

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**DESARROLLO DE MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE
BIOPLÁSTICOS A PARTIR DE ALGAS VERDES**

Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero Mecánico

AUTOR:

Luis Eduardo Miranda Berrocal

ASESOR:

Fernando Gilberto Torres García


Lima, noviembre, 2023

Informe de Similitud

Yo, Fernando Gilberto Torres García, docente de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesor de la tesis titulado DESARROLLO DE MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE BIOPLÁSTICOS A PARTIR DE ALGAS VERDES del autor LUIS EDUARDO MIRANDA BERROCAL, dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 11%. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 18/09/2023.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis o Trabajo de Suficiencia Profesional y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha: Lima, 18 de Septiembre de 2023

Torres García, Fernando Gilberto	
DNI: 07879100	
ORCID: 0000-0002-3123-266X	

Resumen

En la actualidad, existe interés en el desarrollo de bioplásticos a partir de fuentes naturales para reemplazar los plásticos convencionales obtenidos a base de petróleo debido a la contaminación que genera tanto la producción de estos, como su largo proceso de descomposición. El presente proyecto de tesis se centra en las algas verdes de la especie *Ulva* como fuente de desarrollo de láminas de bioplástico a partir del Ulvan, su componente principal. Las variedades tomadas durante el desarrollo de este proyecto fueron las algas *Ulva Nematoides*. Se evaluaron distintos métodos para poder extraer el polisacárido Ulvan de cada muestra de algas, explorando extracción por medio ácido, medio neutro y medio básico. De los cuales, el primer grupo no pudo ser tomado en cuenta para los ensayos de caracterización, FTIR, tracción, DSC y TGA, debido a que su consistencia viscosa no permitía su manipulación. Se produjeron delgadas de 50g de Ulvan y se agregó el 10% en peso de glicerol. Se compararon los resultados obtenidos entre cada grupo de muestras, divididos por método de extracción y por contenido de plastificante. Se pudo ver que el porcentaje de plastificante agregado al Ulvan no degradó la estructura molecular del mismo, dando como resultados valores muy cercanos para muestras con 0% y 10% de glicerol. El proceso determinante para diferenciar el rendimiento de las muestras fue el método de extracción, del cual se obtuvo que las muestras de medio básico alcanzan una mayor deformación y una mayor estabilidad térmica.

Los resultados obtenidos demuestran que las algas verdes estudiadas de la especie *Ulva* pueden ser tomadas en consideración para la producción de bioplástico, ya que representan una fuente abundante en el medio ambiente, el método de producción de las láminas no genera residuos tóxicos y muestran un bajo porcentaje de materia inerte o inorgánica.

Palabras clave: Ulvan, *Ulva Nematoides*, láminas, extracción, glicerol

Abstract

To this date, there is interest in the development of bioplastics made out of natural sources to replace petroleum-based conventional plastics, due to the pollution generated by their production, as well as their long periods of decomposition. The present thesis project focuses on green algae of the *Ulva* species as a source for developing thin bioplastic films made out of Ulvan, their main component. The varieties used during the present project were *Ulva Nematoidea*. Different extraction methods of Ulvan polysaccharide were evaluated for each algae sample, exploring acid, neutral and basic extraction. From which, the first group was discarded from characterization tests, FTIR, traction, DSC and TGA, because their viscous consistency did not allow their manipulation.

Thin films of 50g of Ulvan were produced and 10% in weight of glycerol plasticizer was added for each sample. Results were compared for each sample group, divided by extraction method and plasticizer content. The added plasticizer content did not show damage to Ulvan's molecular structure, giving results close to each other for 0% and 10% glycerol content. The main process for sample yield difference was the extraction method, from which it was obtained that basic medium samples reached a higher elongation and thermal stability.

The obtained results show that the studied green algae from the *Ulva* species can be considered for bioplastic production, because they are abundant in the environment, the production process does not generate toxic residues and they show a low percentage of inert or inorganic content.

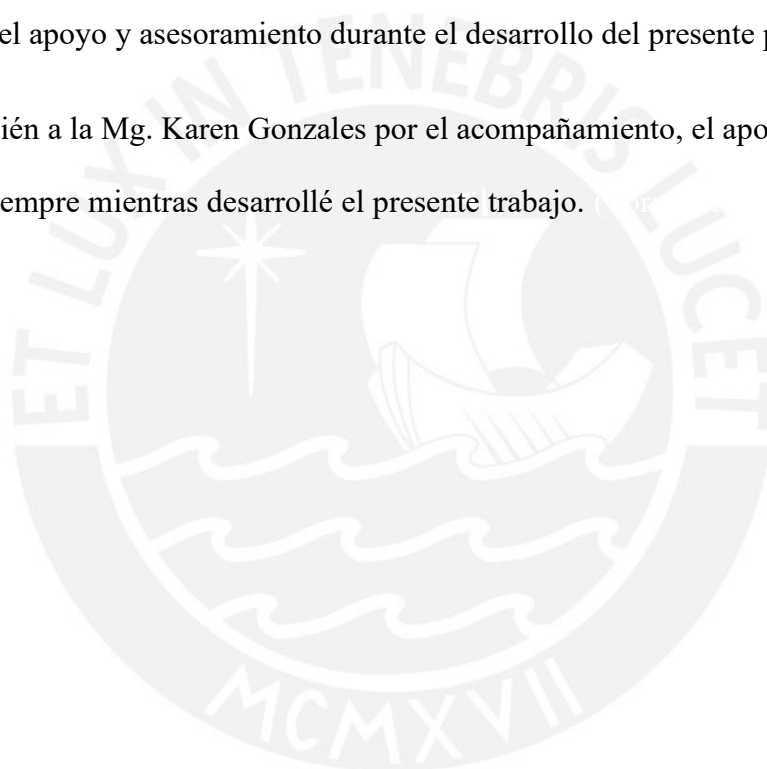
Key words: Ulvan, *Ulva Nematoidea*, films, extraction, glycerol

Agradecimientos

Agradezco a CONCYTEC PROCIENCIA, que financió el presente trabajo en el marco del concurso “Proyectos de Investigación Básica 2020-01” [Contrato N° 121-2020-FONDECYT], dentro del proyecto “Síntesis de bioplásticos a partir de polisacáridos sulfatados extraídos de algas verdes del litoral peruano con aplicaciones potenciales en almacenamiento de energía limpia”.

Agradezco al Dr. Fernando Torres García y al Laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales de la PUCP por el apoyo y asesoramiento durante el desarrollo del presente proyecto.

Agradezco también a la Mg. Karen Gonzales por el acompañamiento, el apoyo, la disposición y por guiarme siempre mientras desarrollé el presente trabajo.



Dedicatoria

A María Elena y Luis Alberto, mis padres, y a Ana Carolina, mi hermana, quienes creyeron en mí desde que empecé mi camino. Gracias por todas las palabras, por todo el tiempo y por todo el amor recibido.

A Jannett y a Rosa, las llevo en mi corazón y espero que se sientan tan orgullosas de mí como siempre lo hicieron.

A todos mis seres queridos, familiares y amigos.

¡Gracias a todos!



Índice de contenido

Informe de Similitud	i
Resumen	ii
Abstract	iii
Agradecimientos	iv
Dedicatoria	v
Índice de contenido	vi
Índice de figuras	viii
Índice de gráficas	x
Índice de tablas	xi
Introducción	xii
Objetivos del proyecto de tesis	xiv
Objetivo general	xiv
Objetivo específico 1	xiv
Objetivo específico 2	xiv
Objetivo específico 3	xiv
Marco teórico / Definición de conceptos contemplados en el documento	xv
Energía limpia	xv
Biopolímeros	xv
Bioplástico	xvi

Biodegradación	xvii
Clasificación de los biopolímeros	xviii
Polisacáridos	xviii
Celulosa	xix
Ulvan	xix
Materia prima	xxi
Alga <i>Ulva Lactuca</i>	xxii
Alga <i>Ulva Papenfussii</i>	xxiii
Alga <i>Ulva Nematoidea</i>	xxiv
1. Desarrollo de métodos optimizados para la extracción y purificación de biopolímeros obtenidos a partir de algas marinas	1
Estado del arte de extracción y purificación de biopolímeros	1
Biopolímeros presentes en algas <i>Ulva</i>	1
Extracción de biopolímeros.	1
Purificación y procesamiento de los biopolímeros extraídos.	4
Análisis y comparación de métodos de extracción y purificación de biopolímeros	7
Análisis de los procesos de extracción y purificación existentes.	7
Comparación de distintos métodos y parámetros para la extracción y purificación.	10
Selección y descripción del procedimiento óptimo para la extracción y purificación de los biopolímeros	12
2. Experimentación / Fabricación de bioplásticos y Técnicas de caracterización	14

Secuencia del procedimiento experimental de fabricación de bioplásticos	14
Registro fotográfico.....	15
Especie <i>Ulva Nematoidea</i>.....	15
3. Resultados experimentales y análisis de propiedades mecánicas y fisicoquímicas de los bioplásticos fabricados.....	26
Rendimiento de extracción:.....	26
Resultados de caracterización de bioplásticos fabricados.....	26
Resultados de FTIR.....	27
Resultados de Ensayos de tracción.....	29
Resultados de DSC.....	31
Resultados de TGA.....	32
Impacto del proyecto	34
Impacto ambiental.....	34
Impacto económico.....	34
Conclusiones	36
Bibliografía	39

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de los bioplásticos según su procedencia

Figura 2. Proceso de descomposición de una botella fabricada con polímeros de algas marinas

Figura 3. Clasificación de los biopolímeros

Figura 4. Estructura de la celulosa

Figura 5. Estructura del Ulvan

Figura 6. Alga *Ulva Lactuca*

Figura 7. Alga *Ulva Papenfussii*

Figura 8. Alga *Ulva Nematoidea*

Figura 9. Esquema de extracción ácida y enzimática / en HCl / en etanol

Figura 10. Secuencia experimental para la elaboración de bioplásticos

Figura 11. Interior del Terminal Pesquero

Figura 12. Puesto de venta de algas en terminal pesquero

Figura 13. *Ulva Nematoidea* antes de depurar impurezas

Figura 14. Impurezas (yuyo, otras algas, etc.)

