



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**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: EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
ALGINATOS DERIVADOS DE ALGAS PARDAS, PARA LA  
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.**

**AUTOR: MILTON JAVIER ROBALINO CACUANGO**

**DIRECTOR: ING. EDUARDO VYHMEISTER, PH.D.**

**LATACUNGA**

**2017**

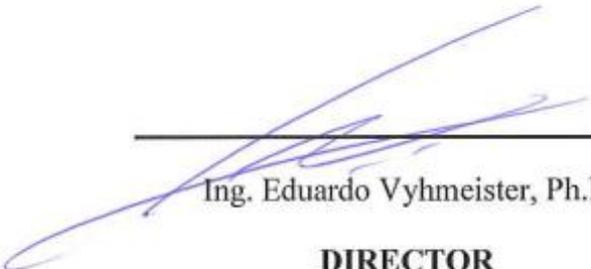


**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA ENERGÍA Y MECÁNICA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN PETROQUÍMICA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, **“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALGINATOS DERIVADOS DE ALGAS PARDAS, PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO”** realizado por **MILTON JAVIER ROBALINO CACUANGO**, 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 **MILTON JAVIER ROBALINO CACUANGO** para que lo sustente públicamente.

Latacunga, junio de 2017



---

Ing. Eduardo Vyhmeister, Ph.D

**DIRECTOR**



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

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, **Milton Javier Robalino Cacuango**, con cedula de ciudadanía N° 1724579345 declaro que el presente proyecto de investigación, **“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALGINATOS DERIVADOS DE ALGAS PARDAS, PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO”** 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, junio de 2017

---

**Milton Javier Robalino Cacuango**

**C.C.: 1724579345**



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

**AUTORIZACIÓN**

Yo, **MILTON JAVIER ROBALINO CACUANGO**, no autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la Biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALGINATOS DERIVADOS DE ALGAS PARDAS, PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Latacunga, junio de 2017

---

**Milton Javier Robalino Cacuango**

**C.C.: 1724579345**

## **DEDICATORIA**

A Dios, a mis padres, a mis hermanos y a mi familia.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por brindarme vida y salud. A mis padres, por ser las personas que siempre están a mi lado brindándome incondicionalmente su amor y comprensión. A mis hermanos por todo el apoyo y cariño.

Un agradecimiento especial para el Dr. Eduardo Vyhmeister y al Dr. Roman Rodríguez, por los conocimientos y el tiempo brindado al desarrollo del presente trabajo.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA .....	i
CERTIFICACIÓN .....	ii
AUTORÍA DE REPSONSALIBILIDAD.....	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE ECUACIONES .....	xvi
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT .....	xviii

## CAPÍTULO I

<b>1. GENERALIDADES .....</b>	<b>1</b>
1.1. Introducción.....	1
1.2. Descripción del problema.....	2
1.3. Propuesta .....	4
1.4. Objetivos.....	5
1.4.1. Objetivo General.....	5
1.4.2. Objetivos Específicos .....	5

## CAPÍTULO II

<b>2.</b>	<b>FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA Y ESTADO DEL ARTE.....</b>	<b>6</b>
2.1.	Fundamentación Teórica .....	6
2.1.1.	Algas Marinas.....	6
2.1.2.	Division Phaeophyta (algas pardas) .....	9
2.1.3.	Fucaceae .....	10
2.1.4.	Laminariaceae.....	11
2.1.5.	Dictyotaceae .....	12
2.1.6.	Algas en el Ecuador.....	13
2.1.7.	Principales polisacáridos en algas pardas.....	15
2.1.8.	Alginatos.....	16
2.1.9.	Laminarina.....	17
2.1.10.	Polisacáridos sulfatados .....	19
2.1.11.	Compuestos fenólicos .....	22
2.1.12.	Estructura y propiedades del Alginato .....	23
2.1.13.	Obtención y producción de Alginato .....	27
2.1.14.	Usos y aplicaciones del Alginato .....	30
2.1.15.	Diseño experimental.....	32
2.1.16.	Selección del diseño experimental.....	34
2.2.	Estado del Arte .....	35

## CAPÍTULO III

<b>3.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>40</b>
3.1.	Materiales y equipos .....	40
3.1.1.	Reactivos .....	40
3.1.2.	Equipos .....	40
3.2.	Métodos .....	41

3.2.1.	Recolección de las algas .....	41
3.2.2.	Tratamiento de muestras.....	42
3.2.3.	Identificación de la especie.....	43
3.2.4.	Metodología de extracción de alginatos .....	43
3.3.	Diseño Experimental .....	45
3.4.	Métodos analíticos.....	48
3.4.1.	Rendimiento .....	48
3.4.2.	Espectroscopia vibracional FT-IR ATR.....	48
3.4.3.	Análisis Termogravimétrico (TGA) .....	50
3.4.4.	Calorimetría Diferencial de Barrido .....	51

#### **CAPÍTULO IV**

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
4.1.	Recolección de Algas .....	52
4.2.	Tratamiento de muestras.....	53
4.3.	Identificación de la especie.....	54
4.4.	Extracción de alginato .....	57
4.5.	Ajuste del modelo matemático y análisis estadístico .....	58
4.6.	Mejoramiento de modelo matemático y definición de las condiciones óptimas de extracción de alginato .....	62
4.7.	Análisis espectroscópico FT-IR ATR.....	73
4.8.	Determinación del radio M/G.....	77
4.9.	Análisis Termogravimétrico (TGA) .....	79
4.10.	Calorimetría Diferencial de Barrido .....	85

## CAPÍTULO V

<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>89</b>
5.1.	Conclusiones.....	89
5.2.	Recomendaciones .....	91
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>92</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>101</b>
<b>Anexo 1-3.</b>	Algas sobre sustrato rocoso y arenoso en la Playa de Puerto Cayo	
<b>Anexo 2-5.</b>	Alga encontrada a las orillas de la playa de Machalilla	
<b>Anexo 3-7.</b>	Alga encontrada a las orillas de la playa de Puerto López	
<b>Anexo 4.</b>	Tamizador analítico (RESTCH gMBh) utilizado para separar el material particulado	
<b>Anexo 5.</b>	Espectrofotómetro FT-IR Frontier (Perkin Elmer), con accesorio de muestreo ATR	
<b>Anexo 6.</b>	Analizador Termogravimétrico Pirys 1 TGA (Perkin Elmer)	
<b>Anexo 7.</b>	Calorímetro Diferencial de Barrido DSC 1 Star® System (Mettler Toledo)	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Sufijos de las categorías taxonómicas para las algas. . . . .	8
<b>Tabla 2.</b>	Lista de algas macroscópicas mejor representadas en el PNM.....	14
<b>Tabla 3.</b>	Principales especies como fuentes de Laminarina.....	18
<b>Tabla 4.</b>	Composición química de algunos fucoïdanes.....	20
<b>Tabla 5.</b>	Algunas especies de algas pardas que presentan actividad anticoagulante. ....	22
<b>Tabla 6.</b>	Algunas aplicaciones biomédicas de células encapsuladas con alginato.....	31
<b>Tabla 7.</b>	Condiciones reportadas en la fase de extracción alcalina, para la obtención de alginatos a partir de algas pardas.....	39
<b>Tabla 8.</b>	Matriz de diseño planteada para el diseño experimental del presente estudio.....	46
<b>Tabla 9.</b>	Variables independientes y sus niveles usados en el diseño de respuesta de superficie del presente estudio .....	47
<b>Tabla 10.</b>	Porcentaje promedio del peso de la muestra del material algal tamizado.....	54
<b>Tabla 11.</b>	Datos experimentales de la extracción para el ajuste del modelo.....	57
<b>Tabla 12.</b>	Comparación de valores reales y estimados para el rendimiento de la extracción.....	60
<b>Tabla 13.</b>	Análisis de ANOVA del modelo RSM -DCCR.....	61
<b>Tabla 14.</b>	Tratamientos propuestos en la nueva área de estudio .....	65
<b>Tabla 15.</b>	Datos experimentales utilizados para el mejoramiento del modelo cuadrático.....	67

<b>Tabla 16.</b>	Análisis de varianza para el modelo polinomial cuadrático mejorado para la extracción de alginato .....	69
<b>Tabla 17.</b>	Condiciones sugeridas para alcanzar el rendimiento óptimo.....	72
<b>Tabla 18.</b>	Asignación de las bandas para los espectros de alginato de sodio.....	73
<b>Tabla 19.</b>	Relación M/G de los extractos de alginato calculados por relación de absorbancias.....	78
<b>Tabla 20.</b>	Resumen del comportamiento térmico bajo atmosfera de nitrógeno de muestras de alginato.....	82
<b>Tabla 21.</b>	Resumen del Análisis Termogravimétrico para alginato de sodio. ....	84
<b>Tabla 22.</b>	Temperaturas y cambios de entalpia en los termogramas DSC recogidos de las muestras de alginato (dos extractos y alginato de referencia). .....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Clasificación de macroalgas bajo el reino Protista, y sub-clasificación de <i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Fucus vesiculosus</i> (fucales) y <i>Laminaria digitata</i> (laminariales). .....	7
<b>Figura 2.</b>	Diagrama del sistema de Kylin (1933). Extraído y adaptado de .....	10
<b>Figura 3.</b>	Apariencia general de las especies: a) <i>Ascophyllum nodosum</i> ( <i>Linnaeus</i> ), b) <i>Fucus vesiculosus</i> ( <i>Linnaeus</i> ) .....	11
<b>Figura 4.</b>	Apariencia general de las especies: a) <i>Saccharina latissima</i> ( <i>Linnaeus</i> ), b) <i>Laminaria digitata</i> ( <i>Hudson</i> ). .....	12
<b>Figura 5.</b>	Apariencia general de la especie <i>Styopodium zonale</i> .....	13
<b>Figura 6.</b>	Estructura de alginato en forma ácida: (a) bloques GGGG; (b) bloques MMMM; (c) bloques GMGM .....	16
<b>Figura 7.</b>	Estructuras químicas de una unidad de cadena M y G de laminarina. ..	18
<b>Figura 8.</b>	Unidades acáridas que pueden ser sulfatadas .....	19
<b>Figura 9.</b>	Unidad repetitiva de fucoidano.....	21
<b>Figura 10.</b>	Datos estructurales de Alginato: a) monómero del alginato (M vs. G); b) conformación molecular del polímero de alginato; c) cadenas secuenciales de unidades M y G. ....	24
<b>Figura 11.</b>	Hidrogeles de alginato preparados por reticulación iónica (Modelo de Caja de Huevo) .....	26
<b>Figura 12.</b>	El modelo caja de huevo para la unión de cationes divalentes con bloques homopoliméricos de residuos de guluronato, como un sitio probablemente de unión en una secuencia GG. ....	27
<b>Figura 13.</b>	Diagrama del proceso general de los dos métodos para la extracción de alginato de sodio a partir de algas marinas .....	29

<b>Figura 14.</b>	Modelo general de un proceso o sistema.....	33
<b>Figura 15.</b>	Representación gráfica de las experimentaciones en el Diseño Central Compuesto Rotatorio para tres factores .....	45
<b>Figura 16.</b>	Diagrama esquemático de un espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR) (A); Detalles del interferómetro de Michelson, con el accesorio de muestreo atenuado de reflectancia total (ATR) (B). .....	49
<b>Figura 17.</b>	Ubicación de los sitios de muestreo de algas en las costas de la provincia de Manabí (Ecuador). .....	53
<b>Figura 18.</b>	Apariencia general de las especies encontradas en las playas ecuatorianas de la provincia de Manabí (Puerto Cayo, Machalilla y Puerto López).....	54
<b>Figura 19.</b>	Clasificación de las especies de algas pardas reportadas en la zona litoral del Ecuador.....	55
<b>Figura 20.</b>	Aspecto general de las especies del orden Dictyotales: a) <i>Dictyota</i> <i>menstrualis</i> ; b) <i>Padina antillarum</i> .....	56
<b>Figura 21.</b>	Gráficas de superficie (3-D) generadas a partir del modelo cúbico, que muestra el efecto de la temperatura de extracción(A), tiempo de extracción (B) y porcentaje de álcali (C) en el rendimiento de extracción de alginato .....	63
<b>Figura 22.</b>	Gráficas de superficie (3-D) generadas a partir del modelo cuadrático, que muestra el efecto de la temperatura de extracción(A), tiempo de extracción (B) y porcentaje de álcali (C) en el rendimiento de extracción de alginato. ....	64
<b>Figura 23.</b>	Resultados obtenidos en la nueva área de estudio. ....	66
<b>Figura 24.</b>	Análisis residual de los tratamientos. ....	67
<b>Figura 25.</b>	Las gráficas de respuesta de superficie (a, b, c) que muestran el	

	efecto de la temperatura de extracción, tiempo de extracción y concentración de álcali sobre el rendimiento de extracción de alginato.....	70
<b>Figura 26.</b>	Las gráficas de contorno (a, b, c) que muestran el efecto de la temperatura de extracción, tiempo de extracción y concentración del álcali sobre el rendimiento de extracción de alginato.....	71
<b>Figura 27.</b>	Espectro FTIR en el intervalo de 4000-600 cm <sup>-1</sup> para la referencia de alginato de sodio (Sigma-Aldrich).....	75
<b>Figura 28.</b>	Espectro FTIR en el intervalo de 4000-600 cm <sup>-1</sup> para la referencia de alginato de sodio (Sigma-Aldrich).....	76
<b>Figura 29.</b>	Espectros infrarrojos de alginato: (a) alginato del tratamiento MA07; b) alginato de referencia (Sigma- Aldrich); c) alginato del tratamiento MA04.....	77
<b>Figura 30.</b>	Termograma del alginato de referencia (NaAlg. Sigma-Aldrich).....	81
<b>Figura 31.</b>	Curvas TGA del alginato de sodio: alginato de referencia (línea negra); extracto MA7 (línea azul); extracto MA04 (línea roja).....	83
<b>Figura 32.</b>	Termograma DSC del alginato de sodio (Sigma-Aldrich) .....	86
<b>Figura 33.</b>	Termograma DSC: a) alginato MA04; b) alginato de referencia; c) alginato MA07. ....	88

**ÍNDICE DE ECUACIONES**

<b>Ecuación 1.</b> Peso molecular promedio en número.....	25
<b>Ecuación 2.</b> Peso molecular promedio en peso.....	25
<b>Ecuación 3.</b> Ecuación de tercer orden para la regresión de datos.....	47
<b>Ecuación 4.</b> Fórmula para determinar el rendimiento porcentual de extracción de alginato (%).....	48
<b>Ecuación 5.</b> Ecuación cúbica para el rendimiento de extracción.....	59
<b>Ecuación 6.</b> Ecuación cuadrática para el rendimiento de extracción.....	68

## RESUMEN

Las macroalgas como fuente de biomasa no convencional pueden ser utilizadas para producir sustancias químicas que poseen alto valor agregado, son de interés como materia prima para la biorrefinería. Los productos elaborados a partir de derivados de macroalgas, van desde la alimentación humana y animal hasta los hidrocoloides aplicados ampliamente en la industria. En el presente proyecto, se extrajo alginato de sodio a partir de algas pardas marinas ecuatorianas (Phaeophyta). Las condiciones óptimas para la extracción alcalina se determinaron mediante la metodología de respuesta de superficie RSM. Se aplicó un diseño central de diseño rotatorio (CCDR) para evaluar los efectos de los factores de tres variables independientes sobre el rendimiento de extracción de alginato de sodio. Las variables estudiadas fueron temperatura (52-83 °C), tiempo de digestión (0,24 - 3,7 horas) y concentración de álcali (0,367- 3,633%). El análisis de correlación del modelo de regresión matemática indicó que el modelo polinomial cúbico puede emplearse para describir los datos obtenidos a partir del diseño experimental. La expresión de tercer orden muestra alta correlación entre los datos y el modelo. Estadísticamente se determinó que se puede obtener un rendimiento del orden de  $26,55 \pm 0,46\%$  con un intervalo de confianza del 95%, bajo las condiciones de 76°C de temperatura, 3 horas con álcali al 3%, previstas como condiciones óptimas. El alginato extraído se analizó adicionalmente y se comparó con un alginato de referencia. Se utilizó espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, Análisis Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido para comparar los datos analíticos.

### **PALABRAS CLAVE:**

- **ALGAS PARDAS**
- **ALGINATO**
- **METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA**

## ABSTRACT

Macroalgae as source of non-conventional biomass can be used to produce chemicals that have high aggregated values and thus are of interest as a feedstock for biorefineries. Products made from macroalgal derivatives, range from human food and animal feed, to hydrocolloids applied widely in the industry. In this project, sodium alginate was extracted from Ecuadorian brown seaweed (Phaeophyta). The optimal conditions for alkaline extraction were determined by surface response methodology RSM. A central composite design rotatory (CCDR) was applied to evaluate the effects of three independent variables on the extraction yield of sodium alginate. The variables studied in this work were temperature (52 – 83 °C), digestion time (0.24 – 3.7 hours), and alkali concentration (0.367 – 3.633 %). The correlation analysis of the mathematical-regression model indicated that cubic polynomial model could be employed to describe the data obtained from the experimental design. The polynomial expression show high fitness between the data and the model. Statistically it was determined that a yield in the order of  $26.55 \pm 0.46\%$  with a 95% confidence can be obtained under the conditions of 76 °C temperature, 3 hours with 3% alkali, provided as optimal conditions. The extracted alginate was further analyzed and compared with a reference alginate. Fourier transformed Infrared spectroscopy, Thermogravimetric Analysis, and Differential Calorimetric Scanning was used as comparing analytic data.

## KEYWORDS:

- **BROWN ALGAE**
- **ALGINATE**
- **RESPONSE SURFACE METHODOLOGY**

# CAPÍTULO I

## 1. GENERALIDADES

### 1.1. Introducción

La biomasa constituye una de las alternativas más prometedoras, para la producción de materiales y energía. (Se-Kwon, 2015; De Jong & Jungmeler, 2015). La mayor parte de materia prima biológica se produce en la agricultura, la silvicultura y los sistemas microbianos (Waldron, 2009) . El material proveniente de bosques, como plantas forestales, son excelentes materias primas para la industria del papel, cartón y la construcción. Por otra parte frutos, vegetales y demás plantas cultivadas pueden ser consideradas fuentes de compuestos químicos orgánicos para la producción de combustibles, productos químicos, y biomateriales. Un tipo de biomasa no muy comúnmente utilizada pero no menos importante es aquella derivada de algas, la que puede ser obtenida a partir de cultivos o de fuentes de crecimiento natural como ríos, lagos y fuentes marinas. Las algas pueden ser utilizadas con fines alimenticios y aplicaciones industriales.

Las algas marinas se utilizan en diferentes partes del mundo como alimento de animales y fertilizante para cultivos, ya que contienen hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos, yodo, bromo, vitaminas, sustancias naturales estimulantes, entre otros compuestos bioactivos (Kannan, 2014). Además, también contienen más de 60 elementos traza en una concentración mucho mayor que en las plantas terrestres (Kannan et al., 2014). Los elementos traza encontrados generalmente son metales (Tuzen et al ., 2009; Lunde, 1970) por ejemplo: Cobre, zinc, manganeso, hierro, cromo, níquel, selenio, cadmio, plomo y cobalto. Las macroalgas marinas acumulan fácilmente metales del medio en el que viven, y por esta razón, se han utilizado ampliamente como bio-agentes para monitorear la contaminación (polución metálica) de agua de mar (Sawidis et al., 2001).

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 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 (Pereira et al., 2013). Estos polisacáridos son ampliamente utilizados a

nivel industrial tanto en la industria alimenticia, farmacéutica y biotecnológica. Los hidrocoloides son de importancia significativa tecnológica y económica, debido a sus distintas propiedades físico-químicas como agentes gelificantes, espesantes, estabilizantes y emulsificantes (Pereira et al., 2013; Krann, 2012).

Los polisacáridos sulfatados al igual que los no sulfatados poseen importancia industrial y científica. La industria mundial relacionada al procesamiento de algas se ha demostrado que ofrece una amplia variedad de productos para usos humanos directos o indirectos y genera anualmente ganancia del orden de US\$ 10 mil millones (Rebours et al., 2014).

El potencial uso industrial de los alginatos se debe a la forma relativamente simple en que se puede controlar la viscosidad de sus soluciones en una amplia rango de valores. Su bajo costo y propiedades como espesamiento, emulsión, estabilización, suspensión y gelificación encuentran numerosas aplicaciones en las industrias de alimentos, farmacéutica, cosmética, textil, fabricación de papel, pintura y cerámica (Wickens, 2001).

## **1.2. Descripción del problema**

Si bien los factores económicos en la industria dependen de los procesos y operaciones industriales involucrados, las necesidades socio-ambientales buscan el impulso de nuevas industrias no contaminantes y la diversificación de las exportaciones basadas en bioproductos y servicios ecológicos, que disminuyan significativamente la presión sobre el medio ambiente a largo plazo (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, 2013).

La extracción de alginatos a partir de algas, ha sido motivo de varios estudios, debido al amplio campo de aplicación que éstos poseen. Los alginatos no tienen ningún valor nutricional, sin embargo, se emplean como aditivos para cambiar y estabilizar la textura de los alimentos (Torres et al., 2007).

Cabe mencionar que existe un interés en el campo de la biorrefinería, sobre la conversión hidrotermal de alginato, para la producción de ácido láctico (Singhvi & Gokhale, 2013; Jin & Enomoto, 2011). El ácido láctico derivado de la biomasa es un compuesto importante que puede utilizarse como una base química para la

producción de una variedad de productos químicos importantes a gran escala (Singhvi et al., 2013). En la industria química, el ácido láctico tiene un gran potencial como una plataforma química para la producción de ácido pirúvico, propilenglicol, ácido acrílico y acetaldehído (Jeon et al., 2016).

A pesar que a nivel mundial la extracción de compuestos químicos con valor agregado es numerosa, en el país no se ha ahondado en dicha temática y es necesario el aprovechamiento de los recursos naturales disponibles en el Ecuador. Por tal motivo, el presente proyecto da un primer paso en el uso de biomasa no convencional a productos de alto valor agregado en el país.

El procesamiento de biomasa de origen marina haciendo uso de agua en condiciones severas de presión y temperaturas, como alternativa a los métodos convencionales de síntesis y extracción de compuestos químicos han sido motivo de varios trabajos de investigación (Dinjus & Kruse, 2004). La producción y extracción de biocombustibles, ácidos orgánicos, aceites esenciales, entre otros compuestos químicos, a partir de fuentes vegetales por medio de fluidos súper críticos (Lang & Wai, 2001), revela el potencial de la biomasa dentro de las aplicación de la química verde (Machida, 2011)

Los procesamiento hidrotérmicos poseen varios beneficios: (i) no se requieren grandes cantidades de catalizadores ácidos o de base, lo que disminuye la contaminación de sales; (ii) las reacciones catalizadas ácido/base y oxidativas se desarrollan fácilmente y pueden ser controladas para tener buena selectividad; (iii) se puede usar una amplia gama de materia prima y (iv) el agua misma es un medio de reacción respetuoso con el medio ambiente (Jin et al., 2011).

Entre los trabajos respecto a la utilización de agua en condiciones severas de presión y temperatura se puede citar el trabajo de (Jeon et al., 2016), en el que se demuestra la obtención de ácido láctico a partir de alginato derivado de macro algas, por tal motivo el trabajo en mención es un soporte para la finalidad que se pretende dar al alginato obtenido.

En conclusión el presente trabajo trata de dar solución a la falta de diversificación de materia prima para la obtención de productos con valor agregado, a través del aprovechamiento de biomasa no convencional disponible en el país.

### 1.3. Propuesta

El presente proyecto propone la utilización de materia prima disponible en el Ecuador, para la obtención de compuestos químicos con alto valor agregado, tal es el caso del alginato presente en la matriz celular de las macroalgas. La extracción del alginato, se realizará con la finalidad a futuro de someter al polisacárido procesamiento hidrotermal para la producción de ácido láctico.

El trabajo busca lograr la extracción a escala laboratorio y optimización de las condiciones en el proceso de extracción de alginatos presentes en la matriz celular de las algas pardas ecuatorianas a través de la evaluación de la interacción de los factores de extracción. La extracción de alginato se llevará a cabo, considerando un diseño experimental que permita determinar las condiciones de extracción que provean el mayor rendimiento hacia el producto de interés.

La especie de alga destinada al proceso, será recolectada de las costas ecuatorianas, la cual será identificada hasta su orden taxonómico según bibliografía relacionada a la temática en mención (*Algabase* & Taylor, 1945). Además, se caracterizará los productos obtenidos mediante Espectroscopia Vibracional de Infrarrojo, Análisis Termo gravimétrico, y Calorimetría Diferencial de Barrido.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo General**

- Extraer y caracterizar el alginato presente en la matriz celular de algas pardas ecuatorianas, para la producción de ácido láctico.

### **1.4.2. Objetivos Específicos**

- Recolectar y especificar el orden taxonómico de las muestras de las algas pardas ecuatorianas obtenidas en zonas geográficas específicas.
- Generar un diseño experimental idóneo para optimizar la variable de respuesta en la extracción del alginato
- Llevar a cabo el proceso de extracción del alginato, variando los factores de extracción (temperatura, tiempo, concentración del álcali), en función de los niveles especificados en el diseño experimental.
- Aplicar métodos analíticos para comparar los productos obtenidos con materiales de referencia.
- Estudiar el efecto de la interacción de los factores de extracción (temperatura, tiempo, concentración del álcali), sobre el rendimiento de alginato extraído
- Obtener las condiciones óptimas de extracción basado en un diseño experimental propuesto.

## CAPÍTULO II

### 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA Y ESTADO DEL ARTE

#### 2.1. Fundamentación Teórica

##### 2.1.1. Algas Marinas

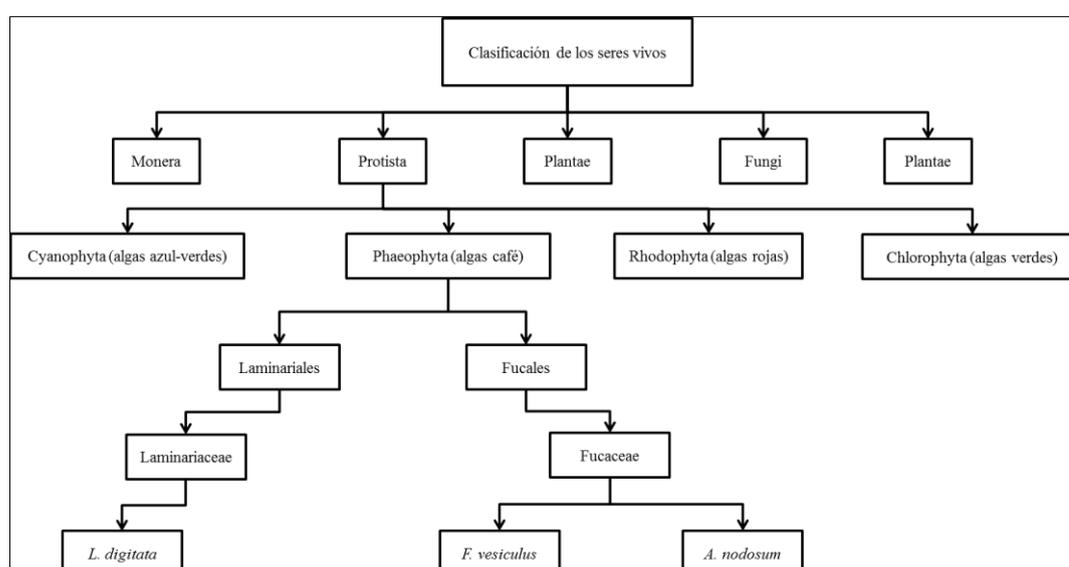
Las algas son un grupo heterogéneo de plantas, que van desde organismos microscópicos, hasta los grandes y complejos quelpos, que pueden superar los 10 metros de longitud (Radmer, 1996).

Las algas pueden ser clasificadas en dos principales grupos; el primero comprendido por microalgas, y el segundo conformado por macroalgas. Las macroalgas, o algas marinas, incluyen algas café, verdes y rojas. Éstas generalmente habitan en la zona litoral, mientras que las microalgas se encuentran tanto en la zona litoral como en la zona béntica, además también se encuentra en aguas oceánicas a manera de fitoplancton (El Gamal, 2010).

El fitoplancton está comprendido por micro-organismos (grupo de protistas) tales como diatomeas, dinoflagelados, flagelados verdes, amarillo-marrones (dorados) y algas azul-verdes (*cianofita*). Las clases más importantes de microalgas en términos de abundancia son las diatomeas (*Bacillariophyta*), las algas verdes (*Chlorophyceae*) y las algas doradas (*Chrysophyceae*), además las cianobacterias o algas verde-azuladas (*Cyanophyceae*) también se denominan microalgas, por ejemplo, la *Spirulina* (*Arthrospira platensis* y *Arthrospira maxima*) (Venkatesan, et al., 2015).

Las algas marinas generalmente se describen en tres categorías principales, y son clasificadas de acuerdo al color predominante por ejemplo algas verdes, rojas, verdes y marrones (pardas). Sin embargo Diaz-Pulido G. (2008), agrega las algas verde-azul los tres tipos de alga ya mencionados. En general, las algas son un grupo de eucariotas fotosintéticos (excepto las algas verde-azuladas procariotas). La ausencia de verdaderas raíces, tallos y hojas los separa taxonómicamente de plantas superiores.

En el sistema clásico de clasificación de cinco reinos (Figura 1), las macroalgas han sido asignadas al reino Protista. En este reino, las algas se han agrupado para la conveniencia en cuatro divisiones (phyla), es decir Rhodophyta (algas rojas); Phaeophyta (algas marrones) y Chlorophyta (algas verdes). La diferenciación principal es el color, pero sobre todo en su reserva de polisacáridos contenidos en su estructura. La clasificación de acuerdo con el color se muestra en la Figura 1, donde se observa tres especies representativas de las algas pardas (*L. digitata*, *F. vesiculosus* y *A. nodosum*), pertenecientes al orden de las laminariales y fucales respectivamente.



