

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Extracción de celulosa a partir de una mezcla de microalgas
aisladas de un humedal artificial en El Progreso, Guatemala,
para la producción de hidrogeles**

Trabajo de Investigación en modalidad de Tesis presentado por
Ana Sabrina Figueroa de la Torre
para optar al grado académico de Licenciada en Biotecnología
Molecular

Guatemala,
2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

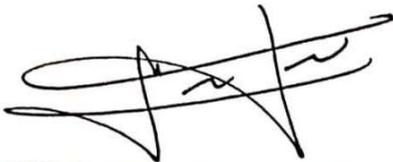


**Extracción de celulosa a partir de una mezcla de microalgas
aisladas de un humedal artificial en El Progreso, Guatemala,
para la producción de hidrogeles**

Trabajo de Investigación en modalidad de Tesis presentado por
Ana Sabrina Figueroa de la Torre
para optar al grado académico de Licenciada en Biotecnología
Molecular

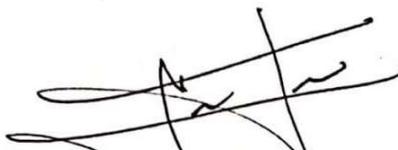
Guatemala,
2023

Vo.Bo.:

(f) 

MSc. Julio Roberto Matute

Tribunal examinador:

(f) 

MSc. Julio Roberto Matute

(f) 

MSc. Anna Yunuen Soto

(f) 

Ing. Roberto Díaz

Prefacio

El presente trabajo de graduación forma parte de un proyecto realizado en conjunto con el Centro de Estudios en Biotecnología de la Universidad del Valle de Guatemala y Cementos Progreso. Este estudio surgió por el interés de brindarle una aplicación a las microalgas que crecen naturalmente en el humedal artificial de Cementos Progreso, en Sanarate, El Progreso, Guatemala. Aunque el uso de la celulosa derivada de microalgas puede ser variado, este trabajo supone ser un antecedente para aplicaciones de las microalgas para la producción de hidrogeles que puedan ser aplicados a diferentes fines.

Me gustaría agradecer a Cementos Progreso por su aporte financiero y la donación de sus microalgas. Gracias a aquellos trabajadores que me asistieron durante los análisis, sus conocimientos fueron de gran aporte. También me gustaría agradecer a mis asesores, Julio Matute y Yunuen Soto, por su orientación, apoyo y paciencia a lo largo de este trayecto. Asimismo, agradezco al Laboratorio de Protección Vegetal (LPV) de la Universidad del Valle de Guatemala por el aporte de reactivos. Finalmente, agradezco a mi familia y amigos por la motivación y soporte que me han brindado. Valoro profundamente la confianza que depositaron en mí y el apoyo que me han brindado a lo largo de estos años de estudio. A mis catedráticos, les agradezco los conocimientos que me han brindado todos estos años.

Índice

Prefacio.....	III
Lista de cuadros.....	VI
Lista de figuras.....	VII
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	2
2.1. Objetivo general.....	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
3. Justificación.....	3
4. Marco teórico.....	4
4.1. Microalgas.....	4
4.1.1. Clasificación.....	4
4.1.2. Cultivo.....	4
4.1.3. Aplicaciones biotecnológicas e industriales de las algas.....	6
4.2. Métodos de extracción de biomasa.....	6
4.2.1. Centrifugación.....	7
4.2.2. Sedimentación por gravedad.....	8
4.2.3. Filtración.....	8
4.2.4. Flotación.....	8
4.2.5. Floculación.....	9
4.3. Celulosa de microalgas.....	10
4.3.1. Biosíntesis.....	11
4.3.2. Métodos de extracción.....	13
4.3.3. Aplicaciones de la celulosa.....	14
4.4. Producción de hidrogeles a base de celulosa.....	14
5. Metodología.....	16
5.1. Sitio de estudio.....	16
5.2. Sujetos de estudio.....	16
5.3. Enfoque, diseño y tipo de investigación.....	17
5.4. Variables.....	17
5.5. Viabilidad.....	17

5.6.	Materiales y métodos	18
5.6.1.	Aislamiento de microalgas	18
5.6.2.	Cultivo de microalgas en sistema semiabierto	18
5.6.3.	Extracción de biomasa	18
5.6.4.	Extracción de celulosa.....	19
5.6.5.	Elaboración del hidrogel	20
6.	Resultados.....	21
6.1.	Cultivo de microalgas aisladas del humedal artificial.....	21
6.2.	Caracterización de CNF extraída de microalgas	22
6.3.	Hidrogel formado a partir de CNF	25
7.	Análisis de resultados	28
8.	Conclusiones.....	33
9.	Recomendaciones	34
10.	Bibliografía	35
	Referencias.....	35
11.	Anexos.....	39

Lista de cuadros

1	Comparación de la producción de centrífugas	7
2	Comparación de técnicas de cosecha de microalgas	10
3	Contenido de celulosa en base al peso seco total de biomasa de microalgas	13
4	Variables controladas para diferentes procesos requeridos para la extracción de celulosa a partir de biomasa de microalgas	17
5	Rendimiento de protocolo de extracción de celulosa por un método genérico	22
6	Fijación de dióxido de carbono para la producción de biomasa de microalgas	39
7	Valores de picos en espectros FTIR de celulosa extraída de <i>C. vulgaris</i> comercial	39
8	Valores de picos en espectros FTIR de celulosa extraída de una mezcla de microalgas	39

Lista de figuras

1	Representación esquemática de la síntesis de celulosa en organismos (plantas, bacterias, algas, etc.)	11
2	Organización y morfología de complejos terminales sintetizadores de celulosa (CTs) en macro y microalgas	11
3	Descripción generalizada de la función de los componentes involucrados en la síntesis de la celulosa.....	12
4	Aplicaciones de hidrogeles biodegradables a base de celulosa	15
5	Metodología implementada en este estudio	16
6	Principales microalgas aisladas del humedal artificial: <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp., vistos bajo el microscopio óptico a 400X	21
7	Sistema semiabierto para cultivo de microalgas	22
8	Nanofibrillas de celulosa (CNF) secada en horno a 60°C por 1.5 horas, extraída de <i>C. vulgaris</i> comercial y una mezcla de microalgas aisladas del humedal artificial	23
9	Espectros FTIR de CNF extraída de <i>C. vulgaris</i> comercial y una mezcla de microalgas aisladas del humedal artificial	23
10	Imágenes SEM con magnificación de x 500-300 de CNF extraída de <i>C. vulgaris</i> comercial y una mezcla de microalgas aisladas del humedal artificial	24
11	Hidrogel formado a partir de la CNF extraída a partir de diferentes fuentes de microalgas previo a un calentamiento final a 60°C por 30 min y posterior al calentamiento	26
12	Hidrogel formado a partir de la CNF extraída de <i>C. vulgaris</i> comercial	26
13	Espectro FTIR de celulosa comercial	40

Resumen

Los hidrogeles a base de celulosa han cobrado mayor interés en los últimos años debido a que constituyen un material prometedor para una amplia gama de aplicaciones, tales como las gasas para heridas, andamios para medicina regenerativa, dispositivos para administración controlada de medicamentos, depósitos de agua en la agricultura, empaques biodegradables para alimentos, etc. Las principales ventajas de hidrogeles a base de celulosa son: hidrofilia, renovabilidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad, bajo costo y no-toxicidad. Una fuente de celulosa son las microalgas verdes, siendo estos microorganismos abundantes, ubicuos y asequibles. Dadas las amplias aplicaciones de las microalgas, principalmente por sus pigmentos y ácidos grasos, el presente estudio tuvo por objetivo extraer y purificar celulosa obtenida de una mezcla de microalgas aisladas de un humedal artificial, mediante un método de extracción genérico, para la producción de hidrogeles. Para probar la viabilidad del método genérico, se llevó a cabo la extracción de celulosa a partir de biomasa seca de *Chlorella vulgaris* comercial. Por medio de este, se obtuvo un rendimiento de la reacción del 0.15%. La presencia de nanofibrillas de celulosa (CNF) se corroboró mediante análisis FTIR y SEM. En cambio, con la mezcla microalgas, estando compuesta por *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., se obtuvo un rendimiento del 1.6%, aunque el extracto estuvo mayormente compuesto por desechos celulares y una cantidad insignificante de celulosa. Aunque la celulosa proveniente de la mezcla de microalgas no fue útil para la producción de un hidrogel, con la CNF recuperada de *C. vulgaris* comercial se obtuvo una parcial gelificación. Aunque no se formó un hidrogel funcional, se demostró que la celulosa proveniente de microalgas puede ser un precedente para la producción de hidrogeles, siendo necesario en futuros estudios la optimización de la extracción y purificación del biopolímero.

Abstract

Cellulose-based hydrogels have gained more interest throughout the years as they have become a promising material for a wide range of applications, such as wound dressings, scaffolds for regenerative medicine, devices for controlled drug delivery, water reservoirs in agriculture, biodegradable food packaging, etc. Its main advantages are hydrophilicity, renewability, biodegradability, biocompatibility, low cost, and non-toxicity. One of the natural sources of this biopolymer are green microalgae. These microorganisms are known to be abundant, ubiquitous, and low-cost maintenance. Given the wide applications of microalgae, mainly for their pigments and fatty acids, the present study aimed to extract and purify cellulose from a mixture of microalgae, isolated from an artificial pond. This was done using a generic cellulose extraction method, in order to use it afterwards to produce hydrogels. To test the feasibility of the generic method, cellulose extraction was performed using commercial *Chlorella vulgaris* dry biomass. By this means, a reaction yield of 0.15% was obtained. The presence of cellulose nanofibrils (CNF) was confirmed by FTIR and SEM analysis. On the other hand, with the microalgae mixture (composed by *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp.) a yield of 1.6% was obtained. However, most of the extract was composed mainly of cellular debris and an insignificant amount of cellulose. The cellulose extracted from the microalgae mixture was not enough to produce hydrogel. However, partial gelation was obtained using CNF collected from commercial *C. vulgaris*. Though a functional hydrogel was not produced, it was shown that cellulose from microalgae is still a feasible option for the future production of hydrogels. To ensure this in future studies, it is recommended to optimize the extraction and purification of the biopolymer.

1. Introducción

Las microalgas son microorganismos unicelulares, polifiléticos, fotosintéticos capaces de crecer de forma autotrófica y heterotrófica. Estos seres microscópicos son ubicuos, pudiendo crecer en ambientes acuáticos (tanto salinos como de agua dulce), y terrestres. Destacan por sobrevivir y adaptarse a ambientes con condiciones extremas: hipersalinos, ácidos, temperatura altas o bajas. En ecosistemas acuáticos contribuyen con el balance de oxígeno disuelto en el agua por medio de fotosíntesis (Gómez, 2007), además de ser eficientes en la fijación de dióxido de carbono; el uso de agua y de luz solar para la producción de biomasa (Lage *et al.*, 2021). Aunque tienen diferentes utilidades, sobresalen como bioindicadores de la calidad acuática (Arrieta, 2008). Es por ello que han proliferado en el humedal artificial que posee la empresa Cementos Progreso; ubicada en Sanarate, El Progreso, Guatemala. Este humedal fue construido en el año 2,000 para el tratamiento de aguas residuales derivadas de usos domésticos, con la finalidad de mejorar la calidad del agua en ecosistemas naturales. Se han realizado diferentes estudios para el aislamiento de estos microorganismos del humedal artificial para su posterior identificación y se determinó que está comprendido principalmente por los siguientes géneros de microalgas: *Chlorella*, *Wilmottia*, *Chlorococcum*, *Euglena*, *Arthrospira* (Carrillo, 2019).

Además de ser utilizadas como bioindicadores de la calidad acuática, se manifiesta el interés por ampliar las aplicaciones de las microalgas a otras ramas, para su aprovechamiento, principalmente por las ventajas que representan respecto a su rápida reproducción y bajo costo de mantenimiento. En años recientes, ha destacado su utilidad para aplicaciones biotecnológicas, variando entre diferentes especies, actuando como soluciones prometedoras para conflictos dentro de la industria farmacéutica, industria alimenticia, biorremediación ambiental y producción de bioenergías (Arrieta, 2008). Los compuestos activos de interés para las industrias anteriormente mencionadas suelen ser los lípidos y pigmentos que las microalgas poseen. Sin embargo, estos seres también sobresalen como una alternativa de materia prima para la obtención de biopolímeros. Entre los biopolímeros renovables se encuentra la celulosa (Valero *et al.*, 2013), un polisacárido formado a partir de cadenas lineales de β -D-glucosa que comprende aproximadamente el 70% del peso seco en la pared celular de microalgas verdes (Moral, 2012). La celulosa de procedencia de plantas, bacterias o microalgas ha sido utilizada en diferentes industrias para la fabricación de pinturas, papel y pulpas, composiciones, filtros, empaques biodegradables y sensores electrónicos.

Siendo de gran interés, se ha ampliado la aplicación de la celulosa de procedencia biológica a la preparación de hidrogeles. Los hidrogeles se definen como redes poliméricas reticuladas y capaces de retener una fracción significativa de agua dentro de su estructura (Ahmed, 2015). Estos han recibido una atención considerable en los últimos años debido a que constituyen un material prometedor para amplia gama de aplicaciones. Las principales ventajas de hidrogeles a base de celulosa son: hidrofilia, renovabilidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad, bajo costo y no-toxicidad (Yang *et al.*, 2020). Las tecnologías de hidrogeles pueden aplicarse a productos higiénicos, agricultura, sellados, deshidratación de carbón, nieve artificial, farmacéuticos, aditivos de alimentos y biosensores (Ahmed, 2015). Dado que poseen un grado de flexibilidad similar a un tejido natural, recientemente han sobresalido dentro del área de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa debido a su capacidad de encapsular células madre y cargarse con factores de crecimiento y proteínas esenciales para promover la diferenciación celular (Mantha *et al.*, 2019), siendo una estrategia prometedora dentro de la medicina regenerativa para la reparación de tejidos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Extraer y purificar celulosa obtenida de una mezcla de microalgas aisladas de un humedal artificial, mediante un método de extracción genérico, para la producción de hidrogeles.

2.2. Objetivos específicos

- Estandarizar un método genérico para la extracción de celulosa de biomasa comercial de *Chlorella vulgaris*.
- Aplicar el proceso de extracción de celulosa a una mezcla de microalgas aisladas de un humedal artificial.
- Caracterizar morfológicamente las nanofibrillas de celulosa extraídas de una mezcla de microalgas.
- Elaborar un hidrogel a partir del extracto de nanofibrillas de celulosa derivado de microalgas.

3. Justificación

El estudio se centró en las microalgas presentes naturalmente en el humedal artificial de la empresa Cementos Progreso, en Sanarate, El Progreso, Guatemala. Estos microorganismos han sido utilizados como biosensores de la calidad acuática del humedal, puesto que el fin de este último es tratar aguas residuales derivadas de usos domésticos. Además de ello, contribuyen con la reducción de la huella de carbono por el uso de este gas para la realización de fotosíntesis. Sin embargo, una problemática que ha surgido es la continua proliferación de estos microorganismos por la abundancia de nutrientes en el sistema: nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y otros metales que actúan como cofactores (Lage *et al.*, 2021) y que, por ende, resultan en la acumulación de biomasa. En estudios anteriores se ha empleado la biomasa de microalgas para la extracción de compuestos de interés, principalmente pigmentos, proteínas y lípidos, para diferentes aplicaciones dentro de la industria farmacéutica, cosmética, alimenticia y generación de bioenergía. Sin embargo, estos microorganismos también sobresalen como una alternativa de materia prima para la obtención de biopolímeros, entre ellos la celulosa. Aprovechando que las microalgas tienen un bajo costo de mantenimiento y tienen una reproducción relativamente rápida, se planteó brindarle una aplicación a la biomasa y de ella extraer celulosa que pueda ser utilizada para diferentes fines.

Cabe mencionar que los biopolímeros han cobrado mayor importancia en la actualidad para diferentes aplicaciones de sostenibilidad debido a que son biocompatibles y biodegradables. Estas características los vuelven útiles en diferentes aplicaciones como películas comestibles, emulsiones, materiales de empaquetamiento en la industria alimenticia, para transporte de medicamentos, implantes médicos, matrices para tejidos, entre otros. Estos se dividen en biopolímeros sintéticos (ácido poliláctico, policaprolactona, alcohol polivinilo) o naturales (celulosa, almidón, gelatina). La celulosa, siendo uno de los biopolímeros más abundantes en el planeta, tiene la ventaja de ser biológicamente renovable, no tóxico, biodegradable, biocompatible, bioadhesivo y biofuncional (Baranwal *et al.*, 2022). Este biopolímero se suele obtener de forma natural de plantas y bacterias. Recientemente, las algas y microalgas han sido un nuevo enfoque para la extracción de celulosa. En microalgas verdes, la celulosa comprende aproximadamente el 70% del peso seco en la pared celular (Moral, 2012). La celulosa de procedencia de plantas, bacterias o microalgas ha sido utilizada en diferentes industrias para la fabricación de pinturas, papel y pulpas, composiciones, filtros, empaques biodegradables y sensores electrónicos.