Figura 15. *Ulva Nematoidea* sin impurezas

Figura 16. *Ulva Nematoidea* en bolsa Ziploc

Figura 17. Bandeja con *Ulva Nematoidea* húmeda

Figura 18. Bandejas en horno a 40°C

Figura 19. *Ulva Nematoidea* retirada del horno luego de 48h

Figura 20. 20g de *Ulva Nematoidea* en 300mL de etanol

Figura 21. Pastillas magnéticas

Figura 22. Muestras en hornillas magnéticas

Figura 23. Vasos de precipitados luego de ser agitados por 24h

Figura 24. Filtrado de muestras en etanol con bomba de vacío

Figura 25. Muestras en horno a 40°C

Figura 26. Film básico con 0% glicerol (izquierda) y 10% glicerol (derecha)

Figura 27. Film neutro con 0% glicerol

Figura 28. Film neutro con 20% glicerol

Figura 29. Films ácidos con 0% glicerol (izquierda) y 10% glicerol (derecha)

Índice de gráficas

Gráfica 1. FTIR de films de Ulvan con pH7 (0% glicerol y 10% glicerol)

Gráfica 2. FTIR de films de Ulvan con pH13 (0% glicerol y 10% glicerol)

Gráfica 3. Curva representativa de ensayo de tracción para U. Nematodea pH7, 0% glicerol

Gráfica 4. Curva representativa de ensayo de tracción para U. Nematodea pH7, 10% glicerol

Gráfica 5. Curva representativa de ensayo de tracción para U. Nematodea pH13, 0% glicerol

Gráfica 6. Curva representativa de ensayo de tracción para U. Nematodea pH13, 10% glicerol

Gráfica 7. Termograma de DSC para U. Nematodea pH7

Gráfica 8. Termograma de DSC para U. Nematodea pH13

Gráfica 9. Gráfica de TGA para U. Nematodea pH7

Gráfica 10. Gráfica de TGA para U. Nematodea pH13

Índice de tablas

Tabla 1. Rendimiento de extracción de Ulvan

Tabla 2. Rendimiento de precipitación de Ulvan

Tabla 3. Rendimiento de extracción de Ulvan seco para distinto medios de extracción



Introducción

Cada año, cerca de 7.25 millones de toneladas de plástico son arrojadas al mar, de las cuales, aproximadamente el 50% son residuos de plásticos de un solo uso (MINAM, 2018). Esta situación repercute negativamente en la vida marina. Según la ONU, se estima que para el año 2050 haya más plástico que peces en el mar. El desecho de estos materiales en el océano contribuye al calentamiento global debido a la emisión de gases de efecto invernadero, como metano y etileno, durante su descomposición. El etileno es ampliamente utilizado en la industria química. Su producción global fue de más de 150 millones de toneladas en 2016. La mayor parte de la producción está destinada al polietileno, que es el polímero sintético más producido y desechado a nivel mundial y el que emite mayor cantidad de metano y etileno durante su descomposición (ONU, 2018).

Además del polietileno como uno de los plásticos más contaminantes en la actualidad, se encuentra el poliestireno (PS). El poliestireno es un derivado del petróleo, como los plásticos comercializados actualmente. Uno de las presentaciones más comunes del poliestireno es el poliestireno expandido (EPS), la cual puede encontrarse en diversos artículos de uso diario como platos y vasos descartables, empaque de alimentos, etc. El motivo por el cual el EPS no es reciclado es por su baja densidad, ya que cerca del 75% de su volumen es aire, además que, debido a su uso, una vez terminada su función, se encuentra con restos de comida y grasas, lo que hace necesario un lavado antes de intentar reciclarlo. La fabricación del EPS es dañina para los trabajadores de la planta, así como para las personas que depositan sus alimentos en productos de este material, ya que este desprende sustancias nocivas cuando tiene contacto con el calor.

Los plásticos sintéticos tradicionales, que son fabricados a base de petróleo y utilizados en la industria y en actividades se presentan como un problema latente, ya que son una de las mayores fuentes de contaminación en el mundo. Generalmente, estos no son reciclables o

reutilizables debido a su composición, motivo por el cual se acumulan y terminan, en su mayoría, en el mar. Esto se debe a que tienen un tiempo de descomposición elevado. En algunos casos, este tiempo alcanza un promedio de al menos 400 años debido a los aditivos que contienen (WWF, 2018).

La alternativa que presenta utilizar algas como fuente de biopolímeros para la elaboración de bioplásticos se respalda en la gran abundancia de algas presentes en el mar, así como la baja necesidad de recursos o espacio para el cultivo y cuidado de estas. Esta especie de algas se presenta como un recurso barato, abundante y fácil de recolectar. Esto aportará a su valor tecnológico como materia prima para la producción de bioplásticos. Sin embargo, aún se debe profundizar sobre los alcances que puedan tener las aplicaciones del *Ulva* presente en las mismas.

Como respuesta al problema descrito, el presente proyecto tiene como objetivo el desarrollo de métodos de fabricación de láminas de bioplástico obtenido a partir de biopolímeros de algas *Ulva*, para lo cual, se plantearán diferentes rutas de extracción de biopolímeros y serán procesados haciendo uso de distintos métodos con el fin de determinar los parámetros de fabricación óptimos (temperatura, tiempo, rpm, humedad relativa, entre otros). También se evaluará el uso de plastificantes para poder mejorar las propiedades fisicoquímicas de las láminas obtenidas. Se evaluará el rendimiento del procedimiento realizado y ensayos de caracterización de material basados en normas o estándares de alcance internacional.

Objetivos del proyecto de tesis

Objetivo general

Desarrollar métodos de fabricación de bioplásticos tomando como materia prima los biopolímeros presentes en las algas marinas.

Objetivo específico 1.

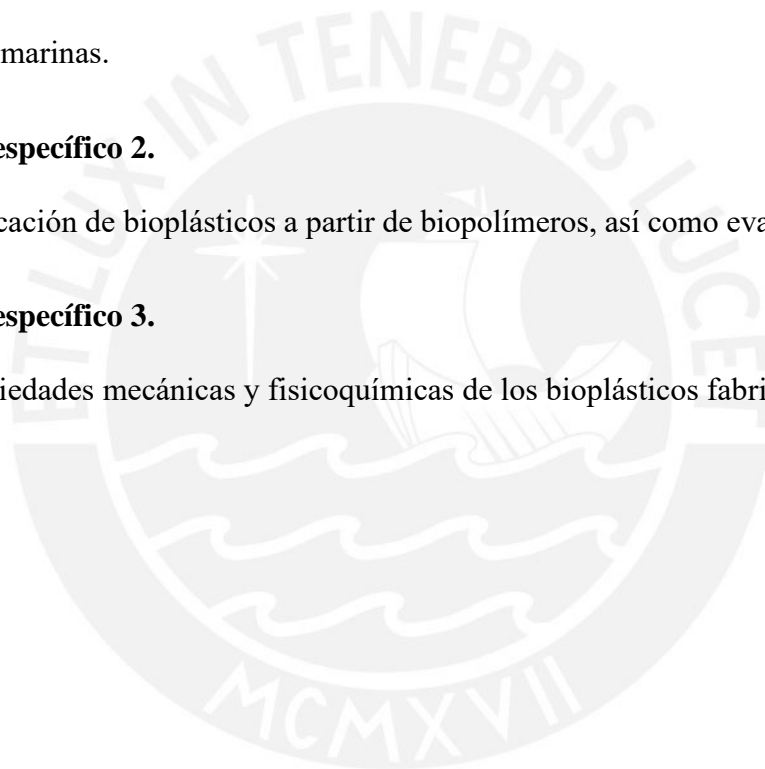
Desarrollar procesos optimizados para la extracción y purificación de biopolímeros obtenidos a partir de algas marinas.

Objetivo específico 2.

Realizar la fabricación de bioplásticos a partir de biopolímeros, así como evaluar los procesos.

Objetivo específico 3.

Evaluar las propiedades mecánicas y fisicoquímicas de los bioplásticos fabricados.



Marco teórico / Definición de conceptos contemplados en el documento

Energía limpia

Procede de las energías renovables. Tiene una mayor variedad y versatilidad de fuentes que las energías obtenidas de combustibles fósiles. Su obtención no produce gases de efecto invernadero ni emisiones contaminantes. Su principal característica es que este tipo de energías tienen una fuente inagotable.

Según las previsiones de la Agencia Internacional de la Energía (AIE), la presencia o participación de este tipo de energía en el suministro global pasará de ser del 26% en el 2018 a ser del 44% en 2040. También, predicen que la demanda eléctrica mundial aumentará un 70% hasta el 2040.

Entre los tipos más comunes de energías renovables existentes, se encuentran

- Energía eólica
- Energía solar (fotovoltaica)
- Energía hidráulica o hidroeléctrica
- Biomasa y biogás
- Energía geotérmica
- Bioetanol
- Biodiésel

Biopolímeros

Un biopolímero es aquel polímero que ha sido obtenido de fuentes renovables de origen vegetal, animal, microbiano, entre otros. Debido a que estos materiales son generalmente compuestos de carbono, eliminan el carbono de la atmósfera y, por lo tanto, se considera que tienen un balance favorable de CO₂. El reciclado no es una opción factible para todos los tipos de plásticos. Los biopolímeros proponen una solución desde el inicio de su proceso productivo.

Estos pueden procesarse a través de los mismos procedimientos que los plásticos convencionales (extrusión, inyección o soplado).

Bioplástico

Se conoce a una bioplástico como un plástico de origen natural y/o biodegradable.

La Asociación Europea de Bioplásticos (European Bioplastics) clasifica estos materiales en dos categorías principales:

- Plásticos procedentes de biomasa / recursos naturales
- Polímeros biodegradables (deben cumplir con una serie de estándares de biodegradabilidad y compostabilidad)

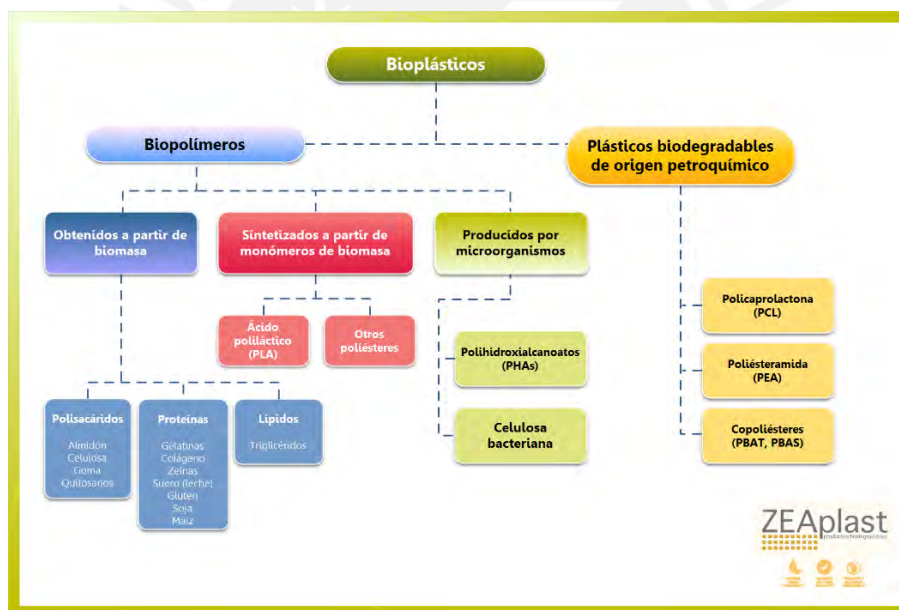


Figura 1. Clasificación de los bioplásticos según su procedencia

Fuente: <http://www.zeaplast.cl/plasticos-biodegradables/tipos-de-bioplásticos+-21>

Existen subcategorías para clasificar a los bioplásticos

- Bioplásticos procedentes total o parcialmente de fuentes renovables: bioplásticos cuyos monómeros proceden de la biomasa (almidón, celulosa)

- Bioplásticos sintetizados por vía biotecnológica: obtención biotecnológica de monómeros con posterior polimerización por vía química y fermentación microbiana.
- Polímeros biodegradables sintéticos (no procedentes de fuentes renovables): bioplásticos conformados por monómeros polimerizados procedentes de fuentes fósiles.