**Figura 1. Clasificación de macroalgas bajo el reino Protista, y sub-clasificación de *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* (fucales) y *Laminaria digitata* (Laminariales).**

Fuente: (Brebion, 2013).

La palabra griega para las algas es “phykos”, y de acuerdo con las Reglas Internacionales de Nomenclatura Botánica a un grupo de algas debe necesariamente incorporado la palabra "phykos" (South & Whittick, 1991). Como consecuencia de tal incorporación las palabras como: Chlorophyceae, Phaeophyceae y Rhodophyceae indican una idea de su relación con las algas.

El Código Internacional de Nomenclatura Botánica (conocido por sus siglas en inglés, ICBN), ha recomendado los siguientes sufijos para las diferentes categorías de algas (Sharma, 2007), como se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.**  
**Sufijos de las categorías taxonómicas para las algas**

<b>Categoría</b>	<b>Sufijos</b>
<b>División</b>	Phyta
<b>Subdivisión</b>	Phytina
<b>Clase</b>	Phyceae
<b>Subclase</b>	Phycidae
<b>Orden</b>	Ales
<b>Sub-orden</b>	Inales
<b>Familia</b>	Aceae
<b>Subfamilia</b>	Oideae
<b>Tribu</b>	Eae
<b>Género</b>	generalmente un nombre en Latín
<b>Especie</b>	generalmente un nombre en Latín
<b>Variiedad</b>	una palabra en Latín
<b>Forma</b>	una palabra en Latín

**Fuente:** (Sharma, 2007)

Por lo tanto, las palabras como Chlorophyta, Phaeophyta y Rhodophyta debido a su terminación "phyta", éstas equivalen al status de división; palabras como Chlorophyceae, Phaeophyceae y Rhodophyceae terminadas con "phyceae", son equivalentes al estatus de una clase; y las palabras como Dictysiphonales, Dictyotales y Ulvales terminadas con "ales", definen el orden dentro de la clasificación de algas.

Durante años las macroalgas y en especial las algas marrón (pardas) han sido investigadas como fuente de polisacáridos y compuestos bioactivos con alto valor económico (Yuan & Macquarrie, 2015; Senni et al ., 2006). Por ejemplo dentro de la familia Fucaceae, la especie *Ascophyllum nodosum* es una especies utilizadaa para la

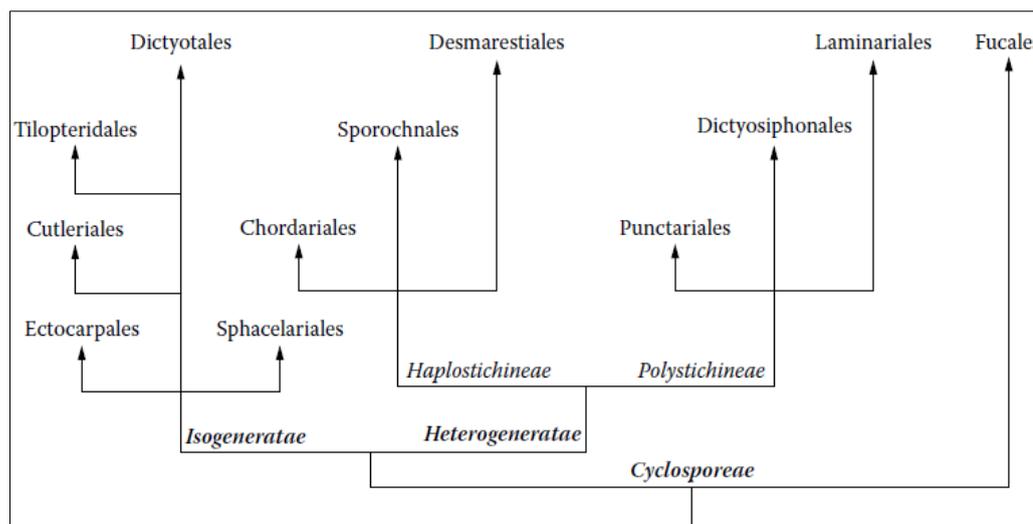
extracción de fucoidan (Yuan et al., 2015). Por otro lado la especie *Fucus vesiculosus*, es utilizada como suplemento alimenticio y como fuente de materia farmacéutica (Balina et al., 2016).

### 2.1.2. División Phaeophyta (algas pardas)

Las algas pardas se agrupan en una clase llamada Melanophyceae, Fucophyceae, o Phaeophyceae; todos estos nombres están de acuerdo con el ICBN. El nombre que más se usa en la actualidad es Phaeophyceae.

En 1933, el botánico sueco Kylin (Johann Harald) dividió las algas pardas en tres grupos consistentes de 12 órdenes (Sharma et al., 2007), como se describe a continuación, y es adicionalmente ilustrado en la Figura 2.

- Grupo I. *ISOGENERATAE* (con alteraciones isomorfas de generaciones)  
  
Órdenes: Ectocarpales, Sphacelariales, Cutleriales, Tilopteridales y Dictyotales.
  
- Grupo II. *HETEROGENERATAE* (con alteraciones heteromorfas de generaciones)  
  
Órdenes: Chordariales, Sporochneales, Desmarestiales, Puntariales, Dictyosiphonales y Laminariales.
  
- Grupo III. *CYCLOSPORAE* (no tiene alteraciones de generaciones)  
  
Órdenes: Fucales



**Figura 2. Diagrama del sistema de Kylin (1933).**

Fuente: (Brodie & Lewis, 2007)

Las diferencias representativas de las principales familias pertenecientes a los órdenes (Dictyotales, Laminariales y Fucales) se describen posteriormente. A un lado de la diferencias morfológicas y taxonómicas, las *Phaeophyceae* son organismos foto-autotróficos multicelulares, clasificados en unos 285 géneros y aproximadamente 2000 especies (Brodie & Lewis, 2007). Su tamaño oscila entre unos pocos milímetros hasta sobrepasar los 40 metros como la especie más conocida *Macrocystis Pyrifera*.

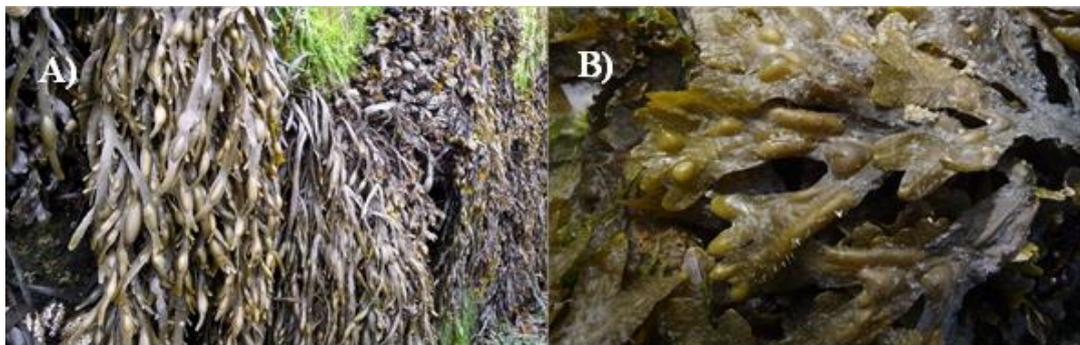
Las algas pardas o marrones representan un grupo diverso de organismos marinos eucariotas y fotosintéticos. La mayoría de las algas marrones contienen el pigmento fucoxantina (Song et al., 2015), que es responsable del distintivo color café verdoso. El color marrón de estas algas se debe a la dominancia del pigmento de xantofila fucoxantina, que enmascara los otros pigmentos, como la clorofila (a y c) y betacaroteno, entre otras xantofilas (Guiry, 2016). Las reservas de polisacáridos presentes en la estructura de estos organismos son por lo general polisacáridos complejos, sulfatados y no sulfatados.

### 2.1.3. **Fucaceae**

En la familia Fucaceae perteneciente al orden de las fucales, está representada por un grupo de algas marinas con talos erectos, con ramas dicotómicas en un sólo plano y una estructura de fijación discoide (Aguilar-Rosas et al., 2002).

De esta familia sólo se han identificado 24 especies, incluyendo 15 especies

bajo el género *Fucus* (por ejemplo *Fucus vesiculosus*) y sólo una en el género *Ascophyllum* (*Ascophyllum nodosum*) (Brebion, 2013).



**Figura 3. Apariencia general de las especies: a) *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus), b) *Fucus vesiculosus* (Linnaeus).**

Fuente: (AlgaeBase, 2017)

Según Brebion J. (2013) el hábitat natural de las Fucaceae se encuentra en la zona intertidal. En consecuencia, las algas marinas están expuestas a dos ambientes diferentes dos veces al día: aire y agua. Por lo tanto, las Fucaceae tienen generalmente un mayor contenido de antioxidantes (como sustancias fenólicas y pigmentos) que se cree que ayudan a estas algas soportar estrés abiótico como la radiación UV y la oxidación del aire.

#### 2.1.4. Laminariaceae

La familia Laminariaceae contiene más especies que las Fucaceae con 61 especies incluyendo 26 en el género *Laminaria* (por ejemplo *Laminaria digitata*) y 21 en el género *Saccharina* (por ejemplo, *Saccharina latissima*) (Brebion et al., 2013).

En contraste con las Fucaceae, las Laminariaceae tienden a vivir en aguas más profundas y rara vez se exponen al medio ambiente atmosférico reduciendo así la exposición a la luz, especialmente durante el invierno (Brebion et al., 2013).



**Figura 4. Apariencia general de las especies: a) *Saccharina latissima* (Linnaeus), b) *Laminaria digitata* (Hudson).**

Fuente: (AlgaeBase, 2017)

La laminarina y manitol son los principales polisacáridos presentes en las algas de este tipo, como la especie *Laminaria digitata* y *Saccharina latissima*, ambas pertenecientes a la familia Laminariaceae, sin embargo las proporciones encontradas difieren ampliamente debido a las grandes variaciones estacionales. Según (Manns et al., 2014) menciona que los niveles varían entre 0 a 33% (p/p) en peso de la materia seca total para la laminarina y 2 a 20% (p/p) para el manitol dependiendo del mes de la cosecha.

### 2.1.5. Dictyotaceae

Los miembros de los dictyotales se han colocado tradicionalmente en una sola familia (Dictyotaceae), dentro de la cual dos tribus han sido reconocidas: Dictyoteae y Zonarieae (Jae Lee & King, 1996). Las algas pertenecientes a la tribu Dictyoteae son reconocidas como una fuente excepcional de terpenos, los cuales poseen potencial actividad citotóxica, leishmanicida, antiviral y antibacterial (Pardo Vargas, 2013).

Dentro de las algas pardas, la familia Dictyotaceae es un grupo representativos debido a la potencial bioactividad de sus productos metabólicos. Aunque es sólo la tercera en número de especies dentro de la clase, químicamente la familia Dictyotaceae, exhibe una rica producción de moléculas terpenoides de diferentes orígenes (De Paula et al., 2011).



**Figura 5. Apariencia general de la especie *Styopodium zonale*.**

**Fuente:** (AlgaeBase, 2017)

Específicamente las algas del género *Styopodium* (Dictyotaceae) están muy extendidas en regiones tanto tropicales como subtropicales y han sido reconocidas como una rica fuente de diterpenos estructuralmente únicos y biológicamente activos de biogénesis mixta (meroditerpenoides) (Costa-Soares et al., 2016). Estos compuestos exhiben interesantes actividades farmacológicas, tales como los efectos antitumoral, insecticidas y antivirales.

#### **2.1.6. Algas en el Ecuador**

En Ecuador son pocos los estudios realizados sobre la riqueza marina, sin embargo de los estudios relacionados a la descripción y reconocimiento de las macroalgas destaca el trabajo titulado “Diagnóstico Ecológico Y Socioeconómico Del Área Marino-Costera Del Parque Nacional Machalilla” (Flachier, Sonnenholzer, Pérez, Jaramillo, & Espinoza, 1997), el estudio en mención fue llevado a cabo en la provincia de Manabí, y se identificaron macroalgas en dos zonas principalmente.

- (i) En las áreas de la plataforma continental costanera del Parque Nacional Machalilla (PNM)

Las áreas en donde se llevó a cabo el estudio fue a lo largo del perfil costanero del PNM, en donde se presentó mayor volumen de especies vegetales fue en los islotes: La Viuda, El Islote, Sucre y Horno de Pan, localizadas al norte del PNM. (Flachier et al., 1997), reporta que en las prospecciones submarinas las macroalgas se encontraron sobre un sustrato rocoso y arenoso a profundidades no

superiores a 20 metros.

De las divisiones de algas observadas, las algas pardas (feofíceas) fueron el grupo que presentaron mayor abundancia con el 60%, mientras que las algas verdes (clorofíceas), representadas con el 5% fueron el grupo menos dominante. En la Tabla 2 se muestra las especies identificadas, de acuerdo a la clasificación por color (Phaeophyta, Rodophyta, Chlorophyta). De las clases de algas pardas tan solo se identificaron algas de la especie *Dictyota sp.* y *Padina sp.*

En las expediciones submarinas llevadas a cabo en locaciones del sur como por ejemplo Salango, Ballena, Los Ahorcados y el sector de Punta Mala, se reportó una menor abundancia de algas arrecifales en comparación con las localidades del norte. La Tabla 2 muestra de manera general las especies de macro-algas mejor representadas en el Parque Nacional Machalilla, clasificadas de acuerdo a la división.

**Tabla 2.**  
**Lista de algas macroscópicas mejor representadas en el PNM**

<b>Taxa</b>	<b>Especies</b>
<b>Phaeophyta</b>	<i>Dictyota sp.</i>
	<i>Padina sp.</i>
<b>Rodophyta</b>	<i>Corallina sp.</i>
	<i>Haliciona sp.</i>
<b>Chlorophyta</b>	<i>Caulerpa sp.</i>
	<i>Chaetomorpha sp.</i>
	<i>Codium sp.</i>
	<i>Enteromorpha sp.</i>
	<i>Ulva sp.</i>

**Fuente:** (Flachier et al., 1997)

Por otra parte las especies mejor identificadas en las localidades del sur sobre sustratos rocosos y arenales fueron las algas rojas (rodofíceas), acompañadas de especies incrustantes y coralinas, con una representatividad del 95%. Las especies fueron identificadas en lugares con profundidades de entre 10 y 25 metros.

ii) En la Isla de la Plata.

El estudio reporta que el 95% de las especies estuvo representado por algas rodofíceas del género *Corallina*, y se encontraron en las zonas expuestas de los arrecifes, mientras que el 5% estuvo conformado por especies del género *Chaetomorpha* (algas verdes). De los arrecifes observados al norte de la Isla de La Plata, las coralináceas se hallan formando la parte más externa de la cresta de algas (algal ridges) (Lasso B., 2009).

### **2.1.7. Principales polisacáridos en algas pardas**

Las algas pardas se caracterizan por el alto contenido de alginatos en su pared celular, tanto en forma de sal como en forma de ácido algínico. (Gómez Ordóñez, 2013). En las algas pardas los polisacáridos almacenados a partir de la fotosíntesis (fotosintatos), no son glucosa ni almidón, como plantas terrestres, sino que la laminarina se encuentra presente (como producto de la polimerización de glucosa) y el manitol (Song et al., 2015). Además, el alginato es el polisacárido estructural que se encuentra en mayor porcentaje en la pared celular de algas pardas (Men'shova et al., 2013, Hahna et al., 2012), conjuntamente con fucoidan y celulosa (en lugar de lignina como plantas terrestres (Song et al., 2015). Estos carbohidratos únicos de algas pardas varían según la especie, la ubicación, la salinidad, la estación o metodología de cosecha (Mushollaeni, 2011).

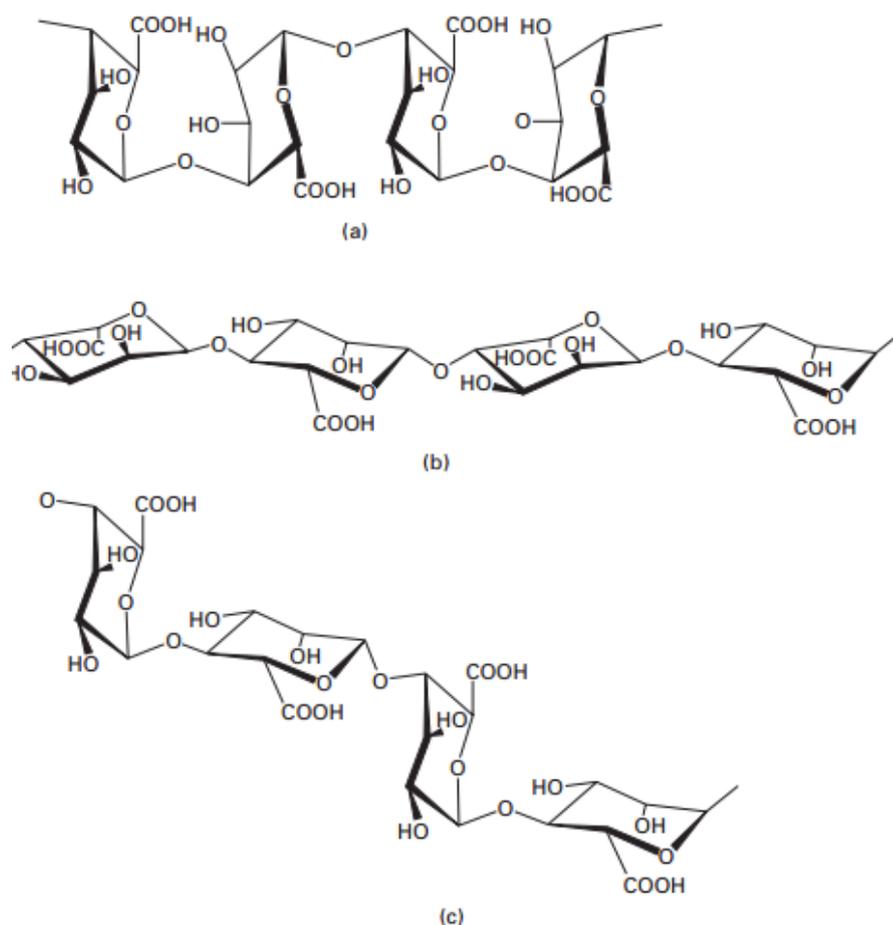
La composición química y estructura de polisacáridos varía dependiendo de la filogenia de las diversas especies de algas, que son ampliamente estudiados por sus diferentes funciones fisiológicas. La composición, propiedades y métodos de extracción de polisacáridos a partir de algas ha sido descrita en varios trabajos de investigación. Los estudios son amplios debido a la enorme variabilidad derivada de diferentes especies de algas, métodos de cultivos, así como los diferentes hábitats entre otras condiciones ambientales que afectan su crecimiento y por ende composición referida al contenido de polisacáridos.

Además, la composición y proporciones de polisacáridos varían de acuerdo a la etapa de vida y parte morfológica de la especie. Los polisacáridos de almacenamiento son la principal fuente de energía, mientras que los polisacáridos

estructurales tienen funciones solidificantes y protectoras (Misurcova et al., 2015).

### 2.1.8. Alginatos

Los alginatos son los principales constituyentes presentes en la pared celular de algas pardas (Phaeophyceae) y no se encuentran en las especies terrestres (Gómez-Ordóñez et al., 2013). En general el alginato en su forma ácida (ácido algínico) es un polisacárido formado por cadenas de bloques de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G), con diferentes arreglos de dichos bloques como se muestra en la Figura 6. La Figura 6.a muestra la fórmula estructural de los bloques G. La Figura 6.b representa la fórmula estructural de los bloques M. Finalmente la Figura 6.c el fórmula estructural de los arreglos secuenciales de los bloques G-M.



**Figura 6. Estructura de alginato en forma ácida: (a) bloques GGGG; (b) bloques MMMM; (c) bloques GMGM.**

Fuente: (Eichhorn et al., 2009)

La composición de alginato depende significativamente de la especie de alga, de la ubicación, estación, así como de las diferentes partes morfológicas a partir de

las cuales se realiza la extracción del alginato, es decir, el estipe tiene un desarrollo (movimiento estructural) diferente en comparación con las frondas. Las propiedades físicas de los alginatos y la formación de geles, dependen de la proporción relativa de los bloques G y M (Misurcova et al., 2015).

Los alginatos de un tipo u otro parecen estar presentes en la mayoría de las especies de algas marrones, pero se producen en cantidades explotables (30-45% en peso seco) sólo en los kelps y laminillas más grandes, pertenecientes a los órdenes Laminariales y Fucales (Guiry et al., 2017)

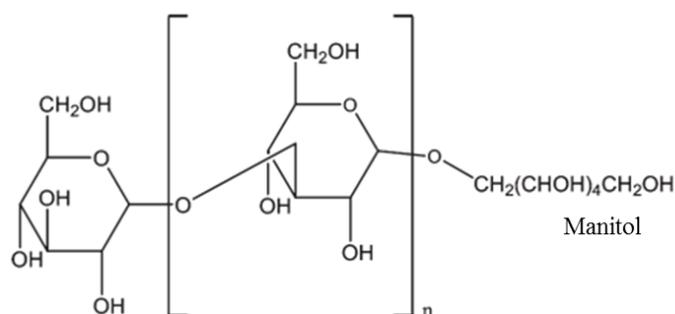
Sin embargo, no todas las algas marrones poseen cantidades suficientemente significativas de alginatos para merecer la explotación, por ejemplo, la especie *Sargassum muticum*, una especie adventiva de Japón que ha migrado hacia el Atlántico y el Mediterráneo, posee un contenido de entre 16-18% de alginatos en peso base seca (Guiry et al., 2017).

### **2.1.9. Laminarina**

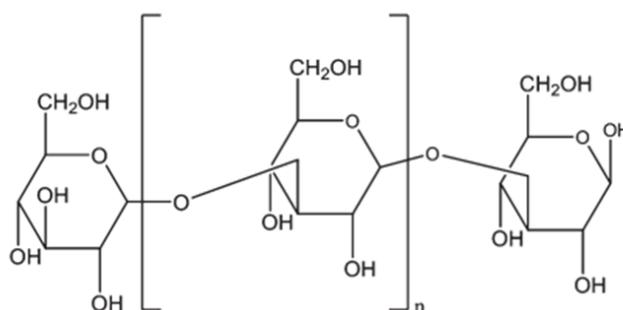
La laminarina es un polisacárido de bajo peso molecular y compuesto bioactivo presente en algas pardas. También conocido como laminaran o leucosina, fue extraído por primera vez por Schmiedeberg en 1885. La laminarina se encuentra principalmente en las frondas de las especies *Laminaria* y *Saccharina* (Kadam et al., 2015). Químicamente la laminarina es un polisacárido de almacenamiento de  $\beta$ -glucano que se compone mayoritariamente de cadenas entrelazadas de (1,3)- $\beta$ -d-glucano y en menor proporción de uniones  $\beta$ -(1,6) (Manns et al., 2014; Kadam et al., 2015). Por ejemplo, la laminarina de la especie *Eisenia bicyclis* está compuesta por una cadena lineal de enlace (1,3) y (1,6) en una relación de 2:1 (Kadam et al., 2015).

La laminarina es una mezcla de dos diferentes moléculas, una terminada por una unidad de glucosa reductora y la otra por el alcohol de un azúcar no reductor (manosa) como el manitol (Zajic, 2012). Las cadenas M (manitol) y G (D-glucosa) son dos tipos de cadenas de laminarinas, dependiendo del extremo reductor. El bloque M terminan con una sustitución de D-manitol, mientras que las cadenas G terminan con glucosa como el extremo reductor. Las estructuras básicas de una unidad de la cadena M y G de la laminarina se presentan en la *Figura 7*.

En el campo de la medicina una aplicación potencial de la laminarina es en forma de sulfato de laminarina de sodio, que se aplica como anticoagulante, del que se reporta que posee un tercio de efectividad en comparación a la heparina (Wickens et al., 2001).



a) Cadena M de Laminarina



b) Cadena G de Laminarina

**Figura 7. Estructuras químicas de una unidad de cadena M y G de laminarina.**

Fuente: (Kadamet al., 2015)

La laminaria es un producto de reserva soluble presente principalmente en las Phaeophytas (por ejemplo *Ascophyllum*, *Fucus* y *Laminaria* spp), con valores de alrededor del 30% en peso seco del tejido algario (Zajic et al., 2012). El contenido de laminarina de algunas macroalgas de uso común se describe en la *Tabla 3*.

**Tabla 3.**

**Principales especies como fuentes de Laminarina.**

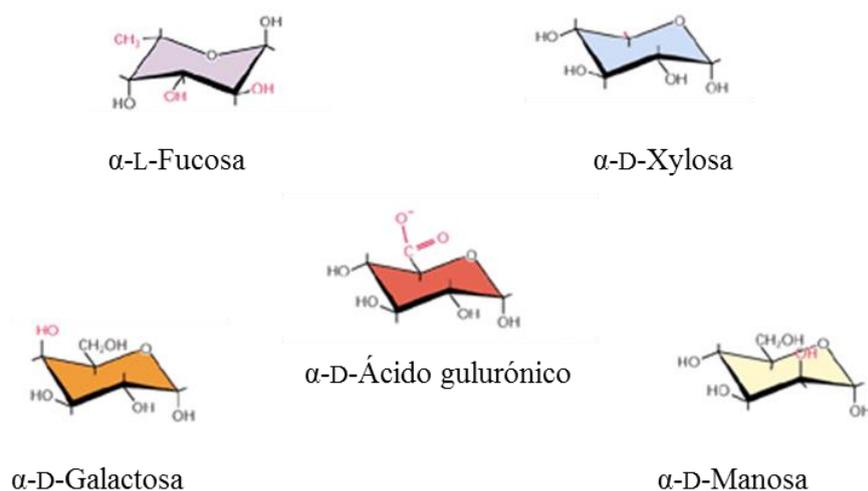
Espece de Alga	Contenido
<i>Saccharina latissima</i>	0-33% de peso seco
<i>Laminaria hyperborea</i>	0-32% de peso seco

CONTINÚA→

<i>Laminaria digitata</i>	0-14% de peso seco
<i>L. digitata</i>	0-35% de peso seco dependiendo de la temporada
<i>Fucus vesiculosus</i>	84% del total de azúcares
<i>Undaria pinnatifida</i>	3% de peso seco
<i>Ascophyllum nodosum</i>	4.5% de peso seco
Fuente: (Zajic et al., 2012)	

### 2.1.10. Polisacáridos sulfatados

Las paredes celulares de varios órdenes de algas marrones, particularmente Fucales y Laminariales, consisten principalmente en fucoidanes, que están compuestos por cantidades variables de unidades sacáridas, tales como fucosa, xilosa, ácido gulurónico, galactosa y manosa (ver Figura 8), con un grado diferente de sulfatación. Las estructuras derivadas de diferentes distribuciones de unidades sacáridas (azúcares) y diversos contenidos de grupos sulfato, dentro de los más importantes son los llamados carragenanos, sulfatos de xilomanano, fucoidanos y sulfato de galactano (Chaminda-Lakmal et al., 2015).



**Figura 8. Unidades acáridas que pueden ser sulfatadas**

Fuente: (Hildebrnad, 2017).

Los polisacáridos sulfatados observados en las algas marrones son del tipo fucoidanos que incluyen moléculas polidispersas basadas en cadenas de L-fucosa

sulfatada (ver Figura 9). Las composiciones químicas de los polisacáridos sulfatados de algunas especies de algas marrones se describen en la *Tabla 4*, es decir se determina la proporción en las que se encuentra cada compuesto. La composición química de los fucoidanes varía de acuerdo a la especie. El fucoidan está. Principalmente compuesto por fucosa y sulfato en distintas proporciones, sin embargo Li et al., (2008) reporta que existe otras unidades de sacáridos como galactosa, manosa, xilosa, y ácido gulurónico, e incluso acetato.

**Tabla 4.**  
**Composición química de algunos fucoidanes**

<b>Alga parda</b>	<b>Composición química</b>
<i>F. vesiculosus</i>	fucosa, sulfato
<i>F. evanescens</i>	fucosa/sulfato/acetato (1/1.23/0.36)
<i>F. disticus</i>	fucosa/sulfato/acetato (1/1.21/0.08)
<i>F. serratus</i>	fucosa/sulfato/acetato (1/1/0.1)
<i>Lessonia vadosa</i>	fucosa/sulfato (1/1.12)
<i>Macrocystis pyrifera</i>	fucosa/galactosa(18/1), sulfato
<i>Pelvetia wrightii</i>	fucosa/galactosa(10/1), sulfato
<i>Undaria pinnatifida(mekabu)</i>	fucosa/galactosa (1/1.1), sulfato
<i>Ascophyllum nodosum</i>	fucosa(49%), xylosa(10%), GlcA(11%), sulfato
<i>Himanthalia lorean &amp; Bifurcaria bifurcate</i>	fucosa, xylosa, GlcA, sulfato

**CONTINÚA→**

*Padina pavonia* fucosa, xylosa, manosa, glucosa, galactosa, sulfato

*Laminaria angustata* fucosa/galactosa/sulfato (9/1/9)

*Ecklonia kurome* fucosa, galactosa, manosa, xylosa, GlcA, sulfato

*Sargassum stenophyllum* fucosa, galactosa, manosa, GlcA, glucosa, xylosa, sulfato

*Adenocytis utricularis* fucosa, galactosa, manosa, sulfato

*Hizikia fusiforme* fucosa, galactosa, manosa, xylosa, GlcA, sulfato

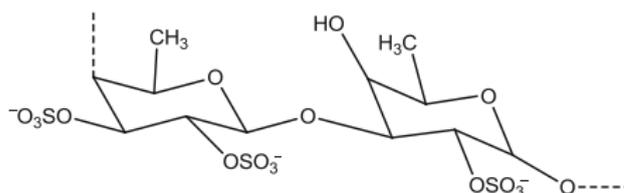
*Dictyota menstrualis* fucosa/xylose/ácido urónico /galactosa/sulfato (1/0.8/0.7/0.8/0.4) y (1/0.3/0.4/1.5/1.3)

*Spatoglossum schroederi* fucosa/xylosa/galactosa/sulfate (1/0.5/2/2)

GlcA = Ácido gulurónico

Fuente: (Li et al., 2008)

La fucosa es el azúcar neutro que presenta mayor abundancia en los polisacáridos sulfatados de algas pardas. Otros azúcares residuales, tales como xilosa, manosa, glucosa y galactosa, participan en la composición de polisacáridos sulfatados en diferentes cantidades. Los azúcares residuales de galactosa y xilosa ocurren en cantidades mayores después de los de fucosa, especialmente en especies de *Laminaria sp*, mientras que en la especie *Fucus sp*, la galactosa alterna con unidades de xilosa.



