

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

Milton J. Robalino



CONTENIDO

INTRODUCCIÓN
OBJETIVOS
METODOLOGÍA
RESULTADOS
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

INTRODUCCIÓN

BIOMASA

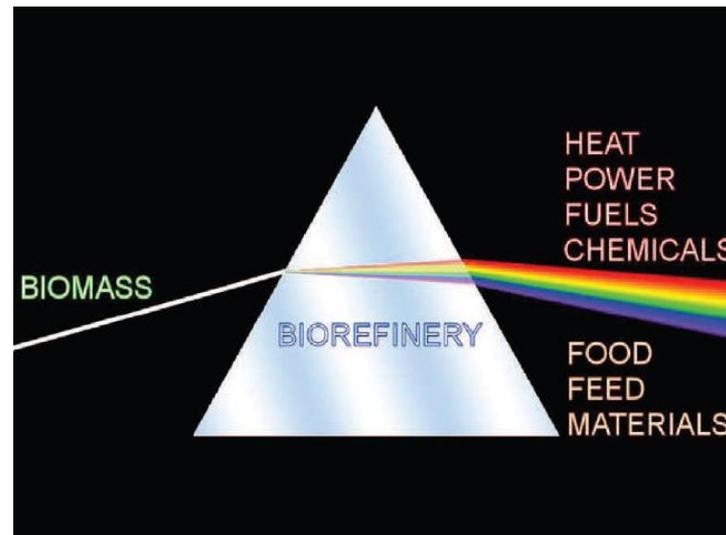
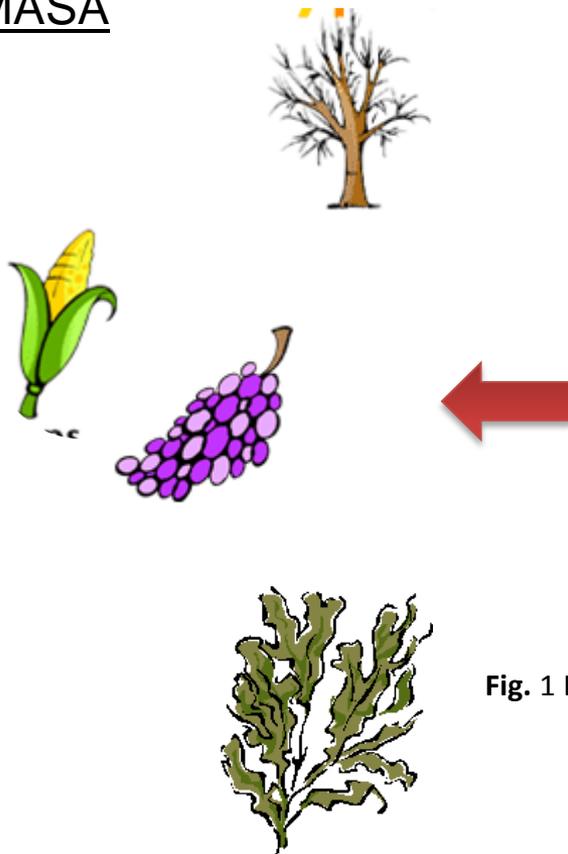


Fig. 1 La Biorrefinería y su papel en la transformación de la biomasa
Fuente: (IEA, 2015)

INTRODUCCIÓN

MACRO-ALGAS

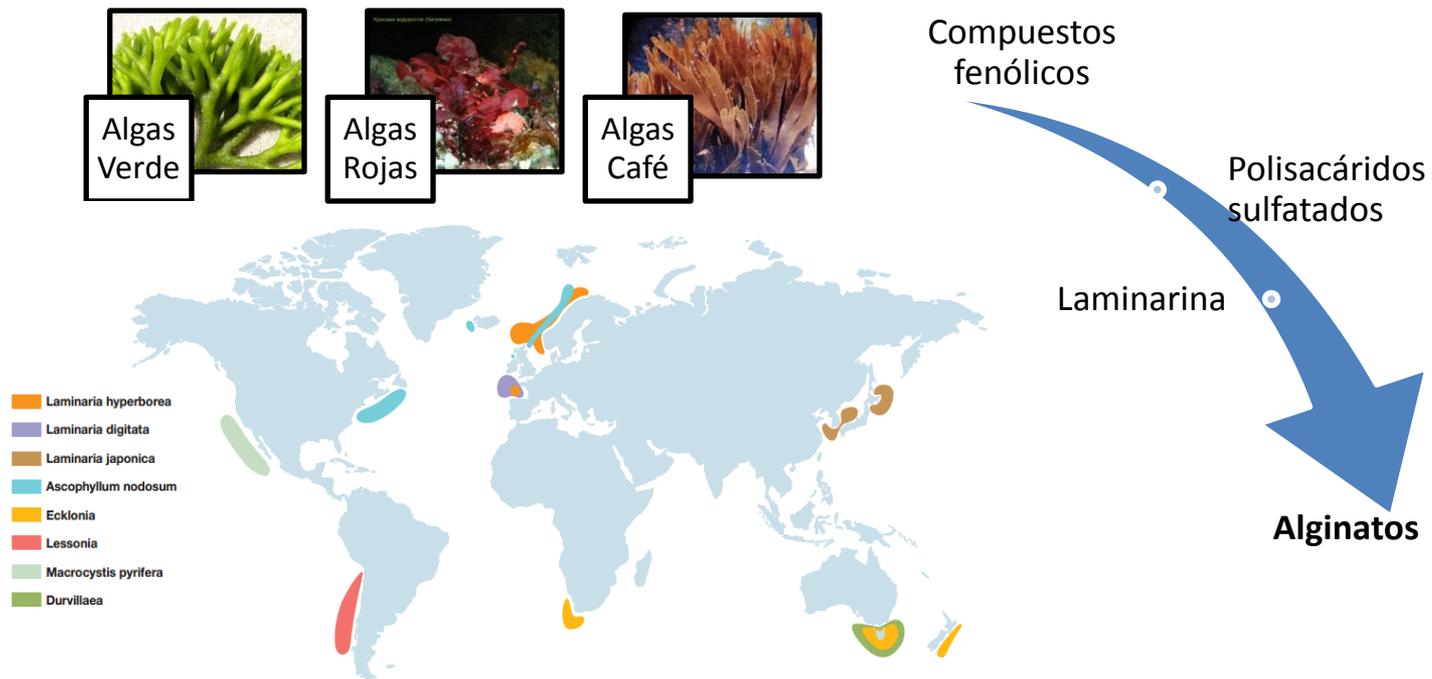


Fig 2. Distribución de algas pardas utilizadas industrialmente
 Fuente: (Draget, 2005)