Biodegradación

La biodegradación hace referencia al ataque de microorganismos (hongos o bacterias) a los polímeros, proceso a través del cual se obtiene la desintegración del polímero en pequeños fragmentos debido a la ruptura de enlaces en su cadena principal. Los productos resultantes de este proceso de descomposición son dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), agua (H_2O) y biomasa. La descomposición puede ser aeróbica o anaeróbica, dependiendo del medio en el que se encuentren los residuos de los productos de bioplástico (al aire libre, en el agua, bajo tierra, etc.)

La biodegradación se divide en dos etapas:

- Biodegradación primaria: La molécula pierde sus propiedades físico-químicas debido a alteraciones estructurales.
- Biodegradación secundaria: La sustancia química es metabolizada por los microorganismos como fuente de carbono y energía.



Figura 2. Proceso de descomposición de una botella fabricada con polímeros de algas marinas

Fuente: <https://muhimu.es/medio-ambiente/botella-algas-biodegradable/>

Clasificación de los biopolímeros

Los biopolímeros se pueden clasificar según su fuente. Polímeros basados en recursos renovables (extraídos directamente de la biomasa), polímeros biodegradables basados en monómeros bio-derivados y biopolímeros sintetizados por microorganismos.

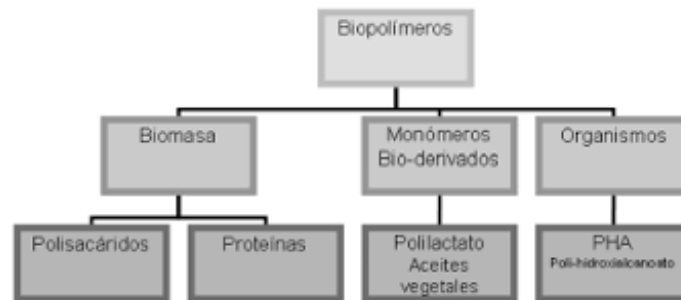


Figura 3. Clasificación de los biopolímeros

Fuente: (Fernando Valero-Valdivieso et al., 2013)

Polisacáridos

Dentro del grupo de biopolímeros extraídos directamente de la biomasa, se encuentran los polisacáridos.

Los polisacáridos son moléculas formadas por la unión de monosacáridos mediante enlaces glicosídicos (generalmente, por más de 10 monosacáridos). Son carbohidratos, es decir, se conforman por carbono, hidrógeno y oxígeno. Desempeñan funciones de reserva energética en el caso del glucógeno y el almidón, o de función estructural, como es en el caso de la celulosa.

Existen dos tipos de polisacáridos:

- Homopolisacáridos: conformados por solo un tipo de monosacárido. (celulosa)
- Heteropolisacáridos: conformados por más de un tipo de monosacárido.

Celulosa

La celulosa es un polisacárido estructural que constituye el principal componente de la pared de las células vegetales. Se forma por la unión de moléculas de glucosa mediante enlaces glucosídicos. Este tipo de polímeros se produce mediante modificación química de la celulosa natural. Dentro de sus principales representantes, están los biomateriales compuestos de celulosa. Los polímeros de celulosa pueden ser utilizados en procesos de extrusión y moldeo.

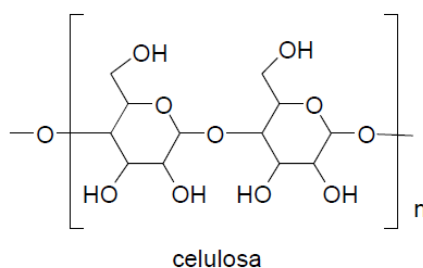


Figura 4. Estructura de la celulosa

Fuente: <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-03.php>

Ulvan

El Ulvan es un polisacárido de la pared celular que compone entre el 9 y el 36% del peso seco de la biomasa de la *Ulva* y está compuesto principalmente por ramnosa sulfatada, ácidos urónicos y xilosa. La ramnosa es de interés por su efecto en las vías biosintéticas en la dermis y en la inmunidad de la planta. Los ácidos urónicos y sus ésteres de sulfato son constituyentes en los glicosaminoglicanos (GAGs). Al igual que los GAGs, el Ulvan tiene una estructura predominante repetitiva de disacáridos compuesta de un ácido urónico enlazado a una azúcar sulfatada neutral y, por lo tanto, es un candidato para la modulación de procesos y funciones llevadas a cabo por los polisacáridos. En este aspecto, el Ulvan tiene potenciales aplicaciones en la ciencia de los biomateriales, nutracéuticos, agricultura y la industria alimentaria (Kidgell et al., 2019).

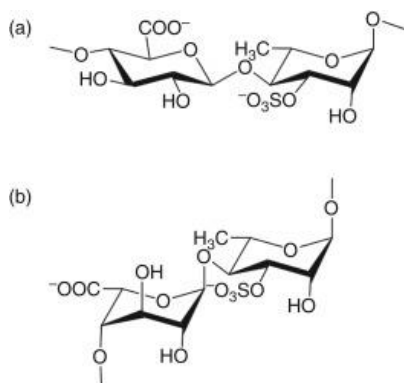


Figura 5. Estructura del Ulvan

Fuente: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/Ulvan>

La composición del Ulvan dependerá principalmente de la especie de su fuente de extracción, eco-fisiología y los procedimientos de procesamiento utilizados para preparar tanto a la biomasa como al Ulvan. Las variaciones en la composición debidas a los factores eco-fisiológicos pueden ampliarse por diferentes técnicas de extracción y análisis. La conformación del Ulvan en soluciones está parcialmente determinada por su composición y ha sido descrita a través de modelamiento molecular y evidencia empírica.

Las propiedades biológicas de los polisacáridos, incluyendo al Ulvan, están directamente relacionadas a su estructura química. Por lo tanto, es importante entender cómo los procesos de extracción, aislamiento y purificación afectan a la estructura química del polisacárido extraído y, como consecuencia, sus propiedades biológicas.

Materia prima

Generalmente, las algas se pueden dividir en dos grupos, microalgas y macroalgas. A pesar de que especies de ambos grupos tienen potencial para la fabricación de bioplásticos, el presente proyecto se centrará en las macroalgas. Este tipo de algas presenta, en su mayoría, un color verde, rojo o marrón/pardo. La producción y proliferación natural de algas supera a la de los cultivos terrestres.

Además de contar con mayor disponibilidad, ser más baratas y ecológicas, las macroalgas absorben el CO₂ durante la fotosíntesis, reducen la acidez del océano y aportan positivamente frente al calentamiento global. Las algas producen polisacáridos mientras se van desarrollando, los cuales pueden ser aprovechados como biomaterial en la fabricación de bioplásticos o como aglomerantes. Adicionalmente, posterior al final del tiempo de vida de los bioplásticos fabricados a base de algas, estos no generan microplásticos contaminantes como los plásticos tradicionales a base de petróleo. Debido a su alto contenido de polisacáridos, las algas se presentan como un componente ideal para hacer láminas de polisacáridos. Las propiedades químicas y físicas dependerán de la especie elegida. Sin embargo, las láminas (*films*) fabricadas a partir de derivados de algas son considerablemente más caras que el plástico convencional. Recientemente, estudios mostraron que realizar estas láminas directamente de algas en vez de derivados resulta en una alternativa más económica y que no implica tratamientos químicos en su fabricación ni generan efectos negativos. A pesar de que los plásticos producidos a partir de algas se caracterizan por tener una baja resistencia mecánica y son vulnerables al vapor de agua, la mezcla de diferentes especies como materia prima ayuda a mejorar el desempeño de los productos obtenidos.

Puntualmente, las macroalgas verdes, comúnmente, presentan un mayor contenido de celulosa en su pared celular y almacenan más carbohidratos como almidón. También, los polisacáridos presentes en las algas verdes se asemejan más a los de plantas terrestres en comparación de las

algas rojas y pardas. Dentro de las algas verdes, la especie *Ulva* es popular en la producción de bioplásticos. Esto se debe a su alto contenido de polisacáridos y abundancia, además de que su contenido de Ulvan tiene como propiedad la formación de capas o láminas, y su celulosa puede ser aprovechada como refuerzo o como relleno o sellador.

La especie *Ulva* puede almacenar hasta un 45% de polisacáridos en su pared celular, Ulvan (9-36%), celulosa (1-15%), xiloglucano y glucoronano. El Ulvan es un polisacárido aniónico sulfatado compuesto principalmente por xilosa y ramnosa enlazadas a ácidos urónicos. Puede formar capas termorreversibles gracias a sus propiedades fisicoquímicas. En la actualidad, se emplea una amplia variedad de métodos de síntesis está utilizando la *Ulva sp.*, como la extracción y precipitación en agua caliente, extracción ácida y enzimática, entre otras.

El Ulvan se mezcla con otros polímeros como el PVC, PVA y PEO para poder mejorar las propiedades mecánicas de las láminas fabricadas. El resto de especies de algas verdes son comúnmente descartadas para la producción de bioplásticos, o son utilizadas como relleno en vez de componentes de la matriz de los productos generados. Sin embargo, es necesaria mayor investigación en diferentes especies para poder ampliar el campo de los bioplásticos producidos a base de algas marinas.

