alcalinas fuertes, pH 10 a 80 ° C durante dos horas y con un bajo volumen de agua. El mejor tratamiento de pre-extracción para obtener un alginato con alta viscosidad es hidratar el alga con formalina al 0,1% durante la noche, luego lavar el alga una vez con ácido clorhídrico a pH 4 usando un sistema discontinuo con agitación continua durante 15 min. Este estudio nos permite corroborar las condiciones de extracción (importancia de un medio básico) para la extracción de alginato (polisacárido), así como la importancia de un tratamiento previo del alga. (Hernández-Carmona et al., 1998)

“Production of mono sugar from acid hydrolysis of seaweed”. Optimizaron las condiciones del proceso para la sacarificación de macroalgas (algas marinas) en mono azúcar utilizando los siguientes factores: cantidad de biomasa, concentración de catalizador, temperatura y tiempo de reacción. El componente principal, *Laminaria japonica* (alga parda) es un carbohidrato que se puede convertir en una variedad de azúcares. Se produjo manitol (31,53% en peso) a partir de *L. japonica* seca. Este estudio nos indica en relación al que se va a desarrollar, que se pueden obtener otros polisacáridos también a partir de las algas pardas o marrones. (Jang, Shirai, Uchida, & Wakisaka, 2012).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

A lo largo de este capítulo se describirá y explicará los procedimientos que se emplearon en el presente trabajo, tanto para el estudio de los polisacáridos (siendo el de mayor importancia el alginato de sodio) presentes en las algas pardas ecuatorianas, así como también para la producción de ácidos orgánicos a partir de las mismas usando procedimientos hidrotermales (microondas). De igual forma los métodos analíticos para cada uno de los productos de interés.

3.1. Materiales y Reactivos

3.1.1. Reactivos

- Sigma Aldrich ®

Alginato de Sodio (CAS 9005-38-3)

Ácido Láctico (CAS 79-33-4)

- Merck ®

Formaldehído (37%, ACS, Reag. Ph Eur)

Ácido clorhídrico (37%, ACS, ISO, Reag. Ph Eur)

Carbonato de sodio (EMSURE® ISO. CAS 497-9-8)

- La Casa del Químico

Óxido de Calcio

- Otros

Etanol (96%)

Agua destilada

Agua de Mar (ESENCIA MARINA)

Ácido Acético Glacial

3.1.2. Equipos

Se emplearon los equipos que se encuentran disponibles en el laboratorio de investigación de la carrera de Ingeniería Petroquímica de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE sede Latacunga, donde se desarrolló este trabajo.

- Agitador mecánico – BOECO OSD-20
- Centrifugadora - BOECO C-28A
- Estufa – ESCO Isotherm
- Ph-metro – BOECO
- Conductímetro - BOECO CT-480
- Analizador Termogravimétrico– Perkin Elmer, modelo Pyris 1 TGA
- Calorímetro Diferencial de Barrido DSC- METTLER TOLEDO, modelo **DSC1 STAR®** System
- Espectrómetro infrarrojo FT-IR accesorio de muestreo universal ATR- PerkinElmer, modelo Frontier
- GC-IMS FlavourSpec
- Tamizador analítico - RESTCH gMBh
- Microondas (Digestor) analytikjena TOP WAVE

3.2. Métodos

3.2.1. Recolección, tratamiento y transporte de las Algas Pardas

La metodología aplicada, para la materia prima del presente estudio. Se describe a continuación:

Las algas pardas dependiendo de la especie suelen encontrarse en la zona

intermareal rocosa y pueden ser recolectadas manualmente sin dificultad alguna, sin embargo si se encuentra sumergida en sitios más profundos pueden ser atrapadas mediante un garfio o cualquier tipo de gancho pesado o un rastrillo sujetado a una cuerda. (Ozgun et al., 2015)

Las muestras fueron recolectadas en las playas de la provincia de Manabí: Machalilla y Puerto Cayo. Después de la recolección, las algas fueron lavadas para la remoción de arena, y otro tipo de material no deseado con agua corriente. Posteriormente, se transportó apropiadamente en recipientes plásticos hasta el laboratorio, localizado en la ciudad de Latacunga.

En el laboratorio, las muestras se clasificaron para seguidamente ser lavadas múltiples veces con agua corriente y finalmente con agua destilada, posterior al lavado se secarán dentro de un horno conectivo (Estufa – BOECO Isotherm OFA) a 60 °C. Después de alcanzar un peso constante, las muestras secas se molieron usando un procesador de alimentos durante 2,5 minutos. (Yaich et al., 2015)

Para trabajar con un tamaño de partícula definido y homogéneo, se empleó un tamizador analítico RESTCH gMBh, los tamaños seleccionados fueron de Mesh 10, 20. Los ensayos de tamizaje se llevaron a cabo por triplicado para el material de la playa de Machalilla, en cada replica se partió con una masa de 40 gramos (100% de la muestra).

Finalmente, las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas selladas hasta posteriores análisis. Las algas recolectadas en las playas de Machalilla se utilizaron para el presente estudio. (Yaich et al., 2015)

3.2.2. Extracción de Polisacáridos

Para la extracción de los polisacáridos, tomando en cuenta que el componente a extraer de interés es el alginato de sodio, se tomó como referencia el método realizado por (Mazumder et al., 2016). Todas las experimentaciones, se realizaron en torno al punto óptimo de extracción (90 °C, 3% Na₂CO₃, 3h).

Se utilizó un gramo de Mesh 10 de material algal de la playa de Machalilla

(Figura 13) previamente tratado (lavado, secado, molido y tamizado).



Figura 13 Algas pretratadas y tamizadas de la playa de Machalilla

La metodología de extracción consiste en:

Reposar durante 24h 1 gramo de las algas tamizadas en una solución de formol al 2% a temperatura ambiente, para despigmentarlas.

Lavar con agua destilada las algas despigmentadas varias veces (recomendable más de 3), luego añadir ácido clorhídrico 1M (20 ml aproximadamente) para inducir el intercambio iónico Ca/H (transformando en ácido algínico las sales algínicas insolubles) y dejar reposar durante otras 24h.

Con agua destilada, lavar las algas acidificadas a fondo. Digestar la biomasa con ayuda del sistema de la Figura 14, añadiendo carbonato sódico (Na_2CO_3) a distintas concentraciones (0%, 1.5% y 3%) en solución acuosa con agua de mar - agua destilada a distintas proporciones (100:0, 75:25, 50:50, 0:100) durante 3h a 75°C. De tal forma que suman un total de 12 experimentos como se muestra en la Tabla 7. Según (Hernández-Carmona et al., 1999) la relación de volumen de líquido vs la masa de alga seca debe ser de (50ml/g).

El sistema de extracción está compuesto por el agitador eléctrico a 400 – 410 rpm, el cual agitará las algas con la solución de carbonato de sodio contenidos en un vaso de precipitación al cual se le suministra temperatura a través de una especie de baño María con la ayuda del agitador-calentador y un vaso de precipitación que

contiene agua. La porción del vaso que contiene las algas con la solución tiene que tener contacto con el agua del vaso del calentador. Para registrar la temperatura nos ayudamos de un termómetro.

Cabe mencionar que el agua de mar empleada fue adquirida de una microempresa distribuidora (Esencia Marina) localizada en la ciudad de Ambato la cual la purifica mediante filtración, ultravioleta (UV) y Ozonización. (Anexos)



Figura 14 Sistema extracción de polisacáridos (alginato).

Tabla 5.
Experimentos para la extracción de polisacárido.

Experimento	Concentración Na ₂ CO ₃	Proporción Agua de Mar: Agua Destilada
1	0%	100 : 0
2	0%	75 : 25
3	0%	50 : 50
4	0%	0 : 100
5	1.5%	100 : 0
6	1.5%	75 : 25
7	1.5%	50 : 50
8	1.5%	0 : 100
9	3%	100 : 0
10	3%	75 : 25
11	3%	50 : 50
12	3%	0 : 100

Separar la fracción soluble posterior a la extracción alcalina, aplicando centrifugación durante 25 minutos a 4.000 rpm. Centrifugar el sobrenadante de la primera separación a las mismas condiciones, para obtener un líquido con la menor cantidad de sólidos posibles.

Precipitar el sobrenadante de la segunda separación con etanol al 96%. La masa precipitada se recoge y disuelve en agua destilada, para ser agitada durante 12 horas. La solución generada se precipita nuevamente usando una solución nueva de etanol al 96%.

La fracción precipitada se seca a 50°C hasta mantener un peso constante (durante 24 horas). Pesamos el producto seco obtenido para obtener el rendimiento del proceso aplicando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{masa de producto extraído seco}}{\text{masa de alga seca}} * 100$$

Ecuación 2 Rendimiento

Finalmente se realizará su caracterización a través de Espectrometría infrarrojo FT-IR, el Analizador Termogravimétrico— Perkin Elmer y el Calorímetro Diferencial de Barrido DSC- Mettler Toledo.

3.2.3. Producción de Ácidos Orgánicos

Se establecieron dos posibles rutas para su obtención: A partir del uso directo de alga parda pretratada tamizada y de alginato de sodio Sigma Aldrich con agua de mar a diferente salinidad (15; 23,25; 31,5 ppt) y con la presencia o no de un catalizador (CaO) (0g; 0,3g y 0,6g) de acuerdo al diseño experimental proporcionado por el software Statgraphics Centurion (Tabla 7).

Para ambas rutas se emplea el mismo diseño experimental y también el equipo digestor que contiene reactores para conseguir las condiciones de temperatura requeridas (180; 200 y 220 °C) en tiempos determinados (0,5; 1; 1,5 h).

Para estas experimentaciones se agrega a los reactores del microondas analytikjena 0,6 g de materia prima para cada ruta, es decir tanto de alga con un Mesh

20 como de alginato de sodio de Sigma Aldrich. El alga es previamente remojada en agua de mar durante 24h antes de ser sometida al proceso. A su vez también preparan las diluciones del agua de mar con agua destilada para obtener los distintos puntos de salinidad, que son comprobados con la ayuda de un conductímetro en el modo de salinometro para medirla.

Se agregan a los reactores las materias primas junto con el agua a su salinidad respectiva en un volumen de 30 mL así como también la cantidad de catalizador de acuerdo al experimento correspondiente que se esté realizando del diseño experimental.

Una vez concluido el proceso se procede a centrifugar durante 20 min el producto obtenido y posteriormente a filtrarlo y guardarlo en un ambiente oscuro y refrigerado (4°C) de preferencia para su posterior análisis y caracterización a través del GC-IMS FlavourSpec (Espectrofotometría de Movilidad Iónica).

3.2.4. Selección del Diseño Experimental

El diseño de Box Behnken es aplicable cuando se tienen tres o más factores, son eficientes al número de corridas, no incluye tratamientos a los vértices de la región experimental, y al menos uno de los factores se fija en la mitad de su rango de prueba.

El diseño experimental a realizar se presenta en la Tabla 7, el cual fue desarrollado por el software Statgraphics Centurion. Genero una matriz de 27 experimentos en un solo bloque, de los cuales se puede apreciar varias combinaciones entre las variables o factores (temperatura, tiempo, salinidad, catalizador), es decir, los diseños de Box-Behnken consisten en series de ejecuciones en las que cada par de factores varía entre sus niveles bajos y altos, mientras que los otros factores experimentales se mantienen en el nivel medio. Se aprecia un total de 3 repeticiones del punto central (Experimentos: 19,23 y 27).

Tabla 6.
Matriz de Tratamientos Box-Behnken para Ácidos Orgánicos.

N° Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Salinidad (ppt)	CaO (g)
1	180	1,0	31,5	0,3
2	200	1,5	23,25	0,0
3	180	1,0	23,25	0,6
4	180	1,0	15,0	0,3
5	220	1,0	15,0	0,3
6	200	1,5	15,0	0,3
7	200	0,5	15,0	0,3
8	180	1,5	23,25	0,3
9	220	1,0	23,25	0,6
10	180	0,5	23,25	0,3
11	220	1,0	31,5	0,3
12	200	0,5	23,25	0,0
13	200	1,0	15,0	0,6
14	200	1,5	23,25	0,6
15	220	1,5	23,25	0,3
16	200	0,5	31,5	0,3
17	180	1,0	23,25	0,0
18	200	1,0	31,5	0,0
19	200	1,0	23,25	0,3
20	220	0,5	23,25	0,3
21	220	1,0	23,25	0,0
22	200	0,5	23,25	0,6
23	200	1,0	23,25	0,3
24	200	1,0	15,0	0,0
25	200	1,0	31,5	0,6
26	200	1,5	31,5	0,3
27	200	1,0	23,25	0,3

Fuente: (Statgraphics Centurion, 2009)

3.3. Métodos analíticos

3.3.1. Espectroscopia vibracional FT-IR ATR

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), es simple, flexible, directa y especialmente adecuada para el estudio de biomasa y sus derivados, debido a que permite el estudio de superficies in situ. (Contreras, Trujillo, Arias, Pérez, & Delgado, 2010). Es útil para identificar polímeros sintéticos y biopolímeros (productos naturales) (San Andrés, Chércoles, Gómez, & de la Roja, 2010).

Se basa en que la energía radiante (radiación IR) es capaz de provocar vibraciones de los enlaces moleculares. La absorción de la radiación se producirá a determinados valores de frecuencia o número de onda dependiendo de los átomos implicados en estas uniones y del tipo de unión (simple, doble, triple). Las bandas de absorción que aparecen en un espectro FTIR son características de determinados grupos funcionales para permitir identificar la especie química que se analiza. (Hesse et al., 1999; San Andrés et al., 2010)

La radiación IR experimenta múltiples reflexiones e incide en la muestra a través de un cristal de gran poder reflectivo (diamante, ZnSe, Ge). La muestra debe adaptarse perfectamente a la superficie de la ventana mediante la presión ejercida por la punta de un dispositivo especialmente diseñado y que se sitúa sobre la muestra, cuando la radiación incide sobre la muestra, ciertas frecuencias serán absorbidas en función de su composición química. (Socrates, 2001). Por un cristal transparente al IR y de alto índice de refracción pasa un haz de radiación infrarroja (IR), en el cual está colocada la muestra. El haz IR incidente se refleja muchas veces y la superficie de la muestra absorbe parte de la radiación a frecuencias características; por lo tanto, un requerimiento de vital importancia es que haya el contacto adecuado entre el cristal y la muestra. (Contreras et al., 2010)

Una alternativa prometedora para reemplazar los métodos tradicionales ya que requiere de un tratamiento mínimo de la muestra, la toma de espectros toma unos pocos minutos es el uso de la reflectancia total atenuada en el infrarrojo (ATR-FTIR) (LacheGarcía et al., 2011)

La espectroscopia FTIR-ATR presenta ciertas ventajas, no es necesaria la preparación previa de la muestra; lo que la hace muy útil en el caso de fibras, láminas, films y materiales plásticos en general. Además, es importante tener en cuenta que el análisis es superficial, es decir, el espectro obtenido corresponde a los componentes que hay en la superficie de la muestra. (San Andrés et al., 2010)

Previo a su análisis, las muestras de polisacáridos en forma de polvo se secaron a 50°C en un tiempo de 3 horas en un horno convectivo (estufa). Como referencia se empleó el alginato de sodio adquirido a Sigma-Aldrich. Los espectros se registraron a temperatura ambiente (20°C), de 4000 a 600 cm^{-1} por espectroscopia infrarroja por

transformada de Fourier con muestreo de Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR).

Se utilizó un espectrómetro FTIR Frontier (Perkin Elmer, USA), provisto con el dispositivo ATR con cristal de diamante (Tabla 6). Además del software Quant para el desarrollo de los espectros.