**Figura 9** Unidad repetitiva de fucoidano.

Fuente: (Chaminda et al., 2015)

Los polímeros de fucoidán muestran actividades farmacológicas especiales a la presencia del grupo éster de sulfato (Chaminda-Lakmal et al., 2015). Los fucoidanos han sido reportados para un amplio espectro de bioactividades debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, antiproliferativas, anticoagulantes y antivirales. La Tabla 5 muestra las especies que presentan actividad anticoagulante.

**Tabla 5.**  
**Algunas especies de algas pardas que presentan actividad anticoagulante.**

<b>Especie de alga parda</b>	<b>Polisacárido</b>
<i>Spatoglossum schroederi</i>	Galactofucan sulfatado
<i>Ecklonia cava</i>	Polisacárido sulfatado
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Fucoidan
<i>Fucus vesiculosus</i>	Fucoidan
<i>Dictyota cervicornis</i>	Polisacárido sulfatado
<i>Dictyopteris delicatula</i>	Polisacárido sulfatado
<i>Dictyota mertensis</i>	Polisacárido sulfatado
<i>Laminaria saccharina</i>	Fucoidan
<i>Laminaria digitata</i>	Fucoidan
<i>Fucus distichus</i>	Fucoidan
<i>Fucus serratus</i>	Fucoidan
<i>Fucus evanescens</i>	Fucoidan
<i>Fucus spiralis</i>	Fucoidan
<i>Lessonia vadosa</i>	Fucoidan

**Fuente:** (Misurcova et al., 2015)

### **2.1.11. Compuestos fenólicos**

Muchos otros compuestos presentes en las algas poseen efectos benéficos

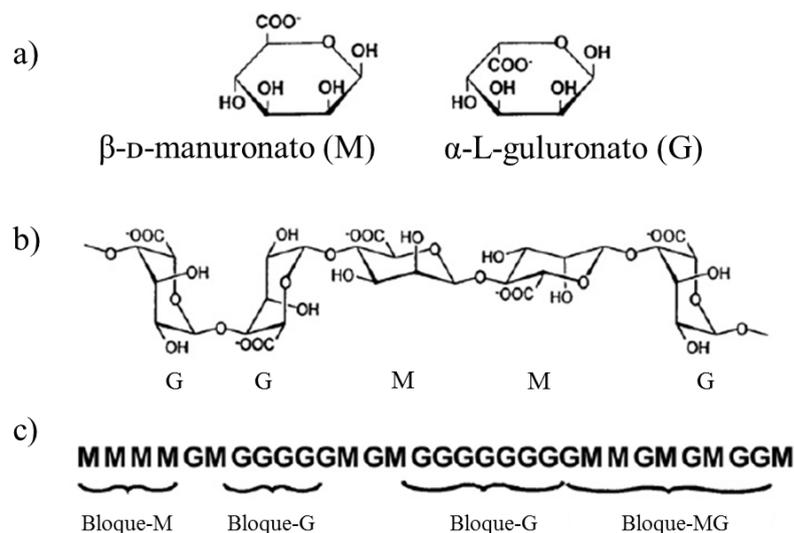
para la salud en el cuerpo humano, tales como los compuestos fenólicos, que son metabolitos secundarios evolucionados como agentes protectores hacia condiciones ambientales desfavorables (Misurcova et al., 2015).

Los compuestos fenólicos se encuentran comúnmente en las plantas, y se sabe tienen varias actividades biológicas, incluyendo propiedades antioxidantes. Estudios han revelado que los extractos de algas marinas, especialmente del tipo polifenoles, tienen actividad antioxidante (Pereira & Neto, 2015).

Un ejemplo es el florotanino, un compuesto polifenólico extraídos de algas marrones y rojas del cual se ha demostrado actividad antioxidante por ensayos in-vitro, además de poseer efecto antiinflamatorio, efecto algicida y bactericida (Pereira et al., 2015; Pacheco & Francis, 2016)

#### **2.1.12. Estructura y propiedades del Alginato**

A nivel molecular el alginato es un copolímero lineal anicónico que consiste en cadenas formadoras de heteropolisacáridos constituidas por bloques de  $\beta$ -D-manuronato (Bloque M) y  $\alpha$ -L-guluronato (Bloque G) (Lee et al., 2012). Su estructura varía en dependencia de la posición de cada monómero en la cadena, formando bloques homopoliméricos (MM o GG) o heteropolímeros (MG o GM) (Misurcova et al., 2015). La Figura 10.a, muestra la configuración en el espacio del  $\beta$ -D-manuronato (Unidad M)  $\alpha$ -L-guluronato (Unidad G), de donde se observa que el anión carboxilato ( $\text{COO}^-$ ) difiere de posicionamiento en ambas unidades. La composición de los dos ácidos es idéntica, su diferencia es básicamente que son epidérmicos en el carbono C5 (Gacesa & Russell, 1990), es decir que poseen diferentes configuraciones del carboxilato ( $\text{COO}^-$ ) alrededor de uno de varios átomos de carbono asimétricos presentes. La Figura 10.b muestra la disposición estructural que presenta la unión de unidades G y M, mientras que la Figura 10.c, muestra la formación de bloques M y G a partir de las correspondiente distribución de unidades M y G.



**Figura 10. Datos estructurales de Alginato: a) monómero del alginato (M vs. G); b) conformación molecular del polímero de alginato; c) cadenas secuenciales de unidades M y G,**

Fuente: (Draget & Taylor, 2011)

Los alginatos son constituyentes presentes en la pared celular de las algas pardas, la función biológica del alginato es ser componente formador de la estructura. El alginato, fisiológicamente, es el responsable de la resistencia mecánica y flexibilidad a través de la formación de matrices intercelulares de gel (Draget et al., 2005). En términos simples, los alginatos en algas marinas pueden considerarse como poseedores de propiedades fisiológicas similares a las de la celulosa en plantas terrestres. La relación entre estructura y función se refleja en la diferencia de composición de los alginatos en diferentes algas o incluso entre diferentes tejidos de la misma planta.

En la especie *L. hyperborea*, una alga que crece en áreas costeras muy expuestas, el talo posee un alto contenido de ácido gulurónico, lo que da una alta rigidez mecánica. Las hojas de las mismas algas, que flotan en la corriente de agua, tienen un alginato caracterizado por un menor contenido de bloques G, que le da una textura más flexible (Draget et al., 2005).

Los alginatos se encuentran tanto en la región intercelular como en las paredes celulares y tienen funciones biológicas estructurales y tipo de intercambio iónico. Bharathiraja et al., (2016), reporta la composición de alginato de diferentes especies de algas marinas: *ascophylum nodosum* (22-30%); frondas de *laminaria digitata* (25-44%); stipes de *laminaria digitata* (35-47%); frondas de *laminaria*

*hyperborea* (17 - 33%); stipes de *laminaria hyperborean* (25-38%); en algas de las especies *sargassum* el contenido de alginato está entre 17 y 45%.

Los polisacáridos en general, son polidispersos con respecto al peso molecular, y el alginato no es la excepción. El peso molecular del alginato oscila generalmente entre 500 y 1000kda (Bharathiraja et al., 2016). En este aspecto se asemejan a polímeros sintéticos en lugar de otros biopolímeros tales como proteínas y ácidos nucleicos; debido a esta polidispersidad, el peso molecular de un alginato es un promedio en toda la distribución de los pesos moleculares, sin embargo, los pesos moleculares de tipos de alginato de sodio comercialmente disponibles oscilan entre 32.000 y 400.000 g/mol (Lee et al., 2012)

La heterogeneidad del peso molecular de los polisacáridos puede describirse mediante varios tipos de peso molecular promedio (Philips et al., 2006). Existen dos métodos comúnmente utilizados para identificar el peso molecular de un polímero. El primero es el promedio en número,  $M_n$  que pesa las moléculas de polímero de acuerdo con el **número** de moléculas que tienen un peso molecular específico. El segundo es el promedio en peso,  $M_w$  que pesa las moléculas de polímero de acuerdo con el peso de moléculas que tienen un **peso** molecular específico.

En una población de moléculas donde  $N_i$  es el número de moléculas y  $w_i$  es el peso de moléculas que tienen un peso molecular específico  $M_i$ , el número y el peso promedio se definen respectivamente como:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad (1)$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i w_i M_i}{\sum_i w_i} = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad (2)$$

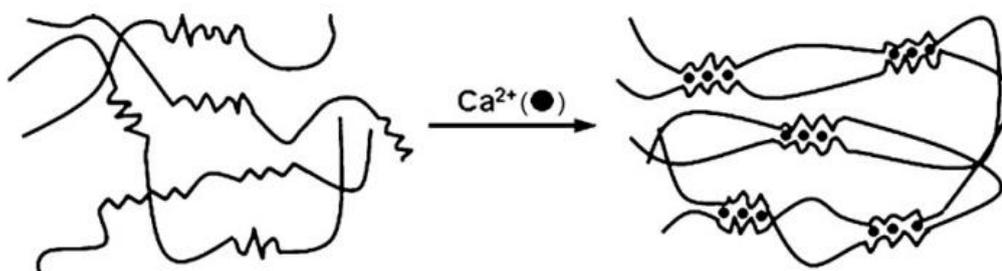
La fracción  $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ , se denomina índice de polidispersidad. Se han reportado valores de índice de polidispersidad entre 1,4 y 6,0 para los alginatos y se han relacionado con diferentes tipos de procesos de preparación y purificación.

La distribución del peso molecular es de importancia para los usos que se pretenda dar a los alginatos, ya que los fragmentos de bajo peso molecular que

contienen sólo bloques G cortos pueden no tomar parte en la formación red de gel y por consiguiente no contribuyen a la resistencia del gel (Draget et al., 2005).

Por lo tanto, se ha reportado un contenido más alto de guluronato en partes de la planta con mayor rigidez (Misurcova et al., 2015). Las propiedades físicas de los alginatos, así como la formación de geles, dependen de la proporción relativa de los bloques. La capacidad de los alginatos para formar geles en presencia de iones calcio divalentes es una de sus principales propiedades biofuncionales y tiene una gran relevancia industrial.

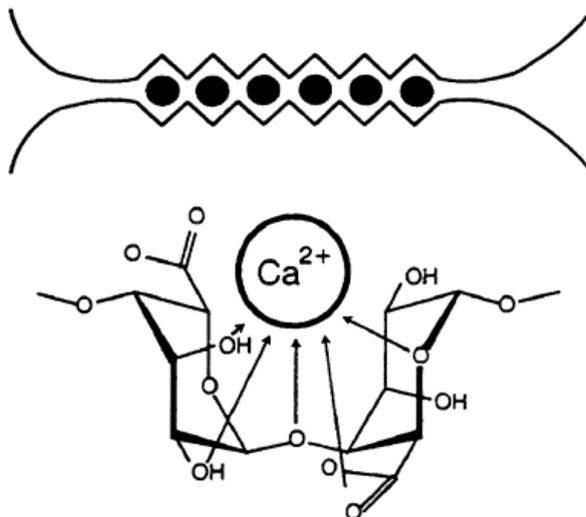
El alginato como sal del ácido algínico es soluble con iones monovalentes ( $K^+$ ,  $Na^+$ ), e insolubles con iones di-/polivalentes. En presencia de  $Ca^{2+}$ , los bloques GG forman complejos iónicos para generar una estructura apilada conocida como el "modelo de caja de huevo" (ver Figura 11), responsable de la formación de gel de consistencia fuerte (Manns et al., 2014).



**Figura 11. Hidrogeles de alginato preparados por reticulación iónica (Modelo de Caja de Huevo)**

Fuente: (Lee & Mooney, 2012)

El método más común para preparar hidrogel a partir de una solución acuosa de alginato es combinar la solución con agentes de reticulación iónicos, tales como cationes divalentes (e.g.  $Ca^{+2}$ ). Se cree que los cationes divalentes se unen únicamente a bloques de guluronato de las cadenas de alginato, ya que la estructura de los bloques de guluronato permite un alto grado de coordinación de los iones divalentes (Lee et al., 2012). Los bloques de guluronato forman uniones con los bloques de guluronato de cadenas poliméricas adyacentes (Figura 12), dando como resultado una estructura de gel, denominada el modelo de reticulación caja de huevo "egg-box-model".



**Figura 12. El modelo caja de huevo para la unión de cationes divalentes con bloques homopoliméricos de residuos de guluronato, como un sitio probablemente de unión en una secuencia GG.**

Fuente: (Draget et al., 2005)

La evaluación de la relación M/G es fundamental para la detección de propiedades del gel. A mayor relación M/G el alginato forma geles elásticos, mientras que a menor relación M/G proporciona geles quebradizos, el valor de la relación puede estar en un rango de 1.2 a 2.1 e incluso proporciones mayores (Manns et al., 2014).

### 2.1.13. Obtención y producción de Alginato

A pesar de los estudios realizados por diversos autores, donde se ha demostrado que pueden obtenerse alginatos mediante fermentación microbiana y modificación post-polimerización de moléculas, todos los alginatos comerciales se obtienen actualmente a partir de fuentes de algas (Niekraszewicz & Niekraszewicz, 2009).

El ácido algínico fue descubierto por primera vez por Stanford en 1881, y las primeras patentes concernientes a la obtención de alginatos de algas fueron publicadas en los años treinta. De manera particular varios autores (Hernández-Carmona et al., 1999; McHugh et al., 2001; Calumpong et al., 1999), han publicado descripciones más específicas del proceso de obtención de alginatos a partir de algas.

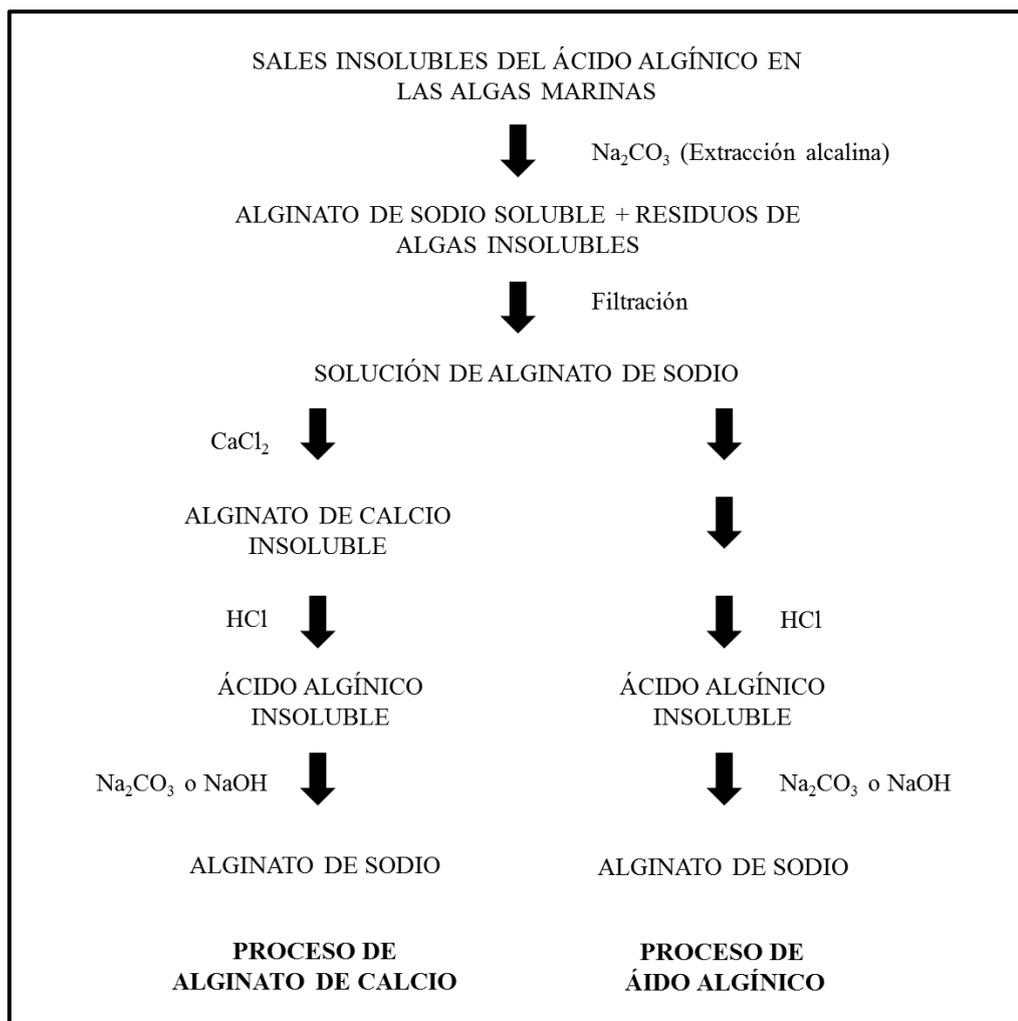
Algunos de los mayores productores de alginatos son la Asociación Industrial

de Algas de China, Danisco Cultor (Dinamarca), Degussa Texturant Systems (Alemania), FMC BioPolymer (EE.UU.), ISP Alginates Ltd (Reino Unido), Kimitsu Chemical Industries Co. Ltd Pronova Biomedical A/S (Noruega). Para el año 2009, la capacidad total de producción de alginato fue de 33 000 toneladas anuales: 16 000 toneladas en Europa, 14 000 toneladas en Asia-Pacífico y 3000 toneladas anuales en las Américas (Niekraszewicz et al., 2009).

Según Wickens G. (2001), la producción de alginato para el 2001, se basaba en *Macrocystis pyrifera* cosechada en los Estados Unidos, *Durvillea sp.* y *Lessonia sp.* de Chile. En países orientales se obtenían pequeñas cantidades de especies de *Ecklonia*, *Eisenia* y *Laminaria japonica*. En Francia la materia prima utilizada es la especie *Laminaria digitata* y, mientras que en el Reino Unido y Noruega se utiliza *L. hyperborea* y *Ascophyllum nodosum*.

Los procesos químicos utilizado para fabricar alginato sódico a partir de algas marrones es relativamente simple. Las dificultades de los procedimientos surgen de las separaciones físicas que se requieren, tales como la necesidad de filtrar residuos de soluciones viscosas o separar precipitados gelatinosos que contienen grandes cantidades de líquido dentro de su estructura y que resisten tanto la filtración como la centrifugación.

Los procesos para la fabricación de alginato sódico (o alginato de sodio, NaAlg) a partir de algas marrones se dividen en dos categorías. La Figura 13 muestra un diagrama sencillo de los procesos, para ilustrar sus diferencias. En uno, los principales productos intermedios son el alginato de calcio y el ácido algínico, mientras que en el otro, no se forma alginato de calcio, solo ácido algínico (McHugh, 1987).



**Figura 13. Diagrama del proceso general de los dos métodos para la extracción de alginato de sodio a partir de algas marinas.**

Fuente: (McHugh, 1987)

Basado en la Figura 13, la ventaja del primer procedimiento (correspondiente al proceso de alginato de calcio), es que el alginato cálcico puede precipitarse en una forma fibrosa que puede separarse fácilmente; de manera que puede convertirse en ácido algínico que es todavía fibroso y también puede separarse fácilmente. Una ventaja adicional a través de esta metodología el fabricante puede controlar la viscosidad del producto (McHugh et al., 1987).

Según explica McHugh et al., (1987), el segundo proceso ahorra un paso, la formación de alginato de calcio, pero también tiene algunas desventajas. Cuando el ácido algínico se precipita en este proceso, forma un precipitado gelatinoso que es muy difícil de separar y las pérdidas globales de ácido algínico son generalmente mayores que en el primer proceso. La eliminación de líquido ("deshidratación")

desde dentro de la estructura de gel del ácido algínico separado presenta también dificultades en este segundo proceso. El contenido de agua en el ácido algínico deshidratado suele ser elevado, por lo que se debe emplear alcohol como disolvente para la conversión en alginato de sodio, esto generalmente hace que el proceso sea más caro.

El costo de los alginatos varía dependiendo del grado de pureza. Se puede obtener alginato de baja pureza y grado técnico (que contiene una cantidad sustancial de desechos de algas) a alrededor de USD 1 por kilogramo, y el alginato ordinario de grado purificado puede obtenerse de aproximadamente 10 USD por kilo, mientras que ultra puro (bajo en endotoxinas), un tipo de alginato especialmente diseñado para fines de inmovilización suele costar alrededor de USD 5 por gramo (Draget et al., 2005).

#### **2.1.14. Usos y aplicaciones del Alginato**

Los alginatos deben considerarse como uno de los polisacáridos más versátiles dado el gran número de aplicaciones diferentes. Estas aplicaciones van de los alimentos a la biomedicina

El alginato se usa típicamente en forma de un hidrogel, para la administración de fármacos, cicatrización de heridas, e incluso aplicaciones de ingeniería de tejidos (Lee et al., 2012)

En aplicaciones médicas, el alginato se emplea como matriz para la encapsulación y/o liberación de células. También se utiliza en forma de micropartículas para sistemas de liberación de antígenos, debido a que es inespecífico, no tóxico y está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA). Además se ha reportado la administración oral de microesferas de alginato debido a que induce una respuesta inmune sistémica y mucosal en una amplia variedad de animales, estas microesferas actúan no sólo como un sistema de liberación, sino también como adyuvantes (Torres et al., 2007). La Tabla 6 muestra algunas aplicaciones biomédicas de células encapsuladas con alginato.

**Tabla 6.****Algunas aplicaciones biomédicas de células encapsuladas con alginato**

<b>Tipo de Célula</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>Células cromafines suprarrenales</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>Hepatocitos</b>	Insuficiencia hepática
<b>Células paratiroides</b>	Hipocalcemia
<b>Islotes Langerhans (<math>\beta</math>-celulas)</b>	Diabetes
<b>Células alteradas genéticamente</b>	Cáncer

**Fuente:** (Draget et al., 2005)

Las aplicaciones industriales del alginato son numerosas. Es ampliamente utilizado como agente emulsionante, espesante y estabilizante en el helado, la pasta de dientes, la industria de la mayonesa, para la separación del suero en las industrias lecheras (Mazumder et al., 2016).

La aplicación técnica más significativa e importante de los alginatos, en términos cuantitativos, es como viscosificante de desintegración por corte, en la impresión textil, en la que el alginato ha ganado gran popularidad, debido a su rendimiento, brillo y nivel de impresión (Draget et al., 2005).

Los alginatos no tienen ningún valor nutricional, sin embargo, a menudo se emplean como aditivos para cambiar y estabilizar la textura de los alimentos. El alginato de polipropilenglicol (PGA), es ampliamente utilizado para suspender la pulpa en bebidas de frutas. También se usa para estabilizar espuma de cerveza, siendo la adición de 50-100 ppm suficiente para reaccionar con la proteína sin ninguna formación de turbidez (Wickens et al., 2001). El gel de alginato de sodio (NaAlg), funcionan de manera apropiada como absorbentes de agua, en aplicaciones higiénicas y farmacéuticas (Draget et al., 2005).

Adicionalmente, la capacidad de los alginatos para inmovilizar células y enzimas se utiliza en la producción: de etanol a partir del almidón, la elaboración de cervecera con levadura inmovilizada, la producción de ácido cítrico, la producción

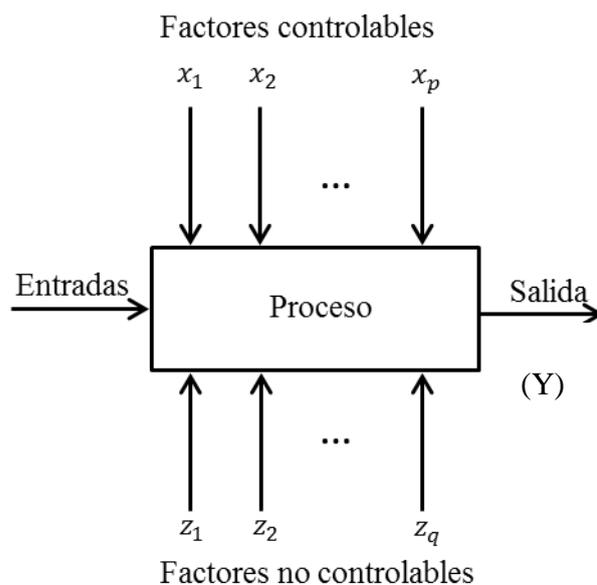
continua de yogur, la producción de prednisolona a partir la hidrocortisona, etc., así como la producción de glicerol a partir de la especie unicelular *Dunaliella tertiolect*. (Wickens et al., 2001)

También se utilizan alginatos en el revestimiento de papel para obtener la uniformidad de la superficie y como agentes de unión en la producción de varillas de soldadura. En este último caso, al proporciona estabilidad en la etapa húmeda y funciona como un plastificante durante el proceso de extrusión. Además dentro de las aplicaciones técnicas, el alginato de amonio se usa frecuentemente como componente en el sellado de latas (Draget et al., 2005).

Finalmente, su propiedad emulsiva hace posible su uso en pinturas de emulsión de caseína, mientras que por sus propiedades de suspensión se utilizan en pulimentos y pinturas para automóviles. Los alginatos de cobre y mercurio son un componente útil de las pinturas submarinas. Los alginatos de metales pesados se pueden disolver en amoniaco, que por evaporación, produce una película impermeable que puede actuar como barniz, mientras que el alginato de cobre amoniacal se emplea con éxito para la impregnación y conservación de la madera. Los alginatos insolubles producto de la reacción entre los alginos crudos y los iones metálicos, se utilizan para formar se utiliza para calderas de calcinación (Wickens et al., 2001).

#### **2.1.15. Diseño experimental**

Para entender correctamente un diseño experimental, es necesario primero tener una buena comprensión del “proceso”. Un proceso es la transformación de entradas en salidas (Figura 14). Por ejemplo en la fabricación de productos, los factores o variables de proceso son: personas, materia prima, máquinas, procedimientos, etc. y los resultados pueden ser características de desempeño (potencia resistencia, etc) o características de calidad de un producto, una salida también puede ser referida como respuesta.



**Figura 14. Modelo general de un proceso o sistema**

Fuente: (Montgomery, 2004)

En la figura 14 se muestra el modelo general de un proceso, al cual se puede denominar “caja negra”, se observa que la salida es el resultado característico que representa la evaluación de dicho proceso. Las variables controlables (representadas por  $x$ ) pueden variar fácilmente durante un experimento y tales variables tienen un papel clave en el desempeño del proceso. Las variables incontrolables (representadas por  $z$ ) son difíciles de controlar durante un experimento. Estas variables o factores son responsables de la variabilidad en el rendimiento del producto o la inconsistencia del rendimiento del producto. Es importante determinar los ajustes óptimos de  $x$  (entrada) para minimizar los efectos de  $z$  (salida) (Jiju, 2014).

Al realizar un experimento diseñado, se hacen intencionalmente cambios en las entradas del proceso, en las variables (o factores), para observar los cambios correspondientes en la salida o respuesta. Si se está tratando con un nuevo proceso de desarrollo de productos, generalmente se hacen cambios en los parámetros de diseño para hacer que el rendimiento de diseño sea insensible a todas las fuentes de variación (Jiju et al., 2014).

El diseño experimental y la optimización son herramientas que se utilizan para examinar sistemáticamente diferentes tipos de problemas que surgen en el desarrollo de determinadas actividades de un proceso. Es obvio que si los experimentos se realizan al azar, el resultado ó resultados obtenidos también serán

aleatorios (Lundstedt et al., 1998). Por lo tanto, es una necesidad planear los experimentos de tal manera que la información obtenida sirva para realizar un análisis objetivo enfocado a las variables deseadas.

El diseño de un experimento (o diseño experimental) según Brebion et al., (2013), es por definición, una secuencia de experimentos organizados para definir con un número mínimo de ensayos y máxima exactitud, la influencia de varios parámetros de proceso sobre uno o más resultados, tales como: costos, eficiencia, rendimiento, pureza, etc.

#### **2.1.16. Selección del diseño experimental**

El diseño experimental se utiliza ampliamente en procesos industriales, así como en la investigación y desarrollo (Lundstedt et al., 1998) con la finalidad de determinar parámetros clave en una línea de proceso, la optimización de la configuración de parámetros y/o la predicción de resultados mediante el establecimiento de un modelo matemático para el proceso.

La metodología de la superficie de respuesta (MSR), fue desarrollada por Box y Wilson en los años 50's. Los autores describen la aplicación de la MSR en procesos químicos (Myers et al., 2016). Este término se originó a partir de la perspectiva gráfica generada después de la aptitud del modelo matemático, y su uso ha sido ampliamente adoptado en textos sobre quimiometría.

La MSR consiste en un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas que se basan en el ajuste de modelos empíricos a los datos experimentales obtenidos en relación con el diseño experimental. Para llevar a cabo la metodología se emplean funciones polinomiales para describir el sistema estudiado y, en consecuencia, explorar (modelar y desplazar) las condiciones experimentales hasta su optimización.

De acuerdo con Almeida-Bezerra et al., (2008), algunas etapas en la aplicación de la MSR como técnica de optimización son: (1) la selección de variables independientes de efectos mayores en el sistema a través de estudios de selección y la delimitación de la región experimental, de acuerdo con el objetivo del estudio y la experiencia del investigador; (2) la elección del diseño experimental y la realización de los experimentos de acuerdo con la matriz experimental seleccionada; (3) el tratamiento matemático-estadístico de los datos experimentales obtenidos mediante

el ajuste de una función polinomial; (4) la evaluación de la aptitud del modelo; (5) la verificación de la necesidad y la posibilidad de realizar un desplazamiento en dirección a la región óptima; finalmente (6) obtener los valores óptimos para cada variable estudiada.