Alga *Ulva Lactuca*



Figura 6. Alga *Ulva Lactuca*

Fuente: <http://coralecolab.com/index.php/productos/cel-algas/14-cel-ulva>

La *Ulva Lactuca* es un alga verde que crece en la mayoría de los océanos del mundo. Hablando específicamente en el litoral peruano, esta especie de alga se encuentra abundante en aguas tranquilas, como la Bahía de Paracas, Pucusana, Callao, Ancón y Paita. Esta especie de alga se conoce también como “lechuga de mar”; actualmente, su uso principal está en el ámbito alimentario. Sin embargo, su alta abundancia ha generado interés en utilizarla para aplicaciones industriales.

La especie *Ulva* pertenece a las algas ulvales (chlorophyta), un tipo de alga muy común a nivel mundial. La oportuna habilidad de crecimiento de esta especie la vuelve un gran candidato para el reciclaje de agua proveniente de sistemas de la acuicultura. Actualmente, las algas recolectadas son destinadas cumplir la función de composta o para la producción de biocombustibles.

Alga *Ulva Papenfussii*



Figura 7. Alga *Ulva Papenfussii*

Fuente: http://www.imarpe.pe/imarpe/index2.php?id_seccion=I01390200000000000000

Esta especie de *Ulva* se caracteriza por tener un color verde claro a intenso de hasta 20cm de alto. Sus hojas son redondeadas, delgadas y suaves al tacto, con bordes lisos y talos polimórficos. La *Ulva Papenfussii* puede reproducirse de manera asexual (tetrasporas) y de manera sexual (isogamia).

Esta alga se encuentra en las regiones de Piura, Lambayeque, La Libertad y Tacna. Generalmente, se encuentra en zonas intermareal, en chacras o rocas sublitorales hasta 20m. Como esta especie tolera bajas salinidades, se le puede hallar en estuarios y en zonas donde existen aportes nitrogenados.

Según el catálogo digital de la Biodiversidad Acuática del Perú, es la especie de *Ulva* de mayor tamaño en el área, superando los 30cm de longitud. Se encuentra en el Perú desde Paita (Piura) hasta Pisco (Ica) y habita sobre sustratos rocosos en el intermareal inferior y submareal hasta 5m de profundidad.

Actualmente, una de sus aplicaciones es la de aditivo para alimentos de aves de corral.

Alga *Ulva Nematoides*

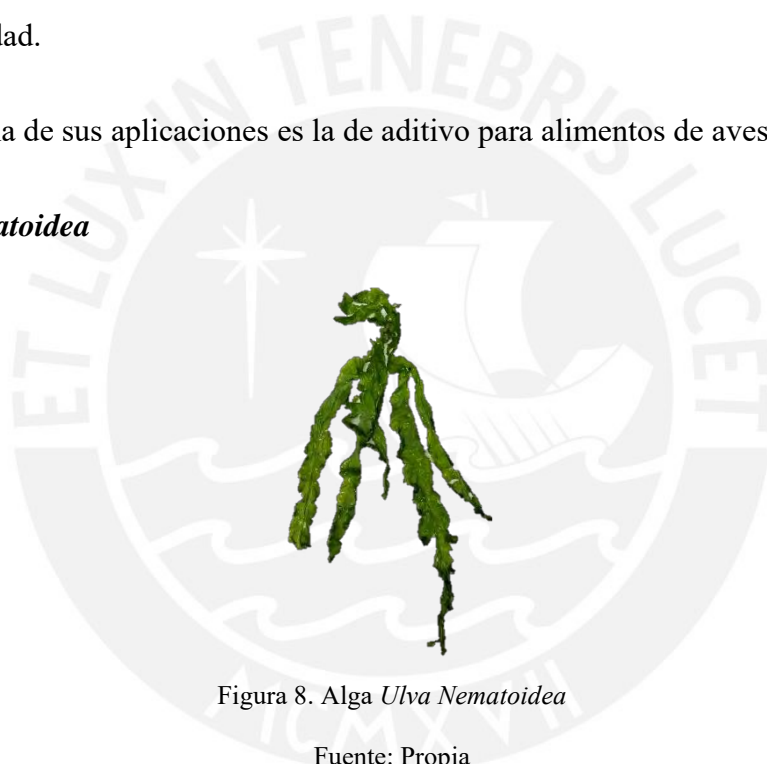


Figura 8. Alga *Ulva Nematoides*

Fuente: Propia

Esta especie es abundante en el intermareal de zonas protegidas del oleaje. En el submareal, es registrada en los primeros 5 metros de profundidad.

Sus características son un tallo folioso alargado color intenso que alcanza de 20 a 25cm de largo, escasamente ramificado y con márgenes contorneados. Presenta hojas muy delgadas y translúcidas de textura lisa. Los bordes de sus hojas presentan irregularidades.

En el laboratorio, se encontraron algas *Ulva Nematodea* de hasta 50cm de largo.

El interés actual en las fuentes renovables para la producción de químicos y polímeros presenta a la biomasa proveniente de las algas *Ulva* como una fuente potencial por ser explorada.



1. Desarrollo de métodos optimizados para la extracción y purificación de biopolímeros obtenidos a partir de algas marinas

Estado del arte de extracción y purificación de biopolímeros

En el presente capítulo, se identificarán los métodos existentes para realizar la extracción de sustancias poliméricas presentes en las algas verdes, así como su posterior purificación y procesamiento.

Biopolímeros presentes en algas *Ulva*

Entre los polímeros sintetizados por la especie de algas *Ulva*, los polisacáridos de la pared celular conforman entre el 38% y el 54% de la masa del alga seca. Estos incluyen cuatro familias de especies de polisacáridos: dos mayores, el Ulvan soluble en agua y la celulosa insoluble, y dos menores, xiloglucano lineal álcali-soluble y glucuronano (Lahaye & Robic, 2007), (Robic et al., 2009).

Los trabajos más recientes realizados en las células de la pared celular de la *Ulva* se han dirigido principalmente al Ulvan debido a que sus características fisicoquímicas y biológicas son de particular interés para aplicaciones alimentarias, farmacéuticas, agrícolas.

El Ulvan es un polielectrolito aniónico que contiene grupos carboxílicos y sulfatos en su estructura. Está compuesto principalmente por sulfato, ramnosa, xilosa y ácido glucurónico, y también glucosa y proteínas en menores cantidades.

Extracción de biopolímeros.

Según Kidgell, Magnusson, de Nys y Glasson (2019), la selección de las condiciones de extracción depende generalmente de las propiedades fisicoquímicas de la molécula del Ulvan y las interacciones de esta con los demás componentes de la pared celular. Se utilizan 3 criterios para la determinación de las condiciones óptimas para la extracción del Ulvan:

1. Alto rendimiento

2. Alta selectividad
3. Baja degradación

Para abordar estos criterios, se deben revisar las propiedades fisicoquímicas de las macromoléculas predominantes en la *Ulva*, así como revisar recomendaciones literarias sobre los métodos más apropiados para la extracción enfocado en la aplicación del biopolímero.

Los factores que afectan el rendimiento de la extracción realizada son

- Propiedades de la biomasa y su pre-tratamiento
- Temperatura de la extracción
- Extractor y la relación extractor-biomasa
- Tamaño de partícula de la biomasa
- Tiempo de duración de la extracción

Las propiedades fisicoquímicas que influyen en el rendimiento de la extracción incluyen su relativa baja solubilidad en condiciones acuosas y la estabilización de la pared celular, predominada por sus interacciones con cationes divalentes.

La solubilidad del Ulvan y su interacción intermolecular depende de los niveles de pH. En la práctica, la conformación en forma de cuencas del Ulvan tiende a la formación de agregaciones a niveles ácidos y neutrales de pH y estas agregaciones se dispersan en niveles de pH menores al pKa de ácidos urónicos, lo que permite una mayor solubilidad del Ulvan.

Dadas estas propiedades fisicoquímicas de las macromoléculas de la *Ulva*, se puede realizar una selección de las condiciones para la extracción para aumentar la eficiencia y la selectividad del Ulvan extraído y también limitar su degradación.

El rendimiento en la extracción del Ulvan puede variar significativamente entre distintos grupos de algas recolectadas de distintos lugares, debido a las condiciones ambientales (luz,

temperatura) del lugar de recolección. Por lo tanto, para realizar una evaluación efectiva, es recomendable comparar los rendimientos obtenidos en grupos de algas recolectadas en un mismo lugar.

Con respecto al pre-tratamiento de la biomasa, la reducción de la sal presente en la biomasa a través de una extracción en agua caliente mejora el rendimiento de la extracción del Ulvan.

La solubilidad del Ulvan mejora para temperaturas altas, entre 80 y 90°C, la temperatura es menor a la temperatura de ebullición del agua para evitar degradaciones en el Ulvan (*depolymerization*, desulfatación). Sin embargo, altas temperaturas promueven las interacciones con demás componentes de la pared celular, lo que puede disminuir la solubilidad. Como resultado, se utilizan extractores como quelantes y ácidos para poder superar la integridad estructural de la pared celular y así poder incrementar la eficiencia de la extracción. Las extracciones con quelantes están dirigidas a niveles neutros o cercanos a neutro de pH y a alta temperatura (80-90°C). El rendimiento aumenta cuando el nivel de pH es ajustado a 4.5. Extracciones en medios ácidos (como el HCl), generalmente, obtienen un mayor rendimiento.

La selectividad del Ulvan por sobre otros polisacáridos puede inferirse al comparar las proporciones molares entre ramnosa y ácidos urónicos o xilosa de extractos obtenidos mediante el uso de distintos extractores. La literatura indica que, según estudios, es importante la influencia del nivel de pH al momento de evaluar la selectividad del Ulvan. La selectividad mejora a niveles bajos de pH, sin embargo, esto puede conducir a mayores niveles de degradación estructural del Ulvan obtenido.

La degradación de la estructura del Ulvan durante el proceso de extracción podría reducir o aumentar su funcionalidad para la aplicación destinada. El Ulvan puede degradarse fácilmente luego de una extracción realizada en medios químicos o enzimáticos. Una muestra de Ulvan

con degradación mínima es considerada como un producto versátil. Las dos características más afectadas por la degradación del Ulvan son el grado de polimerización y el grado de sulfatación.

Purificación y procesamiento de los biopolímeros extraídos.

Los métodos de aislamiento y purificación del Ulvan están relacionados a la disponibilidad de recursos y al enfoque del estudio. El aislamiento es la separación del extracto de la biomasa residual y la eliminación del solvente. La purificación implica la separación del Ulvan de otros solutos. En la práctica, estos dos pasos no son mutuamente exclusivos. Es importante notar que los métodos de aislamiento y purificación influyen las propiedades fisicoquímicas y biológicas del Ulvan. Se esperan 2 resultados: alta recuperación y producto puro.

