

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
**UNIVERSIDAD
CATÓLICA**
DEL PERÚ

Extracción y caracterización de alginato de sodio procedente del alga parda *Macrocystis sp.*

Tesis para optar por el título de **Licenciado en Química**, que presenta el bachiller:

Jorge Luis Ayarza León

ASESOR: Dr. Javier Nakamatsu Kuniyoshi

Lima, agosto de 2015

RESUMEN

Las algas son consideradas como una de las fuentes sostenibles de biomasa más prometedoras. Son capaces de producir y almacenar una gran cantidad de biomoléculas de importancia como potenciales combustibles, alimentos para seres humanos y animales, fármacos y aditivos para alimentos, productos agroindustriales, cosméticos e incluso para tratamiento de aguas. El mar, los ríos y los lagos del Perú constituyen el hábitat de muchas especies de algas. El alginato es un polisacárido lineal compuesto de unidades de las sales de los ácidos carboxílicos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G); y se encuentra presente en gran cantidad en la matriz extracelular de las algas marinas pardas de la clase *Phaeophyceae*. En la actualidad, el alginato se extrae en diversas partes del mundo de una gran variedad de especies de algas. La utilidad del alginato a nivel académico e industrial es variada, sus usos comunes incluyen: aglutinante en tintes para textiles, agente espesante o estabilizante en mezclas alimenticias, matriz para inmovilizar y transportar agentes biológicos o catalíticos, fabricación de fibras antibacterianas y hemostáticas, etc.

En el presente trabajo se estudió el alginato obtenido del alga *Macrocystis sp.*, una especie endémica del Perú. En primer lugar, se optimizó el proceso de obtención del alginato, el cual contempló tres procedimientos: un pre-tratamiento, una extracción y una purificación. Previamente, el alga se separó en tres partes, según su morfología: hojas, bulbos y tallos. El pre-tratamiento del alga óptimo consistió en un lavado con una solución acuosa de hipoclorito de sodio NaOCl 0,5 % por 30 min. La extracción óptima se consiguió con una solución acuosa de carbonato de sodio en proporción molar 1:1 de Na_2CO_3 a alginato, a 80 °C por 2 h. Finalmente, se propuso un método alternativo de purificación, el cual consistió en una precipitación del extracto crudo de alginato en 2-propanol, seguido de la disolución del extracto crudo y seco en una solución acuosa de EDTA 5 mM, una centrifugación, una filtración con membrana, un proceso de diálisis en agua y un secado por liofilización.

En segundo lugar, se realizó un análisis químico del producto final para determinar la composición y estructura del alginato. Por espectroscopía $^1\text{H-RMN}$ se determinó

los valores de ratio M/G y la longitud promedio en número de los bloques-G sin considerar las triadas $-MGM-$ ($N_{G>1}$). El ratio M/G promedio fue 1,75, indicando así una composición de 64 % de unidades manuronato y 36 % de guluronato. No se observó una diferencia significativa en el ratio M/G entre los extractos de las tres partes del alga, sin embargo, el alginato de los tallos y bulbos contenía cadenas de guluronatos más largas que el de las hojas. Por otro lado, la espectroscopía FT-IR permitió verificar los grupos funcionales del alginato y estimar el ratio M/G. Se determinó que las mediciones por FT-IR eran comparables a las de RMN, y por lo tanto servirían para controles rutinarios de la caracterización del alginato.

En tercer lugar, se realizó un análisis de masa molar del alginato por viscosimetría capilar y GPC. Con la viscosimetría capilar, se determinó que la masa molar promedio en viscosidad del alginato fue de aproximadamente 320 kDa. El análisis por GPC mostró que los extractos de las tres partes del alga tenían la misma distribución de masas molares, con un M_p promedio de 330 ± 20 kDa relativo a estándares de PEO. Además, se determinó que el PDI promedio es $5,094 \pm 0,201$, lo cual indica una distribución bastante dispersa.

Finalmente, se realizó un estudio morfológico del ácido algínico, alginato de sodio y sus derivados de calcio y cobre por microscopía electrónica de barrido (SEM); y un estudio de la degradación del alginato en medio alcalino asistida por microondas. Adicionalmente, se incluyó un análisis del residuo del pre-tratamiento del alga, puesto que se consideró la posibilidad de encontrar un polisacárido denominado fucoïdan, el cual es de interés académico y comercial.

FACULTAD DE
CIENCIAS E
INGENIERÍA



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ

TEMA DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUIMICA

TÍTULO : "Extracción y caracterización del alginato de sodio procedente del alga parda *Macrocystis sp.*"

ÁREA : Materiales

ASESOR : Dr. Javier Nakamatsu Kuniyoshi

ALUMNO : Jorge Luis Ayarza León

CÓDIGO : 20101831

FECHA : 29 de abril de 2015

NUMERO : 207



DESCRIPCIÓN Y OBJETIVOS:

Las algas son consideradas como una de las fuentes sostenibles de biomasa más prometedoras. Son capaces de producir y almacenar una gran cantidad de biomoléculas de importancia como potenciales combustibles, alimentos para seres humanos y animales, fármacos y aditivos para diversas industria como la de alimentos, agrícola, cosmética e incluso para tratamiento de aguas. El mar, los ríos y los lagos del Perú constituyen el hábitat de muchas especies de microalgas y macroalgas. Por lo tanto, es de suma importancia conocer su potencial y planificar el desarrollo sostenible de una industria extractiva y de cultivo de estas algas endémicas, así como su transformación en productos con valor agregado.

El alginato es un polisacárido presente en gran cantidad en la matriz extracelular de las algas marinas pardas de la clase *Phaeophyceae*. El polímero es lineal, y consiste de unidades de los ácidos carboxílicos β -D-manurónico y α -L-gulurónico. En la actualidad, el alginato se extrae en diversas partes del mundo de varias especies de algas. La utilidad del alginato a nivel académico e industrial es variada, sus usos comunes incluyen: aglutinante en tintes para textiles, agente espesante o estabilizante en mezclas alimenticias, matriz para inmovilizar y transportar agentes biológicos o catalíticos, fabricación de fibras antibacterianas y hemostáticas, etc. El objetivo general de este trabajo es el estudio del alginato obtenido de la *Macrocystis sp.* macroalga endémica del Perú, obtenida del litoral de la región Ica. En primer lugar, se optimizará el proceso de extracción del alginato de sodio para luego determinar su estructura química, masa molar y morfología. Los estudios comprenderán el uso de espectroscopia infrarroja y de resonancia magnética nuclear, viscosimetría capilar y cromatografía de permeación en gel. Adicionalmente, se realizará un análisis morfológico por microscopía electrónica de barrido y un estudio de degradación del alginato por radiación microondas.

Máximo: 100 páginas

FIRMA DEL ASESOR: _____

FIRMA DEL COORDINADOR: _____

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. A mis padres Luis y Susana y mi hermano Eduardo por su gran amor y apoyo constante en mi vida. A mis abuelos, por su cariño y por darme una sonrisa siempre.

A mi asesor Javier Nakamatsu por toda su ayuda y dedicación a lo largo de esta tesis, así como también en mi formación universitaria y profesional. Agradezco mucho la confianza depositada en mí y en mi trabajo.

A mis amigos del colegio y de la universidad por su gran amistad en todos estos años. A los integrantes del Laboratorio 211 "Team Nakamatsu", por su apoyo y comprensión y por todos los agradables momentos compartidos.

Al Sr. Paul Kradolfer Zamorra, Gerente de Investigación y Desarrollo de PSW S.A., por proveernos amablemente del alga *Macrocystis sp.* para la realización de esta tesis. A la Dirección de Gestión de la Investigación (DGI) de la PUCP por el apoyo económico brindado.

A los Ings. Alex Nieva y Miguel Pinto por su ayuda en la realización de los experimentos de $^1\text{H-RMN}$. A Milka Cajahuanca por su colaboración y apoyo en las mediciones por IR y UV-Vis.

Al Dr. Yves Coello por su contribución y consejos en la realización de los estudios por SEM. Al Dr. Luis Ortega por su ayuda en las mediciones por XRF. A los profesores de la Sección Química por la formación brindada todos estos años.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	viii
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Alginato.....	1
1.1.1 Introducción.....	1
1.1.2 Composición y estructura química.....	2
1.1.3 Obtención.....	3
1.1.4 Caracterización.....	6
1.1.5 Propiedades y usos.....	7
1.2 Fucoïdan.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	16
3.1 Reactivos, equipos y materiales.....	16
3.1.1 Reactivos.....	16
3.1.2 Equipos.....	17
3.1.3 Materiales.....	18
3.2 Metodología.....	18
3.2.1 Extracción de alginato.....	18
3.2.1.1 Pre-tratamiento del alga.....	19
3.2.1.2 Extracción en medio alcalino.....	20
3.2.1.3 Purificación del alginato.....	21
3.2.1.4 Protocolo propuesto para la extracción y purificación de alginato de sodio.....	22
3.2.2 Análisis de composición y estructura química por RMN.....	22
3.2.3 Determinación del ratio M/G por FT-IR.....	23

3.2.4	Análisis de masa molar por viscosimetría capilar.....	23
3.2.5	Análisis de masa molar por cromatografía de permeación en gel (GPC).....	23
3.2.6	Estudio del alginato por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	24
3.2.6.1	Morfología del alginato de sodio y sus derivados.....	24
3.2.6.2	Estudio del proceso de gelificación del alginato de sodio por entrecruzamiento iónico.....	25
3.2.7	Degradación de alginato en medio alcalino asistida por microondas...25	
3.2.8	Análisis del residuo del pre-tratamiento del alga con ácido.....	28
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1	Extracción de alginato.....	29
4.1.1	Pre-tratamiento del alga.....	30
4.1.2	Extracción en medio alcalino.....	32
4.1.3	Purificación del alginato.....	34
4.1.4	Protocolo propuesto para la extracción y purificación de alginato de sodio.....	36
4.2	Análisis de composición y estructura química por RMN.....	37
4.3	Determinación del ratio M/G por FT-IR.....	50
4.4	Análisis de masa molar por viscosimetría capilar.....	55
4.5	Análisis de masa molar por cromatografía de permeación en gel (GPC)....	61
4.6	Estudio del alginato por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	65
4.6.1	Morfología del alginato de sodio y sus derivados.....	65
4.6.2	Estudio del proceso de gelificación del alginato de sodio por entrecruzamiento iónico.....	67
4.7	Degradación de alginato en medio alcalino asistida por microondas.....	74
4.8	Análisis del residuo del pre-tratamiento del alga con ácido.....	83
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	90
5.1	Conclusiones.....	90
5.2	Recomendaciones.....	91
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del alginato: (a) monómeros constituyentes, y (b) formas estructurales dependiendo de la secuencia de monómeros.....	2
Figura 2. Etapas del proceso de extracción y purificación del alginato de sodio.....	6
Figura 3. Diagrama del entrecruzamiento iónico: (a) solución acuosa de alginato de sodio con los bloques poligulurónicos representados como <i>zig-zag</i> ; (b) efecto quelato de los bloques poligulurónicos sobre los cationes Ca^{2+} causan el entrecruzamiento y la gelificación.....	10
Figura 4. Estructura base del fucoidan.....	13
Figura 5. Partes del alga parda <i>Macrocystis sp.</i> : hojas, bulbos y tallos.....	19
Figura 6. Gráficos de la temperatura, presión, potencia y los programas de calentamiento en microondas para los casos mostrados en la Tabla 1.....	27
Figura 7. Alginato pre-tratado con formol (<i>izquierda</i>), y alginato pre-tratado con hipoclorito de sodio (<i>derecha</i>).....	31
Figura 8. Espectro UV-VIS de una solución acuosa al 2 % (w/v) del extracto de alginato (hojas).....	37
Figura 9. Región de interés del espectro 1H del alginato para el análisis cuantitativo.....	39
Figura 10. Espectro 1H -RMN a 80 °C (D_2O , 500 MHz) del alginato Sigma-Aldrich (<i>arriba</i>), y ajuste de la región de interés del espectro (<i>abajo</i>).....	40
Figura 11. Espectro 1H -RMN a 80 °C (D_2O , 500 MHz) del alginato extraído de las hojas de <i>Macrocystis sp.</i> (<i>arriba</i>). Resultados del ajuste de la región de interés del espectro 1H -RMN (<i>abajo</i>).....	42
Figura 12. Espectro 1H -RMN a 80 °C (D_2O , 500 MHz) del alginato extraído de los bulbos de <i>Macrocystis sp.</i> (<i>arriba</i>). Resultados del ajuste de la región de interés del espectro 1H -RMN (<i>abajo</i>).....	44

Figura 13. Espectro ^1H -RMN a 80 °C (D_2O , 500 MHz) del alginato extraído de los tallos de <i>Macrocystis sp.</i> (<i>arriba</i>). Resultados del ajuste de la región de interés del espectro ^1H -RMN (<i>abajo</i>).....	46
Figura 14. Espectros ^{13}C -RMN (D_2O , 125,77 MHz) de los extractos de alginato de (A) hojas, (B) bulbos y (C) tallos.....	48
Figura 15. Espectro FT-IR del alginato de sodio Sigma-Aldrich en modo transmitancia (<i>arriba</i>) con ampliación de la zona de 2000 a 500 cm^{-1} (<i>abajo</i>).....	51
Figura 16. Relación entre el ratio de absorbancias (A_1/A_2) y la composición del alginato (ratio M/G) para (1) A_{1320}/A_{1290} y (2) A_{1125}/A_{1030}	52
Figura 17. Espectros FT-IR de los extractos de alginato: (A) hojas, (B) bulbos y (C) tallos.....	53
Figura 18. Ecuaciones para viscosimetría capilar.....	56
Figura 19. Resultados de viscosimetría para el alginato Sigma-Aldrich.....	57
Figura 20. Resultados de viscosimetría para el extracto de alginato (hojas).....	58
Figura 21. Resultados de viscosimetría para el extracto de alginato (bulbos).....	59
Figura 22. Resultados de viscosimetría para el extracto de alginato (tallos).....	60
Figura 23. Cromatogramas de los estándares de PEO (fase móvil Na_2SO_4 0,05 M y EDTA 0,01 M, flujo 0,5 mL/min, T = 35 °C).....	62
Figura 24. Cromatogramas de las muestras de alginato (fase móvil Na_2SO_4 0,05 M y EDTA 0,01 M, flujo 0,5 mL/min, T = 35 °C) y resultados del análisis de distribución de masas molares.....	63
Figura 25. Imágenes SEM del (A) alginato de sodio, (B) alginato de calcio y (C) ácido alginico.....	66
Figura 26. Proceso de gelificación de perlas de alginato de sodio en CaCl_2 (<i>ac</i>).....	68
Figura 27. Proceso de gelificación de perlas de alginato de sodio en CuSO_4 (<i>ac</i>).....	69
Figura 28. Secciones transversales de las perlas de alginato de calcio, a (A) 1 min y a (B) 30 min de iniciada la gelificación.....	70

Figura 29. Secciones transversales de las perlas de alginato de cobre, a (A) 1 min y a (B) 30 min de iniciada la gelificación.....	71
Figura 30. Escaneo de línea por SEM-EDS en las secciones transversales de las perlas de alginato de cobre, a 1 min (A) y a 30 min (B) de iniciada la gelificación.....	72
Figura 31. Mapeo del cobre por SEM-EDS en las secciones transversales de las perlas de alginato de cobre, a 1 min (A) y a 30 min (B) de iniciada la gelificación...	73
Figura 32. Espectros FT-IR (en pastilla de KBr) de (a) muestra G purificada, (b) residuo de G , y (c) muestra H	76
Figura 33. Espectros ^1H -RMN a 80 °C (D_2O , 500 MHz) de (a) muestra G purificada, (b) residuo de G , y (c) muestra H	79
Figura 34. Espectros ^{13}C -RMN a 25 °C (D_2O , 125 MHz) de (a) alginato inicial y (b) muestra G purificada.....	81
Figura 35. Cromatograma del alginato Sigma-Aldrich y de la muestra G purificada (fase móvil Na_2SO_4 0,05 M y EDTA 0,01 M, flujo 0,5 mL/min, T = 35 °C); y resultados del análisis de distribución de masas molares.....	82
Figura 36. Espectro FT-IR en pastilla de KBr del residuo del pre-tratamiento con HCl (pH 4).....	83
Figura 37. Espectro FT-IR en pastilla de KBr del fucoidan comercial purificado.....	84
Figura 38. Espectros ^1H -RMN a 80 °C (D_2O , 500 MHz) del residuo del pre-tratamiento (<i>arriba</i>) y del fucoidan comercial purificado (<i>abajo</i>).....	86
Figura 39. Espectros XRF del residuo del pre-tratamiento (<i>arriba</i>) y fucoidan comercial (<i>abajo</i>).....	88
Figura 40. Cromatogramas del extracto de fucoidan y del fucoidan comercial (fase móvil Na_2SO_4 0,05 M y EDTA 0,01 M, flujo 0,5 mL/min, T = 35 °C); y resultados del análisis de distribución de masas molares.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Programas de calentamiento en microondas para la solución de alginato en medio alcalino.....	26
Tabla 2. Estudio del contenido de humedad del alga.....	29
Tabla 3. Estudio del pre-tratamiento del alga.....	31
Tabla 4. Estudio del efecto de la concentración de la base en la extracción.....	33
Tabla 5. Estudio del efecto del estado inicial del alga en la extracción.....	34
Tabla 6. Purificación del alginato de sodio.....	35
Tabla 7. Rendimientos de la extracción y purificación de alginato de sodio del alga <i>Macrocystis sp.</i>	36
Tabla 8. Relaciones empleadas para el análisis cuantitativo por ¹ H-RMN del alginato.....	38
Tabla 9. Resultados del ajuste de la región de interés del espectro de 1H-RMN del alginato Sigma-Aldrich.....	41
Tabla 10. Parámetros de composición y estructura del alginato Sigma-Aldrich.....	41
Tabla 11. Parámetros de composición y estructura del extracto de alginato (hojas).....	43
Tabla 12. Parámetros de composición y estructura del extracto de alginato (bulbos).....	45
Tabla 13. Parámetros de composición y estructura del extracto de alginato (tallos).....	47
Tabla 14. Resumen de los resultados por ¹ H-RMN de los extractos de alginato.....	47
Tabla 15. Ratio M/G de los extractos de alginato calculados por FT-IR.....	55
Tabla 16. Viscosidad intrínseca y masa molar promedio de las muestras de alginato.....	61

Tabla 17. Datos de los estándares Malvern Viscotek PolyCAL de PEO reportados por el fabricante.....	61
Tabla 18. Prueba de viscosidad de soluciones de alginato con EDTA.....	64
Tabla 19. Medición de viscosidad del alginato degradado.....	75



ABREVIATURAS

ASTM	American Society for Testing Materials
c	Concentración
^{13}C -RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
$\text{Ca}(\text{Alg})_2$	Alginato de calcio
$\text{Cu}(\text{Alg})_2$	Alginato de cobre
EDS	Dispersión de energía de rayos-X
EDTA	Sal disódica del ácido etilendiamintetracético
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
G	Guluronato
GPC	Cromatografía de permeación en gel
HAlg	Ácido algínico
HOD	Agua semi deuterada
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
^1H -RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
M	Manuronato
M/G	Ratio M/G
M_p	Masa molar del pico
M_n	Masa molar promedio en número
M_w	Masa molar promedio en peso
MW	Masa molar
NaAlg	Alginato de sodio
$N_{G>1}$	Longitud promedio en número de los bloques-G sin considerar las triadas $-\underline{\text{M}}\underline{\text{G}}\text{M}-$
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
η_{inh}	Viscosidad inherente
η_{red}	Viscosidad reducida
η_r	Viscosidad relativa
η_{sp}	Viscosidad específica
PDI	Índice de polidispersión
PEO	Óxido de polietileno o polietilenglicol
SEM	Microscopía electrónica de barrido
T	Temperatura
t	tiempo

TSP	Sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-2,2,3,3-d ₄
UV/Vis	Espectroscopía ultravioleta/visible
w/v	Relación peso / volumen
w/w	Relación en peso
XRF	Fluorescencia de rayos-X



1. MARCO TEÓRICO

1.1 Alginato

1.1.1 Introducción

Los polisacáridos son polímeros compuestos por unidades denominadas azúcares simples o monosacáridos, los cuales están unidos mediante enlaces glicosídicos. En la naturaleza, los polisacáridos cumplen una diversidad de funciones biológicas esenciales como, por ejemplo, almacenamiento de energía en el caso del almidón y del glucógeno, o estructural en el caso de la celulosa y la quitina. Desde la antigüedad, el desarrollo del ser humano ha estado íntimamente ligado al uso de polisacáridos. Por ejemplo, la celulosa de las plantas ha tenido innumerables aplicaciones en sus diversas formas como madera, papel, fibras, etc.

Un polisacárido muy abundante en el mar es el alginato. Este se encuentra presente en gran cantidad, aproximadamente 40 % en peso seco, en la matriz extracelular de las algas pardas de la clase *Phaeophyceae* y, en menor proporción, en las cápsulas de bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas*. El alginato cumple, principalmente, una función estructural pues brinda resistencia mecánica y flexibilidad a la vez.^{1,2} En 1881, el químico británico E.C.C. Stanford descubrió y estudió por primera vez las propiedades del alginato, y desde entonces este biopolímero ha encontrado gran cabida en el ámbito industrial y en el académico.^{1,3} La capacidad de gelificación del alginato es aprovechada en diversas industrias, tales como la textil^{2,3}, la alimentaria^{4,5} y la farmacéutica.⁶⁻⁸ Por otro lado, en el ámbito académico, existen diversos estudios sobre posibles aplicaciones del alginato en campos como la medicina y la biotecnología.^{6,7} Actualmente, varios países extraen alginato de las algas marinas, principalmente China, Japón, Estados Unidos, Noruega, Escocia, Francia y Chile. En 2009, su producción industrial fue de alrededor de 30 000 toneladas globalmente.¹

1.1.2 Composición y estructura química

El alginato es un copolímero lineal, y consiste en unidades de los ácidos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G), unidos por enlaces glicosídicos 1 \rightarrow 4 y dispuestos de manera homo- y heteropolimérica (ver Figura 1). Así, el alginato no tiene sus unidades dispuestas en secuencias regulares, por lo cual no basta conocer la composición monomérica para describir su estructura química.¹ Como se observa en la Figura 1b, existen diversas formas del enlace glicosídico según cómo sea la secuencia de unión entre monómeros, esto genera 3 formas estructurales: el bloque GG, una estructura abultada o capsular; el bloque MM, una estructura tipo cinta plana; y el bloque MG, una estructura tipo escalera. El enlace glicosídico en un bloque MM se forma entre los carbonos ecuatoriales **C-1** y **C-4**, mientras que en un bloque GG, se forma entre los carbonos axiales **C-1** y **C-4**.³ Tanto el ratio M/G como la cantidad relativa de determinados bloques son factores determinantes en las propiedades del alginato.

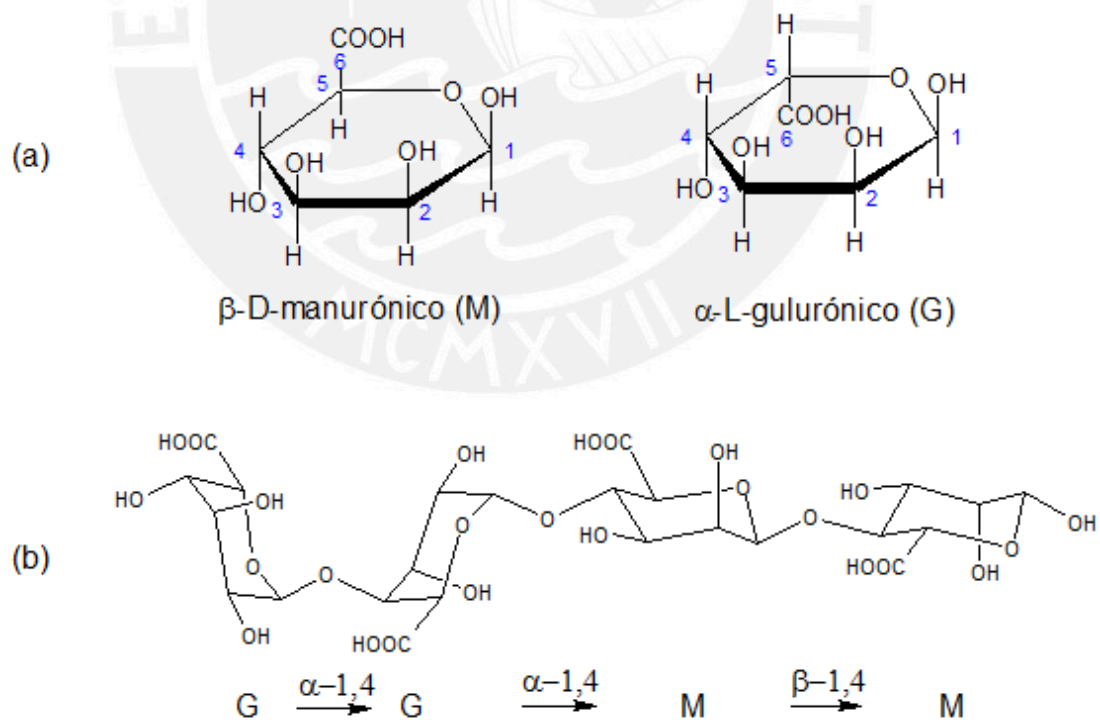


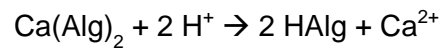
Figura 1. Estructura del alginato: (a) monómeros constituyentes, y (b) formas estructurales dependiendo de la secuencia de monómeros.

1.1.3 Obtención

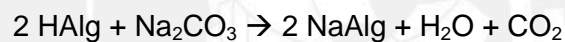
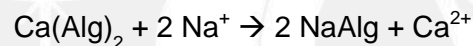
El proceso de manufactura comienza con la recolección del alga, la cual puede encontrarse naturalmente o ser cultivada, a fin de no afectar su abundancia y distribución en el mar. De entre las diversas especies de algas pardas, se extraen alginatos con diferentes propiedades, principalmente debido a la variación del ratio M/G y de la composición estructural. Incluso en una misma alga se pueden encontrar diferencias en la composición del alginato según las partes del alga. Las fuentes comerciales más comunes son los géneros de algas *Ascophyllum*, *Durvillae*, *Ecklonia*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis*, *Sargassum* y *Turbinaria*. El género *Macrocystis* se recolecta, principalmente, en la costa oeste de Norte América (México y Estado Unidos); el género *Laminaria* en el norte de Europa (Francia, Irlanda, Noruega, Escocia) y en el este asiático (China, Japón y Korea); el género *Ascophyllum* en Escocia e Irlanda; los géneros *Durvillae*, *Lessonia* y *Ecklonia* en Australia y Chile; y los géneros *Sargassum* y *Tubinaria* en el Atlántico norte y al sur de la India y las Filipinas.³ En 2009, se recolectaron aproximadamente 75 000 toneladas de alga seca de los géneros *Laminaria* y *Lessonia*, lo cual representó el 81 % de la cosecha global de algas alginofitas. El valor comercial del alginato en dicho año fue de US\$ 12 por kg.⁹ En el Perú, se recolectan las especies *Macrocystis pyrifera* (“sargazo”), *Lessonia trabeculata* (“aracanto”) y *Lessonia nigrescens* (“aracanto negro”) en la zona centro-sur del litoral, principalmente en la región Ica.¹⁰ Sin embargo, estas solo son extraídas, secadas y trituradas para su exportación, principalmente a China⁹, pues no existe una industria productora de alginato en el país.

Una vez recolectada el alga, esta puede almacenarse en forma húmeda o seca. El alga húmeda se corta en pequeños pedazos, se trata con solución diluida de formol y se almacena en tanques de concreto por varios meses. El alga también puede secarse al ambiente, triturarse y almacenarse por meses. Cuando va a ser usada, se la hidrata remojándola por varias horas. Por otro lado, algunos productores emplean el alga húmeda intacta para la extracción.³ En general, la trituración es más ventajosa pues permite un manejo más sencillo a nivel de planta, e incrementa la superficie de reacción en los tratamientos posteriores.

El alginato en el alga se encuentra principalmente como la sal de calcio, la cual es insoluble en agua, y en menor medida como sales de sodio, potasio, magnesio, estroncio y bario.¹¹ En el pre-tratamiento (Figura 2a)^{3,11}, se trata el alga con una solución de formol para remover los compuestos fenólicos que le dan un color oscuro indeseable, y se remoja en ácido clorhídrico diluido por periodos cortos de tiempo para convertir el alginato de calcio a ácido algínico, según la reacción:



La conversión no es total, pero busca remover la mayor cantidad de calcio sin degradar el alginato. Posteriormente, la extracción del alginato^{3,12} como su sal de sodio se realiza con un tratamiento alcalino con una solución de carbonato de sodio, los detalles se muestran en la Figura 2b. El resultado del tratamiento es un lodo de alga que se separa del alginato disuelto por medio de un filtro de tambor rotatorio. En la extracción, compiten procesos de intercambio iónico y neutralización ácido-base:



Las condiciones de reacción afectan la viscosidad final del alginato.¹² El alginato de sodio se disuelve formando una solución muy viscosa, mientras que la celulosa y otros compuestos insolubles del alga quedan en suspensión. Para separar los residuos insolubles, primero es necesario diluir el extracto entre 4 a 6 veces su volumen con agua. Luego, se puede emplear la flotación, con ayuda de un floculante, o la filtración, con perlita o tierra diatomea. Adicionalmente, se pueden realizar otras filtraciones dependiendo de la pureza que se necesite para un determinado uso.^{3,13}

Una vez que se tiene la solución de alginato de sodio, se pueden emplear dos métodos de purificación^{3,13,14}, como se muestra en la Figura 2c:

- *Método del alginato de calcio.* La solución de alginato de sodio se añade a una solución de cloruro de calcio, lo que da lugar a la formación de fibras. Los iones calcio generan un entrecruzamiento iónico entre las cadenas de alginato, lo cual lo vuelve un gel insoluble en agua. Si se desea decolorar el alginato, este se trata con una solución de hipoclorito de sodio. Luego, se

reemplaza a los iones Ca^{2+} con H^+ por adición de ácido clorhídrico diluido, lo que da lugar al ácido algínico, que también es insoluble. El ácido algínico se lava con agua y se comprime con una prensa para deshidratarlo. El producto debe contener al menos 25 % (w/w) de sólido. Este se convierte a alginato de sodio por neutralización con álcali en solución acuosa, lo que da lugar a una pasta viscosa. La pasta puede ser lavada en alcohol (metanol, etanol, 2-propanol) con lo cual precipitan fibras de alginato de sodio, o puede ser prensada a través de una malla con hoyos circulares para formar pellets. Finalmente, el alginato de sodio es secado en una bandeja con aire caliente antes de ser pulverizado.

- *Método del ácido algínico.* En este caso, el ácido algínico se precipita directamente de la solución de alginato de sodio por adición de ácido clorhídrico diluido, lo que da lugar a un precipitado gelatinoso. El ácido algínico se separa por flotación con inyección de aire. Luego, se procede a deshidratarlo por compresión o por centrifugación, y eso resulta en un producto con al menos 25 % (w/w) de sólido. Este se puede convertir a alginato de sodio por el método descrito anteriormente o, por un método alternativo, la conversión se realiza con álcali en suspensión con alcohol (metanol, etanol, 2-propanol). Finalmente, el alginato de sodio es secado y pulverizado.

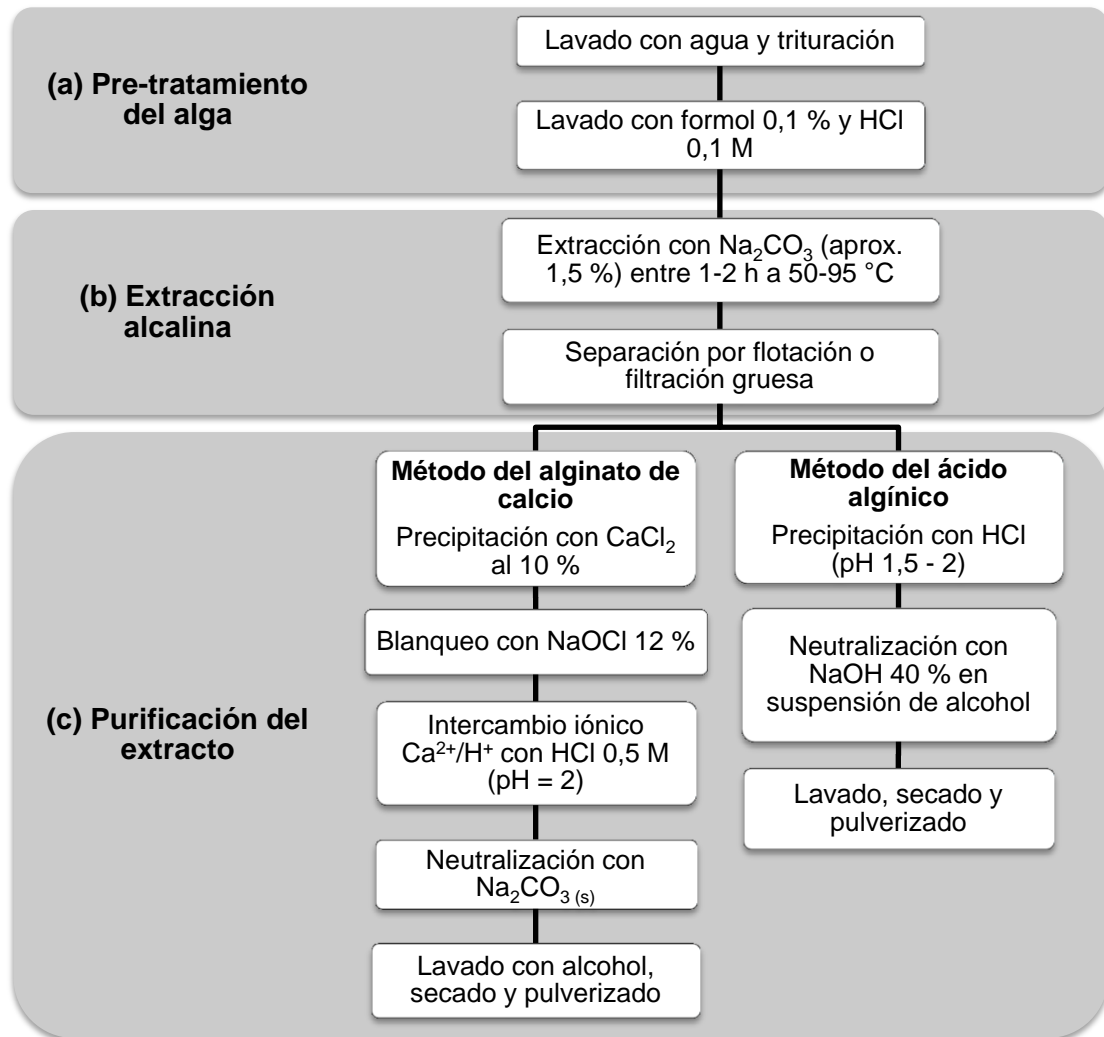


Figura 2. Etapas del proceso de extracción y purificación del alginato de sodio.