INTRODUCCIÓN

EL ALGINATO

- Polisacárido presente en las Phaeophytas
- Formado por:
 - 2 unidades
 - 3 bloques

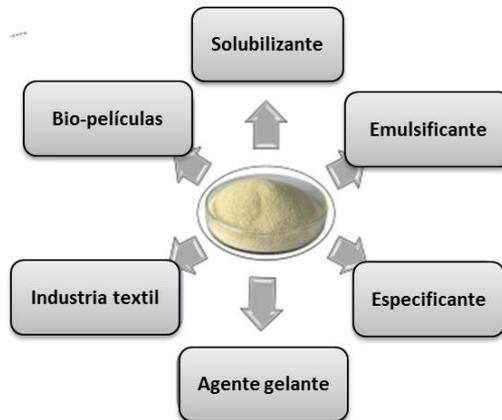


Fig 4. Usos del alginato

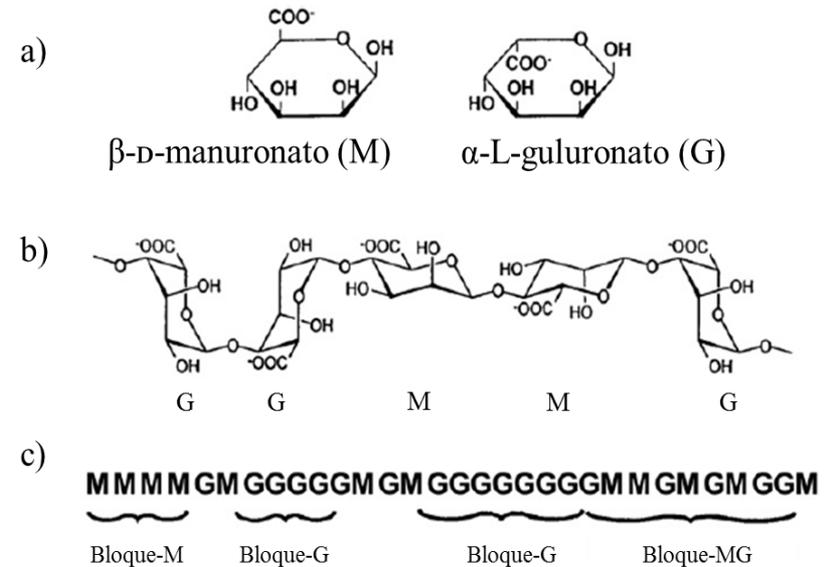


Fig 3. Datos estructurales de Alginato: a) monómero del alginato (M vs. G); b) conformación molecular del polímero de alginato; c) cadenas secuenciales de unidades M y G. (Draget & Taylor, 2011)

INTRODUCCIÓN

PROCESO DE OBTENCIÓN DE ALGINATO

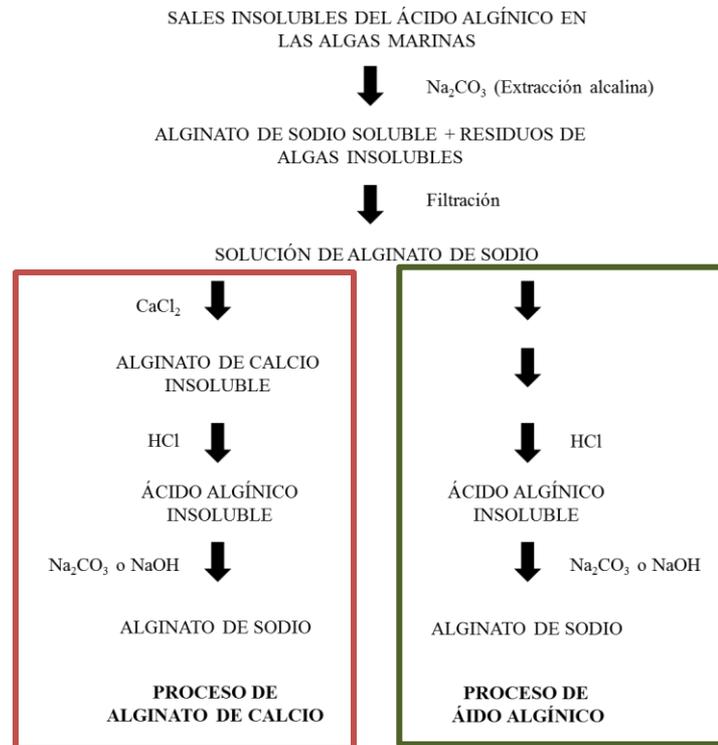


Fig 5. Diagrama del proceso general de los dos métodos para la extracción de alginato de sodio a partir de algas marinas.

Fuente: (McHugh, 1987)

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

METODOLOGÍA

RESULTADOS

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

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



OBJETIVOS

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.