Posterior a la extracción del Ulvan, el extracto es separado de la biomasa residual mediante filtración y/o centrifugación previa al aislamiento del Ulvan por precipitación, evaporación por ultrafiltración y liofilización.

La precipitación por etanol es el método más empleado experimentalmente. Típicamente, la adición de etanol (por ejemplo, al 70-96%) a un extracto concentrado es adecuado para precipitar el Ulvan, mientras que los compuestos solubles en etanol se mantienen en la solución. Sin embargo, la precipitación por etanol está limitada por la baja solubilidad de sales y la alta solubilidad de Ulvan de bajo peso molecular en mezclas de agua y etanol. Consecuentemente, la precipitación puede llevarnos a obtener interpretaciones erróneas de rendimiento y de propiedades fisicoquímicas. Una desalinización eficiente de extractos de Ulvan puede obtenerse a través de diálisis, ultrafiltración y cromatografía.

La diálisis y la ultrafiltración permiten la reducción o remoción de excesos de sales y moléculas pequeñas que podrían contaminar el extracto de Ulvan. La diálisis es altamente efectiva en remover los excesos de sales en muestras analíticas y para otras aplicaciones que requieran una cantidad baja de residuos.

La ultrafiltración es generalmente un proceso de dos etapas:

1. Concentración: reducción de volumen
2. Diafiltración

El rango de valores del corte de peso molecular (MWCO) para el Ulvan está generalmente entre 3.6 y 12 kDa. Para la diálisis, la selección del tamaño de poros está basada en la retención de Ulvan y en la relación de flujo de permeado, lo cual disminuye junto al tamaño de poros. El equilibrio entre la retención del Ulvan y el tiempo de la ultrafiltración está optimizado aproximadamente en 10 kDa MWCO.

Técnicas cromatográficas para la purificación de Ulvan:

- Cromatografía con intercambio de aniones (AEC): eliminación de proteínas e impurezas de polisacáridos neutros
- Cromatografía con exclusión de tamaño (SEC): determinación de pesos moleculares y distribuciones de peso molecular

Idealmente, la elección de las técnicas de extracción limitará las opciones para la co-extracción de impurezas de macromoléculas, así como la necesidad de emplear técnicas de purificación más intensas. La sal es la impureza más significativa y es más eficiente eliminarla por diálisis o ultrafiltración.

Dependiendo del proceso de extracción empleado, la proteína también deberá ser eliminada en medios químicos o enzimáticos, e incluso técnicas cromatográficas. Las técnicas cromatográficas son más reproducibles y permite obtener fracciones de Ulvan altamente purificadas. En la práctica, la selección estratégica de los procedimientos de extracción, aislamiento y purificación deben hacerse basándose en los recursos disponibles.

La duración de la diálisis es, usualmente, no mayor a 36 horas, de lo contrario, la bolsa de diálisis se pondría mohosa. La bolsa de diálisis debe ser preparada antes de su uso. Usualmente se les coloca en agua hirviendo por 30 minutos para poder eliminar impurezas que puedan contener. Generalmente, las bolsas de diálisis son estables en un rango de pH entre 5 y 9, por lo cual, el extracto de la solución del polisacárido debe estar en ese rango de niveles de pH antes de la diálisis (Shi, 2016).

Shi propone 4 métodos para la eliminación de proteínas en los extractos:

-Método de enzimas: utilizar proteasa para hidrolizar o digerir proteínas en la solución del extracto. Uno de los métodos más usados es el tratamiento de digestión de pronasa; por ejemplo, se ajusta el nivel de pH de la solución entre 7 y 8, se agrega pronasa y se digiere en 2 a 4 horas a 37°C. Luego de la digestión, la solución deberá calentarse en agua hirviendo por 5 minutos para evitar la reacción.

-Método Sevag: de acuerdo a la característica de que las proteínas pueden desnaturalizarse en cloroformo, se agrega cloroformo a la solución acuosa del polisacárido (pH 4-5) en una proporción de 1 a 5 en volumen, posteriormente se agrega n-butanol. La proporción del butanol al cloroformo es de 1 a 5 en volumen. Luego, sacudir la mezcla fuertemente por 20 minutos. Las proteínas desnaturalizadas pueden retirarse mediante centrifugado. Este método no es muy severo en términos de reacción de los materiales, pero el punto negativo es que tiene una eficiencia muy baja. Adicionalmente, el procedimiento debe realizarse unas 5 veces para poder eliminar efectivamente las proteínas. El método Sevag es empleado usualmente para la eliminación de proteínas de polisacáridos microbianos.

-Método de triclorotrifluoroetano: se agrega una cantidad en volumen de triclorotrifluoroetano igual a la de la solución del extracto a condición de enfriamiento (usualmente 4°C). La mezcla se mueve por 10 minutos, las proteínas en la solución aparecerán en forma de jalea/gelatina.

Este método se aplica a bajas temperaturas debido al bajo punto de ebullición del triclorotrifluoroetano (47.7°C) y a su volatilidad, lo que limita la ampliación de su aplicación.

-Método de ácido tricloroacético (ATC): el extracto de la solución del polisacárido se debe enfriar previamente. Posteriormente, se agrega el ATC lentamente a una concentración entre 15% y 30% en peso mientras se remueve hasta que no se formen precipitados. Debido a la acidez del ATC y que este pueda causar una degradación en los polisacáridos extraídos, la mezcla se conserva por un tiempo de 4 horas a bajas temperaturas (usualmente 4°C) y luego se centrifuga para poder obtener una solución de extracto sin proteínas.

La purificación de los polisacáridos consiste en la purificación de los polisacáridos mixtos aislados para poder obtener varios polisacáridos homogéneos. Es difícil distinguir al aislamiento de la purificación debido a que, generalmente, el aislamiento incluye algún tipo de purificación. Por el otro lado, la purificación también contiene procedimientos de aislamiento a veces.

Análisis y comparación de métodos de extracción y purificación de biopolímeros

Análisis de los procesos de extracción y purificación existentes.

De acuerdo a la bibliografía sobre el efecto de las condiciones de extracción en el rendimiento y la pureza del Ulvan extraído de la *Ulva Lactuca*, el rendimiento de la extracción está calculada por la siguiente fórmula (Yaich et al., 2013):

$$\text{Rendimiento de extracción [\%]} = \frac{\text{Peso del precipitado}}{\text{Peso seco del alga}} * 100$$

En el estudio mencionado, se realizaron extracciones calentando 60 gramos de polvo de algas en 1 litro de solución de ácido clorhídrico (pH 1.5 y pH 2) centrifugado a 250 rpm en un matraz de acero inoxidable con chaqueta con un baño termostático en un proceso discontinuo a 80 y

90°C. A cada uno de los valores de pH y temperatura, se extrajeron las muestras luego de 1, 2 y 3 horas.

Luego de la extracción, se filtraron las muestras con estameñas y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. El filtrado se centrifugó a 10°C por 20 minutos a 10,000 rpm para remover las partículas sólidas. El supernadante se filtró con papel filtro Whatman nro. 1 para remover las impurezas y el filtrado obtenido se llamó “Jugo de extracto”. El pH del jugo se ajustó a 3.5 con 1 M de hidróxido de sodio.

Para la precipitación del Ulvan, se añadieron 3 volúmenes de etanol al 96% a un volumen de jugo de extracto. El precipitado de alcohol es separado de los supernadantes por centrifugación a 5,000 rpm por 20 minutos a 10°C. Luego, el precipitado, de alcohol fue lavado 3 veces con etanol al 50%, 75% y 100% y centrifugado al a 5,000 rpm por 10 minutos a 10°C. Finalmente, se secó al vacío a 40°C y luego se molió utilizando un molino centrífugo.

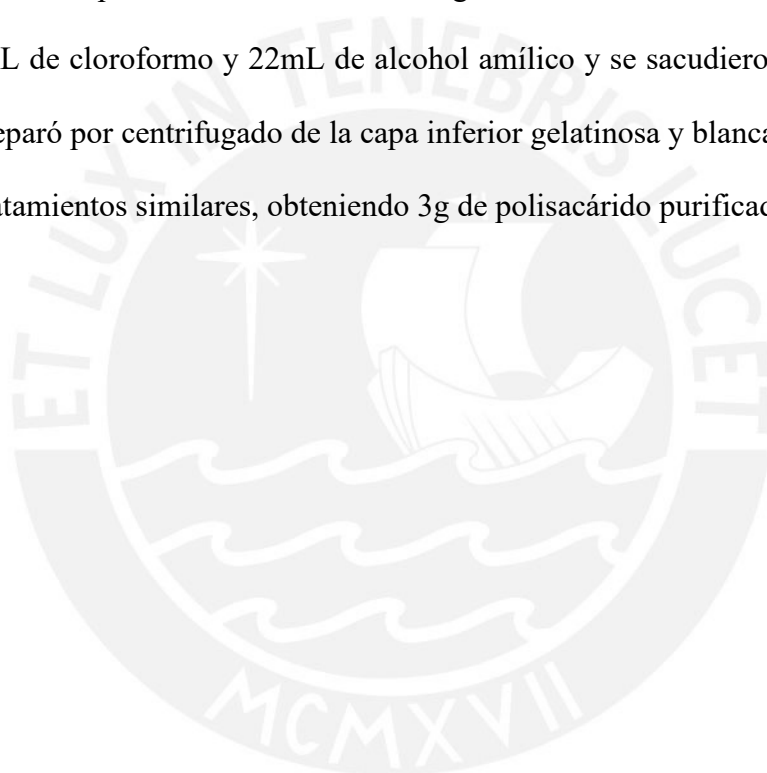
Se usó una muestra de 100 gramos de *Ulva Lactuca*, lavada y seca. Se extrajeron sus pigmentos con acetona fría al 85%. Posteriormente, calentaron la muestra con una solución de carbonato de sodio al 0.5% y 0.25% con agua hirviendo. Los extractos combinados se concentraron a 85°C en un volumen aproximado de 10L, posteriormente decantados de un residuo de sales de calcio. Luego, se agregó ácido clorhídrico en una etapa más avanzada de la concentración para poder mantener el nivel de pH entre 7 y 8. El extracto neutralizado se dializó en 0.02N-ácido acético, seguido por agua destilada. (Joyce E Brading et al., 1954)

Las impurezas inorgánicas faltantes (ceniza, calcio, fierro y sulfato) se eliminaron de una solución acuosa al 1% del carbohidrato por “Zeocarb 215(H)”, seguido de diálisis. La sal de sodio se preparó por neutralización con hidróxido de sodio concentrado en 400mL y precipitado en etanol (4L).