1.1.4 Caracterización

Existen diversas técnicas analíticas para caracterizar la composición monomérica del alginato. Realizando una hidrólisis parcial con ácido y empleando la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de alta resolución de ^1H y ^{13}C , uni- y bidimensional¹⁵⁻¹⁸, se pueden determinar las frecuencias de las mónadas F_G (fracción de unidades de guluronato), F_M (fracción de unidades de manuronato), los dúos F_{GG} , F_{MG} , F_{GM} , F_{MM} , y las triadas F_{GGG} , F_{GGM} , F_{MGG} , F_{MGM} , F_{MMM} , F_{MMG} , F_{GMM} , F_{GMG} . Estas frecuencias se calculan en base a diversas relaciones entre las áreas de las señales correspondientes. Consecuentemente se pueden determinar valores

como la longitud promedio en número de los bloques-G (N_G), la longitud promedio en número de los bloques-G sin considerar las triadas $-MGM-$ ($N_{G>1}$), y de forma equivalente, los valores N_M y $N_{M>1}$. En general, se puede lograr una buena caracterización determinando F_G y $N_{G>1}$ puesto que el contenido de ácido gulurónico está relacionado directamente con las propiedades de gelificación del alginato.¹⁵ Adicionalmente, se ha reportado el uso de la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) como método alternativo para determinar el ratio M/G¹⁹, el contenido catiónico²⁰, y la composición de bloques de alginato separados por hidrólisis parcial.²¹

Otro parámetro importante de la caracterización del alginato, así como de todos los polímeros, es su masa molar promedio. Las mediciones de viscosidad intrínseca de un polímero se relacionan con una masa molar promedio por medio de la ecuación de Mark-Houwink:

$$[\eta] = K M^\alpha$$

Donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca, M es la masa molar promedio de viscosidad, y K y α son constantes para un sistema polímero/solvente en particular.^{22,23} Por otro lado, la cromatografía de permeación en gel (GPC), con columnas de exclusión molecular por tamaño, utiliza esta propiedad para determinar la distribución de masas molares en función al volumen hidrodinámico.²⁴ En conjunto, la composición, estructura secuencial y masa molar determinan la utilidad del alginato para una determinada aplicación.

1.1.5 Propiedades y usos

En general, las aplicaciones del alginato se relacionan con su hidrofiliidad, su capacidad de formar geles y su biocompatibilidad. Tres de sus derivados son de importancia comercial: el alginato de sodio, el alginato de calcio y el alginato de propilenglicol, no obstante, también se producen en menores cantidades las sales de amonio, potasio, magnesio y trietanolamina.³ Su presentación comercial es, por lo general, en forma de polvo granulado de un color blanco a marrón claro. Adicionalmente, se puede formar fibras de alginato de calcio.¹

En cuanto a su solubilidad, el alginato tiene un carácter hidrofílico debido a sus abundantes grupos hidroxilo y carboxilo. Es insoluble en solventes orgánicos, aún en aquellos de gran polaridad como los alcoholes. La solubilidad en medio acuoso depende de varios factores: pH, composición y estructura, masa molar promedio, fuerza iónica, y contenido de cationes gelificantes.¹

- Los pK_a 's de los monómeros ácido manurónico y gulurónico son 3,38 y 3,65, respectivamente. En el caso del polímero, los pK_a 's difieren levemente. La adición de ácido bruscamente causa la precipitación de ácido algínico, pero si la adición es paulatina, se forma un gel de ácido algínico. La composición y estructura del alginato son también determinantes, pues los alginatos con mayor cantidad de secuencias alternantes MG precipitan a menor pH que aquellos con predominancia de secuencias homopoliméricas. Esto se relaciona con la mayor estabilidad del sólido homopolimérico por su mayor grado de orden cristalino y las fuertes interacciones por puentes de hidrógeno.¹
- Como es común en los polímeros, una mayor masa molar promedio significa una menor solubilidad.¹ Aún con alginatos de baja masa molar, sus soluciones acuosas son considerablemente viscosas a concentraciones de 1 % (w/v).³
- Como en todo polielectrolito, la fuerza iónica del agua o solución acuosa en la que se disuelva el alginato tiene efectos sobre la extensión de la cadena polimérica, su viscosidad y su solubilidad. La disolución del alginato de sodio se basa en un proceso de difusión entre el seno del solvente y el solvente dentro del alginato hidratado. En agua, la concentración de iones en el interior del polímero es considerablemente mayor que en el exterior, por lo cual la difusión procede con relativa rapidez. En cambio, en una solución salina, la diferencia en concentración iónica es menor, por lo cual la difusión procede con mayor lentitud, resultando en un mayor tiempo para disolver al alginato.¹
- La presencia de iones calcio Ca^{2+} u otros cationes multivalentes (Sr^{2+} , Cu^{2+} , etc.) a concentraciones mayores de 3 mM disminuye considerablemente la solubilidad del alginato pues este se entrecruza iónicamente formando un

gel insoluble. Este problema es de especial consideración cuando se emplean o preparan soluciones de alginato en aguas “duras”.¹

Las sales de alginato sólidas son considerablemente estables, y pueden durar por varios meses sin mayor degradación siempre que se mantengan en un ambiente seco, fresco y sin exposición al sol. Por el contrario, el ácido algínico es altamente susceptible a degradación por catálisis ácida intramolecular.¹ El enlace glicosídico es susceptible a la degradación ácida, por radicales libres, por despolimerización óxido-reductiva, por radiación (microondas, rayos- γ) y, en menor medida, por degradación con álcali.^{1,6,22,25,26} Al ser un polímero natural, existen también enzimas (alginato liasas) y microorganismos (*Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*) que lo degradan.^{1,27} La degradación resulta en pérdida de viscosidad y disminución de su capacidad de gelificación.

En la actualidad, las aplicaciones del alginato son variadas tanto a nivel industrial como a nivel de laboratorio. La variabilidad en composición y masa molar de los diversos alginatos conducen a diferentes propiedades tecnológicas. En solución, tiene un gran uso como espesante y estabilizante de mezclas acuosas, dispersiones o emulsiones.¹ Los ácidos urónicos pueden ser modificados químicamente para funcionalizar el polímero, por varios métodos, e.g. oxidación, aminación reductiva, esterificación, copolimerización, etc.²⁸⁻³¹ Además, se han estudiado los efectos del alginato en sistemas biológicos, así, por ejemplo, existe evidencia de que alginatos con gran cantidad de unidades de ácido manurónico inducen respuestas inmunológicas en organismos vivos, específicamente inflamación.¹

Los alginatos tienen una gran capacidad para formar geles. Su afinidad por cationes multivalentes, principalmente debido al efecto quelato de los bloques poligulurónicos, conduce a la formación de geles por entrecruzamiento iónico (ver Figura 3). Los geles pueden formarse en un rango de temperaturas relativamente amplio, y son termoestables. Sin embargo, la temperatura sí influye sobre la cinética de la gelificación, así como en las propiedades finales del gel. Existen, no obstante, otros métodos alternativos de gelificación que incluyen el entrecruzamiento químico, la reducción del pH para formar el gel de ácido algínico,

y la interacción electrostática con polielectrolitos de carga opuesta (e.g. polímeros cargados positivamente como la quitosana).¹

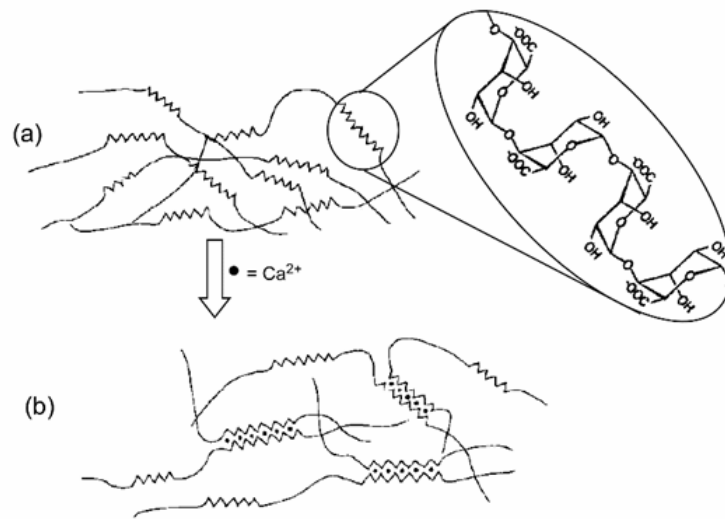


Figura 3. Diagrama del entrecruzamiento iónico: (a) solución acuosa de alginato de sodio con los bloques poligulurónicos representados como *zig-zag*; (b) efecto quelato de los bloques poligulurónicos sobre los cationes Ca^{2+} causan el entrecruzamiento y la gelificación.³

En el entrecruzamiento iónico del alginato, los principales factores a considerar son la composición y estructura secuencial, la concentración, la cantidad de iones gelificantes y la presencia de quelantes (EDTA, fosfatos, citrato). El ratio M/G es un factor determinante de las propiedades de gelificación. Entre mayor sea la cantidad de residuos de ácido gulurónico, es decir, menor ratio M/G, el gel es más rígido. Las concentraciones del alginato y de la solución de cationes gelificantes controlan la velocidad de entrecruzamiento puesto que este es un proceso difusivo. Por último, la presencia de agentes quelantes selectivos para cationes multivalentes puede emplearse tanto para regular la cinética del entrecruzamiento como para descomponer el gel.¹

Debido a que la gelificación es muy rápida, no se puede generar un gel homogéneo por mezcla directa de las soluciones de alginato y de los cationes multivalentes. La liberación controlada del catión de entrecruzamiento se puede realizar con dos métodos: el de difusión y el de gelificación *in situ*.¹

- En el método de difusión, se añaden gotas de la solución de alginato en una solución con algún catión gelificante (e.g. CaCl_2). La gelificación es bastante rápida, formándose una perla de alginato. A medida que transcurre el tiempo, el alginato difunde hacia la superficie de la perla, mientras que el catión, lo hace hacia el interior. Se genera así una diferencia en la concentración de alginato entre la superficie y el centro de la perla. La adición de cationes no gelificantes produce una desestabilización del gel, lo cual causa que se hinche considerablemente. Para obtener una mayor homogeneidad, se emplea alginato de alta masa molar y una alta concentración de cationes gelificantes y no-gelificantes. Esta técnica resulta útil si se quiere inmovilizar o encapsular algún agente presente en la solución de alginato.
- En el método de gelificación *in situ*, se mezcla una solución de alginato con una solución del catión gelificante en estado inactivo. Por ejemplo, se puede emplear sales insolubles de calcio CaCO_3 o CaSO_4 , o Ca^{2+} coordinado con algún agente quelante. Generalmente, el catión gelificante es liberado variando el pH de la solución, por adición de ácidos orgánicos o lactonas, y a medida que se libera dicho catión, se van formando simultáneamente varios núcleos de gelificación que, finalmente, se entrecruzan. En comparación con el método anterior, la gelificación es más lenta y, además, la fortaleza del gel depende en mayor grado de la masa molar del alginato. Sin embargo, los geles obtenidos son mucho más homogéneos. Este método permite un mayor control de la cinética de gelificación, lo cual resulta útil si se quiere fabricar un gel para un determinado uso.

A nivel industrial, se ha encontrado al alginato útil para las siguientes aplicaciones:

- La industria textil emplea los alginatos como agentes espesantes en pastas para teñir textiles. Debido a que el alginato tiene afinidad por la celulosa y no reacciona con los colorantes, como sí lo hace el almidón, tiene gran aplicabilidad en esta industria.³
- En la industria alimentaria, el alginato ha sido clasificado como un aditivo seguro por la Unión Europea y por Estados Unidos. Se añade en pequeñas cantidades como agente espesante o estabilizante en salsas, mayonesas,

postres horneados, helados, productos lácteos en general, etc. Otros usos incluyen el revestimiento de alimentos con películas comestibles, y aditivo de suplementos dietéticos por sus efectos fisiológicos.⁴ En alimentos con pH ligeramente básico o neutro se emplea el alginato de sodio, mientras que aquellos con pH ligeramente ácido, se emplea el alginato de propilenglicol pues este es más estable en esas condiciones de pH.³ En la actualidad, el alginato ha tomado gran cabida en la cocina debido a sus interesantes propiedades de gelificación y biocompatibilidad, particularmente en el área de la cocina molecular. De hecho, con el método de esferificación, se pueden formar gelatinas comestibles de alginato de calcio con variados ingredientes.⁵

- El alginato también tiene aplicaciones biológicas como inmovilizador de agentes catalíticos para síntesis química, e.g. catalizadores organometálicos o enzimas, o incluso células vivas.⁷ Por ejemplo, se usa en la conversión de glucosa a fructosa, en la producción de penicilinas, en la conversión de almidón a etanol en la industria cervecera, entre otras.³
- En la medicina y la industria farmacéutica, las aplicaciones son variadas. Fibras de alginato de calcio, de considerable resistencia mecánica, son usadas por sus propiedades antibacterianas y hemostáticas. Además, son fácilmente absorbibles por el cuerpo humano, o se pueden retirar aplicando solución salina de sodio. El ácido algínico en polvo se añade a la comida dietética, pues en presencia de agua se hincha y da una sensación de “satisfacción”. También se añade en algunas pastillas para el reflujo gástrico.³ Los odontólogos emplean alginato de calcio para hacer moldes dentales.⁸ Algunos medicamentos son encapsulados en alginato ya que este permite una liberación paulatina y controlada.⁷

1.2 Fucoïdan

El término fucoïdan se refiere a una familia de polisacáridos sulfatados, ricos en fucosa que se encuentran presentes en diversas especies de algas pardas (géneros *Fucus*, *Laminaria*, *Macrocystis*, *Sargassum*, *Ascophyllum*, etc.). La estructura química y complejidad del fucoïdan dependen en gran parte de la

especie de alga de la cual procede, aunque en general todos presentan una cadena lineal base de poli- $\alpha(1\rightarrow3)$ -L-fucopiranososa (ver Figura 4). La fucosa tiene la característica particular de presentar un grupo metilo en la posición C-6. Los residuos de L-fucopiranososa generalmente se encuentran sulfatados en la posición C-2 o C-4 (en algunos casos en C-3), o también pueden presentar ramificaciones de mono- u oligosacáridos de fucosa. Además, es común encontrar otros tipos de azúcares incluyendo manosa, glucosa, galactosa, xilosa, ácido glucurónico, etc. presentes en forma de ramificaciones o como parte integral de la cadena.^{32,33}

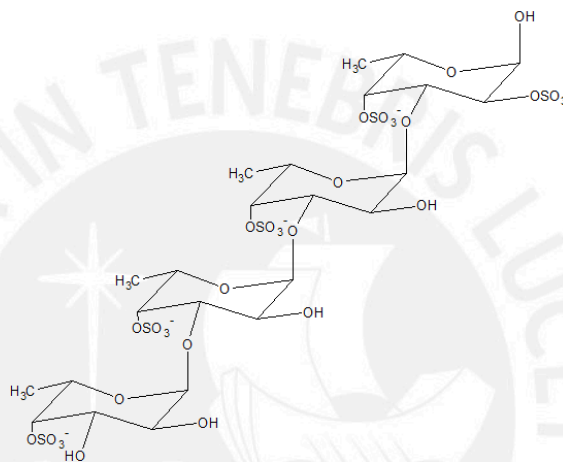


Figura 4. Estructura base del fucoidan.

Los métodos de extracción reportados son diversos, siendo algunos de los más comunes la extracción en medio ácido diluido (HCl, H₂SO₄, ácido acético) o en solución acuosa de cloruro de calcio (CaCl₂). Las condiciones de la extracción (tiempo y temperatura) reportadas en la literatura varían considerablemente, aunque en general se emplean extracciones consecutivas por varias horas en caliente (70 – 100 °C). Posteriormente, el fucoidan se recupera por precipitación en solución concentrada de etanol o por liofilización.³³ Los métodos de caracterización clásicos se basan en determinaciones colorimétricas de contenido total de azúcares, de ácido urónicos y de sulfato.³² La composición específica de monosacáridos se puede obtener por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), previa hidrólisis del fucoidan y derivatización de los residuos.³⁴ Adicionalmente, se han reportado estudios por FT-IR^{32,35} y RMN³⁶, los cuales se basan en la identificación de señales particulares del fucoidan, como por ejemplo, el grupo sulfato (SO₃⁻) o el grupo metilo del anillo piranoide. La masa molar se

determina usualmente por GPC, y varía dependiendo de la especie del alga y de las condiciones de la extracción.³²

El fucoidan ha cobrado importancia recientemente debido a sus potenciales aplicaciones en el campo de la medicina. Se ha descubierto que tiene propiedades antitumorales, antiinflamatorias, antitrombóticas y anticoagulantes. Por ejemplo, estudios *in vitro* revelan potencial actividad anti-tumoral en células cancerígenas de pulmón o piel. Se sugiere que dicha actividad se debe a las respuestas inmunológicas producto de la activación de macrófagos por polisacáridos, la cual está mediada por receptores particulares en las membranas celulares. Por otro lado, la presencia de los grupos sulfato parece ser también un factor clave en estas aplicaciones biomédicas. Estudios *in vivo* en ratones enfermos de leucemia revelaron que al sobre-sulfatar químicamente al fucoidan, su actividad anticancerígena se incrementaba. Otras aplicaciones potenciales del fucoidan se encuentran en el campo de la cosmética y la nutrición. Estudios revelan que el fucoidan aplicado tópicamente tiene efectos inhibitorios sobre el envejecimiento de la piel. La solubilidad de este polisacárido en agua hace que sea fácil de agregar en formulaciones como lociones y cremas. En la actualidad, el fucoidan se vende en Estados Unidos, Inglaterra y Asia oriental como suplemento alimenticio en forma de cápsulas, comprimidos o aditivos para bebidas. Se promueve su consumo para mejorar el sistema inmunológico e incrementar la longevidad.³⁷

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue el estudio de alginato obtenido del alga parda *Macrocystis sp.*, una especie endémica del Perú. En primer lugar, estudiar la optimización del proceso de extracción de alginato de sodio del alga parda *Macrocystis sp.*, obtenida del litoral de la región Ica, en lo referente al rendimiento y a la calidad del producto. Además, caracterizar el alginato de sodio de las siguientes formas: análisis químico, determinación de masa molar y estudio morfológico. El análisis químico comprende el uso de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Determinar la masa molar promedio por viscosimetría capilar y, la distribución de masas molares, por cromatografía de permeación en gel (GPC). Realizar un estudio morfológico por microscopía electrónica de barrido (SEM) y de formación de geles con Ca^{2+} y Cu^{2+} . Adicionalmente, evaluar la degradación del alginato por medio de radiación microondas en medio acuoso alcalino. Finalmente, investigar la posibilidad de extraer fucoidan del alga.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos, equipos y materiales

3.1.1 Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico y se usaron sin purificación previa, a menos que se indique lo contrario.

- Alga parda *Macrocystis sp.*
- **Sigma-Aldrich®**
Sal de sodio del ácido algínico (grado de pureza no especificado)
- **JT-Baker®**
Metanol, 2-propanol
- **Merck®**
Carbonato de sodio, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, bicarbonato de sodio, sal disódica del ácido etilendiamintetraacético (EDTA), sulfato de sodio anhidro, yoduro de potasio, yodato de potasio, tiosulfato de sodio, cloruro de calcio, óxido de deuterio, sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-2,2,3,3-d₄ (TSP)
- **Otros**
 - Formol Erza® 37 %
 - Lejía Clorox® 4 %
 - Fucoidan KAL® Nutraceutical 300 mg, frasco 60 tabletas
 - Estándares de PEO Malvern Viscotek PolyCAL®
 - Agua ultrapura (grado Milli-Q, pH 6,01 y resistividad 18,2 x 10⁶ Ω·cm) obtenida de un sistema de ósmosis inversa y filtración con filtro de fibra hueca con tamaño de poro de 0,2 μm.

3.1.2 Equipos

Los equipos empleados en esta tesis se encuentran en la Sección Química de la PUCP, a excepción del SEM (Sección Ingeniería Mecánica).

- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Ascend de 500 MHz. El equipo emplea un magneto superconductor de 11,7 T, una unidad de temperatura variable BCU I -40/50 y una consola Avance^{III} HD. Para el procesamiento de los espectros se empleó el programa ACD/NMR Processor Academic Edition.
- Espectrómetro infrarrojo Perkin-Elmer modelo FT-IR 100. Consta de una fuente de luz láser de He, Ne; con un detector de LiTaO₃ (tantalato de litio) y una barra de carburo de silicio como fuente de radiación. Para el procesamiento de los espectros se empleó el programa Origin 8.0.
- Espectrómetro UV/Vis de haz simple, Agilent 8453E, posee lámparas de deuterio y tungsteno como fuente de radiación, monocromador de rejilla holográfica cóncava, arreglo de fotodiodos como detector y rango de longitud de onda entre 190 y 1100 nm. Se emplean celdas de cuarzo de 1 cm de espesor.
- Cromatógrafo de permeación en gel Malvern Viscotek GPC System con detector de índice de refracción. Se empleó una columna para polímeros aniónicos Malvern Instruments A6000M General Mixed Aq, compuesta de polihidroximetacrilato poroso, y con dimensiones de 300 x 8 mm, tamaño de partícula de 13 μm y número de platos teórico mayor a 12 000. Para el procesamiento de los cromatogramas se empleó el programa OmniSEC.
- Microscopio electrónico de barrido (SEM) FEI Quanta 650, empleado con detector *Everhart-Thornley* (ETD) en modo de electrones secundarios y retrodispersados. El equipo emplea como fuente de electrones un filamento de tungsteno. Además, tiene acoplado un sistema de dispersión de energía de rayos-X (EDS) Ametek EDAX TEAM. Adicionalmente, se empleó un equipo para recubrimiento con oro Quorum Q150R ES.
- Espectrómetro de fluorescencia de rayos-X (XRF) portátil Bruker Tracer III-SD, cuenta con un objetivo de rodio como fuente de radiación y un detector de deriva de silicio (SDD).
- Reactor de microondas Anton Paar Monowave 300.
- Liofilizador Labconco modelo 4.5 a 10^{-2} mbar y -44 °C.

- Manta calefactora con controlador de temperatura Electrothermal Digital Controller MC810.
- Viscosímetro Ubbelohde Technical Glass Products Inc. 1C ($K = 0,02871 \text{ mm}^2/\text{s}^2$).
- pH-metro Hannah Instruments.

3.1.3 Materiales

- Filtro de fieltro de poliéster WEB Vent Filters.
- Filtros de membrana Merck-Millipore compuestos de nitrocelulosa con tamaños de poro de 8 y 0,2 μm .
- Filtros de membrana Merck-Millipore compuestos de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0,45 μm y diámetro de 47 mm.
- Filtros de jeringa Merck-Millipore compuestos de nylon con tamaño de poro de 0,45 μm y diámetro de 13 mm.
- Membrana para diálisis Spectra/Por #3 compuesta de éster de celulosa con MWCO de 3500 y diámetro 45 mm.

3.2 Metodología

3.2.1 Extracción de alginato

Se obtuvo una muestra del alga parda *Macrocystis sp.* del litoral de la región Ica, Perú, la cual fue congelada y transportada a Lima. Fue lavada con agua para retirar las impurezas sólidas (arena, residuos orgánicos, etc.) y se separó en tres partes (ver Figura 5), basándose en su morfología: estipe (“tallos”), neumatocistos (“bulbos”) y láminas (“hojas”), y se congelaron para su conservación.

En principio, se estudió el contenido de humedad del alga. Para ello, se descongeló el alga, se lavó con agua y se secó superficialmente con papel antes de pesar. Luego, se tomó una masa conocida entera y se dejó secar en una estufa a 50 °C por varios días hasta que la masa permaneciera constante.



Figura 5. Partes del alga parda *Macrocyctis sp.*: hojas, bulbos y tallos.

3.2.1.1 Pre-tratamiento del alga

Se realizaron cuatro tipos de pre-tratamiento, para ello el alga se colocó en una de las siguientes soluciones de lavado, a temperatura ambiente (25 °C) y con agitación constante, empleando una proporción de 50 mL de solución por gramo de alga seca (o su equivalente, 5 g de alga húmeda):

- A. Solución acuosa de metanol al 40 % (v/v) por 12 h.
- B. Solución acuosa de formol 0,1 % (w/w) por 12 h, seguido de un lavado con ácido clorhídrico (pH 4) por 15 min.
- C. Solución acuosa de ácido clorhídrico (pH 4) por 12 h.
- D. Hipoclorito de sodio diluido (proporción 1:7 de lejía : agua) por 30 min, seguido de tres lavados con agua. El análisis yodométrico indicó una concentración de hipoclorito de sodio de 3,8 % (w/w) en la lejía concentrada, lo cual implica que la solución de lavado tiene una concentración de 0,48 % (w/w).

Para mejorar la eficiencia del pre-tratamiento, el alga seca se trituró ligeramente (partículas de aproximadamente 5 mm de diámetro). Al finalizar cada lavado, el alga se separó por filtración gruesa con embudo Büchner. En el caso del pre-tratamiento

C, con HCl (pH 4), el filtrado se liofilizó para recuperar el residuo, el cual fue analizado posteriormente. Para analizar la eficiencia de los pre-tratamientos, se extrajo alginato de sodio del alga pre-tratada empleando un medio alcalino con Na_2CO_3 acuoso 0,1 M por 2 h a 80 °C. El extracto se filtró al vacío con fieltro de poliéster y se precipitó en 2-propanol (2:1 en volumen de propanol : solución alcalina). El producto se secó en una estufa a 50 °C por dos días.

3.2.1.2 Extracción en medio alcalino

En primer lugar, el alga se descongeló, se enjuagó con agua y se secó superficialmente con papel toalla. En todos los casos, el pre-tratamiento fue con el método **B**. Para la extracción, se empleó una proporción de 60 mL de solución por cada 10 g de alga húmeda (o su equivalente, 2 g de alga seca). La concentración de Na_2CO_3 se varió según lo descrito en la sección 4.1.2. La temperatura de extracción se reguló a 80 °C empleando una manta calefactora. El calentamiento fue por 2 h. Una vez terminada la extracción, se obtuvo una mezcla gelatinosa, la cual fue diluida entre 3 a 4 veces su volumen con agua caliente a 50 °C para facilitar su filtración. Se filtró al vacío con fieltro de poliéster para retener los sólidos residuales y se dejó enfriar por 30 min en la refrigeradora. El producto se precipitó en 2-propanol (2:1 en volumen propanol : solución), se dejó 30 min en el alcohol y se filtró al vacío. Finalmente, se secó en estufa a 50 °C por dos días.

Adicionalmente, se estudió si el secado previo del alga tenía algún efecto sobre el rendimiento de la extracción. Para ello, se tomó 20 g de alga húmeda, se agregó 250 mL de agua y se trituró ligeramente. El alga se recuperó por filtración gruesa al vacío, y se separó en dos porciones de igual masa. La primera porción se empleó directamente para la extracción, mientras que la segunda porción se secó en estufa a 50 °C por 24 h. Asumiendo que el alga triturada es una mezcla considerablemente homogénea, ambas porciones deberían tener la misma masa en seco de alga, haciendo así las extracciones comparables. El pre-tratamiento se realizó con el método **B**. La extracción se realizó empleando una proporción de 0,5 g Na_2CO_3 por cada 10 g de alga húmeda (o su equivalente, 2 g de alga seca), a 80 °C por 2h.

3.2.1.3 Purificación del alginato

El alginato de sodio del extracto crudo se precipitó en 2-propanol, empleando una relación en volumen de 2:1 (propanol : solución). Esto se realizó vertiendo el extracto en 2-propanol y agitando fuertemente con ayuda de una bagueta. El alginato es insoluble en solventes orgánicos, por lo cual precipitó formando fibras que se adherieron a la bagueta. De esta forma se obtuvo un sólido gelatinoso que se pudo retirar fácilmente del baño. Una vez retirado, el sólido se enjuagó en 2-propanol, se comprimió para retirar el solvente absorbido y se dejó secar en una estufa a 50 °C por 2 días.

El alginato de sodio crudo y seco se disolvió en una solución de EDTA 5 mM obteniéndose una concentración de 0,65 % (w/v). Para facilitar la disolución, se calentó a 40 °C por 1 h. La solución se centrifugó a 3000 rpm por 10 min para separar los sólidos insolubles. El sobrenadante se filtró a presión usando un filtro de nitrocelulosa con tamaño de poro de 8 µm. Luego, se dializó en agua por 48 h, cambiando regularmente la solución de diálisis. Se emplearon membranas de éster de celulosa Spectra/Por #3 MWCO 3500. Finalmente, se recuperó el alginato por liofilización. Alternativamente, la solución de alginato en EDTA se puede precipitar en 2-propanol.

Para el análisis de los extractos de alginato, se empleó alginato comercial Sigma-Aldrich como referencia. Debido a que este producto contenía residuos insolubles, fue necesaria una purificación previa para asegurar la exactitud de los análisis. Se empleó el mismo método de purificación descrito anteriormente, excepto que el alginato de sodio se disolvió solo en agua y no se realizó la diálisis.

3.2.1.4 Protocolo propuesto para la extracción y purificación de alginato de sodio

Se extrajo alginato de sodio de las tres partes del alga separadas anteriormente: hojas, tallos y bulbos. El alga se secó en estufa a 50 °C por 24 h. Luego, se trituró ligeramente en seco. El pre-tratamiento se realizó con el método **D**. Se empleó 50 mL de solución de lavado por cada gramo de alga seca. La extracción se realizó con una solución de Na₂CO₃ acuoso en proporción molar 1:1, a 80 °C por 2 h. Esto equivale a 0,25 g de Na₂CO₃ por gramo de alga seca en 30 mL de agua. Una vez terminada la extracción, el alginato se purificó siguiendo el método descrito en la sección 3.2.1.3. Adicionalmente, se obtuvo un espectro UV-VIS de una solución al 2 % (w/v) del extracto de alginato.

3.2.2 Análisis de composición y estructura química por RMN

De acuerdo a la norma ASTM F2259-10(2012)¹⁵, se preparó 100 mL de una solución acuosa de alginato de sodio al 0,1 % (w/v). El pH se ajustó a 5,6 con HCl 0,1M y se calentó a 100 °C por 1 h. El pH se ajustó a 3,8 con HCl (1 M y 0,1M) y se calentó nuevamente a 100 °C por 30 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. El pH se reguló a 7 con NaOH (1M, 0,1 M) y se liofilizó. La muestra se disolvió en 2 mL de D₂O 99,9 % y se liofilizó. Se tomó 12 mg de la muestra y se disolvió en 0,8 mL de D₂O 99,9 %. Se agregó 10 µL de estándar de TSP al 1 % (w/v) en D₂O, y 20 µL de EDTA en D₂O 0,3 M. El EDTA actúa como quelante de los iones Ca²⁺, los cuales causan ensanchamiento de las señales. Se obtuvo el espectro de ¹H a 80 °C, con 64 escaneos y tiempo de relajación (d1) de 2 s. Para el procesamiento del espectro, se empleó un *zero-filling* de 65k puntos y un *exponential window function* con 0,5 Hz de ensanchamiento de línea.¹⁵

Adicionalmente, se empleó la misma muestra para obtener el espectro de ¹³C a 25 °C, con 30 000 escaneos y tiempo de relajación (d1) de 5 s.^{17,26} Para el procesamiento del espectro, se empleó un *exponential window function* con 10 Hz de ensanchamiento de línea.

En ambos análisis, los desplazamientos químicos se referenciaron a la señal del TSP.

3.2.3 Determinación del ratio M/G por FT-IR

Se empleó el método descrito por Filipov y Kohn¹⁹ para estimar el ratio M/G del alginato por espectroscopía FT-IR. Para ello, se pesó 1 mg de alginato de sodio y 200 mg de KBr. Se disolvieron en 3 mL de agua Milli-Q Nanopure, y se liofilizó la solución. Se molió el liofilizado en mortero, se tomó 100 mg y se formó una pastilla de 12 mm de diámetro. Se obtuvo el espectro FT-IR con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 barridos. El equipo realizó la autocorrección de CO_2 y agua tras la adquisición del espectro.

3.2.4 Análisis de masa molar por viscosimetría capilar

La viscosimetría capilar se realizó con un viscosímetro Ubbelohde 1C ($K = 0,02871\text{ mm}^2/\text{s}^2$). Se empleó como solvente una solución acuosa de NaCl 0,1 M³⁸ filtrada con membrana de nylon de $0,2\text{ }\mu\text{m}$. Para el alginato Sigma-Aldrich, se preparó una solución al 0,25 % (w/v) mientras que para los alginatos extraídos de *Macrocystis sp.*, soluciones al 0,1 % (w/v). Estas soluciones se filtraron con membranas de acetato de celulosa de $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Para cada muestra, se realizaron tres diluciones, midiéndose cuatro veces el tiempo de flujo a cada concentración. Las mediciones se realizaron a $25\text{ }^\circ\text{C}$.³⁸

3.2.5 Análisis de masa molar por cromatografía de permeación en gel (GPC)

El análisis por GPC se basó en la norma ASTM FF2605-08^{1,24}. Como fase móvil se empleó una solución de Na_2SO_4 0,05 M y EDTA 0,01 M en agua Milli-Q. La fase móvil se preparó como solución stock de Na_2SO_4 0,1M y EDTA 0,02 M en agua Milli-Q, se diluyó 1:1 (v/v) y se filtró al vacío con filtro de membrana de $0,22\text{ }\mu\text{m}$

antes de su uso. Las muestras se disolvieron directamente en la fase móvil a una concentración de 1,5 mg/mL por 24 h a 10 °C y con agitación magnética a 600 rpm. Se dejaron temperar a 25 °C, se filtraron con filtros de jeringa de 0,45 µm y se transfirieron a viales. Se inyectó 250 µL de muestra en un *loop* de 100 µL. La cromatografía se realizó por 40 min a un flujo de 0,5 mL/min.

3.2.6 Estudio del alginato por microscopía electrónica de barrido (SEM)

3.2.6.1 Morfología del alginato de sodio y sus derivados

En principio, se estudió la morfología superficial del alginato de sodio y sus derivados: alginato de calcio y ácido algínico. Las muestras se prepararon con el alginato de sodio Sigma-Aldrich purificado. Se preparó una solución acuosa al 1,5 % (w/v) de alginato, y se separó en tres porciones. La primera se liofilizó directamente. La segunda porción se precipitó en forma de perlas por adición directa con gotero a un baño de cloruro de calcio 0,5 M. Las perlas se dejaron reposar en el baño por 30 min, se lavaron varias veces con agua y se liofilizaron. Finalmente, la tercera porción se precipitó en forma de perlas por adición directa con gotero a un baño de ácido clorhídrico 1 M. Las perlas se dejaron reposar por 15 min, se lavaron varias veces con agua hasta que el agua de lavado tuviese pH 4, y se liofilizaron. Para su análisis por SEM, las muestras de alginato se colocaron en pines de aluminio recubiertos con discos adhesivos de carbono. Además, se recubrió las muestras con una capa de oro de aproximadamente 20 nm de grosor empleando el equipo de *sputtering* en el modo *Timed Sputter* por 60 s a una corriente de 25 mA. Se observaron las muestras usando el detector ETD en modo alto vacío con un voltaje de 10 kV.

3.2.6.2 Estudio del proceso de gelificación del alginato de sodio por entrecruzamiento iónico

Se estudió el proceso de gelificación del alginato de sodio por precipitación con cationes divalentes, en este caso calcio (Ca^{2+}) y cobre (Cu^{2+}), para lo cual se preparó una solución acuosa al 2 % (w/v) de alginato de sodio Sigma-Aldrich. Luego, se precipitaron perlas de alginato (aprox. 3 mm de diámetro) en dos soluciones acuosas: CaCl_2 0,5 M y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M. Ambas soluciones fueron previamente filtradas con membrana de nylon de 1,2 μm . Se fotografió el proceso de gelificación a diferentes tiempos para observar el proceso de difusión de los cationes gelificantes. En el caso del cobre, las perlas a 1 min y a 30 min se congelaron en nitrógeno líquido, se cortaron transversalmente y se liofilizaron. Se observaron las secciones transversales por SEM empleando el detector ETD y el sistema EDS en modo alto vacío con un voltaje de 20 kV. Estas muestras también se recubrieron con oro siguiendo el mismo método descrito en la sección 3.2.6.1.