3.3.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Es una técnica que mide la variación del peso de una muestra cuando se calienta, se enfría o se mantiene a una temperatura constante. Se produce el calentamiento gradual de la muestra en una atmósfera inerte (N₂) o aire hasta 1000 °C, mientras se genera la medición de pérdida de peso en función de la temperatura, ya sea por algún cambio en la muestra. Estas pérdidas de peso son específicas para cada tipo de muestra.

Entre sus áreas de aplicación están los plásticos, elastómeros y termoestables, una amplia gama de análisis de las industrias química y farmacéutica. Empleándose principalmente para la caracterización de materiales en lo que respecta a su composición.

Para efectuar los análisis térmicos se empleó el equipo Pyris 1 TGA, como referencia para el análisis de pérdida de peso en función de la temperatura se usó alginato de sodio de Sigma-Aldrich con una masa de entre 1 y 3 mg de las muestras previamente secados a 50 °C durante 30 minutos.

El método para analizar las muestras consiste en calentarlas a un flujo de nitrógeno de 20 ml/min desde la temperatura ambiente hasta los 50 °C, luego mantener la temperatura constante durante 0,5 minutos, posteriormente la muestra fue calentada con el mismo flujo de nitrógeno (20 ml/min) hasta 900 °C y finalmente mantener la temperatura isotérmica durante 3 minutos a un caudal de 20 ml/min de aire. La tasa de calentamiento es de 10 °C/min.

3.3.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC), es una técnica rápida, fácil de usar y muy sensible, empleada para medir los cambios en función del tiempo o la temperatura; de entalpía, debidos a modificaciones en las propiedades químicas y físicas de un material (identificación y caracterización de materiales).

El método consiste en pesar una capsula de aluminio (48 a 50 mg aproximadamente), para posteriormente tarar y sacar de una micro balanza solamente la base de la capsula y agregar un poco de la muestra. Regresar ambas a la balanza y obtendremos el peso de la muestra. Posteriormente realizar un diminuto orificio en la tapa de la capsula con la ayuda de la herramienta similar a un alfiler del fabricante. Se utilizó como referencia en el equipo una cápsula de aluminio (49,99 mg) vacía sellada. Con un flujo de nitrógeno de 90 ml/min, la muestra se calentó de 25 a 550 °C a una velocidad de 10 °C / min. Dando como resultado absorción o liberación de calor (reacción endotérmica o exotérmica) lo cual se verá reflejado en los termogramas.

Los termogramas DSC de las muestras se obtuvieron usando calorímetro diferencial de barrido **DSC 1 STAR®** System Mettler Toledo.

3.3.4. Espectrometría de Movilidad de Iones (IMS)

Es una técnica de ionización suave para formar especies de iones reactivos desde el gas portador empleado en el sistema (aire generalmente). La mezcla de estos grupos de iones reactivos estables con muestras de vapor a analizar puede dar lugar a la ionización de los materiales incluidos en la muestra, formando así grupos de iones característicos del material de la muestra.

Un pequeño paquete de los iones así formados se inyecta eléctricamente en una región de deriva, donde pasan a un electrodo colector a cierta distancia (típicamente de unos pocos cm) bajo la influencia de un campo electrostático aplicado. Los iones viajan a través de la región de deriva a velocidades características que están relacionadas con el tamaño y la forma de los grupos de iones.

Al llegar al colector, cada una de las especies de iones genera una señal

específica, y se mide la corriente de iones en función de la hora de llegada. Un lote de corriente de iones forma un espectro de movilidad iónica, con una banda de movilidad iónica correspondiente a cada una de las especies iónicas únicas. El espectro es una composición única del compuesto original.

El espectro de IMS medido se analiza y la información de movilidad se extrae en tiempo real dentro del instrumento. La comparación de las movilidades medidas con las movilidades conocidas de compuestos amenazantes dará lugar a una condición de alarma si hay una coincidencia.

Las muestras obtenidas en la producción de ácidos orgánicos por las dos rutas establecidas serán reducidas a pH 1 y colocadas en viales (10 μ L de volumen de muestra) e insertadas en el GC-IMS FlavourSpec para determinar la presencia de ácidos orgánicos previa realización de curvas de calibración de los ácidos (ac. láctico, ac. acético). Las curvas de calibración se realizaron por duplicado a diferentes concentraciones de los ácidos láctico y acético (0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% y 3%), se colocaron en viales en un volumen de 10 μ L y se analizó en el equipo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Extracción de polisacáridos

Los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento aplicando la E (1) para cada experimentación se muestran en la Tabla 8. Como se mencionó anteriormente las experimentaciones (12 en total) se realizaron en base a las condiciones óptimas establecidas por el trabajo de (Mazumder et al., 2016). Al cual se le realizaron variaciones del método de extracción, al emplear agua de mar. Cabe mencionar que el sistema en el cual se desarrolló la extracción (Figura 14) es empírico, y no se podía mantener un control exacto de la temperatura.

Tabla 7.
Experimentos y rendimientos de extracción de polisacáridos.

Experimento	Concentración Na₂CO₃	Proporción Agua de Mar: Agua Destilada	Rendimiento (%)
1	0%	100 - 0	15,75
2	0%	75 - 25	14,05
3	0%	50 - 50	10,51
4	0%	0 - 100	1,0736
5	1.5%	100 - 0	25,46
6	1.5%	75 - 25	23,7
7	1.5%	50 - 50	22,16
8	1.5%	0 - 100	20,73
9	3%	100 - 0	27,34
10	3%	75 - 25	25,64
11	3%	50 - 50	24,72
12	3%	0 - 100	22,12

Como se puede observar en la Tabla 7 un factor decisivo en la extracción de polisacáridos (alginato específicamente) es la presencia de carbonato de sodio,

mientras exista mayor concentración de este el rendimiento de extracción aumenta proporcionalmente.

La presencia de agua de mar como medio también contribuye a mejorar el rendimiento de extracción ya que en su composición posee sales de sodio (NaCl principalmente).

En los experimentos 1,2,3 y 4 con Na₂CO₃ al 0% no se pudo evidenciar la formación de alginato, con lo cual se puede decir que sin la presencia de esta sal no se obtiene el biopolímero deseado.

4.1.1. Análisis espectroscópico FT-IR ATR

Es una herramienta útil, ya que permite la caracterización previa de un compuesto orgánico a partir del rango de frecuencia de 4000 a 650 cm⁻¹ (número de onda) del espectro infrarrojo.

Para identificar a un polisacárido partimos del estudio sistemático en dos pasos sucesivos:

- Identificar los grupos funcionales (enlaces químicos) de la molécula: Para ello se elaboró la Tabla 8 con los grupos funcionales en donde se encuentran las frecuencias en cm⁻¹ posibles de las bandas de absorción de cada uno estos. De tal forma se puede conocer si el espectro de una muestra (molécula) no contiene la absorción típica de cierto grupo funcional.

Tabla 8.
Grupos funcionales y frecuencias de absorción de los principales polisacáridos de las algas pardas.

Frecuencia (cm-1)	Nombre	Formula	Polisacárido		
			Alginato	Laminaria	Fucoidano
1750 - 1735	Grupo éster ácido carboxílico	C=O	-	-	+
1650 - 1640	Enlace Amida tipo I	N-H2	-	-	-

CONTINÚA



1637 - 1615	Anión Carboxilato	COO-	+	+	+
1600 - 1500	Enlace Amida tipo II (aminoazúcares y proteínas)	N-H	-	-	-
1425	Enlace tipo -β de glucosa		-	-	-
1415	Grupo carboxilato	O-C-O	+	+	-
1260 - 1225	Grupo éster sulfato	S=O	+	+	+
960 - 969	Residuo , Acetico, COS	(CH3)- Fucosa	-	-	+
948	Residuo ácido urónico	C-O	+	-	-
883	Residuo ácido β- manurónico	C1-H	+	-	-
890	Enlace tipo -β	CH,CC,CO	-	+	+
845	Grupo sulfato en posición C-4 axial		-	-	+
820	Grupo sulfato en posición ecuatorial	C-O-S	+	-	+
663	Enlace tipo -β de glucosa		-	-	-

Fuente: (Ordóñez, 2012)

- Analizar la región de la huella dactilar (anomérica): Esta región se encuentra en el rango de frecuencias de $950 - 700 \text{ cm}^{-1}$ (Mathlouthi & Koenig, 1987). Es característica de cada compuesto.

Todas las muestras fueron obtenidas por el método extractivo de (Mazumder et al., 2016), empleando agua de mar y variación de concentración de Na_2CO_3 , motivo por el cual referimos el análisis a la identificación del alginato de sodio (principal polisacárido de las paredes celulares de las algas pardas) y la posible adición de otros polisacáridos a su estructura.

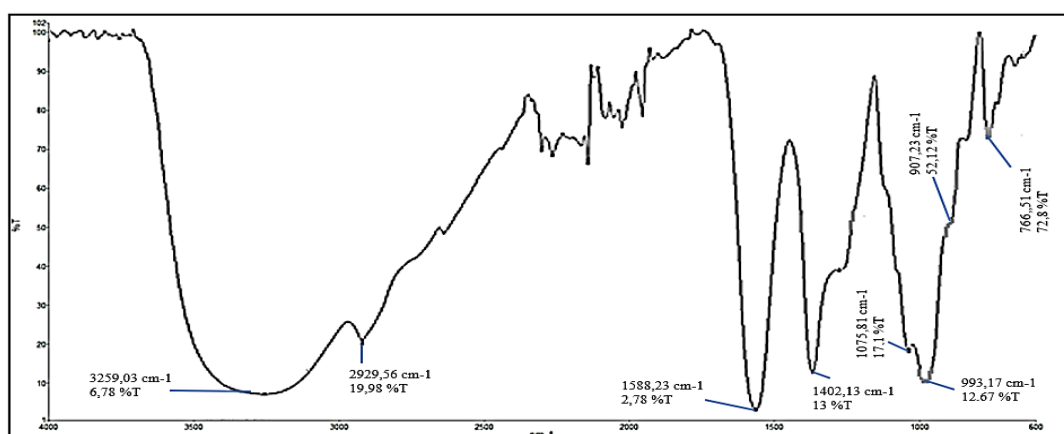


Figura 15 Espectro FTIR de referencia del alginato de sodio de Sigma-Aldrich.

En la figura 15 podemos apreciar el espectro IFTR de referencia del alginato de sodio, en el mismo que podemos apreciar los picos y bandas de absorción características. Como se muestra en la Tabla 8, según (Ordóñez, 2012) se puede evidenciar la presencia de: anión carboxilato (COO^-) a $1588,23 \text{ cm}^{-1}$, el grupo carboxilato (O-C-O) entre $1260 - 1225$, grupo éster sulfato (S=O) a 948 , residuo ácido urónico (C-O) a 883 , residuo ácido β - manurónico (C1-H) a 820 y el grupo sulfato en posición ecuatorial (C-O-S).

Para (Muñoz Ochoa, 2006) el espectro de infrarrojo muestra bandas de absorción a 3406 cm^{-1} por la vibración del enlace O-H. A 2935 cm^{-1} el estiramiento C-H. Las bandas a 1611 y 1417 cm^{-1} corresponden a vibraciones de los enlaces del grupo carboxilo. Bandas a 1070 y 1040 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de los enlaces del anillo de azúcar (manosa). A los 1256 cm^{-1} , en general a la vibración de los enlaces de los grupos éster sulfato, y a los 815 cm^{-1} aparece una banda que se atribuye a la torsión de los grupos éster sulfato en posición ecuatorial al anillo del azúcar.

Finalmente, (Gómez-Ordóñez & Rupérez, 2011) mencionan que existen de siete a ocho bandas características en el rango de 2000 a 600 cm^{-1} para el alginato. En la región de $4000-2000 \text{ cm}^{-1}$ aparecen dos señales que generalmente corresponden a algas secas y los polisacáridos, la primera a $3258,02 \text{ cm}^{-1}$, por el enlace hidrogeno OH (vibraciones de estiramiento) y la segunda a $2928,21 \text{ cm}^{-1}$ pertenece a vibraciones de estiramiento C-H. A $1405,85 \text{ cm}^{-1}$ corresponde a la vibración de deformación C-OH con contribución de la vibración de estiramiento simétrica del grupo carboxilato (O-C-O). Las señales a $1081,68 \text{ cm}^{-1}$ y $1025,19 \text{ cm}^{-1}$, pueden corresponder a las vibraciones de estiramientos C-O y C-C del anillo de piranosa, respectivamente.

También para (Gómez-Ordóñez & Rupérez, 2011) las bandas más importantes, corresponden al ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G). Las bandas aproximadamente a 808 y 787 cm^{-1} corresponden al ácido manurónico y gulurónico, las señales a 1030 y 1080 cm^{-1} corresponden a los bloques mencionados.

La región más discutida, es la anomérica (950 a 750 cm^{-1}) según (Fenoradosoa et al., 2010). En ella se evidencia dos bandas características (7 y 8).

La banda 7 y 8 corresponde a la vibración de estiramiento C-O de residuos de ácido urónico y a los residuos de ácido manurónico.

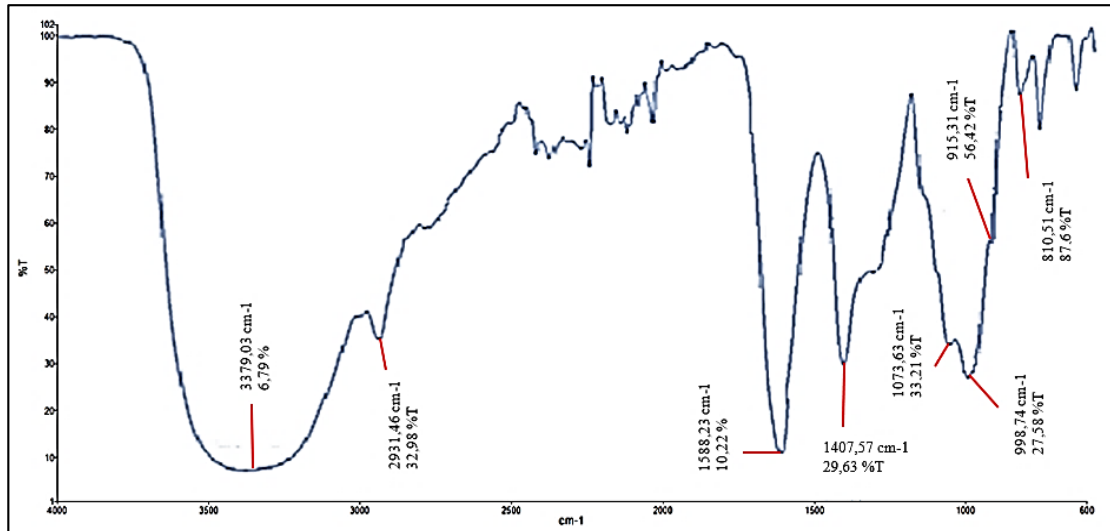


Figura 16 Espectro FTIR común entre experimentos al 1,5% de Na₂CO₃.