OBJETIVOS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 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.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN
OBJETIVOS
METODOLOGÍA
RESULTADOS
CONCLUSIONES RECOMENDACIONES

METODOLOGÍA

ETAPAS DE OBTENCIÓN DE ALGINATO

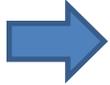


METODOLOGÍA

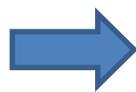
EXTRACCIÓN DE ALGINATO



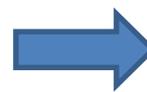
Decoloración



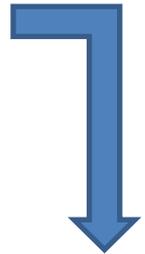
Tratamiento ácido



Extracción alcalina



Separación de fases



Precipitación



Formación de fibras



Secado y reducción de tamaño

METODOLOGÍA

RECOLECCIÓN DE ALGAS

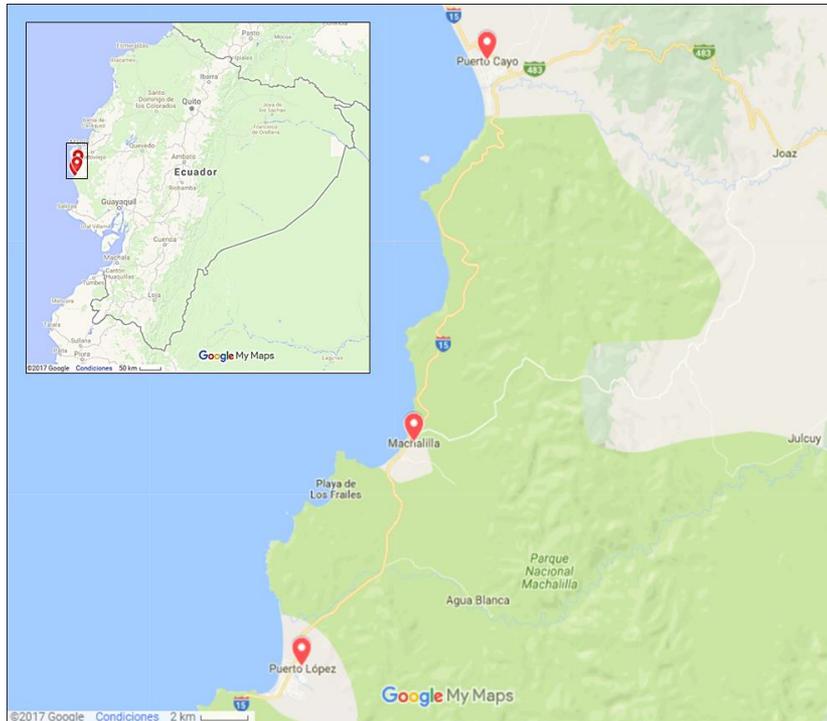


Fig 6. Ubicación de los sitios de muestreo de algas en las costas de la provincia de Manabí (Ecuador).

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);

Puerto López

- ($1^{\circ} 33' 44.96''$ S; $80^{\circ} 49' 7.67''$ W).

METODOLOGÍA

DISEÑO EXPERIMENTAL- Diseño Central Compuesto Rotatorio.

Tabla 1.

Variables independientes y sus niveles usados en el diseño de respuesta de superficie del presente estudio

Factores	Variables Codificadas				
	α	-1	0	1	α
Variables naturales 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

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

Ec. 2 Ecuación de tercer orden, utilizada para la regresión de datos

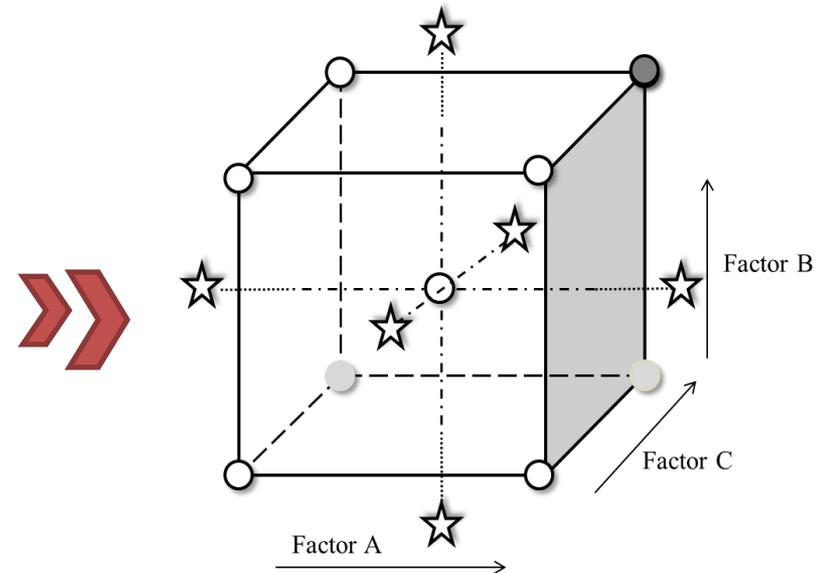


Fig 7. Representación gráfica de las experimentaciones en el Diseño Central Compuesto Rotatorio para tres factores

METODOLOGÍA

MÉTODOS ANALÍTICOS

<u>FT-IR</u> FTIR Frontier/accesorio de muestreo ATR (Perkin Elmer, EE.UU.)	Secado previo durante 3 horas Espectros registrados en la región de 4000 a 600 cm^{-1} 64 escaneos con resolución espectral de 4 cm^{-1} Velocidad de desplazamiento de los espejos de 0.2 cm/s .
<u>TGA</u> Pyris 1 TGA (Perkin Elmer, EE.UU.)	<ol style="list-style-type: none"> 1) Mantener a 0.5 min a 50.00°C 2) Calentar de 50.00°C a 900.00°C a 10.00°C/min 3) Mantener por 1.0 min a 900.00°C 4) Mantener por 3.0 min a 900.00°C // Aire 20.0 ml/min <div style="text-align: right; margin-top: 10px;"> // N₂, 20ml/min </div>
<u>DSC</u> DSC 1 STAR® System (Mettler Toledo, Suiza)	Calentamiento de 25 °C a 550 °C a una velocidad de 10 °C*min ⁻¹ . Flujo de nitrógeno de 90 ml/min.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN
GENERALIDADES
METODOLOGÍA
RESULTADOS
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

RESULTADOS

ESPECIE RECOLECTADA



Fig 8. Apariencia general de las especies encontradas en las playas ecuatorianas de la provincia de Manabí (Puerto Cayo, Machalilla y Puerto López)

ICBN

División → Phaeophyta

Clase → Phaeophyceae

Orden → Dictyotales

Familia → Dictyoaceae

Género → Padina

Serie

Especie

RESULTADOS

RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Tabla 2.