Una de las aplicaciones de la celulosa que ha cobrado gran interés en los últimos años es su aprovechamiento para la producción e hidrogeles. Esto se debe a que este compuesto facilita la polimerización y retención del agua dentro de estas estructuras por su hidrofilia. Además, son renovables, biodegradables, biocompatibles, de bajo costo y no presenta toxicidad (Yang *et al.*, 2020). Las características de los hidrogeles a base de celulosa lo vuelven una alternativa viable y sostenible para diferentes aplicaciones dentro de la industria de alimentos, farmacéutica, agricultura, ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

4. Marco teórico

4.1. Microalgas

Las microalgas son microorganismos unicelulares, polifiléticos, fotosintéticos capaces de crecer de forma autotrófica y heterotrófica, en diversos ambientes. Estos son ubicuos, es decir, que tienen una amplia distribución en ambientes acuáticos, salinos o de agua dulce, y terrestres; pudiendo adaptarse y sobrevivir en condiciones extremas (hipersalinos, alcalinos, ácidos, temperaturas bajas o temperaturas elevadas). En los ecosistemas acuáticos contribuyen con el balance de oxígeno disuelto en el agua durante la fotosíntesis (Gómez, 2007). Además, se caracterizan por su eficiencia en la fijación de dióxido de carbono, el uso de agua y de luz solar para la producción de biomasa. Para su desarrollo y correcto funcionamiento metabólico también requieren nutrientes fundamentales como nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y otros metales que actúen como cofactores (Lage *et al.*, 2021).

Las algas microscópicas han ganado una mayor relevancia en la actualidad debido a sus diferentes aplicaciones biotecnológicas e industriales, ya sea en cultivo masivo, inmovilizadas, vivas o procesadas (Arrieta, 2008). Debido a su fácil cultivo y rápido crecimiento, son sometidas a la explotación comercial. Una de las principales aplicaciones radica en la producción de biocombustible (Susanti & Taufikurahman, 2020), específicamente biodiésel, por ser una fuente rica en lípidos funcionales transesterificables (ácidos grasos y derivados) (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

4.1.1. Clasificación

Estos microorganismos ocupan una alta biodiversidad debido a la variedad en sus características morfológicas, estructura de plastidios, composición bioquímica, reproducción, organización celular y hábitat. Con relación a su morfología, son considerados eucariotas por poseer organelos celulares definidos por membranas. Estos se pueden dividir en los siguientes grupos: bacilariofita, clorofita (alga verde), crisofita, dinofita, eustigmatofita, feofita, primnesiofita, rhafofita, rodofita (alga roja) y xantofita (Carrillo, 2019; Susanti & Taufikurahman, 2020).

4.1.2. Cultivo

Para el cultivo de microalgas es necesario tomar en consideración la especie a cultivar y la finalidad de su biomasa. Cohen (1986) y Tan *et al.* (2020) destacan tres ventajas del cultivo de microalgas:

- Es un sistema biológico que utiliza eficientemente energía solar para la producción de materia orgánica. Los rendimientos anuales de biomasa de microalgas suelen ser mayores que el de plantas terrestres debido a su rápido crecimiento.
- Facilidad en la composición bioquímica algal mediante la variación de las condiciones ambientales y/o del medio de cultivo.

- Bajo determinadas condiciones, varias especies de microalgas son capaces de producir y acumular altas concentraciones de compuestos de interés comercial (lípidos, almidón, proteínas, glicerol, biopolímeros, pigmentos naturales).

Sistema de cultivo

Sistema abierto

Este sistema es aquel en el que los cultivos están expuestos a las condiciones del medio ambiente. Dado que dependen grandemente de factores ambientales, biológicos y operacionales, las especies algales presentes en este sistema tienen una alta tolerancia a la variación diurna y estacional (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Los cultivos suelen ser mixtos, prevaleciendo los géneros *Ankistrodesmus*, *Botryococcus*, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Euglena*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, etc. (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Suelen ser utilizados para fines industriales por su capacidad de producción de biomasa a gran escala; sin embargo, tienen como desventaja su susceptibilidad a contaminación con bacterias capaces de competir y sustituir el cultivo de microalgas, o bien, de consumirlas (Alvarado, 2020).

Sistema cerrado

El sistema cerrado es aquel hecho con contenedores artificiales que previenen el contacto del cultivo con el ambiente externo. En este es posible tener cultivos monoespecíficos (Hernández-Pérez & Labbé, 2014) y mantener un control de las condiciones fisicoquímicas que intervienen para su cuidado. Ramírez *et al.* (2013) establecen que los fotobiorreactores, siendo un medio de cultivo de sistema cerrado, tienen la ventaja de proveer una mayor eficiencia en el proceso de fotosíntesis, evitar la contaminación con otros microorganismos, reducir la pérdida de dióxido de carbono y de evaporación del agua. Estos pueden ser de diferentes materiales y tener diferentes diseños.

Condiciones

Ajeno a la especie de microalgas a cultivar y el tipo de sistema de cultivo, es necesario cumplir determinadas condiciones, abióticas y bióticas, para modular la productividad primaria y optimizar su crecimiento. Los factores más relevantes son: disponibilidad de nutrientes, disponibilidad de dióxido de carbono, pH, luz, temperatura y pastoreo (por predadores). Respecto a los nutrientes, los requerimientos pueden variar en función de la especie. De forma general, suelen necesitar los elementos conformantes de la materia orgánica (carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo). Además de estos macronutrientes, precisan de micronutrientes como lo son las trazas de hierro, cobre, cobalto, zinc y manganeso. Dichos nutrientes contribuyen con el metabolismo fotosintético, regulación del contenido lipídico, formación de ácidos nucleicos y el balance energético. Por otro lado, otro requerimiento de las microalgas consiste en una efectiva fijación del dióxido de carbono ambiental para el aumento de su productividad. Aunque la capacidad de fijación puede variar dependiendo de la especie, suelen tolerar concentraciones entre 10 y 15% de este gas (Hernández-Pérez & Labbé, 2014; Gómez, 2007). Unido a esto, es necesario tomar en consideración otro gas disuelto: el oxígeno. Este es un producto del metabolismo fotosintético de las microalgas; sin embargo, una elevada saturación tiende a aumentar la productividad (Park *et al.*, 2011).

Al igual que el nivel de CO₂, el pH óptimo para inducir una buena productividad algal varía en cada especie. Es necesario tomar en consideración que el pH puede variar en función de diversos factores: composición iónica del medio de cultivo, respiración, dióxido de carbono disuelto y actividad microbiana. La intensidad lumínica es otro parámetro necesario que influye en la productividad de los cultivos, principalmente durante su fotosíntesis. Park *et al.* (2011) establece que, por encima del punto de saturación de luz, se puede inducir fotoinhibición y resultar, en el peor de los casos, en apoptosis. En cuanto a la temperatura, suele oscilar entre los 28° a 35°C, aunque el rango óptimo específico dependerá de la especie. Esta variable es fácil de controlar en sistemas cerrados, mientras que en sistemas abiertos suele depender del ambiente y las medidas que se implementen para mantenerlo en un rango deseado. Es necesario tomar en consideración que las microalgas son susceptibles a depredadores como algunos grupos zooplanctónicos (rotíferos y nemátodos), principalmente en sistemas abiertos. Una contaminación por parte de estos implica una reducción en la productividad de hasta 90-99% de la población de microalgas, en pocos días (Park *et al.*,

2011). Para tratar estas plagas se puede optar por medios físicos (filtración, baja concentración de oxígeno disuelto, centrifugación) o químicos (aplicación de hormonas miméticas contra invertebrados, inducción a un pH alcalino) (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

4.1.3. Aplicaciones biotecnológicas e industriales de las algas

Las algas microscópicas han ganado una mayor relevancia en la actualidad debido a sus diferentes aplicaciones biotecnológicas e industriales, ya sea en cultivo masivo, inmovilizadas, vivas o procesadas (Arrieta, 2008). Debido a su fácil cultivo y rápido crecimiento, son sometidas a la explotación comercial. A continuación, se resumen algunas de sus aplicaciones:

- **Biocombustible:** son una fuente de energía renovable que suponen ser una potencial solución frente al agotamiento de combustibles fósiles. Para su producción se emplean lípidos funcionales transesterificables (ácidos grasos y derivados), siendo utilizado principalmente *C. vulgaris* (Brennan & Owende, 2010; Patnaik & Mallick, 2021). Sin embargo, es necesario considerar que para su producción es necesaria la quema de la biomasa, lo que representa una liberación de altas cantidades de dióxido de carbono a la atmósfera.
- **Biofertilizantes:** han demostrado mejorar la productividad de los cultivos vegetales mediante el aumento de la fertilidad de los suelos, debido a su alto contenido en carbono, nitrógeno, fósforo y hierro (Win *et al.*, 2018).
- **Biorremediación:** microalgas cianofitas y clorofitas son empleadas para reducir la erosión del suelo por la producción de mucílagos (Ortiz-Moreno *et al.*, 2019). Además, son utilizadas para el tratamiento de aguas residuales mediante la detoxificación biológica y control de la concentración de metales pesados disueltos (Gómez, 2007). Es necesario llevar un control sobre el crecimiento de las microalgas para evitar que altos niveles de estos eutroficien el agua.
- **Cosméticos:** suele utilizarse para el cuidado de piel (como reparación cutánea y reducir arrugas, ejercer efecto de tensión, evitar formación de estrías), siendo mayormente utilizados *Arthrospira*, *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata* (Spolaore *et al.*, 2006; Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Los compuestos bioactivos de interés son polisacáridos, ácidos, aminoácidos y derivados, pigmentos, etc. (Mourelle *et al.*, 2017).
- **Fármacos:** las microalgas han cobrado un gran valor medicinal debido a que presentan efectos hipocolesterolémicos, actividad antifúngica, antibacteriana, inmunoreguladora y antitumoral. Además, la clorofila extraída de varias especies de microalgas tiene propiedades antisépticas y desinfectantes (Gómez, 2007; Hernández-Pérez & Labbé, 2014).
- **Suplementos nutritivos:** *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina* son los géneros más utilizados para el consumo animal. En cuanto al consumo humano, se destacan *Chlorella*, *Dunaliella* y *Spirulina* como fuente de proteína, vitaminas (A, B1, B2, B6, B12, C, E), minerales (potasio, hierro, magnesio, calcio, yodo) (Spolaore *et al.*, 2006; Koyande *et al.*, 2019).

4.2. Métodos de extracción de biomasa

Uno de los principales retos en el cultivo de las microalgas radica en el método de cosecha de estos para la producción de biomasa con fines comerciales, tratamiento de aguas residuales o captura de dióxido de carbono atmosférico. Esto se debe a que las microalgas tienen baja densidad y son de pequeño tamaño. La selección del método de recuperación depende de las características del cultivo, la complejidad y el costo del sistema. Algunos de los métodos más comunes para la cosecha de la biomasa son: centrifugación, sedimentación, filtración, flotación y floculación (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Generalmente, la cosecha de microalgas ocurre en un proceso de dos pasos: abultamiento de cosecha y espesamiento. El abultamiento de cosecha está dirigido a la separación de la biomasa acumulada de la suspensión. El factor de concentración durante esta etapa depende de la concentración inicial de biomasa y las tecnologías empleadas, incluyendo floculación, flotación o sedimentación. En cuanto al espesamiento, su objetivo radica en concentrar la biomasa abultada en el paso anterior por medio de tecnologías como la centrifugación, filtración o ultrasonido para promover la formación de agregados. Este último paso implica un mayor gasto energético que el primero (Shah *et al.*, 2014).

4.2.1. Centrifugación

Es una técnica factible para la separación de la biomasa del medio de cultivo, principalmente utilizado cuando el valor de los productos resultantes es elevado. El proceso de centrifugación depende de la generación de una fuerza centrífuga que actúa radialmente y acelera el movimiento y la separación de partículas en función de la diferencia de densidad entre la partícula y el medio que la rodea. Alrededor del 80-90% de microalgas pueden ser recuperadas entre 2-5 min de centrifugación y una aceleración entre 500-100 × g. La centrifugación suele ser un método preferido para recuperar células de microalgas, especialmente si se desea producir concentrados de vida útil prolongada para la acuicultura. La recuperación de biomasa de algas depende de las características de sedimentación de las células, el tiempo de residencia de la suspensión celular en la centrífuga y la profundidad de sedimentación.

Existen cinco tipos básicos de centrífugas: centrífuga de cuenco tubular, centrífuga de cuenco de cámara, centrífuga de discos, centrífuga de decantación o centrífuga de canasta (Doran, 2013). La selección del tipo dependerá de las características de la partícula a sedimentar (tamaño, densidad), del medio (densidad) y del producto de interés, sea este el sobrenadante o el pellet. A continuación se detallan las ventajas y desventajas de cada uno de los sistemas:

Cuadro 1. Comparación de la producción de centrífugas

Sistema	Ventajas	Desventajas
Centrífuga de cuenco tubular	Alta fuerza centrífuga Buen decante Fácil limpieza Desmantelamiento del cuenco fácil	Capacidad de sólidos limitada Obtención de un sobrenadante espumoso Recuperación difícil de sólidos
Centrífuga de cuenco de cámara	Eficiencia de clarificación Capacidad para sólidos grandes Buen decante Posibilidad de enfriamiento del cuenco	Sin descarga de sólidos Dificultad de limpieza Recuperación difícil de sólidos
Centrífuga de discos	Posibilidad de descarga de sólidos Descarga de líquidos bajo presión para eliminación de espuma Posibilidad de enfriamiento del cuenco	Baja tasa de decantación Dificultad de limpieza
Centrífuga de decantación	Continua descarga de sólidos Alta concentración de sólidos recuperados	Baja fuerza centrífuga
Centrífuga de canasta	Sólidos pueden ser lavados Buen decante Capacidad para sólidos grandes	No apta para sólidos biológicos suaves Sin descarga de sólidos Recuperación difícil de sólidos

Fuente: Doran (2013)

La centrifugación puede ser utilizada como un solo paso, o bien, como un paso secundario para la eliminación de agua de alga concentrada colectada por otros métodos. Aunque es rápido y eficaz, no es económicamente viable debido a que requiere de equipos especializados, ocupa mucha energía y no es apto para la recolección a gran escala (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

4.2.2. Sedimentación por gravedad

Es el método más común, en donde se lleva a cabo la recolección a través de la sedimentación por gravedad; es decir, la separación de sólidos y líquidos por acción de la fuerza gravitacional. Este proceso generalmente produce un lodo húmedo y voluminoso, como resultado de una compactación deficiente y velocidades de sedimentación lentas. Esta técnica funciona para varios tipos de microalgas, siendo principalmente aplicado para separar microalgas en agua y tratamiento de aguas residuales. Es necesario considerar que la densidad de la partícula, densidad del medio, radio de las células de microalgas influyen en las características del sedimento formado y la velocidad de sedimentación (Shah *et al.*, 2014).

La sedimentación por gravedad es energéticamente eficiente, muestra una alta efectividad y tiene un menor costo de ejecución (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Japar *et al.* (2017) menciona que algunos de los factores que pueden afectar la tasa de deposición y eficiencia de recolección de biomasa son: densidad y tamaño del microalga, temperatura, intensidad lumínica y tiempo. Para optimizar la cosecha de microalgas se suelen utilizar separadores de láminas y tanques de sedimentación, aunque también se puede recurrir a la floculación (Shah *et al.*, 2014).

4.2.3. Filtración

Se basa en la separación sólido-líquido, siendo eficiente para aquellas microalgas de células grandes (ej.: *Spirulina*), pero inefectivo para células de menor tamaño (ej.: *Chlorella*, *Scenedesmus*). A través de esto se recolecta la biomasa de microalgas a través de filtros en los que las células se acumulan, formando una pasta espesa, permitiendo únicamente el paso del medio líquido. Esta filtración puede darse de forma continua o discontinua. El sistema de filtración puede ser clasificado en microfiltración, macrofiltración, ultrafiltración u ósmosis reversa. La primera tiene un poro de tamaño inferior a 10 μm ; la segunda, de 0.1-10 μm ; la tercera, superior a 10 μm ; la cuarta, de 0.02-2 μm ; y la última, inferior a 0.001 μm (Shah *et al.*, 2014).

Una filtración convencional suele ser insuficiente para la recuperación de biomasa, por lo que se suele emplear una succión o diferencia de presiones para separarlo. Cabe mencionar que esta técnica no suele ser utilizada para la recuperación de biomasa compuesta de células de microalga de menor tamaño por la necesidad de un filtro con poro de menor tamaño, siendo estos más costosos, y consumo de mayor tiempo, especialmente cuando se procesan grandes volúmenes de suspensiones de microalgas (Shah *et al.*, 2014). Aunque se continúa su utilización, no es un método recomendable por el gran gasto energético, necesidad de reemplazo frecuente de la membrana y el bombeo continuo de la biomasa (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Además, otro problema que presenta es la adhesión de las células a la superficie de las membranas, dificultando su separación de forma manual y siendo requerido la realización de lavados para su recuperación. Esto resulta en la disminución de la concentración de concentrado de algas recuperado (Shah *et al.*, 2014).

4.2.4. Flotación

Este método es un proceso de separación por gravedad que consiste en la adición de gases (aire u ozono) que interactúan con la carga de las paredes celulares de las microalgas. Las burbujas de aire o gas se unen a las partículas sólidas para su posterior transporte a la superficie del líquido. Con la flotación y acumulación en la superficie es posible desnatar la microalga del medio (Hernández-Pérez & Labbé, 2014; Shah *et al.*, 2014). El éxito de la flotación depende de la inestabilidad de las partículas suspendidas, puesto que con una menor inestabilidad habrá un mayor contacto con las partículas de aire. Shah *et al.* (2014) menciona que este método es más beneficioso y efectivo que la sedimentación respecto a la remoción de microalgas. Esto se debe a su capacidad por capturar partículas con un diámetro inferior a 500 μm por colisión entre la burbuja y la partícula. Aunque es una técnica prometedora, el uso de ozono supone una desventaja al incrementar los costos del proceso. Además, únicamente es viable en ensayos a escala de laboratorio para la recolección de algas unicelulares pequeñas (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

Existen tipos de flotación dependientes del método optado para la producción de burbujas: flotación por aire disuelto y flotación electrolítica. La primera es un proceso por el cual se generan pequeñas burbujas, con

un tamaño entre 10-100 μm . La producción de burbujas de aire finas se basa en la solubilidad del aire en agua a medida que aumenta la presión. Esto es posible llevarlo a cabo por saturación a presión atmosférica y flotación al vacío, saturación bajo carga estática con flujo ascendente y surgimiento de microfloración, o saturación a presiones superiores a la atmosférica y flotación bajo condiciones atmosféricas. La flotación por aire disuelto puede emplear un floculante y burbujas de aire altamente presurizadas (por calor o aire arrastrado) para obligar a las células de microalgas a agruparse y flotar hacia la superficie del agua, donde posteriormente pueden ser eliminadas por un dispositivo de desnatado. Aunque resulta altamente eficiente, este tipo de flotación requiere de una gran cantidad de energía y altas presiones. En la flotación electrolítica se utiliza la electrólisis para formar burbujas de gas. Se ha visto que este tipo de flotación es efectivo para una gran variedad de microalgas; sin embargo, requiere de una elevada inversión energética (Shah *et al.*, 2014).