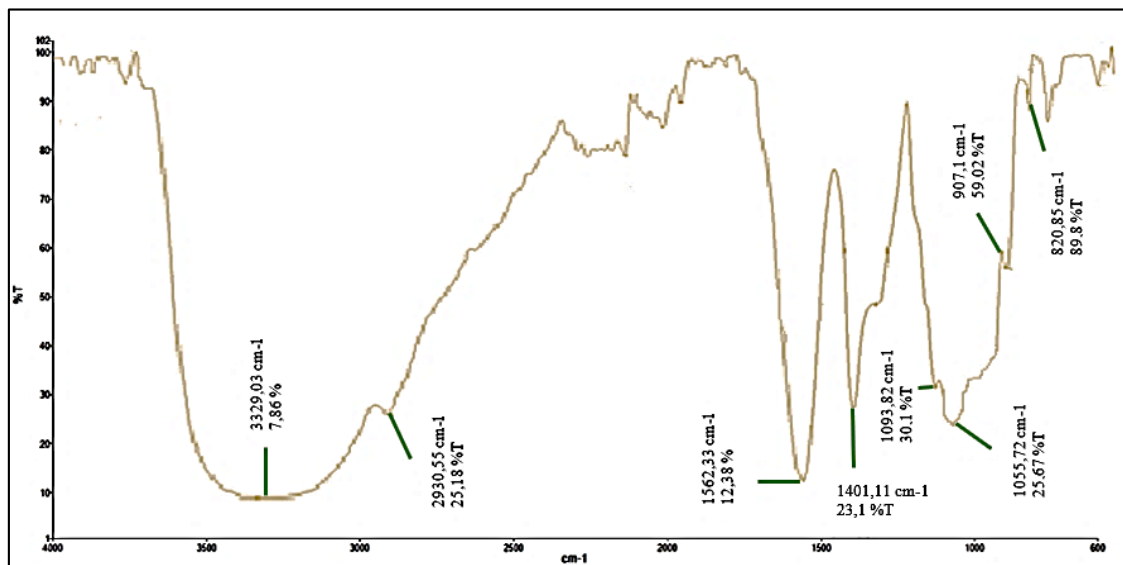


Figura 17 Espectro FTIR común entre experimentos al 3% de Na₂CO₃.

Por lo tanto, con lo mencionado anteriormente, así como también con las Figuras 15, 16 y 17, generamos la Tabla 9. En la cual se establecen las señales características para el alginato de sodio y generamos una comparación para cada uno de los espectros de infrarrojo obtenidos como parte del análisis a los experimentos realizados:

Tabla 9.
Longitudes de Onda y bandas características para la referencia y experimentos.

N° de Señal	Nombre de Banda	Señal IFTR de muestras (cm ⁻¹)		
		Sigma Aldrich	Experimentos al 1,5% de Na ₂ CO ₃	Experimentos al 3% de Na ₂ CO ₃
1	O-H banda de estiramiento	3259,03	3379,03	3329,03
2	C-H estiramiento	2929,56	2931,46	2930,55
3	O-C-O estiramiento asimétrico	1588,23	1588,23	1562,33
4	O-C-O estiramiento simétrico C-OH contribución por deformación	1402,13	1407,57	1401,11
5	O-H estiramiento de flexión, debido al ácido gulurónico	1075,81	1073,63	1093,82
6	C-O-C estiramiento, debido al ácido manurónico	993,17	998,74	1055,72
7	C-O-C estiramiento	907,23	915,31	907,1
8	Residuos de ácido manurónico	766,51	810,51	820,85

Tanto para la extracción de alginato de sodio al 1,5% y 3% de Na₂CO₃ se puede evidenciar la presencia de los picos y longitudes de onda características al ser comparados con la referencia, a pesar de existir variaciones mínimas los espectros presentan la misma forma. Con lo cual podemos decir que si se formó alginato de sodio.

Por el contrario, como se puede observar en la Figura 18 para los experimentos al 0% de Na₂CO₃ el espectro es distinto al del alginato de sodio, a pesar de poseer algunos picos y longitudes de ondas similares como por ejemplo la señal correspondiente al estiramiento O-H a 3490,33 cm⁻¹.

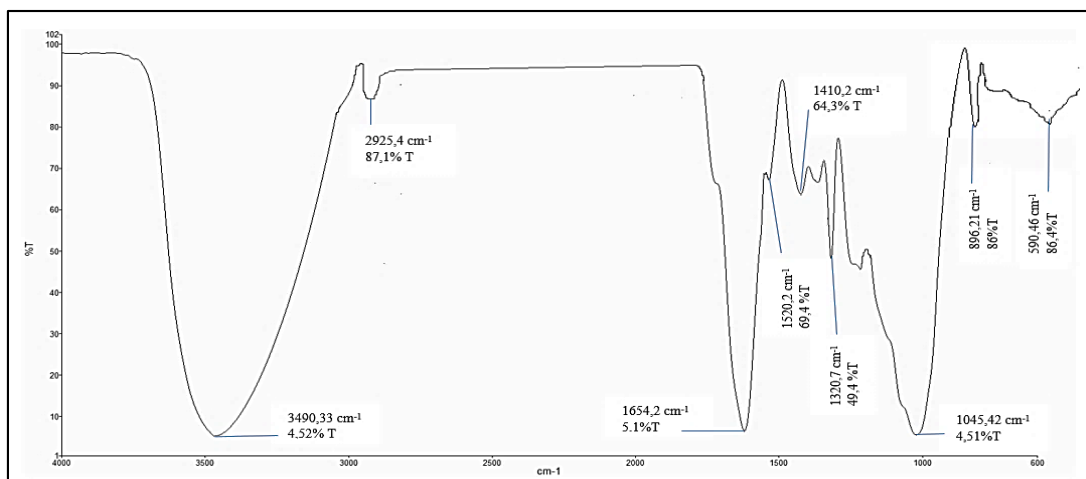


Figura 18 Espectro FTIR común entre experimentos al 0% de Na₂CO₃.

Algunas algas pardas y sus polímeros extraídos exhiben una señal alrededor de 1220-1260 cm^{-1} (banda ancha), correspondiente a grupos éster de sulfato ($\text{S}=\text{O}$), elemento característico de los fucoidanos y polisacáridos sulfatados. (El Atouani et al., 2016)

Guiándonos de la Tabla 9 podemos hacer referencia a los fucoidanos y longitudes de onda características, en la cual podemos visualizar: 1750 – 1735 cm^{-1} grupo éster ácido carboxílico ($\text{C}=\text{O}$), 1637 – 1615 cm^{-1} anión carboxilato (COO^-), 1260 – 1225 cm^{-1} grupo éster sulfato ($\text{S}=\text{O}$), 960 – 969 cm^{-1} Residuo , Acético, COS (CH_3)-Fucosa, 890 cm^{-1} Enlace tipo -f3 ($\text{CH}, \text{CC}, \text{CO}$), 845 cm^{-1} grupo sulfato en posición C-4 axial, 820 cm^{-1} grupo sulfato en posición ecuatorial ($\text{C}-\text{O}-\text{S}$). Así como también a los laminaranos: 1637 – 1615 cm^{-1} anión carboxilato (COO^-), 1415 cm^{-1} grupo carboxilato ($\text{O}-\text{C}-\text{O}$), 1260 – 1225 grupo éster sulfato ($\text{S}=\text{O}$), 890 cm^{-1} enlace tipo -f3 CH, CC, CO.

Según (Troncoso Valenzuela, 2014) señales a 3490,33 cm^{-1} son atribuibles a la vibración O-H y a 1654,2 cm^{-1} corresponde a la presencia de agua. Se observan señales características de la presencia de polisacáridos sulfatados a los 1250 y 1045 cm^{-1} correspondientes a estiramientos $\text{S}=\text{O}$ asimétrico y simétrico respectivamente. También se observó una señal a los 580 cm^{-1} asignable a una deformación asimétrica S-O. Una señal a los 896,21 cm^{-1} correspondiente a protones en los cuales el enlace glicosídico se encuentra en configuración β . (Matsuhiro, 1996). Se puede decir que esta muestra contiene un sistema complejo de polisacáridos.

Con base en los espectros FT-IR del fucoidan (Anexo 2), encontramos

absorción en el número de onda de 1259 cm^{-1} que corresponde a los enlaces $\text{S} = \text{O}$, similar a estos en el fucoïdan comercial (*Fucus vesiculosus*). Se vio respaldado por la aparición de un pico a 823 cm^{-1} que corresponde al sulfato en posición ecuatorial, suponiendo que el grupo sulfato se une al C-2 de fucosa para formar sulfato fucosa, mientras que un fucoïdan comercial a 843 cm^{-1} . Los monómeros constituyentes del fucoïdan crudo son fucosa, galactosa, glucosa, manosa, xilosa, ácido glucurónico. (Peranginangin & Saepudin, 2016)

a) **Determinación del radio M/G**

La técnica FTIR también es una herramienta útil para determinar una estimación cuantitativa entre el ácido manurónico y ácido gulurónico (M/G) partiendo de los valores de absorción (absorbancia) de algunas bandas del espectro: 808 y 1030 cm^{-1} para el ácido manurónico y 787 y 1080 cm^{-1} para el ácido gulurónico. (Gómez Ordóñez, 2012)

La relación M/G permiten conocer la naturaleza del gel de alginato, posee gran interés en la industria cosmética y alimentaria. Alginatos con una relación M/G superior a 1, forman geles más elásticos y blandos en relación a los alginatos con M/G inferior a 1. (Gómez Ordóñez, 2012)

En la Tabla 10, se puede observar la relación M/G para cada muestra analizada mediante la técnica FTIR:

Tabla 10.
Relación M/G para las tres muestras analizadas usando FTIR.

Muestra	M o G	Longitud de Onda (cm^{-1})	Absorbancia	Relación M/G
Alginato Referencia	M	993,17	0,897	1,169491525
	G	1075,81	0,767	
Alginato al 1,5% Na ₂ CO ₃	M	998,74	0,559	1,169456067
	G	1073,63	0,478	

CONTINÚA



Alginato al 3% Na ₂ CO ₃	M	1055,72	0,59	1,13243762
	G	1093,82	0,521	

Entonces podemos decir que los alginatos analizados al poseer una relación M/G superior a 1 posiblemente formaran geles más elásticos y blandos.

4.1.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)

La figura 19, muestra el termograma del alginato empleado como referencia (Sigma- Aldrich). En cinco etapas o zonas, existe degradación térmica; correspondiendo a cada una los intervalos de temperatura 40 a 235°C; 235 a 290°C; 290 a 510 °C; 510 a 785 y 785 °C a 900°C; respectivamente.

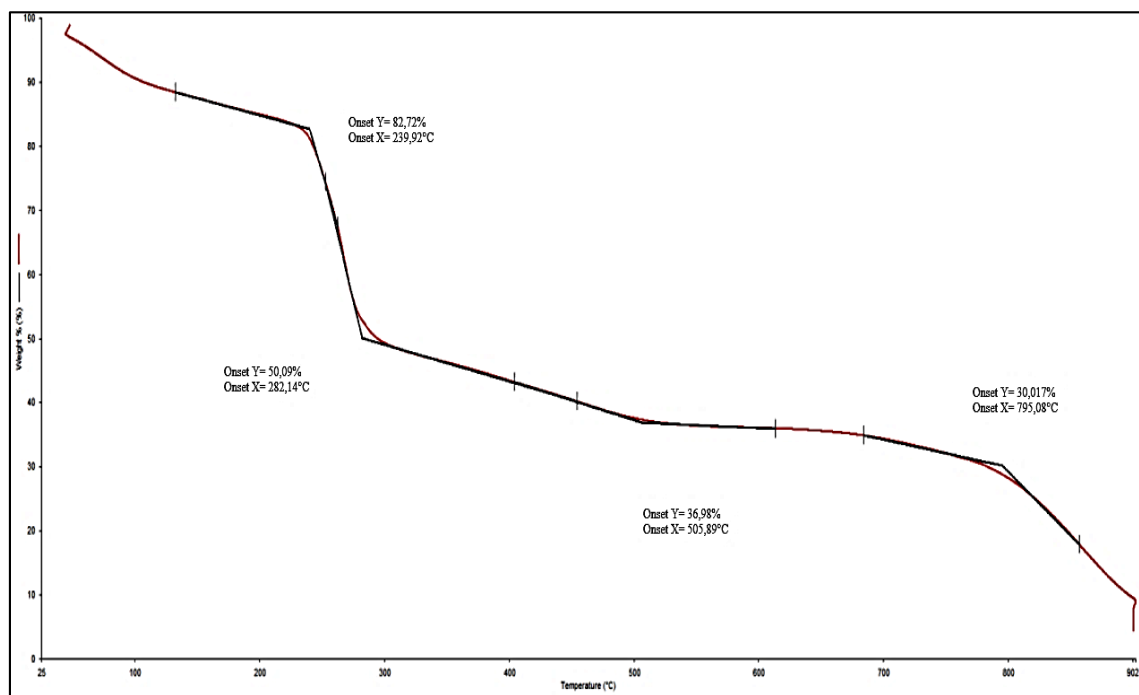


Figura 19 Termograma para el alginato referente de Sigma Aldrich.

Según los trabajos realizados por (Martins et al., 2013; Soares, Santos, Chierice, & Cavalheiro, 2004; Tripathi & Mishra, 2012), se desarrolló la Tabla 11, en la que se detalla cada una de las zonas características en la degradación térmica para el alginato de sodio bajo una atmosfera de nitrógeno.

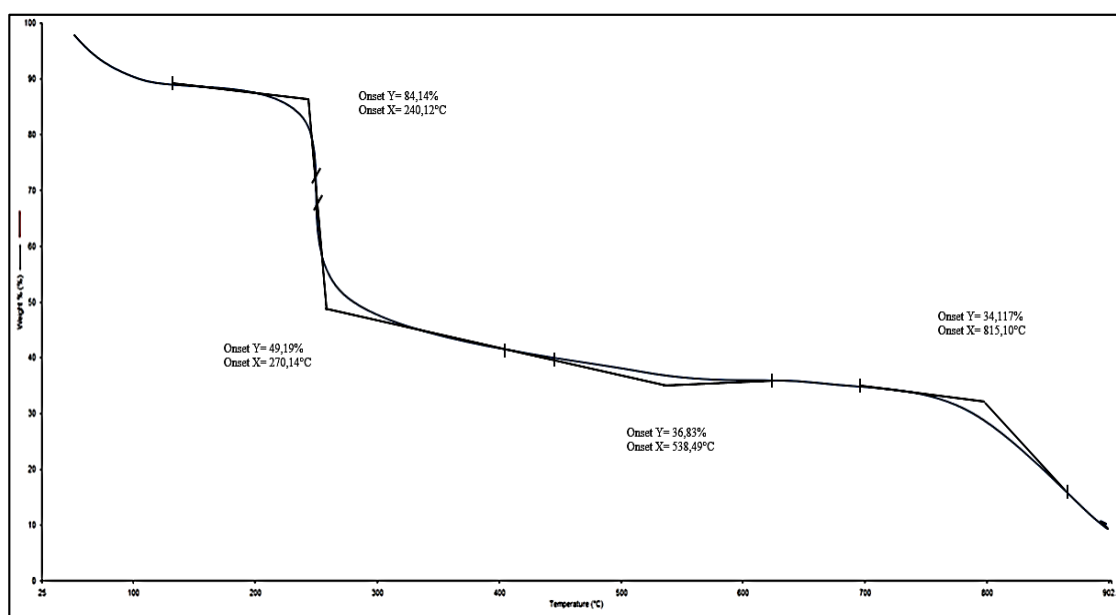
Tabla 11.
Zonas e intervalos característicos para análisis TGA de alginato de sodio.

Intervalo de Temperatura (°C)	Nombre de la Zona
40 a 235	Deshidratación y pérdida de humedad
235 a 290	Descomposición
290 a 510	
510 a 785	Fragmentación de NaAlg en monómeros, Formación de Carbonato
785 a 900	Descomposición de Carbonato

Fuente: (Martins et al., 2013; Soares et al., 2004; Tripathi & Mishra, 2012)

En las figuras 20 y 21, correspondientes a los termogramas de los experimentos al 1,5% y 3% de Na_2CO_3 se puede evidenciar la presencia de las zonas características del alginato de sodio (temperatura y pérdida de peso). Con lo cual también podemos verificar por este método analítico la formación de alginato de sodio. A continuación se realizó una comparativa en la Tabla 12 entre los termogramas de referencia y de los experimentos. En donde podemos observar las pérdidas similares de peso para cada muestra correspondiente. Así como también los intervalos de temperatura.