El producto fibroso se convirtió en un polvo higroscópico (~20g) por trituración con etanol y éter. Se obtuvo ácido con 0.2 en H₂O, sal de sodio con 0.35 en H₂O, sulfato de las cenizas de la sal de sodio. La oxidación de la sal de sodio con yodo alcalino en un regulador de carbonato-bicarbonato mostró un grupo oxidable presente en 3450g de polisacárido ácido.

La estimación del ácido urónico por determinación del dióxido de carbono liberado en la destilación con ácido clorhídrico al 13.15% mostró residuos de ácido urónico en 913g.

Para la eliminación de proteína, se disolvieron 10g de sal de sodio en 300mL de agua. Se agregaron 225mL de cloroformo y 22mL de alcohol amílico y se sacudieron por 6 horas. La fase acuosa se separó por centrifugado de la capa inferior gelatinosa y blanca. Posteriormente, se le dieron 4 tratamientos similares, obteniendo 3g de polisacárido purificado.



Comparación de distintos métodos y parámetros para la extracción y purificación.

Una alta temperatura con un nivel bajo de pH (~1.3-1.5) puede resultar en niveles altos de *depolymerization* que extracciones con niveles más altos de pH (con o sin un extractor agregado). La condición de extracción más severa (90°C con pH 1.5 por 3 horas) resultó en un mayor rendimiento con el costo de un grado de *depolymerization* significativamente más alto que la condición más leve (80°C con pH 2 por 1 hora).

De acuerdo a Kidgell, Magnusson, de Nys y Glasson, la combinación de la temperatura de extracción, pH del solvente y el tiempo de duración de la extracción influyen directamente con la calidad y el rendimiento del proceso. Altas temperaturas permiten una mayor solubilidad, un nivel bajo de pH mejora la selectividad del Ulvan, y un tiempo prolongado de extracción mejora el rendimiento del Ulvan.

Nivel de pH	pH 1.5						pH 2					
Temperatura	80°C			90°C			80°C			90°C		
Tiempo de duración de la extracción	1h	2h	3h	1h	2h	3h	1h	2h	3h	1h	2h	3h
Rendimiento de la extracción [%]	43.12	51.05	57.40	52.91	55.55	61.37	49.20	50.00	55.29	50.52	58.73	56.34

Tabla 1. Rendimiento de extracción de Ulvan

Fuente de los datos: (Yaich et al., 2013)

Se concluye que las condiciones recomendadas para realizar la extracción son

- Temperatura: 80-90°C
- pH 2-4.5
- Duración: 1 a 3 horas

Según la tabla 1, los valores más altos obtenidos para la extracción de Ulvan (57.40% y 61.37%) se obtienen en un tiempo de duración de 3 horas y a un nivel de pH de 1.5 tanto para 80°C como para 90°C respectivamente.

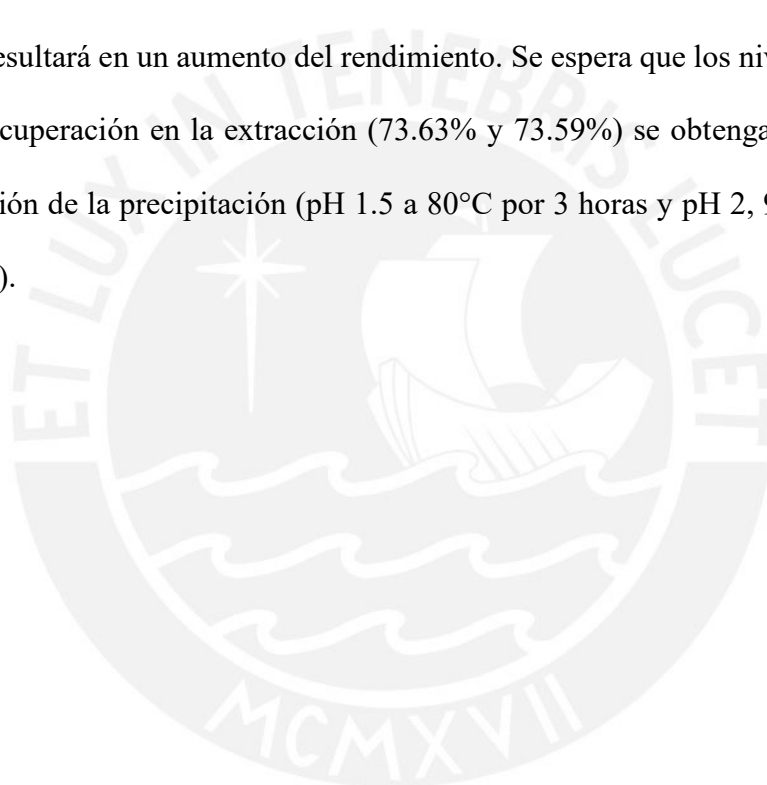
Por otro lado, los resultados más bajos (43.12% y 49.20%) se obtuvieron en 1 hora a una temperatura de 80°C para niveles de pH de 1.5 y 2 respectivamente.

Nivel de pH	pH 1.5						pH 2					
Temperatura	80°C			90°C			80°C			90°C		
Tiempo de duración de la precipitación	1h	2h	3h	1h	2h	3h	1h	2h	3h	1h	2h	3h
% de recuperación	61.02	61.20	73.63	67.05	62.93	68.92	70.79	69.05	70.75	70.47	73.59	72.69

Tabla 2. Rendimiento de precipitación de Ulvan

Fuente de los datos: (Yaich et al., 2013)

De acuerdo a la tabla, manteniendo valores constantes de pH y de tiempo de duración, aumentar la temperatura resultará en un aumento del rendimiento. Se espera que los niveles más altos de porcentaje de recuperación en la extracción (73.63% y 73.59%) se obtengan prolongando el tiempo de duración de la precipitación (pH 1.5 a 80°C por 3 horas y pH 2, 90°C por 2 horas, respectivamente).



Selección y descripción del procedimiento óptimo para la extracción y purificación de los biopolímeros

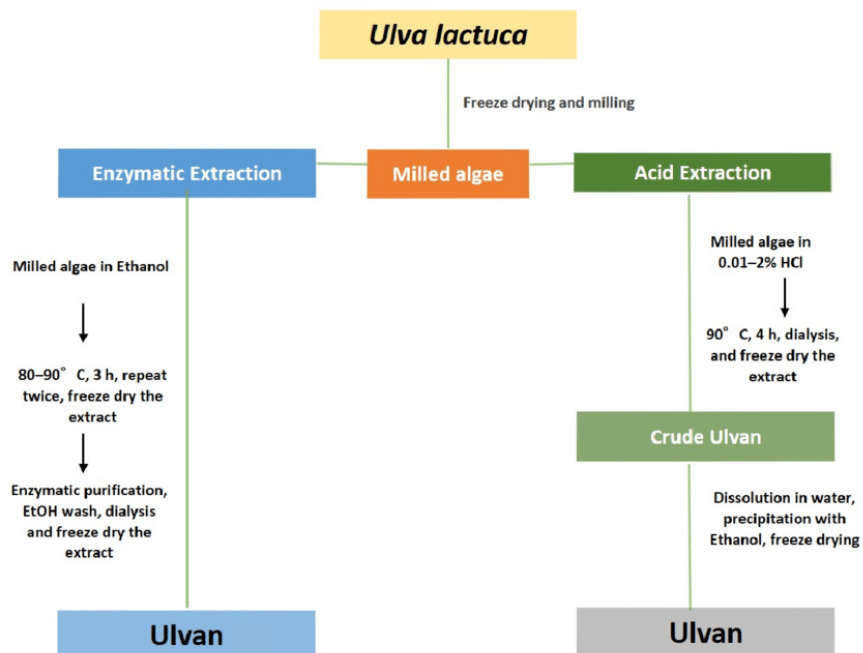


Figura 9. Esquema de extracción ácida y enzimática / en HCl / en etanol

Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-flowchart-of-the-Ulvan-extraction-method-from-Ulva-lactuca_fig3_343523900

Se tomará como referencia el procedimiento detallado para la extracción ácida en la Figura 9.

Las algas recolectadas serán limpiadas, secadas y molidas para iniciar con el proceso de fabricación del bioplástico. Se calentará 60g de polvo de algas en una solución de 1 litro de ácido clorhídrico (HCl) y se centrifugará a 250 rpm con un baño termostático en proceso discontinuo a 90°C por 3 horas y con un nivel de pH de 1.5. Según Yaich, Garna, Besbes, Paquot, Blecker y Attia, el rendimiento de extracción esperado es de 61.37%.

A continuación, la sustancia será filtrada con una estopilla. Luego se enfriará a temperatura ambiente para ser centrifugada a 10,000rpm por un tiempo de 20 minutos a una temperatura de 10°C. La sustancia obtenida de este proceso se conoce como “Jugo de extracto”. A este Jugo se le agregará 1M de hidróxido de sodio para llevar el nivel de pH a 3.5 Posteriormente, y en

relación al esquema presentado en la Figura 9, la purificación se dará por precipitación por etanol. Se añadirán 3 volúmenes de etanol al 96% por 1 volumen de Jugo de extracto. Los parámetros a considerar para la precipitación son nivel de pH de 1.5 a 80°C con un tiempo de duración de 3 horas. La mezcla será centrifugada a 5,000rpm por 20 minutos a 10°C. Luego será lavada 3 veces con etanol al 50, 75 y 100%. Finalmente, se centrifugará la sustancia a 5,000rpm por 10 minutos a 10°C. Similarmente al proceso de extracción, se espera un rendimiento de recuperación por precipitación del 73.63%.