Datos experimentales de la extracción para el ajuste del modelo

Corrida N°	Patrón guía	A (°C)	B (horas)	C (%)	Rendimiento (%)
MA 1	++	75	3	1	22,99
MA 2	+++	75	1	3	23,57
MA 3	+-	74	1	1	16,81
MA 4	+++	76	3	3	26,55
MA 5	+-	57,5	1	3	17,94
MA 6	000	67	2	2	22,14
MA 7	---	57,5	1	1	15,98
MA 8	+-	57,5	3	3	21,77
MA 9	-+	57,5	3	1	20,17
MA 10	000	68	2	2	23,04

Continuación.

MA 10	000	68	2	2	23,04
MA 11	000	66,5	2	2	21,71
MA 12	00A	67	2	3,63	25
MA 13	00a	67	2	0,36	8,25
MA 14	0A0	67	3,7	2	21,56
MA 15	000	66,5	2	2	21,7
MA 16	000	67	2	2	22,04
MA 17	0a0	67	0,4	2	15,12
MA 18	A00	83,5	2	2	24,68
MA 19	000	67	2	2	22,27
MA 20	a00	52	2	2	19,45

RESULTADOS

MODELO MATEMÁTICO

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

Ec. 3. Ecuación cúbica para el rendimiento de extracción

Modelo de Tercer orden

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

RESULTADOS

ANÁLISIS DE VARIANZA- SIGNIFICANCIA

Tabla 3.
Análisis de varianza
para el modelo
polinomial de tercer
orden

Fuente	Suma de Cuadrados	Valor p
Modelo	318,54	< 0,0001
A-Temperatura	0,59	0,0038
B-Tiempo	20,74	< 0,0001
C-Álcali	140,28	< 0,0001
AB	0,31	0,0098
AC	2,62	0,0004
BC	2,92	0,0004
A²	0,33	0,0090
B²	10,87	< 0,0001
C²	22,86	< 0,0001
ABC	2,60	0,0004
A²B	0,24	0,0138
A²C	1,75	0,0008
AB²	0,61	0,0037
AC²	0,000	
B²C	2,28	0,0005
BC²	0,000	
A³	0,39	0,0069
B³	0,000	
C³	0,000	
Coefficiente de variación (% CV) = 0,46;		
R² = 0,9999; R² ajustado = 0,9995;		
Desviación estándar = 0,094.		



Términos significativos (p<0,05)

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DEL ÓPTIMO

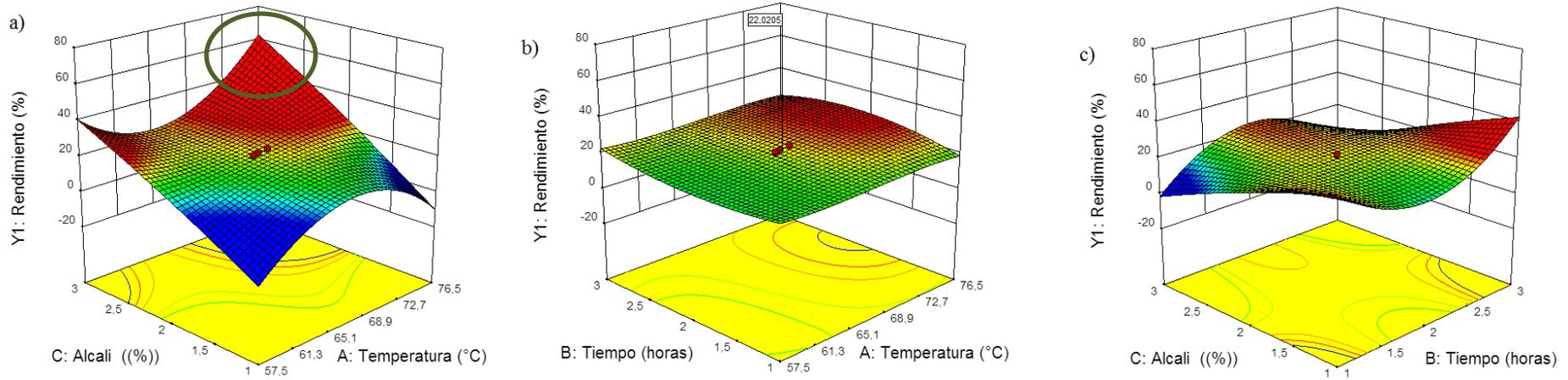


Fig 9. Gráficas de respuesta de superficie (a, b, c) que muestran el efecto de la temperatura de extracción, tiempo de extracción y concentración de álcali sobre el rendimiento de extracción de alginato