3.2.7 Degradación de alginato en medio alcalino asistida por microondas

En primer lugar, se preparó una solución de alginato Sigma-Aldrich 0,667 % (w/v) en NaOH 0,083 M (se dejó homogenizando por un día a temperatura ambiente). Los programas de calentamiento por microondas realizados y los gráficos correspondientes se muestran en la Tabla 1 y la Figura 6. En general, se empleó un tiempo de calentamiento de 2 min para llegar a la temperatura deseada, agitación magnética de 800 rpm y enfriamiento final con aire a 50 °C. El tiempo de calentamiento a temperatura constante varió según el caso. Para cada muestra, se tomó 15 mL de la solución de alginato y se colocó en un reactor para microondas de 30 mL. Se sometió al programa de calentamiento y se trasvasó el contenido a una fiola de 25 mL. Se enrasó con agua y se homogenizó. Las concentraciones finales de alginato y NaOH son 0,4 % (w/v) y 0,05 M, respectivamente. Se midió la viscosidad relativa a 25 °C empleando un viscosímetro Ubbelohde 1C ($K = 0,02871 \text{ mm}^2/\text{s}^2$). Para cada muestra se repitió la medición de viscosidad cuatro veces.

Tabla 1. Programas de calentamiento en microondas para la solución de alginato en medio alcalino.

Variable: Tiempo de calentamiento T = 100 °C		Variable: Temperatura de reacción t = 10 min	
Caso	Tiempo (min)	Caso	Temperatura (°C)
A (control, 25 °C)*	0	E (control, t = 0 min)*	25
B	5	F	100
C	10	G	115
D	10 (intermitente)**	H	130

* Se empleó muestras sin calentar como control puesto que el alginato podría sufrir degradación espontánea a temperatura ambiente en el medio alcalino. El estudio de la variable tiempo de calentamiento se realizó inmediatamente después de preparada la solución, mientras que el de la variable temperatura de reacción, una semana después.

** Este caso se denomina intermitente debido a que se empleó un programa con tres calentamientos y enfriamientos que suma un tiempo neto de calentamiento de 10 min.

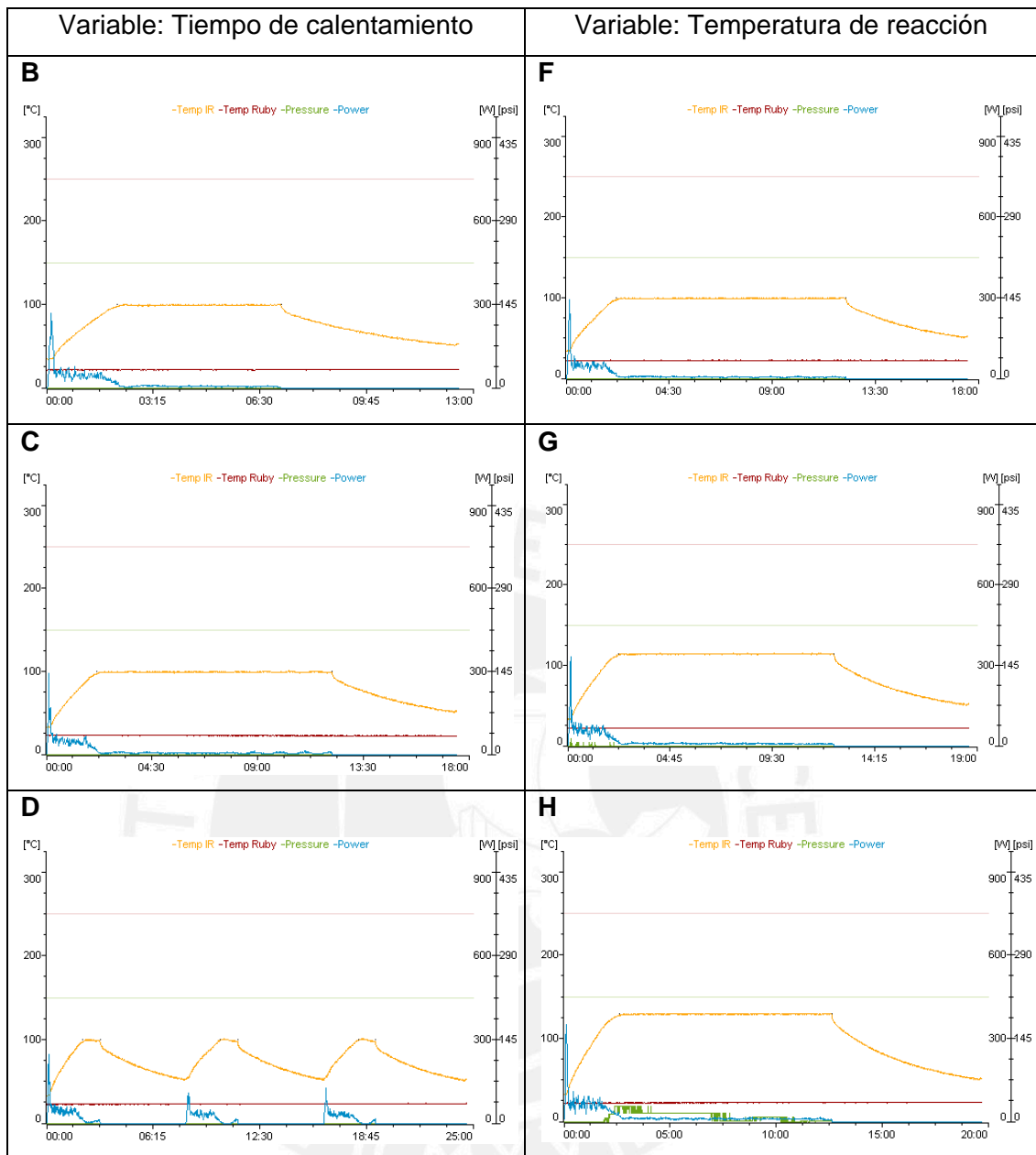


Figura 6. Gráficos de la temperatura, presión, potencia y los programas de calentamiento en microondas para los casos mostrados en la Tabla 1. La línea anaranjada corresponde a la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) medida con el sensor IR, la línea azul corresponde a la potencia (W) de la radiación microondas, y la línea verde corresponde a la presión (psi) en el tubo de microondas durante el calentamiento.

Se analizó el producto de la degradación por FT-IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y GPC.^{15,17,19,24} Se tomaron las muestras **G** y **H**, y se reguló el pH a 6 con HCl 1 M. La muestra **G** se precipitó en 2-propanol y se separó por centrifugación a 1000 rpm por 2 min. Se lavó el alginato con 2-propanol y se dejó secar en estufa a 50 °C por 24 h. El propanol residual se rotaevaporó, y el residuo sólido se dejó secar en las mismas condiciones. Por otro lado, la muestra **H** se liofilizó. Se obtuvieron los espectros FT-IR y ^1H -RMN de las tres muestras. Adicionalmente, se obtuvieron los espectros ^{13}C -RMN y los cromatogramas GPC del alginato inicial y de la muestra **G** purificada.

3.2.8 Análisis del residuo del pre-tratamiento del alga con ácido

El análisis químico se realizó por espectroscopías FT-IR, ^1H -RMN y XRF. Los espectros FT-IR se obtuvieron en pastillas de KBr (1 mg de muestra liofilizada en 200 mg de KBr), con resolución de 4 cm^{-1} y con 32 barridos.¹⁹ Los espectros ^1H -RMN se obtuvieron a 80 °C, con 64 escaneos y tiempo de relajación (d_1) de 2 s. Se agregó 10 μL de estándar de TSP al 1 % (w/v) a las muestras.¹⁵ Los desplazamientos químicos se referenciaron a la señal del TSP. Los espectros XRF se obtuvieron directamente de la muestra liofilizada empleando un voltaje de 40 kV, una corriente de 30 μA y un tiempo de análisis de 60 s. Adicionalmente, se obtuvo la distribución de masa molar por GPC, empleando el mismo sistema que en el caso del alginato.²⁴ Para comparar el residuo del pre-tratamiento con el fucoïdan ofrecido comercialmente, se adquirió un suplemento alimenticio en tabletas, marca KAL Nutraceutical, el cual consistía en un extracto del alga *Laminaria japonica*, comúnmente conocida como *kombu*, con un contenido de fucoïdan de 300 mg por tableta. Se tomó una tableta y se trituró completamente. Luego, se agregó agua y se dejó agitando a 40 °C por 1 h. Seguidamente, se centrifugó la mezcla a 3000 rpm por 5 min. El sobrenadante se filtró con papel filtro de paso rápido y se liofilizó.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de alginato

La extracción de alginato comprende tres procedimientos: un pre-tratamiento, una extracción en medio alcalino y un proceso de purificación. En la literatura, se reporta que existen diferencias en la composición del alginato dependiendo de la parte del alga de donde se extraiga³, por lo tanto, se empleó únicamente las hojas del alga para estudiar las variables que afectan la extracción. Así mismo, se comparó la extracción empleando el alga húmeda y el alga seca. Para determinar la eficiencia de la extracción, se comparó la masa y el color del extracto de alginato crudo.

En la Tabla 2, se observa que el contenido de humedad del alga es cercano al 80 % (w/w), o lo que es lo mismo, el contenido de alga seca es del 20 % (w/w). Este valor se empleó como referencia posteriormente para calcular el rendimiento de las extracciones empleando el alga húmeda.

Tabla 2. Estudio del contenido de humedad del alga.

Masa (g)	bulbo 1	bulbo 2	tallo 1	tallo 2	hoja 1	hoja 2
alga húmeda	1,7910	1,2049	1,3119	1,5970	1,6466	1,9277
1 día	0,2447	0,2628	0,3030	0,2845	0,3418	0,3083
2 días	0,2428	0,2634	0,3015	0,2850	0,3399	0,3072
alga seca	0,2428	0,2634	0,3015	0,2850	0,3399	0,3072
% humedad	86,4	78,1	77,0	82,2	79,4	84,1
					MEDIA	81,2 %

4.1.1 Pre-tratamiento del alga

Con el pre-tratamiento **A**, se pretendió estudiar la viabilidad de usar solventes orgánicos hidrosolubles para remover compuestos orgánicos en el alga, causantes del color en el producto final. El método **B** ha sido reportado como el pre-tratamiento óptimo pues el formaldehído reaccionaría con compuestos fenólicos presentes en el alga para precipitarlos como productos insolubles.¹¹ Luego, el tratamiento ácido permitiría remover los cationes gelificantes. Por comparación, con el método **C** se buscó comprobar la eficacia de la reacción con el formaldehído. Finalmente, con el método **D**, se buscó comprobar si el hipoclorito de sodio ayudaría a reducir la coloración del producto final.

En todos los casos, excepto aquel con NaOCl (método **D**), el residuo del pre-tratamiento fue una mezcla acuosa, gelatinosa y de color verde amarillento. Para remover los sólidos insolubles, la mezcla se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y se filtró a presión con membrana de nitrocelulosa de 8 μm . Finalmente, el residuo soluble se recuperó por liofilización. El rendimiento fue del 5 % (w/w) aproximadamente respecto de la masa inicial de alga. En base a lo reportado en la literatura, se presume que este residuo podría ser un polisacárido del tipo fucoidan.^{33,39} El análisis químico del mismo se muestra en la sección 4.8.

La Tabla 3 muestra los resultados de los diferentes pre-tratamientos. El pre-tratamiento con formol 0,1 % (w/w) condujo a un producto de color verde de mediana intensidad (ver Figura 7). El residuo de la filtración con fieltro de poliéster, al final de la extracción, fue un sólido de color verde oscuro. A comparación, el metanol no pareció presentar una ventaja significativa sobre el uso de la solución de formol, pues no removió con eficiencia los compuestos fenólicos en el alga, posiblemente porque estos están dentro de la matriz celular y su difusión es lenta. Por otro lado, el pre-tratamiento **C**, solamente con HCl (pH 4), condujo a un producto con mayor coloración, lo que parece indicar que el formol sí remueve parcialmente los compuestos fenólicos en el alga. El método **D** del NaOCl 0,5 % (w/w) condujo a un producto marcadamente menos coloreado que los casos anteriores (ver Figura 7). Durante el procedimiento, se observó que primero el alga se tornaba color marrón y luego se iba decolorando rápidamente por efecto de la

oxidación. Sin embargo, como se reporta en la literatura¹³, un tratamiento muy prolongado podría conducir también a la degradación del alginato, resultando en un producto de menor masa molar. A diferencia del método reportado en la literatura¹³, en el cual el blanqueo se realiza directamente sobre el alginato de calcio precipitado a partir del extracto, el método aquí mostrado tiene la ventaja de que, al realizarse antes de la extracción, evita dejar el olor y sabor a cloro en el producto final.

Tabla 3. Estudio del pre-tratamiento del alga.

Pre-tratamiento	Color final	Intensidad del color
A. Metanol 40 %	Verde	Media
B. Formol 0,1 % + HCl	Verde	Media
C. HCl (pH 4)	Verde	Oscuro
D. NaOCl 0,5 %	Marrón	Claro

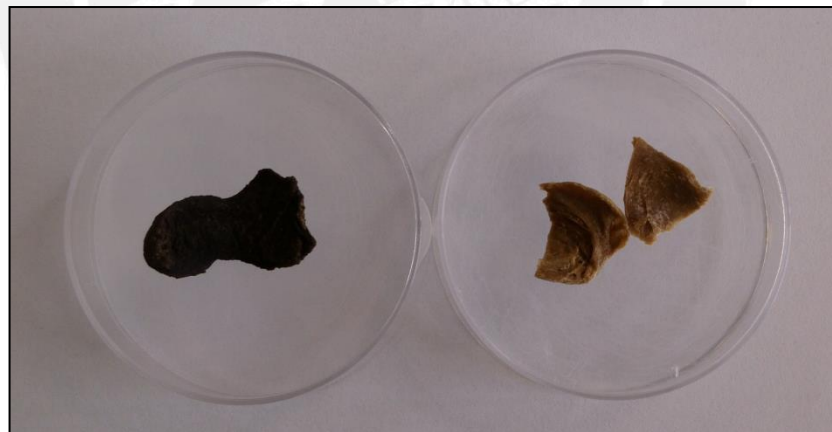


Figura 7. Alginato pre-tratado con formol (*izquierda*), y alginato pre-tratado con hipoclorito de sodio (*derecha*).

En base a lo observado, el tratamiento con hipoclorito de sodio parece ser el más indicado para obtener un alginato de menor coloración. Además, de esta forma se evita los lavados ácidos subsecuentes al tratamiento con formaldehído, los cuales podrían reducir la masa molar del producto final.¹¹ En caso se encontrara fucoidan

en el residuo del pre-tratamiento, y este tuviese potenciales aplicaciones comerciales, entonces convendría emplear el lavado solamente con ácido (método C) para recuperarlo y así obtener ambos productos de un mismo lote de alga.

4.1.2 Extracción en medio alcalino

En la literatura¹², se reporta que la extracción de alginato óptima se realiza con solución acuosa de carbonato de sodio, Na_2CO_3 , a pH 10, lo cual equivale aproximadamente a una concentración de 0,017 M. En el presente estudio, la extracción se realizó también con Na_2CO_3 (ac), pero variando la concentración de base, y se comparó los rendimientos. Para hacer los cálculos de número de moles, en base a la neutralización de los grupos carbonato (ver ecuaciones químicas en la sección 1.1.3), se empleó las siguientes suposiciones. Esto se hizo para asegurar el máximo de solubilidad del alginato en el medio de reacción.

- i. Contenido de humedad en el alga: 80 %.
- ii. En base a lo reportado en la literatura, el máximo contenido de alginato en el alga sería aproximadamente 40 % en peso seco.¹
- iii. Todo el alginato está presente como ácido algínico, por ende, su masa molar por unidad es de 177 g/mol.

En base a estas suposiciones, se probaron las siguientes proporciones molares de Na_2CO_3 a alginato: 0,625:1, 1:1 y 2:1.

Para estudiar las condiciones de concentración de la base, se realizaron cuatro extracciones empleando el alga húmeda (ver la Tabla 4). Como se aprecia, la concentración de la base es un factor determinante en la eficiencia de la extracción de alginato. En la condición **(a)**, se reprodujo la condición de solución de Na_2CO_3 (ac) a pH 10 (equivalente a 0,017 M) reportada en la literatura; sin embargo, no se obtuvo un buen rendimiento. En la condición **(b)**, se empleó una relación molar Na_2CO_3 : alginato de 0,625:1, con lo cual se incrementó marcadamente el rendimiento y alcanzó un 27,7 %. Esto parece indicar que las suposiciones mencionadas anteriormente son un buen método para calcular la cantidad de base necesaria para una extracción óptima. Posteriormente, se optó por incrementar la

relación molar a 1:1, como se observa en la condición **(c)**. El rendimiento se incrementó en un 66 % aproximadamente. Cabe mencionar que para esta concentración, el alga prácticamente se desintegró en el medio de extracción, a diferencia de los casos anteriores en donde se observaron pequeños restos de alga. Para comprobar si la relación molar 1:1 era la condición óptima de extracción, se probó una relación 2:1, como se observa en la condición **(d)**. En este último caso, el rendimiento no cambió significativamente respecto al caso anterior. Por lo tanto, se concluye que la relación molar 1:1 es la mejor alternativa para la extracción de alginato. Esta condición implica el uso de 0,5 g de Na_2CO_3 por cada 10 g de alga húmeda (o su equivalente, 2 g de alga seca).

Tabla 4. Estudio del efecto de la concentración de la base en la extracción.

Condición	Na_2CO_3 :alginato (moles)	$[\text{Na}_2\text{CO}_3]$ (M)	Rendimiento (%)*
(a)	pH 10	0,017 M	4,2 ± 0,2
(b)	0,625:1	0,047 M	27,7 ± 0,8
(c)	1:1	0,079 M	46,0 ± 2,9
(d)	2:1	0,157 M	45,4 ± 3,5

*El rendimiento se calculó en base a la masa de alga seca, asumiendo que el contenido de humedad del alga es del 80 %. Las extracciones se realizaron por duplicado.

Adicionalmente, se estudió si había alguna diferencia entre emplear el alga húmeda o seca para la extracción. Para ello, se obtuvo dos porciones equivalentes de alga húmeda, y una de ellas se dejó secar. La masa en seco del alga fue 1,90 g. Como se observa en la Tabla 5, no parece haber una diferencia significativa entre la extracción con alga húmeda o alga seca. Esto se debe a que, en ambos casos, el pre-tratamiento hidrata al alga, lo cual a su vez facilita la disolución del alginato en el medio alcalino durante la extracción propiamente dicha. Sin embargo, cabe resaltar que el alga seca es más fácil de almacenar y de manejar.

Tabla 5. Estudio del efecto del estado inicial del alga en la extracción.

Estado inicial del alga	Rendimiento (%)*
Húmeda	57,7
Seca	56,0

*El rendimiento se calculó en base a la masa de alga seca, asumiendo que el contenido de humedad del alga es del 80 %. Las extracciones se realizaron una vez.

4.1.3 Purificación del alginato

En la literatura se reporta que el método del alginato de calcio es ampliamente usado para aislar el alginato de sodio del extracto crudo.^{1,3,13,14} Sin embargo, al aplicar este método se observó que la precipitación del alginato es muy rápida y, por ende, las impurezas tienden a quedar atrapadas en el gel formado. Además, se ha reportado que el alginato sufre cierta degradación en los subsiguientes tratamientos con solución de HCl para remover el calcio.¹³ Por lo tanto, se diseñó un método alternativo para purificar el alginato.

El alginato de sodio se aisló del extracto crudo por precipitación en 2-propanol. Al secarse, el gel de alginato redujo su volumen significativamente formando un sólido duro. Superficialmente presentaba un color oscuro pero el interior era blanquecino. Posteriormente, el alginato de sodio crudo se purificó según el método descrito en la sección 3.2.1.3. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Dada la gran variedad de aplicaciones que tiene el alginato, la elección del método de purificación está sujeta al grado de pureza que se necesite. Por ejemplo, el alginato empleado en aplicaciones biomédicas requiere una purificación más exhaustiva, a fin de remover endotoxinas, proteínas, metales pesados, microorganismos, etc.⁶ En cambio para aplicaciones como impresión de textiles, el grado de pureza requerido es menor.

Tabla 6. Purificación del alginato de sodio.

Parte del alga	Masa alginato crudo (g)	Masa alginato purificado (g)	Rendimiento (% w/w)
Hojas	1,0555	0,6985	66,2
Tallos	0,9543	0,6238	65,4
Bulbos	1,2228	0,6606	54,0

*El rendimiento se calculó en base a la masa de alga seca. Las extracciones se realizaron una vez.

En general, el método aquí propuesto permite remover una cantidad considerable de impurezas, resultando en un alginato con buena solubilidad y de color claro. En primer lugar, la precipitación en 2-propanol permitió aislar el alginato de sodio del extracto crudo. Durante la extracción, el alginato se disuelve en el medio acuoso básico, sin embargo, la lisis de las células libera una gran cantidad de sustancias al medio. Así, el solvente orgánico remueve el Na_2CO_3 residual, membranas celulares, lípidos residuos orgánicos, proteínas, compuestos fenólicos, etc. y reduce significativamente el color del producto final. Además, permite en cierta medida evitar la proliferación de microorganismos en el producto. Con el secado se evapora el solvente residual. Posteriormente, el producto es disuelto en una solución acuosa de EDTA 5 mM a una concentración de 0,65 % (w/v). La concentración es crucial, puesto que se necesita una solución suficientemente fluida para lograr una buena separación por centrifugación, pero no tan diluida como para dificultar el aislamiento del alginato al final de la purificación. El EDTA facilita la disolución puesto que actúa como quelante de cationes gelificantes, principalmente el calcio. Es recomendable triturar el producto antes de su purificación, y calentar la solución a 40 °C para asegurar una buena disolución. La centrifugación permite remover los sólidos insolubles, algunos de los cuales también son responsables del color oscuro en el producto final. Por su parte, la filtración permite remover micropartículas en suspensión. Es recomendable filtrar a presión en vez de usar vacío puesto que la solución tiene una viscosidad considerable. Posteriormente, la solución se somete a una diálisis en agua, con la cual se remueven las sales (incluyendo el EDTA), contaminantes orgánicos disueltos, y oligómeros de alginato u otros polisacáridos de baja masa molar. El alginato se puede recuperar por liofilización, con lo cual queda en forma de espuma expandida. Por otro lado, si se emplea la precipitación en 2-propanol, se le puede posteriormente triturar y dejar secar.

4.1.4 Protocolo propuesto para la extracción y purificación de alginato de sodio

Se determinó un protocolo óptimo de obtención de alginato de sodio a partir de *Macrocystis sp.* El pre-tratamiento se realizó con solución de hipoclorito de sodio 0,5 %. La extracción fue en medio acuoso alcalino con Na_2CO_3 en proporción molar 1:1, a 80 °C por 2 h. El extracto de alginato crudo se aisló por precipitación en 2-propanol, y se purificó por redisolución en medio acuoso con un agente quelante de cationes divalentes, seguido de una centrifugación, una filtración, y un proceso de diálisis con membrana porosa. Finalmente, el alginato purificado se recuperó por liofilización.

En la Tabla 7, se observan los resultados del proceso de obtención de alginato de sodio a partir de las tres partes del alga: hojas, bulbos y tallos. La Figura 8 muestra el espectro UV-VIS de una solución acuosa del extracto de alginato (hojas). Se observa que la absorción en el rango visible (390 – 700 nm) es casi nula, lo cual comprueba que el producto final tiene una baja coloración. El rendimiento promedio de la extracción de alginato de sodio purificado fue $33,0 \pm 1,9$ % (w/w). Este valor es superior al reportado por Hernández-Carmona *et al.*¹², quienes obtuvieron un rendimiento máximo de 21,9 %.

Tabla 7. Rendimientos de la extracción y purificación de alginato de sodio del alga *Macrocystis sp.*

Parte del alga*	Extracción (% w/w)	Purificación (% w/w)	Total (% w/w)
Hojas	52,7	66,2	34,9
Tallos	47,7	65,4	31,2
Bulbos	61,1	54,0	33,0

*Extracciones realizadas con el alga seca. Se hizo una sola extracción por cada parte.

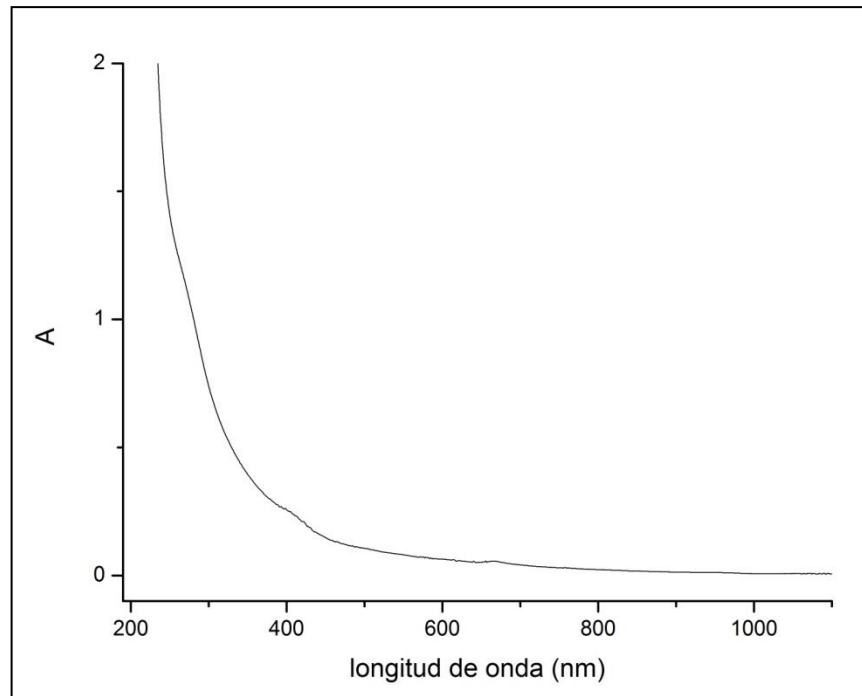


Figura 8. Espectro UV-VIS de una solución acuosa al 2 % (w/v) del extracto de alginato (hojas).

4.2 Análisis de composición y estructura química por RMN

Se empleó la norma ASTM F2259-10(2012)^{ε1} para el análisis del alginato por RMN.¹⁵ El método contempla una degradación del polisacárido en medio ácido previo al análisis. Esto se debe a que dicha degradación rompe los enlaces glicosídicos, lo cual permite reducir la viscosidad de la muestra, incrementar la movilidad de las moléculas y consecuentemente obtener un espectro con mejor resolución.

Del espectro ¹H-RMN de las muestras de alginato, se calcularon las frecuencias de las mónadas, los dúos y las tríadas, con las cuales a su vez se calculó el ratio M/G y la longitud promedio en número de los bloques-G sin considerar las tríadas – MGM- ($N_{G>1}$). Los estudios de Grasdalen *et al.*,^{16,18} (recopilados en la norma ASTM F2259-10(2012)^{ε1}) mostraron que se pueden calcular los valores anteriormente mencionados empleando las señales características de la zona entre 4,25 y 5,5 ppm (ver Figura 9). Estas señales corresponden a los hidrógenos enlazados a los

carbonos 1 y 5 (ver Figura 1), los cuales están más desprotegidos debido a su cercanía al enlace glicosídico y al grupo carboxilo, respectivamente. Debido a que algunas de las señales se solapan entre sí, fue necesario emplear un ajuste gaussiano-lorentziano para determinar las áreas de los picos. Además, para obtener un buen ajuste fue necesario definir correctamente la línea base. Las relaciones empleadas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Relaciones empleadas para el análisis cuantitativo por ¹H-RMN del alginato.¹⁵

Mónadas*	$G = 0,5(A + C + 0,5(B1 + B2 + B3))$ $M = B4 + 0,5(B1 + B2 + B3)$ $F_G = G/(M + G)$ $F_M = M/(M + G)$
Dúos*	$GG = 0,5(A + C - 0,5(B1 + B2 + B3))$ $MG = GM = 0,5(B1 + B2 + B3)$ $MM = B4$ $F_{GG} = GG/(M + G)$ $F_{MM} = MM/(M + G)$ $F_{GM} = F_{MG} = MG/(M + G)$
Tríadas*	$GGM = MGG = (B1)0,5(B1 + B2 + B3)/(B1 + B2)$ $MGM = (B2)(0,5)(B1 + B2 + B3)/(B1 + B2)$ $GGG = GG - GGM$ $F_{GGG} = GGG/(M + G)$ $F_{MGM} = MGM/(M + G)$ $F_{GGM} = F_{MGG} = GGM/(M + G)$
Ratios	$N_G = F_G / F_{GM}$ $N_{G>1} = (F_G - F_{MGM}) / F_{GGM}$ $N_M = F_M / F_{MG}$

*F = fracción o frecuencia

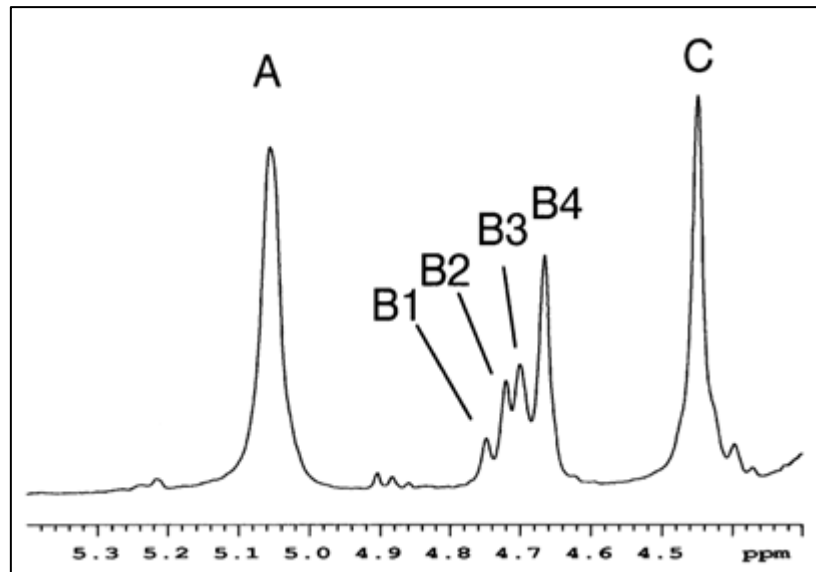


Figura 9. Región de interés del espectro ^1H del alginato para el análisis cuantitativo. (Tomado de la referencia 15)



En primer lugar, se corroboró el método empleando el alginato comercial provisto por Sigma-Aldrich (ver Figura 10).

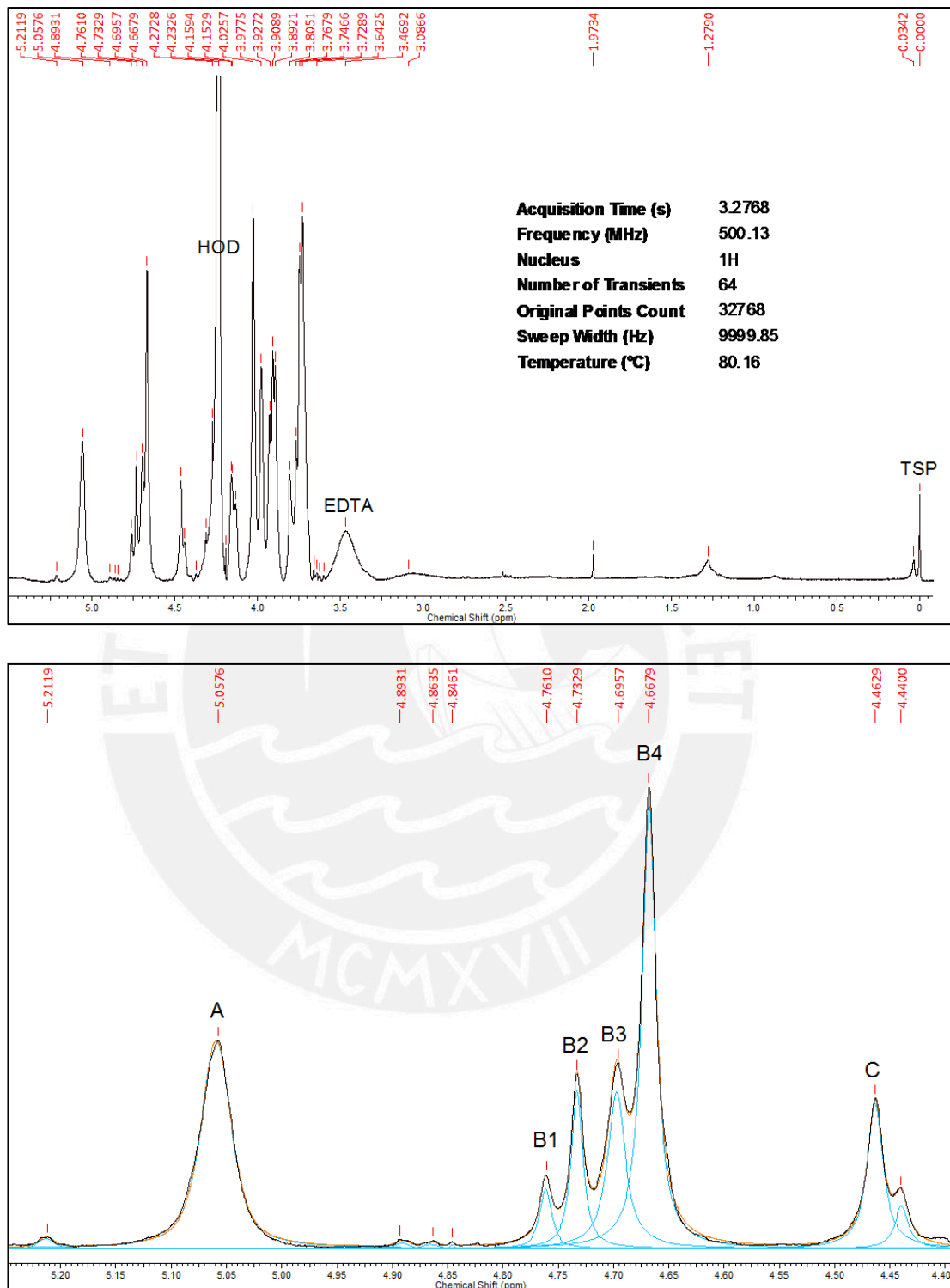


Figura 10. Espectro ^1H -RMN a 80 °C (D_2O , 500 MHz) del alginato Sigma-Aldrich (*arriba*), y ajuste de la región de interés del espectro (*abajo*). La línea negra es el espectro original; la línea azul es el ajuste para cada pico; y la línea amarilla es la suma total del ajuste. Concordancia del modelo = 99 %.

Tabla 9. Resultados del ajuste de la región de interés del espectro de $^1\text{H-RMN}$ del alginato Sigma-Aldrich.

Señal	δ (ppm)	Asignación*	Área (u.a.)
A	5,06	G (protón 1)	8 119 330 304
B1	4,76	GGM (protón 5)	964 861 056
B2	4,73	MGM (protón 5)	2 528 234 496
B3	4,70	MG (protón 1)	3 936 093 696
B4	4,67	MM (protón 1)	8 751 037 440
C	4,47	GG (protón 5)	4 096 526 144

*Ver asignación de protones en la Figura 1.

El productor reporta que el ratio M/G de este alginato es de 1,56, es decir, una composición de 61 % manuronato y 39 % guluronato.⁴⁰ El valor aquí obtenido es de 1,57 (ver Tabla 10), lo cual concuerda considerablemente con lo reportado. El $N_{G>1}$ indica que, en promedio, el número de unidades en una cadena homogulurónica es de 5.

Tabla 10. Parámetros de composición y estructura del alginato Sigma-Aldrich.