2. Experimentación / Fabricación de bioplásticos y Técnicas de caracterización

Secuencia del procedimiento experimental de fabricación de bioplásticos

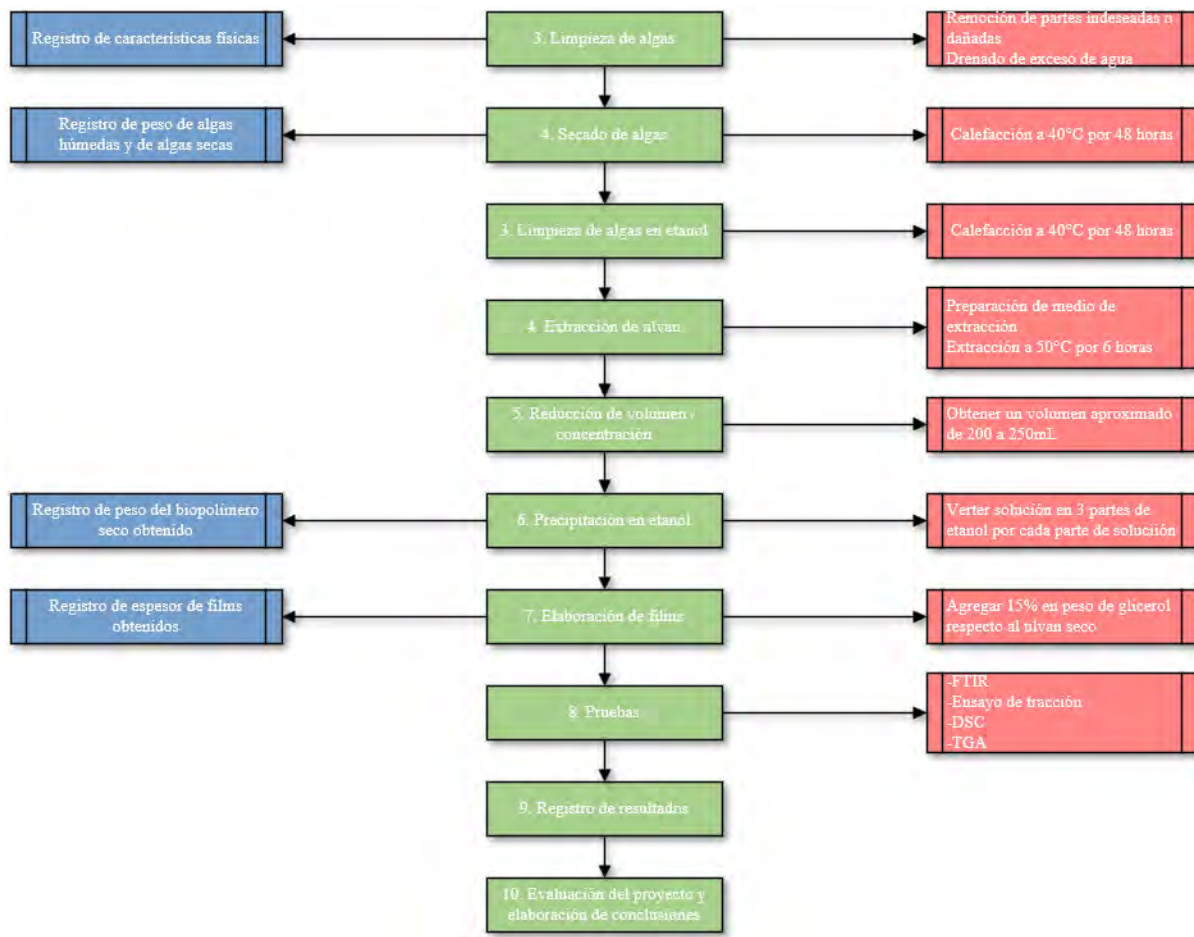


Figura 10. Secuencia experimental para la elaboración de bioplásticos

Fuente: Propia

Registro fotográfico

Especie *Ulva Nematoidea*

Pre-tratamiento.

- Compra de algas (lugar de compra: terminal pesquero de Villa María del Triunfo; lugar de recolección según vendedores: Laguna Grande – Ica, Perú; Pisco – Ica, Perú).



Figura 11. Interior del Terminal Pesquero

Fuente: Propia



Figura 12. Puesto de venta de algas en terminal

pesquero

Fuente: Propia

- Depurar impurezas.



Figura 13. *Ulva Nematoidea*

antes de depurar impurezas

Fuente: Propia



Figura 14. Impurezas

(yuyo, otras algas, etc.)

Fuente: Propia



Figura 15. *Ulva Nematoidea* sin impurezas

Fuente: Propia

- Lavar algas con agua de grifería.
- Lavar algas con agua destilada.
- Exprimir exceso de agua.

- Opcional:
 - Almacenar algas en una bolsa Ziploc.



Figura 16. *Ulva Nematoida* en bolsa Ziploc

Fuente: Propia

- Colocar bolsa en congelador
- Descongelar cuando se desee trabajar con las algas congeladas
- Colocar las algas en una bandeja metálica recubierta de papel aluminio.
- Registrar peso inicial de la muestra (peso de bandeja con aluminio, peso de bandeja con aluminio + algas húmedas).



Figura 17. Bandeja con *Ulva Nematoida* húmeda

Fuente: Propia

- Introducir la bandeja en un horno a 40°C por 48 horas (voltear las algas a las 24 horas para aportar al secado).



Figura 18. Bandejas en horno a 40°C

Fuente: Propia

- Registrar pesos de muestras luego del secado (peso de bandeja con aluminio + algas secas).



Figura 19. *Ulva Nematoides* retirada del horno luego de 48h

Fuente: Propia

- Triturar algas secas.
- Opcional:
 - Almacenar algas en una bolsa Ziploc.
 - Colocar bolsa en congelador.
 - Descongelar cuando se desee trabajar con las algas congeladas.

- Colocar 20g de algas en un vaso de precipitados de 500mL.
- Agregar 300mL de etanol.



Figura 20. 20g de *Ulva Nematodea* en 300mL de etanol

Fuente: Propia

- Agregar una pastilla magnética.



Figura 21. Pastillas magnéticas

Fuente: Propia

- Colocar el vaso de precipitados en una hornilla magnética.
 - 220 rpm
 - 24 horas
 - Temperatura ambiente (20°C)



Figura 22. Muestras en hornillas magnéticas

Fuente: Propia

- Retirar muestra de la hornilla magnética.

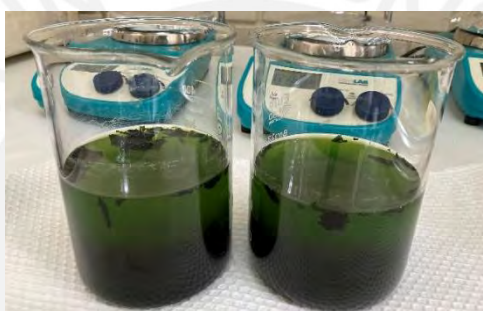


Figura 23. Vasos de precipitados luego de ser agitados por 24h

Fuente: Propia

- Retirar la pastilla magnética del vaso.
- Filtrar el etanol de las muestras usando una bomba de vacío, un matraz y papel Whatman.



Figura 24. Filtrado de muestras en etanol con bomba de vacío

Fuente: Propia

- Recolectar etanol y desecharlo.

- Colocar la muestra en un horno a 40°C por 48 horas.



Figura 25. Muestras en horno a 40°C

Fuente: Propia

Extracción.

- Preparar el medio de extracción.
- Medio básico: NaOH 0.1M
 - Preparación:
 - *Disolver 4g de NaOH 1M en 1L de agua destilada.*

- Medio neutro: Agua destilada

- Medio ácido: HCl 0.1N

- Preparación:

- Reducción de normalidad a 1N (500mL):

$$V * 12N = 500mL * 1N$$

$$V = 41.6mL \rightarrow V = 40mL$$

→ *Diluir 40mL de HCl 12N en 460mL de agua destilada.*

- Reducción de normalidad a 0.1N (500mL):

$$V' * 1N = 500mL * 1N$$

$$V' = 50mL$$

→ *Diluir 50mL de HCl 1N en 450mL de agua destilada.*

- Agregar 700mL del medio de extracción a las algas limpias.
 - 50°C
 - 5 horas
 - 500rpm

Reducción de volumen/concentración.

- Filtrar y centrifugar la mezcla. Desechar las algas y conservar el líquido.
- Colocar el vaso en una coccinilla magnética hasta obtener un volumen aproximado de entre 200mL y 250mL.
 - 50°C
 - 350rpm

Precipitación en etanol.

- Esperar a que la solución enfríe.
- Centrifugar a 7,000rpm por 10 minutos.
- Agregar 3 partes de volumen de etanol por cada parte de volumen de la solución en un vaso de precipitado.
- Introducir el vaso de precipitado en un baño maría frío.
- Agregar lentamente la solución de Ulvan.
 - Recomendación: utilizar una bagueta o varilla de agitación para el vaciado de la solución para evitar que una caída agresiva del fluido.
 - Recomendación: no agitar la mezcla durante ni después del vaciado de la solución en etanol.
- Refrigerar la mezcla por 24 horas aproximadamente.
- Separar biopolímero precipitado de la parte líquida.
 - Recomendación: centrifugar la mezcla a 10,000rpm por 10 minutos.

- Colocar las partes sólidas en una placa Petri e ingresar en la estufa a 40°C por 48h.
- Verificar si la mezcla se encuentra seca. Pesar el biopolímero obtenido.
- Triturar muestra en un mortero y almacenarla en un vaso estéril.

Elaboración de films

- Primera versión
 - Disolver 0.5g de Ulvan seco en 50mL de agua destilada.
 - Temperatura ambiente (20°C)
 - 30 minutos
 - 250 rpm
 - Aumentar temperatura para aportar a la disolución del Ulvan.
 - 50°C
 - 30 minutos
 - 250rpm
 - Cuando la mezcla sea homogénea, separarla en 2 partes de 25mL.
 - Vaciar la primera parte en una placa Petri e introducirla en la estufa a 40°C por 48 horas aproximadamente.
 - Mezclar la segunda parte con 15% de glicerol en peso (0.0375g de glicerol respecto a 0.25g de Ulvan disuelto)

$$0.0375g \text{ glicerol} = 0.03mL \text{ glicerol} = 30\mu L \text{ glicerol}$$

- Vaciar la mezcla en una placa Petri e introducirla en la estufa a 40°C por 48 horas aproximadamente.
- Una vez que los films se encuentren secos, retirarlos cuidadosamente de las placas Petri.

- Registrar el diámetro y el espesor del film obtenido utilizando un vernier y un micrómetro respectivamente.
- Segunda versión
 - Disolver 1g de Ulvan seco en 100mL de agua destilada.
 - Aumentar temperatura para aportar a la disolución del Ulvan.
 - 60-70°C
 - 30 minutos
 - 250rpm
 - Cuando la mezcla se homogenice, separarla en 2 partes de 50mL.
 - Vaciar la primera parte en una placa Petri e introducirla en la estufa a 40°C por 48 horas aproximadamente (0% de plastificante).
 - Mezclar la segunda parte con 10% de glicerol en peso (0.05g de glicerol respecto a 0.5g de Ulvan).
$$0.05g \text{ glicerol} = 0.04mL \text{ glicerol} = 40\mu L \text{ glicerol}$$
 - Vaciar la mezcla en una placa Petri e introducirla en la estufa a 40°C por 48 horas aproximadamente.
- Observaciones:
 - Para los films obtenidos de Ulvan por extracción básica, el porcentaje de glicerol máximo que permite la manipulación de los mismos es de 10% respecto al peso de Ulvan.