Según Cavazzuti M. (2013) a la Metodología de Superficie de Respuesta se denominan todas aquellas técnicas empleadas para interpolar o aproximar la información proveniente de un diseño de experimentos. Diferentes métodos de interpolación o aproximación (Lineal, no lineal, polinomial, estocástico, etc.) pueden ser empleados para la MRS. La idea es crear una hipersuperficie n-dimensional de interpolación o aproximación en el espacio (n+1)-dimensional dado por las n variables más la función objetivo. El beneficio de esta operación es que es posible aplicar técnicas de optimización de la superficie de la respuesta. La optimización es muy rápida en razón a que se basa en la evaluación analítica de la función de interpolación o aproximación y, si la información procedente del diseño experimental es suficiente, el resultado global del procedimiento de optimización es bastante exacto.

## **2.2. Estado del Arte**

Los trabajos y estudios desarrollados en el Ecuador no están estrechamente relacionados con el presente tema propuesto, principalmente están enfocados al aprovechamiento de la biomasa de tipo algal (microalgas) para la producción de productos como biodiesel y biogas.

A la presente fecha en el Ecuador son escasos los proyectos de investigación relacionados al aprovechamiento de biomasa alga proveniente de las macroalgas o a su vez poseen una muy leve relación con el mismo. De manera específica el trabajo que más se relaciona es el realizado por León F. (1999), en el que se reporta la extracción de alginato a partir de la especie que habita en medio de agua dulce, el trabajo hace uso de microalgas (*Zygnemataceae*) como materia prima para el desarrollo experimental, por el contrario en el presente proyecto se pretende utilizar algas pardas propias de las costas ecuatorianas, para la extracción de alginato con la finalidad de producir ácido láctico a partir del mismo.

En el trabajo de Torres et al., (2007), se investigaron las condiciones para la

extracción de alginato a partir del alga *Sargassum vulgare* una especie de Brasil. El proceso de extracción vario sometiendo a las muestras de 1 a 5 horas a 60°C, para posteriormente purificar los extractos por precipitación con etanol. De acuerdo con la Figura 13 el estudio procedió por la ruta del ácido algínico, debido a que utilizó ácido clorhídrico para liberar el calcio presente en la estructura del alginato, posteriormente se utilizó carbonato de sodio como álcali para sustituir los protones por iones sodio, para finalmente obtener alginato de sodio. Los productos obtenidos se caracterizaron estructural y fisicoquímicamente por análisis elemental y espectroscopia de fluorescencia. Para la determinación de las fracciones de los bloques poliméricos (gulunorato y manuronato)  $F_{GG}$  y  $F_{MM}$ , por los que se conforma el alginato se caracterizaron por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Como resultado se determinó que las condiciones óptimas para obtener los alginatos a partir de *S. vulgare* fueron 60 °C y 5 horas de extracción. En estas condiciones, se extrajo un alginato más viscoso con mayor rendimiento (16,9%) de la biomasa de algas marinas.

Por otra parte Mazumder et al., (2016) estudió la extracción de alginato a partir de la especie *Sargassum muticum* (phaeophyta). En el trabajo se evaluó la relación de factores de extracción mediante análisis de factor único, posterior a la determinación de la región de interés se desarrolló la metodología de superficie de respuesta con diseño rotatorio central compuesto (RSM-CCRD) para reducir y optimizar, la concentración de álcali, tiempo de extracción y el consumo de disolvente. Tras evaluar los resultados, se mostró que el rendimiento óptimo de extracción fue de 13,57%, obtenido con una temperatura de 86°C, a una concentración del álcali al 3% y etanol al 93% como agente precipitante. El modelo matemático obtenido tras el análisis de regresión múltiple fue un polinomio de segundo orden, el rendimiento de extracción predicho mostró un alto coeficiente de ajuste ( $R^2 = 0,98$ ) con respecto al rendimiento experimental de alginato. De los resultados del análisis de factor único se demostró que el tiempo de extracción es una variable crítica para la eficiencia de extracción y rendimiento de alginato. El rendimiento de extracción del polisacárido fue insignificante entre el 50 y 60% de etanol. El rango de precipitación aumentó ligeramente al 70% y alcanzó su máximo entre 90 y 100%.

En cuanto al tratamiento de biomasa para su aprovechamiento, los trabajos de

investigación a nivel mundial para la obtención de compuestos químicos como ácidos orgánicos y biocombustibles haciendo uso de fluidos a elevadas temperaturas y presiones, son extensos. Pese a esto, sólo unos pocos estudios han dado importancia a la conversión de alginato proveniente de macro algas utilizando un procesamiento hidrotermal (Jeon et al., 2016)

De manera general en el trabajo realizado por Aida T. (2012) sobre la producción de ácidos orgánicos a partir de alginato, se reporta que para lograr la obtención de ácidos orgánicos se llevó a cabo tratamiento hidrotérmico de alginato. En la experimentación de la conversión hidrotermal se determinó la obtención de ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido glicólico, ácido 2-hidroxibutírico, ácido succínico, ácido málico, ácido manurónico y ácido gulurónico. El rendimiento total y máximo de ácidos orgánicos fue 46% en un medio a 350 °C, 40 MPa y 0,7 segundos tiempo de reacción.

Jeon W. (2016), evaluó el alginato derivado de macroalgas, como posible materia prima (biomasa) para la producción de ácido láctico en condiciones hidrotérmicas elevadas, utilizando óxidos metálicos como catalizadores en base sólida. Como medio catalíticos se utilizaron varios óxidos metálicos (CaO, ZnO, ZrO<sub>2</sub>, CeO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y TiO<sub>2</sub>). Del estudio se concluye que el catalizador de CaO exhibió el mayor rendimiento catalítico, produciendo ácido láctico alrededor de 13% en condiciones de 200 °C de temperatura durante 1 hora, mientras que otros catalizadores de óxido de metálicos presentaron poca actividad.

Dentro del área de la aplicación de los fluidos sub y supercríticos se puede destacar el trabajo de Bicker M. (2005), en el que se propone la obtención de ácido láctico por medio de la conversión hidrotermal de carbohidratos en un sistema de reacción continuo bajo condiciones subcríticas; en el mencionado trabajo se estudia el rendimiento de ácido láctico obtenido tras la adición de iones metálicos en forma de sales para incrementar el rendimiento. Las sales de Co (II), Ni (II), Cu (II) y Zn (II), se usaron en pequeñas cantidades como catalizadores, en el estudio se demostró que el rendimiento de ácido láctico aumenta hasta 42% a partir de sacarosa como alimentación y 86% a partir de dihidroxiacetona, a condiciones de 300 °C y 25 MPa. De donde se concluye que el sulfato de zinc (Zn<sup>2+</sup>), dio los mejores resultados con respecto al rendimiento de ácido láctico.

De los trabajos de investigación mencionados, se evidencia que la obtención de ácidos orgánicos y en específico ácido láctico, es posible bajo medios de reacción severos e incluso con la adición de catalizadores para mejorar el rendimiento de los productos de interés sin embargo la experimentación a condiciones severas conlleva a utilizar equipamiento de costo relativamente alto, para alcanzar condiciones de trabajo de presión y temperatura como las ya señaladas.

Los trabajos realizados sobre la obtención de alginatos a partir de algas marrones poseen diferentes enfoques en el estudio de la extracción de alginatos. En general, estos procesos implican pre-tratamiento de la muestra (lavado, secado y molienda), tratamiento decolorante, tratamiento ácido, digestión alcalina, separación de fases, precipitación y secado. Las condiciones reportadas en la literatura varían de acuerdo a la especie a tratar, algunas de las condiciones descritas para la extracción de alginatos se resumen en la Tabla 7, así como también se reporta el rendimiento obtenido por cada autor. De los estudios presentados en la Tabla 7, todos los autores siguen la metodología del proceso del ácido algínico de acuerdo con el diagrama de (McHugh et al., 1987) (Figura 13). Sin embargo Vauchel P. (2008), utiliza  $H_2SO_4$  (0,5M) como el medio ácido para la remoción del calcio de la estructura del alginato, mientras que para la extracción alcalina utiliza carbonato de sodio al igual que los demás autores.

El alginato puede extraerse eficientemente usando condiciones de alta temperatura que varían de 50 a 90 °C con soluciones de carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ), como medio básico, durante lapsos de tiempo que van de 1 a 5 horas. Dependiendo del requerimiento, para la obtención de la sal del alginato o del ácido algínico, en la precipitación se emplea un solvente alcohólico o ácido clorhídrico (HCl) respectivamente.

**Tabla 7.**  
**Condiciones reportadas en la fase de extracción alcalina, para la obtención de alginatos a partir de algas pardas**

Espece de Alga	Método	Rendimiento %	Referencia
<i>Sargassum muticum</i>	Extraída a una temperatura de 86°C, con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> al 3% durante 3 horas, precipitado con etanol.	13.57	Mazumder et. al, (2016)
<i>Sargassum turbinarioides</i>	Extraída a una temperatura de 100°C, con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> al 2% durante 3 horas, precipitado con etanol.	10.00	Fenoradosoa et. al, (2010)
<i>Laminaria digitata</i>	Extraída a una temperatura de 20°C, con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> al 4%, precipitado como ácido algínico	33.00	Vauchel et. al, (2008)
<i>Laminaria digitata</i>	Extraída a una temperatura de 40°C, con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> al 2% durante 5 horas, precipitado con etanol.	40.10	Fertah et. al, (2014)
<i>Sargassum vulgare</i>	Extraída a una temperatura de 60 y 80°C, con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> al 2% durante 5 horas, precipitado con etanol.	16.9	Torres et. al, (2007)
<i>Turbinaria decurrens</i>	Extraída con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> al 0,75% durante 5 horas, precipitado como ácido algínico	25.5	Subramanian et. al, (2015)

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA

El objetivo principal de este tópico es la descripción de la metodología aplicada, para la recolección de la materia prima que será sometida al procesamiento planteado en el presente proyecto. Se describe a continuación las actividades involucradas a la recolección, tratamiento de muestras y las actividades pertenecientes a la fase de extracción. Además, se describirá la metodología para el análisis y comparación del producto obtenido (alginato de sodio) con un material de referencia.

#### 3.1. Materiales y equipos

##### 3.1.1. Reactivos

Los reactivos adquiridos fueron utilizados sin previa purificación.

- Sigma Aldrich ®

Sal de sodio de ácido algínico (CAS 9005-38-3)

- Merck ®

Formaldehido (37%, ACS, Reag. Ph Eur)

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

Carbonato de sodio (EMSURE® ISO. CAS No. 497-19-8)

- Otros

Etanol (96%)

Agua destilada

##### 3.1.2. Equipos

En el presente trabajo de titulación se utilizaron los equipos disponibles en el Laboratorio de petroquímica de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE-Latacunga, detallándolos a continuación los más importantes:

- Espectrómetro infrarrojo FT-IR accesorio de muestreo universal ATR-PerkinElmer, modelo Frontier
- Analizador Termogravimétrico– Perkin Elmer, modelo Pyris 1 TGA
- Calorímetro Diferencial de Barrido DSC- Mettler Toledo, modelo **DSC1 STAR®** System
- Agitador mecánico- Boeco, modelo OSD-20
- Centrifugadora- Boeco, modelo C-28A
- Estufa – Boeco Isotherm OFA

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Recolección de las algas**

Las muestras de algas (algas pardas) seleccionadas para el desarrollo del trabajo experimental fueron recolectadas tomando en cuenta su constitución química en base a las revisiones bibliográficas técnico-científicas realizadas con anterioridad en el presente trabajo.

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 la especie se encuentra en la zona béntica, es decir que la vegetación se encuentra sumergida en lugares más profundos pueden ser atrapadas mediante un garfio o cualquier tipo de gancho pesado o un rastrillo sujetado a una cuerda, la desventaja se presenta al utilizar estas herramientas, es que estos son propensos a dañar las plantas, debido a que pueden abrir o desgarrar los tubérculos o rizomas, que podría ser útil en la identificación de plantas.

Alternativamente el buceo es también uno de los métodos eficiente de la topografía vegetación acuática sumergida (Allen et al., 2009), Al ser un método costoso que requiere de profesionales que sean lo suficientemente calificados con experiencia, no se optó por la mencionada práctica de recolección

Las especies fueron recolectadas en el mes de Febrero del año 2017. Las muestras recolectadas en 3 diferentes playas de la provincia de Manabí, se fotografiaron en el lugar de recolección (Anexo 1-8), además también se realizó geo-

referenciación del lugar de muestreo, emulando lo realizado en varios trabajos relacionados (Munier et al., 2013; Ozgun & Turan, 2015), con fines de reproducibilidad de la práctica recolectiva y fiabilidad de muestreo.

### **3.2.2. Tratamiento de muestras**

Después de la recolección, las algas fueron lavadas para la remoción de arena, epífitos y otro tipo de material no deseado con agua corriente, al igual que la metodología empleada por Polat S. (2008) y Ozgun S. (2015). Luego, se transportó apropiadamente en recipientes plásticos hasta el laboratorio, localizado en la ciudad de Latacunga, emulando el procedimiento realizado por Ozgun S. (2015) y Yaich H. (2015).

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) a 60 °C hasta alcanzar un peso constante.

Después de alcanzar un peso constante, las muestras secas se molieron usando un procesador de alimentos marca UMCO durante 2,5 minutos, como lo realizado por (Yaich et al., 2015), el material particulado obtenido presentó diferentes tamaños de partícula.

La manera más sencilla de separar material sólido particulado de diferente naturaleza, es empleando un clasificador granulométrico, que consiste en un conjunto variable de platos contenedores de mallas con diferente separación del entramado.

Para trabajar con un tamaño de partícula definido y homogéneo, se empleó un tamizador analítico RESTCH gM8h con 5 niveles (incluida la base), los tamaños seleccionados fueron de Mesh 10, 20, 40 y 60 (Anexo 8). Se utilizaron esferas de homogenización para ayudar a la mejor distribución del material durante las vibraciones del tamizaje. En el primer nivel se empleó 4 esferas de homogenización, mientras que en los tres niveles restantes se empleó 3 esferas. Los ensayos de tamizaje se llevaron a cabo por triplicado para el material de la playa de Puerto Cayo y Machalilla, cada ensayo partió con una masa 40 gramos, que representa el 100% de la muestra.

Finalmente las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas selladas hasta posteriores análisis, adoptando el procedimiento realizado por (Gómez Ordóñez, 2013), en el cual menciona que las muestras molidas se almacenan en bolsas de plástico permitiendo su conservación y almacenamiento hasta 3 años de caducidad a temperatura ambiente (25°C) en un área oscura, el mencionado modo de conservación es confiable y fue realizado también, por Yaich H. (2015).

Las macroalgas utilizadas con fines taxonómicos se recolectaron y transportaron de manera adecuada, posteriormente fueron lavadas a fondo con agua destilada, y para su conservación se colocaron de acuerdo a dos métodos: el primero en una solución de formaldehído al 4% y el segundo en etanol al 70% sin embargo en la preservación con etanol se espera la descoloración como lo describe Diaz-Pulido G. (2008)

### **3.2.3. Identificación de la especie**

Para presentar resultados claros, es necesario identificar científicamente las especies de algas marinas con la que se pretende trabajar en los ensayos analíticos y pruebas experimentales en el presente proyecto.

Dependiendo de las habilidades de los miembros del equipo de recolección, las plantas, bien pueden ser identificadas en el sitio de recolección con guías de campo dependiendo de la disponibilidad, o más tarde con la ayuda del personal calificado (Allen et al., 2009).

Para la identificación del orden taxonómico, se utilizó información específica para el reconocimiento de las especies de algas como la encontrada en el sitio web *Algabase*, que sirve para la determinación taxonómica de las especies de acuerdo a los estatus (división, clase, género, familia, especie, etc). Además, bibliografía (Taylor et al., 1945) relacionada a la identificación de las especies existentes en el Ecuador de acuerdo con sus características morfológicas, en conjunto con la información disponible en el sitio web mencionado son herramientas útiles para definir la especie a utilizar en el presente proyecto.

### **3.2.4. Metodología de extracción de alginatos**

De acuerdo con Mazumder et al., (2016), la extracción de alginato consta de

cinco etapas: pre-tratamiento ácido, extracción alcalina, separación de fases sólido-líquido, precipitación del extracto y secado. El proceso descrito de manera general corresponde a la ruta del ácido algínico de acuerdo con lo resumido por McHugh et al., (1987) en la *Figura 13*. Se adoptarán el proceso de extracción descrito por Mazumder et al., (2016), realizando leves modificaciones, para la obtención de alginato a partir de algas pardas ecuatorianas.

Las algas recolectadas en las playas de Machalilla se utilizaron para el presente estudio. En todos los tratamientos se utilizó un gramo de Mesh 20 de material algal previamente tratado (lavado, secado, molido y tamizado). La metodología de extracción consiste en:

Remojar las algas secas, en formaldehído al 0,2% durante 24 horas a temperatura ambiente (20°C aprox.) con la relación de 1,5ml de solución por cada gramo de alga seca, para atrapar los pigmentos presentes en la pared celular.

Lavar el lecho de la biomasa con agua destilada varias veces (recomendable más de 3), luego añadir ácido clorhídrico (HCl) para promover el intercambio iónico Ca/H (Lorbeer et al., 2015), convirtiendo las sales algínicas insolubles en ácido algínico.

Posteriormente lavar las algas acidificadas a fondo con agua destilada, para digerir la biomasa añadiendo carbonato sódico en solución acuosa durante un tiempo y temperatura determinado. La relación de volumen de la solución alcalina vs. la masa de alga seca debe ser de (50ml/g) de acuerdo experimentaciones previas y las reportadas por Hernández-Carmona G. (1999). Las condiciones de extracción alcalina fueron llevadas a cabo como lo establecido en el diseño experimental.

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% (1:2 v/v) como lo sugiere Zubia M. (2008). La masa precipitada se recoge y disuelve en agua destilada, para ser agitada durante 12 horas. La solución generada se precipita

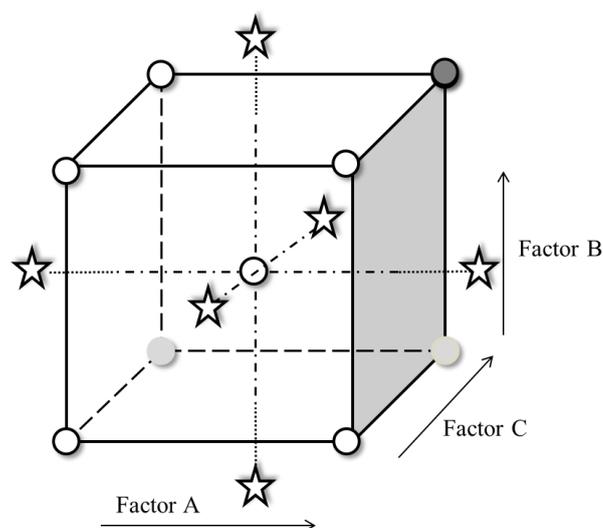
nuevamente usando una solución nueva de etanol al 96%.

La fracción precipitada (fibras de alginato) se seca a 50°C hasta mantener un peso constante (durante 24 horas).

### 3.3. Diseño Experimental

Con el fin de investigar la influencia y la interacción de los parámetros de extracción específicos, además de optimizar el proceso de extracción se estableció un diseño experimental de metodología de respuesta de superficie (Response Surface Methodology, MSR) del tipo de Diseño Central Compuesto Rotable (DCCR).

El Diseño Central Compuesto Rotable o Rotatorio, idealmente consiste en evaluar 15 experimentaciones diferentes como se muestra en la Figura 15. Del total de las experimentaciones, ocho son combinaciones con los niveles superior e inferior (vértices del cubo), 6 corresponden a las combinaciones de los distanciamientos axiales ( $\pm\alpha$ ), y finalmente un punto central. Sin embargo adicionalmente a las 15 combinaciones propias del diseño, se sugiere agregar puntos centrales, que sirven para determinar y generalizar la desviación estándar (error experimental) para todas las corridas. Al aplicar diseños de superficie de respuesta es necesaria la formación de bloques para eliminar las variables perturbadoras, como por ejemplo condiciones ambientales (Montgomery et al., 2004), que difieren del momento en que se realizan las experimentaciones.



**Figura 15. Representación gráfica de las experimentaciones en el Diseño Central Compuesto Rotatorio para tres factores**

Luego de haber realizado una revisión del estado del arte en cuanto al proceso de obtención de alginato a partir de algas, para el presente estudio se seleccionaron 3 factores (temperatura, tiempo y concentración del álcali) estrechamente relacionados en la fase denominada “extracción alcalina”. Los óptimos sugeridos por la literatura (Mazumder et al., 2016; Vauchel et al., 2008; Fenoradosoa et al., 2010; Calumpong, 1999; Torres et al., 2007) y por experimentaciones previas, se establecieron como puntos centrales, para los factores temperatura (A), tiempo (B) y concentración del álcali (C), denotado como (0; 0; 0). El punto central, por ejemplo se ajustó a 67°C (temperatura de calentamiento) durante 2 horas (tiempo de digestión de la biomasa) en una solución alcalina al 2%.

Todos los experimentos requeridos se resumen en la matriz llamada "Matriz de diseño D". La matriz de diseño experimental del Diseño Compuesto Central fue generada por el software Design-Expert 10.0 (Stat-Ease, Inc., USA) que se presenta en la Tabla 8. Esta matriz consta de dos bloques (semanas de extracción) con un total de 20 corridas, de las cuales 14 experimentaciones son combinaciones diferente y seis puntos centrales. Los valores de los parámetros correspondientes a cada factor de estudio se expresan como nivel inferior, central y superior (-1; 0; 1) respectivamente, mientras que los distanciamientos incorporados en el diseño adoptado (factor alfa,  $\pm\alpha$ ), son representados por  $a$  y  $A$ , respectivamente. Cada fila explica el arreglo a seguir con el nivel de cada parámetro y el resultado esperado para la respuesta ( $Y_i$ ). Cada arreglo sugiere un patrón guía denotado con los niveles de cada configuración.

**Tabla 8.**

**Matriz de diseño planteada para el diseño experimental del presente estudio.**

Corrida	Patrón	Bloque	A (°C)	B (horas)	C (% m/V)	Y (%)
MA01	++-	1	76,5	3	1	Y1
MA02	+++	1	76,5	1	3	Y2
MA 03	+--	1	76,5	1	1	Y3
MA 04	+++	1	76,5	3	3	Y4
MA 05	--+	1	57,5	1	3	Y5
MA 06	000	1	67	2	2	Y6
MA 07	---	1	57,5	1	1	Y7

CONTINÚA→

MA 08	++	1	57,5	3	3	Y8
MA 09	+-	1	57,5	3	1	Y9
MA 10	000	1	67	2	2	Y10
MA 11	000	1	67	2	2	Y11
MA 12	00A	2	67	2	3,633	Y12
MA 13	00a	2	67	2	0,367	Y13
MA 14	0A0	2	67	3,7	2	Y14
MA 15	000	2	67	2	2	Y15
MA 16	000	2	67	2	2	Y16
MA 17	0a0	2	67	0,4	2	Y17
MA 18	A00	2	82,5	2	2	Y18
MA 19	000	2	67	2	2	Y19
MA 20	a00	2	51,5	2	2	Y20

En la Tabla 9 se muestra las tres variables significativas con los valores reales que se evaluaron en cinco niveles codificados ( $-\alpha$ , -1, 0, +1 y  $+\alpha$ ) utilizando el diseño de fracción completa en dos bloques. Los rangos de factores se introdujeron en términos de alfa ( $\alpha$ ) con un valor de 1,6330 (Montgomery, 2004).

**Tabla 9.**  
**Variables independientes y sus niveles usados en el diseño de respuesta de superficie del presente estudio**

	Factores	Variables Codificadas				
		$-\alpha$	-1	0	1	$\alpha$
<b>Variables naturales</b>	Temperatura (C°)	51,5	57,5	67	76,5	82,5
	Tiempo (hrs.)	0.4	1	2	3	3.7
	Porcentaje álcali (%)	0.367	1	2	3	3.633

Los coeficientes de la ecuación de tercer orden se ajustaron a la respuesta resultante del DCC por la metodología de Medios de Mínimos Cuadrados. El diseño se expresó mediante la ecuación de regresión polinómica para generar el modelo como se muestra a continuación:

$$Y_{i,j,k} = \sum \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{iii} x_i^3 + \sum \sum \sum \beta_{ijk} x_i x_j x_k + \varepsilon \quad (3)$$

Donde  $Y$  es el rendimiento estimado de alginato medido como porcentaje del producto obtenido en base seca,  $x_i$  es el valor codificado o natural de una variable independiente, los  $\beta'_s$  son los coeficientes de regresión, y  $\varepsilon$  es el error experimental

derivado de la metodología. La adecuación de este modelo fue confirmada por el análisis de varianza, ANOVA.

El software Design-Expert 10.0, también se utilizó para realizar pruebas estadísticas para el modelo (significancia, falta de ajuste y coeficiente de correlación  $R^2$ ). Además, la evaluación por el análisis de regresión de los coeficientes del modelo cúbico sirvió para probar su significación. Un modelo de esta naturaleza generalmente se considera aceptable si alcanza el 95% de significancia (valor  $P < 0,05$ ), y su coeficiente de correlación es suficientemente alto ( $R^2 > 0,8$ ) (Lorbeer et al., 2015).

### 3.4. Métodos analíticos

#### 3.4.1. Rendimiento

El alginato en forma de fibras secado durante 24 horas se pesó para la determinación del rendimiento en base seca. El rendimiento de alginato expresado en porcentaje peso/peso se calculó usando la siguiente fórmula.

$$\begin{aligned} & \text{Rendimiento de alginato (\%)} \\ &= \frac{\text{peso del extracto seco}}{\text{peso inicial de la muestra de alga seca}} * 100 \quad (4) \end{aligned}$$

Para la determinación del rendimiento de cada tratamiento se utilizó el valor exacto de la masa proporcionada por la balanza analítica.

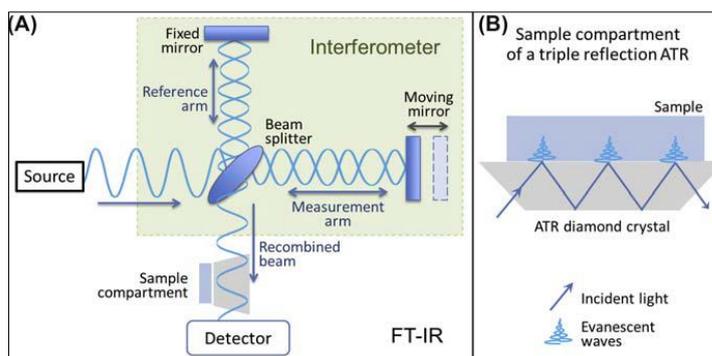
#### 3.4.2. Espectroscopia vibracional FT-IR ATR

La espectroscopia infrarroja es la técnica vibratoria más utilizada para el estudio de productos naturales (Pereira et al., 2013). Las bandas de los grupos funcionales particulares de la muestra absorben la radiación infrarroja de frecuencias específicas del haz y ésta se representa como un espectro de absorbancia contra el número de onda (Pereira et al., 2015). Básicamente la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) permite obtener información específica sobre la presencia de grupos funcionales en las muestras a analizar, principalmente en la región  $4000$  a  $600 \text{ cm}^{-1}$  (Fu et al., 2014).

Recientemente, la técnica de Reflectancia Total Atenuada (ATR) ha revolucionado el análisis de muestras sólidas y líquidas, en razón a que elimina los

inconvenientes del análisis infrarrojo, como la preparación de muestras y la reproducibilidad espectral (Daoub et al., 2016). El accesorio ATR mide los cambios que ocurren en un haz infrarrojo internamente, totalmente reflejado cuando entra en contacto con la muestra, mejorando la versatilidad de los sistemas infrarrojo IR, permitiendo obtener espectros a partir de la superficie de un material (Downey, 2016).

El accesorio ATR se coloca entre el divisor de haz y el detector en la trayectoria de señal. Consiste en un cristal de alto índice de refracción que contacta directamente con la muestra. El haz IR entra en el cristal con un ángulo predeterminado, alcanza la interfaz del cristal y la muestra, y se refleja completamente de nuevo en el cristal (Figura 16). En el punto de reflexión, se produce una onda evanescente que penetra en la muestra y se absorbe, aunque esta onda penetra mínimamente en la muestra los dispositivos ATR permiten muchos puntos de contacto entre la muestra y el haz IR, lo que da como resultado la absorción por la muestra en cada punto de reflexión (Downey et al., 2016).



**Figura 16. Diagrama esquemático de un espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR) (A) y detalles del interferómetro de Michelson, con el accesorio de muestreo atenuado de reflectancia total (ATR) (B).**

Fuente: (Downey, 2016)

Esta técnica, es directa y fiable, la absorción infrarroja es eficiente y se puede obtener un buen espectro infrarrojo a partir de una pequeña cantidad de muestra (en el orden de los miligramos) (Fu et al., 2014). La intensidad de absorción infrarroja depende del cambio del momento dipolar durante la vibración molecular. De este modo, se observan las señales IR más fuertes para las vibraciones que implican grupos funcionales polares (con momento dipolar permanente), tales como el grupo

OH (por ejemplo, en agua y carbohidratos (Pereira et al., 2015).

Las muestras de alginato de sodio en forma de polvo se secaron a 50°C durante 3 horas en un horno convectivo, previo a su análisis. Se utilizó como referencia el alginato de sodio adquirido a Sigma-Aldrich. Todos los espectros se registraron a temperatura ambiente (20°C), en la región de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  por espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier con modo de 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 (Anexo 5). Para cada análisis se estableció un número total 64 escaneos con resolución espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ ; con una velocidad de desplazamiento de los espejos de 0.2  $\text{cm/s}$ . Se utilizó el software Quant para el procesamiento de los espectros.