4.2.5. Floculación

Es un proceso que consiste en la agregación espontánea de las células, resultando en la sedimentación de la microalga. Aunque puede ocurrir de forma natural por la limitación de carbono o de otros factores abióticos, también puede ser inducido por un mecanismo de dispersión de carga (Rawat *et al.*, 2011). La agregación espontánea que ocurre de forma natural es denominada autofloculación y ocurre por la precipitación de sales carbonatadas con células de algas. Sin embargo, esta no ocurre en todas las especies de microalgas y puede ser lenta y poco confiable (Shah *et al.*, 2014). A diferencia de esta, la floculación química requiere de la adición de un químico floculante, sea orgánico o inorgánico. Comúnmente se emplean sales metálicas, como sulfato de aluminio, que interactúan con la carga negativa de las microalgas. Dicha interacción resulta en la coagulación o formación de agregados de las células de microalgas (Rawat *et al.*, 2011). También es posible utilizar como agentes floculantes inorgánicos sulfato férrico, cloruro férrico o cal de hidróxido de calcio. Cabe mencionar que una de las desventajas del uso de floculantes químicos inorgánicos se debe a que es necesaria una alta concentración de estos para causar una separación sólido-líquido de la microalga, resultando en la producción de una gran cantidad de sedimento químico. En cambio, los químicos orgánicos floculantes que pueden ser utilizados son: mucílago de okra, quitosano-poliacrilamida catiónico modificado, Greenfloc 120, o una combinación de almidón y quitosano (Shah *et al.*, 2014).

La floculación es considerada como la primera fase abultamiento de la cosecha, cuyo propósito radica en agregar las células de microalgas para aumentar el tamaño efectivo de las “partículas”. Este paso es preparatorio para un segundo proceso de espesamiento de la biomasa. Aquellas técnicas de espesamiento que se pueden combinar con la floculación suelen ser la filtración, flotación o sedimentación, las cuales vuelven el proceso de cosecha más eficiente (Japar *et al.*, 2017). No obstante, no es apto para la recolección de biomasa cuando los productos de interés requieran cierto grado de pureza, ya que los residuos de esta técnica actúan como contaminantes (Rawat *et al.*, 2011), principalmente cuando se añaden sales de aluminio o hierro. Es necesario considerar que este proceso es sensible al nivel del pH y, aunque puede funcionar para algunas especies de microalgas, cabe mencionar que no funciona para todas las especies. Relacionado a lo anterior, el tamaño, la forma y la composición del flóculo puede variar según la especie y el agente floculante utilizado (Shah *et al.*, 2014).

El siguiente cuadro (Cuadro 2) muestra una comparativa, en términos de ventajas y desventajas, de las diversas técnicas para la recolección de biomasa de microalgas:

Cuadro 2. Comparación de técnicas de cosecha de microalgas.

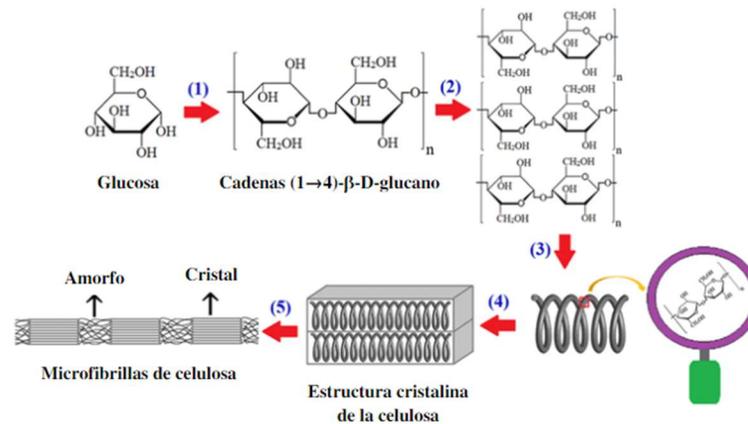
Técnica de cosecha	Ventajas	Desventajas
Centrifugación	Apto para la mayoría de las especies de microalgas Rápida y eficiente cosecha	Alta inversión operacional y de capital
Sedimentación	Bajo costo Potencial de uso como primera etapa para reducción de inversión de costos y energía	Específico para especie de microalgas Más apto para células no-motil densas Separación lenta Baja concentración final
Filtración	Amplia disponibilidad y variedad de filtros y membranas	Filtro usado depende del tamaño de la célula (dependiente de la especie de alga) Apto para células de algas grandes Obstrucción de filtros y membranas
Flotación	Más rápida que la sedimentación Posibilidad de combinar con transferencia gaseosa	Específico para especie de microalgas Alta inversión de capital y operacional
Floculación	Amplia variedad de floculantes disponibles Precio de floculante suele ser bajo	Dificultad de remoción de floculantes Contaminación química

Fuente: Shah *et al.* (2014)

4.3. Celulosa de microalgas

Las células de microalgas están rodeadas por un número relativamente pequeño de polímeros entrelazados en matrices tridimensionales precisos que forman la pared celular. La composición de la pared puede variar dependiendo de la especie y cambiar durante el desarrollo del organismo, o bien, como consecuencia a condiciones ambientales (Sarkar *et al.*, 2009). Consta de celulosa y hemicelulosa; y, variando entre especies, también se pueden presentar alginatos, carragenanos, fucoidanos, pectinas, ulvanos y agar (Zanchetta *et al.*, 2021). La prevalencia de celulosa, un polisacárido morfogénico, es esencial en la estabilidad de la pared celular de plantas, algas y microalgas (Lampugnani *et al.*, 2019). Este polisacárido lineal extracelular se forma a través de la polimerización de unidades de glucosa unidas por enlaces acetales entre el C1 y el C4 del anillo glucopiranososa (Zanchetta *et al.*, 2021), resultando en cadenas de (1→4)-β-D-glucano. Como se presenta en la Figura 1, estas cadenas son empaquetadas en microfibrillas cristalinas o amorfas por medio de enlaces de hidrógeno intermoleculares (Cifuentes *et al.*, 2010; Cidreira *et al.*, 2021).

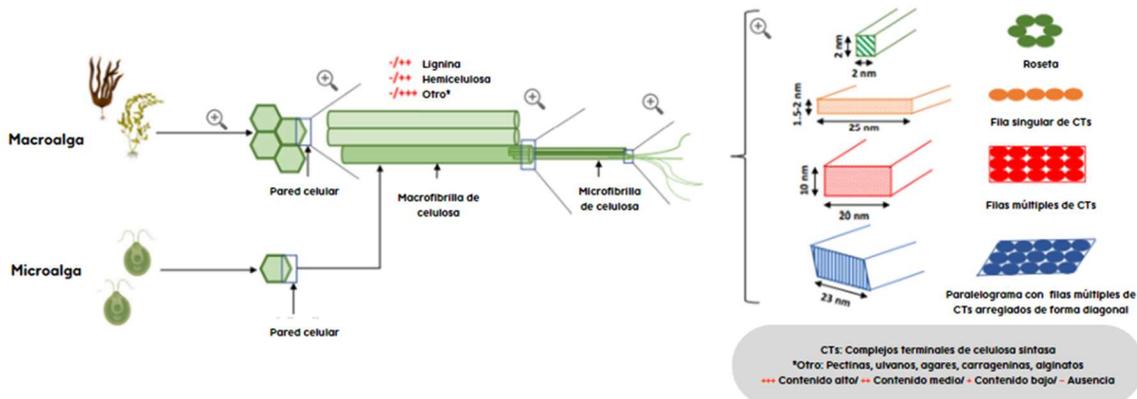
Figura 1. Representación esquemática de la síntesis de celulosa en organismos (plantas, bacterias, algas, etc.). (1) Polimerización de unidades de glucosa para formación de cadenas (1→4)-β-D-glucano; (2) ensamblaje de cadenas de glucano para formación de celulosa; (3) enlace de moléculas de celulosa para formar fibrillas; (4) cristalización de fibrillas de celulosa; (5) disposición de microfibrillas de celulosa en fase cristalina o amorfa.



Fuente: Cidreira *et al.*, 2021

El arreglo de las microfibrillas está directamente relacionado con la geometría de los complejos terminales (CTs). En la Figura 2 se muestran los posibles arreglos de CTs en microalgas: roseta, lineal y diagonal (Tsekos, 1999). Las rosetas se caracterizan por el arreglo de las microfibrillas de celulosa en una forma hexagonal y se presenta normalmente en miembros de Charophyceae. La estructura lineal puede subdividirse en filas singulares y filas múltiples. La primera se ha observado en algas pardas (Phaeophyceae) y algas rojas (Rodophyta), mientras que la segunda se encuentra en Ulvophyceae, Chlorophyceae, Dinophyta y algunas Rodophyta. La estructura diagonal consiste en múltiples filas dispuestas en un paralelograma diagonal y se encuentra en microalgas de la clase Xanthophyceae (Zanchetta *et al.*, 2021).

Figura 2. Organización y morfología de complejos terminales sintetizadores de celulosa (CTs) en macro y microalgas.



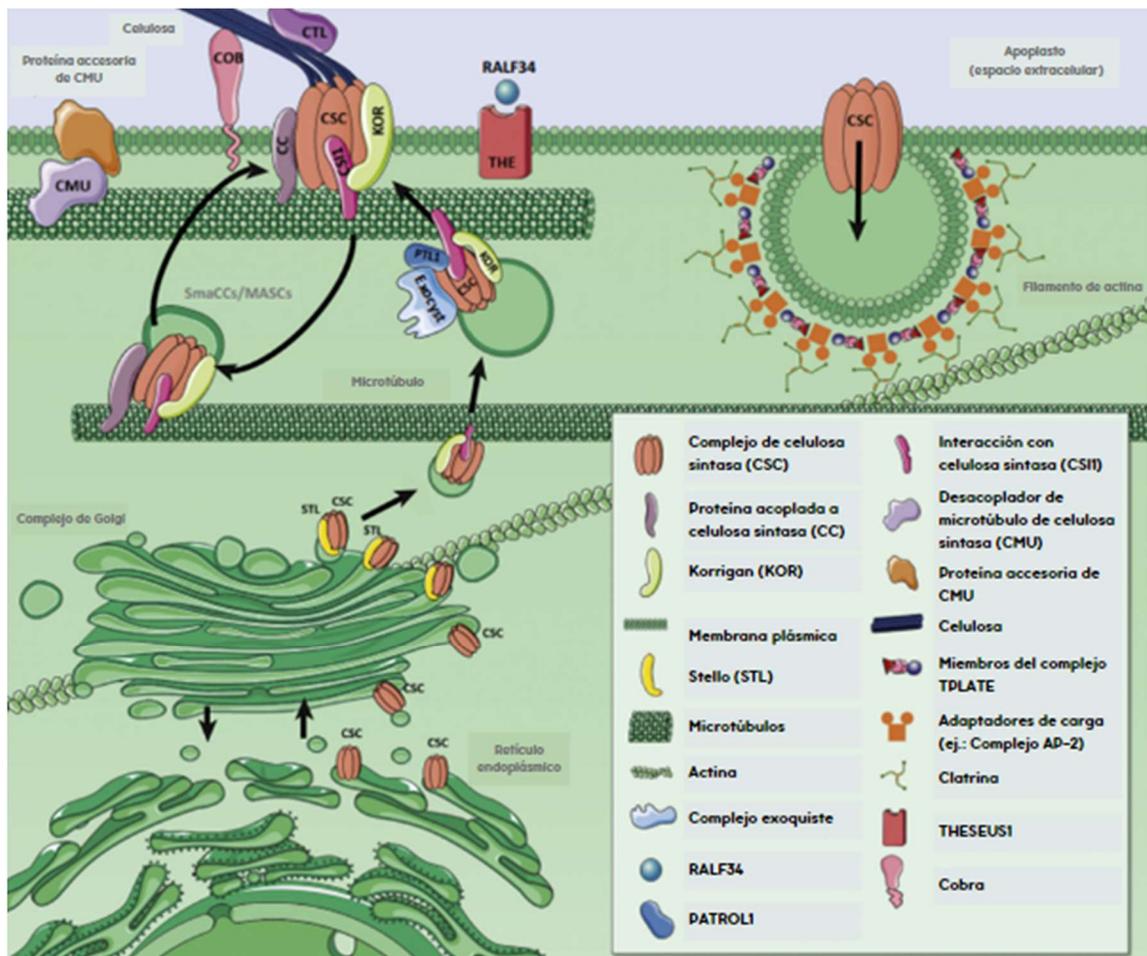
Fuente: Zanchetta *et al.*, 2021

4.3.1. Biosíntesis

La celulosa es sintetizada por complejos enzimáticos unidos a la membrana conocidos como complejos terminales (CTs) de celulosa sintasa. Estos usan UDP-glucosa como donante de azúcar para catalizar la formación de enlaces glucosídicos en las cadenas de glucano en crecimiento (Cifuentes *et al.*, 2010). No se han realizado estudios en donde se dilucide el mecanismo de síntesis de celulosa específico para las microalgas; sin embargo, debido a su relación filogenética con plantas terrestres se asume que el mecanismo de biosíntesis es similar.

La Figura 3 muestra la función de algunos componentes que contribuyen con la síntesis de celulosa en plantas terrestres. Las celulosa sintetasas (CESA) de proteínas CTs son sintetizadas, y posiblemente ensambladas, en el retículo endoplásmico (ER) para posteriormente ser exportadas de forma individual (CESA) o como complejo (CT) al aparato de Golgi (Tsekos, 1999), donde las proteínas Stello (STL) participan en distribuir y secretar CTs. La tasa de secreción por la red trans-Golgi es controlada por el pH y se regula por acción de la actina del citoesqueleto. En la corteza celular, las CTs se pueden encontrar en pequeñas vesículas denominadas smaCC/MASCs que están involucradas en la entrega y/o internalización de las CTs. Además de las subunidades CESA, el CT contiene proteínas accesorias, incluidas korrigan (KOR) y el acompañante de CESA (CC). Una vez en la membrana plasmática, el CT se vuelve catalíticamente activa, lo que da como resultado el movimiento del complejo. La dirección del movimiento puede estar dirigida por microtúbulos corticales a través de CSI1. Las proteínas extracelulares, como Cobra (COB) y CTL, pueden interactuar con las microfibrillas de celulosa y afectar sus características estructurales. Se cree que el CT estará activo durante algún tiempo. Cuando algunos de estos complejos CTs se estancan o pierden su función, se reciclan o se transportan a través de endosomas tardíos formada por el complejo TPLATE hacia vacuolas para su degradación (Li *et al.*, 2014; Lampugnani *et al.*, 2019).

Figura 3. Descripción generalizada de la función de los componentes involucrados en la síntesis de la celulosa.



Fuente: Lampugnani *et al.*, 2019

Las proteínas CESA presentan 8 hélices putativas transmembranales que están involucradas en el anclaje de la enzima a la membrana plasmática. Se predice que una gran parte soluble de CESAs están localizadas en el lado citoplásmico de la membrana, en donde la UDP-glucosa es sintetizada por la pirofosforilasa UDP-glucosa como resultado del metabolismo fotosintético. Cabe recalcar que la parte soluble de la proteína CESA

contiene los aminoácidos catalíticos que forman los enlaces β en las cadenas de celulosa a partir de las moléculas de UDP-glucosa, en el que la glucosa tiene inicialmente una configuración α . Se sugiere que este mecanismo de inversión está acoplado a la adición de unidades de glucosa al extremo no reductor de las cadenas de glucano en crecimiento. Estas cadenas de glucano, presentes en el citoplasma, son exportadas a través de la membrana plasmática para llegar a la pared celular. Aunque el mecanismo de exportación es desconocido, diversos autores han propuesto varias hipótesis para la explicación de este fenómeno. Una de estas hipótesis supone la existencia de un poro delimitado por las 8 hélices de CESA, a través del cual pasan las cadenas a través de la membrana. Otros modelos hipotéticos proponen la participación de proteínas parecidas a porinas que contribuyan con la translocación. Tras ser sintetizado, las cadenas de (1 \rightarrow 4)- β -D-glucano son liberados en la pared celular por acción catalítica de KOR. Su posterior ensamblaje en microfibrillas cristalinas de celulosa en la pared es un proceso poco comprendido que puede darse de forma espontánea o por acción de otras proteínas (Saxena & Brown, 2005; Bessueille & Bulone, 2008).

La regulación de la síntesis de celulosa se puede llevar a cabo a nivel transcripcional o postranscripcional. A nivel transcripcional se ven involucradas hormonas, como brasinoesteroides, que afectan la expresión de los genes CESA. A nivel postranscripcional, la actividad catalítica de las CESAs se ve afectado por la fosforilación de estas. Asimismo, puede alterar la relación entre CTs y microtúbulos (Li *et al.*, 2014). Un estudio realizado por Jeong *et al.* (2017) se demostró que la privación de nitrógeno en cultivos de *Nannochloropsis* salina puede aumentar la transcripción de UDP-glucosa pirofosforilasa y celulosa sintasas, resultando en el engrosamiento de la pared celular por acumulación de celulosa.