Figura 20 Termograma para experimentos al 1,5% de Na_2CO_3 .



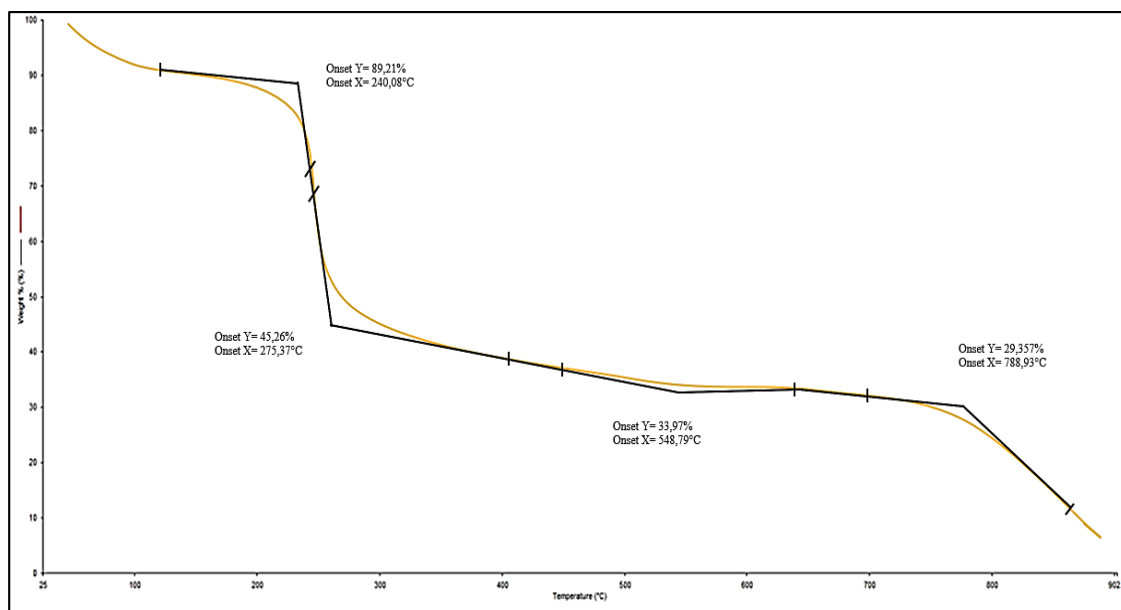


Figura 21 Termograma para experimentos al 3% de Na₂CO₃.

Tabla 12.

Comparación entre termogramas de las muestras analizadas.

Zona	Parámetros	Muestra		
		Alginate Sigma Aldrich	Experimentos al 1,5% Na ₂ CO ₃	Experimentos al 3% Na ₂ CO ₃
Deshidratación y pérdida de humedad	ΔT °C	40 - 235 °C	40 - 230 °C	37 - 240 °C
	% pérdida - peso	17,28	15,86	10,79
Descomposición	ΔT °C	235 - 290 °C	230 - 315 °C	240 - 275 °C
	% pérdida - peso	32,63	34,95	43,95
Fragmentación de NaAlg en monómeros, Formación de Carbonato	ΔT °C	510 - 785 °C	520 - 780 °C	527 - 782 °C
	% pérdida - peso	13,11	12,36	11,29
Descomposición de Carbonato	ΔT °C	785 - 900 °C	780 - 900 °C	782 - 900 °C
	% pérdida - peso	6,97	2,713	4,62

Por otra parte, el termograma obtenido para los experimentos al 0% de Na₂CO₃ (Figura 22), no coincide con el del alginato de sodio de referencia, podemos

evidenciar la forma de una curva diferente, así como también las zonas características, intervalos de temperatura y el porcentaje de pérdida de peso. Para esta curva se distinguen 6 zonas en las cuales se puede evidenciar pérdidas de peso de la muestra de forma menos abrupta que en algunas zonas del termograma del alginato de sodio. Al evidenciar anteriormente a través de la técnica IFTR-ATR una mezcla compleja de polisacáridos para esta muestra, se le puede atribuir la razón del porque esta curva es bastante diferente a la del alginato de sodio.

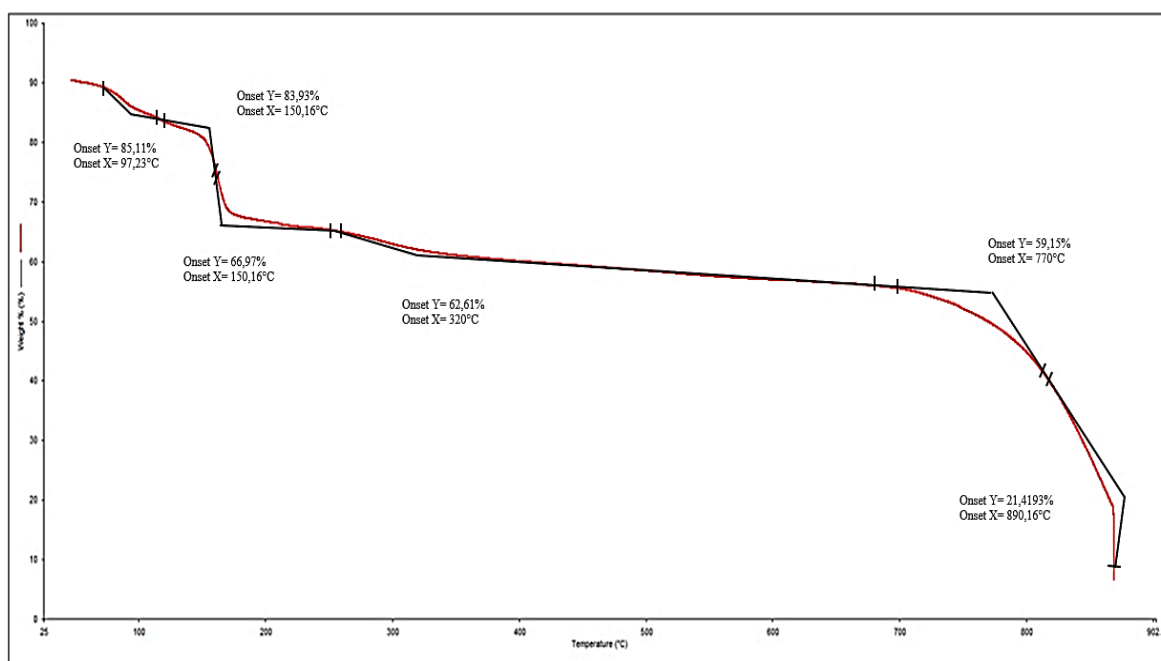


Figura 22 Termograma para experimentos al 0% de Na₂CO₃.

4.1.3. Calorimetría Diferencial de Barrido

(Soares et al., 2004; Swamy, Ramaraj, & Siddaramaiah, 2010) enuncian que para la curva DSC del alginato de sodio como se muestra en la Figura 23, se presentan dos picos característicos uno endotérmico cercano a 100°C (para el alginato de referencia se desplazó a 90°C) y otro exotérmico entre 240 – 260 °C (para la referencia se produjo a 246,25 °C). Al primero se le atribuye la temperatura de transición vítrea (T_g), mientras que al segundo la temperatura de fusión (T_m). Descomponiéndose totalmente a más de 300°C.

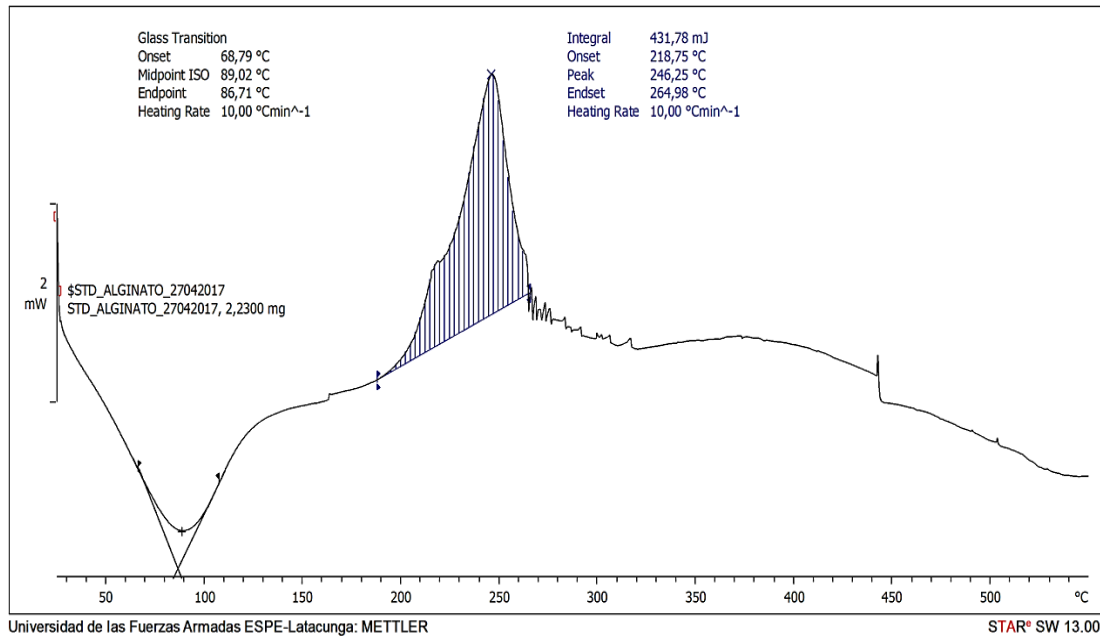


Figura 23 Curva DSC para el alginato de referencia.

Las curvas DSC se obtuvieron en una atmosfera de nitrógeno. Como se puede apreciar en las figuras 24 y 25. Para (Soares et al., 2004) los termogramas DSC presentan los dos picos característicos del alginato de sodio como ya se había mencionado antes, uno relacionado con la perdida de agua y humedad contenida en el polisacárido y otro a la reacción de pirolisis.

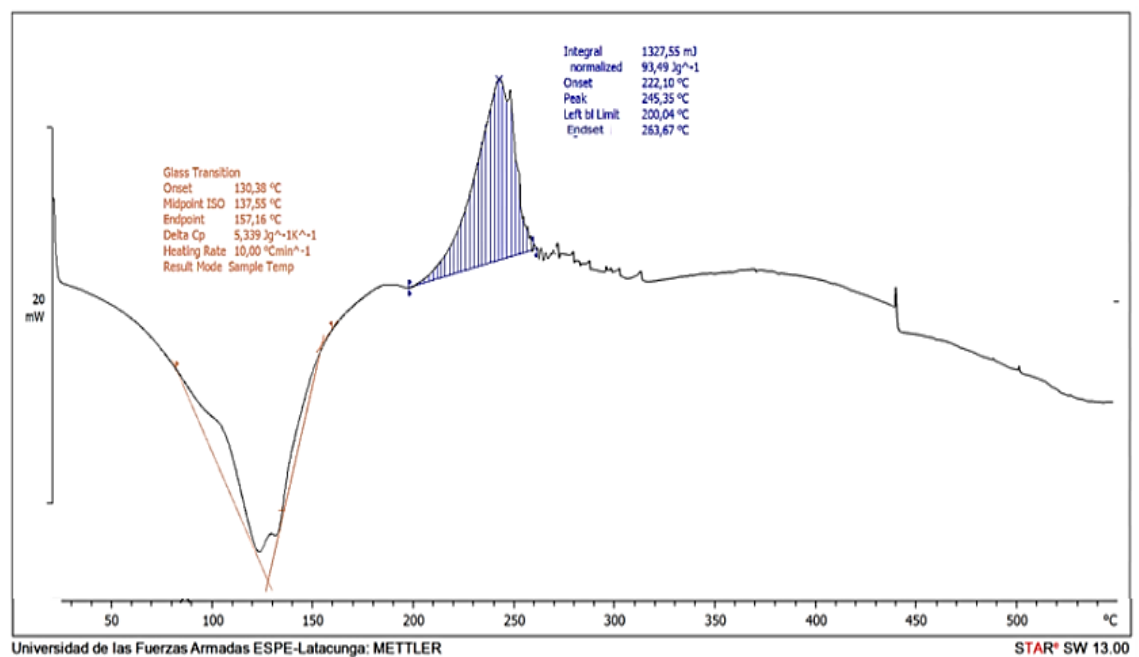


Figura 24 Curva DSC para los experimentos al 1,5% de Na₂CO₃.

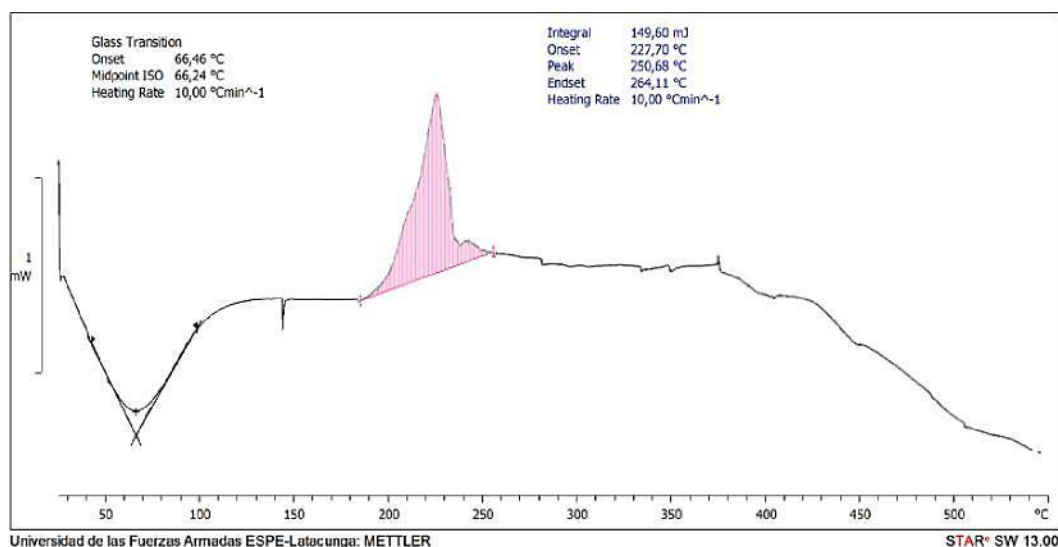


Figura 25 Curva DSC para los experimentos al 3% de Na₂CO₃.

La Tabla 13, es una tabla comparativa de cambios de entalpia y temperaturas en los termogramas DSC obtenidos de las muestras analizadas.

Tabla 13.
Comparación entre termogramas DSC de las muestras analizadas.

		Muestra Analizada		
Zona	Parámetro	Alginato Sigma Aldrich	Experimentos al 1,5 % Na ₂ CO ₃	Experimentos al 3% de Na ₂ CO ₃
Tg	Onset (°C)	68,79	130,38	66,46
	Midpoint ISO (°C)	89,02	137,55	66,24
	End Point (°C)	86,71	157,16	83,32
Tm	Integral (mJ)	431,78	1327,55	149,6
	Onset (°C)	218,75	222,1	227,7
	Peak (°C)	246,25	245,35	250,68
	Endset (°C)	264,98	263,67	264,11

Se puede apreciar en la Tabla 13, que para los experimentos al 1,5% el pico endotérmico con respecto al alginato de referencia y a los experimentos al 3% de Na₂CO₃, un desplazamiento significativo el cual puede ser por el gran contenido de agua de agua en forma de humedad o como agua en la estructura del polisacárido.

Por otra parte para los experimentos al 0% de Na₂CO₃ presentan un

termograma DSC distinto al del alginato de referencia como se muestra en la Figura 26, como ya mencionamos en los análisis de las técnicas anteriores debido a que la muestra es una mezcla compleja de polisacáridos.