Mónadas		Dúos		Tríadas		Ratio M/G	$N_{G>1}$
F_G	0,39	F_{GG}	0,21	F_{GGG}	0,16	1,57	5,1
F_M	0,61	F_{MM}	0,43	F_{MGM}	0,13		
		F_{GM}	0,18	F_{GGM}	0,05		
		F_{MG}	0,18	F_{MGG}	0,05		

Una vez corroborado el método, se realizó el mismo procedimiento para los extractos de alginato del alga *Macrocystis sp.* (ver Figuras 11, 12 y 13).

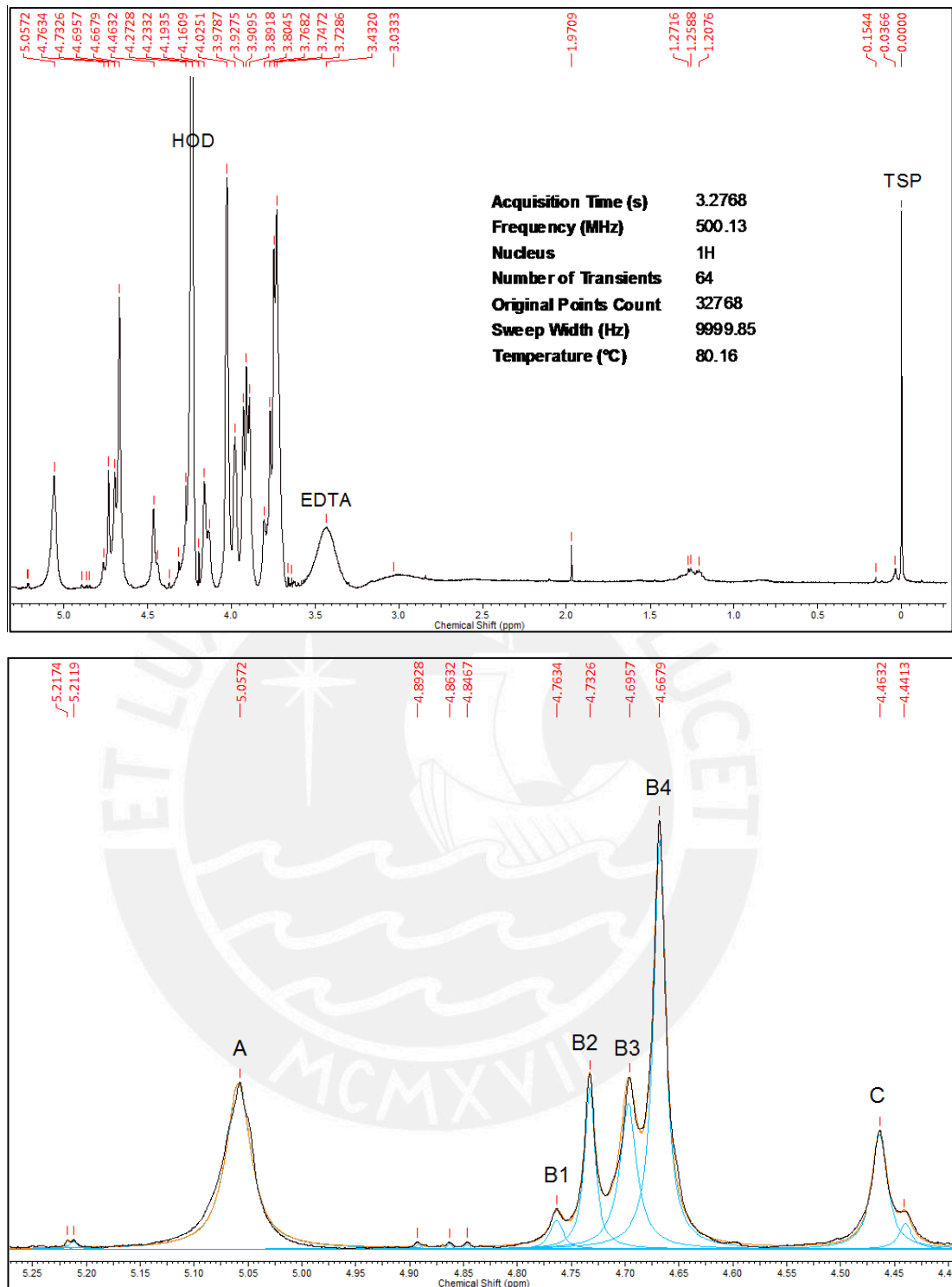


Figura 11. Espectro ^1H -RMN a 80 °C (D_2O , 500 MHz) del alginato extraído de las hojas de *Macrocystis sp.* (arriba). Resultados del ajuste de la región de interés del espectro ^1H -RMN (abajo). Concordancia del modelo = 99 %.

Tabla 11. Parámetros de composición y estructura del extracto de alginato (hojas).

	Mónadas		Dúos		Tríadas	Ratio M/G	N_{G>1}
F _G	0,37	F _{GG}	0,17	F _{GGG}	0,14	1,73	6,0
F _M	0,63	F _{MM}	0,44	F _{MGM}	0,16		
		F _{GM}	0,20	F _{GGM}	0,03		
		F _{MG}	0,20	F _{MGG}	0,03		

De la Tabla 11, se observa que el ratio M/G es de 1,73, lo cual indica una composición de 63 % de manuronato y 37 % guluronato. Este valor es comparable con lo reportado en la literatura para esta especie de alga: 1,56.³ Ligeras variaciones en el ratio M/G son esperables dependiendo del lugar de origen del alga. El N_{G>1} indica que, en promedio, el número de unidades en una cadena homogulurónica es de 6.

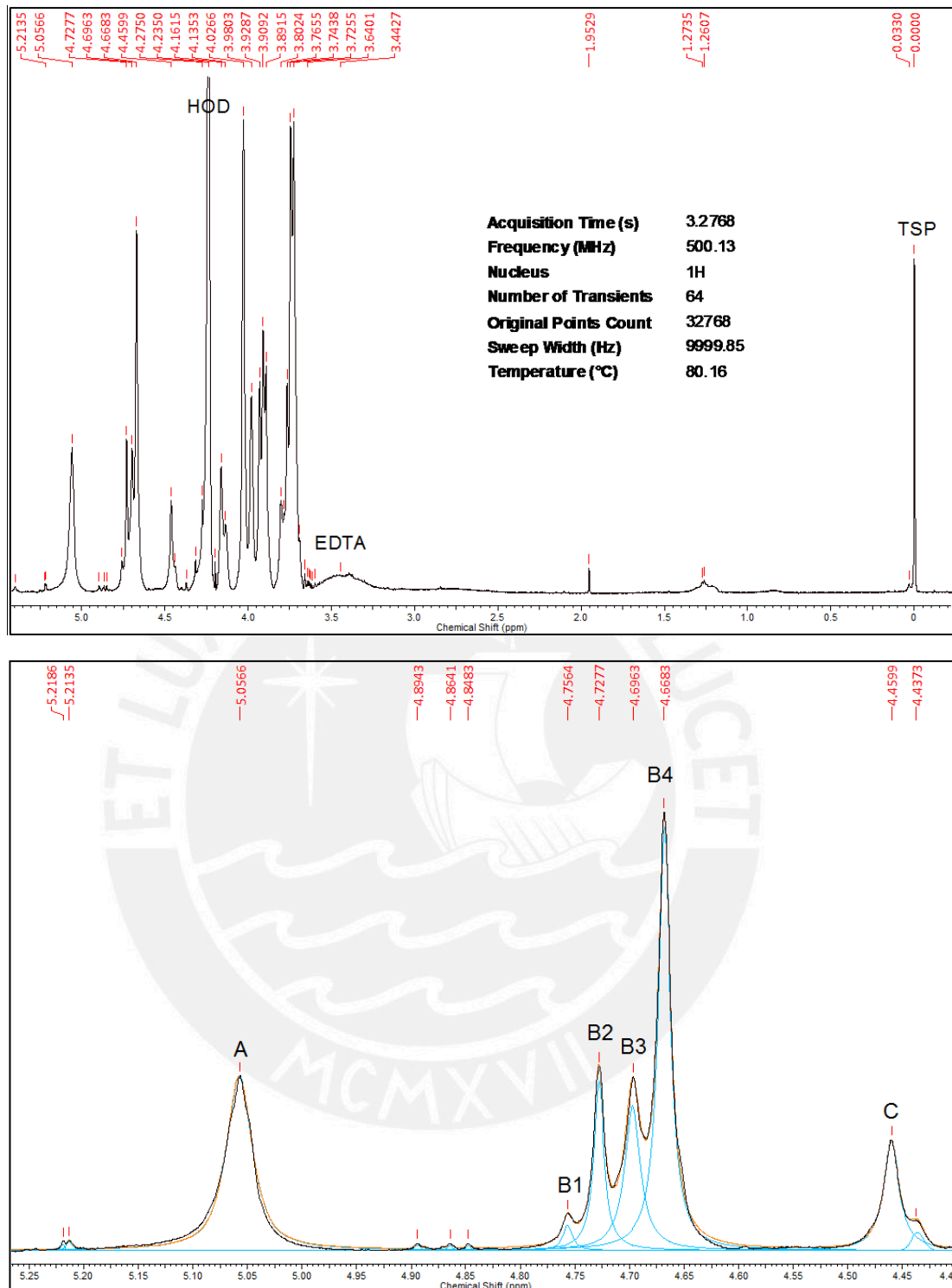
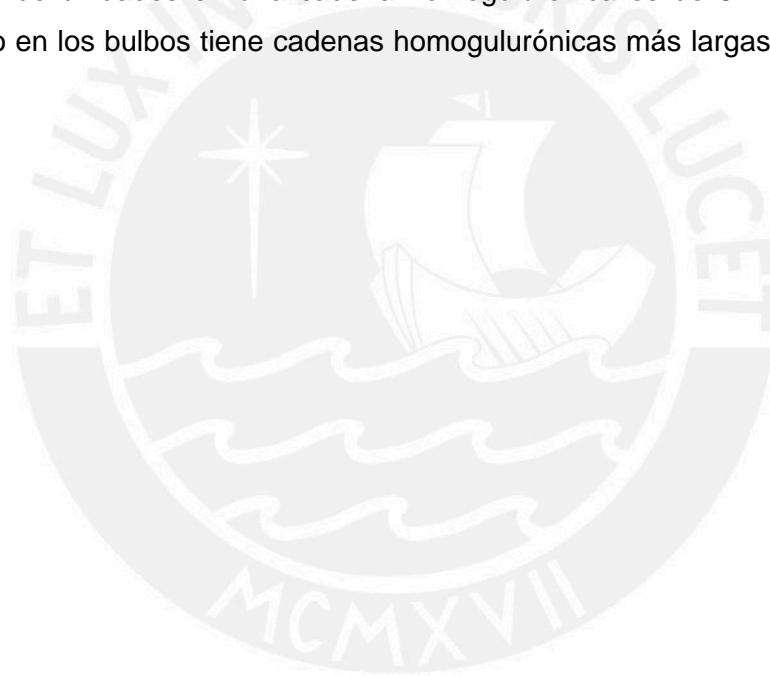


Figura 12. Espectro ^1H -RMN a 80 °C (D_2O , 500 MHz) del alginato extraído de los bulbos de *Macrocystis sp.* (arriba). Resultados del ajuste de la región de interés del espectro ^1H -RMN (abajo). Concordancia del modelo = 99 %.

Tabla 12. Parámetros de composición y estructura del extracto de alginato (bulbos).

Mónadas		Dúos		Tríadas		Ratio M/G	$N_{G>1}$
F_G	0,36	F_{GG}	0,17	F_{GGG}	0,15	1,79	8,4
F_M	0,64	F_{MM}	0,45	F_{MGM}	0,17		
		F_{GM}	0,19	F_{GGM}	0,02		
		F_{MG}	0,19	F_{MGG}	0,02		

De la Tabla 12, se observa que el ratio M/G es de 1,79, lo cual indica una composición de 64 % manuronato y 36 % guluronato. Este valor es bastante similar al obtenido para el extracto de hojas. El valor de $N_{G>1}$ indica que, en promedio, el número de unidades en una cadena homogulurónica es de 8. Esto indica que el alginato en los bulbos tiene cadenas homogulurónicas más largas que aquel en las hojas.



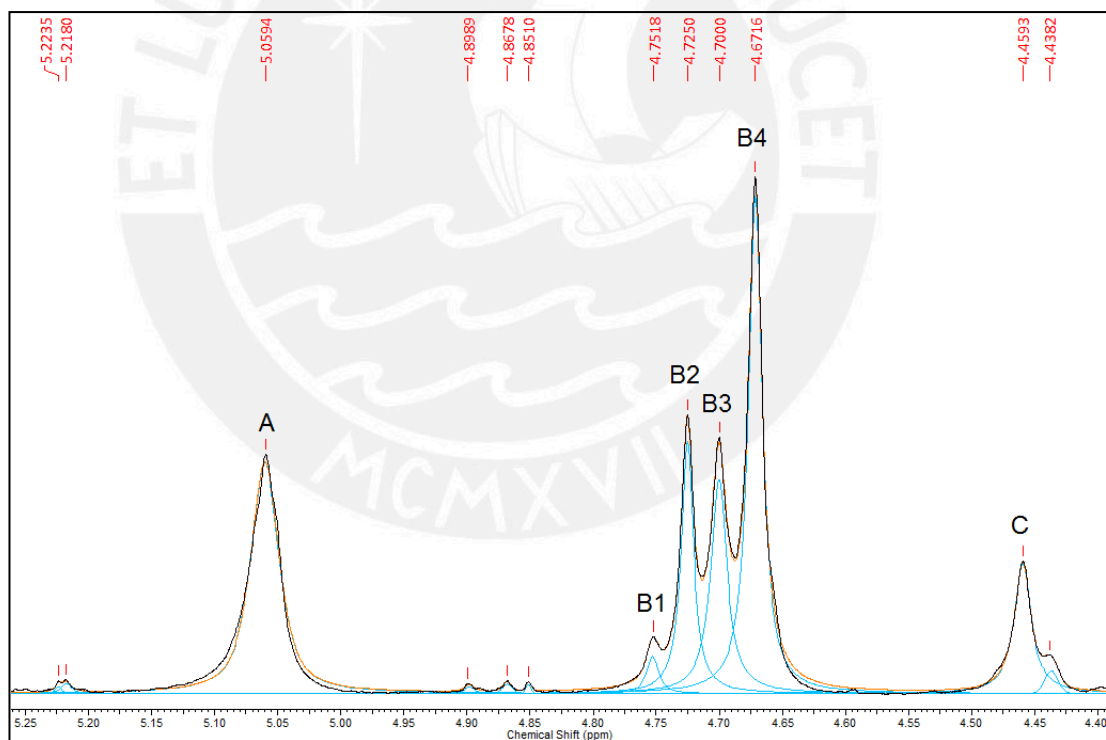
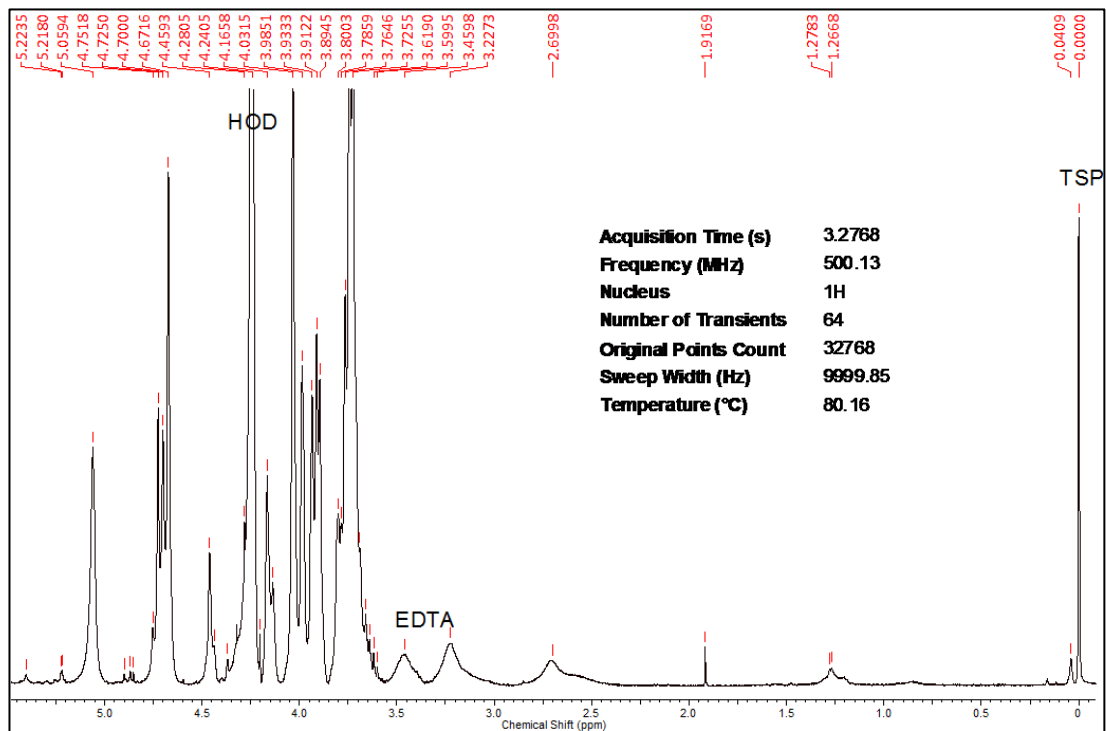


Figura 13. Espectro ^1H -RMN a 80 °C (D_2O , 500 MHz) del alginato extraído de los tallos de *Macrocystis sp.* (arriba). Resultados del ajuste de la región de interés del espectro ^1H -RMN (abajo). Concordancia del modelo = 99 %.

Tabla 13. Parámetros de composición y estructura del extracto de alginato (tallos).

Mónadas		Dúos		Tríadas		Ratio M/G	$N_{G>1}$
F_G	0,37	F_{GG}	0,15	F_{GGG}	0,13	1,72	6,7
F_M	0,63	F_{MM}	0,42	F_{MGM}	0,19		
		F_{GM}	0,21	F_{GGM}	0,03		
		F_{MG}	0,21	F_{MGG}	0,03		

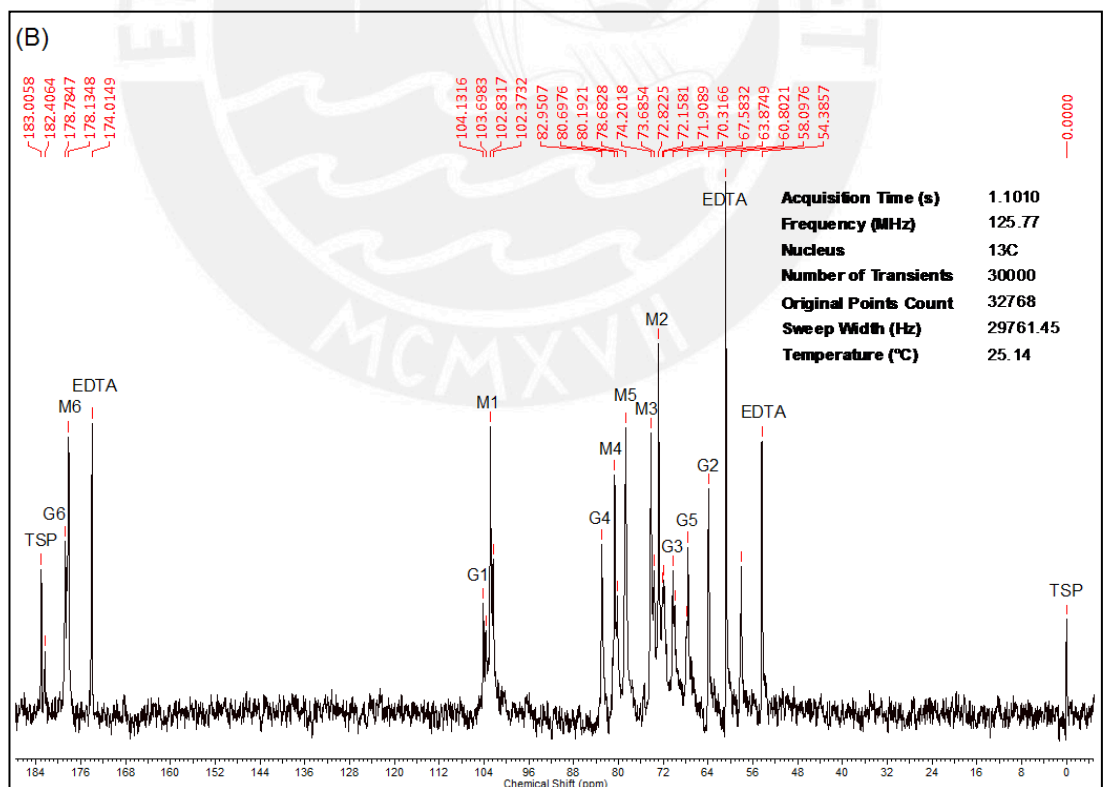
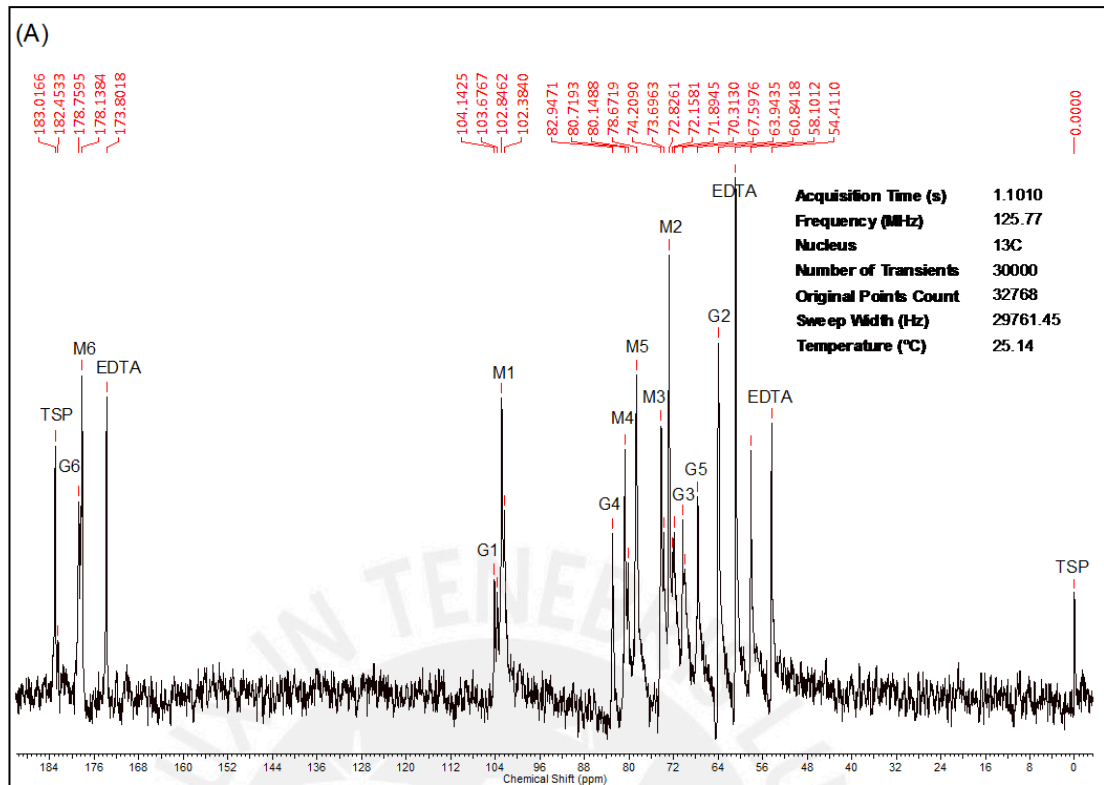
De la Tabla 13, se observa que el ratio M/G es de 1,72, lo cual indica una composición de 63 % manuronato y 37 % guluronato. Este valor es casi el mismo que para el alginato de las hojas y los bulbos. El $N_{G>1}$ indica que, en promedio, el número de unidades en una cadena homogulurónica es de 7. Al igual que en el caso de los bulbos, los tallos parecen contener alginato con cadenas homogulurónicas más largas que las hojas.

Tabla 14. Resumen de los resultados por $^1\text{H-RMN}$ de los extractos de alginato.

Parte del alga	Ratio M/G	$N_{G>1}$
Hojas	1,73	6,0
Bulbos	1,79	8,4
Tallos	1,72	6,7

En general, se observa que no existen mayores diferencias en cuanto al ratio M/G se refiere entre las diferentes partes del alga *Macrocystis sp.* Sin embargo, los bulbos y tallos parecen contener alginato con cadenas homogulurónicas más largas que las hojas (ver Tabla 14). Esto concuerda puesto que más guluronatos en secuencia permiten la formación de geles más rígidos, lo cual se refleja en la consistencia de los bulbos y los tallos.

Se obtuvo también los espectros de $^{13}\text{C-RMN}$ de los extractos de alginato (ver Figura 14).



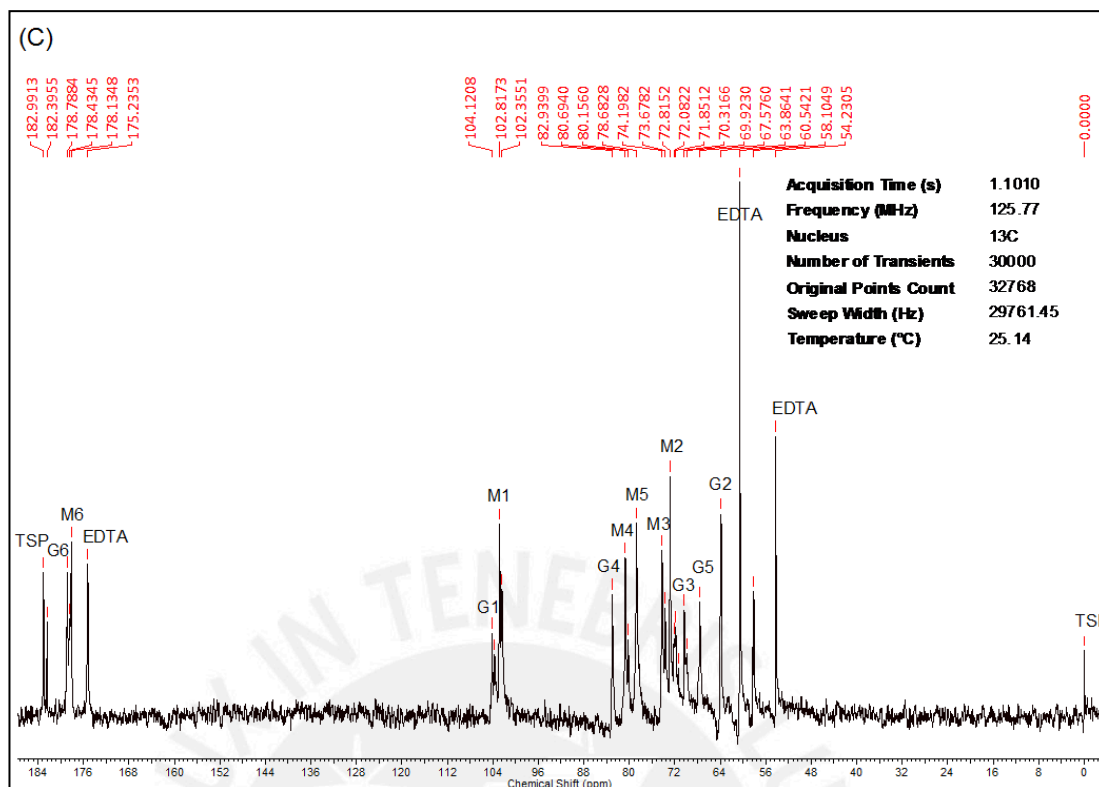


Figura 14. Espectros ¹³C-RMN (D₂O, 125,77 MHz) de los extractos de alginato de (A) hojas, (B) bulbos y (C) tallos. La letra indica si el carbono es de un manuronato (M) o de un guluronato (G), mientras que el número es referencial a la secuencia mostrada en la Figura 1.

Los carbonos 6 (δ 178 ppm) corresponden al ácido carboxílico. Los carbonos 1 (δ 104 ppm) son los anoméricos del enlace glicosídico. Estos están enlazados a dos oxígenos, por lo cual sus señales se encuentran desplazadas hacia campo bajo. Los carbonos 4 (δ 80 ppm) son aquellos que también forman el enlace glicosídico aunque, al estar enlazados solo a un oxígeno, sus señales no se encuentran tan desplazadas como la de los carbonos 1. En la zona de 70-80 ppm, se distinguen las señales del resto de carbonos de los anillos piranoides (carbonos 2, 3 y 5).¹⁷ En general, se observa que los picos correspondientes a los manuronatos son considerablemente más intensos que los picos de los guluronatos. Esto concuerda con los valores del ratio M/G hallados por ¹H-RMN.

En conclusión, el análisis por ^1H y ^{13}C -RMN indica que el extracto de alginato posee una mayor cantidad de manuronato que de guluronato, siendo el ratio M/G aproximadamente 1,75. A diferencia de lo reportado en la literatura³, no se observó mayores diferencias en cuanto al ratio M/G en función de la parte del alga de la cual se extrajo el alginato. Sin embargo, los resultados parecen indicar que los bulbos y tallos poseen cadenas homogulurónicas más largas que las hojas.

4.3 Determinación del ratio M/G por FT-IR

En principio, se obtuvo el espectro FT-IR del alginato de sodio Sigma-Aldrich (ver Figura 15). Se distinguen las siguientes bandas de absorción:²⁰

- estiramiento del O-H a 3424 cm^{-1}
- estiramiento de los C-H del anillo piranoide a 2962 y 2932 cm^{-1}
- estiramiento simétrico del COO^- a 1611 cm^{-1}
- estiramiento asimétrico del COO^- a 1416 cm^{-1}
- estiramiento del C-O a 1337 y 1299 cm^{-1}
- estiramiento C-O-C a 1094 cm^{-1}

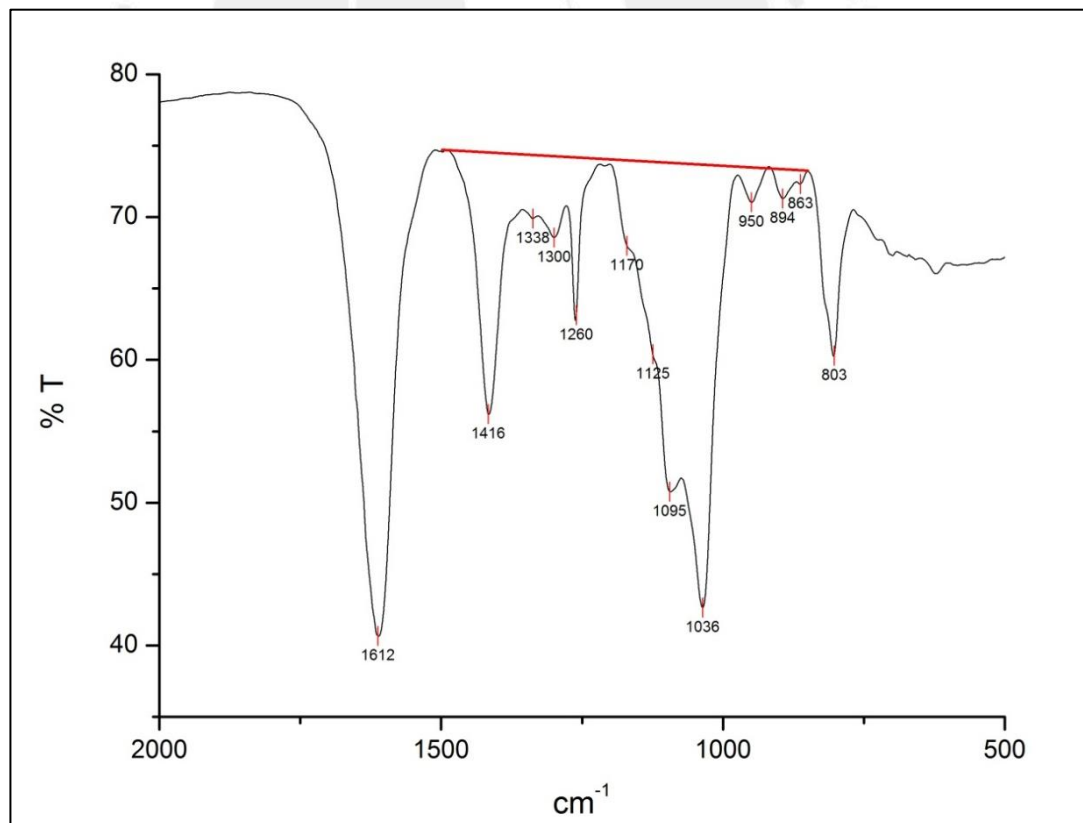
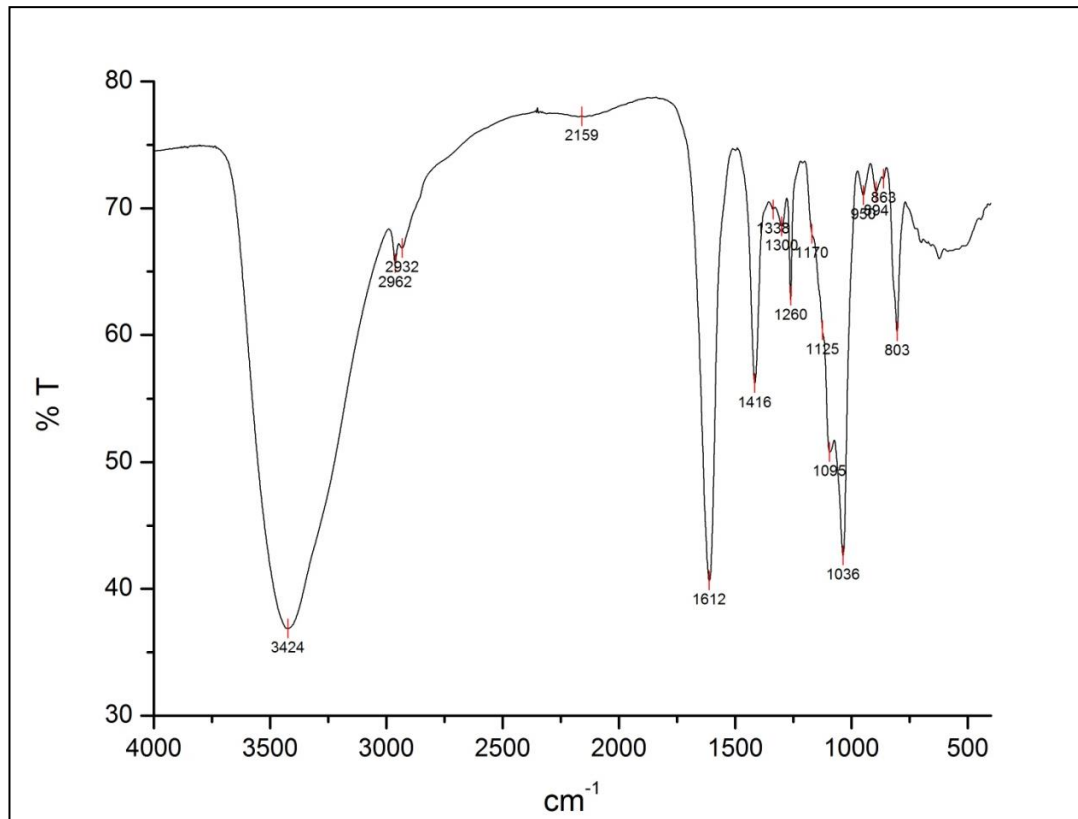


Figura 15. Espectro FT-IR del alginato de sodio Sigma-Aldrich en modo transmitancia (*arriba*) con ampliación de la zona de 2000 a 500 cm^{-1} (*abajo*). En rojo se muestra la línea base trazada para el cálculo del ratio M/G.