4.3.2. Métodos de extracción

Existen diversos protocolos de extracción de celulosa de macro y microalgas, aunque su selección depende de la especie utilizada y el uso que se le dará a la celulosa. Estos se pueden dividir en tratamientos mecánicos y químicos (Moral, 2012).

En el Cuadro 3 se recaba el contenido de celulosa de algunas microalgas obtenida en diversos estudios, principalmente por una combinación de extracción mecánica y química.

Cuadro 3. Contenido de celulosa en base al peso seco total de biomasa de microalgas.

Filo	Clase	Cepa	Celulosa (%)	Referencias
-	-	Mezcla de microalgas y cianobacterias de una planta de tratamiento de aguas residuales	7.1	(Ververis <i>et al.</i> , 2007)
Chlorophyta	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella vulgaris</i>	10 – 47.5	(Aguirre & Bassi, 2013)
Ochrophyta	Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	25	(Samia <i>et al.</i> , 2016)

Extracción mecánica

Para separar la celulosa del resto de componentes celulares se recurre a sistemas mecánicos (homogeneizadores de alta presión, molinos, refinadores, tratamientos ultrasónicos, etc.) que provocan una escisión transversal a través de la pared celular para la liberación de la celulosa microfibrilada. La biomasa utilizada para la extracción de celulosa debe pasar varias veces por el tratamiento mecánico para asegurar una mayor extracción del contenido celulósico; sin embargo, esto puede resultar en la pérdida de cristalinidad y disminución del tamaño de las fibras. La celulosa extraída debe ser sometida a tratamientos secundarios (como filtración o tratamientos químicos) para su purificación y extracción de las regiones amorfas (Moral, 2012). Un método sugerido por Wahlström *et al.* (2020) para recuperar la cristalinidad de la celulosa consiste en someterla a un tratamiento ácido, usualmente con HCl, para promover la hidrólisis y formación de cristales.

En cambio, para la regeneración CNF se recomienda la homogeneización del extracto de celulosa, siendo la muestra pasada por un homogeneizador de dos cámaras a diferentes presiones (usualmente 325 y 1600 bar).

Extracción química

Existen diversos métodos químicos para la extracción de celulosa de microalgas, entre los cuales cabe destacar la hidrólisis ácida o alcalina, método combinado e hidrólisis enzimática. La hidrólisis ácida consiste en la resuspensión de la materia orgánica en agua desionizada con una concentración conocida de ácido, generalmente ácido sulfúrico o ácido clorhídrico. La adición de ácido provoca un cambio en la carga superficial sobre las partículas y estabiliza la suspensión. Tras un determinado tiempo de reacción, se inactiva la reacción y el material extraído es sometido a procesos de separación y lavado para la obtención de la celulosa. El proceso de la hidrólisis alcalina es similar a la hidrólisis ácida, aunque la biomasa algal previamente desecada es mezclada con soluciones alcalinas (como hidróxido de sodio o potasio) para posteriormente purificar el extracto. El método combinado ha sido empleado para la extracción de celulosa a partir de la biomasa seca de las microalgas, o bien, de residuos algales. Este consiste en el lavado de la materia con metanol en condiciones determinadas (ácidas, básicas o neutras) para la eliminación de lípidos, seguido del blanqueamiento de los residuos y lavados ácidos y básicos. En cuanto a la hidrólisis enzimática, se somete la biomasa a una solubilización enzimática capaz de disolver componentes celulares que no son fibras, siendo empleadas usualmente xilanasas y lacasas. Aunque depende del material, se han empleado las siguientes para la extracción de CNF: FiberCar®, Viscozyme® L, celulasas, lisado de *Xanthomonas axonopodis*, Optimash, pectinasas, etc. (Michelin *et al.*, 2020). El residuo de dicha solubilización es filtrado y tratado para la purificación de la celulosa (Moral, 2012).

4.3.3. Aplicaciones de la celulosa

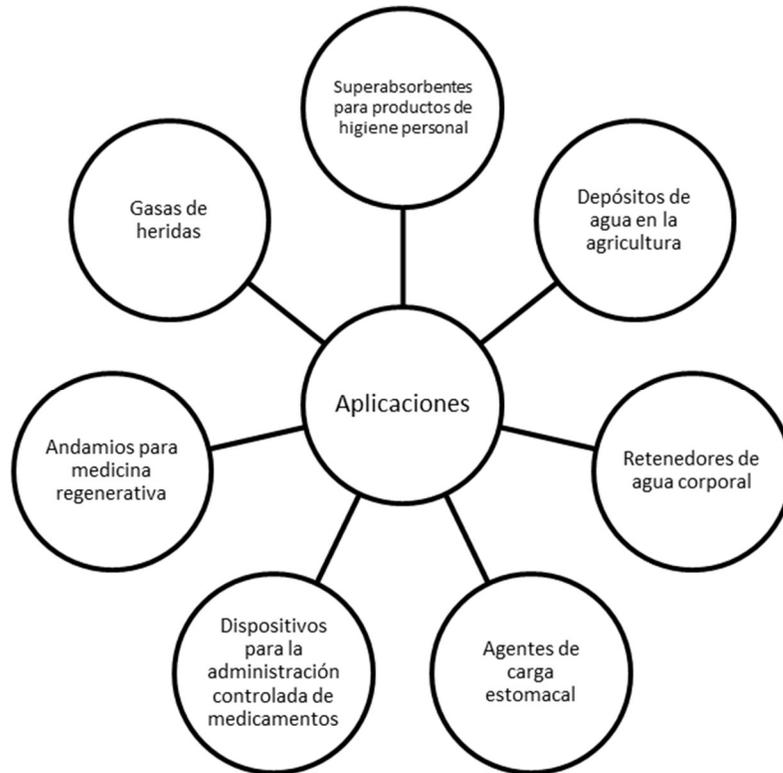
La celulosa algal, al igual que la celulosa extraída de las plantas terrestres, exhibe un comportamiento elástico al ser aplicada tensión, aunque difiere por poseer un mayor grado de cristalinidad (Moral, 2012). Dada la abundancia de la producción de este polímero, tiene el potencial de ser utilizado para una variedad de aplicaciones. El alto grado de cristalinidad y capacidad de absorción la vuelven un competente ideal para la fabricación de medicamentos e hidrogeles, con viscosidad regulada, en la industria farmacéutica. Además, puede ser utilizada como excipiente en la fabricación de fármacos (Shokri & Adibkia, 2011; Moral, 2012). En la cosmética, el biopolímero se emplea como gelificante de champús, cremas y lociones. Esto se debe a que la cristalinidad de la celulosa mejora las propiedades de recubrimiento, sedosidad, duración y adherencia a la piel. Una de sus aplicaciones más conocidas es su utilidad en la fabricación de papel, puesto que actúa como una alternativa más favorable al medioambiente en comparación con la extracción, blanqueo y pasteo de lignina (Moral, 2012). Otras aplicaciones mencionadas por Valero-Valdivieso *et al.* (2013) son: fabricación de membranas y otros medios de separación (con ésteres de celulosa), prendas de vestir y materiales higiénicos desechables (con celulosa regenerada para fibras). Las aplicaciones de la celulosa suelen variar de aquellas de la biomasa de microalgas con que son más específicas, siendo de interés la producción de productos que puedan ser beneficiados por la consistencia de la celulosa.

4.4. Producción de hidrogeles a base de celulosa

Los hidrogeles a base de celulosa son una aplicación prometedora para diferentes áreas de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Asimismo, presentan aplicaciones en otras áreas industriales (Figura 4). Estudios recientes han demostrado que estos promueven la adhesión celular, crecimiento y proliferación de aquellos tejidos que se desean regenerar (Mahmood *et al.*, 2022). En caso sean aplicados a heridas, ayuda a mantener la humedad de la herida mediante el control de los exudados y sana quemaduras de segundo grado. Otras aplicaciones más recientes consisten en la formación de la córnea durante tratamientos quirúrgicos, y regeneración de tejido vascular y de corazón (Dutta *et al.*, 2019; Mantha *et al.*, 2019). La celulosa utilizada para estas aplicaciones suele ser de proveniencia bacteriana por ser este un microorganismo de rápida reproducción y ser la celulosa extraída flexible. Dado que las microalgas también tienen una relativa rápida reproducción, de fácil mantenimiento y ubicuas, suponen ser una alternativa eficiente y viable para la

extracción de celulosa y posterior uso del biopolímero para producción de hidrogeles con diferentes aplicaciones.

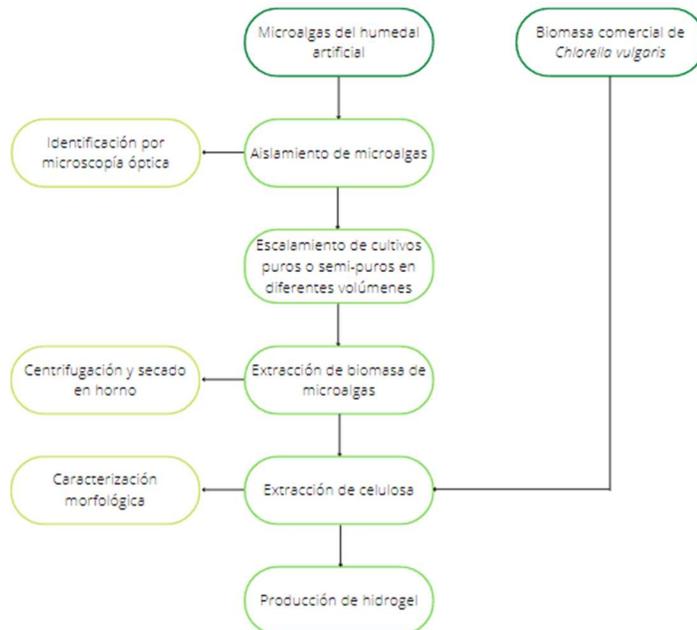
Figura 4. Aplicaciones de hidrogeles biodegradables a base de celulosa.



Fuente: Samino *et al.* (2009)

5. Metodología

Figura 5. Metodología implementada en este estudio



Fuente: Autoría propia

5.1. Sitio de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio del Departamento de Bioquímica y Microbiología y Laboratorio del Centro de Estudios en Biotecnología, dentro de las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala.

5.2. Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio fueron las microalgas aisladas del humedal artificial de Cementos Progreso, ubicada en Sanarate, El Progreso, Guatemala. Los géneros de microalga aislados y utilizados para la extracción fueron *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. Por otro lado, se ha utilizado biomasa seca proveniente de *Chlorella vulgaris* comercial para comprobar la viabilidad del método genérico adoptado en este estudio para la extracción de celulosa.

5.3. Enfoque, diseño y tipo de investigación

Esta investigación tuvo un enfoque combinado dominante, siendo el enfoque cualitativo el dominante, y un diseño experimental verdadero.

5.4. Variables

Cuadro 4. Variables controladas para diferentes procesos requeridos para la extracción de celulosa a partir de biomasa de microalgas

Procedimiento	Variable	Definición	Tipo	Medición
Cultivo de mezcla de microalgas aisladas de un humedal artificial	Aireación	Proceso en el cual se suministra oxígeno al sistema acuático, siendo suministrado por medio del uso de piedras difusoras conectadas a bombas de oxigenación de 120 V.	Cuantitativo	Caudal 180 L/h
	Temperatura	Nivel de energía térmica que recibe el sistema. Este varía dependiendo del ambiente externo.	Cuantitativo	13-26 °C
	pH	Medida de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa.	Cuantitativo	pH 10
Extracción de celulosa a partir de biomasa seca de microalga	Resistencia eléctrica	Oposición que haya una corriente eléctrica al momento de entrar en recirculación. Este puede ser controlado por un reóstato.	Cuantitativo	90 V
	Temperatura	Nivel de energía térmica que recibe el sistema.	Cuantitativo	°C (valor depende del paso llevado a cabo: ver sección de Materiales y Métodos)
	pH	Medida de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa.	Cuantitativo	pH 7
Producción de hidrogel	Temperatura	Nivel de energía térmica que recibe el sistema.	Cuantitativo	°C (valor depende del paso llevado a cabo: ver sección de Materiales y Métodos)

5.5. Viabilidad

Las microalgas aisladas son provenientes del humedal artificial de Cementos Progreso, ubicado en El

Progreso, Guatemala. Al ser nativos del ambiente, las microalgas obtenidas son altamente viables para este estudio, principalmente por ser asequibles, de facilitada y económico mantenimiento, y rápida reproducción. Su cultivo en un sistema abierto o semiabierto únicamente requiere del suministro de agua estéril y de fertilizante agrícola previamente disuelto en agua y esterilizado. En cuanto a la extracción de la celulosa y producción de hidrogeles, para el método propuesto se emplean reactivos asequibles y equipos presentes en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala.

5.6. Materiales y métodos

5.6.1. Aislamiento de microalgas

Las microalgas fueron previamente aisladas del humedal artificial de Cementos Progreso, ubicada en Sanarate, El Progreso, Guatemala. Para una mayor purificación de los cultivos se recurrió a métodos de sembrado por estriado en placa y diluciones seriadas en placas de 96 pocillos. Para este paso se utilizó el medio BBM. Al obtener cultivos puros de *Chlorella* y *Scenedesmus*, identificados morfológicamente por microscopía óptica a una magnificación de 400X, se prosiguió con el escalamiento de cada cultivo a volúmenes de 250, 500 y 1000 mL, respectivamente. Dichos cultivos fueron situados en una incubadora a 29 °C con iluminación LED roja (25 W, 120 V) a un fotoperíodo de 16 h:8 h de iluminación y oscuridad. Cabe mencionar que se vigiló semanalmente el pH del medio, siendo ajustado a pH 10 por medio de la adición de solución NaOH 1.0 M.

5.6.2. Cultivo de microalgas en sistema semiabierto

Tras obtener de 1 L de cultivo por cada cultivo puro se prosiguió con la transferencia de los cultivos a un mismo sistema semiabierto. El sistema fue armado con una pecera de vidrio de 28.9 x 29.8 x 59.3 cm y requirió del uso de cuatro piedras difusoras de aire fueron colocadas en el fondo del contenedor para evitar, en la medida de lo posible, la sedimentación de las microalgas. Estas piedras fueron conectadas a dos bombas de aireación, con una potencia de 120 V cada una. Siendo de interés el uso de un medio de cultivo asequible y económico, se suministró al sistema agua estéril y, como fuente de nutrientes, fertilizante agrícola (marca Disagro®) compuesto por nitrógeno (15%), fósforo (15%) y potasio (15%).

Cabe mencionar que dicho alimento fue preparado disolviendo 3 g del fertilizante en 1 L de agua estéril para posteriormente ser esterilizado por autoclave. 100 mL de la solución de fertilizante se suministraron al sistema cada dos semanas para nutrir a las microalgas. Se vigiló semanalmente el pH del medio (siendo óptimo el pH 10) para fomentar el crecimiento mayormente de las microalgas alcalófilas. Cabe mencionar que dicho pH disminuía continuamente como resultado del metabolismo de las microalgas, por lo que era menester agregar una solución básica, en este caso NaOH 1.0 M, para elevarlo. Por otro lado, al ser un sistema semiabierto, el cultivo estaba expuesto a condiciones del medio ambiente variables (temperatura y fotoperíodo). Respecto a la iluminación, esta se dio de forma natural, siendo iluminado indirectamente por la luz solar.

5.6.3. Extracción de biomasa

La cosecha de microalgas se dio principalmente por medio de la centrifugación. Aquellas microalgas aglomeradas por autofloculación natural fueron recolectadas, colocadas en placas Pyrex de vidrio y secadas en horno a aproximadamente 60 °C por 2 horas hasta su completo secado. Por otro lado, las microalgas resuspendidas de forma homogénea en el medio fueron centrifugadas a 7800 rpm en la centrífuga Eppendorf Centrifuge 5430R por 10 min a 4 °C. Tras descartar el sobrenadante, el pellet fue transferido a placas Pyrex de vidrio para su secado en horno. La biomasa seca recuperada fue almacenada en contenedores plásticos y un ambiente seco para su posterior uso.

5.6.4. Extracción de celulosa

El procedimiento optado para la extracción de celulosa de microalgas, fueran estas de fuente comercial o proveniente del humedal artificial, fue adoptado del estudio realizado por Samia *et al.* (2016) y Wahlström *et al.* (2020). Se aplicaron modificaciones según fue conveniente. A continuación, se detalla el método utilizado:

Extracción de celulosa y generación de nanofibrillas de celulosa (CNF)

A partir de biomasa de *C. vulgaris* comercial

La biomasa seca, siendo utilizado 50 g como máximo por cada prueba, fue colocada dentro de un sobre de papel filtro que fue situada dentro del sistema Soxhlet. La extracción de Soxhlet se llevó a cabo usando como solvente 250 mL etanol al 85%, colocada dentro de un balón con capacidad de 500 mL. El sistema de extracción fue calentado mediante el uso de una manta térmica conectada a un reóstato, manteniendo una resistencia constante de 90 V. Cabe mencionar que para asegurar la ebullición del solvente se utilizaron 7 perlas de ebullición. Este sistema, utilizado para remover pigmentos y ácidos grasos, se dejó funcionando por 48 h. Tras descartar la fase líquida, se lavó la fracción insoluble con etanol absoluto varias veces. Luego, se dejó secar en horno a 37 °C por 16 h. Con al intención de remover cualquier residuo de pigmento verde u otras impurezas coloreadas, se suspendió la masa en 400 mL de peróxido de hidrógeno al 4%, seguido de un calentamiento de la mezcla a 80°C por 16 h en baño María.