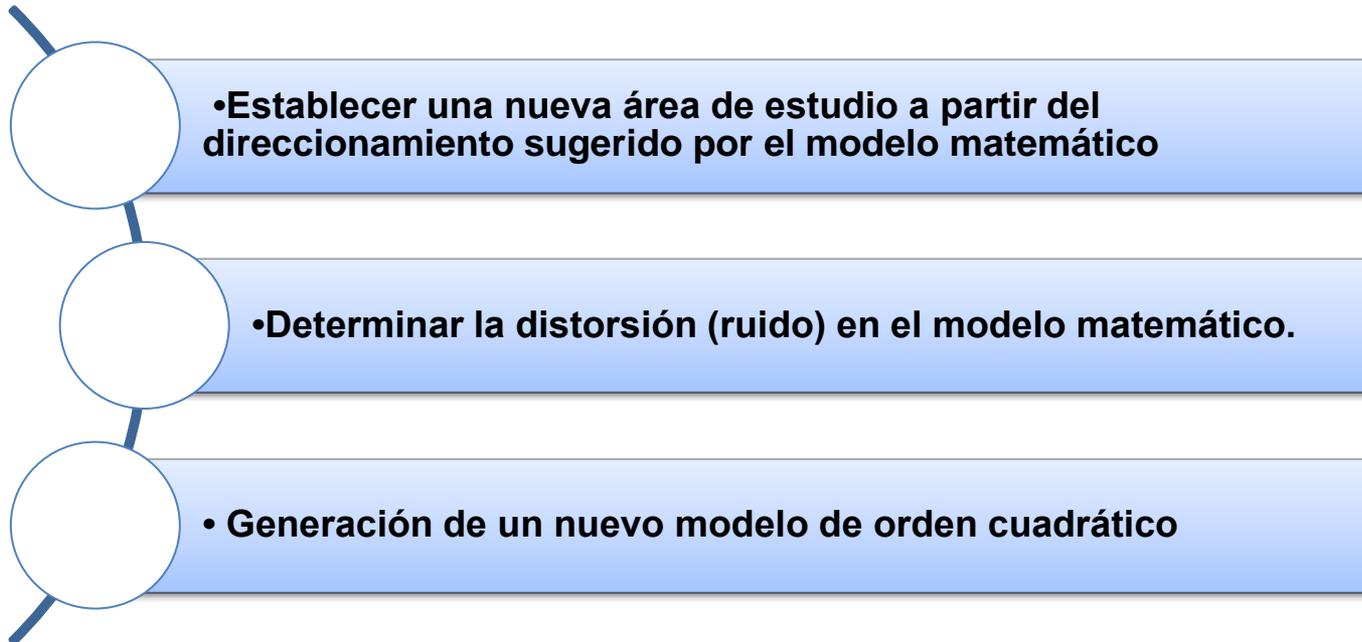
Valor óptimo predicho (61,33%)
 Valor óptimo experimental ($\bar{Y}=21,83$)



Ajuste del modelo

RESULTADOS

MEJORAMIENTO DEL MODELO MATEMÁTICO



RESULTADOS

MEJORAMIENTO DEL MODELO- NUEVA ÁREA DE ESTUDIO

Tabla 4.

Tratamientos propuestos en la nueva área de estudio.

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

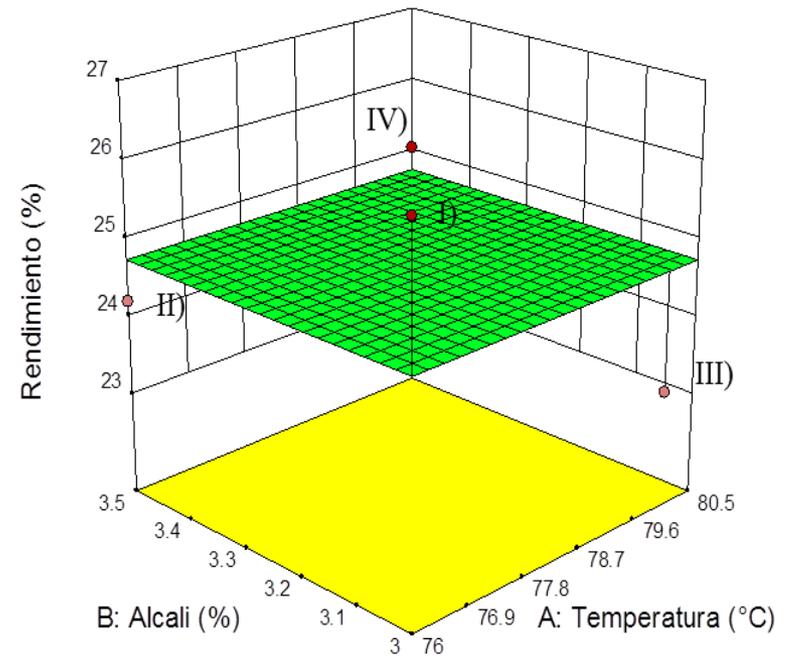


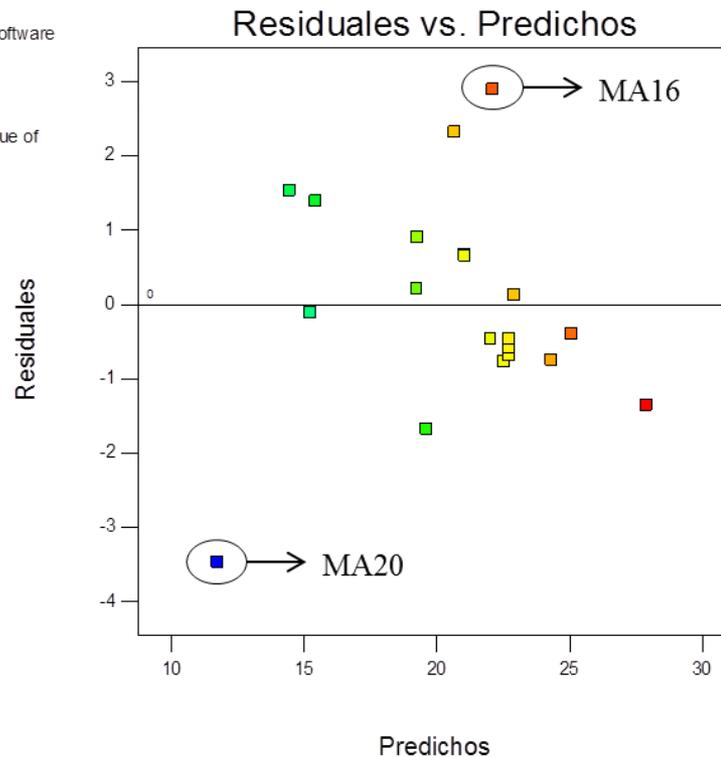
Fig 10. Resultados obtenidos en la nueva área de estudio