Para estimar el ratio M/G, el método de Filipov y Kohn¹⁹ emplea preferentemente el ratio entre las absorbancias de las bandas a 1320 y 1290 cm^{-1} (A_{1320}/A_{1290}). Ese valor se relaciona con el ratio M/G empleando la gráfica de la Figura 16, la cual dichos investigadores construyeron a partir de muestras con ratio M/G conocido.

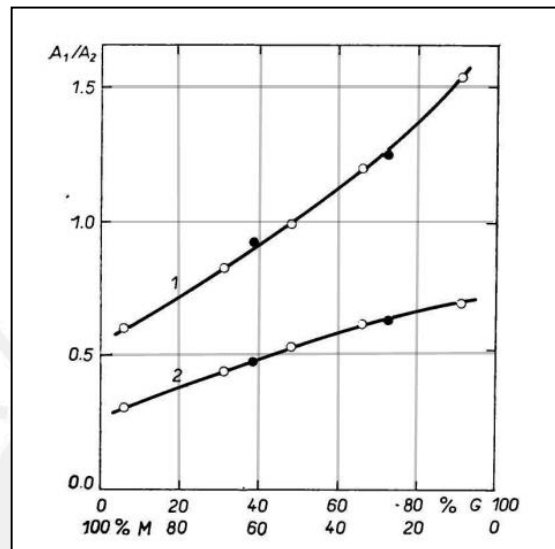
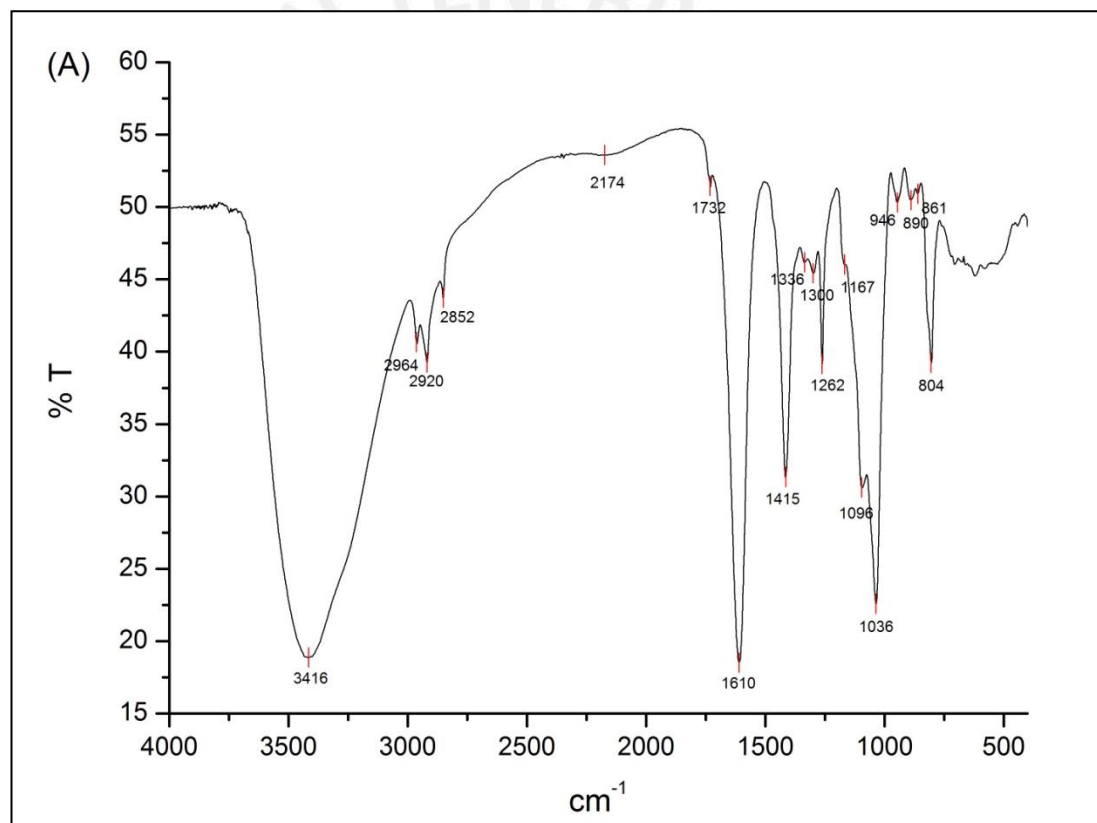


Figura 16. Relación entre el ratio de absorbancias (A_1/A_2) y la composición del alginato (ratio M/G) para (1) A_{1320}/A_{1290} y (2) A_{1125}/A_{1030} . (Tomado de la referencia 19)

En el espectro FT-IR en modo absorbancia del alginato Sigma-Aldrich, se trazó una línea base sobre los puntos de menor absorbancia a 850 y 1500 cm^{-1} . Se observó que las bandas de absorción de 1320 y 1290 cm^{-1} se encuentran desplazadas a 1338 y 1300 cm^{-1} , respectivamente (ver Figura 15). Sin embargo, la forma coincide con los picos descritos por Filipov y Kohn, por lo cual fueron empleadas para el análisis. Los valores de absorbancia para las bandas a 1338 y 1300 cm^{-1} son 0,027 y 0,034, respectivamente. El ratio de absorbancias es 0,77. Empleando la gráfica de la Figura 16, se obtiene una composición de 67 % de manuronato y 33 % guluronato, es decir, un ratio M/G de 2,03 aproximadamente. Este valor es ligeramente diferente al reportado para este producto (1,56), sin embargo, es una buena aproximación.⁴⁰

En la Figura 17, se muestran los espectros FT-IR de los extractos de alginato. Se distinguen las mismas bandas de absorción que en el alginato Sigma-Aldrich. La única diferencia apreciable es la variación en la intensidad relativa de las bandas a ~ 1260 y ~ 800 cm^{-1} respecto de las demás. En el espectro de las hojas (Figura 17A), ambas bandas poseen una intensidad relativa considerablemente mayor que en los espectros de los bulbos (Figura 17B) y tallos (Figura 17C). Como se menciona más adelante en la sección 4.8 *Análisis del residuo del pre-tratamiento del alga con ácido*, estas bandas indican la presencia de polisacáridos sulfatados. Al parecer las hojas contienen una mayor cantidad de los mismos que los bulbos y los tallos.



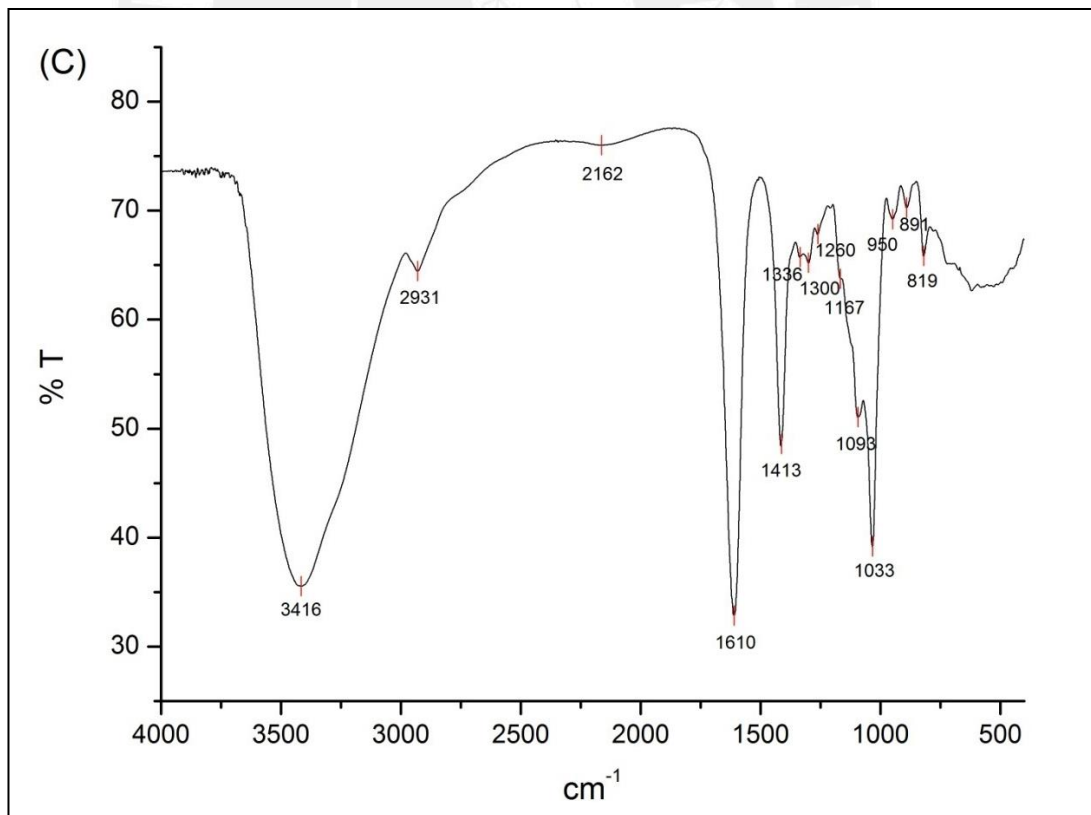
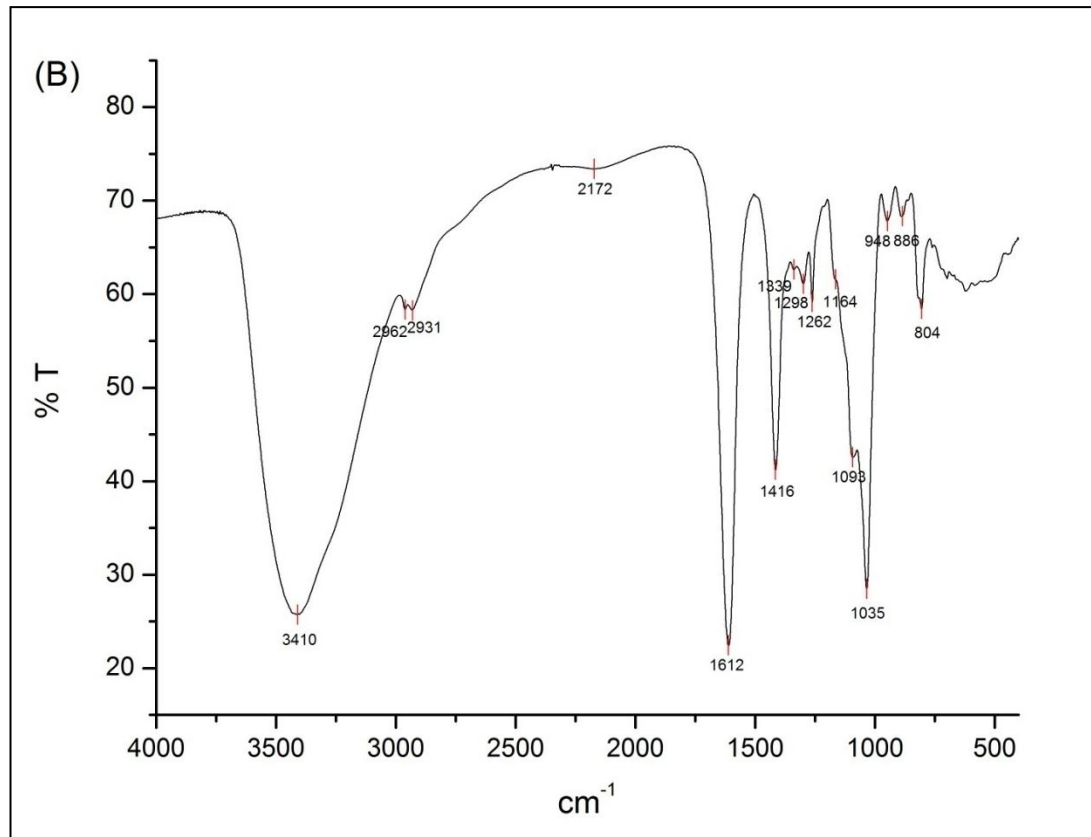


Figura 17. Espectros FT-IR de los extractos de alginato: (A) hojas, (B) bulbos y (C) tallos. Se obtuvo un solo espectro por cada muestra.

A continuación, se muestran los ratios M/G calculados siguiendo este método para los extractos de alginato.

Tabla 15. Ratio M/G de los extractos de alginato calculados por FT-IR.

Parte del alga	A ₁₃₃₈	A ₁₃₀₀	A ₁₃₃₈ /A ₁₃₀₀	Ratio M/G
Hojas	0,050	0,057	0,88	1,50
Bulbos	0,053	0,063	0,84	1,86
Tallos	0,045	0,049	0,92	1,44

Como se observa en la Tabla 15, los ratios M/G calculados son bastante cercanos entre sí, e indican una composición en el rango de 55 - 65 % manuronato y 45 - 35 % guluronato. El ratio M/G promedio es 1,60. Los tallos parecen contener una cantidad ligeramente mayor de guluronatos que las hojas y los bulbos. Esto concuerda considerablemente con los resultados obtenidos por ¹H-RMN, aunque claramente esta última técnica permite un cálculo más exacto del ratio M/G. Se comprueba entonces que se puede realizar una buena aproximación del ratio M/G de los extractos de alginato por FT-IR. La ventaja de este método radica en la facilidad y rapidez para la preparación de la muestra y en su bajo costo, a comparación del RMN. Por lo tanto, podría servir para controles rutinarios de la caracterización del alginato.

4.4 Análisis de masa molar por viscosimetría capilar

Los estudios de Martinsen *et al.* reportan que, para el alginato de *Macrocystis pyrifera* disuelto en NaCl_(aq) 0,1 M, las constantes de Mark-Houwink son $\alpha = 0,92$ y $K = 0,073 \text{ cm}^3/\text{g}$.³⁸ En la Figura 18, se muestran las ecuaciones empleadas para el cálculo de la masa molar por viscosimetría capilar. Para determinar la viscosidad intrínseca se empleó el valor promedio de la ordenada de las gráficas de Huggins y Kraemer. Luego, con esta viscosidad intrínseca se determinó la masa molar promedio en viscosidad empleando la ecuación de Mark-Houwink.

<i>Viscosidad relativa</i>	$\eta_r = \frac{t}{t_0}$
<i>Viscosidad específica</i>	$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0}$
<i>Viscosidad reducida</i>	$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$
<i>Viscosidad inherente</i>	$\eta_{inh} = \frac{\ln(\eta_r)}{c}$
<i>Método de Huggins</i>	$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right)$
<i>Método de Kraemer</i>	$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\ln(\eta_r)}{c} \right)$
<i>Ecuación de Mark – Houwink</i>	$[\eta] = KM^\alpha$

Figura 18. Ecuaciones para viscosimetría capilar.

A continuación, se muestran los resultados de viscosimetría capilar para las muestras de alginato, así como también los gráficos de Huggins y Kraemer (ver Figuras 19 – 22).

Alginato Sigma- Aldrich

[NaAlg] (g/mL)	Solvente	$2,500 \times 10^{-3}$	$2,083 \times 10^{-3}$	$1,786 \times 10^{-3}$	$1,563 \times 10^{-3}$
t_{promedio} (s)	32,78	58,45	53,13	49,64	47,18
η_r	-	1,78	1,62	1,51	1,44
η_{sp}	-	0,78	0,62	0,51	0,44
η_{red}	-	313,22	297,89	287,96	280,98
η_{inh}	-	231,33	231,74	232,35	232,94

$[\eta] = 231,07 \text{ mL/g}$

$MW = 77\,940 \text{ g/mol}$

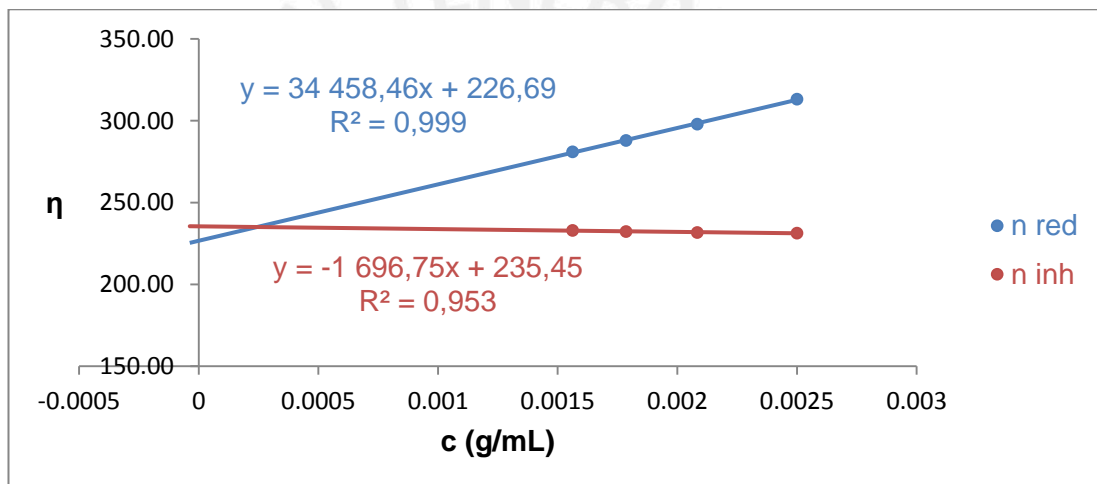


Figura 19. Resultados de viscosimetría para el alginato Sigma-Aldrich.

Extracto de alginato (hojas)					
[NaAlg] (g/mL)	Solvente	$1,00 \times 10^{-3}$	$8,33 \times 10^{-4}$	$7,14 \times 10^{-4}$	$6,25 \times 10^{-4}$
$t_{promedio}$ (s)	32,78	78,40	67,92	61,24	1,73
η_r	-	2,39	2,07	1,87	1,73
η_{sp}	-	1,39	1,07	0,87	0,73
η_{red}	-	1 391,44	1 286,11	1 215,19	1 169,53
η_{inh}	-	871,90	874,08	874,81	877,88

$[\eta] = 839,71 \text{ mL/g}$
 $MW = 316\ 867 \text{ g/mol}$

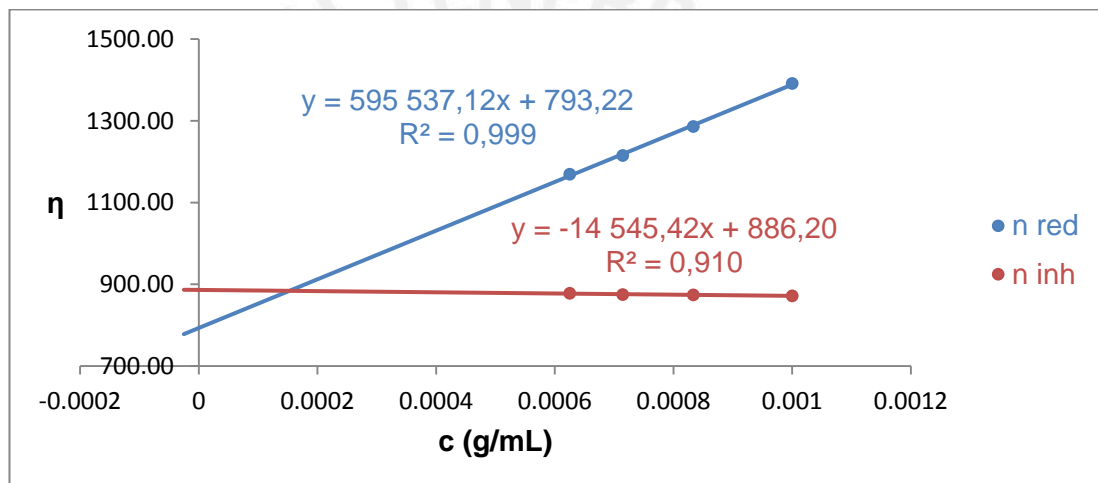


Figura 20. Resultados de viscosimetría para el extracto de alginato (hojas).

Extracto de alginato (bulbos)					
[NaAlg] (g/mL)	Solvente	$1,00 \times 10^{-3}$	$8,33 \times 10^{-4}$	$7,14 \times 10^{-4}$	$6,25 \times 10^{-4}$
t_{promedio} (s)	32,78	98,43	83,01	73,32	66,59
η_r	-	3,00	2,53	2,24	2,03
η_{sp}	-	2,00	1,53	1,24	1,03
η_{red}	-	2 002,59	1 838,57	1 731,08	1 650,03
η_{inh}	-	1 099,48	1 114,88	1 126,87	1 133,86

$[\eta] = 1\,126,46 \text{ mL/g}$
 $MW = 436\,071 \text{ g/mol}$

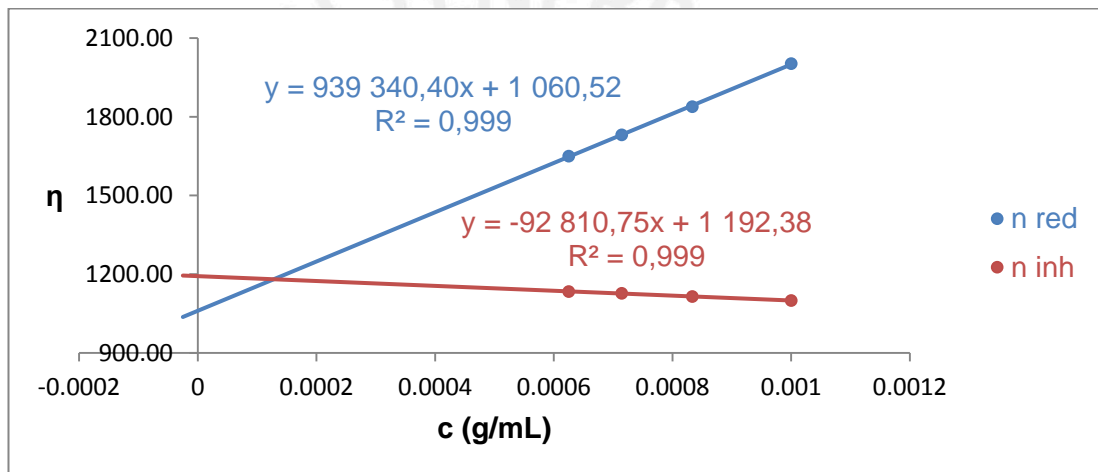


Figura 21. Resultados de viscosimetría para el extracto de alginato (bulbos).

Extracto de alginato (tallos)					
[NaAlg] (g/mL)	Solvente	1,00 x 10 ⁻³	8,33 x 10 ⁻⁴	7,14 x 10 ⁻⁴	6,25 x 10 ⁻⁴
t promedio (s)	32,78	101,90	85,37	75,13	68,00
η _r	-	3,11	2,60	2,29	2,07
η _{sp}	-	2,11	1,60	1,29	1,07
η _{red}	-	2 108,21	1 924,96	1 808,27	1 718,97
η _{inh}	-	1 134,05	1 148,42	1 160,96	1 167,44
[η] = 1 146,49 mL/g					
MW = 444 506 g/mol					

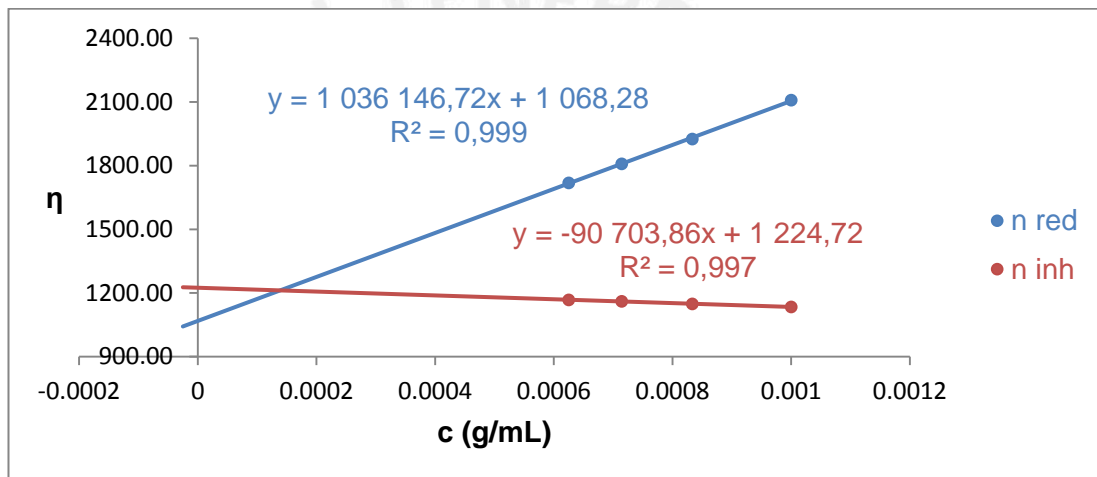


Figura 22. Resultados de viscosimetría para el extracto de alginato (tallos).

En general, se observó una buena correlación lineal entre la concentración de alginato y la viscosidad de la solución. El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 16. Se observa que el alginato Sigma-Aldrich tiene una masa molar menor que los extractos de alginato de *Macrocystis sp.* El productor reporta que la masa molar de dicho producto se encuentra en el rango de 120 000 – 190 000 g/mol⁴⁰, sin embargo, no se reporta el método de medición. Aun así el valor obtenido es relativamente cercano. Además, considerando el hecho de que la muestra de alginato fue sometida a una purificación previa, es posible una variación en la masa molar. Otro factor a considerar es que tampoco se conoce la especie de alga de la cual se extrajo el alginato, por lo cual los coeficientes de Mark-Houwink empleados podrían no ser los apropiados. Por otro lado, los extractos de alginato obtenidos de la *Macrocystis sp.* tienen una masa molar considerablemente mayor. Los extractos

de tallos y bulbos parecen tener masas molares similares entre sí, pero mayores que la de las hojas.

Tabla 16. Viscosidad intrínseca y masa molar promedio de las muestras de alginato.

Alginato	$[\eta]$ (mL/g)	MW (g/mol)
Sigma-Aldrich	231,07	77 940
Hojas	839,71	316 867
Bulbos	1 126,46	436 071
Tallos	1 146,49	444 506

4.5 Análisis de masa molar por cromatografía de permeación en gel (GPC)

El análisis por GPC permitió determinar la distribución de masas molares de las muestras de alginato. En primer lugar, se realizó una curva de calibración convencional empleando estándares Malvern Viscotek PolyCAL de óxido de polietileno (PEO). Se empleó cinco estándares en el rango de 6 000 – 1 000k Da (ver Tabla 17).

Tabla 17. Datos de los estándares Malvern Viscotek PolyCAL de PEO reportados por el fabricante.

	1 000k	600k	270k	65k	6 000
M_p (Da)	1 001 000	610 000	258 000	65 000	6 100
M_n (Da)	886 000	594 000	243 750	62 800	6 000
M_w (Da)	992 000	630 000	270 000	66 600	6 200
PDI*	1,120	1,061	1,108	1,061	1,033

*PDI = índice de polidispersión (M_w/M_n)

El índice de polidispersión (PDI) de los estándares es cercano a 1, lo cual indica uniformidad de las cadenas poliméricas. Como se observa en la Figura 23, los polímeros de mayor masa molar aparecen a menor volumen de retención, debido a su menor interacción con los poros de la columna. El pico a 9,95 mL aparece en todos los cromatogramas, y corresponde al solvente. Este se produce debido a ligeras variaciones de la concentración de sales entre la muestra y la fase móvil. Como no se disponía de suficiente estándar, no se pudo determinar la viscosidad intrínseca de los estándares para así construir la curva de calibración universal. El procesamiento de los cromatogramas de las muestras en OmniSEC se basó en una interpolación de la curva de calibración convencional para determinar los parámetros de las distribuciones. Por lo tanto, la medición por GPC solo permitió determinar las masas molares relativas de las muestras de alginato y su distribución, más no los valores exactos de sus masas molares (M_n , M_w , M_p).

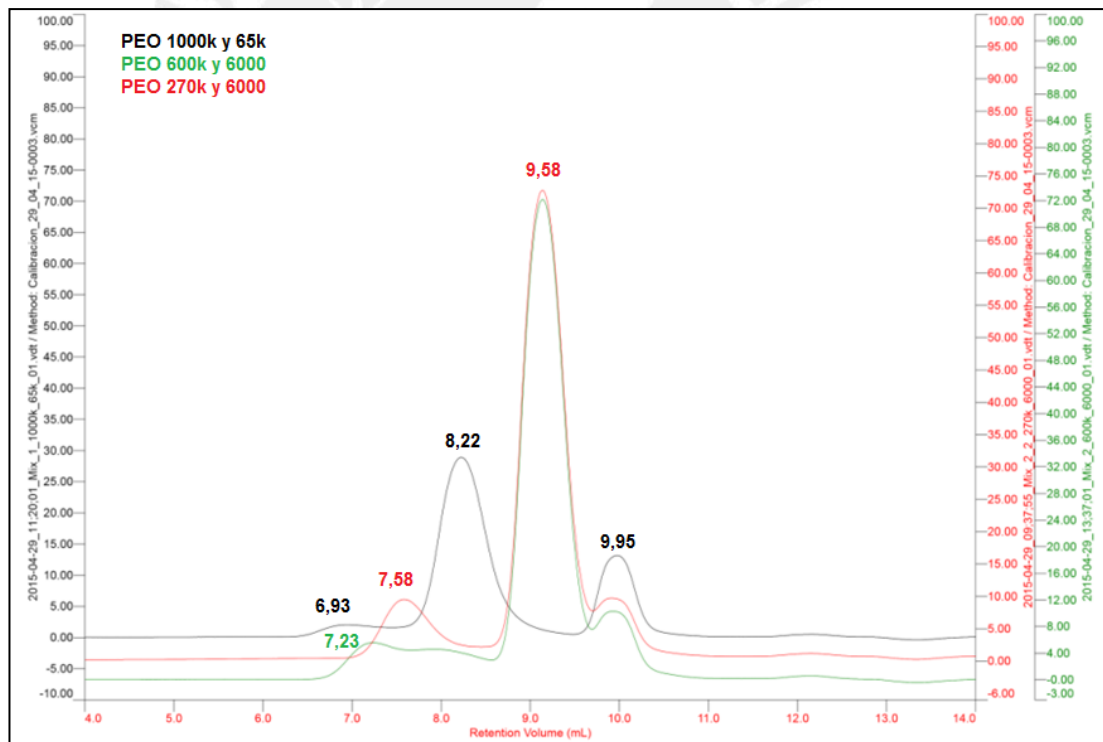
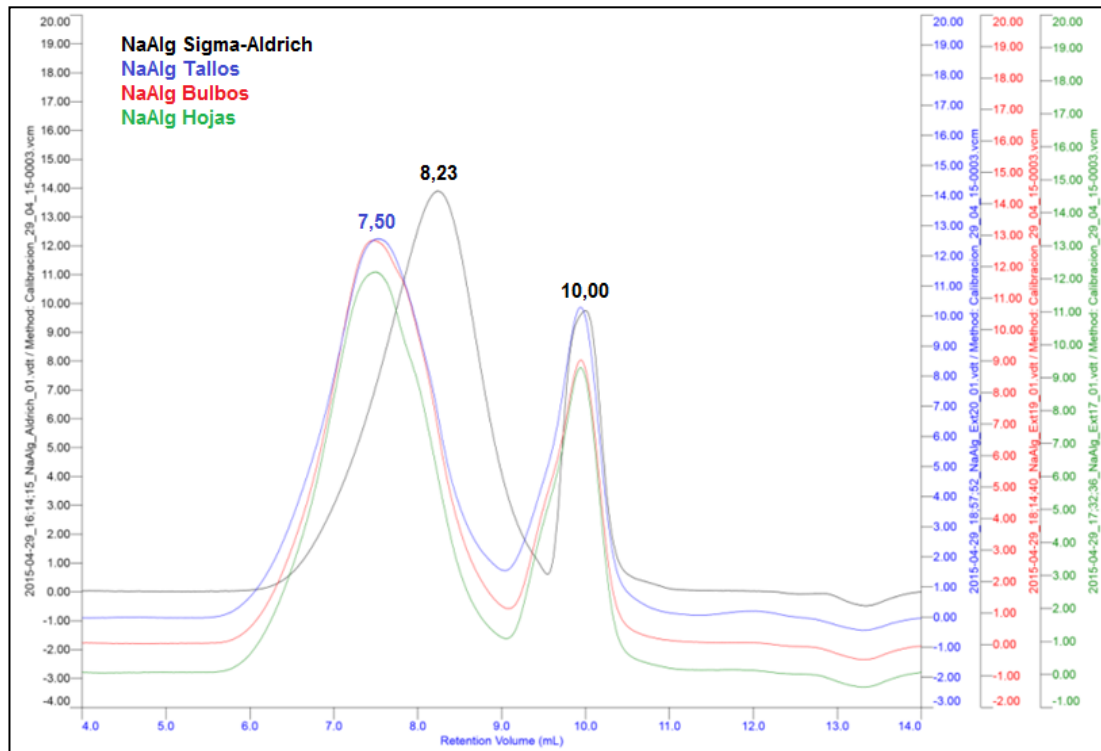


Figura 23. Cromatogramas de los estándares de PEO (fase móvil Na_2SO_4 0,05 M y EDTA 0,01 M, flujo 0,5 mL/min, $T = 35^\circ\text{C}$).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para las muestras de alginato analizadas (ver Figura 24).



	Sigma-Aldrich	Hojas	Bulbos	Tallos
M_p (Da)*	60 551	333 755	347 107	301 286
M_n (Da)	33 054	121 229	112 708	111 415
M_w (Da)	209 328	600 805	563 823	593 321
PDI	6,333	4,956	5,002	5,325

*M_p es la masa molar correspondiente al pico de la muestra en el cromatograma.

Figura 24. Cromatogramas de las muestras de alginato (fase móvil Na₂SO₄ 0,05 M y EDTA 0,01 M, flujo 0,5 mL/min, T = 35 °C) y resultados del análisis de distribución de masas molares.

Como se observa en la Figura 24, el alginato Sigma-Aldrich sale a un volumen de retención de 8,23 mL, mientras que los extractos de alginato de *Macrocystis sp.* salen a un mismo volumen de retención de aproximadamente 7,50 mL. Se comprueba así que el alginato Sigma-Aldrich tiene una masa molar promedio

considerablemente menor a la de los extractos de alginato, lo cual concuerda con los resultados de viscosimetría capilar.

Los extractos de alginato de las tres partes del alga tienen la misma distribución de masas molares, lo cual no concuerda con los resultados de viscosimetría capilar, puesto que allí se observó una mayor viscosidad intrínseca para el alginato de bulbos y tallos. La diferencia más importante entre ambos métodos fue que en el GPC se empleó un agente quelante de cationes divalentes, *i.e.* EDTA, en la fase móvil. La interacción de estos cationes podría incrementar la viscosidad de la solución al entrecruzar cadenas de alginato, generando así agregados que presentan una mayor masa molar. Para comprobar esta hipótesis, se midió la viscosidad de las soluciones de alginato Sigma-Aldrich y de los extractos de hojas y tallos empleando como solvente NaCl 0,1M y EDTA 0,01 M (ver Tabla 18).

Tabla 18. Prueba de viscosidad de soluciones de alginato con EDTA.

Alginato				
c (%)	Blanco	Sigma-Aldrich 0,25 %	Hojas 0,1 %	Tallos 0,1 %
t1*	32,92	59,14	78,90	91,85
t2	32,95	59,16	78,91	91,81
t3	32,95	59,17	78,90	91,80
t4	32,94	59,17	78,92	91,84
t_{prom}	32,94	59,16	78,91	91,83
η_{sp}	-	0,80	1,40	1,79

*Los tiempos se reportan en segundos.

Al comparar las viscosidades específicas de la Tabla 18 con las obtenidas anteriormente en la sección de viscosimetría capilar (ver Figuras 19 - 22), se observa que solo en el caso de los tallos existe una disminución del 10 %. Esto parece indicar que los tallos contienen una cantidad significativa de cationes divalentes, los cuales no fueron eliminados completamente durante el proceso de purificación e interfieren con la medición de masa molar por viscosimetría capilar. Se presume que en el caso de los bulbos sucede lo mismo. Esta situación tiene sentido considerando que tanto bulbos como tallos tienen una consistencia física

mucho más rígida que las hojas, lo cual puede deberse a una mayor cantidad de cationes divalentes que generan mayor entrecruzamiento iónico.