La resuspensión anterior se dejó enfriar a temperatura ambiente, se centrifugó a 5000 rpm por 15 min y se descartó el sobrenadante. La fracción insoluble se lavó varias veces con agua estéril hasta que el pH del agua de lavado fue de 7. Seguidamente, esta fracción se suspendió en 400 mL de solución de NaOH 0.5 M y se dejó incubando a 60 °C por 16 h. Tras ser enfriada a temperatura ambiente, se centrifugó nuevamente a 5000 rpm por 15 minutos. El pellet recuperado fue lavado varias veces con agua hasta que el pH de este último fue de 7. La fracción insoluble se suspendió en 200 mL de solución HCl 5% (v/v), siendo esta mezcla calentada hasta su ebullición y luego enfriada hasta alcanzar los 30 °C. Luego, se dejó incubando la mezcla a 30 °C por 16 h. La solución fue centrifugada a 5000 rpm por 15 min para recolectar la fase insoluble compuesta por las nanofibrillas de celulosa (CNF) y descartar el solvente y las impurezas. La fracción insoluble con el CNF fue lavada varias veces hasta que el pH del agua de lavado fue de 7. La CNF recuperada fue secada en horno a 60 °C por 1.5 h para eliminar la humedad. El porcentaje de recuperación fue calculado con base al peso del extracto final y la biomasa utilizada inicialmente.

A partir de biomasa de la mezcla de microalgas

Previo a la extracción, la biomasa seca fue macerada, procurando la mayor pulverización posible. Se adoptó el procedimiento anteriormente descrito, utilizado con biomasa de origen comercial, con algunas modificaciones: el tiempo de la extracción de Soxhlet y de la incubación en solución de peróxido de hidrógeno fue reducido a la mitad para optimización del proceso. De igual forma, el porcentaje de recuperación fue calculado con base al peso del extracto final y la biomasa utilizada inicialmente.

Caracterización de la CNF extraída

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se midió el espectro IR de las fracciones de celulosa seca entre 4000 a 600 cm^{-1} a temperatura ambiente. Para ello, se empleó el espectrómetro FTIR Perkin Elmer 109473, con un detector de triglicena y equipado con un accesorio de cristal de reflectancia total atenuada (ATR). Se realizaron correcciones con agua atmosférica y dióxido de carbono. La configuración del espectrómetro fue la siguiente: detector de 5.0 kHz, fuente MIR normal, ATR PIKE Diamond MIRacle, resolución de 4 cm^{-1} , apertura de 4 cm^{-1} y simetría Sym.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Este análisis fue llevado a cabo en las instalaciones de Cementos Progreso, Ciudad de Guatemala, Guatemala. Se observó la morfología del CNF a través del SEM. El equipo utilizado fue un microscopio JEOL InTouchScope™, modelo JSM-IT500, con una resolución de 3.0 (30 kV) a 15.0 nm (1.0 kV). La magnificación directa osciló entre $\times 5$ a $\times 300,000$. Cada muestra fue adherida a los soportes con ayuda de un adhesivo de carbono bilateral. El escaneo se realizó bajo una atmósfera inerte. Las imágenes fueron obtenidas por medio del Software Oxford Aztec.

5.6.5. Elaboración del hidrogel

El procedimiento para elaboración de hidrogeles a base de celulosa fue adoptado de Geng y Yang *et al.* (2020). Este se describe a continuación:

Producción de hidrogeles de celulosa en solución acuosa NaOH/urea

Disolución de la celulosa

Se disolvió aproximadamente un 2% de la celulosa extraída de microalgas en solución NaOH/urea (7% de NaOH y 13% de urea) previamente enfriada a 4 °C. Esta fue mezclada por 5 min y almacenada a 4°C para obtener una solución de celulosa transparente. Seguidamente, se centrifugó a 7830 rpm por 12 min a 0 °C con la intención de eliminar burbujas y remover cualquier componente insoluble.

Preparación de hidrogeles de celulosa entrecruzada químicamente

Previamente se preparó una solución de N,N'-metilenbisacrilamida (MBA)/glucosa a una razón molar de 1.05 M/1.0 M. 2 mL de esta solución fueron adicionados a 8 mL de la solución de celulosa. El mixtión se dejó mezclar por 2 h con agitación continua a temperatura ambiente hasta su completa homogenización. La mezcla fue transferida a una placa de cultivo e incubada a 60 °C por 25 min para la gelificación del hidrogel.

Caracterización del hidrogel

Transparencia

Previo al calentamiento final de los hidrogeles a 60 °C por 25 min, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV/Vis Agilent 8453, a una longitud de onda de 335 nm para detección de enlaces -NH₂. Cabe mencionar que como blanco se utilizó una mezcla de la solución NaOH/urea y MBA/glucosa sin la adición de celulosa.

Grado de hinchazón

El grado de hinchazón (GH) fue aplicado para evaluar la capacidad de absorción de agua del hidrogel. Brevemente, el hidrogel curado fue inmerso por dos días en agua destilada para asegurar la liberación de componentes del solvente (urea y NaOH) y de MBA que no haya reaccionado. El agua fue cambiada cada 24 h hasta alcanzar un pH de 7. Posteriormente, se dejó incubar nuevamente por dos días en agua destilada para evaluar su capacidad de absorción. La siguiente ecuación fue utilizada para calcular el grado de hinchazón:

$$\%GH = \frac{P_2 - P_1}{P_1} * 100$$

P₁: Peso del hidrogel curado

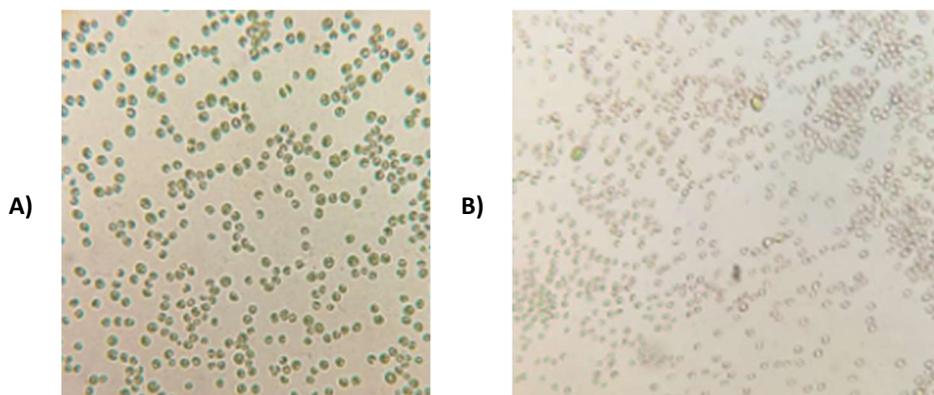
P₂: Peso del hidrogel hinchado

6. Resultados

6.1. Cultivo de microalgas aisladas del humedal artificial

El humedal artificial cuenta con una amplia gama de géneros de microalgas, además de cianobacterias y bacterias. Por medio de diferentes técnicas de aislamiento (sembrado por estriado en medio sólido y realización de diluciones en medio líquido) se lograron aislar dos géneros prevalentes de microalgas: *Scenedesmus* y *Chlorella*. Dicha identificación fue llevada a cabo con base a su morfología, recurriendo a la microscopía óptica. El cultivo aislado de *Scenedesmus* sp. se presentó principalmente como cenobios de cuatro o dos células, teniendo una forma delgada y alargada, cuya unión entre sí comenzaba desde los extremos. Se observó una variación respecto a la presencia o ausencia de apéndices o prolongaciones en los extremos. En aquellos cenobios compuestos por cuatro células se detectó dicha prolongación en las células que se encontraban en los extremos. En cambio, no se detectaron apéndices en los cenobios de dos células. Estos últimos adquirieron una forma más redonda con extremos que terminan en forma de punta. Por su parte, las células individuales presentaron una forma similar a aquellas que se encontraban en cenobios de dos células, aunque predominó una forma completamente redonda (Figura 6A). En la Figura 6B se muestra *Chlorella* sp., caracterizada por ser un alga verde, unicelular, esférica y sin flagelos.

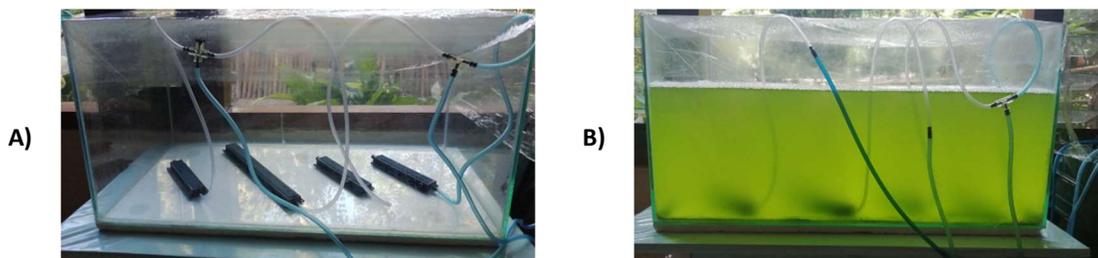
Figura 6. Principales microalgas aisladas del humedal artificial: *Scenedesmus* sp. (A), y *Chlorella* sp. (B), vistos bajo el microscopio óptico a 400X



Dado que era de interés extraer la celulosa a partir de una mezcla de microalgas, se incorporaron ambos cultivos en uno solo. Para la obtención de una mayor cantidad de biomasa de microalgas útil para la extracción del biopolímero se implementó un sistema de cultivo semiabierto (Figura 7), caracterizado por el uso de un contenedor artificial y la exposición del cultivo a condiciones del medio ambiente. El sistema fue armado con una pecera de 28.9 x 29.8 x 59.3 cm (Figura 7A) y requirió del uso de cuatro piedras aireadoras colocadas en el fondo del contenedor para evitar, en la medida de lo posible, la sedimentación de las microalgas. Estas piedras fueron conectadas a dos bombas de aireación, con una potencia de 120 V cada una. El cultivo de microalgas (Figura 7B) manifestó un buen crecimiento bajo las condiciones del medio ambiente y con una alimentación a base de fertilizante agrícola, compuesto por nitrógeno (15%), fósforo (15%) y potasio (15%).

Aunque variables tales como la intensidad lumínica, fotoperíodo y temperatura no fueron controlados por ser dependientes del ambiente, se vigiló semanalmente el pH del medio (siendo óptimo el pH 10) para fomentar el crecimiento mayormente de las microalgas alcalófilas. Cabe mencionar que dicho pH disminuía continuamente como resultado del metabolismo de las microalgas, por lo que era menester agregar una solución básica, en este caso NaOH 1.0 M, para elevarlo.

Figura 7. Sistema semiabierto para cultivo de microalgas. (A) Sistema inicial; (B) Cultivo de microalgas posterior a dos semanas



La recuperación de la biomasa se realizó empleando una manguera para la succión de aquellas microalgas sedimentadas en el fondo de la pecera y las resuspendidas en el medio. Los agregados de microalgas formados naturalmente fueron recolectados y secados en un horno, mientras que aquellas células resuspendidas fueron cosechadas por medio de centrifugación para el posterior secado del pellet obtenido. En promedio se recuperan aproximadamente 0.16 g de biomasa por cada 525 mL de medio de cultivo. No obstante, la tasa de biomasa recuperada puede variar dependiendo de la fase de crecimiento en el que se encuentren las microalgas. Haciendo uso de 27.8 L del cultivo de microalgas se recuperaron 9.7 g de biomasa seca, de lo cual se asume que fue posible fijar 0.017 kg de dióxido de carbono (Cuadro 6, Anexos).

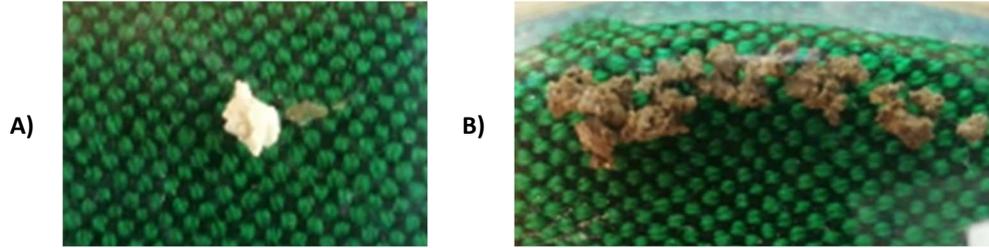
6.2. Caracterización de CNF extraída de microalgas

Para verificar que el método de extracción de celulosa fuera factible, se implementó el protocolo inicialmente a biomasa seca de *Chlorella vulgaris* comercial de *Especies Superb*®. Partiendo de 37.3 g de biomasa comercial se recuperaron 0.0581 g de nanofibrillas de celulosa (CNF) seca, resultando en 0.15% de recuperación del biopolímero (Cuadro 5). A diferencia de esta, la biomasa obtenida de la mezcla de microalgas, compuestas de los géneros *Scenedesmus* y *Chlorella*, resultaron en una tasa de recuperación del 1.6%. Aunque fue posible obtener celulosa a partir de biomasa seca de microalgas, hubo diferencias morfológicas y estructurales entre ambas muestras de estudio. La celulosa obtenida de *C. vulgaris* comercial evidenció una consistencia ligeramente ligosa previo a ser completamente secada. Tras ser secada se presentó como un polvo ligeramente beige (Figura 8A). A diferencia de esta, la CNF recuperada de la mezcla de microalgas manifestó una coloración café-verdosa (Figura 8B), cuya consistencia era mayormente polvorosa previo a su completo secado.

Cuadro 5. Rendimiento de protocolo de extracción de celulosa por un método genérico

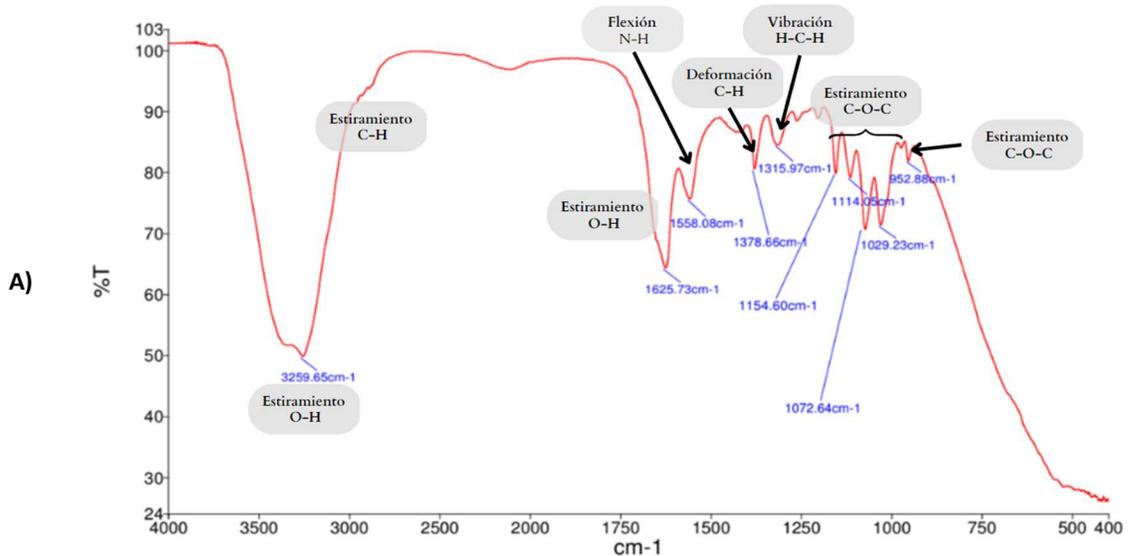
	Peso de CNF seca (± 0.0001 g)	Tasa de recuperación de celulosa (%)
<i>C. vulgaris</i> comercial	0.0581	0.15
Mezcla de microalgas (<i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp.)	0.1559	1.6

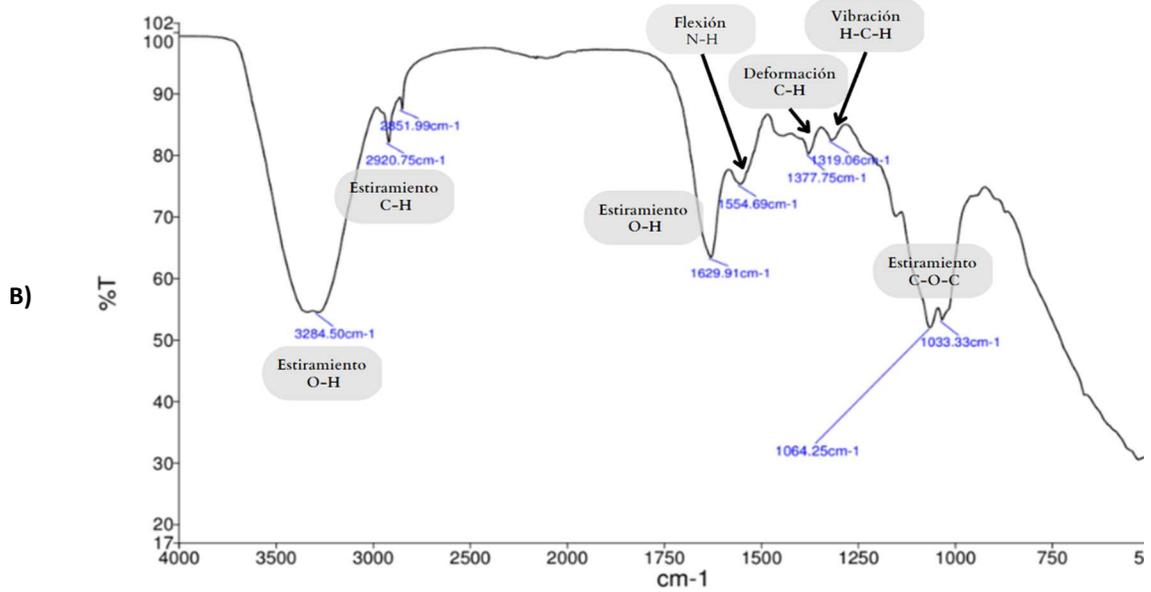
Figura 8. Nanofibrillas de celulosa (CNF) secada en horno a 60°C por 1.5 horas, extraída de *C. vulgaris* comercial (A) y una mezcla de microalgas aisladas del humedal artificial (B).