RESULTADOS

MEJORAMIENTO DEL MODELO- ANÁLISIS DE RESIUDALES

Design-Expert® Software
Y1: Rendimiento

Color points by value of
Y1: Rendimiento:
26.55
8.25



Tratamientos

- MA16: extraído a 67°C, 2 horas con álcali al **3,633%**.
- MA20: extraído a 67°C, 2 horas con álcali al **0,367%**

Fig 11. Análisis residual de los tratamientos

RESULTADOS

MEJORAMIENTO DEL MODELO- GENERACIÓN DE UN NUEVO MODELO

$$\text{Rendimiento (\%)} = 23,03 + 1,61A + 2,03B + 1,68C - 0,16AB + 0,67AC - 0,54BC - 0,31A^2 - 1,55B^2 - 1,15C^2 \quad (3)$$

Ec. 3 Ecuación de segundo orden para la regresión de datos

Tabla 5.

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

Fuente	Suma de cuadros	Valor P
Modelo	163.70	0.0006
A-Temperatura	33.19	0.0008
B-Tiempo	55.46	0.0002
C-Álcali	22.52	0.0024
AB	0.18	0.6887
AC	3.29	0.1208
BC	2.34	0.1802
A²	1.01	0.3605
B²	21.92	0.0026
C²	3.67	0.1046
Coeficiente de variación (% CV) = 4,8; R ² = 0,9568; R ² ajustado = 0,9013; Desviación estándar = 1,03.		

Términos significativos (p < 0,05)

RESULTADOS

MEJORAMIENTO DEL MODELO

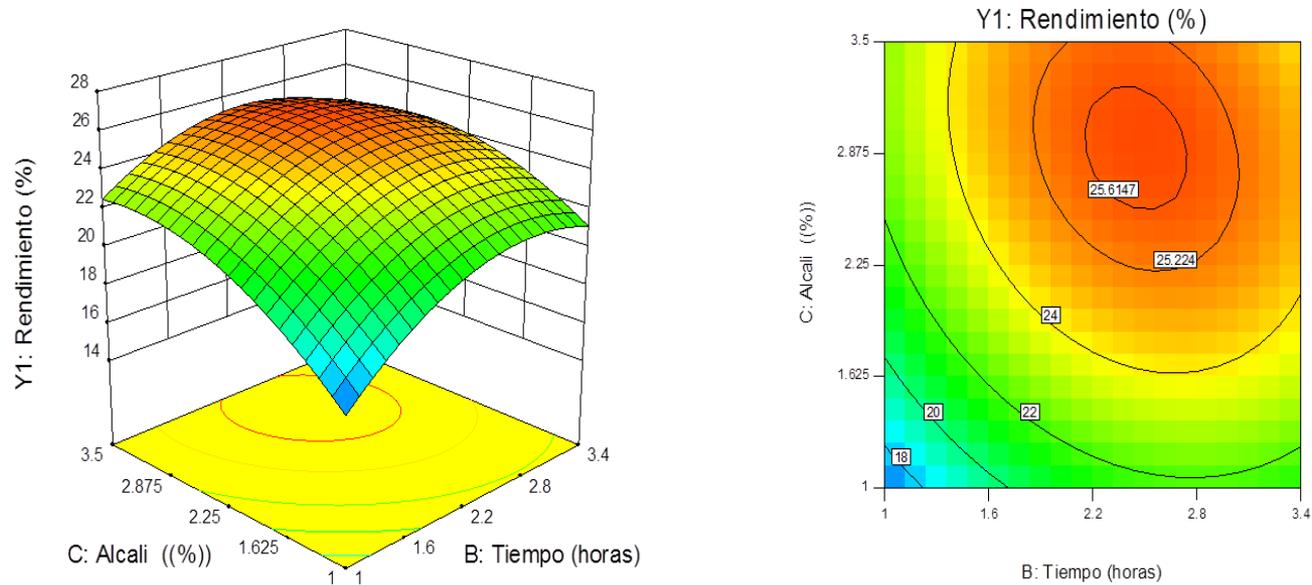


Fig 12. Gráficas de respuesta de superficie y gráficas de contorno que muestran el efecto de la temperatura de extracción, el tiempo de extracción y la concentración de álcali sobre el rendimiento de extracción de alginato

RESULTADOS

MEJORAMIENTO DEL MODELO

Tabla 6.

Condiciones sugeridas para alcanzar el rendimiento óptimo.

Fuente	Factor			Respuesta
	A	B	C	
Graficas de superficie y contorno	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.