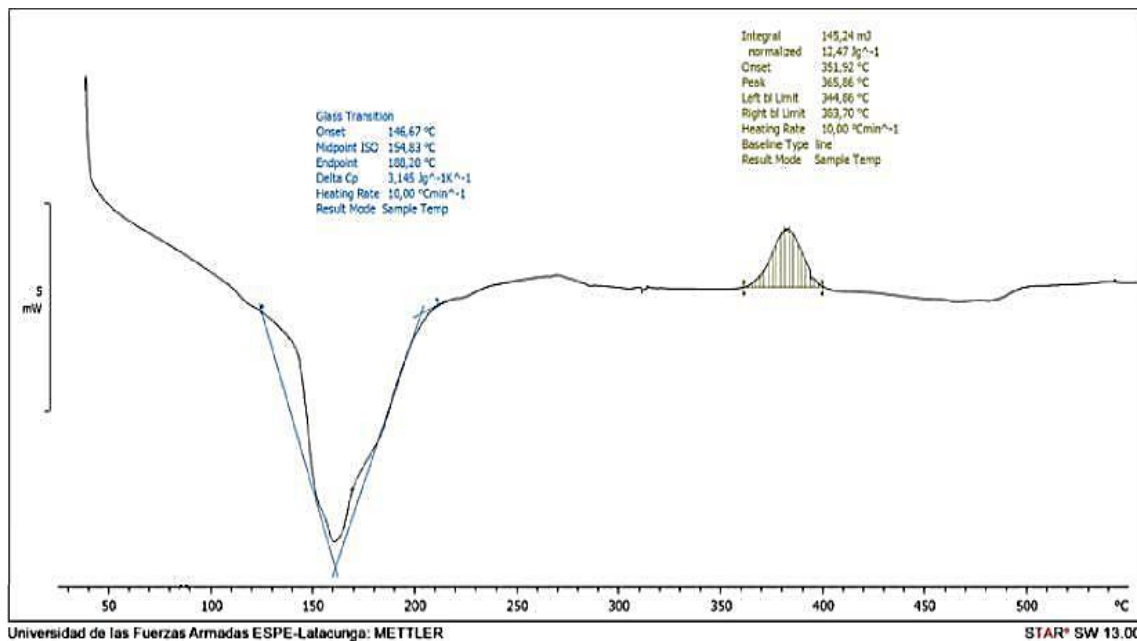


Figura 26 Curva DSC para los experimentos al 0% Na₂CO₃.

4.2. Producción de Ácidos Orgánicos

Para la producción de ácidos orgánicos, se elaboró un mismo diseño experimental para las dos rutas establecidas. Se eligió metodología de superficie de respuesta y el diseño de Box Behnken. Una vez realizadas las experimentaciones (54 en total, 27 para cada ruta) se procedió a analizar el diseño con los valores obtenidos de la variable respuesta (% rendimiento). El diseño experimental proporcionó tres puntos centrales para la obtención de ácidos tanto con algas como con alginato de sodio.

Los análisis de las muestras se realizaron en GC-IMS Flavour Spec, para lo cual previamente se elaboraron las curvas de calibración para cada ácido orgánico que se desea comprobar, en este caso ácido acético (Figura 27) y ácido láctico (Figura 28). En las figuras 29 y 30 podemos observar las imágenes que muestran para cada punto de la curva (diferente concentración del ácido orgánico) la existencia e intensidad de cada uno de ellos según su concentración. Cabe destacar que las intensidades para

el ácido acético son mucho más grandes y robustas debido a que es un ácido mucho más volátil que el láctico, y el GC IMS se basa para el análisis en ese aspecto, la volatilidad de los compuestos.

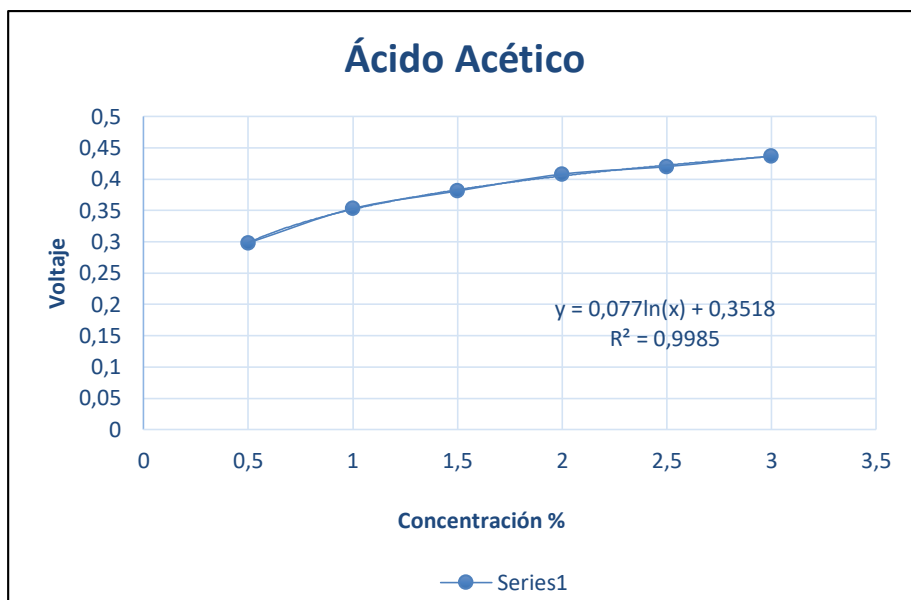


Figura 27 Curva de Calibración del ácido acético.

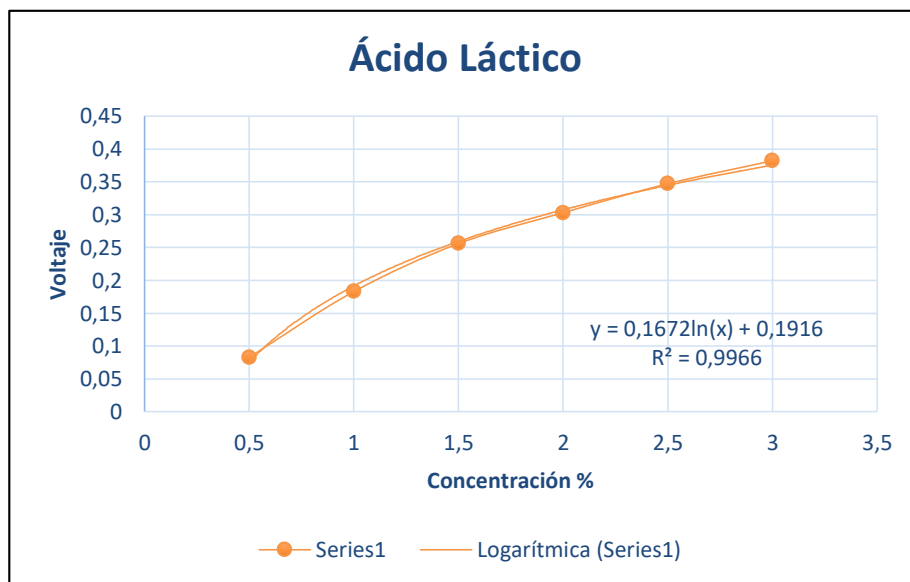


Figura 28 Curva de Calibración del ácido láctico.

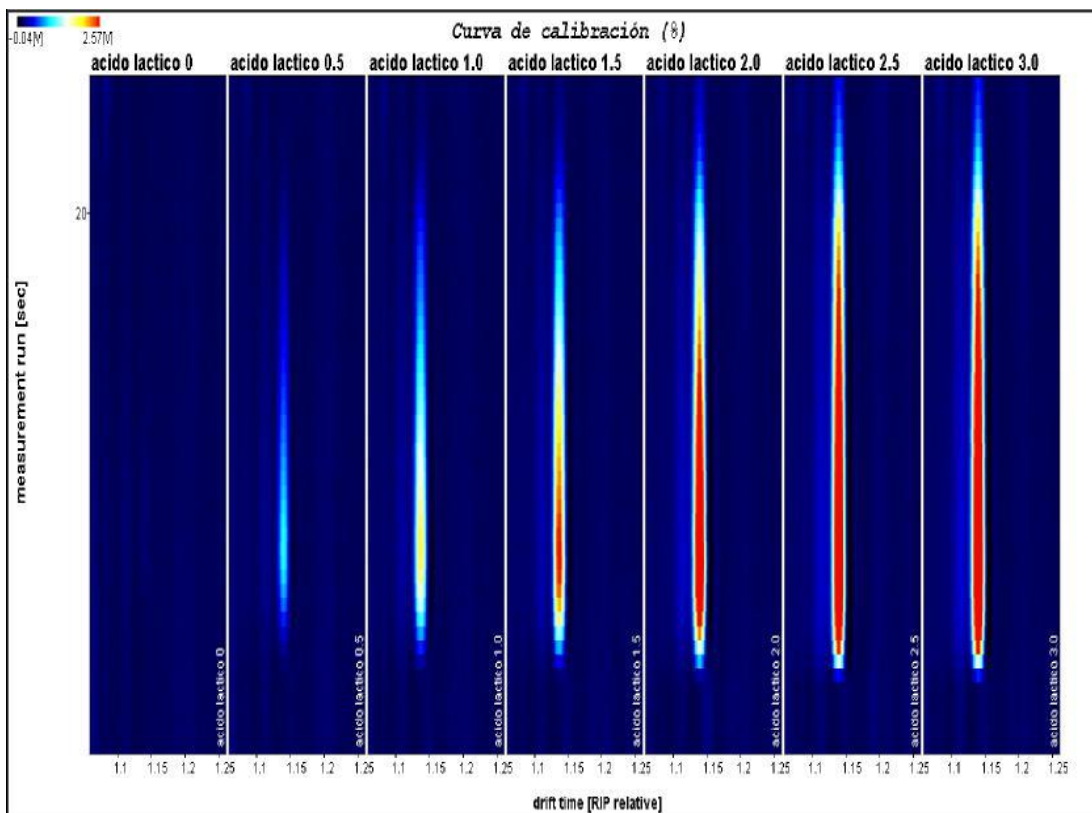


Figura 29 Señales para la curva de calibración del ácido láctico.

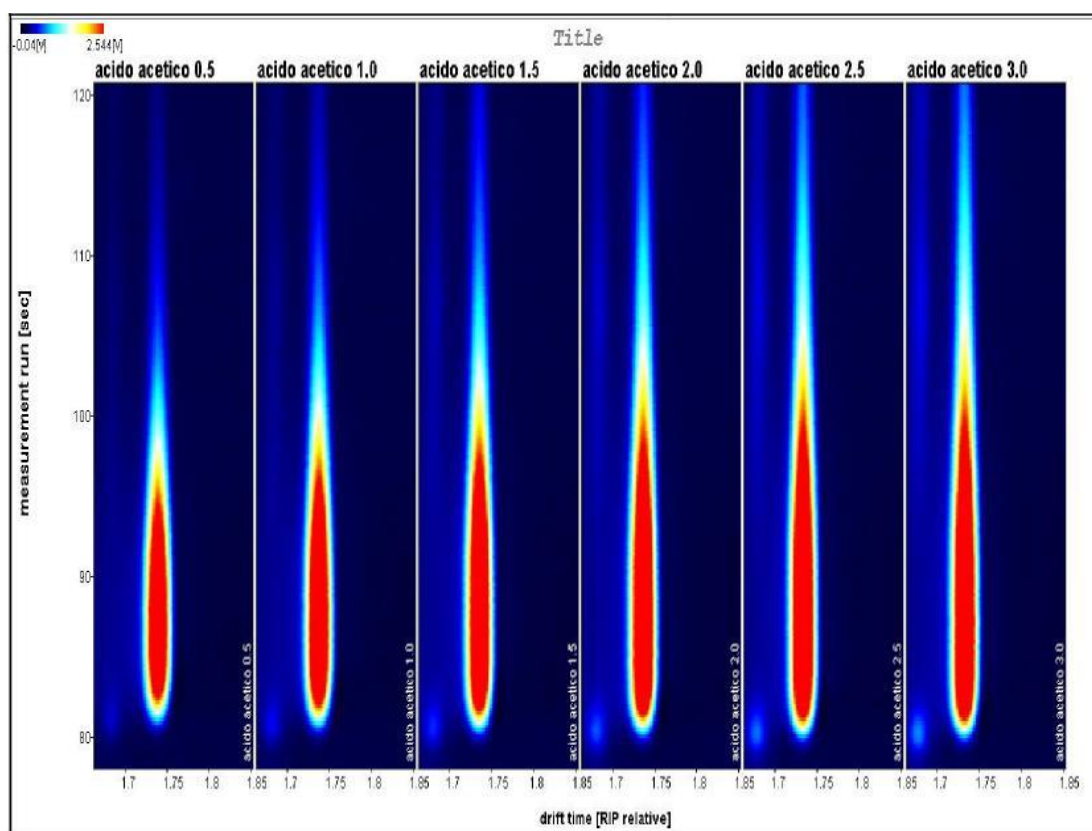


Figura 30 Señales para la curva de calibración del ácido acético.

Para poder determinar el rendimiento, el equipo GC-IMS Flavour Spec nos proporciona los datos de voltaje de cada muestra, con el cual podemos calcular las concentraciones para cada ácido orgánico usando la ecuación de la curva de calibración respectiva. En las Tablas 14,15 se muestran los valores para el ácido láctico, mientras que en las Tablas 16,17 para el ácido acético.

Tabla 14.
Rendimiento de los experimentos con alga para el ácido láctico.

Tratamiento Alga	Voltaje ácido láctico	Concentración del ácido láctico (%)	Rendimiento (ml ácido láctico/ml sol)
GO1	0,427	4,085	13,615
GO2	0,406	3,599	11,996
GO3	0,454	4,794	15,98
GO4	0,458	4,930	16,434
GO5	0,422	3,975	13,251
GO6	0,460	4,979	16,596
GO7	0,392	3,319	11,064
GO8	0,456	4,857	16,189
GO9	0,472	5,365	17,884
GO10	0,475	5,456	18,188
GO11	0,487	5,869	19,563
GO12	0,465	5,134	17,114
GO13	0,378	3,049	10,163
GO14	0,466	5,162	17,207
GO15	0,450	4,692	15,639
GO16	0,416	3,829	12,764
GO17	0,462	5,030	16,765
GO18	0,415	3,794	12,648
GO19	0,395	3,375	11,249
GO20	0,458	4,931	16,438
GO21	0,404	3,571	11,903
GO22	0,442	4,483	14,943
GO23	0,416	3,826	12,753
GO24	0,435	4,289	14,295
GO25	0,461	5,008	16,692
GO26	0,459	4,940	16,467
GO27	0,467	5,196	17,319

Tabla 15.
Rendimiento de los experimentos con alginato de sodio para el ácido láctico.

Tratamiento Alginato	Voltaje ácido láctico	Concentración del ácido láctico (%)	Rendimiento (ml ácido láctico/ml sol)
G1	0,519	7,085	23,615
G2	0,507	6,599	21,996
G3	0,535	7,794	25,98
G4	0,542	8,108	27,025
G5	0,516	6,975	23,251
G6	0,543	8,156	27,187
G7	0,483	5,719	19,064
G8	0,536	7,857	26,189
G9	0,550	8,543	28,475
G10	0,552	8,634	28,779
G11	0,560	9,046	30,154
G12	0,546	8,312	27,705
G13	0,475	5,449	18,163
G14	0,546	8,339	27,798
G15	0,533	7,692	25,639
G16	0,513	6,829	22,764
G17	0,544	8,207	27,356
G18	0,512	6,794	22,648
G19	0,501	6,375	21,249
G20	0,542	8,109	27,029
G21	0,506	6,571	21,903
G22	0,528	7,483	24,943
G23	0,513	6,826	22,753
G24	0,524	7,289	24,295
G25	0,543	8,185	27,283
G26	0,542	8,117	27,058
G27	0,547	8,373	27,91

Tabla 16.
Rendimiento de los experimentos con alga para el ácido acético.