Ambas muestras fueron sometidas a análisis espectroscópicos y microscópicos para la caracterización morfológica del extracto obtenido. Las fracciones de celulosa recuperadas y analizadas por FTIR muestran muchos de los picos característicos de los polisacáridos, siendo estos descritos en el Cuadro 7-8 (Anexos). La Figura 9B, siendo el espectro respectivo para la celulosa proveniente de *C. vulgaris* comercial, muestra un pico ancho entre 3500-3200 cm^{-1} correspondiente al estiramiento O-H del grupo hidroxilo. A su vez, un pico de 1626 cm^{-1} puede implicar el estiramiento del grupo O-H por absorción de agua. El pico a 1379 cm^{-1} se atribuye a una deformación del enlace C-H, también presente a 1250 cm^{-1} . Los picos presentes entre 1420-1315 cm^{-1} se deben a una vibración en forma de tijera del grupo H-C-H. Se asume que aquellas bandas de menor tamaño presentes entre 1160-1020 cm^{-1} describen un estiramiento simétrico C-O-C del anillo de los monómeros que componen la celulosa. Se destaca un pico a 950 cm^{-1} , el cual se puede deber a un estiramiento C-O-C del enlace β -glucosídico presente en la celulosa.

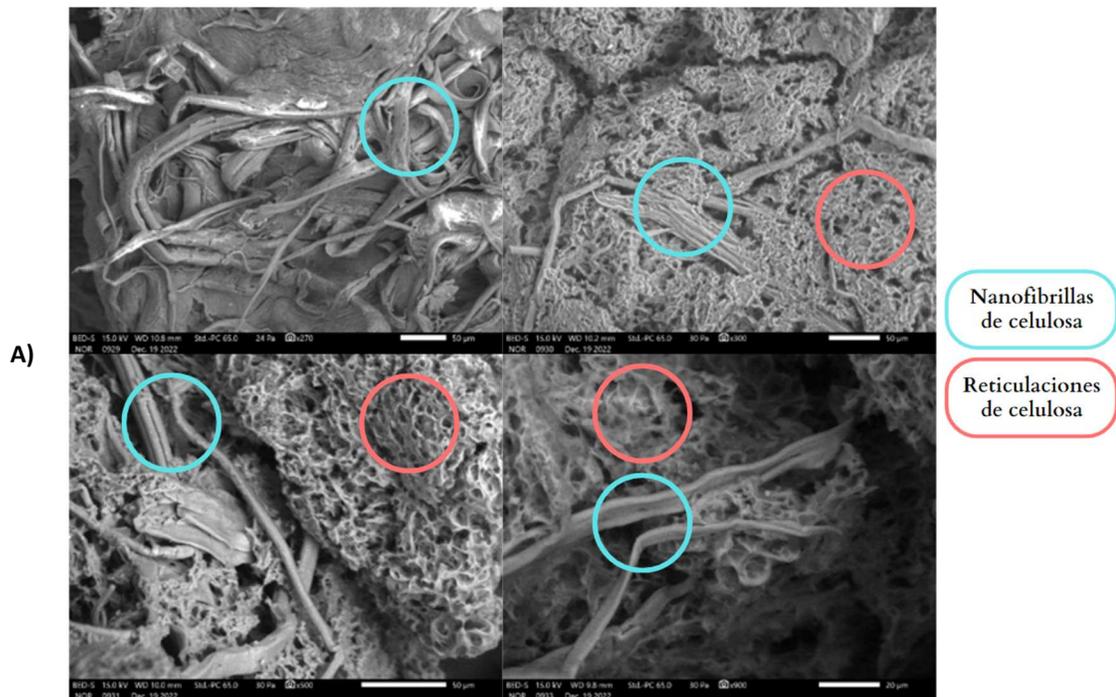
Figura 9. Espectros FTIR de CNF extraída de *C. vulgaris* comercial (A) y una mezcla de microalgas aisladas del humedal artificial (B).

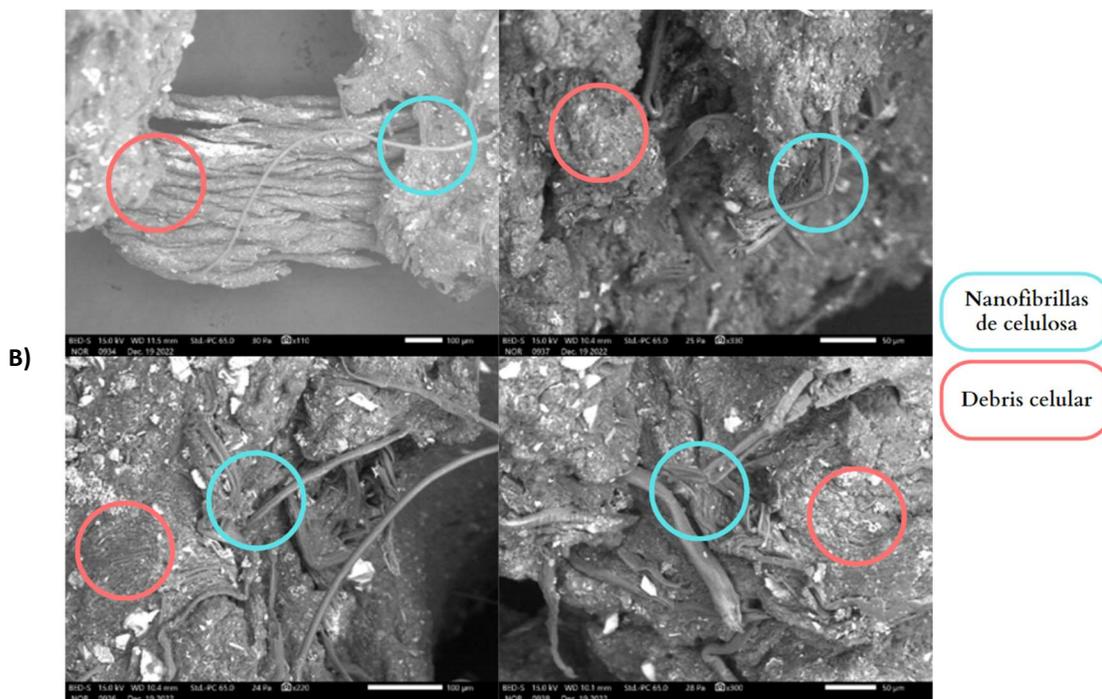




El espectro generado para el extracto obtenido de la mezcla de microalgas (Figura 9B) presentó picos similares a la celulosa obtenida de la microalga comercial. Sin embargo, en este se muestran picos más definidos entre 2950-2850 cm⁻¹ que representan un estiramiento de los enlaces C-H (Cuadro 8, Anexos). Sin embargo, carece de un pico entre 950 y 890 cm⁻¹ que muestre la presencia de un enlace β-glucosídico. Ambas muestras presentan un pico alrededor de 1550 cm⁻¹ que se atribuye a una flexión N-H o estiramiento C-N. Esto puede implicar la contaminación de las muestras con proteínas u otros compuestos nitrogenados y, por ende, un bajo grado de pureza, principalmente en la muestra obtenida de la mezcla de microalgas.

Figura 10. Imágenes SEM con magnificación de $\times 500$ -300 de CNF extraída de *C. vulgaris* comercial (A) y una mezcla de microalgas aisladas del humedal artificial (B).



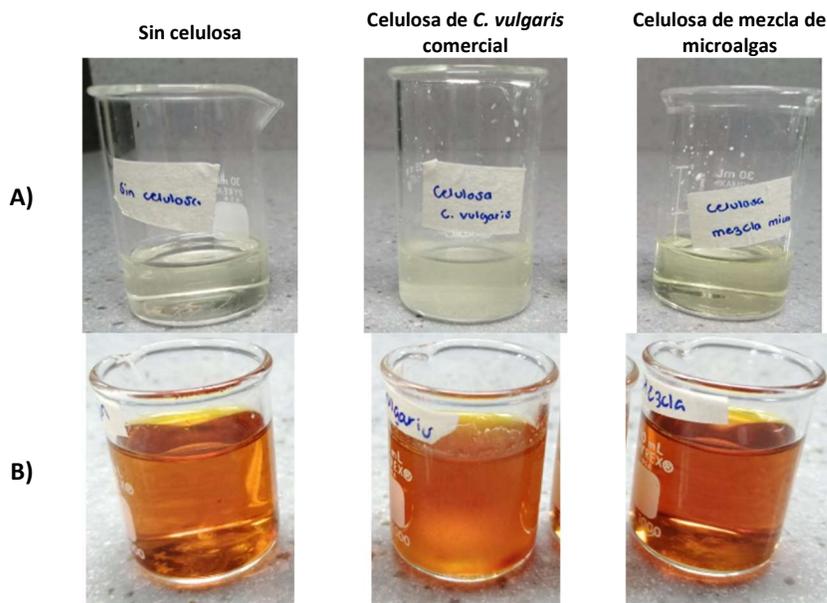


Tras la obtención de imágenes macroscópicas por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) se observó en gran abundancia nanofibrillas de celulosa alargadas en varios puntos de observación de la muestra recuperada de *C. vulgaris* comercial (Figura 10A). Asimismo, se presentaron fibrillas de menor tamaño que formaron redes entre sí, no pudiendo llegar a formarse nanofibrillas de mayor longitud por una posible falta de agitación. Esto es congruente con la aparición de un pico respectivo para el enlace β -glucosídico en el espectro IR. A diferencia de esto, el extracto de la mezcla de microalgas evidencia pocas nanofibrillas y una mayor presencia de posible contaminación generada por acumulación de proteínas y otros desechos celulares. Dicha contaminación se observa como una masa amorfa que predomina en la muestra.

6.3. Hidrogel formado a partir de CNF

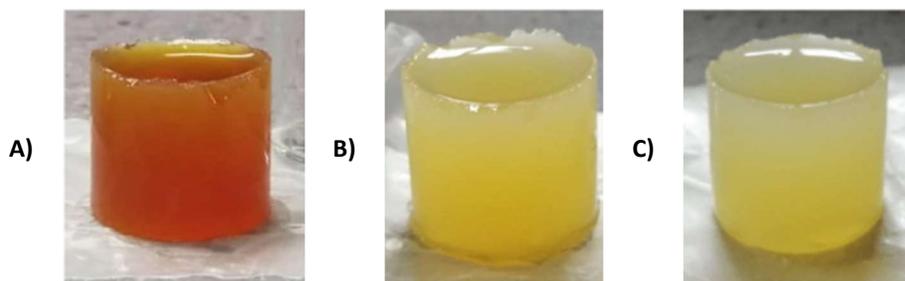
La celulosa y CNF extraída a partir de las diferentes muestras de celulosa fue utilizada para elaborar hidrogeles. Como control se elaboró la mezcla de soluciones sin la adición de celulosa y conteniendo únicamente glucosa. En esta se observó una falta de polimerización, obteniéndose una mezcla líquida. En cambio, en la prueba a la que se le adicionó celulosa de *C. vulgaris* comercial se observó una parcial solidificación de la mezcla resultante de la polimerización y reticulación de la celulosa. Asimismo, este presentó una mayor turbidez (Figura 11A). Sin embargo, aún se presentó de una forma líquida con mayor viscosidad, por lo que no se llevaron a cabo pruebas de para medir el grado de hinchazón. La mezcla formulada con extracto de la mezcla de microalgas tampoco evidenció una gelificación por la predominancia de agentes contaminantes y obtención nimia de celulosa. Esta prueba no presentó turbidez, aunque adquirió una coloración ligeramente amarillenta por la posible contaminación con los pigmentos remanentes.

Figura 11. Hidrogel formado a partir de la CNF extraída a partir de diferentes fuentes de microalgas previo a un calentamiento final a 60°C por 30 min (A) y posterior al calentamiento (B).



Previo a realizar un calentamiento final a 60 °C por 30 min para promover una mayor gelificación y curación del hidrogel se midió la absorbancia de cada solución por espectrofotometría UV/Vis a una longitud de onda de 355 nm. Utilizando como blanco la solución carente de celulosa, se obtuvo una absorbancia de 0.141 y 0.170 para el hidrogel a base de celulosa de microalga comercial y de la mezcla de microalgas, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, una mayor absorbancia en esta última se debe a la presencia de contaminantes como aminoácidos y pigmentos coloreados. En cambio, el hidrogel a base de celulosa de *C. vulgaris* comercial no presentó un cambio significativo en la coloración, únicamente en el incremento de la turbidez. Tras llevarse a cabo un calentamiento final se observó un cambio en la coloración de las tres pruebas, adquiriendo estas una coloración ámbar (Figura 11B). Esto se atribuye a la administración de un calor mayor al necesario por un plazo corto de tiempo, a pesar de lo sugerido en la literatura citada, o posible reacción entre los reactivos utilizados en presencia del calor. Esto último podría afectar últimamente en la gelificación del hidrogel. Respecto a la consistencia, únicamente el hidrogel a base de celulosa proveniente de *C. vulgaris* comercial desarrolló cierto grado de viscosidad, aunque no llegó al grado de gelificación esperado para un hidrogel.

Figura 12. Hidrogel formado a partir de la CNF extraída de *C. vulgaris* comercial. (A) Tras la adición de 2 mL más de solución MBA/glucosa. (B) Tras la incubación por dos días en agua destilada para eliminación de componentes remanentes. (C) Tras la incubación por dos días en agua destilada para la evaluación del grado de hinchazón.



Con el interés por fomentar una mayor gelificación, se adicionaron 2 mL más de la solución MBA/glucosa. A partir de este fue posible promover una mayor gelificación en el hidrogel. Como se observa en la Figura 12A, este adquirió una forma definida, permaneciendo aún con una coloración ámbar. Tras ser sumergido por dos días en agua destilada para fomentar la liberación de componentes del solvente (urea y

NaOH) y de MBA que no haya reaccionado, se observó un cambio a una coloración amarillenta (Figura 12B). Como resultado de la parcial eliminación de los reactivos que no reaccionaron se obtuvo una reducción del peso del hidrogel del 1.51 %. Para la evaluación de la capacidad de retención de agua por este hidrogel se determinó el grado de hinchazón, siendo necesario el sumergimiento de este por dos días en agua destilada. Por medio de este procedimiento se observó el aumento en el volumen del hidrogel, resultando en un grado de hinchazón del 4.48%. Cabe mencionar que la coloración permaneció amarillenta (Figura 12C), aunque la intensidad de este disminuyó por la continua eliminación de los reactivos que no reaccionaron.

7. Análisis de resultados

Los hidrogeles de celulosa han cobrado mayor importancia en la actualidad por ser biocompatibles con células humanas, biodegradables, renovables, hidrofílicos y de bajo costo (Yang *et al.*, 2020). Estas características las vuelven deseables para variadas aplicaciones en diferentes industrias. Siendo la celulosa el biopolímero más abundante en la Tierra, se han buscado diferentes fuentes naturales para su extracción y posterior uso. Entre las se encuentran las microalgas verdes, cuya composición de la pared celular está ocupada por aproximadamente 70% de celulosa (Moral, 2012), aunque puede variar dependiendo de la especie. Dado que son microorganismos ubicuos, de bajo costo de mantenimiento y relativamente rápida tasa de reproducción en comparación con plantas, el presente estudio tuvo por objetivo extraer y purificar celulosa obtenida de una mezcla de microalgas aisladas de un humedal artificial, mediante un método de extracción genérico, para la producción de hidrogeles. En un comienzo, las microalgas fueron aisladas de una muestra de agua del humedal artificial por medio de técnicas microbiológicas de sembrado en placa por estriado para la obtención de colonias puras o semi-puras y posterior realización de diluciones seriadas para la optimización del aislamiento. Esto resultó en la obtención de dos géneros principales identificados con base en su morfología: *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. (Figura 6). El primero se presentó en cenobios de cuatro o dos células, o de forma individual, habiendo una diferencia en la forma alargada de los primeros y esférica de la última. Quevedo *et al.* (2008) atribuye la diferencia de forma celular a la concentración de nutrientes, puesto que una alta concentración tiende a aumentar la esfericidad de la célula por el incremento de la concentración de cloroplastos. En cuanto a *Chlorella*, se mostró como células esféricas de menor diámetro, característico del género. Cabe mencionar que la fuente de nutrientes empleada fue fertilizante agrícola compuesta por 15% de nitrógeno, 15% de potasio y 15% de fósforo, siendo esta una alternativa asequible y económico para el cultivo de microalgas. Aunque fue posible identificar los géneros, es necesario llevar a cabo pruebas bioquímicas y/o moleculares para la identificación de las especies.

Dado que el objetivo radicaba en el uso de una mezcla de microalgas, ambos cultivos puros fueron mezclados y cultivados en un mismo sistema semiabierto (Figura 7). Gracias a la instalación de piedras de burbujeo, potenciadas por dos bombas de aireación de 120 V cada una, se observó un proceso de autofloculación, el cual consiste en la agregación espontánea por la sedimentación de la microalga. Aunque esto puede ocurrir de forma natural, el proceso se puede inducir por la limitación de carbono o en respuesta a otros factores abióticos (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). La microalga sedimentada fue recolectada y secada en horno para la obtención de biomasa seca. En cambio, para recuperar las células suspendidas en el medio se empleó la centrifugación. Esta técnica fue seleccionada por su disponibilidad y su capacidad de sedimentar la mayoría de las algas indistinto a su tamaño, siendo la recolección rápida y eficiente (Shah *et al.*, 2014).