$\epsilon = \pm 0,46$



RESULTADOS

ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO FT-IR

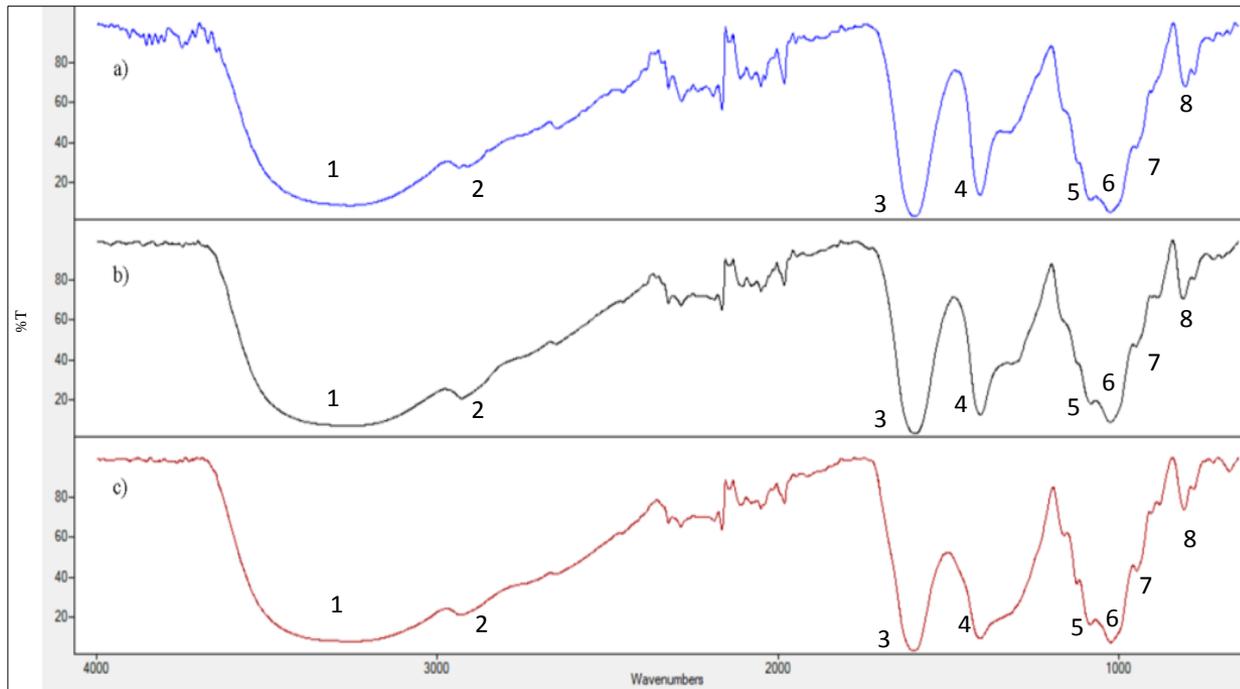
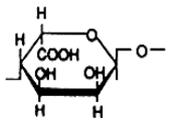
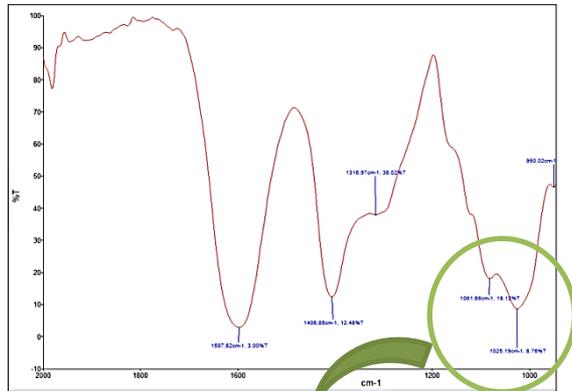


Fig 13. Espectros infrarrojos de alginato:

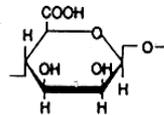
- a) alginato del tratamiento N ° 7
- b) alginato de referencia (Sigma- Aldrich)
- c) alginato del tratamiento N ° 4.

RESULTADOS

ESTIMACIÓN DEL RELACIÓN M/G



Ácido gulurónico



Ácido manurónico

Tabla 7

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	
MA4: alginato extraído a 76°C, 3 horas con Na₂CO₃ al 3%;						
MA7: alginato extraído a 57,5°C, 1 hora con Na₂CO₃ al 1%;						
STD-AlgNa: alginato de referencia (Sigma-Aldrich).						

RESULTADOS

ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO TGA

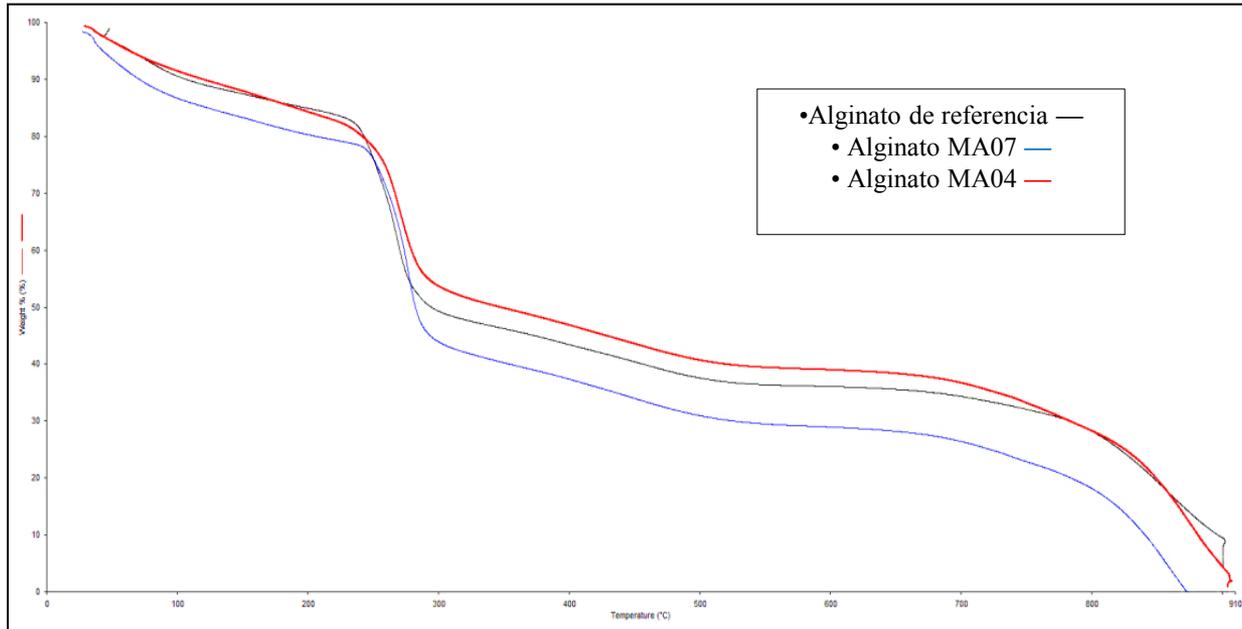


Fig 14. Curvas TGA del alginato de sodio.