### **3.4.3. Análisis Termogravimétrico (TGA)**

Una técnica simple y precisa para estudiar el patrón de descomposición y la estabilidad térmica de los polímeros es el análisis termogravimétrico (Daoub, Elmubarak, Misran, Hassan, & Osman, 2016). El TGA implica el calentamiento gradual de la muestra en una atmósfera inerte ( $\text{N}_2$ ) o aire a temperaturas de hasta 1000 °C, mientras se mide la pérdida de peso en función de la temperatura (Koerner, 1990). La pérdida de peso corresponde a la volatilización, descomposición o formación de diversos componentes de la muestra de ensayo. Las pérdidas de peso deben ser inferidas para cada tipo de muestras de acuerdo a literatura específica.

El alginato de sodio (NaAlg) adquirido en Sigma-Aldrich se utilizó como referencia para el análisis y comparación del comportamiento (pérdida de peso) en el análisis termogravimétrico. Los análisis térmicos se realizaron en el equipo Pyris 1 TGA (Anexo 6), con muestras con una masa de entre 1 y 3 mg previamente secados a 50° durante 30 minutos. Se obtuvieron termogramas o curvas de descomposición térmica como gráficos porcentuales de masa en función de la temperatura de calentamiento. Las muestras se calentaron desde la temperatura ambiente hasta los 50 °C a un flujo de nitrógeno de 20 ml/min, seguidamente se mantuvo la temperatura durante 0,5 minutos, luego la muestra fue calentada hasta 900 °C, con un flujo de nitrógeno de 20 ml/min, se mantuvo durante un minuto la temperatura con atmosfera de nitrógeno. Finalmente se mantuvo la temperatura isotérmica durante 3 minutos con un flujo de aire a un caudal de 20 ml/min. Todos los calentamientos dinámicos

fueron llevados a cabo con a una tasa de calentamiento de 10 °C/min.

#### **3.4.4. Calorimetría Diferencial de Barrido**

La Calorimetría de Barrido Diferencial (Differential Scanning Calorimetry o DSC), es una técnica física que monitorea los cambios físicos y químicos en las muestras, que ocurre durante el procesamiento térmico dando curvas únicas para una muestra analizada (Daoub et al., 2016). El DSC ofrece ser un buen método de análisis térmico para detectar cambios en las propiedades físicas y/o químicas de los materiales en función de la temperatura midiendo los cambios de calor asociados con tales procesos. El método consiste en colocar la muestra y una referencia inerte en una cámara de calentamiento, que mide el flujo de calor requerido para mantener la muestra y la referencia a la misma temperatura (Sachan et al ., 2012). Esto da como resultado absorción de calor (reacción endotérmica) o liberación de calor (reacción exotérmica).

Los termogramas DSC de las muestras de alginato de sodio se obtuvieron usando calorímetro diferencial de barrido **DSC 1 STAR®** System (Mettler Toledo, Suiza) (Anexo 7). Las muestras se prepararon de acuerdo con el procedimiento sugerido por el fabricante. Todas las muestras se colocaron en una capsula de aluminio (40 µl), previamente pesada y se sellaron cuidadosamente con un sellador suministrado por el fabricante. Se pesó el recipiente sellado para obtener la masa de la muestra. Se utilizó como referencia una cápsula de aluminio (40 µl) vacía sellada. La muestra se calentó de 25 °C a 550 °C a una velocidad de 10 °C /min, con un flujo de nitrógeno de 90 ml/min.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

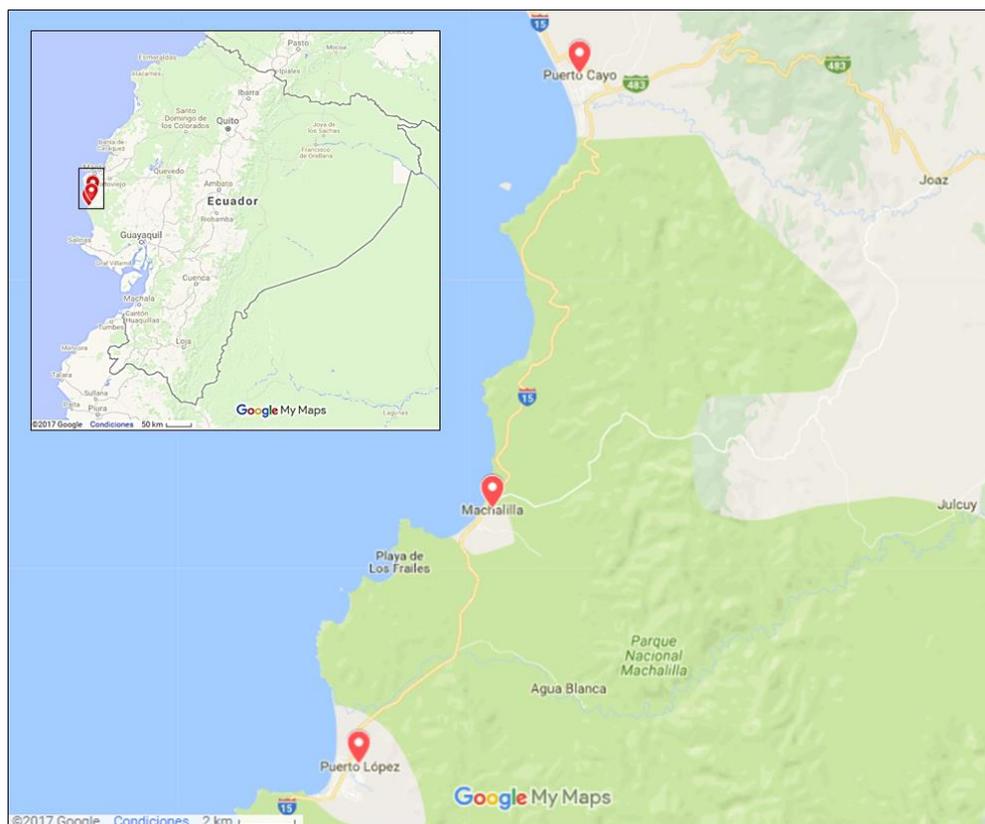
#### 4.1. Recolección de Algas

Las especies de macroalgas a utilizar en el presente estudio fueron recolectadas en tres lugares distintos de las playas de la Provincia de Manabí. Las algas fueron recogidos de manera manual en el mes de Febrero del año 2017, en la playa de Puerto Cayo ( $1^{\circ} 21' 55.98''$  S;  $80^{\circ} 44' 24.91''$  W), Machalilla ( $1^{\circ} 29' 3.99''$  S;  $80^{\circ} 46' 43.91''$  W) y Puerto López ( $1^{\circ} 33' 44.96''$  S;  $80^{\circ} 49' 7.67''$  W), como se muestra en la Figura 17.

Las playas mencionadas están ubicadas al norte de la Provincia de Manabí. Las algas recolectadas en la playa de puerto Cayo se encontraron sobre un sustrato rocoso y arenoso en la zona tidal es decir en la zona en la que marea presenta niveles máximos y mínimos (Anexo 1, 2 y 3).

Las algas recolectadas en la Playa de Machalilla, fueron de las mismas características a las encontradas en la playa de Puerto Cayo especie, sin embargo de tamaño relativamente mayor, el material vegetal (algas) fue encontrado a la orilla libre del material rocoso, sin embargo, se encontraron en conjunto con desechos de cuerdas e hilos de redes propios de la actividad pesquera.

En la playa de Puerto López se encontraron dos tipos de algas (Anexo 3 y Anexo 7), las especies recolectadas se encontraron a la orilla de la playa, de manera similar a la descrita en la playa de Machalilla pero en menor cantidad en comparación a las dos playas anteriores, las especies se encontraron en conjunto con desechos vegetales.



**Figura 17. Ubicación de los sitios de muestreo de algas en las costas de la provincia de Manabí (Ecuador)**

#### **4.2. Tratamiento de muestras**

Los ensayos de tamizaje se llevaron a cabo por triplicado para el material de la playa de Puerto Cayo y Machalilla, cada ensayo partió con una masa 40 gramos, que representa el 100%. En la tabla 10 se muestra el peso promedio expresado en porcentaje de 3 réplicas del tamizaje realizado al material molido durante 2,5 minutos. Se observa que el material algal perteneciente a la playa de Machalilla la mayor cantidad de material (41,72%) se acumuló en el nivel de tamizaje de mesh 10, mientras que para el material de la playa de Puerto Cayo la mayor cantidad (49,41%), fue en el nivel de mesh 20. El material de tanto para Machalilla como para Puerto Cayo presentó menor cantidad en el nivel de mesh 60 (2,25 y 4,03%). El material particulado para la playa de Puerto López no se presenta en los resultados, debido a que no se dispuso del material suficiente para llevar a cabo el tamizaje.

**Tabla 10.****Porcentaje promedio del peso de la muestra del material algal tamizado**

	% Promedio por Playa	
	Machalilla	Puerto Cayo
<b>Mesh</b>	10	41,72
	20	38,47
	40	13,42
	60	2,25
	base	4,15

### 4.3. Identificación de la especie

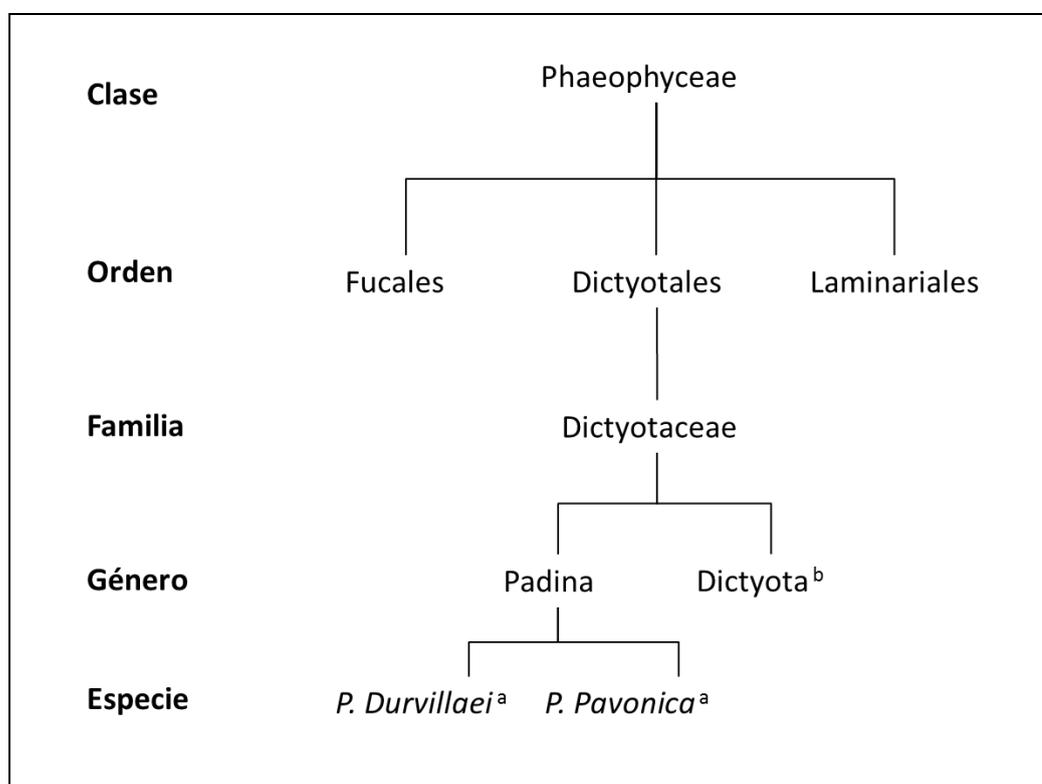
La sistemática macro-álgica para determinar las especies, se basa en las características morfológicas (Díaz-Martínez et al., 2016). Las algas paradas de manera general en cuanto a la morfología son de color marrón u oliváceo, filamentosas o parenquimáticas, de formas muy variadas; que posee pigmentos que enmascaran parcialmente la clorofila (Díaz-Martínez et al., 2016). La identificación de las especies es un trabajo complejo, debido a que las macroalgas suelen tener una alta variación morfológica dentro de cada status taxonómico (clase, orden, familia, género, etc). La Figura 18, muestra una especie recolectada y mantenida en conservación para la identificación taxonómica.



**Figura 18.** Apariencia general de las especies encontradas en las playas ecuatorianas de la provincia de Manabí (Puerto Cayo, Machalilla y Puerto López).

La especie recolectada se identificó de acuerdo a trabajos en relación al estudio de algas marinas realizado en el Ecuador. De acuerdo a la literatura (Flachier et al., 1997; Carvache, 2012), en las costas ecuatorianas se reporta la presencia de especies de la división Phaeophyta, Rhodophyta y Chlorophyta. En cuanto a las especies de interés para el presente trabajo, en la zona litoral del Ecuador las algas pardas referidas como phaeophytas, se han identificado especies pertenecientes al género *Dictyota* y *Padina*.

Según la clasificación taxonómica sugerida por Sharma O. (2007), el género *Dictyota* y *Padina*, reportado por Flachier A. (1997), pertenecen a familia Dictyotaceae que a su vez pertenece a orden de las Dictyotales. Los Dictyotales junto con las Fucales, Laminariales entre otras son órdenes dentro de la clase Phaeophyceae perteneciente a la división phaeopyhta. La Figura 19 muestra un esquema de clasificación general de algunas de algas mencionadas por los Flachier A. (1997) y Carvache K. (2012) en el Ecuador según su género.



<sup>a</sup> Especie reportada por Flachier A. (1997);

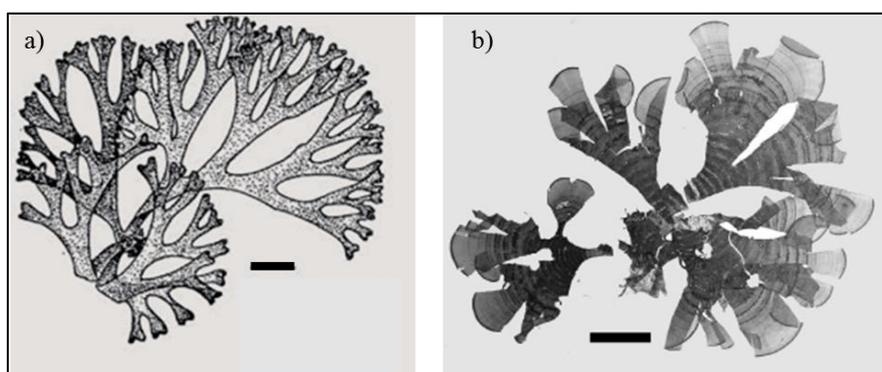
<sup>b</sup> Especie reportada por Carvache K. (2012).

**Figura 19. Clasificación de las especies de algas pardas reportadas en la zona litoral del Ecuador.**

A modo de comparación, la especie mostrada en la Figura 18, posee un aspecto similar a las especies del género *Dictyota* y *Padina*, reportadas por Carvache K. (2012) y Flachier A. (1997). Conociendo que ambas especies pertenecen al orden y familia de las Dictyotales y Dictyotacea respectivamente; es importante establecer las diferencias específicas de cada estatus para determinar el género al que pertenece la especie recolectada.

Refiriéndose a la morfología de las algas de la familia Dictyotaceae son plantas de tamaño moderado de uno a varios ejes que surgen de una base (agarre almohadillado), aunque también surgen sobre un soporte en el suelo o superficie del hábitat (Taylor et al., 1945). Por lo general su estructura comienza 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 (Taylor et al., 1945).

El género *Dictyota* es común en partes tropicales del Océano Pacífico, las frondas son planas, regularmente dicotómicamente ramificadas en ángulos de 15-45 grados. A diferencia de *Dictyota*, las frondas de las especies de *Padina* (por ejemplo, *Padina antillarum*) son en forma de abanico (Dawes, 2016). La Figura 19.a y 19.b muestran la forma descrita para las especies de ambos géneros.



**Figura 20. Aspecto general de las especies del orden Dictyotales: a) *Dictyota menstrualis*; b) *Padina antillarum*, (barra = 2cm).**

**Fuente:** (a) (Dawes et al., 2016) y (b) (Díaz-Martínez et al., 2016)

De acuerdo con lo descrito, las especies recolectadas de manera general se infiere que son algas pardas de la división Phaeophytas, debido a su color marrón como se aprecia en la Figura 18. Al tener un soporte bibliográfico se define que las especies pertenecen a la familia Dictyotaceae debido a sus ramificaciones,

independientemente de la forma y terminaciones de las mismas. Finalmente de acuerdo con (Taylor, 1945), se concluye que las especies pertenecen al género *Padina* en razón a que sus frondas son planas algo plegadas, en forma de abanico, divididas en segmentos estrechos, incluyendo que sus terminaciones son del tipo redondas como lo menciona (Dawes et al., 2016); por el contrario en las especies del género *Dictyota* presentan terminación dentadas (Taylor et al., 1945). Además de la descripción morfológica, se concuerda con Taylor W. (1945), quien menciona que las especies de este tipo son sésiles, es decir que crecen adherido o arraigado en su sustrato, razón por la cual las especies presentan calcificación, es decir deposición de material arenoso sobre las superficies del alga (Anexo1, 2 y 3).

#### 4.4. Extracción de alginato

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos (rendimiento) tras llevar a cabo los diferentes tratamientos pre-establecidos en el diseño experimental. Como se determinó en el diseño experimental previamente, el diseño está conformado por dos bloques que contienen seis repeticiones en los puntos centrales (3 por cada bloque) representados por las corridas MA 6, 10, 11, 15,16 y 19. El patrón guía mostrado en la Tabla 11, representa la codificación de las combinaciones establecidas en el diseño experimental. Sin embargo los valores correspondientes a la temperatura de extracción no son los exactamente definidos por la matriz de diseño original (Tabla 8), en razón a que el sistema de reacción ensamblado empíricamente no proporciona un control de temperatura adecuado, en cuanto a los valores de los factores B y C, debido a su naturaleza, se puede asegurar su valor de acuerdo a la matriz de diseño original.

**Tabla 11.**

**Datos experimentales de la extracción para el ajuste del modelo**

Corrida N°	Patrón guía	Bloque	A (°C)	B (horas)	C (%)	Rendimiento (%)
MA 01	++-	1	75	3	1	22,99
MA 02	+++	1	75	1	3	23,57
MA 03	+-	1	74	1	1	16,81
MA 04	+++	1	76	3	3	26,55

CONTINÚA→

<b>MA 05</b>	--+	1	57,5	1	3	<b>17,94</b>
<b>MA 06</b>	000	1	67	2	2	<b>22,14</b>
<b>MA 07</b>	---	1	57,5	1	1	<b>15,98</b>
<b>MA 08</b>	+++	1	57,5	3	3	<b>21,77</b>
<b>MA 09</b>	-+-	1	57,5	3	1	<b>20,17</b>
<b>MA 10</b>	000	1	68	2	2	<b>23,04</b>
<b>MA 11</b>	000	1	66,5	2	2	<b>21,71</b>
<b>MA 12</b>	00A	2	67	2	3,63	<b>25</b>
<b>MA 13</b>	00a	2	67	2	0,36	<b>8,25</b>
<b>MA 14</b>	0A0	2	67	3,7	2	<b>21,56</b>
<b>MA 15</b>	000	2	66,5	2	2	<b>21,7</b>
<b>MA 16</b>	000	2	67	2	2	<b>22,04</b>
<b>MA 17</b>	0a0	2	67	0,4	2	<b>15,12</b>
<b>MA 18</b>	A00	2	83,5	2	2	<b>24,68</b>
<b>MA 19</b>	000	2	67	2	2	<b>22,27</b>
<b>MA 20</b>	a00	2	52	2	2	<b>19,45</b>

A: Temperatura; B: tiempo y C: concentración del álcali.

#### 4.5. Ajuste del modelo matemático y análisis estadístico

Tras el análisis de los datos experimentales, se determinó que el modelo matemático de tercer orden, correlaciona de mejor manera la respuesta con los tres factores experimentales. Se seleccionó la ecuación cubica debido a que presenta mejor ajuste con respecto a la de segundo orden. El valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para el modelo cúbico fue mayor (0,9994), comparado con el modelo cuadrático ( $R^2= 0,8776$ ). La relación matemática entre el rendimiento de alginato (Y) y los factores codificados A, B y C (temperatura, tiempo y concentración del álcali, respectivamente) se expresa en la ecuación siguiente:

$$\begin{aligned}
\text{Rendimiento (Y \%)} & \\
&= 21,15 + 8,46A + 1,91B + 4,98C + 0,25AB \\
&+ 5,38AC - 1,98BC + 0,21A^2 - 1,35B^2 - 1,95C^2 \\
&- 1,89ABC + 0,34A^2B + 28,00A^2C - 5,79AB^2 \\
&- 26,71B^2C - 2,58A^3
\end{aligned} \tag{5}$$

En donde el factor A representa la temperatura, el factor B y C representan el tiempo y la concentración del álcali respectivamente. La ecuación en términos de factores codificados se puede utilizar para hacer predicciones sobre la respuesta para los niveles dados de cada factor. Por defecto, los niveles superiores de los factores se codifican como +1 y los niveles inferiores de los factores se codifican como -1. La ecuación codificada es útil para identificar el impacto relativo de los factores comparando los coeficientes de los factores. La importancia de las variables y sus efectos se puede explicar por la magnitud y el signo de los coeficientes en consecuencia. Haciendo referencia a la Ecuación 4, cada variable independiente en el presente estudio ejerció un efecto positivo hacia el rendimiento de alginato. A modo de comparación, el coeficiente del factor A (8,46) es mayor que el coeficiente del factor C (4,98), lo que indica que la temperatura de digestión (A) es más importante que la concentración del álcali (C) utilizada durante el proceso de extracción alcalina. A su vez el valor del coeficiente del factor B (1,91), lo que indica que el tiempo de extracción es de menor importancia en comparación a los dos otros factores.

Los resultados reales y estimados por el modelo de regresión se resumen en la Tabla 12. De los valores presentados en la tabla a continuación se observa claramente que la diferencia algebraica entre el valor real experimental y el valor predicho por el modelo cubico no supera la unidad. El signo negativo indica que el valor estimado por el modelo es superior al valor real, mientras que un valor positivo del residuo indica que la estimación está por debajo del valor real experimental.

**Tabla 12.**

**Comparación de valores reales y estimados para el rendimiento de la extracción.**

<b>Corrida</b>	<b>Rendimiento Real (%)</b>	<b>Rendimiento Predicho (%)</b>	<b>Residuo</b>
MA 01	22,99	23,10	0,00
MA 02	23,57	23,49	-0,02
MA 03	16,81	16,65	-0,03
MA 04	26,55	26,69	0,02
MA 05	17,94	17,94	0,00
MA 06	22,14	22,15	-0,01
MA 07	15,98	15,98	0,00
MA 08	21,77	21,76	0,01
MA 09	20,17	20,16	0,01
MA 10	23,04	23,04	0,00
MA 11	21,71	21,71	0,00
MA 12	25,00	25,08	-0,08
MA 13	8,25	8,82	-0,57
MA 14	21,56	21,67	-0,11
MA 15	21,70	21,71	-0,01
MA 16	22,04	22,15	-0,11
MA 17	15,12	15,43	-0,31
MA 18	24,68	24,74	-0,06
MA 19	22,27	22,15	0,12
MA 20	19,45	20,81	-0,09

Se realizó el Análisis de Varianza Mutlifactores ANOVA, para evaluar los efectos de las variables experimentales y sus posibles interacciones. El análisis de varianza indicó que el modelo es estadísticamente válido con un “valor p” inferior a 0,0001 y además con un alto valor de  $R^2$  como se muestra en la Tabla 13

El valor de  $R^2$  del modelo fue de 0,9999 indicando un alto grado de correlación entre los valores experimentales y predichos. El modelo con un valor F de 2390,52 implica que el modelo es significativo. Los valores p inferiores a 0,0500 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso A, B, C, AB, AC, BC,  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$ , ABC,  $A^2B$ ,  $A^2C$ ,  $AB^2$ ,  $B^2C$ ,  $A^3$ , son términos significativos del modelo ( $p < 0.05$ ), mostrados en la Tabla 13.

**Tabla 13.**  
**Análisis de ANOVA del modelo RSM –DCCR**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
<b>Modelo</b>	318,54	15	21,24	2390,52	< 0.0001
<i>A-Temperatura</i>	0,59	1	0,59	66,78	0,0038
<i>B-Tiempo</i>	20,74	1	20,74	2334,35	< 0.0001
<i>C-Álcali</i>	140,28	1	140,28	15791,51	< 0.0001
<i>AB</i>	0,31	1	0,31	34,52	0,0098
<i>AC</i>	2,62	1	2,62	294,83	0,0004
<i>BC</i>	2,92	1	2,92	328,42	0,0004
$A^2$	0,33	1	0,33	36,72	0,0090
$B^2$	10,87	1	10,87	1223,60	< 0.0001
$C^2$	22,86	1	22,86	2573,74	< 0.0001
<i>ABC</i>	2,60	1	2,60	292,90	0,0004
$A^2B$	0,24	1	0,24	27,05	0,0138
$A^2C$	1,75	1	1,75	197,29	0,0008
$AB^2$	0,61	1	0,61	68,69	0,0037
$AC^2$	0,000	0			
$B^2C$	2,28	1	2,28	256,41	0,0005
$BC^2$	0,000	0			
$A^3$	0,39	1	0,39	44,22	0,0069

CONTINÚA→

$B^3$	0,000	0	
$C^3$	0,000	0	
<b>Error puro</b>	0,027	3	0,00888
<b>Correc. Total</b>	330,68	19	

**Coefficiente de variación (% CV) = 0,46;  $R^2$  = 0,9999;  $R^2$  ajustado = 0,9995; Desviación estándar = 0,094.**

De acuerdo con Montgomery et al., (2004) el coeficiente de variación mide la variabilidad no explicada o residual de los datos como un porcentaje de la media de la variable de respuesta, en base a lo mencionado un valor CV bajo (0,46), indica claramente que el modelo es reproducible y fiable.

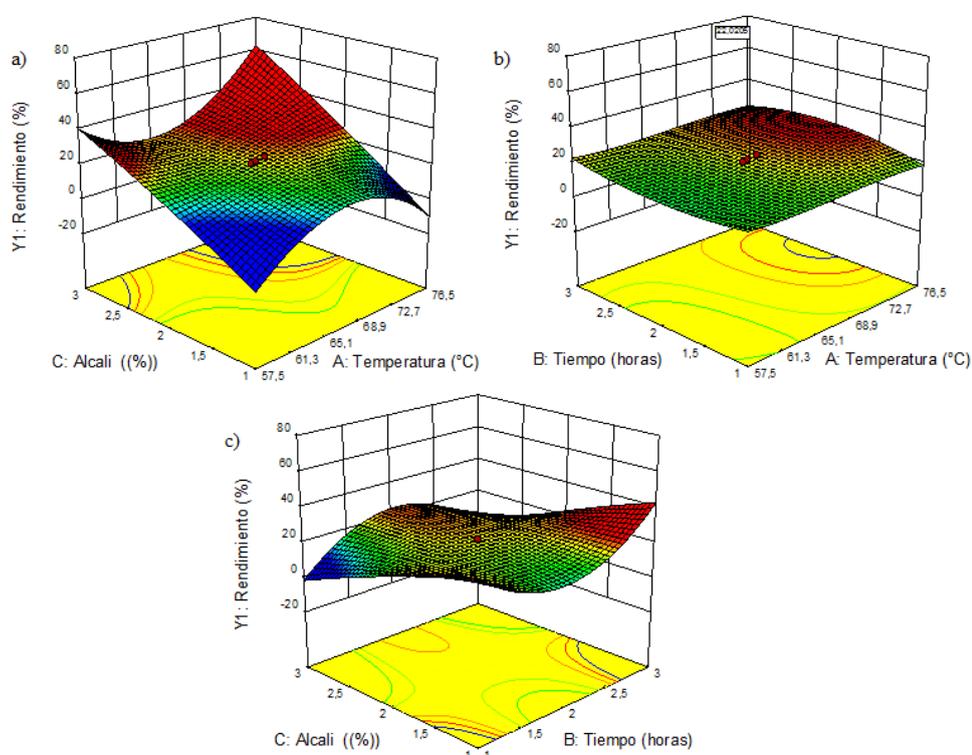
#### **4.6. Mejoramiento de modelo matemático y definición de las condiciones óptimas de extracción de alginato**

La mejor manera de expresar el efecto de cualquier parámetro sobre la respuesta dentro del espacio experimental bajo investigación es generar gráficos de superficie de respuesta de la ecuación determinada. La ecuación polinomial de tercer orden ajustada, se expresó en forma gráficos tridimensional (ver Figura 21). Las superficies de respuesta se representaron utilizando el software Design-Expert (State-Ease, versión 10), con el fin de ilustrar la relación entre las respuestas y los niveles experimentales de cada variable.

En la Figura 21 se presentan los resultados del rendimiento de extracción de alginato afectado por la temperatura, tiempo y concentración del álcali empleados en la extracción. Las curva se construyen al mantener una de las variables constantes en el nivel intermedio (0), mientras los dos factores independientes van variando entre los rangos superior e inferior (+1;-1). De las gráficas de superficie que relaciona temperatura y tiempo de extracción frente al rendimiento (Figura 21.a), se puede apreciar que el valores máximos de rendimiento (62,97%) sugeridos por el modelo están direccionados hacia mayor el empleo de mayor temperatura y mayor concentración del álcali. De la misma manera en la representacion del tiempo y concentracion del álcali frente al rendimiento (Figura 21.c), sugiere que a mayor tiempo y concentración se obtendría un mayor rendimiento de extracción (42,23%). Sin embargo, las condiciones evaluadas sugeridas como óptimo por el modelo de tercer orden (76,5 °C; 2 horas; álcali al 3%), dan como resultado un rendimiento

21,83% (promedio de dos experimentaciones), muy por el contrario del valor predicho (62,97%).