Sin embargo, una de las desventajas observadas fue el tiempo empleado para la recolección de 27.8 L de cultivo, siendo este mayor al esperado. Es por lo mismo que se recomienda optar por otros métodos de recolección de biomasa, siendo una de las principales el uso de un floculante químico o un biofloculante (Ogbonna & Nwoba, 2021) para inducir la sedimentación. No obstante, es necesario tomar en consideración el agente químico a utilizar y métodos para su remoción para prevenir una contaminación química. Partiendo de 27.8 L de cultivo se obtuvieron 9.7 g de biomasa seca de microalga en variadas fases de crecimiento, siendo esto último útil para corroborar si el método de extracción de celulosa es útil para diferentes especies de microalga que se encuentren en diferentes estados de crecimiento. Lam *et al.* (2012) reportan que las células de microalgas están compuestas de aproximadamente un 50% de carbono, aunque este valor varía dependiendo de la especie, de los cuales 1.8 kg de dióxido de carbono son fijados al producir 1 kg de biomasa. Partiendo de este supuesto, se cree que de los 9.7 g de biomasa utilizada para extraer celulosa fue posible fijar 0.017 kg de CO₂ (Cuadro 6, Anexos).

Previo a realizar la extracción de celulosa de la biomasa seca de la mezcla de microalgas, se llevó a cabo una prueba de extracción partiendo de biomasa seca de *C. vulgaris* comercial. Inicialmente, la biomasa fue sometida a una extracción por Soxhlet con etanol al 85% con la finalidad de remover pigmentos y ácidos grasos. La interacción entre el etanol y la capa fosfolipídica de la membrana celular del microalga resulta en un desorden en la estructura física de la membrana, además de la solubilidad de estos en el solvente. Una vez permeabilizada la membrana se facilita la plasmólisis de cloroplastos en respuesta a un desequilibrio osmótico, liberando los pigmentos contenidos. Sin embargo, Jaeschke *et al.* (2016) menciona que la combinación de etanol en conjunto con la administración de fuerza de campo eléctrico, principalmente 180 V, optimizan la extracción de lípidos. Es por ello que se administró lo anterior en forma de calor mediante el uso de una manta térmica, administrando una fuerza de 90 V por medio de un reóstato. Aunque Wahlström *et al.* (2020) recomiendan llevar a cabo esta extracción por 24 horas, las microalgas fueron expuestas a 48 h hasta asegurar la mayor cantidad de remoción de pigmentos, aunque aún se obtuvo una biomasa verdosa. Posterior a ello, la biomasa fue lavada varias veces con etanol absoluto para eliminar el solvente remanente. Seguidamente, la resuspensión en peróxido de hidrógeno se utilizó para remover cualquier residuo de pigmento verde u otras impurezas coloreadas al ser este un agente clarificante. Aunque se logró eliminar la mayor cantidad de pigmentos, la biomasa permaneció con una coloración amarillenta. Para asegurar una mayor o completa eliminación de pigmentos es recomendable realizar pruebas de extracción de Soxhlet con fuerzas de campo eléctrico superiores a 90 V.

Con la remoción del peróxido y realización de lavados hasta alcanzar un pH de 7 se aseguró la eliminación de impurezas y obtención mayormente de celulosa, ya que este se encuentra dentro del pH óptimo del biopolímero (pH 5-7.5). Seguidamente, se optó por un tratamiento alcalino y ácido para la obtención de celulosa en forma de nanofibrillas (CNF). La solución de hidróxido de sodio, usada en el tratamiento alcalino, permitió eliminar principalmente ácidos grasos libres, que no se removieron anteriormente, y hemicelulosa. Además, este tratamiento se caracteriza por interrumpir los enlaces de hidrógeno entre las diferentes cadenas de celulosa antes del siguiente tratamiento, resultando en una despolimerización y la producción de cristales de celulosa de longitud corta (Chand & Fahim, 2021) que posteriormente pueden ser precipitados con el cambio a un pH neutro. Esto se logró observar en la formación de pequeños precipitados blanquecinos suspendidos en una solución de tonalidad verde. Aunque no se llevó a cabo, Siti *et al.* (2019) recomiendan implementar un tratamiento de blanqueamiento con NaClO para remover otros pigmentos; o bien, también para la remoción de lignina en caso la muestra contenga. El tratamiento ácido, efectuado con ácido clorhídrico, es utilizado para llevar a cabo una hidrólisis que resulte en la producción de celulosa de tamaño nanométrico a través de la remoción de regiones amorfas de la celulosa. Sun *et al.* (2015) explican este fenómeno por la capacidad de iones de cloruro para romper el enlace de hidrógeno masivo. Como producto de esta reacción se obtuvo un precipitado beige-blanquecino y amorfo que posteriormente fue neutralizado por lavados con agua y secado para la obtención de nanofibrillas de celulosa en forma de polvo (CNF).

La biomasa obtenida de una mezcla de microalgas fue expuesta al mismo tratamiento que la biomasa de microalga comercial, con algunas modificaciones de por medio. Cabe mencionar que dicha biomasa se presentó como polvo y pequeñas escamas. Aunque se maceró con ayuda de un pistilo, no fue posible pulverizar completamente la biomasa para obtener un polvo fino. Es por ello que la literatura citada recomienda el uso de un molinero de café u otra tecnología con la misma funcionalidad para pulverizar completamente la muestra. Respecto a la extracción de Soxhlet, se redujo el tiempo a 24 h. A pesar de dicha

reducción, se cree que se logró eliminar gran parte de los pigmentos y de los ácidos grasos por el uso de una menor cantidad de biomasa (9.7 g). De igual forma, el tiempo de resuspensión e incubación en peróxido de hidrógeno se redujo a 8 h con la finalidad de optimizar el proceso.

A diferencia de la prueba realizada con la biomasa comercial, tras el uso de peróxido aún se observó la permanencia de una tonalidad ligeramente verdosa en la biomasa. En cuanto al sobrenadante, este se mostró ligeramente blanquecino, corroborando una falta de eliminación de pigmentos. Lo anterior se puede deber a una falta de mayor contacto entre solventes-biomasa derivado de la presencia de escamas de biomasa y no biomasa completamente pulverizada. Por su parte, el tratamiento alcalino y ácido fue similar al ejecutado con *C. vulgaris* comercial; no obstante, los resultados difirieron. Posterior al tratamiento alcalino se obtuvo la misma cantidad de biomasa previo a este paso, con una pequeña capa en la parte superior de esta con apariencia de fibrillas blanquecinas que suponen ser aquellas formadas por celulosa. Sin embargo, su separación de la biomasa era dificultosa. Recurriendo a la hidrólisis ácida se obtuvo nuevamente una biomasa polvorosa cubierta en la parte superior por fibrillas difíciles de separar. Tras su recuperación por centrifugación y secado se obtuvo un polvo verde. A pesar de ello, el producto resultante fue secado para su posterior análisis morfológico.

Como se mencionó anteriormente, el producto resultante de la extracción usando biomasa de *C. vulgaris* comercial y biomasa de una mezcla de microalgas provenientes de un humedal artificial fue un polvo beige-blanquecino y un polvo verdoso, respectivamente (Figura 8). Previo a su secado en horno para remoción del agua, el primero presentó una textura al tacto ligeramente viscosa, característica de polímeros, mientras que el segundo fue mayormente polvoroso, con una menor viscosidad. Análisis efectuados por espectroscopía FTIR evidenciaron picos característicos de los polisacáridos para el extracto de biomasa comercial (Figura 9A; Cuadro 7, Anexos), tales como el estiramiento del grupo hidroxilo O-H, vibraciones H-C-H y estiramientos C-O-C del anillo de cada unidad de glucosa que conforma la celulosa. Uno de los picos más importantes presentados en el espectro fue a 953 cm^{-1} , el cual representa un estiramiento C-O-C del enlace β -glucosídico presente en la celulosa. Dichos resultados son congruentes con los obtenidos por Ranganagowda *et al.* (2019) (Figura 13, Anexos), en donde se llevó a cabo un análisis por FTIR de celulosa comercial. Una diferencia fundamental obtenida en el espectro IR de la celulosa de *C. vulgaris* radica en un pico alrededor de 1550 cm^{-1} , el cual es una flexión N-H o estiramiento C-N.

La presencia de estos grupos funcionales puede atribuirse a la presencia de aminoácidos, actuando como impurezas en el producto final. Sin embargo, dicha contaminación no fue representativa, pues las imágenes generadas por SEM demostraron mayormente la presencia de nanofibrillas de celulosa (Figura 10A). Reticulaciones formadas por fibrillas de menor tamaño pueden deberse a una falta de formación de enlaces de moléculas de celulosa entre sí para la generación de fibrillas de mayor tamaño, por lo que es recomendable optar por incrementar el tiempo de reacción con ácidos y bases, además de brindar una agitación continua. Esto permitirá una mayor interacción entre moléculas de celulosa para la formación de fibrillas y posterior disposición amorfa o cristalina. La recuperación de CNF fue de 0.15%, partiendo de 37.3 g de biomasa de *C. vulgaris* comercial (Cuadro 5).

El extracto recuperado de la biomasa proveniente de una mezcla de microalgas, conformado por *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., fue del 1.6% (Cuadro 5). Sin embargo, este fue mayormente compuesto por restos celulares en lugar de celulosa. En el espectro IR (Figura 9B; Cuadro 8, Anexos) se obtuvieron picos similares al extracto de microalga comercial (grupos funcionales O-H, C-H, H-C-H y C-O-C), con excepción de la falta del pico respectivo del estiramiento C-O-C perteneciente al enlace β -glucosídico. Aunque las imágenes del SEM evidenciaron la presencia de algunas fibrillas (Figura 9B), su concentración en la muestra fue mínima. Una concentración insignificante del biopolímero puede resultar en su falta de detección por análisis FTIR, lo que resultaría en la inexistencia del pico anteriormente esperado alrededor de los 950 cm^{-1} de absorción. Al igual que la muestra anterior, también se obtuvo un pico alrededor de 1550 cm^{-1} , indicando la contaminación con proteínas. De igual forma, los grupos funcionales detectados pueden atribuirse a otros compuestos orgánicos presentes en el debris celular (pigmentos, lípidos, otros polisacáridos, monosacáridos, etc.). Esta contaminación se mostró como una masa amorfa en las imágenes generadas por microscopía SEM (Figura 10B). La separación del CNF del debris celular puede realizarse por diferentes técnicas: homogenización de alta presión, ultrasonificación de alta intensidad u oxidación con (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-il)oxil (conocido como TEMPO) (Atiqah *et al.*, 2019). Sin embargo, es necesario

tomar en cuenta aquellos factores que afectaron durante el proceso para su modificación con la finalidad de optimizar la extracción: pulverización completa de la biomasa, tiempo de extracción de Soxhlet y fuerza de campo eléctrico utilizado, tiempo de incubación en peróxido de hidrógeno.

Los extractos obtenidos fueron posteriormente utilizados para corroborar su funcionalidad para la producción de hidrogeles (Figura 11A). Este consistió en primera instancia en la disolución de la celulosa en el solvente acuoso NaOH/urea seguido de la mezcla con MBA/glucosa. Se ha reportado que el sistema NaOH/urea es altamente eficiente por su capacidad de disolver celulosa de un peso molecular elevado. Por su parte, el MBA es utilizado como un agente de reticulación debido a sus dobles enlaces de carbono-carbono, lo que le permite reaccionar con diferentes grupos como $-NH_2$, $-OH$ y $-COOH$, formando una red tridimensional. La adición de glucosa se debe a que la desprotonación de su grupo hidroxilo en la posición C6 en un ambiente altamente alcalino permite que este pueda reaccionar posteriormente con el MBA y con la celulosa para la formación de reticulaciones (Yang *et al.*, 2020). Como era de esperarse, en la mezcla sin celulosa no se dio una gelificación por ausencia de un polímero (celulosa) que reaccionara con el MBA, al igual que una baja concentración de glucosa que pudiera reticularse con el MBA y formar un hidrogel. Esto resultó en una solución traslúcida. De igual forma, al emplear el extracto de la mezcla de microalgas no se dio una gelificación por la insignificante concentración de celulosa en la mezcla. En cuanto a la prueba con CNF extraída de *C. vulgaris* comercial, se observó una gelificación de la solución como resultado de una efectiva reacción con la celulosa obtenida. Sin embargo, no se gelificó lo suficiente como para formar un hidrogel, requiriendo la adición de una mayor concentración de celulosa para poder formarse correctamente. Cabe mencionar que uno de los retos, que pudo haber afectado en la formación de las reticulaciones, consiste en la disolución de la celulosa. Este biopolímero no se disuelve en agua o otros solventes orgánicos comunes, por lo que su disolución requiere de la interrupción de la red extendida de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares dentro de su estructura, así como de las interacciones hidrofóbicas y de van der Waals entre las caras menos polares de las unidades de anhidroglucosa (Yang *et al.*, 2020).

Previo a un calentamiento final para favorecer la reacción de gelificación, eliminación de agua remanente y curación del hidrogel se midió la absorbancia de las muestras donde se adicionaron los extractos de microalgas, utilizando como blanco aquella sin celulosa. Dicha absorbancia fue medida a una longitud de onda de 335 nm, ya que permite comprobar la presencia de grupos $-NH_2$. La absorbancia de la mezcla con celulosa proveniente de microalga comercial fue de 0.141, corroborando la presencia de $-NH$ detectado en el espectro IR. La contaminación de la muestra también pudo afectar la reticulación de la celulosa con el MBA y la glucosa, impidiendo la completa gelificación del hidrogel. Una mayor absorbancia se obtuvo de la mezcla con extracto de la mezcla de microalgas, siendo de 0.170. Esto se atribuye a la composición del extracto, siendo predominante el debris celular donde se podrían encontrar pigmentos, lípidos y proteínas. Tras un secado a 60°C por 30 min se observó un cambio de coloración de las tres soluciones (Figura 11B) a un color oscilando entre ámbar y cobrizo. Kumar *et al.* (2018) explica este fenómeno de cambio de coloración por la reacción entre NaOH diluido y glucosa en presencia de calor, resultando en la isomerización del monosacárido y cambio de coloración de ligeramente amarillento a un color café/cobrizo. Cabe mencionar que la isomerización de la glucosa también pudo haber repercutido en la reticulación, afectando la consistencia del hidrogel en formación.

Para fomentar una mayor reticulación se adicionaron 2 mL más de la solución MBA/glucosa a la mezcla que contuvo la celulosa obtenida de *C. vulgaris* comercial, ya que únicamente con esta se obtuvo una mayor viscosidad por la recuperación de una mayor cantidad de celulosa. Dicha adición contribuyó con una mayor reticulación entre los componentes, de forma que la mayor gelificación permitió que el hidrogel adquiriera una forma definida y pudiera ser manipulada (Figura 12A). Para asegurar la eliminación de aquellos reactivos que no reaccionaron para formar el hidrogel, este se sumergió en agua destilada por dos días. Dicha acción resultó en la eliminación de la coloración ámbar y adquisición de una coloración amarillenta. El cambio de coloración se atribuye a la eliminación parcial del azúcar isomerada, resultando en una reducción del peso del 1.51%. Procurando evaluar su capacidad de retención de agua, siendo esta una característica esencial de los hidrogeles, el hidrogel se sumergió nuevamente en agua destilada por dos días. Como se observa en la Figura 12C, la coloración permaneció amarillenta por una falta de eliminación de aquellos compuestos que no reaccionaron; a pesar de ello, el volumen de este aumentó por la absorción del agua. Por medio del cambio del peso se obtuvo un grado de hinchazón del 4.48 %. Sin embargo, es importante mencionar que dicho valor no es el grado de hinchazón definitivo del hidrogel, puesto que previo a la prueba este ya contenía agua. Es

por ello que previo a realizar esta prueba es recomendable liofilizar el hidrogel, de forma que se pueda obtener un %GH más preciso.

Aunque fue posible extraer celulosa a partir de biomasa de *C. vulgaris* o de una mezcla de microalgas (*Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp.) provenientes de un humedal artificial, estos no fueron completamente puros. Respecto al primero, se obtuvo mayormente CNF de diferentes tamaños, predominando nanofibrillas de menor tamaño y reticuladas. El extracto de la mezcla de microalgas resultó en la obtención de una cantidad insignificante de celulosa, estando esta contaminada con debris celular. Estos resultados demuestran que el método genérico utilizado para la extracción de celulosa es efectivo; sin embargo, diversos parámetros deben ser modificados para optimizar la extracción del biopolímero. A partir de dichos extractos se corroboró que la celulosa proveniente de microalgas puede ser efectiva para la formación de hidrogeles, aunque es necesaria la adición de una mayor concentración de celulosa para favorecer la reticulación y gelificación completa para la generación de hidrogeles.

8. Conclusiones

- El método adoptado y modificado para la extracción de celulosa en algas fue efectivo para la extracción de este biopolímero proveniente de *Chlorella vulgaris* comercial. Se obtuvo un 0.15% de celulosa a partir de la biomasa seca de la microalga comercial, siendo éste ligeramente contaminado con proteínas.
- El rendimiento de extracción aplicado a una mezcla de microalgas proveniente de un humedal artificial, compuesta por *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., fue de 1.6%. Sin embargo, el extracto estaba compuesto mayormente por restos celulares y pigmentos, habiendo una menor cantidad de CNF en la muestra obtenida.
- El análisis FTIR de las nanofibrillas de celulosa obtenidas a partir del microalga comercial *C. vulgaris* evidenciaron la presencia de picos característicos de los polisacáridos, siendo importante la aparición de grupo funcional respectivo para el enlace β -glucosídico. Por medio de microscopía SEM se observaron nanofibrillas de celulosa alargada, aunque predominaron redes de nanofibrillas de este polisacárido.
- A diferencia de la celulosa extraída de la microalga comercial, el extracto recuperado de la mezcla de microalgas resultó mayormente en la obtención de debris celular que se presentó como una masa amorfa bajo las imágenes generadas por microscopía SEM. A través del espectro IR no se detectó un pico específico para los enlaces β -glucosídicos por ser la cantidad de celulosa mínima.
- Empleando los extractos obtenidos únicamente gelificó parcialmente aquella mezcla donde se empleó la celulosa recuperada de *C. vulgaris* comercial. Sin embargo, la cantidad de celulosa no fue suficiente para poder formar un hidrogel funcional. Fue necesaria la adición de una mayor cantidad del agente reticulante MBA para la formación de un hidrogel funcional, cuyo grado de hinchazón fue del 4.48%. En cambio, con el extracto obtenido de la mezcla de microalgas no se formaron reticulaciones que sirvieran como precedente para la formación de un hidrogel por no haber suficiente biopolímero disponible.