En general, los PDI de las muestras de alginato son bastante altos, indicando así una amplia dispersión de masas molares. Sin embargo, el PDI de los extractos de alginato es ligeramente menor que el del alginato Sigma-Aldrich. En este tipo de polímeros de origen natural es esperable una amplia dispersión.⁴¹ Además, hay que considerar el hecho de que la extracción en medio alcalino rompe las cadenas poliméricas parcialmente, lo cual incrementaría la dispersión por la formación de fragmentos de menor masa molar.

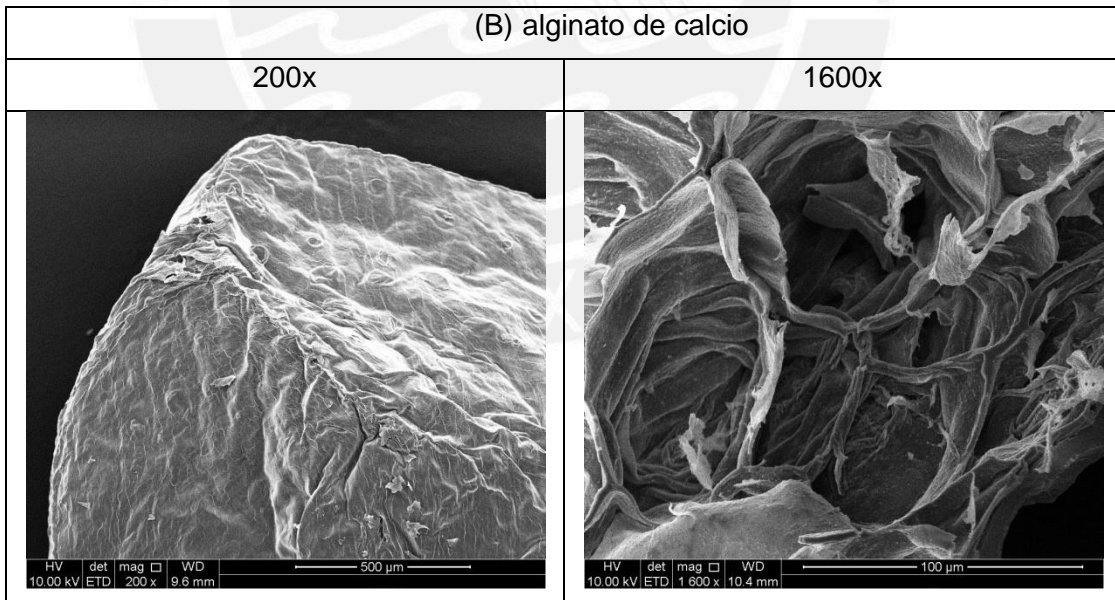
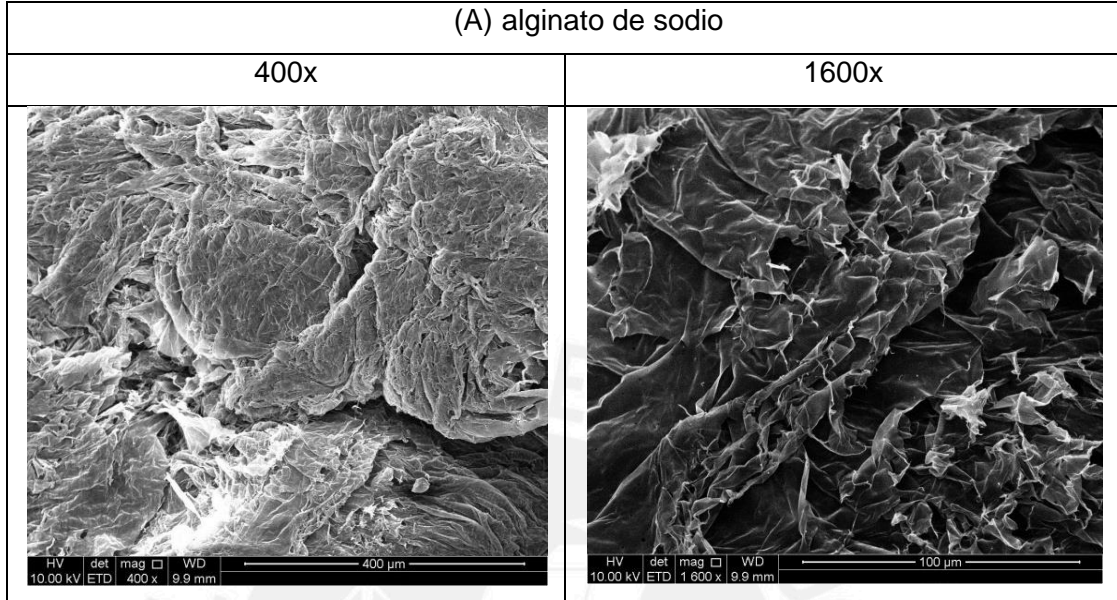
4.6 Estudio del alginato por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las aplicaciones del alginato se relacionan principalmente con su capacidad para formar geles, por lo cual se realizó un estudio morfológico del alginato de sodio y sus derivados, así como también un estudio de su proceso de gelificación por entrecruzamiento iónico.

4.6.1 Morfología del alginato de sodio y sus derivados

El alginato se comercializa comúnmente como su sal de sodio, sin embargo existen diversos derivados de importancia entre los cuales se encuentran alginato de calcio y el ácido algínico. Las imágenes por SEM en la Figura 25 muestran que efectivamente existen diferencias morfológicas entre el alginato de sodio y sus derivados. Comparando las imágenes a magnificación de 1600x de las Figuras 25(A) y 25(B), se observa que la presencia del catión Ca^{2+} , divalente, genera una estructura menos compacta que el catión Na^+ , monovalente, pues el alginato de sodio tiene una estructura con forma de láminas plegadas, mientras que el interior de la perla de alginato de calcio posee una estructura porosa amorfa. Por otro lado, la Figura 25(C) muestra que el ácido algínico tiene forma de láminas lisas, muy

diferente a la de las sales metálicas. Esto tiene sentido puesto que la ausencia de cationes permite que el polímero se expanda.



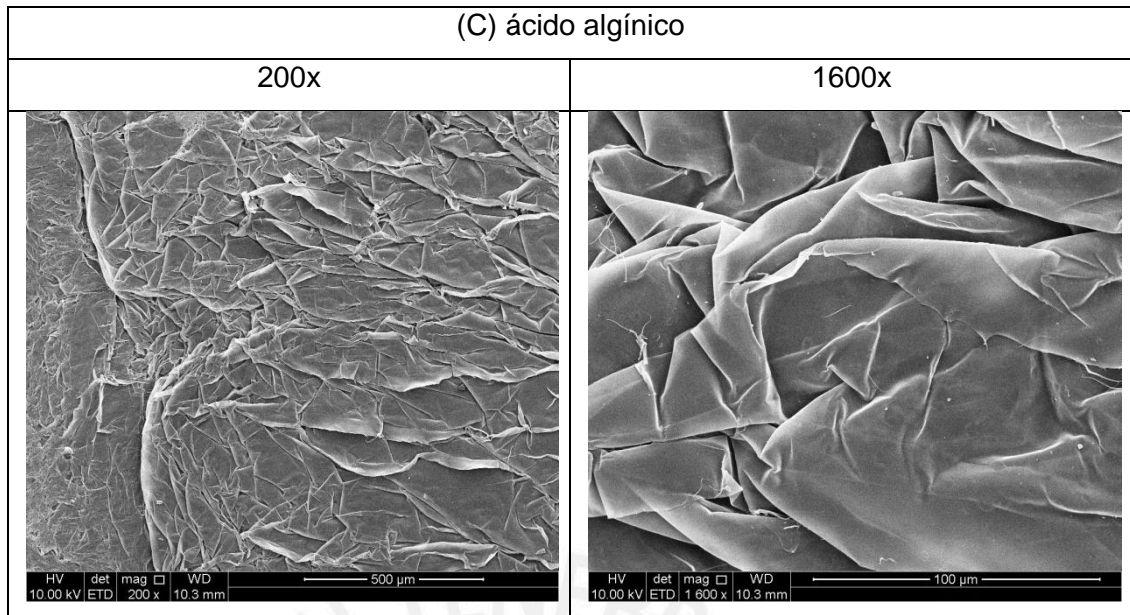


Figura 25. Imágenes SEM del (A) alginato de sodio, (B) alginato de calcio y (C) ácido algínico, liofilizados.

4.6.2 Estudio del proceso de gelificación del alginato de sodio por entrecruzamiento iónico

El alginato de sodio precipitó en forma de perlas en soluciones acuosas de cationes multivalentes, Ca^{2+} y Cu^{2+} . Como se observa en la Figura 26, el proceso de gelificación es considerablemente rápido. Al instante en que se agrega la gota de alginato de sodio a la solución de calcio, los cationes Ca^{2+} rápidamente entrecruzan las cadenas poliméricas en la superficie de la perla, fijando así su forma esférica. Al principio, las perlas son transparentes, pero a medida que transcurre el tiempo, se van tornando más opacas. Esto se debe a que los cationes Ca^{2+} van difundiendo paulatinamente hacia el interior de la perla. Para comprobar esto, una perla se cortó transversalmente al minuto de iniciada la gelificación, y se observó que el interior aún estaba líquido, solo la superficie había gelificado.

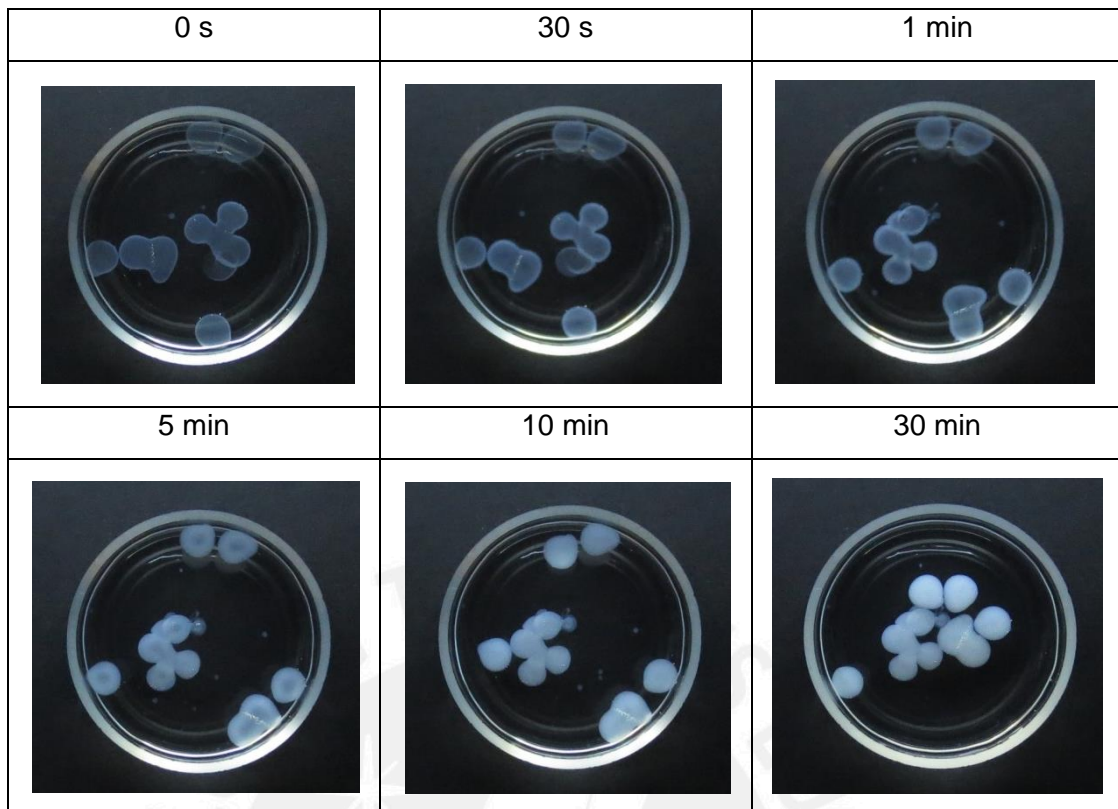


Figura 26. Proceso de gelificación de perlas de alginato de sodio en CaCl_2 (ac).

Al emplear una solución de sulfato de cobre, se observó el mismo proceso de gelificación que en el caso del calcio (ver Figura 27), sin embargo, la gelificación con calcio parece ser un poco más rápida. Si se compara la opacidad de las perlas en las imágenes a 5 min de iniciada la gelificación, se observa que la proporción gel : solución es mayor en el alginato de calcio que en el alginato de cobre. Esto comprueba que la afinidad del alginato por el catión gelificante afecta la dinámica del proceso. Un factor a considerar sería el radio iónico del catión. Asumiendo un número de coordinación 6, el radio del Cu^{2+} es 0,73 Å, mientras que el del Ca^{2+} es 1 Å.⁴² Según el modelo de la “caja de huevos” (“egg-box” model), los guluronatos tienen un efecto quelante sobre los cationes divalentes, por lo cual el tamaño del catión afectaría la conformación que adoptan las cadenas de alginato que lo rodean.¹ Otros factores involucrados podrían ser la densidad de carga del catión o la afinidad de sus orbitales para formar enlaces de coordinación con los carboxilatos.⁴³

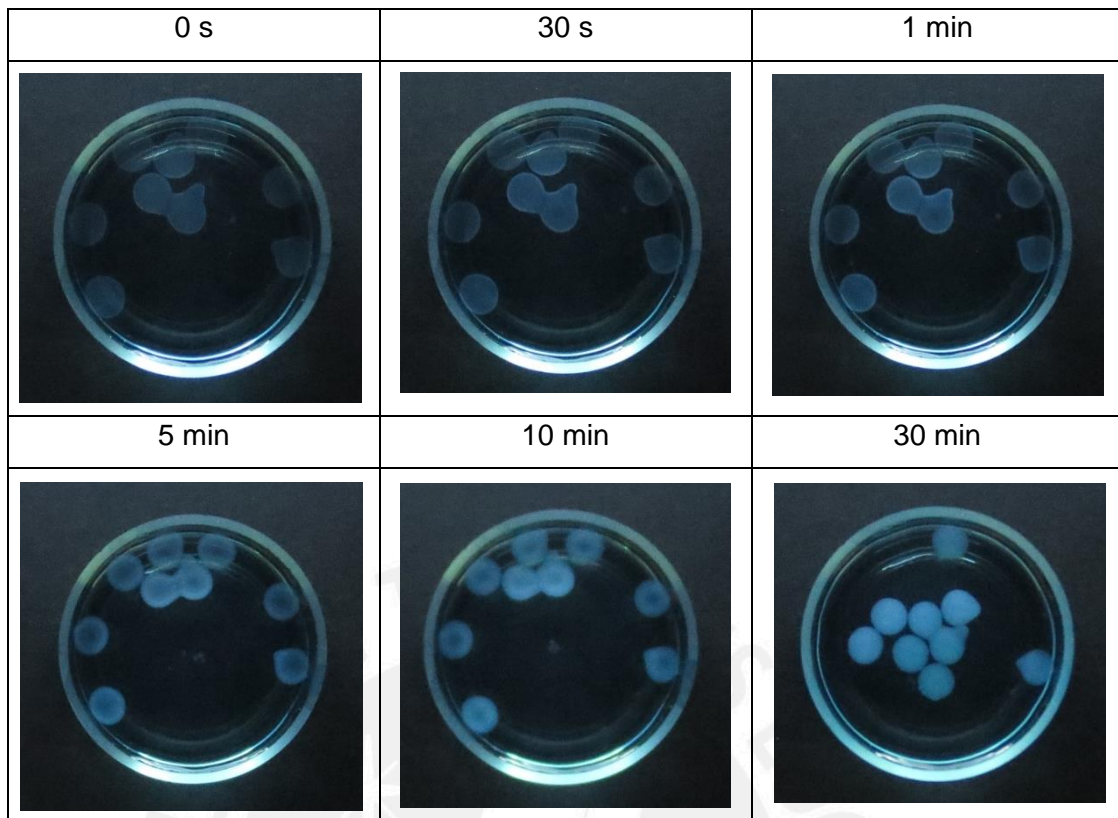


Figura 27. Proceso de gelificación de perlas de alginato de sodio en CuSO_4 (ac).

Con ayuda de las imágenes del SEM, se comparó la morfología de las secciones transversales de las perlas de $\text{Ca}(\text{Alg})_2$ y $\text{Cu}(\text{Alg})_2$, a 1 min y 30 min de iniciada la gelificación en ambos casos.

A 1 min de iniciada la gelificación, las perlas de alginato no gelificaron completamente, por lo cual, en las Figuras 28(A) y 29(A), se distinguen dos áreas morfológicamente diferentes. El área externa, que ha gelificado, tiene una estructura rugosa y porosa. Por el contrario, el área más interna de la perla tiene una estructura más compacta, como de láminas arrugadas. Comparando las Figuras 28(A) y 25(A), se observa que la topografía del área más interna es la del alginato de sodio. Cabe resaltar también que, como se mencionó antes, la gelificación con Ca^{2+} parece proceder con mayor rapidez que con Cu^{2+} . Si se compara la distancia radial del área gelificada en comparación al diámetro de la perla en las Figuras 28(A) y 29(A), se observa que, proporcionalmente, el calcio ha avanzado más que el cobre. Por otro lado, a 30 min de iniciada la gelificación, en

ambos casos las perlas de alginato gelificaron casi por completo. En las Figuras 28(B) y 29(B), se observan estructuras porosas en ambas secciones transversales. Sin embargo, la gelificación con calcio genera una forma como de láminas entrecruzadas, mientras que la gelificación con cobre genera una forma de láminas apiladas.

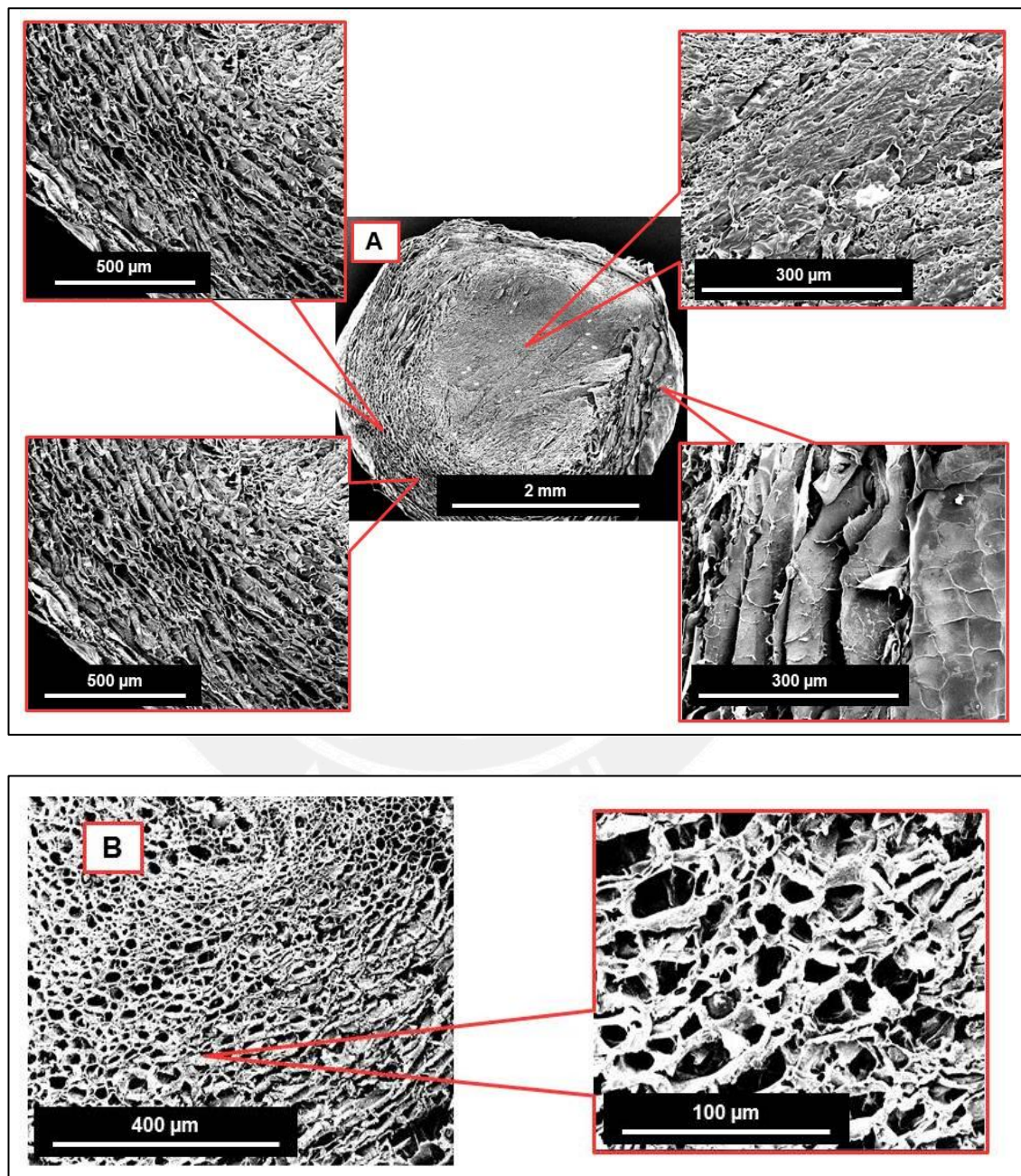


Figura 28. Secciones transversales de las perlas de alginato de calcio, a (A) 1 min y a (B) 30 min de iniciada la gelificación. En los cuadrados rojos se muestran las magnificaciones de ciertas áreas de las perlas.

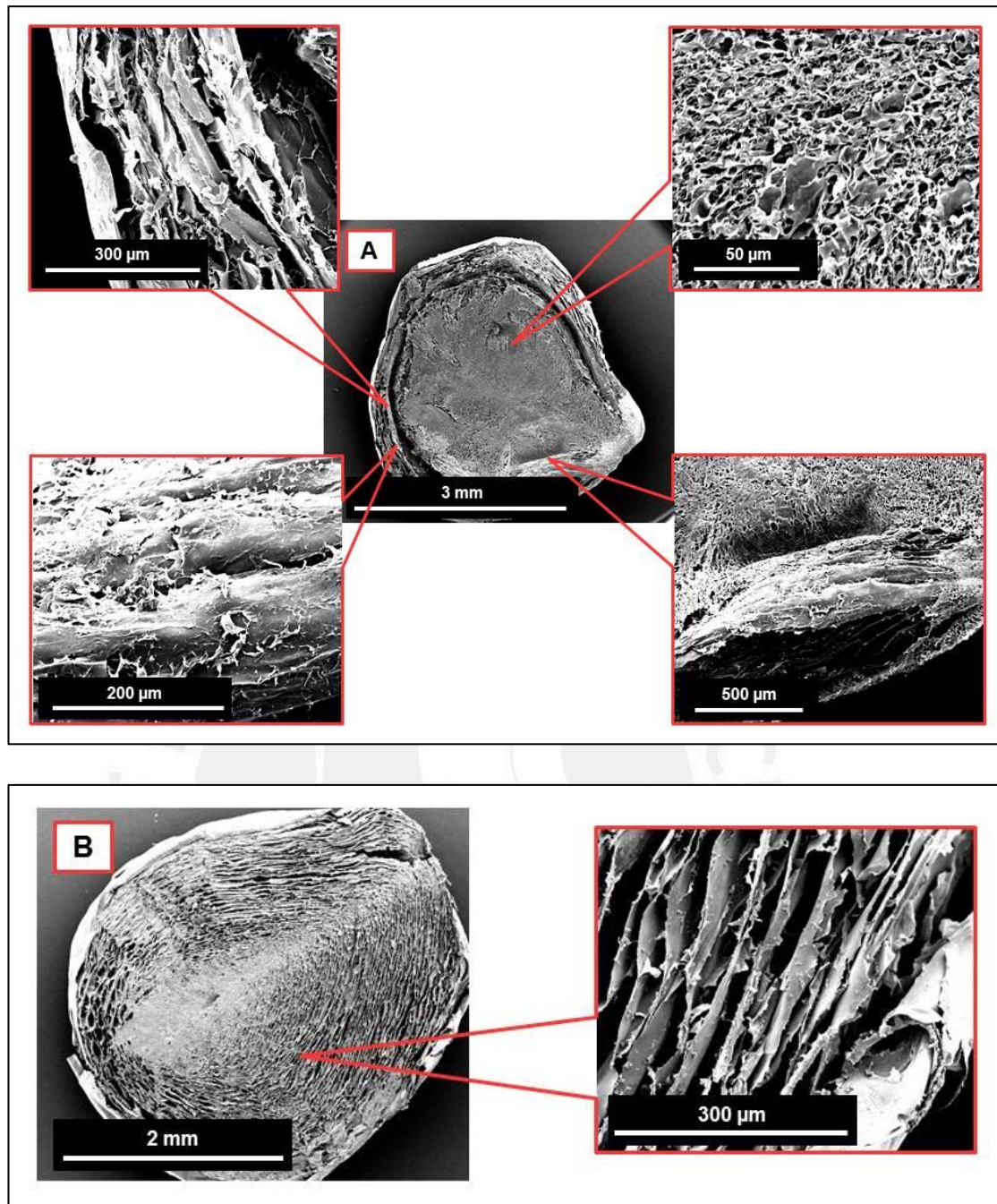


Figura 29. Secciones transversales de las perlas de alginato de cobre, a (A) 1 min y a (B) 30 min de iniciada la gelificación. En los cuadrados rojos se muestran las magnificaciones de ciertas áreas de las perlas.

Finalmente, se realizó un análisis por SEM-EDS de las secciones transversales de las perlas de $\text{Cu}(\text{Alg})_2$. La elección del Cu^{2+} se debió a que, al ser un catión atípico en el alginato, fue sencillo determinar su presencia por EDS. En las Figuras 30(A) y 31(A) ($\text{Cu}(\text{Alg})_2$ a 1 min), se observa que efectivamente el cobre es el responsable de la gelificación y la estructura porosa en la zona radialmente más externa de la perla de alginato. El escaneo de línea y el mapeo muestran la presencia de cobre solamente en dicha zona. El escaneo del carbono se realizó para corroborar que la intensidad de la señal del cobre no se debió a efectos morfológicos. Se observa claramente que la señal del carbono es considerablemente constante. Por otro lado, en las Figuras 30(B) y 31(B), se observa que a los 30 min el cobre se encuentra presente en toda la perla de alginato, tanto el escaneo de línea como el mapeo lo confirman. Este estudio confirma que la gelificación del alginato procede por difusión de los cationes multivalentes hacia el seno de la perla de alginato.⁴⁴

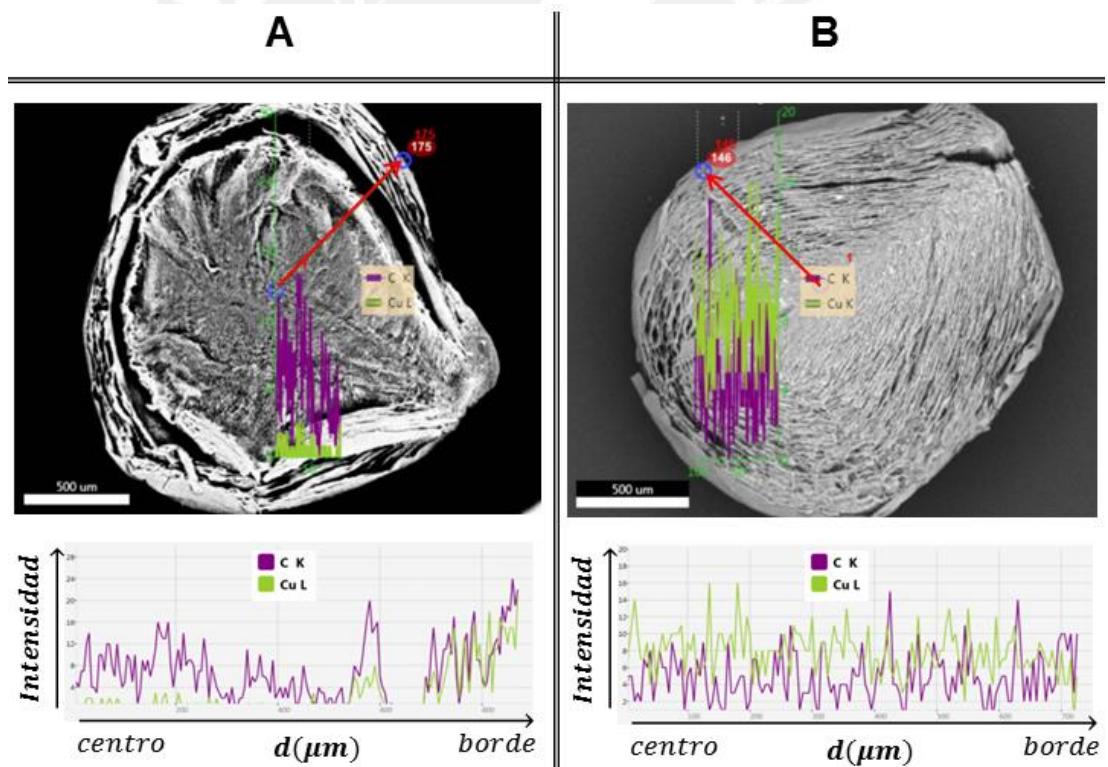


Figura 30. Escaneo de línea por SEM-EDS en las secciones transversales de las perlas de alginato de cobre, a 1 min (A) y a 30 min (B) de iniciada la gelificación. Se muestra una imagen referencial de la perla de $\text{Cu}(\text{Alg})_2$, donde se observa el escaneo de línea (flecha roja) para los elementos C y Cu. Luego, se muestra el gráfico de distancia (μm) vs intensidad de señal para cada elemento.

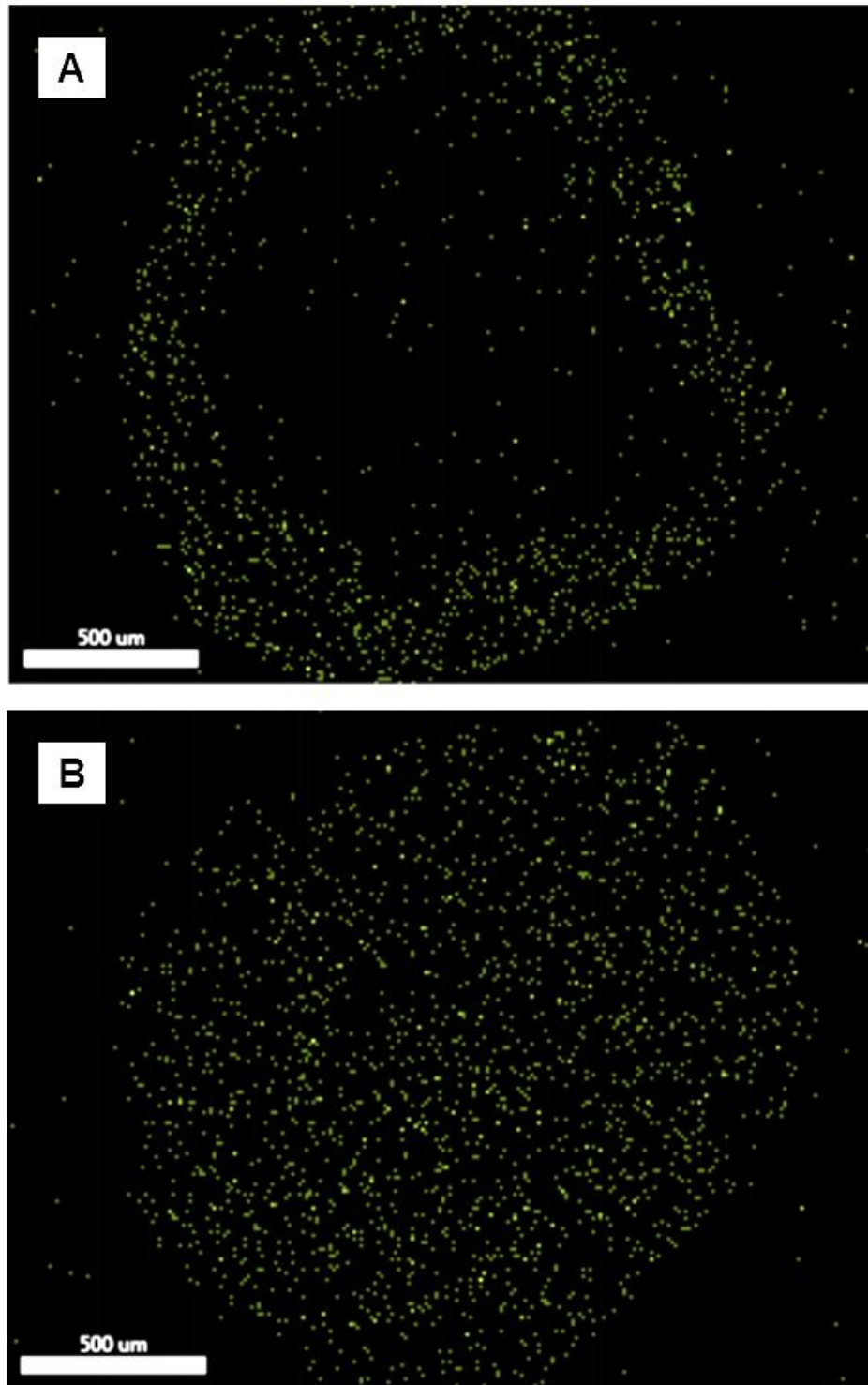


Figura 31. Mapeo del cobre por SEM-EDS en las secciones transversales de las perlas de alginato de cobre, a 1 min (A) y a 30 min (B) de iniciada la gelificación.

4.7 Degradación de alginato en medio alcalino asistida por microondas

El uso de radiación microondas para síntesis química y extracciones es una técnica relativamente novedosa que ha tomado gran cabida debido a la facilidad de uso así como a los reducidos tiempos de reacción que se manejan. A diferencia del método usual de calentamiento por conducción y convección, la radiación microondas penetra directamente en el medio de reacción, generando focos de calentamiento uniformemente distribuidos haciendo más eficiente el proceso. Estos se producen debido a la rotación dipolar de los solventes polares y a la migración de iones producto de la aplicación del campo electromagnético. Ambos procesos favorecen la rápida transferencia de masa y energía, lo cual a su vez facilita el proceso de calentamiento y reacción.³⁵

Se estudió el efecto de la degradación en medio alcalino asistida por microondas sobre la masa molar del alginato. Se analizó las variables tiempo de calentamiento y temperatura de reacción. Previamente, se ha reportado la aplicación de microondas para la hidrólisis de alginato en medio ácido, obteniéndose resultados favorables.²⁵ El medio ácido es comúnmente usado para la degradación de polisacáridos pues permite la fácil ruptura de los enlaces glicosídicos por adición de una molécula de agua. Por otro lado, se sabe que el alginato también es susceptible a la degradación por base, por lo cual resulta pertinente un estudio análogo al reportado pero en medio alcalino. La elección de hidróxido de sodio se debe a que no genera productos gaseosos que pudiesen generar sobrepresión en un medio de reacción cerrado. Los resultados del estudio se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Medición de viscosidad del alginato degradado.