Tratamiento Alga	Voltaje ácido láctico	Concentración del ácido acético (%)	Rendimiento (ml ácido acético/ml sol)
GO1	0,319	0,656	1,987
GO2	0,239	0,231	0,700
GO3	0,354	1,022	3,098

CONTINÚA
 →

GO4	0,373	1,312	3,976
GO5	0,304	0,537	1,626
GO6	0,289	0,442	1,338
GO7	0,275	0,369	1,119
GO8	0,265	0,324	0,983
GO9	0,375	1,36	4,122
GO10	0,32	0,661	2,002
GO11	0,383	1,498	4,539
GO12	0,376	1,367	4,142
GO13	0,319	0,655	1,986
GO14	0,27	0,348	1,054
GO15	0,32	0,658	1,995
GO16	0,274	0,365	1,107
GO17	0,299	0,505	1,53
GO18	0,263	0,315	0,955
GO19	0,218	0,176	0,532
GO20	0,32	0,659	1,997
GO21	0,276	0,373	1,129
GO22	0,276	0,374	1,134
GO23	0,239	0,231	0,699
GO24	0,24	0,234	0,708
GO25	0,25	0,266	0,806
GO26	0,381	1,459	4,42
GO27	0,357	1,073	3,25

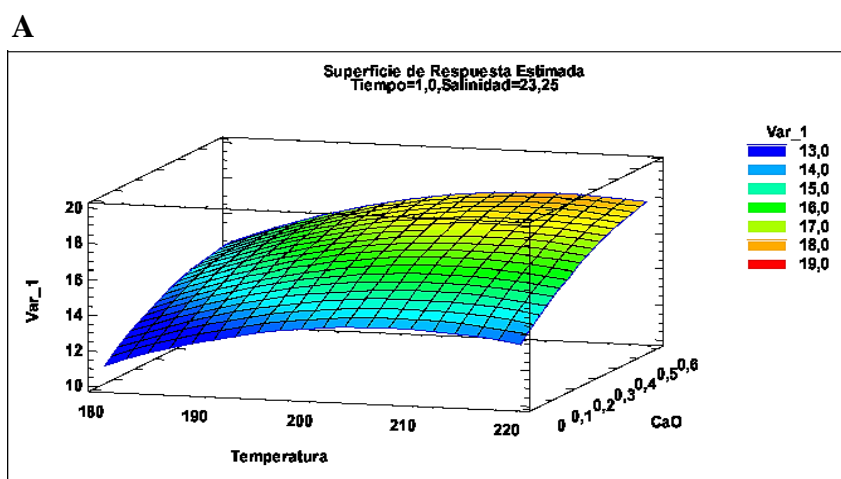
Tabla 17.
Rendimiento de los experimentos con alginato de sodio para el ácido acético.

Tratamiento Alginato	Voltaje ácido láctico	Concentración del ácido acético (%)	Rendimiento (ml ácido acético/ml sol)
G1	0,326	0,714	2,164
G2	0,266	0,326	0,988
G3	0,364	1,177	3,567
G4	0,385	1,534	4,649
G5	0,335	0,804	2,437
G6	0,301	0,516	1,564
G7	0,298	0,496	1,504

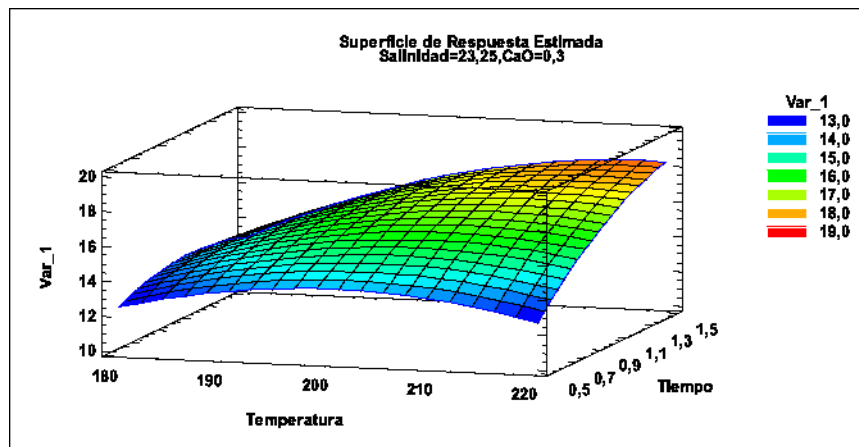
CONTINÚA →

G8	0,268	0,338	1,023
G9	0,383	1,497	4,536
G10	0,332	0,772	2,339
G11	0,403	1,938	5,872
G12	0,388	1,598	4,841
G13	0,333	0,784	2,376
G14	0,289	0,443	1,342
G15	0,332	0,777	2,356
G16	0,29	0,448	1,359
G17	0,31	0,58	1,758
G18	0,275	0,368	1,116
G19	0,265	0,325	0,986
G20	0,331	0,766	2,321
G21	0,3	0,509	1,543
G22	0,301	0,516	1,563
G23	0,265	0,326	0,987
G24	0,262	0,312	0,945
G25	0,266	0,329	0,997
G26	0,393	1,704	5,165
G27	0,369	1,242	3,765

La metodología de Superficie de Respuesta nos permite generar gráficas que nos permiten observar cómo está siendo afectada nuestra variable respuesta, en este caso en particular, el rendimiento. En cuanto se van cambiando los valores de las variables involucradas (Temperatura, Cantidad de CaO, Salinidad y tiempo). Es decir estas graficas nos ofrecen un análisis visual de la influencia de nuestros factores o variables hacia nuestra variable respuesta. Para esta investigación tenemos cuatro factores en cada diseño, se eligen dos para graficarlos, uno en cada eje, mientras que los dos restantes ocupan sus valores medios.



B



C

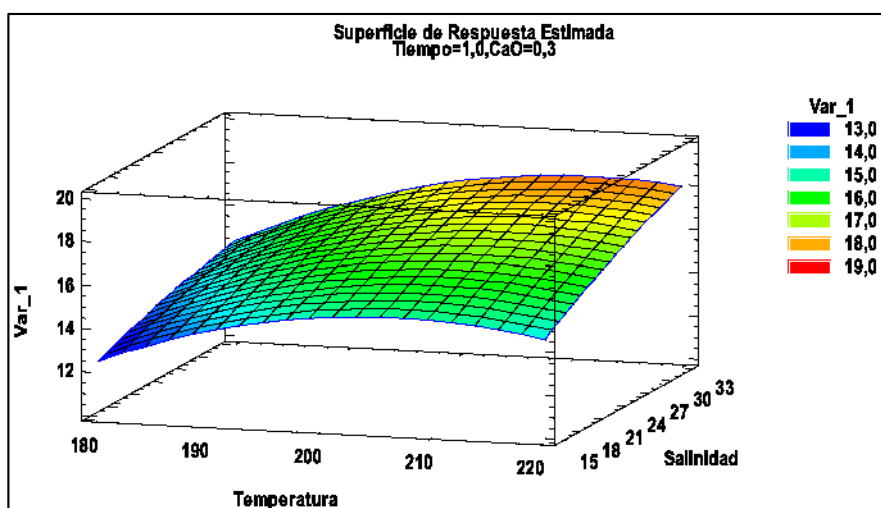


Figura 31 Graficas de Superficie de Respuesta para el ácido láctico a partir del alga parda.

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Rendimiento (Var_1) para cada uno de los efectos, entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 7 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%. El estadístico R-Cuadrado indica que el modelo, así ajustado, explica 92,2281% de la variabilidad en Rendimiento. El estadístico R-cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 83,1608%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 1,03135. El error medio absoluto (MAE) de 0,545926 es el valor promedio de los residuos. El

estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Tabla 18.
Tabla de análisis ANOVA para producción de ácido láctico a partir de alga parda.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	16,1101	1	16,1101	15,15	0,0021
B:Tiempo	27,5791	1	27,5791	25,93	0,0003
C:Salinidad	25,4596	1	25,4596	23,94	0,0004
D:CaO	45,876	1	45,876	43,13	0,0000
AA	9,55987	1	9,55987	8,99	0,0111
AB	6,79906	1	6,79906	6,39	0,0265
AC	0,5929	1	0,5929	0,56	0,4697
AD	0,567762	1	0,567762	0,53	0,4790
BB	4,91093	1	4,91093	4,62	0,0528
BC	2,58888	1	2,58888	2,43	0,1447
BD	1,83467	1	1,83467	1,72	0,2136
CC	0,0748393	1	0,0748393	0,07	0,7953
CD	10,8011	1	10,8011	10,15	0,0078
DD	3,65167	1	3,65167	3,43	0,0886
Error total	12,7642	12	1,06368		
Total (corr.)	164,235	26			

R-cuadrada = 92,2281 por ciento
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 83,1608 por ciento
Error estándar del est. = 1,03135
Error absoluto medio = 0,545926
Estadístico Durbin-Watson = 1,66355 (P=0,1396)
Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,145419

Fuente: Statgraphics

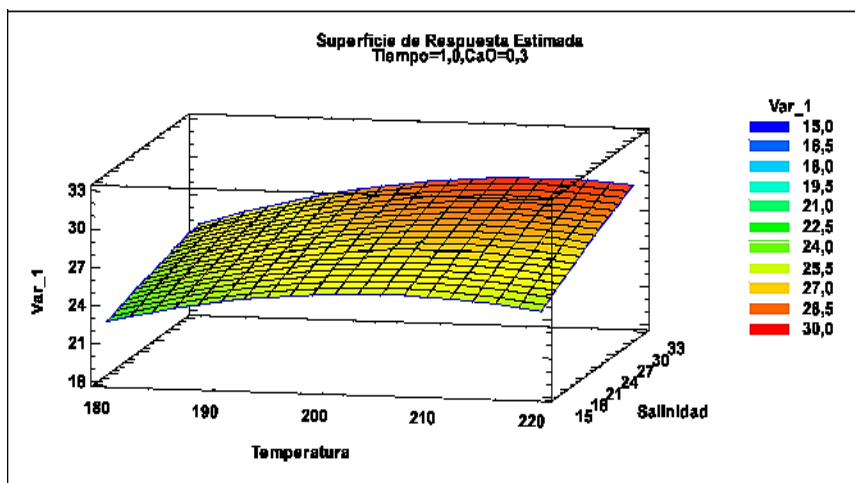
La Tabla 19 muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza el Rendimiento. Conjuntamente con la gráfica de superficie (Temperatura vs tiempo) de la Figura 31 se determina un valor óptimo de rendimiento (19,3684) a 213,416 °C, 1,49909 h, 15 ppt de Salinidad y 0,599936 g de CaO.

Tabla 19.
Tabla de optimización para producción de ácido láctico a partir de alga.

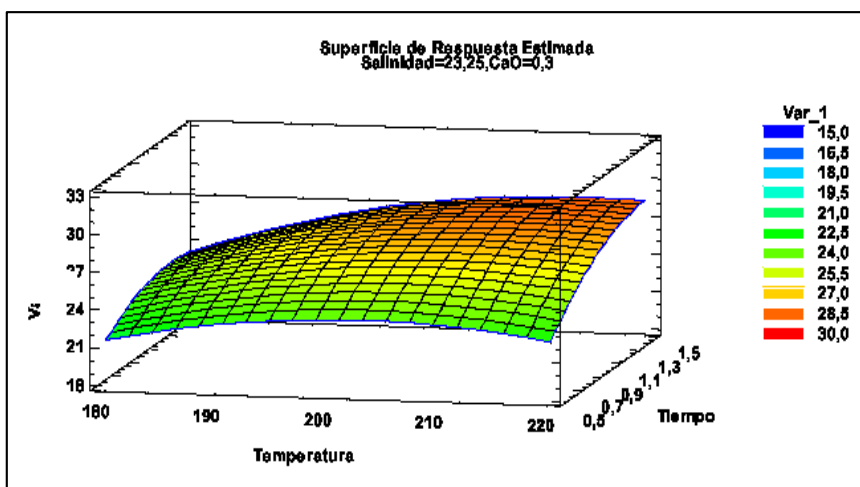
<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	180,0	220,0	213,416
Tiempo	0,5	1,5	1,49909
Salinidad	15,0	31,5	15,0
CaO	0,0	0,6	0,599936

Fuente: Statgraphics

A



B



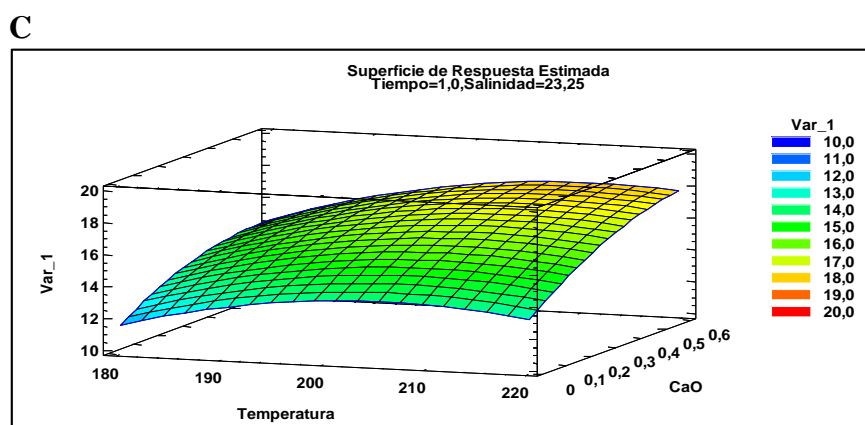


Figura 32 Graficas de Superficie de Respuesta para el ácido láctico a partir de alginato de sodio.

La Tabla 20 (ANOVA) también particiona la variabilidad de Rendimiento (Var_1) para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 7 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 88,7801% de la variabilidad en Rendimiento. El estadístico R-cuadrada ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 75,6903%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 1,50626. El error medio absoluto (MAE) de 0,819222 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Tabla 20.
Tabla de análisis ANOVA para producción de ácido láctico a partir de alginato de sodio.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	26,0397	1	26,0397	11,48	0,0054
B:Tiempo	43,2554	1	43,2554	19,07	0,0009

CONTINÚA →

C:Salinidad	30,8866	1	30,8866	13,61	0,0031
D:CaO	61,8166	1	61,8166	27,25	0,0002
AA	15,7354	1	15,7354	6,94	0,0218
AB	3,62141	1	3,62141	1,60	0,2304
AC	1,13529	1	1,13529	0,50	0,4928
AD	1,1004	1	1,1004	0,49	0,4994
BB	11,0694	1	11,0694	4,88	0,0474
BC	2,58888	1	2,58888	1,14	0,3064
BD	5,54367	1	5,54367	2,44	0,1440
CC	0,0528456	1	0,0528456	0,02	0,8812
CD	15,035	1	15,035	6,63	0,0244
DD	5,97606	1	5,97606	2,63	0,1306
Error total	27,2259	12	2,26882		
Total (corr.)	242,658	26			

R-cuadrada = 88,7801 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 75,6903 por ciento

Error estándar del est. = 1,50626

Error absoluto medio = 0,819222

Estadístico Durbin-Watson = 1,65346 (P=0,1329)

Fuente: Statgraphics

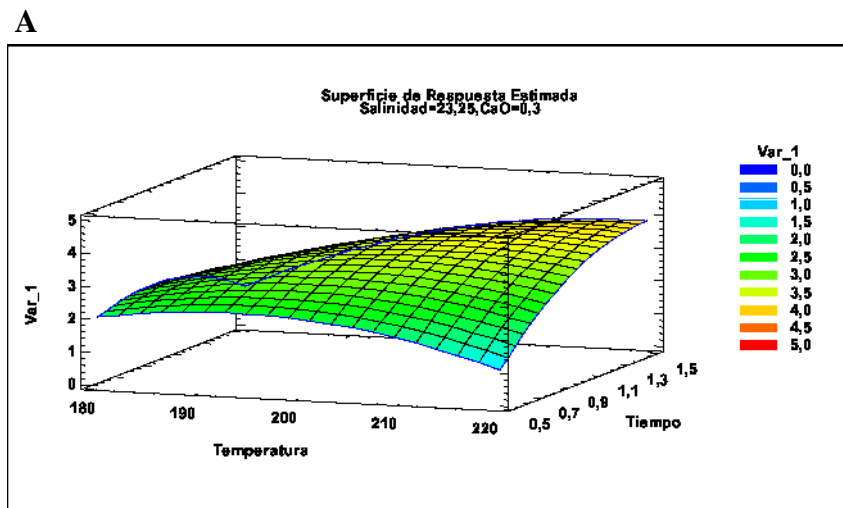
La Tabla 21 muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza el Rendimiento. Conjuntamente con la gráfica de superficie (Temperatura vs Salinidad) de la Figura 32 se determina un valor óptimo de rendimiento (29,6475) a 215,162 °C, 1,3169 h, 31,5 ppt de Salinidad y 0,29736 g de CaO.