9. Recomendaciones

- Para facilitar la cosecha de biomasa de microalgas es sugerible optar por el uso de agentes floculantes para fomentar la aglomeración de la microalga. Esto posibilitará una mayor concentración de microalgas y posterior facilidad de separación de la biomasa concentrada por medio de la centrifugación.
- Durante la extracción de celulosa a partir de la biomasa de microalgas es recomendable modificar los parámetros de los procedimientos llevados a cabo. Es necesario llevar a cabo la extracción de Soxhlet por 48 horas con una fuerza de campo eléctrico superior a 90 V para asegurar la eliminación de la mayor cantidad de ácidos grasos y pigmentos. Respecto a la incubación en peróxido de hidrógeno, este debe llevarse a cabo por 16 horas para continuar con la eliminación de aquellas impurezas coloreadas. Con la eliminación de la mayor cantidad de impurezas y debris celular se facilitará la obtención de celulosa durante el tratamiento alcalino y la hidrólisis ácida.
- Aunque se corroboró la obtención de celulosa en las muestras de estudio, es necesario llevar a cabo otros análisis morfológicos (difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear, cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada, etc.) para poder caracterizar la celulosa obtenida. Asimismo, pruebas fisicoquímicas son aconsejables para comprobar el grado de pureza de la celulosa.
- La celulosa recuperada de biomasa de microalgas es efectiva como precedente para la formación de hidrogeles; sin embargo, esta debe ser adicionada a la mezcla en una mayor concentración para promover una mayor reticulación y formación de un hidrogel funcional. Además, es necesario incubar la mezcla de NaOH/urea, MBA/glucosa y celulosa a 23°C por 12 horas, sin la administración de calor, para prevenir la isomerización del azúcar y posterior cambio de coloración. Dichas modificaciones permitirán la producción efectiva de un hidrogel funcional.
- Dado que las microalgas son microorganismos que han demostrado ser eficientes en la fijación de dióxido de carbono, siendo este un proceso necesario para la producción de unidades de glucosa que son utilizadas para la producción de nanofibrillas de celulosa, es recomendable estudiar la tasa de consumo de este gas. Además de ello, la importancia de esto a nivel ambiental radica en evaluar el papel que juegan en la reducción de la huella de carbono.

10. Bibliografía

Referencias

- Aguirre, A.; A. Bassi. 2013. Investigation of biomass concentration, lipid production, and cellulose content in *Chlorella vulgaris* cultures using response surface methodology. *Biotechnology and Bioengineering*. 110(8): 2114-2122. DOI: 10.1002/bit.24871
- Ahmed, E. 2015. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review. *Journal of Advanced Research*. 6: 105-121. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006
- Alvarado, M. 2020. Diseño *in silico* de cebadores a partir de genes de resistencia a condiciones alcalinas para el tamizaje de microalgas alcalófilas y alcalino tolerante [Tesis de Grado]. Universidad del Valle de Guatemala. P. 78.
- Arrieta, E. 2008. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*. 14(1): 8-13.
- Atiqah, M.; D. Gopakumar; F. Owolabi; Y. Pottathara; S. Rizal; N. Aprilia; D. Hermawan; M. Paridah; S. Thomas; A. Khalil. 2019. Extraction of cellulose nanofibers via eco-friendly supercritical carbon dioxide treatment followed by mild acid hydrolysis and fabrication of cellulose nanopapers. *Polymers (Basel)*. 11(11). DOI: 10.3390/polym11111813
- Baranwal, J.; B. Barse; A. Fais; G. Delogu; A. Kumar. 2022. Biopolymer: a sustainable material for food and medical applications. *Polymers*. 14. DOI: 10.3390/polym14050983
- Bessueille, L.; V. Bulone. 2008. A survey of cellulose biosynthesis in higher plants. *Plant Biotechnology*. 25: 315-322.
- Brennan, L.; P. Owende. 2010. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14: 557-577. DOI: 10.1016/j.rser.2009.10.009
- Carrillo, A. 2019. Optimización de extracción de ADN y amplificación de los marcadores universales 16S y 18S ADNr para código de barras de ADN de microorganismos presentes en el Lago de Atitlán, Sololá, y un humedal artificial en El Progreso, Guatemala [Tesis de Grado]. Universidad del Valle de Guatemala. P. 125.
- Chand, N.; M. Fahim. 2021. Natural fibers and their composites. *Tribology of Natural Fiber Polymer Composites*. 2a ed. Pp. 1-59. DOI: 10.1016/B978-0-12-818983-2.00001-3
- Cidreira, A.; K. Cappuccio; T. Hatami; L. Zuniga. 2021. Cellulose nanocrystals-based materials as hemostatic agents for wound dressings: a review. *Biomedical Microdevices*. 23(4). DOI: 10.1007/s10544-021-00581-0

- Cifuentes, C.; V. Bulone; A. Emons. 2010. Biosynthesis of callose and cellulose by detergent extracts of tobacco cell membranes and quantification of the polymers synthesized *in vitro*. *Journal of Integrative Plant Biology*. 52(2): 221-233. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2010.00919.x
- Cohen, Z. 1986. Products of microalgae. *Handbook of Microalgae Mass Culture*. USA: C. R. C. Press. Pp 41-453.
- Doran, P. 2013. *Bioprocess engineering principles*. 2a ed. UK: Elsevier. P. 903.
- Dutta, S.; D. Patel; K. Lim. 2019. Functional cellulose-based hydrogels as extracellular matrices for tissue engineering. *Journal of Biological Engineering*. 13(55). DOI: 10.1186/s13036-019-0177-0
- Gómez, L. 2007. Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*. 19(2): 3-20. ISSN: 0258-5995
- Geng, H. 2018. A one-step approach to make cellulose-based hydrogels of various transparency and swelling degrees. *Carbohydrate Polymers*. 186: 208-216. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.01.031
- Hernández-Pérez, A.; J. Labbé. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 49(2): 157-173. DOI: 10.4067/S0718-19572014000200001
- Jaeschke, D.; T. Menegol; R. Rech; G. Mercali; L. Ferreira. 2016. Carotenoid and lipid extraction from *Heterochlorella luteoviridis* using moderate electric field and ethanol. *Process Biochemistry*. 51(10): 1636-1643. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.07.016
- Japar, A.; N. Azis; M. Takriff; N. Yasin. 2017. Application of different techniques to harvest microalgae. *Transactions on Science and Technology*. 4(2): 98-108.
- Jeong, S.; S. Nam; K. HwangBo; W. Jeong; B. Jeong; Y. Chang; Y. Park. 2017. Transcriptional regulation of cellulose biosynthesis during the early phase of nitrogen deprivation in *Nannochloropsis salina*. *Scientific Reports*. 7. DOI: 10.1038/s41598-017-05684-4
- Koyande, A.; K. Chew; K. Rambabu; T. Tao; D. Chu; P. Show. 2019. Microalgae: a potential alternative to health supplementation for humans. *Food Science and Human Wellness*. 8(1): 16-24. DOI: 10.1016/j.fshw.2019.03.001
- Kumar, S.; D. Nepak; S. Kansal. 2018. Expedient isomerization of glucose to fructose in aqueous media over sodium titanate nanotubes. *RSC Advances*. 8: 30106-30114. DOI: 10.1039/c8ra04353a
- Lage, S.; A. Toffolo; F. Gentili. 2021. Microalgal growth, nitrogen uptake and storage, and dissolved oxygen production in a polyculture based-open pond fed with municipal wastewater in northern Sweden. *Chemosphere*. 276(2021). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130122
- Lam, M.; K. Lee; A. Mohamed. 2012. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control*. 10: 456-469. DOI: 10.1016/j.ijggc.2012.07.010
- Lampugnani, E.; E. Flores-Sandoval; Q. Tan; M. Mutwil; J. Bowman; S. Persson. 2019. Cellulose synthesis – Central components and their evolutionary relationships. *Trends in Plant Science*. 24(5): 402-412. DOI: 10.1016/j.tplants.2019.02.011
- Li, S.; L. Bashline; L. Lei; Y. Gu. 2014. Cellulose synthesis and its regulation. *American Society of Plant Biologists*. 12. DOI: 10.1199/tab.0169
- Mahmood, A.; D. Patel; B. Hickson; J. DesRochers; X. Hu. 2022. Recent progress in biopolymer-based hydrogel materials for biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 23. DOI: 10.3390/ijms23031415

- Mantha, S.; S. Pillai; P. Khayambashi; A. Upadhyay; Y. Zhang; O. Tao; H. Pham; S. Tran. 2019. Smart hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine. *Materials*. 12(20). DOI: 10.3390/ma12203323
- Michelin, M.; D. Gomes; A. Romani; M. Polizeli; J. Teixeira. 2020. Nanocellulose production: exploring the enzymatic route and residues of pulp and paper industry. *Molecules*. 25(15). DOI: 10.3390/molecules25153411
- Moral, A. 2012. Microalgas para la extracción de celulosa de alta pureza. *Congreso Nacional del Medio Ambiente (CONAMA2012)*. Recuperado de: <https://studylib.es/doc/6979280/microalgas-para-la-extracci%C3%B3n-de-celulosa-de-alta-pureza-...>
- Mourelle, M.; C. Gómez; J. Legido. 2017. The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. *Cosmetics*. 4(4). DOI: 10.3390/cosmetics4040046
- Ogbonna, C.; E. Nwoba. 2021. Bio-based flocculants for sustainable harvesting of microalgae for biofuel production: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 139. DOI: 10.1016/j.rser.2020.110690
- Ortiz-Moreno, M.; K. Sandoval-Parra; L. Solarte-Murillo. 2019. *Chlorella*, ¿un potencial biofertilizante?. *Orniquia*. 23(2): 71-78. DOI: 10.22579/20112629.582
- Park, J.; R. Craggs; A. Shilton. 2011. Wastewater treatment high-rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*. 102: 35-42.
- Patnaik, R.; N. Mallick. 2021. Microalgal biodiesel production: realizing the sustainability index. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 9. DOI: 10.3389/fbioe.2021.620777
- Quevedo, C.; S. Morales; A. Acosta. 2008. Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 15(1): 25-31.
- Ramírez, L.; L. Queiroz; E. Jacob. 2013. Fotobiorreactor: herramienta para cultivo de cianobacterias. *Ciencia y Tecnología*. 6(2): 9-19. ISSN 1390-4043
- Ranganagowda, R.; S. Kamath; B. Bennehalli. 2019. Extraction and characterization of cellulose from natural areca fiber. *Material Science Research India*. 16(1). DOI: 10.13005/msri/160112
- Rawat, I.; R. Ranjith-Kumar; T. Mutanda; F. Bux. 2011. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*. 88: 3411-3424. DOI: 10.1016/j.apenergy.2010.11.025
- Samia, B.; B. Mohamed; K. Schéhérazade; A. Sidi. 2016. Physicochemical analysis of cellulose from microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *African Journal of Biotechnology*. 15(24): 1201-1207. DOI: 10.5897/AJB2016.15321
- Sannino, A.; C. Demitri; M. Madaghiele. 2009. Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications. *Materials*. 2(2): 353-373. DOI: 10.3390/m2020353
- Sarkar, P.; E. Bosneaga; M. Auer. 2009. Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. *Journal of Experimental Botany*. 60(13): 3615-3635. DOI: 10.1093/jxb/erp245
- Saxena, I.; R. Brown. 2005. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Annals of Botany*. 96(1): 9-21. DOI: 10.1093/aob/mci155
- Shah, J.; A. Deokar; K. Patel; K. Panchal; A. Mehta. 2014. A comprehensive overview on various method of harvesting microalgae according to Indian perspective. *International Conference on Multidisciplinary Research & Practice*. 1(7): 313-317. ISSN 2321-2705.

- Shokri, J.; K. Adibkia. 2013. Application of cellulose and cellulose derivatives in pharmaceutical industries. *Cellulose – Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications*. DOI: 10.5772/55178
- Siti, H.; W. Danial; M. Samah; W. Samad; D. Susanti; R. Salim; Z. Majid. 2019. Extraction and characterization of microfibrillated and nanofibrillated cellulose from office paper waste. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 23(5): 901-913. DOI: 10.17576/mjas-2019-2305-15
- Spolaore, P.; C. Joannis-Cassan; E. Duran; A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101(2): 87-96. DOI: 10.1263/jbb.101.87
- Sun, B.; G. Peng; L. Duan; A. Xu; X. Li. 2015. Pretreatment by NaOH swelling and then HCl regeneration to enhance the acid hydrolysis of cellulose to glucose. *Bioresource Technology*. 196: 454-458. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.009
- Susanti, H.; T. Taufikurahman. 2020. Microalgae biodiversity and applications. *2nd International Conference on Universal Wellbeing: Research and Education During Pandemic Era: Challenges and Opportunities*. Pp. 63-67. ISBN 978-602-5871-88-7
- Tan, S.; S. Lee; K. Chew; M. Lam; J. Lim; S. Ho; P. Show. 2020. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*. 11(1): 116-129. DOI: 10.1080/21655979.2020.1711626
- Tsekos, I. 1999. The sites of cellulose synthesis in algae: diversity and evolution of cellulose-synthesizing enzyme complexes. *Journal of Phycology*. 35(4): 635-655. DOI: 10.1046/j.1529-8817.1999.3540635.x
- Valero-Valdivieso, M.; Y. Ortegón; Y. Uscategui. 2013. Biopolímeros: avances y perspectivas. *Dyna*. 80(181): 171-180.
- Ververis, C.; K. Georghiou; D. Danielidis; D. Hatzinikolaou; P. Santas; R. Santas; V. Corleti. 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology*. 98(2): 296-301. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.01.007
- Wahlström, N.; U. Edlund; H. Pavia; G. Toth; A. Jaworski; A. Pell; F. Choong; H. Shirani; K. Nilsson; A. Richter. 2020. Cellulose from the green macroalgae *Ulva lactuca*: isolation, characterization, optotracing, and production of cellulose nanofibrils. *Cellulose*. 27: 3707-3725. DOI: 10.1007/s10570-020-03029-5
- Win, T.; G. Barone; F. Secundo; P. Fu. 2018. Algal biofertilizers and plant growth stimulants for sustainable agriculture. *Industrial Biotechnology*. 14(4). DOI: 10.1089/ind.2018.0010
- Yang, J.; B. Medronho; B. Lindman; M. Norgren. 2020. Simple one pot preparation of chemical hydrogels from cellulose dissolved in cold LiOH/urea. *Polymers*. 12(2). DOI: 10.3390/polym12020373
- Zanchetta, E.; E. Damergi; B. Patel; T. Borgmeyer; H. Pick; A. Pulgarin; C. Ludwig. 2021. Algal cellulose, production, and potential use in plastics: challenges and opportunities. *Algal Research*. 56. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102288

11. Anexos

Cuadro 6. Fijación de dióxido de carbono para la producción de biomasa de microalgas

Composición de carbono en microalgas	Tasa de fijación de CO ₂ (Lam <i>et al.</i> , 2012)	CO ₂ fijado por la mezcla de microalgas utilizadas para la extracción de CNF
~ 50 %	1.8 kg CO ₂ / 1 kg biomasa	0.017 kg

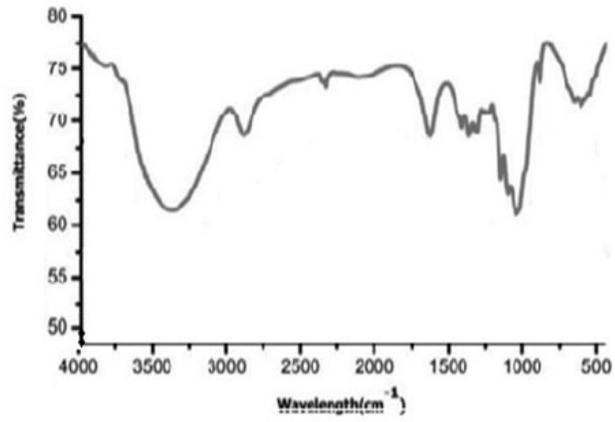
Cuadro 7. Valores de picos en espectros FTIR de celulosa extraída de *C. vulgaris* comercial

Absorción (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3259.65	Estiramiento O-H
1625.73	Estiramiento O-H por agua absorbida
1558.08	Flexión N-H o estiramiento C-N
1378.66	Deformación C-H
1315.97	Vibración H-C-H
1154.60	Estiramiento simétrico C-O-C del anillo
1114.05	Estiramiento simétrico C-O-C del anillo
1072.64	Estiramiento simétrico C-O-C del anillo
1029.64	Estiramiento simétrico C-O-C del anillo
952.88	Estiramiento C-O-C de enlace β-glucosídico

Cuadro 8. Valores de picos en espectros FTIR de celulosa extraída de una mezcla de microalgas

Absorción (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3284.50	Estiramiento O-H
2920.75	Estiramiento C-H
2851.99	Estiramiento C-H
1629.91	Estiramiento O-H por agua absorbida
1554.69	Flexión N-H o estiramiento C-N
1377.75	Deformación C-H
1319.06	Vibración H-C-H
1064.25	Estiramiento simétrico C-O-C del anillo
1033.33	Estiramiento simétrico C-O-C del anillo

Figura 13. Espectro FTIR de celulosa comercial



Fuente: Ranganagowda *et al.* (2019)