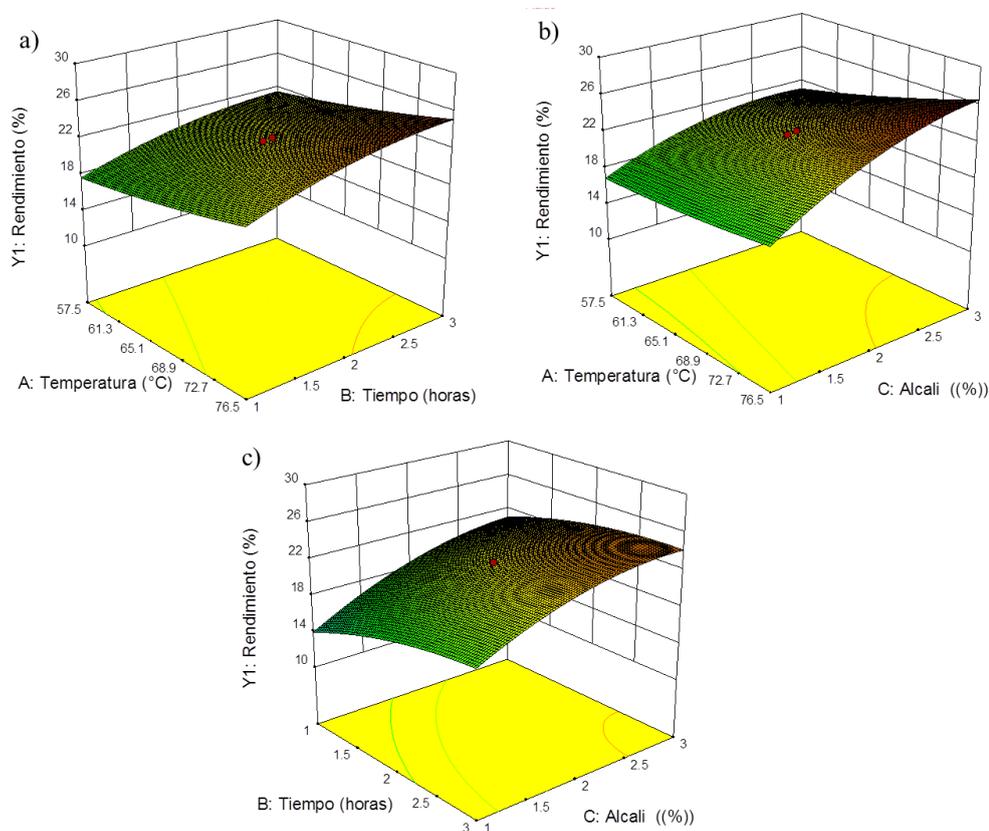
En el presente trabajo de manera general, la expresión polinomial de tercer orden la correlación provee un muy buen ajuste de los datos obtenidos en la extracción de alginato (temperatura, tiempo, concentración del álcali, y porcentaje de rendimiento). A pesar que el modelo cúbico ofrece un factor de determinación cercano a 1 ( $R^2 = 0,9999$ ), la expresión matemática parece no predecir resultados no pertenecientes a las condiciones experimentales del estudio, tal es la razón de los saltos bruscos de rendimiento observados en las Figuras 21.a y 21.c.



**Figura 21.** Gráficas de superficie (3-D) generadas a partir del modelo cúbico, que muestra el efecto de la temperatura de extracción(A), tiempo de extracción (B) y porcentaje de álcali (C) en el rendimiento de extracción de alginato.

Para comparar el comportamiento del modelo cúbico frente al modelo cuadrático, obtenido de la regresión de los datos experimentales se presentan las curvas de superficie del modelo de segundo orden (Figura 22). Al analizar las curvas de superficie obtenidas por el modelo cuadrático, se observa que los óptimos sugeridos se obtendrían al experimentar con condiciones máxima de operación, de manera similar a lo sugerido por el modelo cúbico en cuanto a temperatura y

concentración del álcali. La representación de superficie de temperatura-concentración del álcali vs rendimiento de extracción mostrada en la Figura 22.b, sugiere que el óptimo se encontraría al experimentar en la región a 76°C y álcali al 3%, para obtener un rendimiento del 26,31%.



**Figura 22. Gráficas de superficie (3-D) generadas a partir del modelo cuadrático, que muestra el efecto de la temperatura de extracción(A), tiempo de extracción (B) y porcentaje de álcali (C) en el rendimiento de extracción de alginato.**

Para mejorar el ajuste del modelo matemático de segundo orden y generar gráficas de contorno elípticas o circulares que permitan determinar las condiciones óptimas de extracción, se decidió realizar tres ajustes para la nueva regresión ANOVA, que involucra lo descrito a continuación:

- (i) Establecer una nueva área de estudio a partir del direccionamiento sugerido por el modelo cuadrático y cúbico.

Conociendo la dirección del área de estudio (condiciones de experimentación), que se debe evaluar para hallar el óptimo del rendimiento de extracción sugerida tanto por el modelo cuadrático y cúbico, se decidió construir una nueva área de

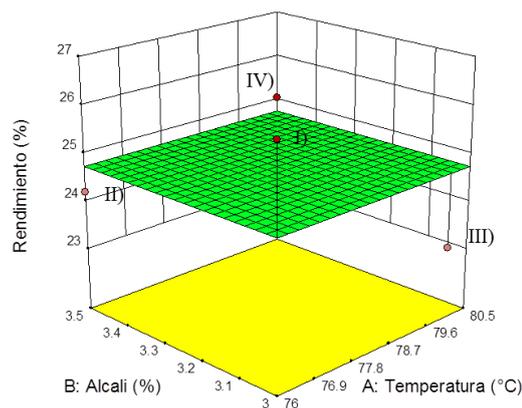
estudio a partir del punto que dio mayor resultado (76°C, 3 horas y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 3%). Los cuatro ensayos correspondientes a la nueva área de estudio se muestran en la tabla 14 conjuntamente con los resultados obtenidos de las experimentaciones. Todos los ensayos se llevaron a cabo a tres horas (tiempo de digestión) para simplificar el análisis de efecto de los factores sobre el resultado. La Figura 23 representa gráficamente los resultados obtenidos de las experimentaciones propuestas, en donde el plano es la media de extracción (24,75%) de las cuatro experimentaciones. El punto superior del frente (I) representa una resultado experimental (26.55%) correspondiente a la evaluación de extracción a 76°C, 3horas con álcali al 3% (ver Tabla 11). Se definió un incremento de 4 °C en el factor temperatura así como un incremento de 0,5 % en la concentración del álcali. De los 4 tratamientos el ensayo I exhibe el mayor rendimiento de extracción (26.55%).

**Tabla 14.**

**Tratamientos propuestos en la nueva área de estudio**

<b>Tratamiento</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Álcali (%)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b>I</b>	76	3	26,55
<b>II</b>	76	3,5	24,21
<b>III</b>	80	3	23,18
<b>IV</b>	80	3,5	25,06

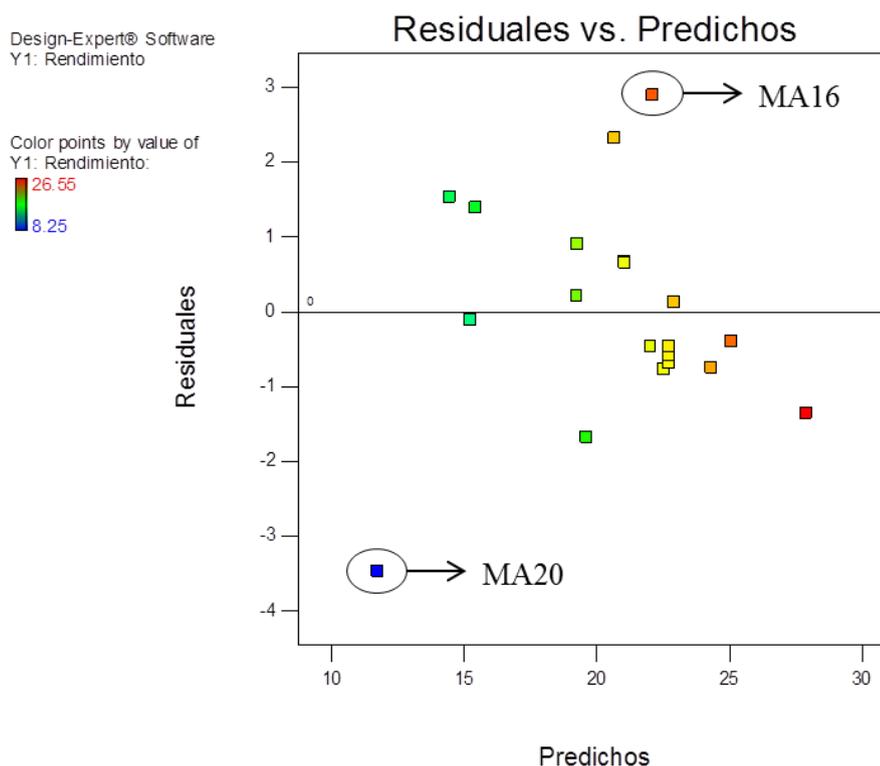
Comparando el ensayo I y II ambos extraídos a 76 °C pero a diferentes concentraciones de álcali. Se observa que al aumentar la concentración a 3.5 % (Tratamiento II) no existe un incremento sobre el rendimiento de extracción, por el contrario la respuesta exhibe un descenso (23.47%). Al comparar los extractos III Y IV ambos obtenidos a 80 °C. El tratamiento IV llevado a cabo con mayor concentración de álcali 3.5 % muestra mayor rendimiento (25.01%), que el extracto III (23.18%) el cual fue obtenido con álcali al 3%. Posiblemente los tres tratamientos exhiben un decremento de rendimiento debido a que tales condiciones experimentales sobrepasaron la región del óptimo.



**Figura 23. Resultados obtenidos en la nueva área de estudio.**

- (ii) Determinar la distorsión (ruido) en el modelo matemático por medio del análisis el error residual.

La figura 23 muestra los valores residuales vs el valor predicho de cada tratamiento. Los puntos extremos (azul y rojo) observados en la Figura 24 corresponden a los tratamientos efectuados a las mismas condiciones de temperatura y tiempo ( $67^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas), pero con diferentes concentración de álcali. El extracto MA16 se utilizó carbonato de sodio al 3.633%, mientras que para el extracto MA20 se utilizó carbonato al 0.367%. De los resultados, se determinó que los distanciamientos axiales correspondientes a las extracciones MA16 y MA20, que dan como resultado de rendimiento 25 y 8.25 % respectivamente, son los tratamientos que ocasionan perturbación en el modelo matemático de segundo orden debido a la magnitud de su valor como resultado. Sin embargo, la naturaleza de los resultados de los extractos MA16 y MA20, posee lógica y son explicables, en razón a que existe una diferencia aproximada de 10 veces entre cada tratamiento en términos de concentración. Para lograr un mejor ajuste del modelo se propuso remover los resultados de los dos tratamientos que ocasiona la perturbación.



**Figura 24. Análisis residual de los tratamientos.**

- (iii) Generación de un nuevo modelo de orden cuadrático, modifican puntos en la matriz de diseño.

La Tabla 15 muestra el conjunto de datos experimentales empleados para obtener el modelo matemático de segundo orden. El mejoramiento del ajuste de la expresión polinomial cuadrática se logró, agregando los tres puntos del área de estudio planteada anteriormente descrita, manteniendo tres puntos centrales y removiendo dos puntos correspondientes a combinaciones axiales que generaban la perturbación, como ya se describió en la sección anterior.

**Tabla 15.**

**Datos experimentales utilizados para el mejoramiento del modelo cuadrático**

Corrida	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Álcali (%)	Rendimiento experimental (%)
1	75	1	3	23.57
2	57.5	1	3	17.94
3	76	3	3	26.55
4	57.5	1	1	15.98

**CONTINÚA→**

5	75	3	1	22.99
6	74	1	1	16.81
7	57.5	3	3	21.77
8	57.5	3	1	20.17
9	52	2	2	19.45
10	83.5	2	2	24.68
11	67	3.7	2	21.56
12	67	2	2	22.14
13	67	0.4	2	15.12
14	75	3	3.5	24.21
15	80	3	3.5	25.06
16	67	2	2	22.04
17	67	2	2	22.27

La Ecuación 6 representa la expresión matemática de segunda orden obtenida del software Desig Expert™ (versión 10.0), se muestra a continuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = 23,03 + 1,61A + 2,03B + 1,68C - 0,16AB + 0,67AC - 0,54BC - 0,31A^2 - 1,55B^2 - 1,15C^2 \quad (6)$$

Donde, A, B y C son los valores codificados de las variables independientes, temperatura de extracción (°C), tiempo de extracción (horas) y porcentaje de álcali (%), respectivamente, de acuerdo con la codificación de factores mostrados en la Tabla 9.

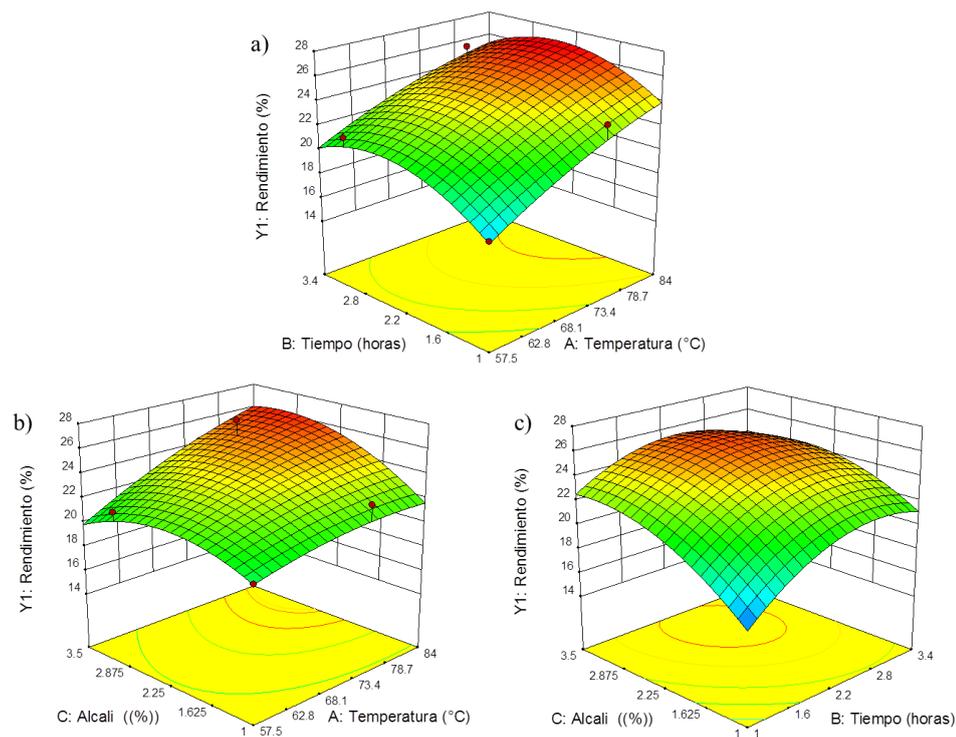
El análisis de varianza obtenido del software Design Expert se muestra en la Tabla 16. Se determinó que el modelo es significativo ( $p < 0.001$ ). Los valores P inferiores a 0,0500 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso A, B, C y  $B^2$  son términos de modelo significativos. Los valores superiores a 0,1000 indican que los términos del modelo no son significativos. Si hay muchos términos de modelo insignificantes la eliminación de dichos términos, puede mejorar el modelo. El coeficiente de determinación  $R^2 = 0.9568$ , indica una mayor correlación del modelo cúbico en comparación al coeficiente de correlación del modelo cuadrático original ( $R^2 = 0.8763$ ), verificando que los cambios realizados mejoraron el ajuste de modelo cuadrático.

**Tabla 16.**

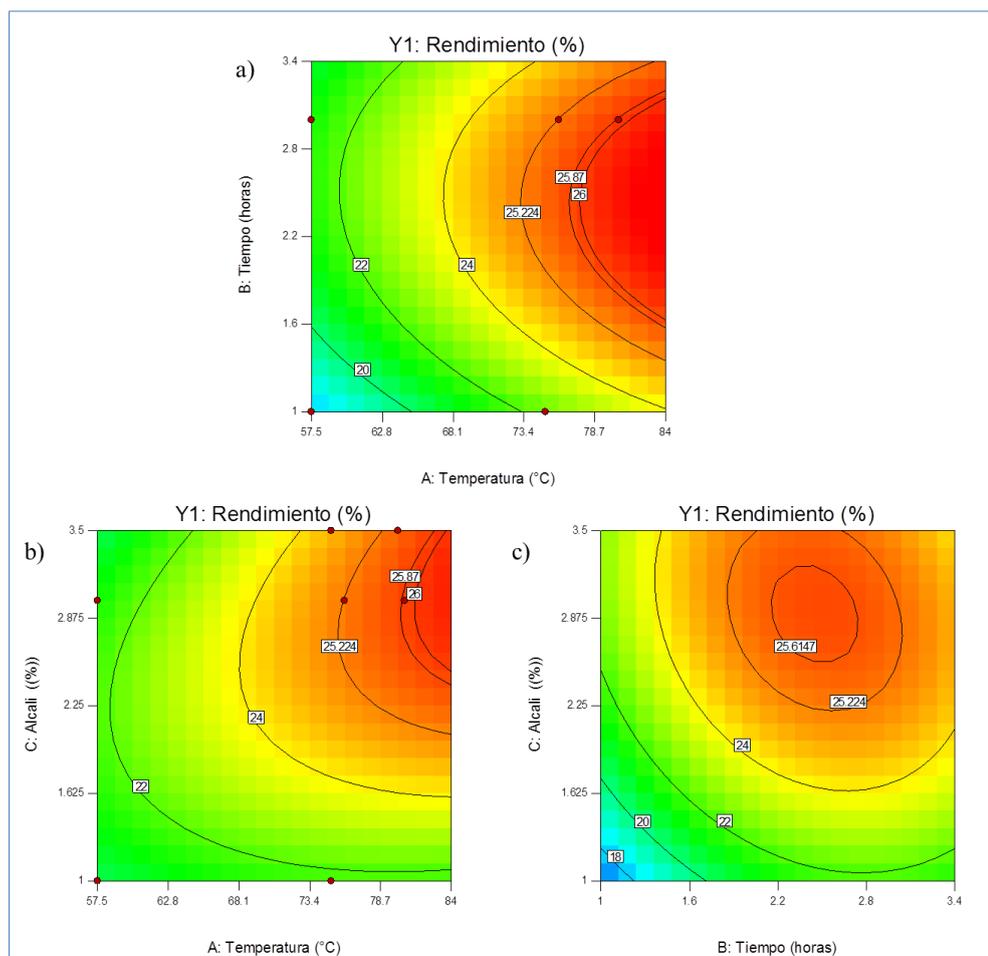
**Análisis de varianza para el modelo polinomial cuadrático mejorado para la extracción de alginato**

	Suma de cuadros	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
<b>Modelo</b>	163.70	9	18.19	17.23	0.0006
<i>A-Temperatura</i>	33.19	1	33.19	31.44	0.0008
<i>B-Tiempo</i>	55.46	1	55.46	52.54	0.0002
<i>C-Álcali</i>	22.52	1	22.52	21.33	0.0024
<i>AB</i>	0.18	1	0.18	0.17	0.6887
<i>AC</i>	3.29	1	3.29	3.12	0.1208
<i>BC</i>	2.34	1	2.34	2.22	0.1802
<i>A<sup>2</sup></i>	1.01	1	1.01	0.96	0.3605
<i>B<sup>2</sup></i>	21.92	1	21.92	20.77	0.0026
<i>C<sup>2</sup></i>	3.67	1	3.67	3.47	0.1046
<b>Residual</b>	7.39	7	1.06		
<i>Falta de ajuste</i>	7.36	5	1.47	110.71	0.0090
<i>Error Puro</i>	0.027	2	0.013		
<b>Correc. Total</b>	178.02	17			
<b>Coeficiente de variación (% CV) = 4,8; R<sup>2</sup> = 0,9568; R<sup>2</sup> ajustado = 0,9013; Desviación estándar = 1,03.</b>					

Se construyeron nuevas graficas 3D de la superficie de respuesta conjuntamente con las gráficas de contorno para ilustrar el efecto de las variables sobre el rendimiento de extracción. Las curvas de respuesta de superficie mostradas en la Figura 25 fueron obtenidas del software Design Expert™, se construyen al variar el valor de dos factores, mientras el factor restante se mantuvo en un valor correspondiente al nivel superior de acuerdo con la codificación de variables mostrada en la Tabla 9.



**Figura 25.** Las gráficas de respuesta de superficie (a, b, c) que muestran el efecto de la temperatura de extracción, el tiempo de extracción y la concentración de álcali sobre el rendimiento de extracción de alginato.



**Figura 26.** Las gráficas de contorno (a, b, c) que muestran el efecto de la temperatura de extracción, el tiempo de extracción y la concentración de álcali sobre el rendimiento de extracción de alginato.

Como se observa en la Figura 25, la tendencia cuadrática es levemente más marcada en las tres gráficas. La Figura 26 muestra las curvas de contorno del efecto de los tres factores temperatura, tiempo y concentración del álcali sobre el rendimiento de extracción de alginato. De las gráficas de contorno se puede definir una combinación de condiciones para alcanzar la región de extracción óptima, encerrada o cercana a las curvas elípticas. Sin embargo debido a que las curvas son construidas al establecer el valor de una variable independiente, es necesario determinar el valor numérico general aplicando métodos numéricos. Se utilizó Matlab® para la maximización de la expresión polinomial descrita por la Ecuación 6. Los valores arrojados por el programa en términos de las variables codificadas y su equivalencia en variables naturales se muestran en la Tabla 17, conjuntamente con los valores de las condiciones sugeridas por las gráficas de contorno.

La función de respuesta (rendimiento de extracción), fue maximizada sin restricción alguna, el valor arrojado fue de 28,00 %. Sin embargo debido a limitaciones técnicas propias del sistema de reacción, se decidió agregar como restricción a la maximización numérica un valor límite de temperatura de 84°C, bajo estas condiciones el valor de respuesta predicho por el modelo cuadrático fue de 26,83 %.

**Tabla 17.**

**Condiciones sugeridas para alcanzar el rendimiento óptimo**

Fuente	Factor			Respuesta
	A	B	C	
Graficas de contorno 26.a	(>77.3)	(1.6-3.2)	1 (3)	26
Graficas de contorno 26.b	(>81.3)	1(3)	(>2.6)	26
Graficas de contorno 26.c	1 (76)	(2,2 – 2,8)	(2,5-3)	25,61
Maximización sin restricción	4,95 (104,52)	0,025 (2,025)	2,13 (4,13)	28,00
Maximización con restricción de temperatura	1,73(84)	0,36 (2.36)	1,14(3,14)	26,83
Tratamiento MA04	0,95 (76)	1 (3)	1 (3)	26,55

A: Temperatura (°C); B: tiempo (horas) y C: concentración del álcali (%); Respuesta: Rendimiento de extracción (%).

El valor entre paréntesis muestra el valor natural del factor.

Finalmente, el valor sugerido como óptimo por la maximización de la función de segundo orden (Ecuación 6) es la combinación de factores de 84°C de Temperatura, 2,36 horas y álcali al 3,14%. Sin embargo considerando la variación que puede sufrir la respuesta (rendimiento), es decir  $\pm \epsilon$  (error experimental), se define que las condiciones determinadas como óptimas, son las evaluadas por el tratamiento MA04 que involucra digerir la muestra a 76°C de temperatura, durante 3 horas con carbonato de sodio al 3%, para alcanzar un rendimiento de 26,55%, en razón a que estadísticamente si se considera el valor del error experimental ( $\pm 0,46$ ), el rendimiento obtenido de 26,55%  $\pm (\epsilon)$  puede estar en el rango del valor de la optimización numérica(26,83%). Por ende no es significativo elevar la temperatura 6 °C, ni tampoco incrementar la concentración del álcali hasta 3,14%, pese un descenso de 0,74 horas en el tiempo de extracción.

#### 4.7. Análisis espectroscópico FT-IR ATR

La espectroscopía vibracional se aplicó como una técnica fácil y rápida no destructiva, con el fin de identificar las bandas características de los grupos funcionales en el alginatos y sus fracciones (ácido manurónico y ácido gulurónico). La figura 22 muestra el espectro IR del alginato de referencia en el rango de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . En la Tabla 14 se muestran los picos característicos del estándar de alginato de sodio utilizado para comparar con los extractos obtenidos. El detalle de los bandas características se describe a continuación.

De acuerdo con Gómez-Ordóñez E. (2011) y El Atouani S. (2016), en la región de 4000-2000  $\text{cm}^{-1}$  se presentan dos bandas que generalmente se encuentran en los polisacaridos así como en algas secas, la primera señal (pico 1) centrada alrededor de 3258,02  $\text{cm}^{-1}$ , por el enlace hidrogeno O-H (vibraciones de estiramiento) y la segunda (pico 2) más pequeña y débil a 2928,21  $\text{cm}^{-1}$  debido a vibraciones de estiramiento C-H.

Según los resultados de Gómez-Ordóñez et al., (2011), el ácido algínico en forma de ácido libre o alginato en forma de sal sódica presentan siete a ocho bandas características en el rango de 2000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . En la tabla 14 se resumen las bandas características las bandas en el rango de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  de tres tipos de alginato, dos extractos y el alginato comercial. El alginato MA7 fue extraído a 57°C, durante 1 hora con álcali al 1%, mientras que el alginato MA4 fue extraído a 76 °C, durante 3 horas con alcalia al 3%. El alginato de referencia fue adquirido a Sigma-Aldrich (EE.UU).

**Tabla 18.**

**Asignación de las bandas para los espectros de alginato de sodio**

<b>Longitud de onda de los picos (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>				
	<b>MA7</b>	<b>MA4</b>	<b>Referencia</b>	<b>Asignación de las bandas</b>
<b>1</b>	3251,85	3252,94	3258,02	O-H banda de estiramiento (enlace de hidrogeno intermolecular)
<b>2</b>	2935,84	2932,97	2928,21	C-H estiramiento
<b>3</b>	1599,06	1601,68	1597,52	O-C-O estiramiento asimétrico
<b>4</b>	1407,73	1407,82	1405,85	O-C-O estiramiento simétrico,

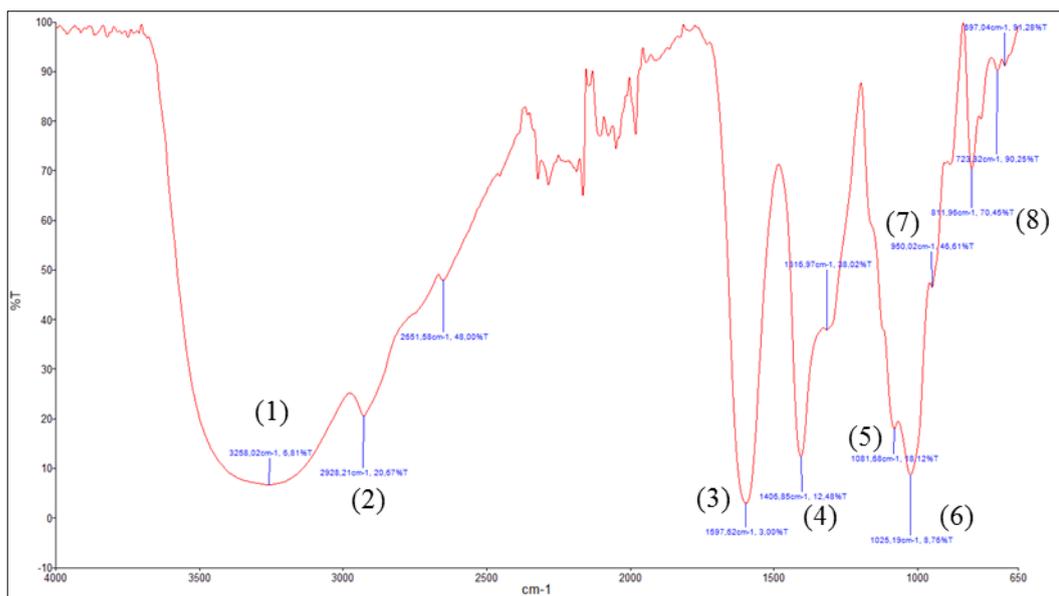
**CONTINÚA**→

5	1082,43	1083,72	1081,68	C-OH contribución por deformación O-H estiramiento de flexión, debido al ácido gulurónico
6	1025,05	1023,95	1025,19	C-O-C estiramiento, debido al ácido manurónico
7	948,5	947,60	950,02	C-O-C estiramiento
8	805,44	808,96	811,96	residuos de ácido manurónico

La banda 3 a  $1597,52\text{ cm}^{-1}$  corresponde a una banda de éster carboxílico, este grupo carbonilo O–C–O se encuentra en forma de anión carboxilato ( $\text{COO}^{-1}$ ) para el caso del alginato (Leal et al., 2008). En el ácido algínico, el estiramiento del grupo carboxílico protonado (C=O) se produce a  $1730\text{ cm}^{-1}$ , cuando el protón se desplaza por un ion monovalente (sodio) los picos aparecen aproximadamente a  $1600$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  (Sellimi et al., 2015).

Según la literatura (Gómez-Ordóñez et al., 2011; Fenoradosoa et al., 2010), se asigna la banda 4 a  $1405,85\text{ cm}^{-1}$  a una vibración de deformación C-OH con contribución de la vibración de estiramiento simétrica O-C-O del grupo carboxilato. Las bandas 5 y 6 a  $1081,68\text{ cm}^{-1}$  y  $1025,19\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, se pueden asignar a las vibraciones de estirado C-O y C-C del anillo de piranosa (Gómez-Ordóñez et al., 2011).

La región anomérica (entre  $950$  a  $750\text{ cm}^{-1}$ ) es la más discutida en los carbohidratos. Esta región mostró dos bandas características (7 y 8) en las muestras de alginato ( $950,02$  y  $811,96\text{ cm}^{-1}$ ). El espectro muestra la banda 7 a  $950,02\text{ cm}^{-1}$  que se asignó a la vibración de estiramiento C-O de residuos de ácido urónico. La banda 8 a  $811,96\text{ cm}^{-1}$  se pueden atribuir a los residuos de ácido manurónico (Leal et al., 2008) (Fenoradosoa et al., 2010).