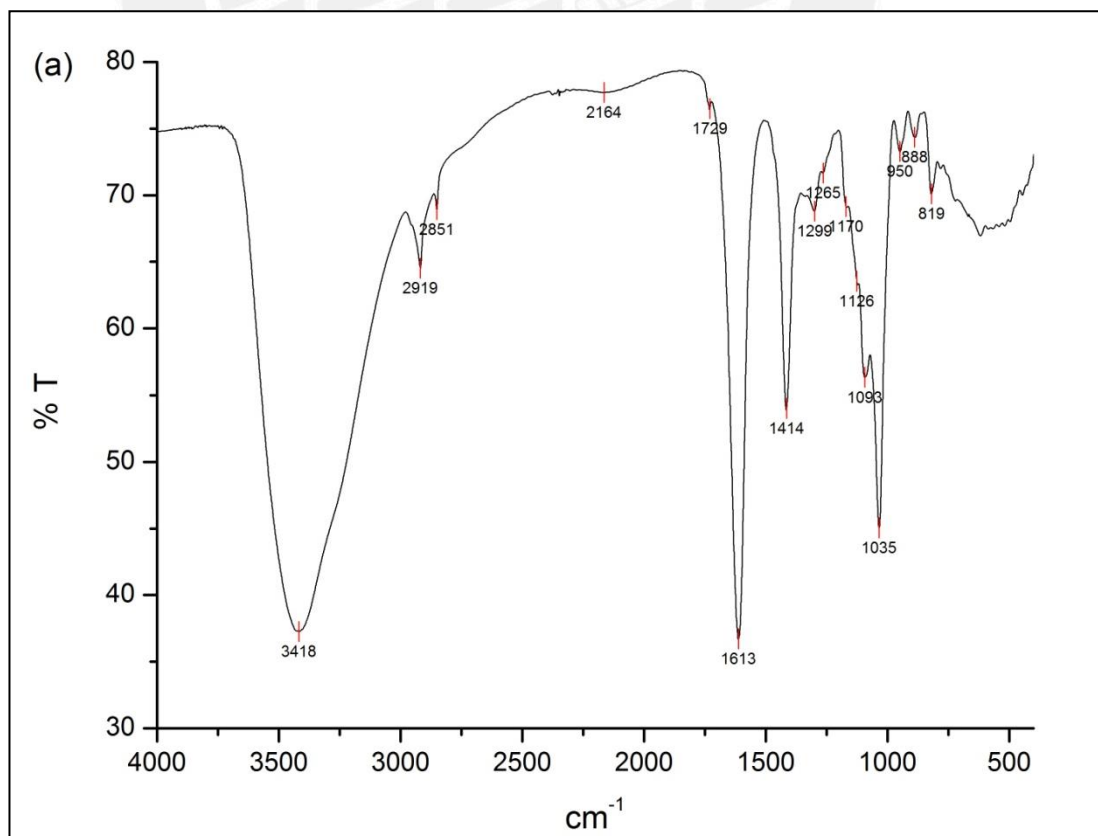
(a) Variable: tiempo de calentamiento					
	solvente	A (0 min)	B (5 min)	C (10 min)	D (intermitente)
Tiempo (s)	32,90	97,79	81,57	73,77	75,37
σ (s)	0,05	0,22	0,15	0,09	0,09
η relativa	-	2,97	2,48	2,24	2,29

(b) Variable: temperatura de reacción					
	solvente	E (25 °C)	F (100 °C)	G (115 °C)	H (130 °C)
Tiempo (s)	32,90	91,17	71,77	56,23	43,27
σ (s)	0,05	0,10	0,14	0,07	0,03
η relativa	-	2,77	2,18	1,71	1,32

Al comparar las viscosidades relativas de las soluciones de control A y E, se observa que efectivamente el alginato en la solución se degradó espontáneamente en el lapso de una semana. En la sección (a) de la Tabla 19, se observa que un mayor tiempo de calentamiento conduce a una disminución de la viscosidad de la solución de alginato, es decir, a una menor masa molar promedio. Sin embargo, no parece haber una relación directamente proporcional entre el tiempo de calentamiento y la viscosidad. En los casos **B** y **C**, una vez que la solución llegaba a la temperatura fijada, la potencia de la radiación microondas disminuía considerablemente puesto que solo se necesitaba mantener la temperatura estable (ver Perfil de calentamiento en Figura 6). En el caso **D**, se empleó un programa de calentamiento intermitente, puesto que de esta forma la solución estaría sometida a una radiación más potente por el mismo tiempo que en el caso **C**. Sin embargo, se observa que no existe una diferencia significativa entre los casos **C** y **D**, lo cual parece indicar que la potencia no es un factor determinante en este caso.

Por otro lado, la sección (b) de la Tabla 19 muestra que la viscosidad de la solución de alginato decrece rápidamente a medida que se incrementa la temperatura de calentamiento. Como se observa en el caso **H** ($T = 130\text{ °C}$), la solución resultante tiene una viscosidad cercana a la del solvente. Esto indica que la temperatura de calentamiento tiene un mayor efecto sobre la masa molar del alginato que el tiempo de calentamiento.

Se analizó el producto de la degradación por FT-IR, RMN y GPC. En la Figura 32, se muestran los espectros FT-IR de la muestra **G** purificada, del residuo de la muestra **G** y de la muestra **H**. El espectro (a) de la Figura 32 muestra las bandas de absorción características del alginato: OH a 3417 cm^{-1} , CH a 2918 y 2850 cm^{-1} , COO^- a 1612 y 1414 cm^{-1} , y C-O-C a 1093 cm^{-1} . El espectro (b) corresponde al residuo de la precipitación de la muestra **G** en 2-propanol. Se observan diversas bandas de absorción similares a las del alginato de sodio: OH en la zona de $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, CH en la zona de $3000\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$, y COO^- a 1619 y 1417 cm^{-1} . Además, se observa una banda a 1638 cm^{-1} la cual podría indicar presencia de enlaces C=C. La banda en la zona de $1030\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ es de muy baja intensidad, lo cual hace suponer que hay pocos o ningún enlace glicosídico C-O-C. El espectro (c) que corresponde a la muestra **H** muestra las mismas señales que el espectro (a) lo cual confirma que el producto de la degradación es alginato. Sin embargo, se observa que la intensidad relativa de la banda en la zona de $1030\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ es menor que en el espectro (a), lo cual tendría sentido puesto que a $130\text{ }^\circ\text{C}$ se produce una mayor degradación y, por ende, disminuye la cantidad de enlaces glicosídicos.



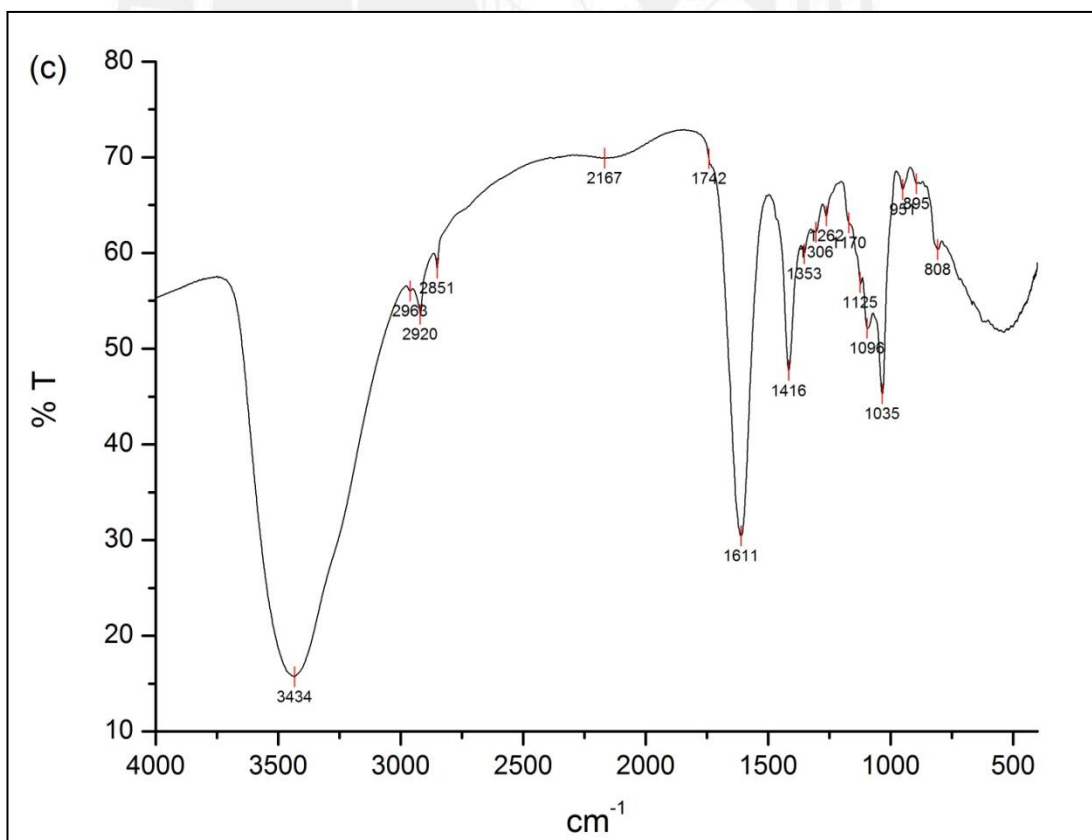
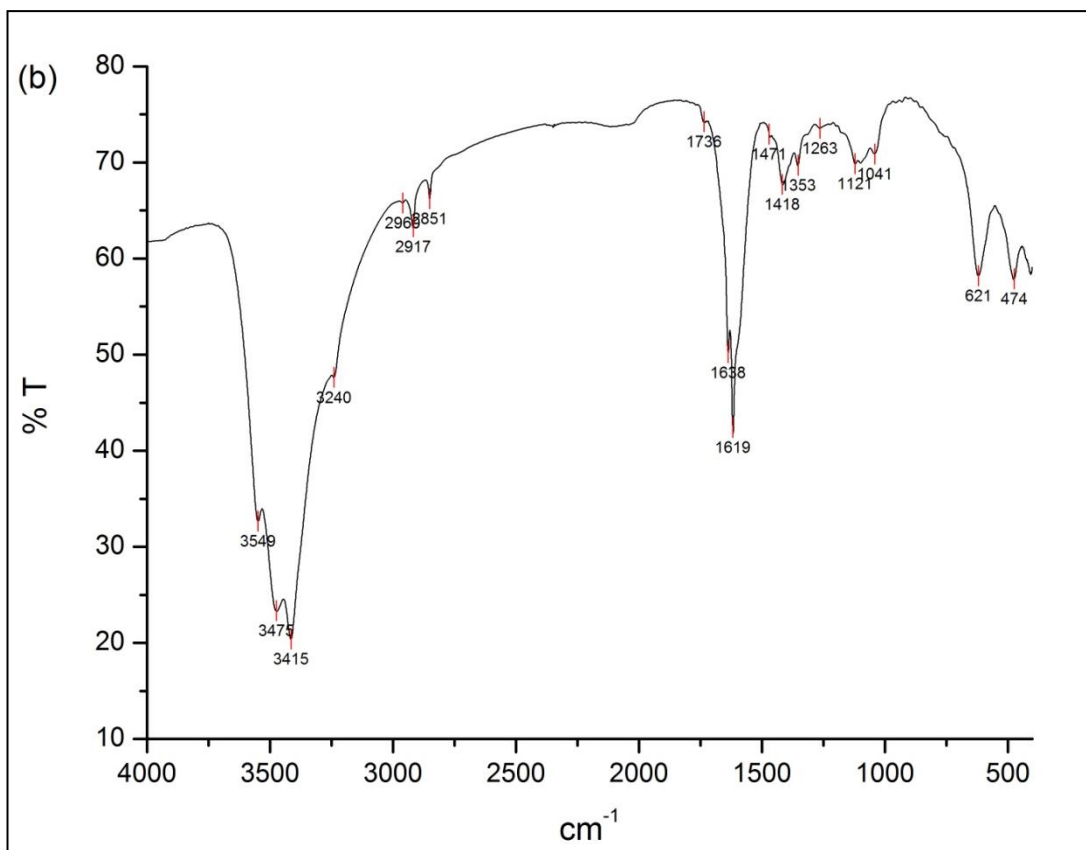
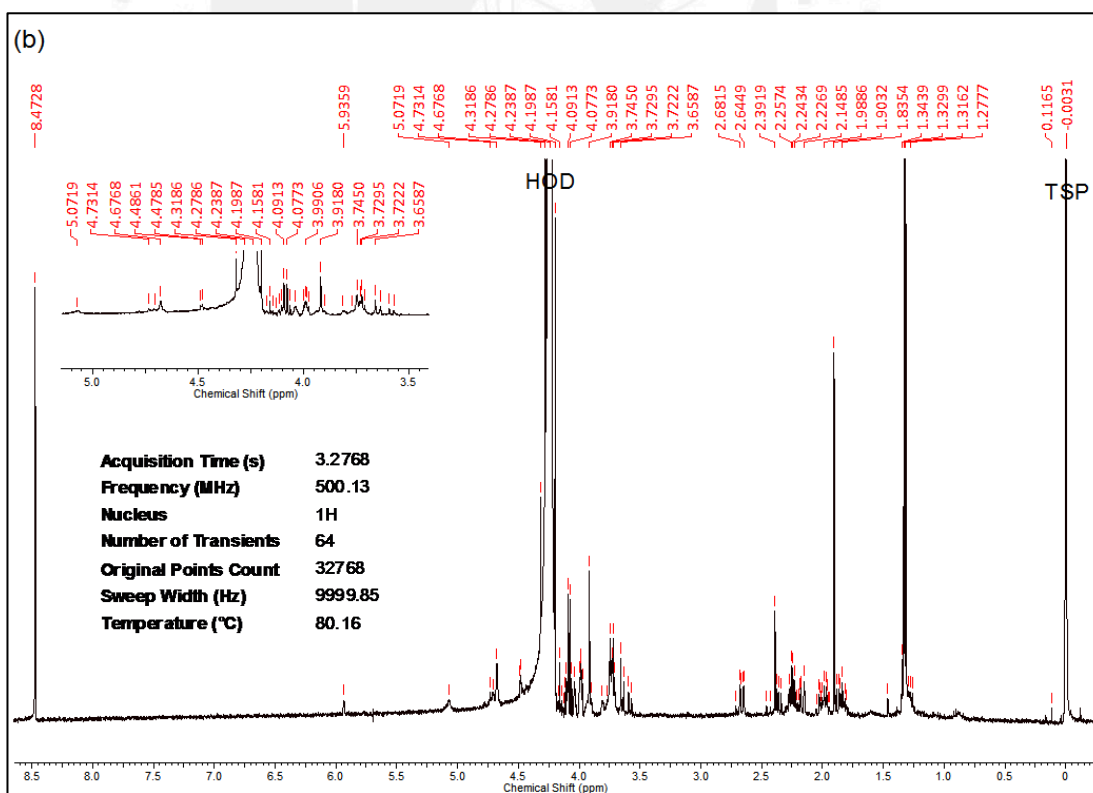
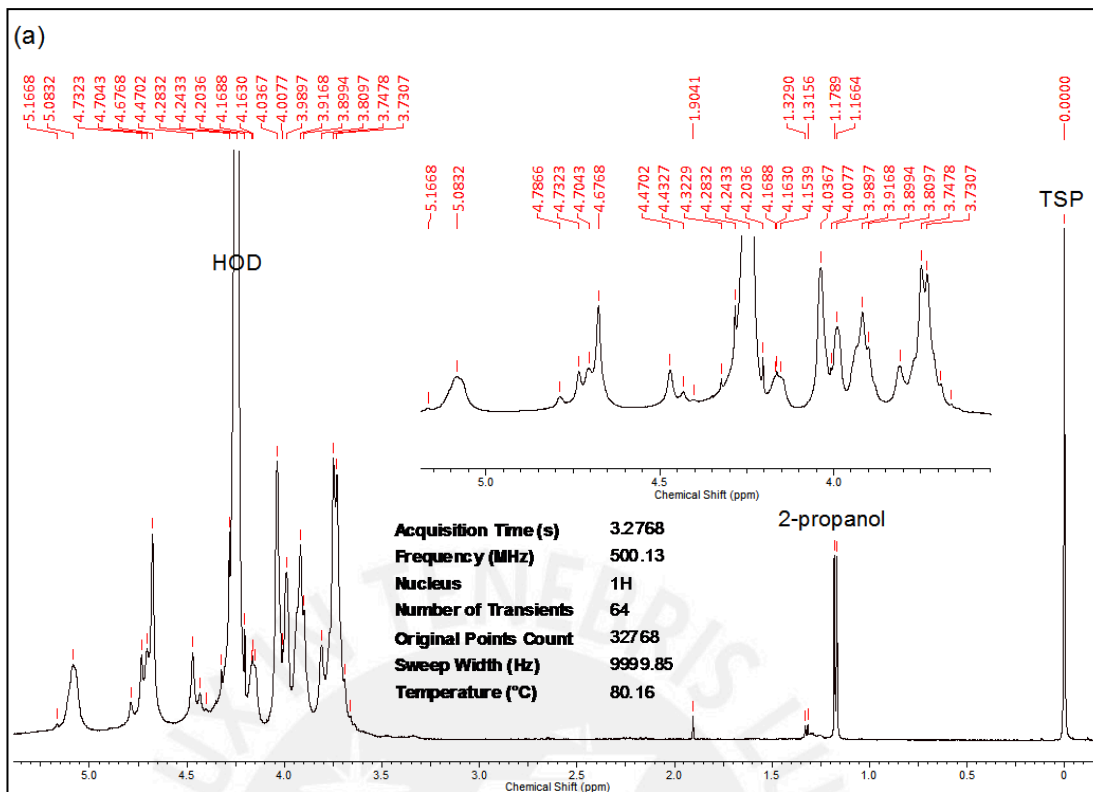


Figura 32. Espectros FT-IR (en pastilla de KBr) de (a) muestra **G** purificada, (b) residuo de **G**, y (c) muestra **H**.

Posteriormente, se obtuvo los espectros ^1H -RMN de las mismas muestras. En la Figura 33(a) se muestra el espectro de la muestra **G** purificada, y se observa que los picos en la zona de 3,5 – 5,5 ppm corresponden a los del alginato. Conjuntamente con los resultados mostrados anteriormente, esto confirma que el principal producto del tratamiento en medio alcalino con microondas es un alginato de menor masa molar. Sin embargo, la Figura 33(b) muestra que dicho tratamiento también conduce a la formación de diversos sub-productos. Se observan los picos característicos del alginato en la zona de 4,5 – 5,5 ppm aunque de muy baja intensidad. Esto es indicativo de un alginato con baja masa molar puesto que al romperse los enlaces glicosídicos, los hidrógenos 1 y 5 ya no están tan desprotegidos y, por ende, sus señales se desplazan hacia campo alto. La intensa señal a 8,5 ppm corresponde al hidrógeno del carboxilo en los ácidos urónicos, lo cual indica la presencia de ácido algínico de baja masa molar. Esto puede deberse a que, durante la neutralización, el alginato de baja masa molar se protonó, pero no precipitó en el 2-propanol puesto que por su reducida polaridad y tamaño debe ser ligeramente soluble. Se observan también una gran cantidad de señales a campo alto en las zonas de 4,0 – 3,5 ppm y 2,75 – 1,25 ppm. Estas pueden deberse a la ruptura de los anillos piranoides del alginato, posiblemente por efecto de radicales libres producto de la radiación microondas combinada con los iones hidroxilo. Finalmente, el espectro (c) de la Figura 33 corresponde a la muestra **H**, la cual no fue purificada. En este se observa la superposición de las señales de los espectros (a) y (b). La señal del 2-propanol no aparece puesto que la muestra **H** se aisló por liofilización.



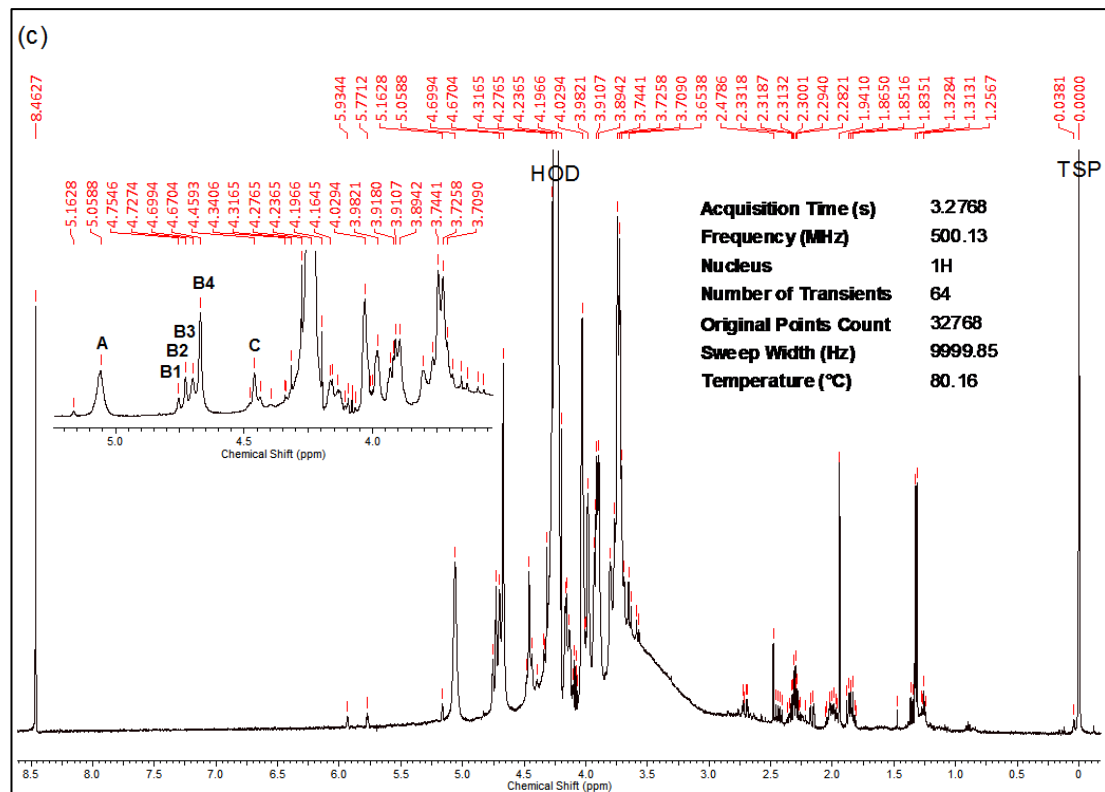


Figura 33. Espectros ^1H -RMN a 80 °C (D_2O , 500 MHz) de (a) muestra **G** purificada, (b) residuo de **G**, y (c) muestra **H**.

Adicionalmente, se obtuvo los espectros ^{13}C -RMN del alginato Sigma-Aldrich y de la muestra **G** purificada. Comparando los espectros (a) y (b) de la Figura 34, se confirma que la muestra **G** purificada es efectivamente alginato degradado. En la literatura, se reporta que el mecanismo de degradación alcalina es la β -eliminación⁶, sin embargo, no se observa presencia de enlaces dobles en el alginato degradado. Esto puede deberse a que el doble enlace, una vez formado, es subsecuentemente hidrolizado en el medio de reacción. La diferencia en la intensidad de los picos se debe a que el alginato degradado presenta mucha más movilidad, por lo cual los núcleos de ^{13}C tienen mayor facilidad para relajarse, generando así una señal más intensa.

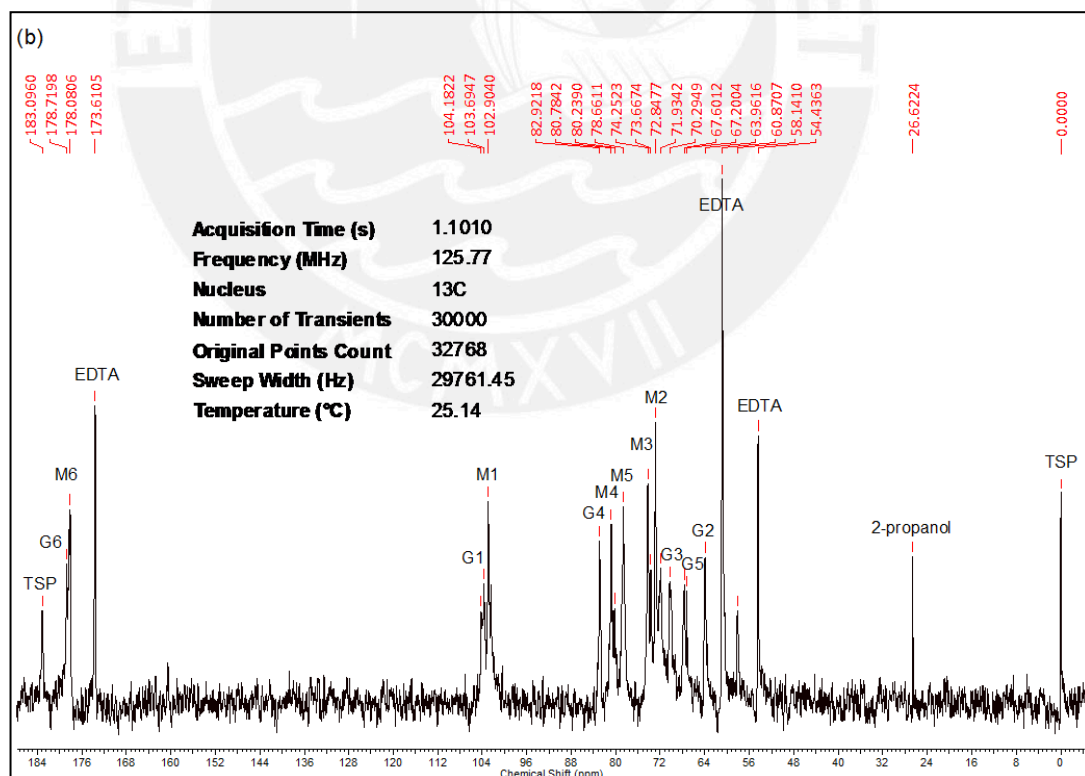
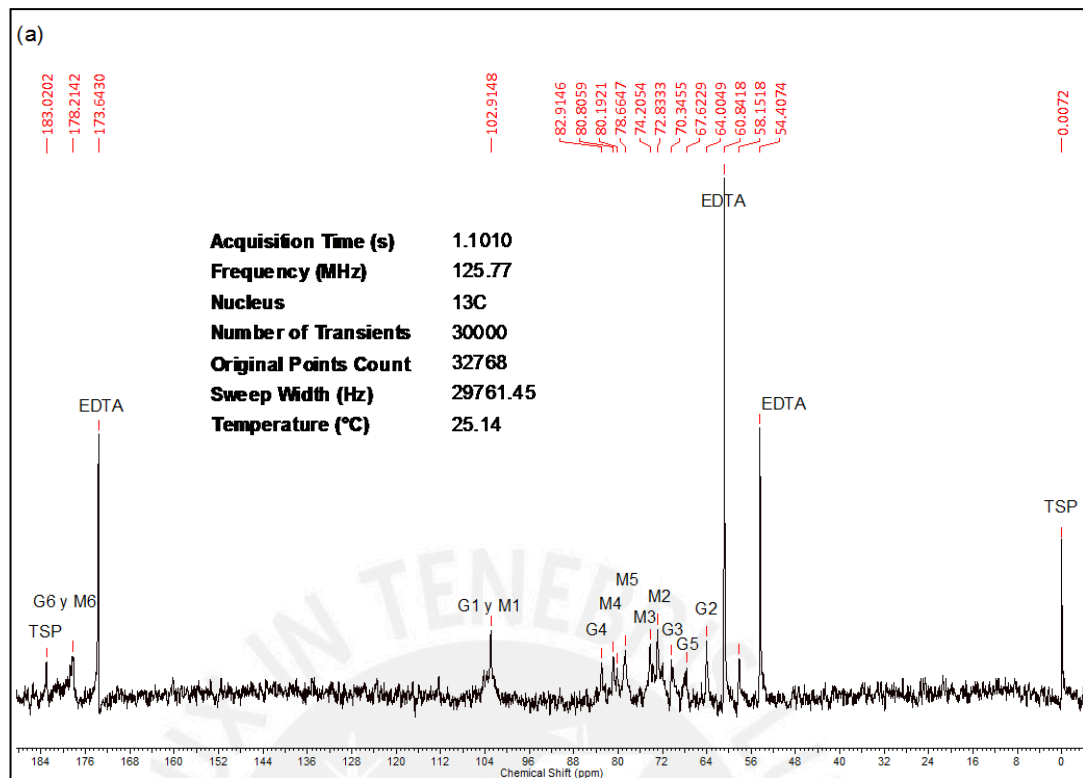
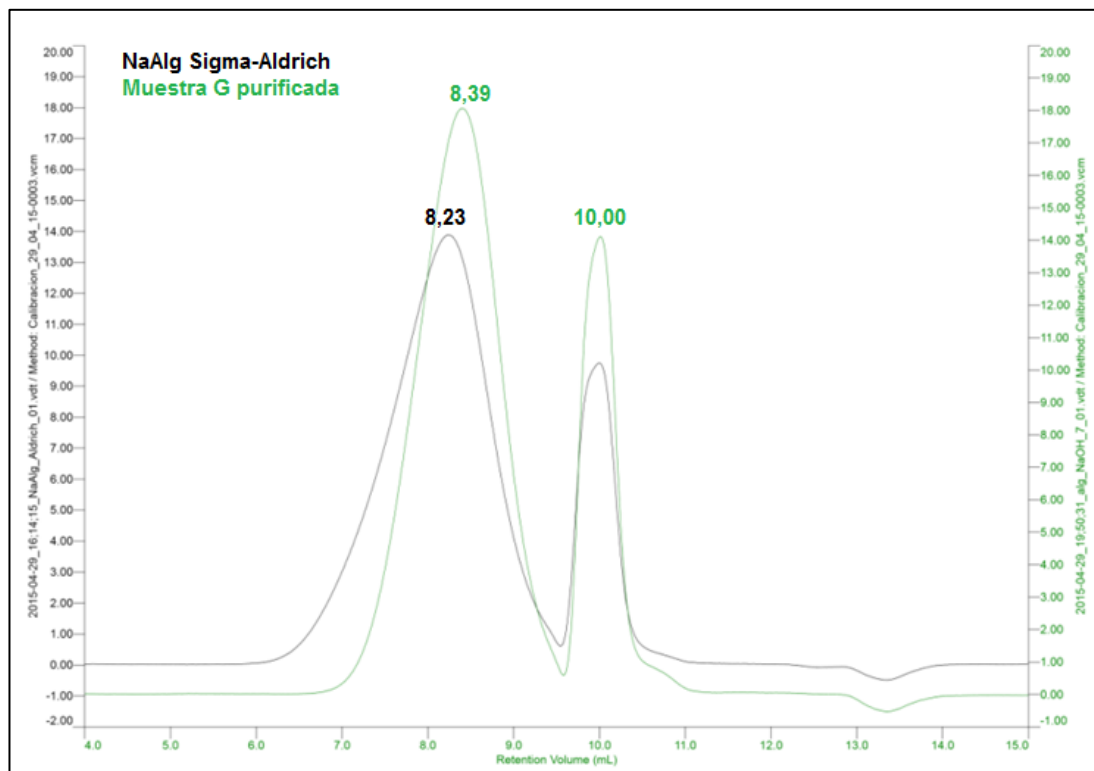


Figura 34. Espectros ^{13}C -RMN a 25 °C (D_2O , 125 MHz) de (a) alginato inicial y (b) muestra **G** purificada.

Finalmente, se obtuvo la distribución de masas molares de la muestra **G** purificada y se comparó con la del alginato Sigma-Aldrich inicial (ver Figura 35). No se pudo obtener el cromatograma de la muestra **H** debido a que el alginato no precipitó apropiadamente en 2-propanol, por lo cual no se pudo separar del resto de sub-productos de la degradación. Esto pudo deberse a que su masa molar promedio ya era bastante baja.



	Sigma-Aldrich	Muestra G purificada
M_p (Da)	60 551	41 191
M_n (Da)	33 054	23 697
M_w (Da)	209 328	84 362
PDI	6,333	3,560

Figura 35. Cromatogramas del alginato Sigma-Aldrich y de la muestra **G** purificada (fase móvil Na₂SO₄ 0,05 M y EDTA 0,01 M, flujo 0,5 mL/min, T = 35 °C); y resultados del análisis de distribución de masas molares.

El análisis por GPC indica claramente que la muestra **G** purificada tiene una masa molar promedio considerablemente menor que el alginato Sigma-Aldrich, lo cual corrobora los resultados por viscosimetría capilar. Además, se observa que la muestra **G** tiene un PDI bastante menor.

4.8 Análisis del residuo del pre-tratamiento del alga con ácido

El espectro FT-IR del residuo del pre-tratamiento del alga con ácido (ver Figura 36) indica la presencia de polisacáridos, posiblemente del tipo fucoidan. Se observan las bandas de absorción típicas de los polisacáridos: la banda ancha a 3433 cm^{-1} asignada al OH, y las bandas a $2933\text{-}2962\text{ cm}^{-1}$ asignadas a los CH del anillo piranoide y a los grupos C-6 de las unidades de fucosa y galactosa. Las bandas a 1626 y 1413 cm^{-1} indican la presencia de ácidos urónicos. Adicionalmente, se observa la banda de absorción a 1261 cm^{-1} correspondiente al estiramiento S=O y las bandas a 850 y 802 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones C-O-S.³²

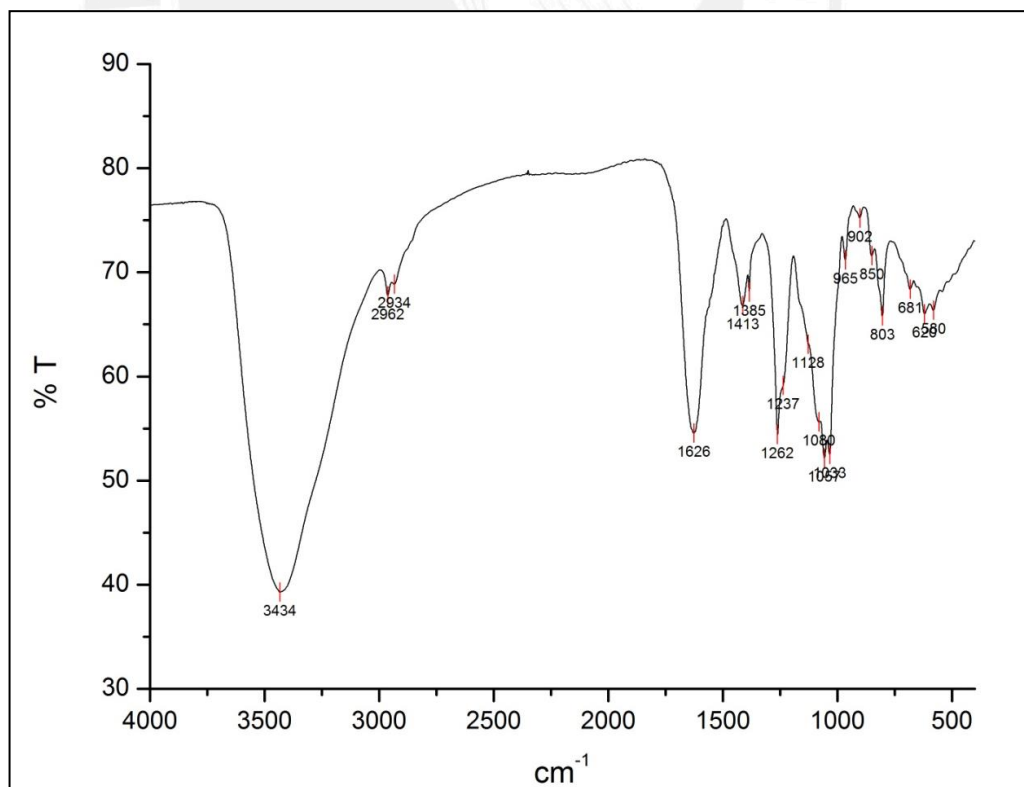


Figura 36. Espectro FT-IR en pastilla de KBr del residuo del pre-tratamiento con HCl (pH 4).