MA4: alginato extraído a 76°C, 3 horas con Na_2CO_3 al 3%;

MA7: alginato extraído a 57,5°C, 1 hora con Na_2CO_3 al 1%;

STD-NaAlg: alginato de referencia (Sigma-Aldrich).



RESULTADOS

COMPORTAMIENTO TGA

Tabla 8.

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

	Inferencia	Rango de temperatura (°C)	Peso perdido (%)
STD	Deshidratación	44,28-235,15	17,333
	Descomposición	235,15-295,6	32,599
		295,6-511,02	12,68
	Formación de Carbonato	511,02-780,76	6,945
	Descomposición de Carbonato	780,76-900	20,669
MA04	Deshidratación	28,49-238,2	19,566
	Descomposición	238,2-305,01	27,533
		305,01-495,32	12,193
	Formación de Carbonato	495,32-742,55	7,025
	Descomposición de Carbonato	742,55-900	29,35
MA07	Deshidratación	27,34-242,6	22,297
	Descomposición	242,6-300,52	34,199
		300,52-499,94	12,586
	Formación de Carbonato	499,94-737,55	7,104
	Descomposición de Carbonato	737,55-872,93	23,814

MA4: alginato extraído a 76°C, 3 horas con Na₂CO₃ al 3%;

MA7: alginato extraído a 57,5°C, 1 hora con Na₂CO₃ al 1%;

STD-AlgNa: alginato de referencia (Sigma-Aldrich).

RESULTADOS

CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO DSC.

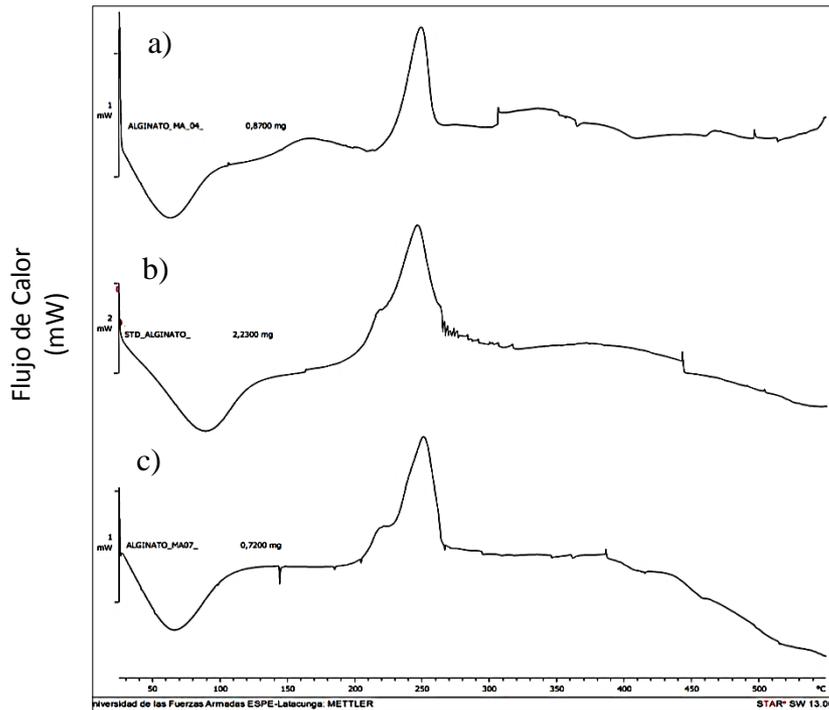


Fig 15. Termograma DSC: a) alginato MA4; b) alginato de referencia; c) alginato MA7.

Tabla 9.

Temperaturas y cambios de entalpia en los termogramas DSC recogidos de las muestras de alginato (Extractos y alginato de referencia).

	Muestra			
	Alginato de referencia	Alginato MA4	Alginato MA7	
Onset(°C)	68,79	65,96	66,46	
Midpoint ISO (°C)	89,02	65,44	66,24	
End point (°C)	86,71	81,41	83,32	
Integral (mJ)	431,78	29,37	96,62	149,6
Onset (°C)	218,75	138	229,68	227,7
Peak (°C)	246,25	164,32	249,2	250,68
Endset (°C)	264,98	195,36	258,63	264,11

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN
OBJETIVOS
METODOLOGÍA
RESULTADOS
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- De acuerdo a la sistemática taxonómica se determinó que la especie recolectada pertenecen a la división Phaeophyta, clase Phaophyceae, del orden Dictyotales, familia Dictyotaceae, perteneciente al género *Padina*.
- 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.

CONCLUSIONES

- Las técnicas analíticas realizadas permitieron comparar los extractos de alginato obtenido, con el alginato de referencia adquirido a una casa comercial.
- 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 ($R^2= 0,9999$).
- Para el 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 ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES

- 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°C, durante 3 horas en una solución con álcali al 3%, para lograr un rendimiento de extracción de $26,55 \pm 0,46\%$.

RECOMENDACIONES

- 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 biomas con etanol (>60%).
- 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.
- Para determinar una mejor estimación del ratio M/G, es recomendable realizar el análisis por resonancia magnética nuclea ^1H -RMN.

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

GRACIAS