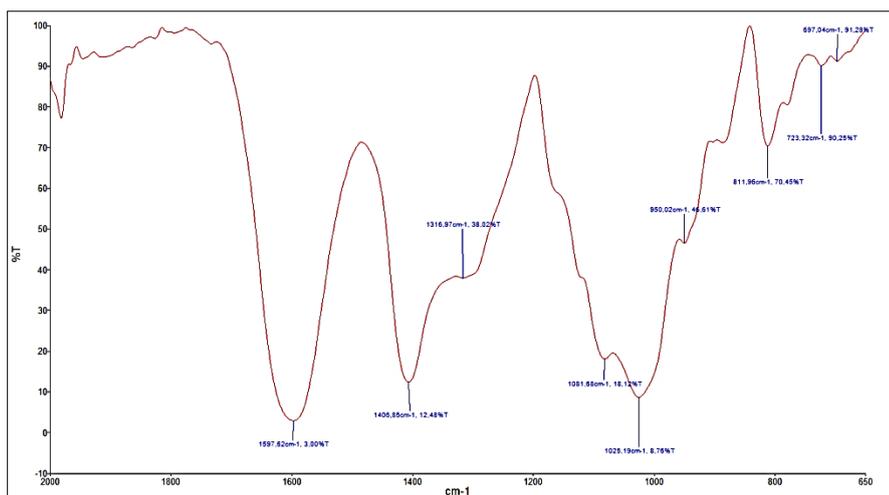


**Figura 27. Espectro FTIR en el intervalo de 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  para la referencia de alginato de sodio (Sigma-Aldrich).**

En la Figura 23 se muestra una ampliación de la zona del espectro infrarrojo en el intervalo de 2000 a  $600 \text{ cm}^{-1}$  de la referencia de alginato de sodio (Sigma-Aldrich). Los alginatos muestran varias bandas características en los espectros IR, de las bandas más importantes, se asignan al ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G). Según (Gómez-Ordóñez & Rupérez, 2011) las bandas aproximadamente a  $808$  y  $787 \text{ cm}^{-1}$  corresponden al ácido manurónico y gulurónico respectivamente, además las bandas a  $1030$  y  $1080 \text{ cm}^{-1}$  corresponden a los bloques mencionados respectivamente.

Lo mencionado por Gómez-Ordóñez et al., (2011), es confirmando por Sari-Chmayssem N. (2016), quien reporta que las unidades manurónicas en una banda de aproximadamente a  $1030 \text{ cm}^{-1}$ , mientras que las unidades gulurónicas originan una banda a  $1093 \text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro del alginato de referencia (Figura 22), se observa un ligero desplazamiento de dichas bandas a  $1025,1 \text{ cm}^{-1}$  y  $1081,67 \text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Además, se observa que la banda a  $1025,1 \text{ cm}^{-1}$  (bloques M) es ligeramente más intensa que la otra banda a  $1081,67 \text{ cm}^{-1}$  (bloques G).



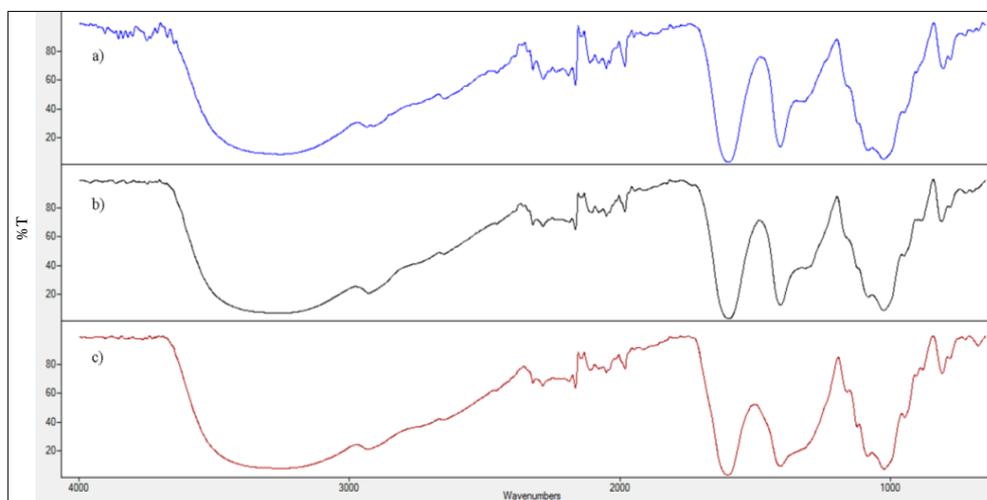
**Figura 28. Espectro FTIR en el intervalo de 4000-600 cm<sup>-1</sup> para la referencia de alginato de sodio (Sigma-Aldrich).**

La figura 24 muestra los espectros de tres tipos de alginato a modo de comparacion. En la Figura 24.a muestra el espectro en transmitancia del alginato Ma7, el cual se obtuvo al digerir la biomasa a niveles minimos de extracción (57,5°C, durante 1 hora en un alcali al 1%). El espectro b) dela Figura 24 representa el alginato de referencia (STD-NaAlg) (Sigma- Aldrich), y finalmente el espectro c) muestra la transmitancia del alginato Ma4 obtenido en el tratamiento N° 4, el cual se obtuvo al digerir la biomasa a niveles maximos de extraccion ( 76,5°C, durante 3 horas en un alcali al 3%).

Se distinguen las mismas bandas que en el alginato de referencia. La única diferencia apreciable es la variación en la intensidad relativa de las bandas entre 1390~1050 cm<sup>-1</sup>, del alginato del tratamiento 4 con respecto de las demás. Según Fertah M. (2014) las bandas débiles a 1316.79, 1125.53 y 1094.66 cm<sup>-1</sup> pueden asignarse a deformaciones C-C-H y O-C-H, estiramiento C-O y vibraciones de estiramiento C-O y C-C de los anillos de piranosa, respectivamente. En cuanto a la relación de las unidades guluronicas y manuronicas que visiblemente se puede identificar a 1025,1 cm<sup>-1</sup> y 1081,7 cm<sup>-1</sup>, se puede deducir que posee la misma relacion de bloques M y G con respecto al alginato de referencia.

Según la literatura (El Atouani et al., 2016; Pereira et al., 2003), algunas algas pardas y sus polímeros extraídos exhiben una banda ancha alrededor de 1220-1260 cm<sup>-1</sup>, asignada a la presencia de grupos éster de sulfato (S = O), que es un componente característico del fucoidano y polisacáridos sulfatados, distintos de los

alginatos. De acuerdo con lo descrito, la ausencia de dicha banda en los tres alginatos analizados (Ma4, Ma7 y STD-NaAlg), indica que los extractos no existe la presencia de polisacáridos sulfatados.



**Figura 29. Espectros infrarrojos de alginato: (a) alginato del tratamiento MA07; b) alginato de referencia (Sigma- Aldrich); c) alginato del tratamiento MA04.**

#### 4.8. Determinación del radio M/G

Las propiedades físicas de los alginatos están determinadas en gran medida por la cantidad relativa de tipos de bloques presentes en el copolímero. Por lo tanto, la relación M/G es un valor importante para definir la naturaleza del gel formado a partir de alginatos (Sari-Chmayssem et al., 2016).

La relación M/G se considera como un parámetro característico que nos permite tener una idea sobre el comportamiento de gelificación de los alginatos, por ende es importante conocer la presencia y proporción de ácido manurónico y ácido gulurónico (Fertah et al., 2014). La mayoría de las aplicaciones de alginatos se basan en su capacidad de formación de gel a través de la unión de catión: por ejemplo, la transición de alginato de sodio soluble en agua a alginatos de calcio insolubles en agua.

La espectroscopia FTIR ha demostrado ser un método útil para la estimación semi-cuantitativa de la relación M/G en los alginatos (Gómez-Ordóñez et al., 2011; Gacesa et al., 1990). Los alginatos muestran varias bandas características, como por ejemplo las asignadas al ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G), como ya se describió anteriormente. Sellimi et al., (2015) y Pereira et al., (2013) explican que la

proporción de intensidades de banda de absorción en aproximadamente  $1100\text{ cm}^{-1}$  y  $1030\text{ cm}^{-1}$ , da una buena estimación de la relación M/G. Sin embargo, este método carece de una precisión de cuantificación (Usov, 1999)

La relación M/G del alginato de referencia, deducida de la relación de intensidad relativa de las bandas de  $1081,7$  y  $1024,7\text{ cm}^{-1}$  fue 1,42. Lo que sugiere que el alginato es ligeramente más rico en residuos gulurónicos que en los residuos de manurónicos. Los alginatos con baja relación M/G ( $<1$ ) corresponden a proporciones mayores de ácido gulurónico (G) que bloques de ácido manurónico (M), formando geles fuertes y rígidos, mientras que la alta relación M/G ( $> 1$ ) producen geles suaves y elásticos (Sellimi et al., 2015)

En la Tabla 15, se muestran la relación M/G de los extractos de alginato calculados por relación de absorbancias obtenidos mediante la técnica de Espectroscopía FT-IR. Se observa que el valor M/G del extracto MA04 es muy similar al valor del alginato de referencia, mientras que el valor del extracto MA07 es relativamente inferior a los dos restante. Los valores determinados para los tres tipos de alginato analizados, sugieren que los geles formados a partir de los mismos, sería suaves y elásticos (Torres et al., 2007; Sellimi et al., 2015).

**Tabla 19.**

**Relación M/G de los extractos de alginato calculados por relación de absorbancias**

	Muestra de alginato					
	STD		MA04		MA07	
	M	G	M	G	M	G
	1024,7	1081,7	1024	1083,8	1025	1082,3
Absorbancia	1,057	0,7413	1,14	0,7938	1,28	0,9498
Radio M/G	1,42		1,43		1,34	
<b>MA4: alginato extraído a 76°C, 3 horas con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 3%;</b>						
<b>MA7: alginato extraído a 57,5°C, 1 hora con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 1%;</b>						
<b>STD-AlgNa: alginato de referencia (Sigma-Aldrich).</b>						

A modo de comparación, los espectros presentados por Pereira L. (2013), sugiere que en la especie *Padina pavonica* se presentan mayor proporción de bloques de ácido gulurónico que manurónico, corroborando que la especie encontrada y descrita en la sección **Identificación de la especie**, pertenece al género *Padina*.

#### 4.9. Análisis Termogravimétrico (TGA)

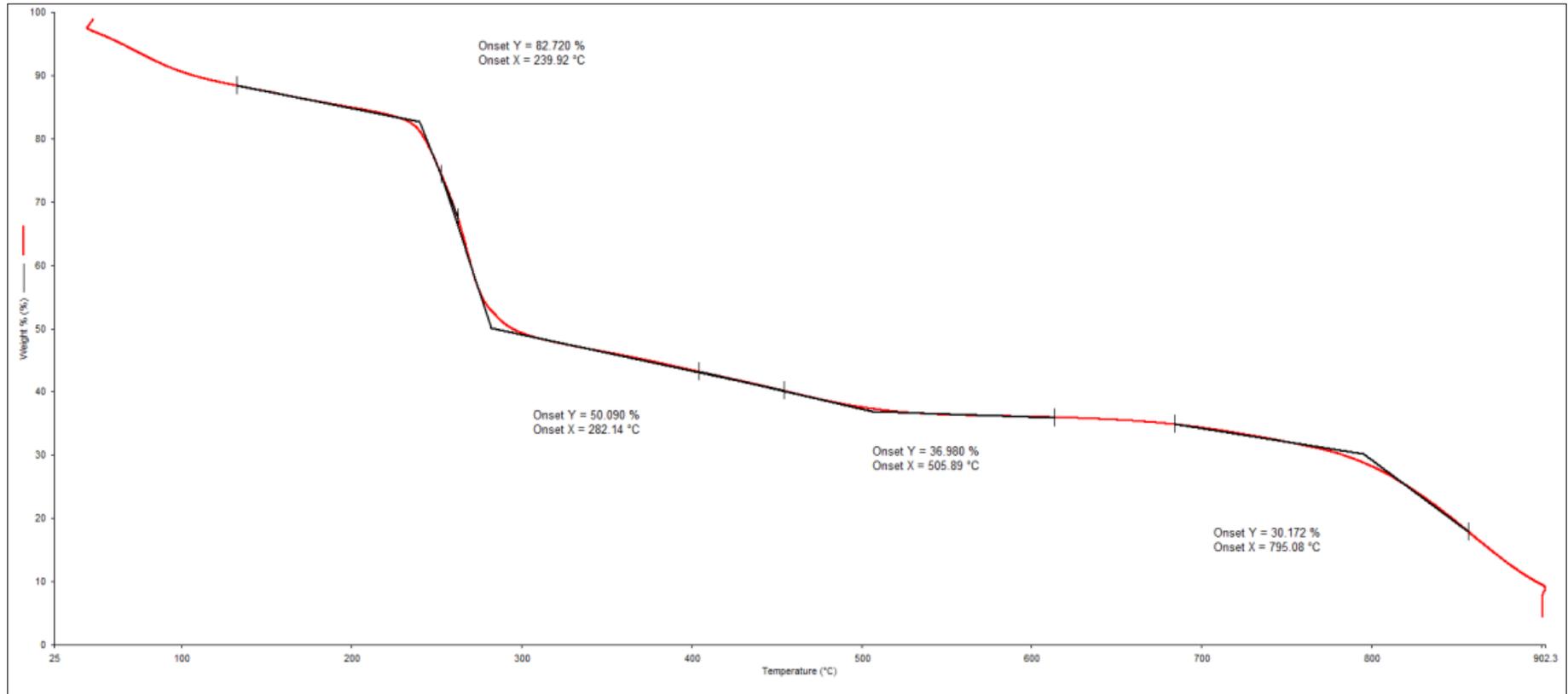
En la Figura 25, se observa la curva TGA del alginato de referencia. El termograma muestra que el polisacárido experimenta procesos de degradación térmica definidas en cinco etapas incluida la pérdida de humedad y descomposición de carbonato de sodio formado. La primera etapa se produjo en el intervalo de temperatura de 44,28 a 235,15°C, seguidamente otra etapa se presenta en el intervalo de 235,15 a 295,6 ° C. Una tercera etapa ocurre de 295,6 a 511,02 °C, posteriormente se define en el rango de 511,02 a 780,76°C, una cuarta etapa. Finalmente la última etapa se presenta a partir de 780,76 °C hasta los 900°C.

En la primera etapa de pérdida de peso (17,333 %), es atribuida a la pérdida de humedad y deshidratación (Martins et al., 2013; Siddaramaiah et al., 2008). Los eventos de pérdida de masa producidos en la segunda y tercera etapa son relacionados con la degradación de las muestras, presentando pérdidas de peso de 32,599 y 12,68%, respectivamente. La degradación de NaAlg se infiere principalmente a la pérdida de componentes volátiles, ruptura de cadenas y fragmentación del alginato sódico (Martins et al., 2013; Tripathi et al., 2012).

Según Soares J. (2004) a partir de los 500 °C se presenta la fragmentación de NaAlg en monómeros (unidades de azúcar), seguida de su conversión en carbonato como subproducto (Soares et al., 2004; Tripathi et al., 2012). Para el alginato de referencia analizado, la formación de carbonato de sodio se presenta en la cuarta etapa en el rango de 511,02 a 780,76 °C.

Soares et al., (2004) menciona que la descomposición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  es dependiente del soporte de la muestra y la atmósfera utilizada. La degradación a  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y material carbonizado se descompone lentamente por encima de los 750 °C en atmósfera de nitrógeno. En el presente trabajo utilizando el crisol de Pt y atmósfera de  $\text{N}_2$ , esta descomposición apareció cerca de los 800 °C. Específicamente la descomposición del carbonato formado se atribuye a la última etapa, que va desde los 780,76 °C hasta 900°C, con una pérdida de peso de 20,669 %. A partir de los 900°C se observa un descenso súbito en la pérdida porcentual de masa, esto debido a que a esta temperatura el calentamiento se llevó a cabo durante 3 minutos con

atmosfera de aire con un flujo de 20 ml/min, en esta etapa todo el material remanente se incineró, probablemente quedando solo cenizas.



**Figura 30.** Termograma del alginato de referencia (NaAlg. Sigma-Aldrich).

En la Tabla 20, se muestran las pérdidas de peso en los intervalos de temperatura para las etapas inferidas sobre comportamiento térmico de las muestras de alginato (STD-AlgNa, MA04 y MA07) analizadas por la técnica TGA. El análisis considerando la presencia de agua (base húmeda) y omitiendo la misma (base seca), permite estimar el contenido de agua, en forma de humedad y como agua ligada a la molécula. La equivalencia de pérdida de peso porcentual en base seca permite tener una idea de la influencia del tratamiento, principalmente sobre la composición del alginato extracto. De los resultados en base seca en la primera etapa de descomposición se observa que el alginato de referencia posee mayor pérdida peso porcentual (44,72%) , seguido del alginato extraído a 57,5°C, durante una hora con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 1%, que presenta una pérdida de 44,01%; de la misma manera en la segunda etapa de descomposición. Comparando la etapa de formación de carbonato de sodio, las tres muestras presentan valores porcentuales similares, de lo que se puede asumir que poseen cantidades similares de sodio. Por otra parte, comparando la etapa de descomposición de carbonato, el extracto MA04 obtenido a condiciones superiores (76°C, 3 horas y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 3%), en comparación al extracto MA07, presenta mayor pérdida de peso, con 38,57% frente a 30,65% de la muestra MA07, posiblemente este valor superior se deba a que carbonato de sodio como reactivo en exceso pudo quedar atrapado dentro de la estructura del alginato o cadenas formadas debido a las condiciones relativamente altas de temperatura y tiempo de extracción.

**Tabla 20.**

**Resumen del comportamiento térmico bajo atmosfera de nitrógeno de muestras de alginato**

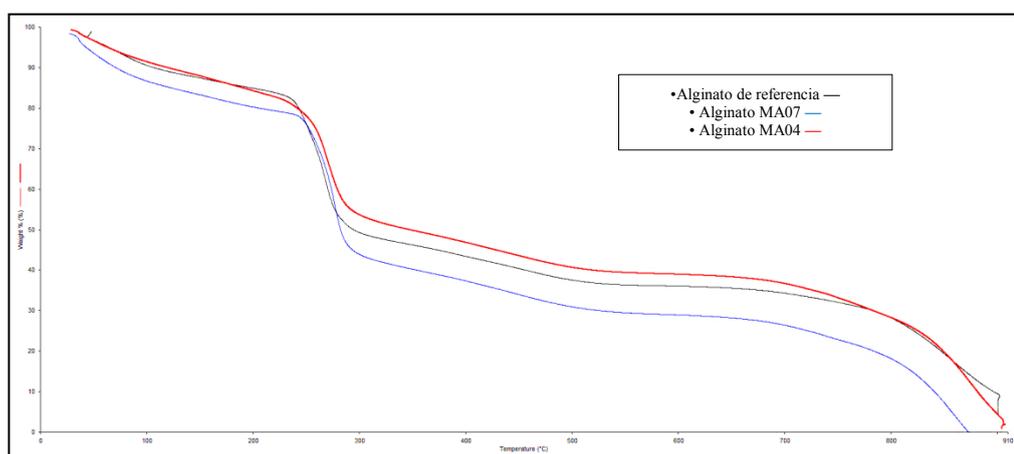
	Inferencia	Rango de temperatura (°C)	Peso perdido <sup>a</sup> (%)	Peso perdido <sup>b</sup> (%)
<b>STD</b>	Deshidratación	44,28-235,15	17,333	
	Descomposición	235,15-295,6	32,599	44,72
		295,6-511,02	12,68	17,40
	Formación de Carbonato	511,02-780,76	6,945	9,53
	Descomposición de Carbonato	780,76-900	20,669	28,36
	<b>MA04</b>	Deshidratación	28,49-238,2	19,566
Descomposición		238,2-305,01	27,533	36,18

**CONTINÚA→**

		305,01-495,32	12,193	16,02
	Formación de Carbonato	495,32-742,55	7,025	9,23
	Descomposición de Carbonato	742,55-900	29,35	38,57
	Deshidratación	27,34-242,6	22,297	
	Descomposición	242,6-300,52	34,199	44,01
		300,52-499,94	12,586	16,20
<b>MA07</b>	Formación de Carbonato	499,94-737,55	7,104	9,14
	Descomposición de Carbonato	737,55-872,93	23,814	30,65

<sup>a</sup> Porcentaje de peso perdido expresado en base húmeda,  
<sup>b</sup> Porcentaje de peso perdido expresado en base seca  
 MA4: alginato extraído a 76°C, 3 horas con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 3%;  
 MA7: alginato extraído a 57,5°C, 1 hora con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 1%;  
 STD-AlgNa: alginato de referencia (Sigma-Aldrich).

La figura 31 muestra una comparación de los termogramas del TGA para dos extractos y el alginato de referencia. Es importante notar que las muestras de alginato mostraron diferentes contenidos de agua. Se observa una diferencia en el comportamiento térmico, como por ejemplo el contenido de agua y composición de las muestras, debido a que dos tipos de extractos (Ma4 y Ma7) fueron sometidos a diferentes procesos de extracción.



**Figura 31. Curvas TGA del alginato de sodio: alginato de referencia (línea negra); extracto MA7 (línea azul); extracto MA04 (línea roja).**

La Tabla 21 muestra una comparación relativa simple del análisis termogravimétrico para tres muestras de alginato de sodio. En la tabla se presenta rangos definidos de temperatura en los que por la literatura, se infiere los procesos

ocurridos específicamente para el alginato; vale recalcar que los rangos pueden omitir o incluir ciertas pérdidas inferidas a otros procesos. Se observa que la pérdida de peso porcentual para el extracto MA4, es menor en la etapa de pérdida de humedad, por el contrario la pérdida de peso es mayor en la etapa de deshidratación (90-210°C) en comparación con MA7 y STD-AlgNa. La presencia de mayor cantidad de agua ligada a la estructura se puede deber a que el extracto MA4 tuvo mayor tiempo de tratamiento en la etapa de digestión alcalina. En las dos etapas de descomposición (210-320°C; 320-560°C), el extracto MA7 presenta mayor pérdida de peso (37,731% y 12,723% respectivamente), posiblemente debido a un falta de arreglo estructural del biopolímero, ya que el extracto fue obtenido en condiciones mínimas de extracción (ver diseño experimental). En la etapa de descomposición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (750-900°C) el extracto MA4 presenta una mayor pérdida de peso (28,676%), posiblemente debida un mayor cantidad de sal formada en la etapa previa, esta formación se explicaría por las condiciones de extracción en las que fue obtenido el alginato (76°C, 3 horas con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 3%), es decir con un a solución de ato contenido de iones sodio. Finalmente se observa que el extracto MA7 perdió el 100% de su peso inicia antes de los 900°C. Por otro lado para MA4 y STD-AlgNa existió un remanente porcentual de peso (1,165 y 5,207% respectivamente), debido a restos de cenizas después de la combustión durante 3 minutos en atmosfera de aire (flujo de 20 ml/min).

**Tabla 21.**

**Resumen del Análisis Termogravimétrico para alginato de sodio.**

$\Delta T$ (°C)	% Peso perdido			Proceso
	MA4	MA7	STD-AlgNa	
<b>45-90</b>	5,032	6,967	6,216	Perdida de humedad
<b>90-210</b>	8,745	7,826	7,182	Deshidratación
<b>210-320</b>	31,791	37,731	36,6335	Fragmentación de cadenas (Descomposición)
<b>320-560</b>	12,436	12,723	11,512	Descomposición
<b>560-750</b>	6,107	6,479	7,565	Formación de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
<b>750-900</b>	28,676	23,147 <sup>a</sup>	19,187	descomposición de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
<b>900<sup>c,d</sup></b>	1,165	0 <sup>b</sup>	5,207	Combustión total

MA4: alginato extraído a 76°C, 3 horas con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 3%;  
 MA7: alginato extraído a 57,5°C, 1 hora con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 1%;  
 STD-AlgNa: alginato de referencia (Sigma-Aldrich);

**CONTINÚA→**

<sup>a</sup> La temperatura el rango fue de 750 a 874°C;

<sup>b</sup> No existe peso perdido a esa temperatura;

<sup>c</sup> El calentamiento fue mantenido por un minuto, en atmosfera de nitrógeno con flujo de 20 ml/min.

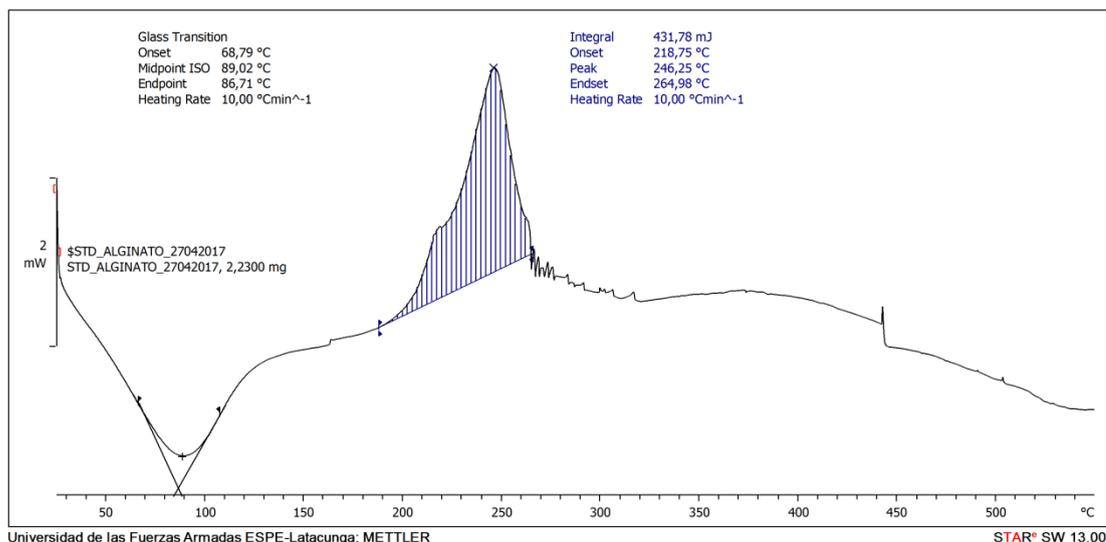
<sup>d</sup> El calentamiento fue mantenido por 3 minutos, en atmosfera de aire con flujo de 20 ml/min.

#### 4.10. Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido DSC, ofrece ser un buen método de análisis térmico para detectar cambios en las propiedades físicas y/o químicas de los materiales en función de la temperatura midiendo los cambios de calor asociados con tales procesos (Sachan et al., 2012).

La curva de DSC de NaAlg (Figura 27), muestra un pico endotérmico amplio alrededor de 89,02 °C y un pico exotérmico fuerte a 246,25 °C. El primer pico (representa la temperatura de transición vítrea  $T_g$ , mientras que la segunda banda representa la temperatura de fusión  $T_m$  (Mruthyunjaya-Swamy et al., 2010). Según la terminología de la ASTM la transición vítrea se define como “cambio reversible en un material amorfo o en regiones amorfas de un material parcialmente cristalino, desde una condición viscosa o cauchosa a una dura y relativamente frágil o viceversa”. La temperatura de transición vítrea  $T_g$ , representa un único valor de temperatura que representa este rango finito de temperatura. Por otra parte la Temperatura de fusión  $T_m$ , para los polímeros representa la temperatura a la que la estructura cristalina del polímero pasa a la estructura de vidrio, que es más similar a la de un líquido de alta viscosidad que a un sólido cristalino.

Según lo reportado por Soares J. (2004) la deshidratación se evidencia por un pico endotérmico cercano a 100°C, esta temperatura reportada recorrió a los 90°C para el alginato de referencia (Sigma Aldrich), posteriormente la descomposición del biopolímero está representada por un pico exotérmico entre 240-260, para el caso del alginato de referencia se dio a 246,25°C. Finalmente, la descomposición del material carbonoso se produjo por encima de 300 °C (Soares et al., 2004).



**Figura 32. Termograma DSC del alginato de sodio (Sigma-Aldrich)**

El termograma DSC obtenidos bajo atmosfera de N<sub>2</sub> de tres tipos de alginato (MA04, Referencia y MA07), se muestran en la figura 28. Los alginatos MA04 y MA07 fueron obtenidos a condiciones de extracción máxima y mínima respectivamente (ver el diseño experimental). El alginato de referencia (Fig. 28.b) presentó un pico endotérmico amplio a 89,02°C que puede estar correlacionado con la pérdida de agua y humedad contenida en le polisacárido de alginato de sodio (Jana et al., 2015; Soares et al., 2004; Mudhusudana-Rao et al., 2013), mientras que para los dos extractos MA4 y MA7 el pico endotérmico se presentó entre 65,44 y 66,24 °C, respectivamente.

Según lo reportado por Soares et al., (2004), luego de la deshidratación, la descomposición del biopolímero se presenta por un pico exotérmico a 240-260 °C dependiendo de la velocidad de calentamiento. El termograma para el alginato de referencia mostró un pico exotérmico fuerte a 246,25 °C atribuido a la reacción de pirólisis (Jana et al., 2015). La reacción exotérmica para los extractos MA04 y MA07 fueron observados a 249,20 y 250,68°C respectivamente.

La Tabla 22 muestra los cambios de entalpia y temperaturas en los termogramas DSC recogidos de las muestras de alginato (dos extractos y alginato de referencia), cuyas curva DSC se muestran en la Figura 28.