Tabla 21.

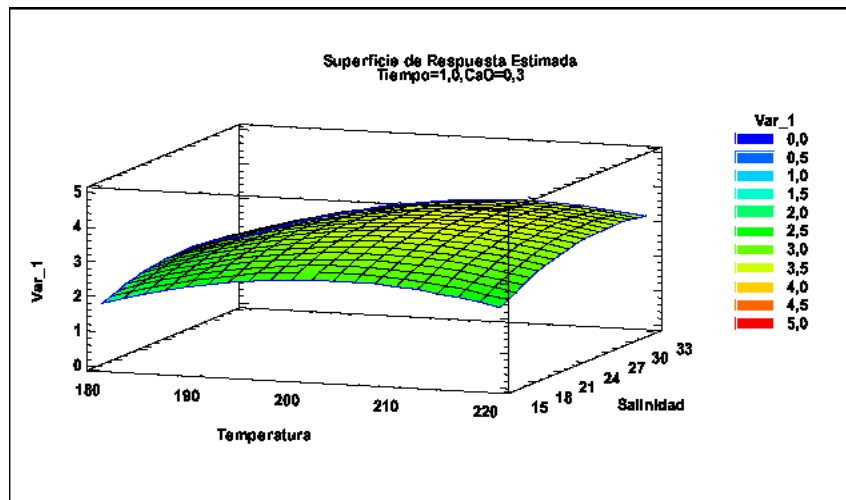
Tabla de optimización para producción de ácido láctico a partir de alginato de sodio.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	180,0	220,0	215,162
Tiempo	0,5	1,5	1,3169
Salinidad	15,0	31,5	31,5
CaO	0,0	0,6	0,29736

Fuente: Statgraphics



B



C

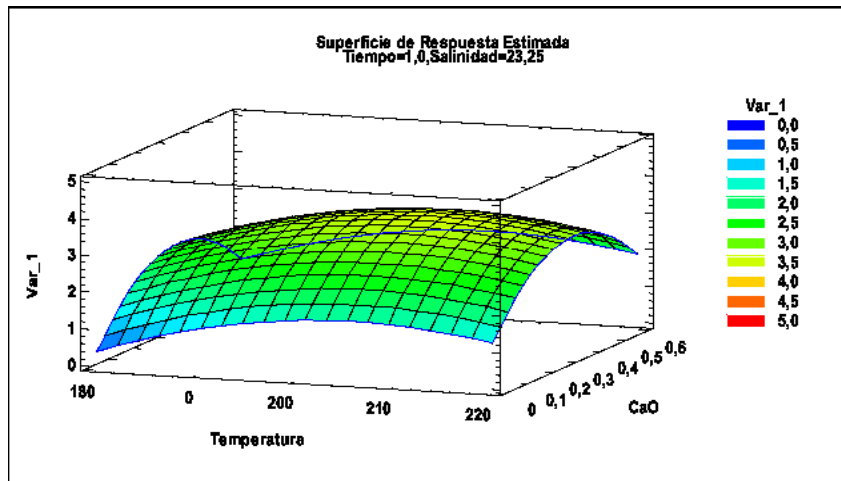


Figura 33 Graficas de Superficie de Respuesta para el ácido acético a partir de alga parda.

La Tabla 22 (ANOVA) particiona la variabilidad de Var_1 (Rendimiento) para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 1 efecto tiene un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 22.
Tabla de análisis ANOVA para producción de ácido acético a partir de alga parda.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	1,98128	1	1,98128	1,61	0,2284
B:Tiempo	3,13345	1	3,13345	2,55	0,1364
C:Salinidad	1,31341	1	1,31341	1,07	0,3217
D:CaO	1,70404	1	1,70404	1,39	0,2619
AA	2,89854	1	2,89854	2,36	0,1506
AB	3,2328	1	3,2328	2,63	0,1309
AC	0,109892	1	0,109892	0,09	0,7701
AD	0,00156025	1	0,00156025	0,00	0,9722
BB	2,50954	1	2,50954	2,04	0,1786
BC	0,938961	1	0,938961	0,76	0,3994
BD	0,765625	1	0,765625	0,62	0,4454
CC	0,764907	1	0,764907	0,62	0,4456
CD	1,61417	1	1,61417	1,31	0,2742
DD	13,3429	1	13,3429	10,85	0,0064
Error total	14,7557	12	1,22964		
Total (corr.)	43,5599	26			

R-cuadrada = 66,1255 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 26,6053 por ciento

Error estándar del est. = 1,10889

Error absoluto medio = 0,624728

Estadístico Durbin-Watson = 1,81744 (P=0,2668)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,050367

Fuente: Statgraphics

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 66,1255% de la variabilidad en Var_1. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 26,6053%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 1,10889. El error medio absoluto (MAE) de 0,624728 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

La Tabla 23 muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza el Rendimiento. Conjuntamente con la gráfica de superficie (Temperatura

vs Tiempo) de la Figura 33 se determina un valor óptimo de rendimiento (3,96) a 219,895 °C, 1,49974 h, 31,5 ppt de Salinidad y 0,315114 g de CaO.

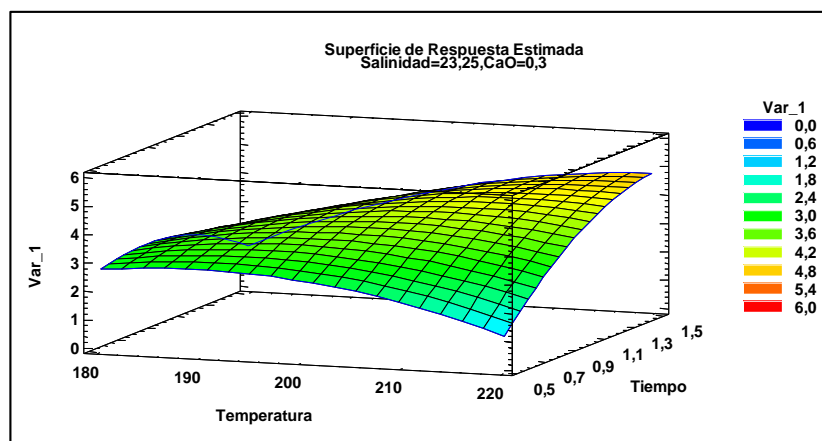
Tabla 23.

Tabla de optimización para producción de ácido acético a partir de alga parda.

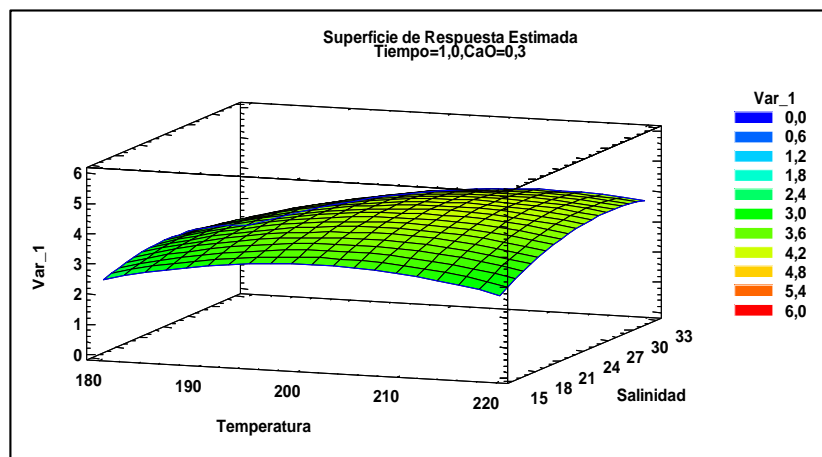
<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	180,0	220,0	219,895
Tiempo	0,5	1,5	1,49974
Salinidad	15,0	31,5	31,5
CaO	0,0	0,6	0,315114

Fuente: Statgraphics

A



B



C

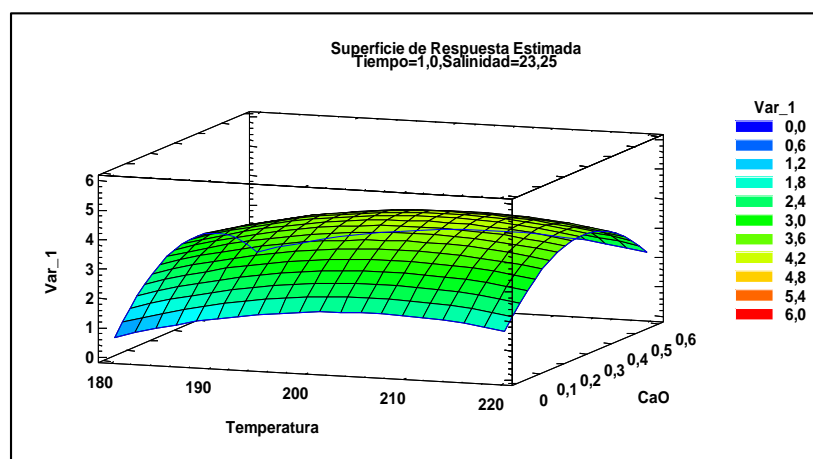


Figura 34 Graficas de Superficie de Respuesta para el ácido acético a partir de alginato de sodio.

La Tabla 24 (ANOVA) particiona la variabilidad de Rendimiento para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 1 efecto tiene una valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 24.
Tabla de análisis ANOVA para producción de ácido acético a partir de alginato de sodio.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	2,15477	1	2,15477	1,30	0,2759
B:Tiempo	4,52027	1	4,52027	2,73	0,1241
C:Salinidad	0,894894	1	0,894894	0,54	0,4760
D:CaO	1,69576	1	1,69576	1,03	0,3311
AA	3,05458	1	3,05458	1,85	0,1990
AB	6,00495	1	6,00495	3,63	0,0809
AC	0,385641	1	0,385641	0,23	0,6378
AD	0,0121	1	0,0121	0,01	0,9332
BB	2,91692	1	2,91692	1,76	0,2088
BC	1,51782	1	1,51782	0,92	0,3569
BD	1,01204	1	1,01204	0,61	0,4491
CC	1,14721	1	1,14721	0,69	0,4211
CD	1,89475	1	1,89475	1,15	0,3054
DD	17,3288	1	17,3288	10,48	0,0071

R-cuadrada = 65,6339 porciento

CONTINÚA



Error total	19,838	12	1,65316	
Total (corr.)	57,7254	26		

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 25,5401 por ciento

Error estándar del est. = 1,28575

Error absoluto medio = 0,736099

Estadístico Durbin-Watson = 1,77005 (P=0,2226)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,0726533

Fuente: Statgraphics

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 65,6339% de la variabilidad en Rendimiento (Var_1). El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 25,5401%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 1,28575. El error medio absoluto (MAE) de 0,736099 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

La Tabla 25 muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza el Rendimiento. Conjuntamente con la gráfica de superficie (Temperatura vs Tiempo) de la Figura 34 se determina un valor óptimo de rendimiento (4,975) a 220 °C, 1,5 h, 31,5 ppt de Salinidad y 0,298809 g de CaO.

Tabla 25.

Tabla de optimización para producción de ácido acético a partir de alginato de sodio.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	180,0	220,0	220,0
Tiempo	0,5	1,5	1,5
Salinidad	15,0	31,5	31,5
CaO	0,0	0,6	0,298809

Fuente: Statgraphics

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Las variaciones realizadas del método de extracción de Mazumder, para este caso en particular, permiten demostrar que sin la adición de Na_2CO_3 al proceso no se llegara a obtener alginato de sodio.
- Para este trabajo el valor del mejor rendimiento fue de 27,34% (Experimento 9) en agua de mar al 100% con la misma temperatura y concentración de Na_2CO_3 . En investigaciones posteriores (Robalino, 2017), con el mismo sistema de extracción y a las mismas condiciones de concentración se obtuvo 26,55% de rendimiento de alginato de sodio, siendo el mejor. El desarrollar la extracción de alginato en agua de mar aumenta ligeramente el rendimiento
- Se puede reemplazar el agua dulce convencional por agua de mar para realizar la extracción de alginato de las algas pardas. De modo que se pueda preservar el agua y contribuir al cuidado del planeta.
- Es posible la producción de ácidos orgánicos a partir de algas pardas marinas y alginato de sodio en agua de mar empleando tratamiento hidrotermal (microondas). Cabe mencionar que el mayor rendimiento obtenido en el estudio para ácido láctico y acético fue del 30,54% y 5,872% comparado con el de (Jeon, 2016) el cual obtuvo 12,59% y 1,08% respectivamente.
- Mediante las diferentes técnicas analíticas para cada uno de los casos de estudio, se logró identificar y caracterizar a los productos de interés para el presente estudio (alginato de sodio, ácidos orgánicos).

5.2. Recomendaciones

- Es recomendable emplear agua de mar sometida a algún proceso de purificación para eliminar sobre todo sólidos que puedan afectar al estado final de los extractos.
- Tratar en lo posible de que el sistema de extracción de polisacáridos sea lo más adiabático posible, para que la temperatura se mantenga constante.
- Proseguir con un estudio en el cual se puedan identificar otros ácidos orgánicos que por bibliografía si se obtienen (Jeon, 2016); (fórmico, glicólico, etc.).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aida, T. M., Yamagata, T., Abe, C., Kawanami, H., Watanabe, M., & Smith, R. L. (2012). Production of organic acids from alginate in high temperature water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 65, 39-44. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.02.021>
- Andrade, L. R., Salgado, L. T., Farina, M., Pereira, M. S., Mourão, P. A. S., & Amado Filho, G. M. (2004). Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae. *Journal of structural biology*, 145(3), 216-225. doi: 10.1016/j.jsb.2003.11.011
- Avendaño-Romero, G., López-Malo, A., & Paolu, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 87-96.
- Awad, N. E., Motawe, H. M., Selim, M. A., & Matloub, A. A. (2009). Antitumorigenic polysaccharides isolated from the brown algae, *Padina pavonia* (L.) Gaill. and *Hydroclathrus clathratus* (C. Agardh) Howe. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol*, 3, 6-11.
- Bicker, M., Endres, S., Ott, L., & Vogel, H. (2005). Catalytical conversion of carbohydrates in subcritical water: A new chemical process for lactic acid production. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 239(1), 151-157.
- Bilan, M. I., Grachev, A. A., Ustuzhanina, N. E., Shashkov, A. S., Nifantiev, N. E., & Usov, A. I. (2002). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. *Carbohydrate Research*, 337(8), 719-730.
- Bold, H. C., & Wynne, M. (1985). "Introduction to the algae: Structure and reproduction". I. Prentice-Hall (Ed.) (pp. 516).
- Cacuango, R., & Javier, M. (2017). Extracción y caracterización de alginatos derivados de algas pardas, para la producción de ácido láctico (Bachelor's thesis, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Extensión Latacunga. Carrera de Ingeniería en Petroquímica.).
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., & Trussell, R. (1996). Standard methods for the examination of water and wastewater. *APHA, AWWA and WPCF, Washington DC*.
- Contreras, H. J., Trujillo, H. A., Arias, G., Pérez, J. L., & Delgado, E. (2010). Espectroscopía ATR-FTIR de celulosa: aspecto instrumental y tratamiento matemático de espectros. *e-Gnosis*, 8.
- Cheung, H., Tanke, R. S., & Torrence, G. P. Acetic acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.

- Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water research*, 37(18), 4311-4330. doi: 10.1016/s0043-1354(03)00293-8
- Díaz, A. (2009). *Diseño estadístico de experimentos 2a Ed*: Universidad de Antioquia.
- El Atouani, S., Bentiss, F., Reani, A., Zrid, R., Belattmania, Z., Pereira, L., . . . Sabour, B. (2016). The invasive brown seaweed *Sargassum muticum* as new resource for alginate in Morocco: Spectroscopic and rheological characterization. *Phycological Research*, 64(3), 185-193.
- Fenoradosoa, T. A., Ali, G., Delattre, C., Laroche, C., Petit, E., Wadouachi, A., & Michaud, P. (2010). Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* Grunow. *Journal of Applied Phycology*, 22(2), 131-137.
- Garza Villegas, J. B. (2013). Aplicación de diseño de experimentos para el análisis de secado de un producto (Experiment design application for analysis of the drying a product). *Innovaciones de negocios*, 10(19), 145-158.
- Girisuta, B., Janssen, L., & Heeres, H. (2006). Green chemicals: A kinetic study on the conversion of glucose to levulinic acid. *Chemical Engineering Research and Design*, 84(5), 339-349.
- Gómez-Ordóñez, E., & Rupérez, P. (2011). FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1514-1520. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.009
- Gómez Ordóñez, E. (2012). Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios "in vitro" e "in vivo".
- González, E., Ahumada, R., Medina, V., Neira, J., & González, U. (2004). Espectrofotometría de absorción atómica con tubo en la llama: aplicación en la determinación total de cadmio, plomo y zinc en aguas frescas, agua de mar y sedimentos marinos. *Quim. Nova*, 27(6), 873-877.
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 315-326. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.011>
- Hahn, T., Lang, S., Ulber, R., & Muffler, K. (2012). Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process biochemistry*, 47(12), 1691-1698.
- Haug, A., Larsen, B., & Smidsrod, O. (1967). Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chem Scand*, 21, 691-704.
- Hernández-Carmona, G., McHugh, D. J., Arvizu-Higuera, D. L., & Rodríguez-montesinos, Y. E. (1998). Pilot plant scale extraction of alginate from *Macrocystis pyrifera*. 1. Effect of pre-extraction treatments on yield and quality of alginate. *Journal of Applied Phycology*, 10(6), 507-513.

- Hernández-Carmona, G., McHugh, D. J., & López-Gutiérrez, F. (1999). Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera*. 2. Studies on extraction conditions and methods of separating the alkaline-insoluble residue. *Journal of Applied Phycology*, 11(6), 493-502.
- Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., Álvarez, R. M., Fernández, A. H., & Kretzer, M. S. (1999). *Métodos espectroscópicos en química orgánica: Síntesis*.
- Jang, S.-S., Shirai, Y., Uchida, M., & Wakisaka, M. (2012). Production of mono sugar from acid hydrolysis of seaweed. *African Journal of Biotechnology*, 11(8), 1953-1963.
- Jeon, W., Ban, C., Park, G., Kim, J. E., Woo, H. C., & Kim, D. H. (2016). Catalytic Conversion of Macroalgae-derived Alginate to Useful Chemicals. *Catalysis Surveys from Asia*, 20(4), 195-209. doi: 10.1007/s10563-016-9218-6
- Jeon, W., Ban, C., Park, G., Woo, H. C., & Kim, D. H. (2016). Hydrothermal conversion of macroalgae-derived alginate to lactic acid catalyzed by metal oxides. *Catalysis Science & Technology*, 6(4), 1146-1156.
- Jeon, W., Ban, C., Park, G., Yu, T.-K., Suh, J.-Y., Woo, H. C., & Kim, D. H. (2015). Catalytic hydrothermal conversion of macroalgae-derived alginate: effect of pH on production of furfural and valuable organic acids under subcritical water conditions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 399, 106-113. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcata.2015.01.011>
- Jin, F., Zhou, Z., Kishita, A., Enomoto, H., Kishida, H., & Moriya, T. (2007). A New Hydrothermal Process for Producing Acetic Acid from Biomass Waste. *Chemical Engineering Research and Design*, 85(2), 201-206. doi: <https://doi.org/10.1205/cherd06020>
- Jin, F., Zhou, Z., Moriya, T., Kishida, H., Higashijima, H., & Enomoto, H. (2005). Controlling hydrothermal reaction pathways to improve acetic acid production from carbohydrate biomass. *Environmental science & technology*, 39(6), 1893-1902.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2007). Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(3), 524-534.
- Karmakar, P., Ghosh, T., Sinha, S., Saha, S., Mandal, P., Ghosal, P. K., & Ray, B. (2009). Polysaccharides from the brown seaweed *Padina tetrastrum*: Characterization of a sulfated fucan. *Carbohydrate Polymers*, 78(3), 416-421.
- Kloareg, B., Demarty, M., & Mabeau, S. (1986). Polyanionic characteristics of purified sulphated homofucans from brown algae. *International Journal of Biological Macromolecules*, 8(6), 380-386. doi: [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(86\)90060-7](https://doi.org/10.1016/0141-8130(86)90060-7)
- Koyama, T., & Thompson, T. G. (1964). Identification and determination of organic acids in sea water by partition chromatography. *Journal of the*

Oceanographical Society of Japan, 20(5), 209-220.

- Kusaykin, M., Bakunina, I., Sova, V., Ermakova, S., Kuznetsova, T., Besednova, N., . . . Zvyagintseva, T. (2008). Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. *Biotechnology journal*, 3(7), 904-915.
- Kylin, H. (1913). Zur Biochemie der Meeresalgen. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 83(3), 171-197.
- Lache-García, A., Meléndez-Correa, L., Orrego, J., Mejía-Ospino, E., Pachón, Z., & Cabanzo, R. (2011). Predicción del Análisis SARA de Crudos Colombianos por Métodos Quimiométricos Utilizando Espectroscopia Infrarroja-ATR. *Revista Colombiana de Física*, 43(3), 643-647.
- León, J. L. A. (2015). *Extracción y caracterización del alginato de sodio procedente del alga parda *Macrocystis* sp.* Pontificia Universidad Católica del Perú, Facultad de Ciencias e Ingeniería. Mención: Química.
- Llanos Fernández, K. K., Bajaaná, T., Jesenia, A., & Chávez Alcívar, M. D. (2015). *Estudio de la actividad antibacteriana de diferentes ácidos orgánicos sobre distintas bacterias Gram negativas de importancia en la industria acuícola.*
- Madhavan Nampoothiri, K., Nair, N. R., & John, R. P. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*, 101(22), 8493-8501. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.092>
- Mao, W., Li, B., Gu, Q., Fang, Y., & Xing, H. (2004). Preliminary studies on the chemical characterization and antihyperlipidemic activity of Polysaccharide from the brown alga *Sargassum fusiforme*. *Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges*, 263-266.
- Martins, A. F., Bueno, P. V., Almeida, E. A., Rodrigues, F. H., Rubira, A. F., & Muniz, E. C. (2013). Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 174-184.
- Mathlouthi, M., & Koenig, J. L. (1987). Vibrational spectra of carbohydrates. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 44, 7-89.
- Matsuhiro, B. (1996). *Vibrational spectroscopy of seaweed galactans*. Paper presented at the Fifteenth International Seaweed Symposium.
- Mazumder, A., Holdt, S. L., De Francisci, D., Alvarado-Morales, M., Mishra, H., & Angelidaki, I. (2016). Extraction of alginate from *Sargassum muticum*: process optimization and study of its functional activities. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3625-3634.
- McHugh, D. J. (1987). Production, properties and uses of alginates. *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. FAO. Fish. Tech. Pap*, 288, 58-115.

- Mian, A. J., & Percival, E. (1973). Carbohydrates of the brown seaweeds *himanthalia lorea*, *bifurcaria bifurcata*, and *Padina pavonia*: Part I. extraction and fractionation. *Carbohydrate Research*, 26(1), 133-146. doi: [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85030-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85030-2)
- Millero, F. J., Feistel, R., Wright, D. G., & McDougall, T. J. (2008). The composition of Standard Seawater and the definition of the Reference-Composition Salinity Scale. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 55(1), 50-72. doi: 10.1016/j.dsr.2007.10.001
- Minitab, I. (2000). MINITAB statistical software. *Minitab Release*, 13.
- Möller, M., Nilges, P., Harnisch, F., & Schröder, U. (2011). Subcritical water as reaction environment: fundamentals of hydrothermal biomass transformation. *ChemSusChem*, 4(5), 566-579.
- Montgomery, D. (2004). Diseño y análisis de experimentos. *Limusa Wiley, Segunda Edición, México*.
- Munilla, M. H., & Carracedo, G. B. (2005). Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 39(1), 49-59.
- Muñoz Ochoa, M. (2006). *Extracción y caracterización de polisacáridos con actividad anticoagulante a partir de algas colectadas en Baja California Sur, México*. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Naja, G. M., Murphy, V., & Volesky, B. (2010). Biosorption, metals. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*.
- Ng, W.-K., Koh, C.-B., Sudesh, K., & Siti-Zahrah, A. (2009). Organic acids potential replacement for antibiotic treatments of tilapia. *Global aquaculture advocate*.
- Ordóñez, E. G. (2012). *Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios "in vitro" e "in vivo"*. Universidad Complutense de Madrid.
- Ozgun, S., Turan, F., Çınar, M. E., Bakir, K., Öztürk, B., Katağan, T., . . . Bakır, B. B. (2015). Biochemical composition of some brown algae from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 21, 125-134.
- Pal, A., Kamthania, M. C., & Kumar, A. (2014). Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds; A Review. *Open Access Library Journal*, 1(4), 1-17. doi: 10.4236/oalib.1100752
- Peranginangin, R., & Saepudin, E. (2016). Purification and characterization of fucoidan from the brown seaweed *Sargassum binderi* Sonder. *Squalen Bulletin*

of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology, 10(2), 79-87.

- Percival, E. (1979). The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycological Journal*, 14(2), 103-117.
- Rabanal Atalaya, M. (2015). *Estudio de los sistemas de polisacáridos del alga parda Dictyota dichotoma y su actividad antiviral*. Facultad de Ciencias Exactas.
- Ramayoni, S., Martín, C., & Calvo Torras, M. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos*: Universitat Autònoma de Barcelona.
- San Andrés, M., Chércoles, R., Gómez, M., & de la Roja, J. M. (2010). Materiales sintéticos utilizados en la manipulación, exposición y almacenamiento de Obras de Arte y Bienes Culturales. Caracterización por espectroscopía FTIR-ATR. *Proceedings X Jornada de Conservación de Arte Contemporáneo (GEIIC), Madrid*, 33-51.
- Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., & Martínez-Cruz, O. (2008). Quantification of organic acids in fermented shrimp waste by HPLC. *Food Technol. Biotechnol*, 46(4), 456-460.
- Sinurat, E., Peranginangin, R., & Saepudin, E. (2016). Purification and Characterization of Fucoidan from the Brown Seaweed *Sargassum binderi* Sonder. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 10(2), 79. doi: 10.15578/squalen.v10i2.133
- Skory, C. D. (2003). Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 30(1), 22-27.
- Soares, J., Santos, J., Chierice, G., & Cavalheiro, E. (2004). Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química*, 29(2), 57-64.
- Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*: John Wiley & Sons.
- Statgraphics Centurion, X. (2009). Statpoint technologies. *INC. version*, 16, 17.
- Strickland, J. D., & Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis.
- Thurman, E. (1985). *Organic Geochemistry of Natural Waters. Developments in Biogeochemistry*. Martinus Nijhoff/Dr W: Junk Publishers, Boston, MA.
- Tripathi, R., & Mishra, B. (2012). Development and evaluation of sodium alginate–polyacrylamide graft–co-polymer-based stomach targeted hydrogels of famotidine. *Aaps Pharmscitech*, 13(4), 1091-1102.
- Troncoso Valenzuela, M. A. (2014). *Caracterización de los polisacáridos presentes en Nothogenia fastigiata (Bory de Saint-Vincent) PG Parkinson Actividad*

biológica y aspectos fisiológicos. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Departamento de Botánica.

- Villela Romanos, M. T., Andrada-Serpa, M. J., Matos dos Santos, M. G., F. Ribeiro, A. C., Yoneshigue-Valentin, Y., Soares Costa, S., & Dutra Wigg, M. (2002). Inhibitory effect of extracts of Brazilian marine algae on human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation in vitro. *Cancer investigation*, 20(1), 46-54.
- Werlinger, C., Alveal, K., & Romo, H. (2004). *Biología marina y oceanografía: conceptos y procesos*: Consejo Nacional del Libro y la Lectura.
- Yabur, R., Bashan, Y., & Hernández-Carmona, G. (2007). Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *Journal of Applied Phycology*, 19(1), 43-53.
- Yaich, H., Garna, H., Bchir, B., Besbes, S., Paquot, M., Richel, A., . . . Attia, H. (2015). Chemical composition and functional properties of dietary fibre extracted by Englyst and Prosky methods from the alga *Ulva lactuca* collected in Tunisia. *Algal Research*, 9, 65-73.
- Zhang, B., von Keitz, M., & Valentas, K. (2008). Thermal effects on hydrothermal biomass liquefaction. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 147(1-3), 143-150.

ANEXOS

ANEXOS

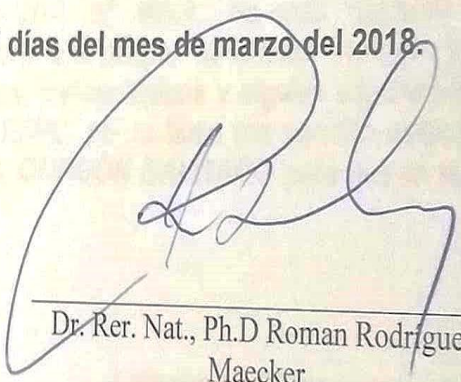


**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA
CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA**

CERTIFICACIÓN

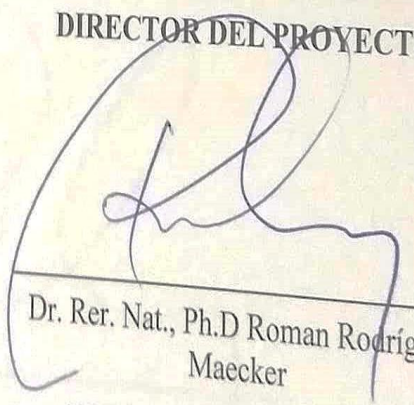
Se certifica que el presente trabajo fue desarrollado por el señor: **JONATAN ISRAEL GORDÓN SALGADO.**

En la ciudad de Latacunga, a los 07 días del mes de marzo del 2018.

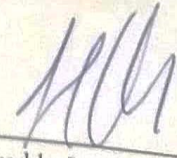

Dr. Rer. Nat., Ph.D Roman Rodríguez
Maecker

DIRECTOR DEL PROYECTO

Aprobado por:


Dr. Rer. Nat., Ph.D Roman Rodríguez
Maecker

DIRECTOR DE CARRERA


Dr. Freddy Jaramillo Checa
SECRETARIO ACADÉMICO