Para comprobar la identidad del residuo, se obtuvo una muestra de fucoidan comercial. El espectro FT-IR de la muestra (ver Figura 37) es considerablemente similar al del residuo del pre-tratamiento. Se observan las bandas de absorción del OH a 3386 cm^{-1} , de los CH a $2961\text{-}2929\text{ cm}^{-1}$, de los ácidos urónicos a 1628 y 1416 cm^{-1} , del S=O a 1261 cm^{-1} y del C-O-S a 861 y 801 cm^{-1} . Sin embargo, la intensidad relativa de los picos es diferente en ambos casos.

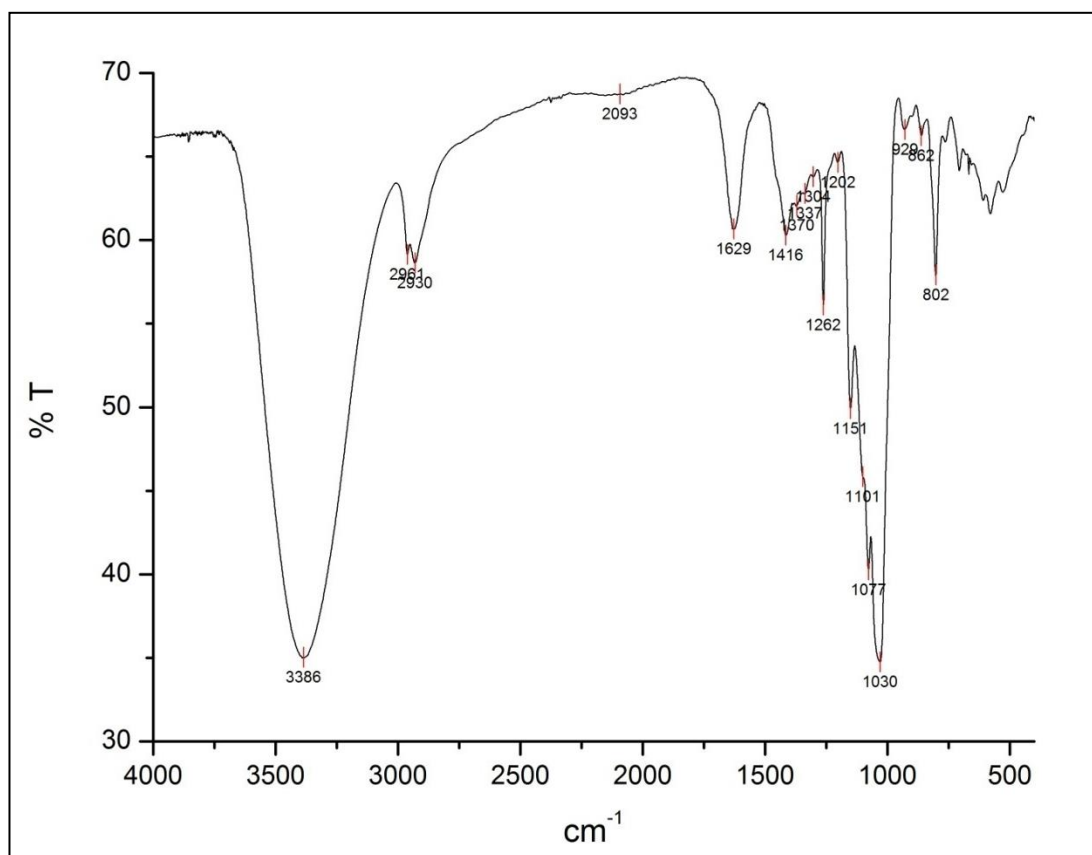


Figura 37. Espectro FT-IR en pastilla de KBr del fucoidan comercial purificado.

El análisis por $^1\text{H-RMN}$ se observa en la Figura 38. En el espectro del residuo se distinguen dos señales, una a $5,44\text{ ppm}$ y otra a $1,35 - 1,27\text{ ppm}$, las cuales podrían corresponder al hidrógeno del carbono anomérico y al grupo metilo de la fucosa, respectivamente.³⁶ Se distinguen también señales a $5,10$, $4,88$, $4,68$, $4,57$ y $4,41\text{ ppm}$, posiblemente pertenecientes al alginato. Particularmente, la señal a $4,68\text{ ppm}$ indicaría que se trata de alginato con alto contenido de manuronato. Las cadenas con alto ratio M/G podrían disolverse en el medio acuoso empleado para el pre-tratamiento puesto que el manuronato tiene un pK_a ($3,35$) más bajo que el

guluronato (3,65) y, además, tiene poca afinidad por cationes divalentes, causantes de la gelificación. Por otro lado, en el espectro del fucoidan comercial, se distinguen una variedad de señales en el rango de 5,5 – 4,5 y de 4,0 – 3,5 ppm que indican la presencia de polisacáridos. La señal a 5,36 ppm probablemente corresponde al hidrógeno del carbono anomérico del anillo piranoide. Se observa también una señal de muy baja intensidad a 1,3 ppm, lo cual indicaría que el fucoidan proveniente de esta alga no tiene un alto contenido de fucosa. Es posible que la cadena principal esté compuesta de azúcares con un grupo hidroxilo en el carbono 6 (análogo a la glucosa), haciendo que las señales metilénicas se desplacen hacia campo bajo.



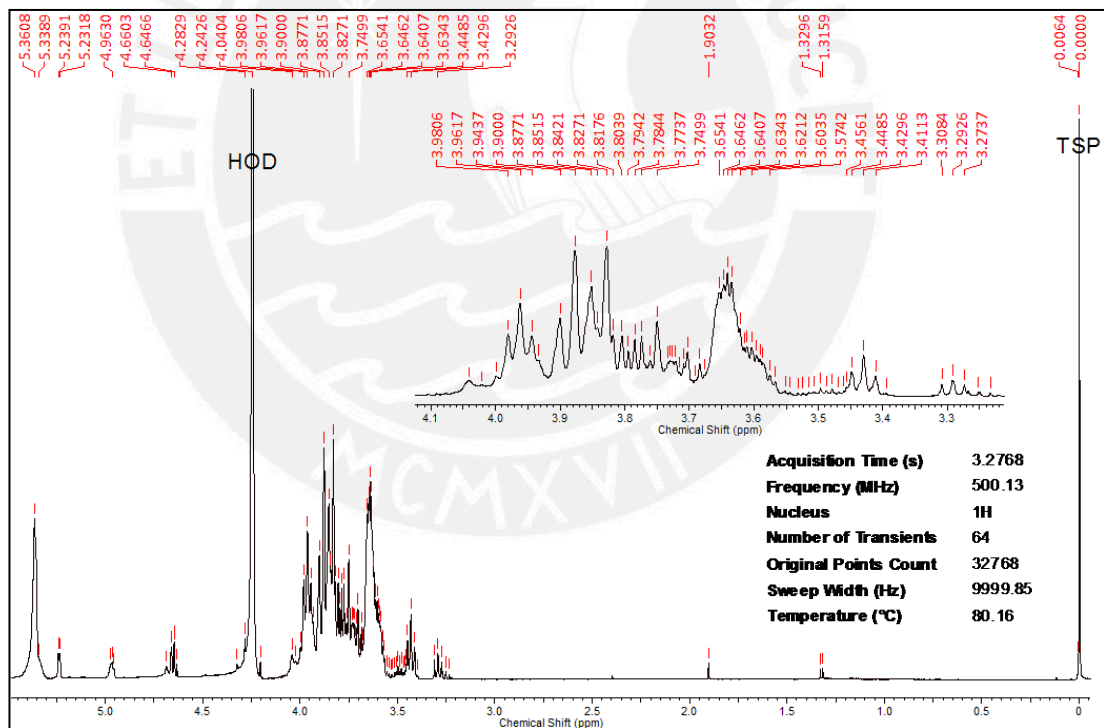
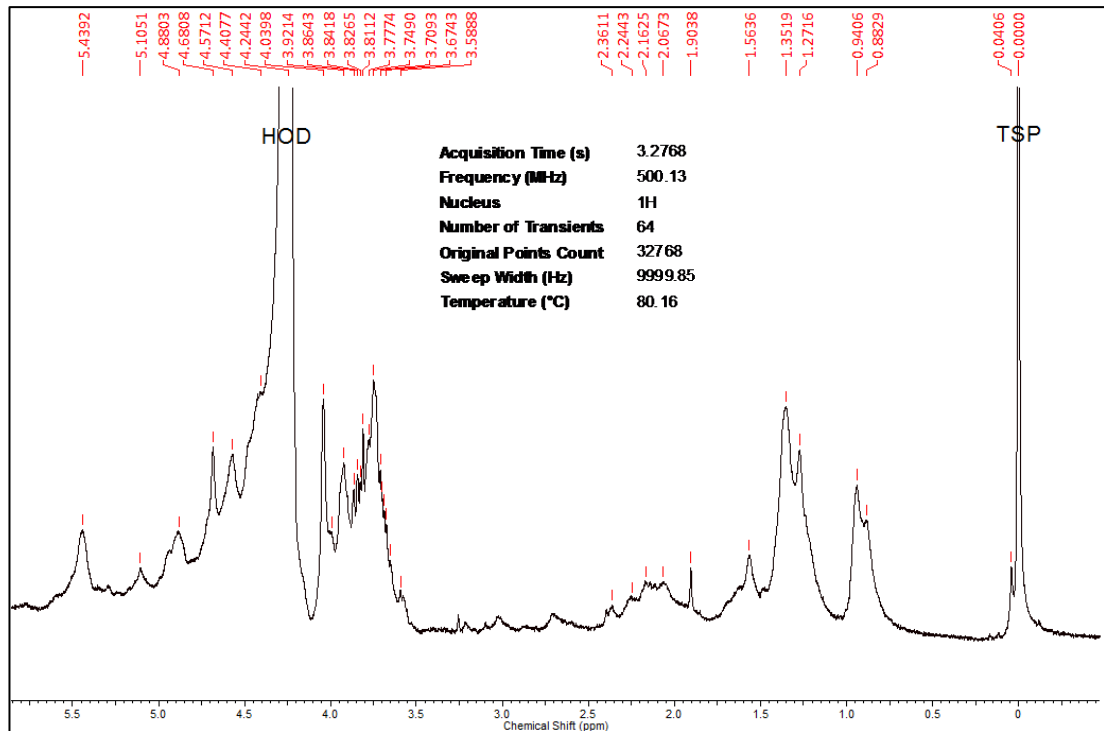


Figura 38. Espectros ^1H -RMN a 80 °C (D_2O , 500 MHz) del residuo del pre-tratamiento (*arriba*) y del fucoidan comercial purificado (*abajo*).

La espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRF) (ver Figura 39) revela que el residuo del pre-tratamiento contiene cantidades considerables de azufre, potasio y calcio. Se aprecian también señales de baja intensidad de fósforo, zinc, estroncio y bromo. La presencia de azufre apoya los resultados descritos por FT-IR, indicando que los polisacáridos presentes se encuentran sulfatados. Las señales intensas de cationes como potasio y calcio son esperables considerando que el espectro FT-IR indica la presencia de ácidos urónicos. Además, los grupos sulfato darían un mayor carácter aniónico al polisacárido, lo cual incrementaría su afinidad por diversos cationes. Por otro lado, el espectro XRF del fucoidan comercial muestra señales de fósforo, azufre, cloro, potasio, calcio, zinc y bromo. La intensa señal del cloro puede deberse a la presencia de cloruros provenientes del proceso de extracción del fucoidan en medio ácido (*i.e.* HCl).



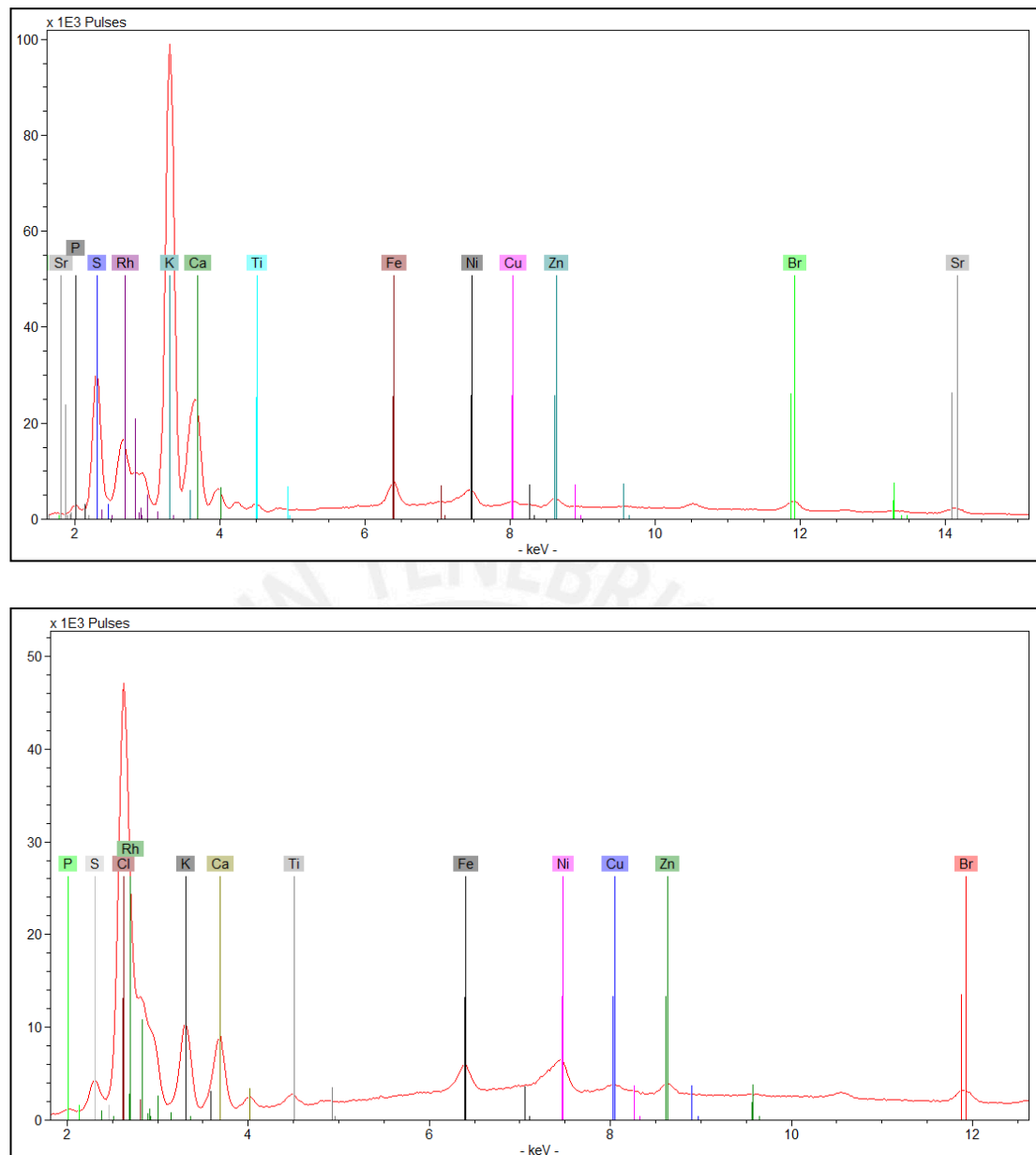
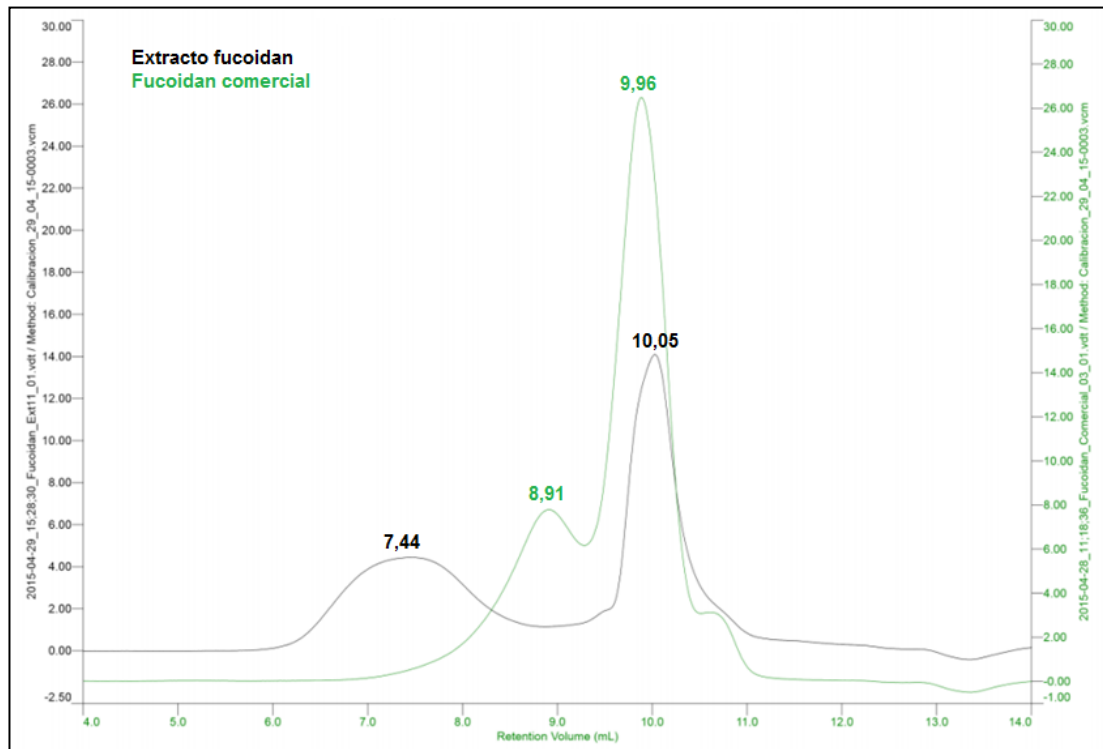


Figura 39. Espectros XRF* del residuo del pre-tratamiento (*arriba*) y fucoidan comercial (*abajo*).

*Las señales de Rh, Ti, Fe, Ni y Cu se deben a componentes presentes en el equipo mismo.

Finalmente, se analizaron las muestras por GPC (ver Figura 40). El residuo del pre-tratamiento tiene una alta masa molar promedio, con un M_p de 370 kDa. Este valor es semejante al de los extractos de alginato. Su PDI es de 4,806 lo cual indica una amplia distribución de masas molares. Por su parte, el fucoidan comercial tiene una masa molar promedio bastante menor, con un M_p de 11k Da. Sin embargo, su PDI es 3,803, es decir, tiene una distribución de masas molares más angosta. La masa

molar del fucoidan es variable y depende principalmente del alga de origen y de las condiciones de extracción empleadas.^{32,33} Considerando que la mayoría de procesos de extracción emplean ácido caliente, es razonable esperar cierto grado de hidrólisis de los enlaces glicosídicos del fucoidan comercial.



	Extracto	Comercial
M_p (Da)	369 103	11 028
M_n (Da)	128 222	12 683
M_w (Da)	616 262	48 234
PDI	4,806	3,803

Figura 40. Cromatogramas del extracto de fucoidan y del fucoidan comercial (fase móvil Na₂SO₄ 0,05 M y EDTA 0,01 M, flujo 0,5 mL/min, T = 35 °C); y resultados del análisis de distribución de masas molares.

En resumen, se concluye que existe suficiente evidencia para suponer que el residuo del pre-tratamiento ácido contiene polisacáridos sulfatados del tipo fucoidan, aunque es altamente probable que también contenga alginato.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El protocolo de extracción de alginato de sodio de *Macrocystis sp.* fue optimizado para mejorar el rendimiento y la calidad del producto.
- El pre-tratamiento óptimo del alga se consiguió empleando una solución acuosa de hipoclorito de sodio 0,5 % (w/w). Esta permitió obtener un alginato con baja coloración.
- La extracción en medio alcalino que generó un mayor rendimiento fue aquella en la que se empleó una relación molar 1:1 de alginato : Na_2CO_3 , esto es 0,5 g de Na_2CO_3 por 10 g de alga húmeda (o su equivalente 2 g de alga seca). La extracción se realizó a 80 °C por 2 h. Adicionalmente, se comprobó que no existe diferencia en cuanto a rendimiento se refiere si se emplea el alga húmeda o el alga seca inicialmente, siempre y cuando se hidrate el alga durante el pre-tratamiento.
- Se diseñó un procedimiento alternativo para purificar al alginato de sodio. El extracto crudo se disolvió en una solución acuosa de EDTA 5 mM, se centrifugó, se filtró a presión con una membrana de 8 μm , se dializó en agua y se liofilizó.
- Los rendimientos finales de alginato obtenidos para las tres partes del alga (hojas, bulbos y tallos) fueron considerablemente cercanos entre sí. El rendimiento promedio de la extracción fue $57,8 \pm 6,7$ % y el de la purificación fue $61,9 \pm 6,8$ %. En promedio, el rendimiento total del proceso de obtención de alginato fue $33,0 \pm 1,9$ % w/w.
- El análisis químico permitió determinar la composición y estructura del extracto de alginato de *Macrocystis sp.* Con el ^1H -RMN se obtuvo los valores de ratio M/G y $N_{G>1}$. En cuanto al ratio M/G, no se observó diferencias significativas entre las diferentes partes del alga. El ratio M/G promedio fue 1,75, es decir, una composición de 64 % manuronato y 36 % guluronato. Sin embargo, los tallos y bulbos parecían contener cadenas homogulurónicas más largas que las hojas, como indicaron los valores de $N_{G>1}$. Por otro lado, con la espectroscopía FT-IR se logró identificar los grupos funcionales presentes en el alginato y estimar el ratio M/G. El ratio M/G promedio obtenido mediante esta técnica fue

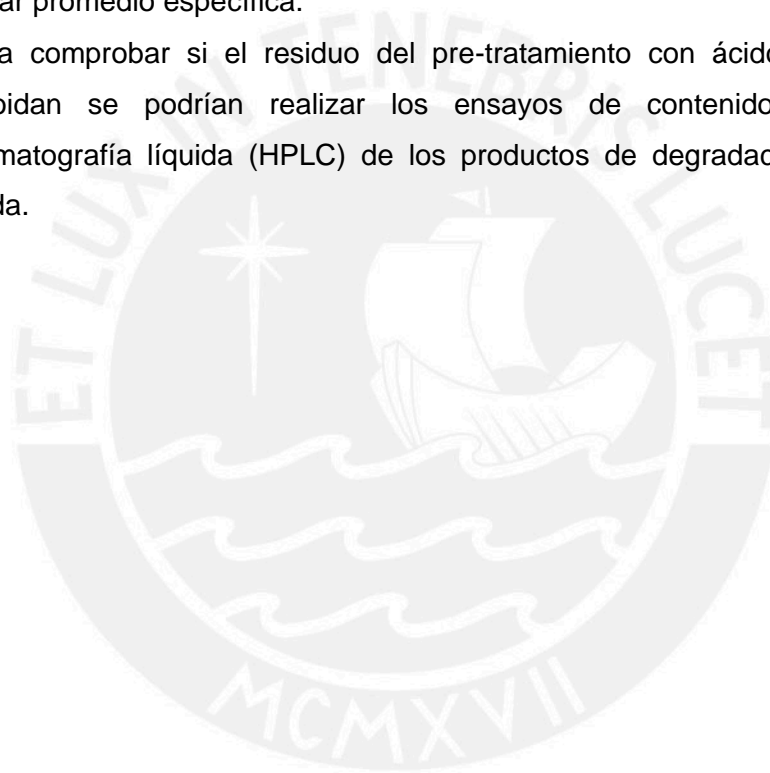
1,60, es decir, una composición de 62 % manuronato y 38 % guluronato. El valor fue considerablemente cercano al obtenido por $^1\text{H-RMN}$.

- El análisis de masa molar por viscosidad y GPC indica que los extractos de alginato de las tres partes del alga *Macrocystis sp.* tienen la misma distribución de masas molares. Considerando el valor obtenido para el extracto de hojas, la masa molar promedio en viscosidad del alginato es aproximadamente 320 kDa. El M_p promedio de los tres extractos de alginato relativo al PEO es 330 ± 20 kDa; y el PDI promedio es $5,094 \pm 0,201$, lo cual implica una distribución de masas molares bastante amplia.
- Considerando los resultados descritos anteriormente, se concluye que no hay un beneficio en separar las partes de esta especie de alga previamente al proceso de extracción de alginato.
- El estudio morfológico por SEM muestra que el entrecruzamiento iónico del alginato con calcio (Ca^{2+}) genera una estructura relativamente compacta y rígida. Además, se observó que el ácido algínico presenta una estructura laminar debido a la expansión del polímero ante la ausencia de cationes. El estudio por SEM-EDS permitió observar el proceso de gelificación de una perla de alginato de sodio por entrecruzamiento iónico con Ca^{2+} y Cu^{2+} . Se confirmó que los cationes multivalentes difunden rápidamente hacia el interior de la perla de alginato.
- La degradación del alginato en medio alcalino asistida por microondas conduce principalmente a la disminución de su masa molar promedio. Además, se concluye que la temperatura de reacción es una variable más determinante en la degradación que el tiempo de calentamiento.
- El análisis del residuo del pre-tratamiento del alga *Macrocystis sp.* con ácido indica que es probable que contenga un polisacárido sulfatado del tipo fucoidan.

5.2 Recomendaciones

- En el estudio del pre-tratamiento del alga, se analizaron diferentes métodos para reducir el color en el producto final. Otra variable a analizar sería la remoción de cationes divalentes con la solución de lavado, para así facilitar la extracción de alginato en medio alcalino. Esto podría ayudar a reducir el tiempo de calentamiento, y minimizar el costo energético. Por lo tanto, se recomienda analizar el contenido de calcio en la solución de lavado residual.

- En cuanto a la extracción de alginato en medio alcalino, resultaría útil analizar también las variables de tiempo y temperatura de reacción.
- En la purificación del alginato, la filtración con membrana puede complicarse a nivel de producción debido a que los sólidos insolubles finos podrían obstruir el flujo. Se propone buscar métodos alternativos de filtración empleando columnas de materiales porosos que retengan las impurezas de manera segregada.
- En el análisis por GPC, sería recomendable emplear estándares de pululán puesto que su estructura es similar a la del alginato. De esta forma, se podría usar el GPC para estimar el valor de una masa molar más cercana del alginato.
- Sería factible el uso de radiación microondas para obtener alginatos con masa molar promedio específica.
- Para comprobar si el residuo del pre-tratamiento con ácido es en realidad fucoidan se podrían realizar los ensayos de contenido de sulfatos y cromatografía líquida (HPLC) de los productos de degradación por hidrólisis ácida.



6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Draget, K. I. Alginates. En *Handbook of hydrocolloids*; Phillips, G. O., Williams, P. A., Eds.; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, 2009; pp. 807–828.
- (2) Donati, I.; Paoletti, S. Material Properties of Alginates. En *Alginates: Biology and Applications*; Rehm, B. H. A., Ed.; Microbiology Monographs; Springer: Berlin, 2009; Vol. 13, pp. 01–53.
- (3) McHugh, D. J. Production, Properties and Uses of Alginates. En *Production and utilization of products from commercial seaweeds* [Online]; McHugh, D. J., Ed.; Fisheries and Aquaculture Department of the United Nations: Roma, 1987. <http://www.fao.org/docrep/x5822e/x5822e00.htm#Contents> (consultado Enero 30, 2015).
- (4) Brownlee, I. A.; Seal, C. J.; Wilcox, M.; Dettmar, P. W.; Pearson, J. P. Applications of Alginates in Food. En *Alginates: Biology and Applications*; Rehm, B. H. A., Ed.; Microbiology Monographs; Springer: Berlin, 2009; Vol. 13, pp. 211–228.
- (5) Cuisine Innovation. Sodium alginate (E401) <http://www.cuisine-innovation.com/en/> (consultado Marzo 15, 2015).
- (6) Andersen, T.; Strand, B. L.; Formo, K.; Alsberg, E.; Christensen, B. E. Alginates as Biomaterials in Tissue Engineering. *Carbohydr. Chem.* **2012**, *37*, 227–258.
- (7) Prasad, K.; Kadokawa, J. Alginate-Based Blends and Nano/Microbeads. En *Alginates: Biology and Applications*; Rehm, B. H. A., Ed.; Microbiology Monographs; Springer: Berlin, 2009; Vol. 13, pp. 175–210.
- (8) Nandini, V. V.; Venkatesh, K. V.; Nair, K. C. Alginate Impressions: A Practical Perspective. *J. Conserv. Dent.* **2008**, *11*, 37–41.
- (9) Bixler, H. J.; Porse, H. A Decade of Change in the Seaweed Hydrocolloids Industry. *J. Appl. Phycol.* **2010**, *23*, 321–335.
- (10) Instituto del Mar del Perú. Estudios de poblaciones de macroalgas. http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/macro_algas/estud_macroalg.pdf (consultado Enero 30, 2015).
- (11) Hernández-Carmona, G.; McHugh, D. J.; Arvizu-Higuera, D. L.; Rodríguez-Montesinos, E. Pilot plant scale extraction of alginate from *Macrocystis pyrifera*. 1. Effect of pre-extraction treatments on yield and quality of alginate. *J. Appl. Phycol.* **1999**, *10*, 507–513.
- (12) Hernández-Carmona, G.; McHugh, D. J.; López-Gutiérrez, F. Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera*. 2. Studies on extraction

- conditions and methods of separating the alkaline-insoluble residue. *J. Appl. Phycol.* **2000**, *11*, 493–502.
- (13) McHugh, D. J.; Hernández-Carmona, G.; Arvizu-Higuera, D. L.; Rodríguez-Montesinos, E. Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* 3. Precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid. *J. Appl. Phycol.* **2001**, *13*, 471–479.
 - (14) Hernández-Carmona, G.; McHugh, D. J.; Arvizu-Higuera, D. L.; Rodríguez-Montesinos, E. Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* 4. Conversion of alginic acid to sodium alginate, drying and milling. *J. Appl. Phycol.* **2002**, *14*, 445–451.
 - (15) ASTM Standard F2259 2010(2012)^{ε1}, "Standard Test Method for Determining the Chemical Composition and Sequence in Alginate by Proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR) Spectroscopy", ASTM International, Westconshohocken, PA, 2012, DOI: 10.1520/F2259-10R12E01, www.astm.org.
 - (16) Grasdalen, H. High-Field, ¹H- N.M.R. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. *Carbohydr. Res.* **1983**, *118*, 255–260.
 - (17) Grasdalen, H.; Larsen, B.; Smidsrod, O. ¹³C-N.M.R. studies of monomeric composition and sequence in alginate. *Carbohydr. Res.* **1981**, *89*, 179–191.
 - (18) Grasdalen, H.; Larsen, B.; Smidsrod, O. A P.M.R. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. *Carbohydr. Res.* **1979**, *68*, 23–31.
 - (19) Filipov, M. P.; Kohn, R. Determination of composition of alginates by infrared spectroscopic method. *Chem. Zvesti* **1974**, *28*, 817–819.
 - (20) Sartori, C.; Finch, D. S.; Ralph, B. Determination of the cation content of alginate thin films by FTi.r Spectroscopy. *Polymer (Guildf)*. **1997**, *38*, 43–51.
 - (21) Leal, D.; Matsuhiro, B.; Rossi, M.; Caruso, F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 308–316.
 - (22) Abd El-Rehim, H. A.; El-Sawy, N. M.; Farag, I. A.; Elbarbary, A. M. Synergistic effect of combining ionizing radiation and oxidizing agents on controlling degradation of Na-alginate for enhancing growth performance and increasing productivity of zea maize plants. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *86*, 1439–1444.
 - (23) Pamies, R.; Schmidt, R. R.; Martínez, M. D. C. L.; Torre, J. G. D. La. The influence of mono and divalent cations on dilute and non-dilute aqueous solutions of sodium alginates. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80*, 248–253.
 - (24) ASTM Standard F2605 2008^{ε1}. "Standard Test Method for Determining the Molar Mass of Sodium Alginate by Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS)", ASTM International: Westconshohocken, PA., 2008, DOI: 10.1520/F2605-08E01.2, www.astm.org.

- (25) Chhatbar, M.; Meena, R.; Prasad, K.; Siddhanta, A. K. Microwave assisted rapid method for hydrolysis of sodium alginate for M/G ratio determination. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76*, 650–656.
- (26) Gomez, C. G.; Rinaudo, M.; Villar, M. A. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *67*, 296–304.
- (27) Rehm, B. H. A. Alginate Production: Precursor Biosynthesis, Polymerization and Secretion. En *Alginates: Biology and Applications*; Rehm, B. H. A., Ed.; Microbiology Monographs; Springer: Berlin, 2009; Vol. 13, pp. 55–71.
- (28) Yang, J.-S.; Xie, Y.-J.; He, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *84*, 33–39.
- (29) Kadokawa, J.; Saitou, S.; Shoda, S. Preparation of alginate-polymethacrylate hybrid material by radical polymerization of cationic methacrylate monomer in the presence of sodium alginate. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *60*, 253–258.
- (30) Rani, P.; Mishra, S.; Sen, G. Microwave based synthesis of polymethyl methacrylate grafted sodium alginate: its application as flocculant. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *91*, 686–692.
- (31) Sen, G.; Singh, R. P.; Pal, S. Microwave-Initiated Synthesis of Polyacrylamide Grafted Sodium Alginate: Synthesis and Characterization. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *115*, 63–71.
- (32) García-Ríos, V.; Ríos-Leal, E.; Robledo, D.; Freile-Pelegrin, Y. Polysaccharides composition from tropical brown seaweeds. *Phycol. Res.* **2012**, *60*, 305–315.
- (33) Ale, M. T.; Meyer, A. S. Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 8131-8141.
- (34) Zhang, J.; Zhang, Q.; Wang, J.; Shi, X.; Zhang, Z. Analysis of the monosaccharide composition of fucoidan by precolumn derivation HPLC. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* **2009**, *27*, 578-582.
- (35) Rodriguez-Jasso, R. M.; Mussatto, S. I.; Pastrana, L.; Aguilar, C. N.; Teixeira, J. A. Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *86*, 1137–1144.
- (36) Shiroma, R.; Konishi, T.; Uechi, S.; Tako, M. Structural Study of Fucoidan from the Brown Seaweed *Hizikia fusiformis*. *Food Sci. Technol. Res.* **2008**, *14*, 176–182.
- (37) Ale, M. T.; Mikkelsen, J. D.; Meyer, A. S. Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2106–2030.

- (38) Martinsen, A.; Skjvik-br, G.; Smidsrod, O.; Paoletti, S. Comparison of Different Methods for Determination of Molecular Weight and Molecular Weight Distribution of Alginates. *Carbohydr. Polym.* **1991**, *15*, 171–193.
- (39) Whyte, J. N. C.; Englar, J. R. *Primary Organic Chemical Composition of the Marine Alga Macrocystis Integrifolia Over the Growing Season By Fisheries and Marine Service Technical Report No . 787*; Vancouver, 1978.
- (40) Sigma-Aldrich. Alginate acid sodium salt - 180947. <http://sigma-aldrich.custhelp.com/app/answers/list/p/129,1949> (consultado Mayo 11, 2015).
- (41) Draget, K.; Smidsrød, O.; Skjåk-Bræk, G. Alginates from Algae. En *Biopolymers Online*; Steinbüchel, A., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005; pp. 215–224.
- (42) Materials Department of Imperial College, London. Database of Ionic Radii <http://abulafia.mt.ic.ac.uk/shannon/ptable.php> (consultado Mayo 12, 2015).
- (43) Huang, C.; Chung, Y.; Liou, M. Adsorption of Cu(II) and Ni(II) by pelletized biopolymer. *J. Hazard. Mater.* **1996**, *3894*, 265–277.
- (44) Lewandowski, Z.; Roe, F. Diffusivity of Cu²⁺ in Calcium Alginate Gel Beads: Recalculation. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 186–187.