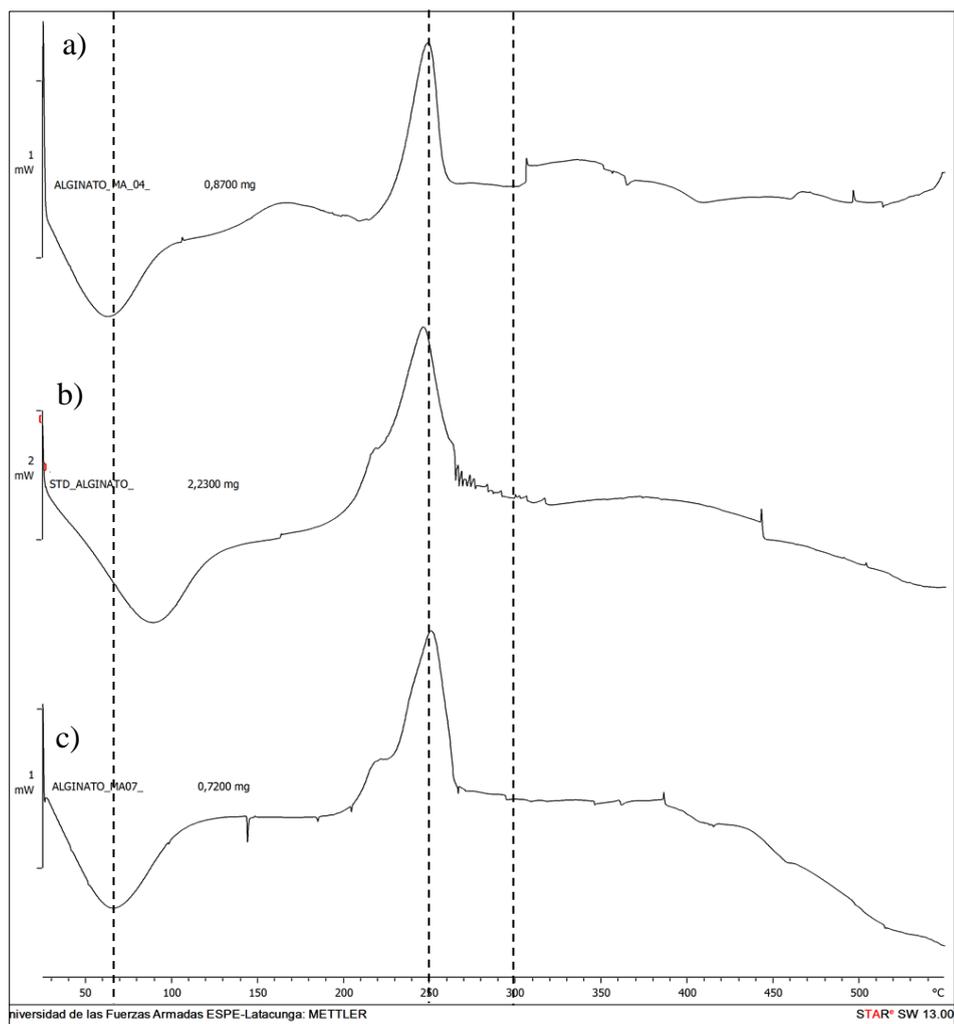
**Tabla 22.**

**Temperaturas y cambios de entalpia en los termogramas DSC recogidos de las muestras de alginato (dos extractos y alginato de referencia)**

	<b>Muestra</b>			
	Alginato de referencia	Alginato MA04	Alginato MA07	
<b>Onset(°C)</b>	68,79	65,96	66,46	
<b>Midpoint ISO (°C)</b>	89,02	65,44	66,24	
<b>End point (°C)</b>	86,71	81,41	83,32	
<b>Integral (mJ)</b>	431,78	29,37	96,62	149,6
<b>Onset (°C)</b>	218,75	138	229,68	227,7
<b>Peak (°C)</b>	246,25	164,32	249,2	250,68
<b>Endset (°C)</b>	264,98	195,36	258,63	264,11

El termograma DSC (Figura 28), se observa el desplazamiento del pico endotérmico del alginato de referencia con respecto al de los extractos obtenidos, esto se puede deber a un mayor contenido de agua ya sea en forma de humedad o como agua dentro de la estructura misma del polisacárido.

El termograma DSC del alginato MA04 presenta una curva a 164,2 °C antes del pico exotérmico más fuerte, esta curvatura de acuerdo Jana et al., (2015), se puede atribuir a una primera descomposición del material orgánico.



**Figura 33. Termograma DSC: a) alginato MA04; b) alginato de referencia; c) alginato MA07.**

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

Las algas pardas dispuestas a utilizar en el presente estudio, se recolectaron en las playas de Puerto Cayo, Machalilla, y Puerto López, en la provincia de Manabí. Inicialmente se planteó definir el orden taxonómico de las especies recolectadas, sin embargo contando con un soporte bibliográfico estrechamente relacionado se logró determinar el hasta el status *género*. De acuerdo a la sistemática taxonómica se determinó que las especies en efecto pertenecen a la división Phaeophyta, clase Phaeophyceae, de orden Dictyotales, familia Dictyotaceae, perteneciente al género *Padina*.

La extracción de alginato se estudió bajo la metodología de superficie de respuesta, para optimizar las condiciones de proceso en la fase de extracción alcalina empleando el Diseño Central Compuesto Rotatorio, con un factor de distanciamiento axial  $\alpha=1,633$ .

Se evaluó el rendimiento de extracción al llevar a cabo veinte experimentaciones sugeridas por el diseño Central Compuesto Rotatorio distribuidas en 2 bloques, de las cuales ocho son combinaciones con los niveles superior e inferior, 6 corresponden a las combinaciones de los distanciamientos axiales ( $\pm\alpha$ ), y tres replicas en el punto central por cada bloque.

Las técnicas analíticas realizadas permitieron comparar los extractos de alginato obtenido, con el alginato de referencia adquirido a una casa comercial. A través de la espectroscopía FT-IR se logró identificar los grupos funcionales presentes en el alginato, y estimar el ratio M/G. El valor de la relación M/G obtenido mediante esta técnica varía de 1,33 a 1,43; para los niveles de las condiciones de extracción mínimo y máximo respectivamente, independientemente de la magnitud del valor se infiere que los extractos de alginato poseen mayor proporción de bloques M. Los análisis térmicos TGA, presentan resultados descritos y comparables con estudios relacionados, identificando pérdida de humedad, deshidratación y descomposición. Los análisis de Calorimetría diferencial de Barrido muestran picos característicos descritos para polisacáridos de este tipo.

El análisis de varianza, permitió obtener un modelo matemático de tercer orden, para correlacionar los datos a través de una expresión matemática, obteniéndose un alto factor de determinación ( $R^2 = 0,9999$ ). A través del Valor P (prueba de hipótesis), se determinó la significancia de la interacción de los factores de extracción. Para el caso del modelo cúbico los coeficientes de los términos que representan los factores estudiados: A, B, C, AB, AC, BC,  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$ , ABC,  $A^2B$ ,  $A^2C$ ,  $AB^2$ ,  $B^2C$ ,  $A^3$  son términos significativos del modelo ( $p < 0.05$ ).

Para identificar y optimizar las variables del proceso, se seleccionaron tres factores de estudio (temperatura de extracción, tiempo de extracción y porcentaje de álcali). Las condiciones establecidas como optimas fueron al llevar a cabo el proceso de extracción a una temperatura de  $76^\circ\text{C}$ , durante 3 horas en una solución con álcali al 3%, para lograr un rendimiento de extracción de  $26,55 \pm 0,46\%$ .

## 5.2. Recomendaciones

Definir las especies de algas marinas más idóneas para a extracción, tomando en cuenta la disponibilidad, estación y abundancia.

Definir claramente un diseño experimental de acuerdo a las condiciones técnicas de operación para llevar a cabo el estudio del efecto de los factores sobre el rendimiento en el proceso de extracción de alginato,

De ser necesario, para obtener un producto más claro se puede agregar una etapa de pre-tratamiento posterior a la despigmentación con formol, agregando un lavado de la biomasa con etanol (>60%). Además para reducir el tiempo de remojo (24 horas) de biomasa en formol y ácido clorhídrico, se puede optar por agitación magnética de la biomasa en los respectivos tratamientos. Sin embargo se debe realizar un estudio estadístico para determinar la influencia de la variación de estas condiciones sobre la respuesta final de interés (rendimiento de alginato).

Es recomendable comparar la metodología propuesta en la fase de extracción alcalina con la metodología de Extracción Asistida por Microondas, aplicando el mismo diseño experimental.

La expresión matemática no es universal, ya que el modelo obtenido es válido sólo para el conjunto de condiciones experimentales reportadas. Específicamente al trabajar con biomasa el desarrollo de trabajos experimentales está expuesto a la variación de las propiedades de la materia prima, para el caso de las algas la estacionalidad altera el contenido de los polisacáridos, en razón a lo mencionado, se debe desarrollar y emplear un modelo matemático para cada caso de estudio,

Para determinar una mejor estimación del ratio M/G, es recomendable realizar el análisis por resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$ -RMN.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L. E., Mateo-Cid, L. E., Mendoza-González, A. C., & Krauss-Cosío, H. (Dic. de 2002). Hesperophycus y Silvetia representantes de la familia Fucaceae (Fucales, Phaeophyta) en la costa del Pacífico de México. *Hidrobiológica*, 12(2), 147-156.
- Aida, T. M., Yamagata, T., Abe, C., Kawanami, H., Watanabe, M., & Smith Jr., R. L. (2012). Production of organic acids from alginate in high temperature water. *The Journal of Suoercritical Fluids*, 65, 39-44.
- AlgaeBase. (2017). *algaebase.org*. (M. D. Guiry, Editor) Recuperado el 05 de Marzo de 2017, de <http://www.algaebase.org>
- Allen, D., McIvor, A., & Darwail, W. (2009). Biodiversity assessment tools. En O. Springate-Baginski, D. J. Allen, & W. Darwell, *An Integrated Wetland Assessment Toolkit: A Guide to Good Practice* (págs. 45-47). Gland, Switzerland: IUCN.
- Almeida Bezerra, M., Santelli Erthal, R., Oliveira Padua, E., Silveira Villar, L., & Amélia Escaleira, L. (September de 2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 955-977.
- Balina, K., Romagnoli, F., & Blumberga, D. (2016). Chemical Composition and Potential Use of Fucus Vesiculosus from Gulf of Riga. *Energy Procedia*, 95, 43-49.
- Bharathiraja, B., Devaki, P., Dheepa, S., Mageshwari, R., Jayamuthunagai, J., Chakravarthy, M., . . . Praveenkumar, R. (2016). Environmental eco-friendly marine resource macro algae (Seaweeds): an omnipotent source for value added products and its applications - A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(7), 19-47.
- Bicker, M. E. (2005). Catalytical conversion of carbohydrates in subcritical water: A new chemical process for lactic acid production. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 239, 151-159.
- Brebion, J. (18 de 02 de 2013). *nuigalway.ie*. Recuperado el 21 de Febrero de 2017, de <https://aran.library.nuigalway.ie/>
- Brodie, J., & Lewis, J. (2007). *Unravelling the algae the past, present, and future of algal systematics*. London: The Systematics Association.
- Calumpong, H. P., Maypa, A. P., & Magbanua, M. (1999). Population and alginate yield and quality assessment of four Sargassum species in Negros Island, central Philippines. *Hydrobiologia*, 298/399(0), 211-215.
- Carvache, K. R. (2012). Tesis de Grado para la obtención del título de Magíster en Ciencias con Énfasis en Manejo Sustentable de Recursos Bioacuáticos y Medio Ambiente. “*Diversidad, Abundancia y Distribución de las Macroalgas en la Zona Intermareal Rocoso en las Playas de Salinas, La*

*Libertad y Ballenita (Península de Santa Elena – Ecuador)*” Guayaquil, Ecuador.

- Cavazzuti, M. (2013). *Optimization Methods: From Theory to Design*. Modena: Springer Science+Business Media.
- Chaminda Lakmal, H. H., Lee, J.-H., & Jeon, Y.-J. (2015). Enzyme-Assisted Extraction of a Marine Algal Polysaccharide, Fucoidan and Bioactivities. En K. G. Ramawat, & J.-M. Mérillon, *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* (págs. 1065-1077). Springer.
- Costa Soares, D., Macedo Szlachta, M., Laneuville Teixeira, V., Ribeiro Soares, A., & Saraiva, E. M. (2016). The Brown Alga *Styopodium zonale* (Dictyotaceae): A Potential Source of Anti-Leishmania Drugs. *Mar. Drugs*, *14*(9), 1-11.
- Daoub, R. M., Elmubarak, A. H., Misran, M., Hassan, E. A., & Osman, M. E. (2016). Characterization and functional properties of some natural Acacia gums. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- Dawes, C. (2016). Macroalgae Systematics. En J. Fleurence, & I. Levine, *Seaweed in Health and Disease Prevention* (págs. 122-124). Tampa: Academic Press.
- De Jong, E., & Jungmeler, G. (2015). Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries. En A. Pandey, R. Hofer, C. Larroche, M. Taherzadeh, & M. Nampoothiri, *Industrial Biorefineries & White Biotechnology* (págs. 3-33). Waltham: Elsevier B.V.
- De Paula, J., Vallim, M. A., & Laneuville Teixeira, V. (2011). What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *21*(2), 216-228.
- Díaz-Martínez, S., Zuccarello, G. C., Salazar Chávez, G. A., Pedroche, F. F., & Avila-Ortiz, A. G. (2016). Species of *Padina* (Dictyotales, Phaeophyceae) in tropical Mexican waters based on molecular-assisted taxonomy. *Phycology*, *55*(6), 673-687.
- Diaz-Pulido, G. (2008). Macroalgae. En P. Hutchings, M. Kingsford, & O. Hoegh-Guldberg, *The Great Barrier Reef: Biology, Environment and Management* (págs. 146-156). New Zeland: CSIRO Publishing.
- Dinjus, E., & Kruse, A. (2004). Hot compressed water—a suitable and sustainable solvent and reaction medium? *Journal of Physics: Condensed Matter*, *16*(14), 1161-1169.
- Downey, G. (2016). *Advances in Food Authenticity Testing*. Dublin: Woodhead Publishing.
- Draget, K. I., & Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*, *25*(2), 251-256.

- Draget, K. I., Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G. (2005). Alginates from Algae. En A. Steinbüchel, *Biopolymers Online* (págs. 215-224). John Wiley and Sons.
- Eichhorn, S. J., Hearle, J. W., Jaffe, M., & Kikutani, T. (2009). *Handbook of textile fibre structure*. Boca Raton: CRC Press.
- El Atouani, S., Reani, A., Zrid, R., Belattmania, Z., Pereira, L., Mortadi, A., . . . Sabour, B. (2016). The invasive brown seaweed *Sargassum muticum* as new resource for alginate in Morocco: Spectroscopic and rheological characterization. *Phycological Research*, 64, 185-193.
- El Gamal, A. A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(1), 1-25.
- Fenoradosoa, T. A., Ali, G., Delattre, C., Laroche, C., Petit, E., Wadouachi, A., & Michaud, P. (March de 2010). Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioide*. *Journal of Applied Phycology*, 22, 131-137.
- Fertah, M., Belfkira, A., Dahmane, E., Taourirte, M., & Brouillette, F. (2014). Extraction and characterization of sodium alginates from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Flachier, A., Sonnenholzer, J., Pérez, D., Jaramillo, L., & Espinoza, E. (Septiembre de 1997). Evaluacion del Área marina del Parque Nacional Machalilla- Parte I. *Diagnóstico Ecológico Y Socioeconómico Del Área Marino-Costera Del Parque Nacional Machalilla*. Quito, Ecuador.
- Fu, Y., Toyoda, K., & Ihara, I. (2014). Application of ATR-FTIR spectroscopy and principal component analysis in characterization of 15-acetyldeoxynivalenol in corn oil. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 7(4), 163-168.
- Gacesa, P., & Russell, N. J. (1990). *Pseudomonas Infection and Alginates: Biochemistry, genetics and pathology*. Chapman and Hall.
- Gómez Ordóñez, E. (2013). <http://eprints.ucm.es/>. Recuperado el 23 de marzo del 2017 de <http://eprints.ucm.es/20162/1/T33968.pdf>
- Gómez-Ordóñez, E., & Rupérez, P. (2011). FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 25, 1514-1520.
- Guiry, M. D. (2017). *seaweed.ie*. Recuperado el 18 de Enero de 2017, de <http://www.seaweed.ie>
- Hahna, T., Langb, S., Ulbera, R., & Muffler, K. (December de 2012). Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochemistry*, 47(12), 1691-1698.
- Hernández-Carmona, G., McHugh, D. J., Arvizu-Higuera, D. L., & Rodríguez-Montesinos, E. (1999). 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.
- Hildebrand, D. (20 de Enero de 2017). Recuperado el 05 de Abril de 2017, de <http://www.uky.edu/~dhild/biochem/11B/lect11B.html>
- Jae Lee, W., & King, R. J. (1996). The Molecular Characteristics of Five Genera of Dictyotaceae (Phaeophyta) from Australia: based on DNA Sequences of Nuclear rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) and 5.8S. *The Korean Journal of Phycology*, 11(4), 381-388.
- Jana, S., Trivedi, K. M., Tallapragada, M. R., Branton, A., Trivedi, D., Nayak, G., & Mishra, R. K. (2015). Characterization of Physicochemical and Thermal Properties of Chitosan and Sodium Alginate after Biofield Treatment. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 430.
- Jeon, W., Ban, C., Park, G., Chul Woo, H., & Heui Kim, D. (2016). Hydrothermal conversion of macroalgae-derived alginate to lactic acid catalyzed by metal oxides. *Journal cover: Catalysis Science & Technology*, 6, 1146-1156.
- Jiju, A. (2014). *Design of Experiments for Engineers and Scientists* (Second ed.). Edinburgh: Elsevier Ltd.
- Jin, F., & Enomoto, H. (2011). Rapid and highly selective conversion of biomass into value-added products in hydrothermal conditions: chemistry of acid/base-catalysed and oxidation reactions. *Energy & Environmental Science*, 4(2), 382-397.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (January de 2015). Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(1), 24-31.
- Kannan, S. (2014). FT-IR and EDS analysis of the seaweeds Sargassum wightii (brown algae) and Gracilaria corticata (red algae). *International Journal of Current Microbiology of Applied Sciences*, 3, 341-351.
- Koerner, R. M. (1990). *Geosynthetic Testing for Waste Containment Applications: STP 1081*. ASTM.
- Krann, S. (2012). Algal Polysaccharides, Novel Applications and Outlook. En C.-F. Chang, *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* » "Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology". Galway.
- Kruse, A., & Dinjus, E. (2007). Hot compressed water as reaction medium and reactant: 2. Degradation reactions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 41, 361-379.
- Lang, Q., & Wai, C. M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies- a practical review. *Talanta*, 53, 771-782.
- Lasso B., S. V. (21 de abril de 2009). Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR). *Sitio Ramsar Parque Nacional Machalilla (Zona Marina)*. Quito,

Ecuador.

- Leal, D., Matsuhiro, B., Rossi, M., & Caruso, F. (2008). FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds of brown seaweeds. *Carbohydrate Research*(343), 308-316.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126.
- León Tamariz, F., & Peña Tapia, X. (1999). Trabajo de Grado en Bioquímica y Farmacia. Universidad de Cuenca. *Extracción de alginatos a partir de algas conjugadas de agua dulce*. Cuenca, Ecuador.
- Li, B., Lu, F., Wei, X., & Zhao, R. (2008). Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules*, 13(8), 1671-1695.
- Lorbeer, A. J., Lahnstein, J., Bulone, V., Nguyen, T., & Zhang, W. (2015). Multiple-response optimization of the acidic treatment of the brown alga *Ecklonia radiata* for the sequential extraction of fucoidan and alginate. *Biosource Technology*, 197, 302-309.
- Lunde, G. (1970). Analysis of trace elements in seaweed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21(8), 416-418.
- Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, A., Pettersen, J., & Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, 42(1-2), 3-40.
- Machida, H. T. (2011). Green chemical processes with supercritical fluids: Properties, materials, separation and energy. *Journal of Supercritical Fluids*, 60, 2-15.
- Manns, D., Deutschle, A. L., Saake, B., & Meyer, A. (2014). Methodology for quantitative determination of the carbohydrate composition of brown seaweeds (Laminariaceae). *The Royal Society of Chemistry*, 4, 25736–25746.
- Manns, D., Deutschle, A. L., Saake, B., & Meyer, A. S. (2014). Methodology for quantitative determination of the carbohydrate composition of brown seaweeds (Laminariaceae). *R S C Advances*, 4(49), 25736-25746.
- 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.
- Mazumder, A., Holdt, S. L., De Francisci, D., Alvarado-Morales, M., Mishra, H. N., & Angelidaki, I. (2016). Extraction of alginate from *Sargassum muticum*: process optimization and study of its functional activities. *Journal of Applied Phycology*.
- McHugh, D. J. (1987). *fao.org*. Recuperado el 15 de Diciembre de 2016, de <http://www.fao.org/docrep/x5822e/x5822e04.htm>

- McHugh, D. J., Hernández-Carmona, G., Arvizu-Higuera, D. L., & Rodríguez-Montesinos, Y. E. (2001). Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* 3. Precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid. *Journal of Applied Phycology*, 13(6), 471-479.
- Men'shova, R. V., Ermakova, S. P., Um, B. H., & Zvyagintseva, T. N. (2013). The composition and structural characteristics of polysaccharides of the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Russian Journal of Marine Biology*, 39(3), 208-213.
- Misurcova, L., Orsavova, J., & Ambrožová, J. V. (January de 2015). Algal Polysaccharides and Health. En K. G. Ramawat , & J.-M. Mérillon, *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* (págs. 109-144).
- Montgomery, D. C. (2004). *Diseño y Análisis de Experimentos* (Segunda ed.). México, D.F.: Limusa- Wiley.
- Mruthyunjaya Swamy, T. M., Ramaraj, B., & Siddramaiah. (2010). Sodium Alginate and Poly(ethylene glycol) Blends: Thermal and orphological Behaviors. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistr*, 47, 877-881.
- Mubaraka, M., Shaijaa , A., & Suchithrab, T. V. (2015). A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research*, 7, 117-123.
- Mudhusudana Rao, K., Kridhna Rao, K., Sudhakar, P., Chowdoji Rao, K., & Subha, M. (2013). Synthesis and Characterization of biodegradable Poly (Vinyl caprolactam) grafted on to sodium alginate and its microgels forcontrolled release studies of an anticancer drug. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(6), 061-069.
- Munier, M., Dumay, J., Morançais, M., Jaouen, P., & Fleurence, J. (2013). Variation in the Biochemical Composition of the Edible Seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada Harvested from Two Sampling Sites on the Brittany Coast (France): Recuperado el 13 de abril del 2017, de <http://dx.doi.org/10.1155/2013/568548>
- Mushollaeni , W. (June de 2011). The physicochemical characteristics of sodium alginate from Indonesian brown seaweeds. *African Journal of Food Science*, 5(6), 349-352.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response Surface Methodology* (Fourth Edition ed.). New Jersey: Wiley.
- Niekraszewicz, B., & Niekraszewicz, A. (2009). The structure of alginate, chitin and chitosan fibres. En S. J. Eichhorn, J. W. Hearle, M. Jaffe, & T. Kikutani, *Handbook of textile fibre structure* (Vol. 2, págs. 266-304). CRC Press.
- Ozgun, S., & Turan, F. (2015). Biochemical composition of some brown algae from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey. *J. Black Sea/Mediterranean Enviroment*, 21(2), 125-134.

- Pacheco, L., & Francis, A. (2016). *Design of an extraction process of phlorotannins and carbohydrate Macrocyctis pyrifera, integrating the use of marine enzymes in the step of carbohydrate hydrolisis.*
- Pardo Vargas, A. (2013). Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias-Química. *Bioprospección de Productos Naturales Marinos de Organismos Bentónicos del Litoral brasileño y Caribe colombiano- Fase I tribu Dictyoteae.* Bogotá, Colombia.
- Pereira, L., & Neto, J. M. (2015). *Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Enviromental Assessment, and Biotechnology.* Portugal: CRC Press.
- Pereira, L., Gheda, S. F., & Ribeiro-Claro, P. J. (2013). Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed Polysaccharides with Potential Use in Food, Pharmaceutical, and Cosmetic Industries. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013, 7 pages.
- Pereira, L., Sousa, A., Coelho, H., Amado, A. M., & Ribeiro-Claro, P. J. (2003). Use of FTIR, FT-Raman and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 223-228.
- Philips, G. O., Stephen, A. M., & Williams, P. A. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications* (Segunda ed.). CRC Press.
- Polat, S., & Özogul, Y. (November de 2008). Biochemical composition of some red and brown macro algae from the Northeastern Mediterranean Sea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(7-8), 566-572.
- Radmer, R. J. (1996). Algal diversity and commercial algal products. *BioScience*, 46(4), 263-270.
- Rebours, C., Marinjo-Soriano, E., Zertuche-González, J. A., Hayasi, L., Vásquez, J. A., Kradolfer, P., . . . Robledo, D. (2014). Seaweeds: an opportunity for wealth and sustainable livelihood for coastal communities. *Journal of Applied phycology*, 26(5), 1939-1951.
- Sachan, N. K., Ghosh, S. K., & Bhattacharya, A. (2012). Differential Scanning Calorimetric Analysis of Drug-Polymer Interaction in Glutinous Rice Based Microbeads. *Asian Journal of Chemistry*, 24(5), 2207-2209.
- Sari-Chmayssem, N., Taha, S., Mawlawi, H., Guégan, J.-P., Jeftić, J., & Benvegna, T. (2016). Extracted and depolymerized alginates from brown algae *Sargassum vulgare* of Lebanese origin: chemical, rheological, and antioxidant properties. *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1915-1929.
- Sawidis, T., Brown, M. T., Zachariadis, G., & Sratis, I. (2001). Trace metal concentrations in marine macroalgae from different biotopes in the Aegean Sea. *Environment International*, 27(1), 43-47.
- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo. (2013). *Buen Vivir*. Recuperado el 28 de Enero de 2017, de <http://www.buenvivir.gob.ec/>

- Se-Kwon, K. (2015). *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Busan: Academic Press- Elsevier.
- Sellimi , S. I., Ayed, B., Maaleej, H., Montero, V., Riaudo, M., Dahia, M., . . . Nasri, M. (2015). Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1358-1367.
- Senni, K., Gueiche, F., Foucault-Bertaud, A., Igondjo-Tchen, S., Fioretti, F., Collic-Jouault, S., . . . Godeau, G. (2006). Fucoidan a sulfated polysaccharide from brown algae is a potent modulator of connective tissue proteolysis. (Elsevier, Ed.) *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445(1), 56-64.
- Sharma, O. P. (2007). *Textbook of Algae*. New Delhi: Tata McGraw-Hill.
- Siddaramaiah, Mruthyunjaya Swamy, T. M., Ramaraj, B., & Hee Lee, J. (2008). Sodium Alginate and Its Blends with Starch: Thermal and Morphological Properties. *Journal of Applied Polymer Science*(109), 4075-4081.
- Singhvi, M., & Gokhale, D. (2013). Biomass to biodegradable polymer (PLA). *RCS Advances*, 3(33), 13558-13568.
- Soares, J. P., Santos, J. E., Chierice, G. O., & Cavaleiro, E. T. (2004). Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *ECLÉTICA Química*, 29(2), 53-59.
- Song, M., Pham, H. D., Seon, J., & Woo, H. C. (October de 2015). Marine brown algae: A conundrum answer for sustainable biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 782-792.
- South, G. R., & Whittick, A. (1991). *An Introduction to Phycology*. Wiley-Blackwell.
- Subramanian, V., Ganapathy, K., & Dakshinamoorthy, B. (2015). FT-IR, 1H- NMR and 13C- NMR Spectroscopy of Alginate Extracted From *Turbinaria Decurrens* (Phaeophyta). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(12), 761-771.
- Taylor, W. R. (1945). *Pacific Marine Algae of the Allan Hancock Expeditions to the Galapagos Islands* (Vol. 12). Los Angeles, California, EE. UU: The University of Southern California Press.
- Torres, M. R., Sousa, A. P., Silva Filho, E. A., Melo, D. F., Feitosa, J. P., De Paula, R. C., & Lima, M. G. (2007). Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil. *Carbohydrate Research*, 324, 2067-2074.
- 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.
- Tuzen, M., Verep, B., Ogretmen, O. A., & Solyak, M. (2009). Trace element content

- in marine algae species from the Black Sea, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 151(1), 362-368.
- Usov, A. I. (1999). Alginic acids and alginates: analytical methods used for their estimation and characterisation of composition and primary structure. *Russian Chemical Reviews*, 68(11), 957.
- Vauchel, P., Kaas, R., Arhaliass, A., Baron, R., & Legrand, J. (September de 2008). A New Process for Extracting Alginates from *Laminaria digitata* : Reactive Extrusion. *Food and Bioprocess Technology*, 1(3), 297-300.
- Venkatesan, J., Manivasagan, P., & Kim, S.-K. (2015). Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. En S.-K. Kim, *Handbook of Marine Microalgae. Biotechnology Advances* (págs. 1,11). Busan, South Korea: Academic Press.
- Waldron, K. W. (2009). *Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing* (Vol. 2). Boca Raton: CRC Press.
- Wickens, G. E. (2001). *Economic Botany: Principles and Practices*. New York: Springer Science+Business Media.
- Yaich, H., Garma, H., Bchir, B., Besbes, S., Paquot, M., Richel, A., . . . Attia, H. (May de 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.
- Yuan, Y., & Macquarrie, D. (2015). Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoïdan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers*, 129(20), 101-107.
- Zajic, J. E. (2012). *Properties and Products of Algae*. New York: Springer Science & Business Media.
- Zubia, M., Payri, C., & Deslandes, E. (2008). Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). *Journal of Applied Phycology*, 20(6), 1033-1043.

# ANEXOS



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

## CERTIFICACIÓN

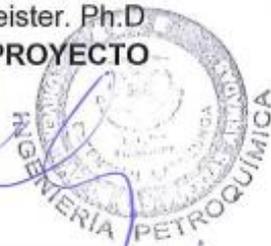
Se certifica que el presente trabajo fue desarrollado por el señor: Milton Javier Robalino Cacuango

En la ciudad de Latacunga 26 días del mes de Junio del 2017.

**Aprobado por:**

  
Ing. Eduardo Vyhmeister. Ph.D  
**DIRECTOR DEL PROYECTO**

  
Dr. Roman Rodríguez, Ret. Nat. Ph.D  
**DIRECTOR DE CARRERA**



**Certificado por:**

  
Dr. Freddy Jaramillo Checa  
**SECRETARIO ACADÉMICO**