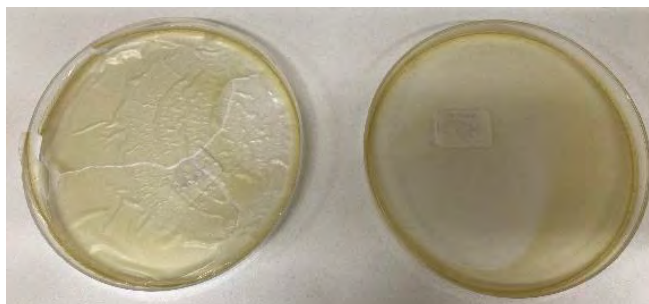


Figura 26. Film básico con 0% glicerol (izquierda) y 10% glicerol (derecha)

Fuente: Propia

- Para extracción neutra, se pudo manipular los films hasta un porcentaje de glicerol de 20%.

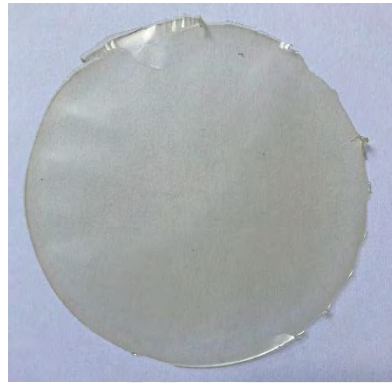


Figura 27. Film neutro con 0% glicerol

Fuente: Propia



Figura 28. Film neutro con 20% glicerol

Fuente: Propia

- Para extracción ácida, no se pudo obtener films manipulables, ya que estos se adherían a la placa Petri y contaban con una composición viscosa

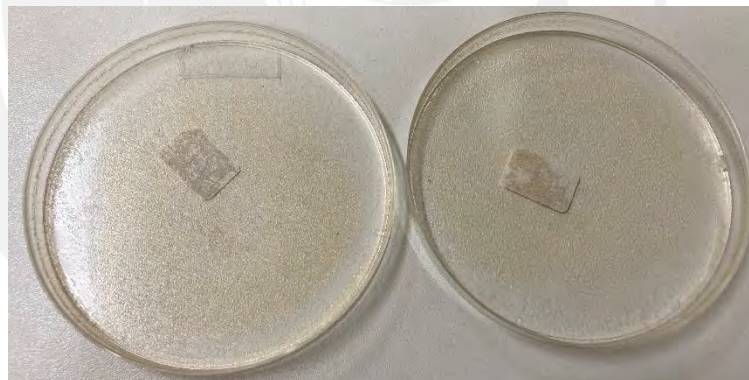


Figura 29. Films ácidos con 0% glicerol (izquierda) y 10% glicerol (derecha)

Fuente: Propia

- Equipos utilizados para ensayos de caracterización de material
 - FTIR
 - Se realizaron ensayos de FTIR usando el equipo de reflexión atenuada (ATR) Spectrum Two de la marca Perkin Elmer. Las muestras fueron puestas entre el accesorio del equipo y el cristal de diamante. Se realizó un barrido de 500cm^{-1} a 4000cm^{-1} .

- Tracción
 - La resistencia de los films fue medida usando el equipo de tracción Mark-10 M4-20 con una celda de carga de 100N. El espesor de los films fue registrado con un micrómetro Gensize 0-25mm – 0.01mm.
 - De acuerdo a los estándares de la norma ASTM D882 para ensayos de tracción en películas delgadas, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:
 - Longitud inicial de las probetas, $L_0=7\text{mm}$
 - Ancho de las probetas, $W=5\text{mm}$
 - Espesor promedio de las probetas, $T=50\mu\text{m}$ (0% glicerol); $T=70\mu\text{m}$ (10% glicerol)
 - Velocidad de separación de mordazas, $v=10\text{mm/min}$
 - Se realizaron ensayos en film con niveles de pH de 7 (extracción neutra) y 13 (extracción básica).
- DSC
 - Los ensayos de calorimetría diferencial de barrido se realizaron con el equipo Perkin-Elmer DSC 4000. Las muestras se recortaron de los films de forma manual, con una masa aproximada de 8mg.
 - Las temperaturas del ensayo fueron de 25°C a 300°C
 - Para todos los ensayos, el valor de referencia de flujo de calor es de 20mW, todos los resultados son en base a este valor.
- TGA
 - Los ensayos de análisis termogravimétrico se realizaron con el equipo Perkin-Elmer TGA 4000. Las muestras tuvieron un peso aproximado de 8mg.

- El rango de temperaturas fue de 30°C a 800°C

3. Resultados experimentales y análisis de propiedades mecánicas y fisicoquímicas de los bioplásticos fabricados

Rendimiento de extracción:

Registro de pesos de ulvan precipitado y rendimiento de recuperación				
<i>Ulva Nematoidea</i>				
Medio		NaOH	Agua Dest.	HCl
Peso de ulvan precipitado [g]	Primera precipitación	0.78	2.72	3.36
	Segunda precipitación	1.71	2.85	1.70
	Tercera precipitación	1.64	2.91	0.75
Promedio de peso de muestra precipitada [g]		1.38	2.83	1.94
Desviación estándar de peso de muestra precipitada		0.52	0.10	1.32
Rendimiento de recuperación promedio [%]		6.89	14.13	9.68

Tabla 3. Rendimiento de extracción de Ulvan seco para distintos medios de extracción.

Fuente: Datos tomados en el Laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales – PUCP

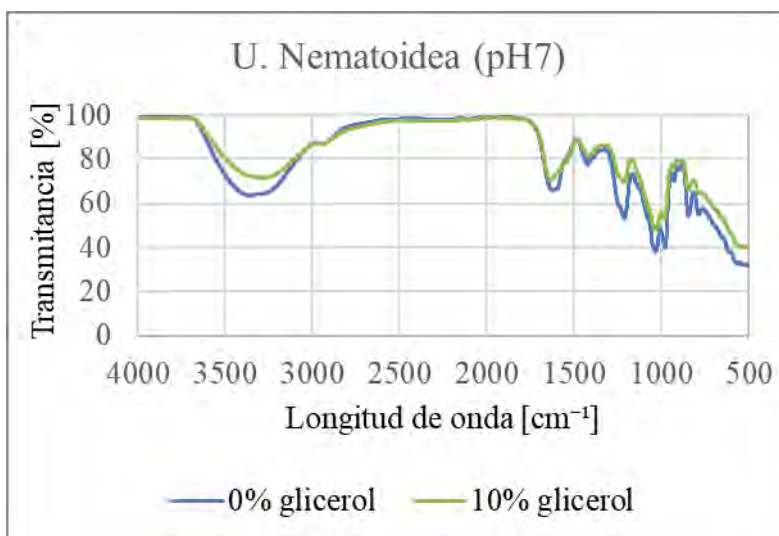
- El rendimiento de extracción fue de 6.89% para muestras de medio básico (NaOH), 14.13% para muestras de medio neutro (agua destilada) y de 9.68% para muestras de medio ácido (HCl). Las muestras obtenidas a partir de extracción neutra mostraron la menor variación en peso por muestra obtenida, además de una mayor cantidad de masa de ulvan seco obtenida.

Resultados de caracterización de bioplásticos fabricados.

Los films producidos en el presente proyecto de tesis fueron sometidos a ensayos de caracterización por espectroscopía (FTIR), ensayos mecánicos (tracción) y caracterización térmica (DSC y TGA). A continuación, se realizará una evaluación de los resultados obtenidos.

Resultados de FTIR

pH7

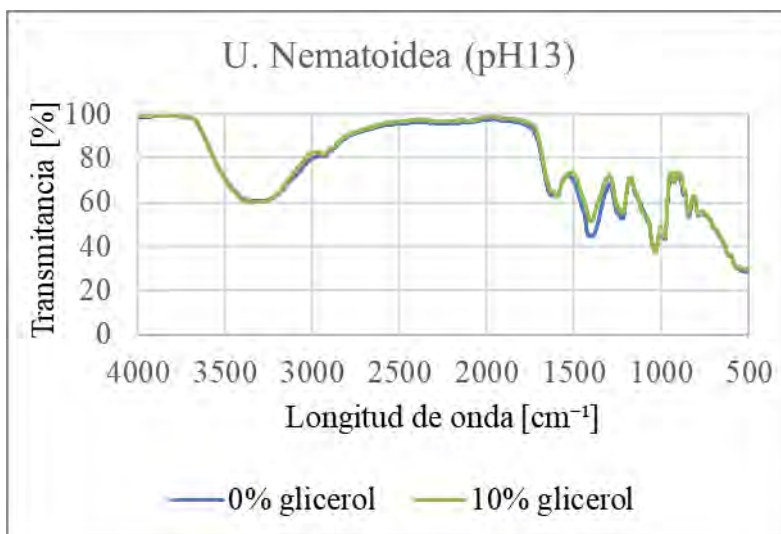


Gráfica 1. FTIR de films de Ulvan con pH7 (0% glicerol y 10% glicerol)

Fuente: Datos tomados en el laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales - PUCP

Para los films con una concentración de pH de 7, se obtuvieron las gráficas mostradas anteriormente. Donde, el pico presente para ambas gráficas en 1624cm^{-1} (0% glicerol) y a 1639cm^{-1} (10% glicerol) representa un enlace C=O y un segundo pico a 1421cm^{-1} para ambas concentraciones de plastificante, también representativo para el enlace C=O son característicos del ácido urónico contenido en el Ulvan. Respecto al contenido de polisacáridos de Ulvan, se tienen los picos en 846cm^{-1} (0% glicerol y 10% glicerol) representan los enlaces C-O-S. El pico en 1242cm^{-1} (0% glicerol) y en 1217cm^{-1} (10% glicerol) revela el estiramiento del enlace S=O para grupos sulfatos. Finalmente, los picos presentes en 788cm^{-1} (0% glicerol) y en 786cm^{-1} (10% glicerol), que representan los enlaces C-O-S, también característicos de los sulfatos presentes en el Ulvan. Generalmente, son los grupos presentes en la estructura de films de Ulvan. El espectro de FTIR de la solución con 10% de glicerol, comparada con la de Ulvan puro, presenta los mismos picos a las mismas longitudes de onda. Lo que indica que la formación de films agregando este porcentaje de plastificante no daña o degrada la composición principal de los mismos.

pH13



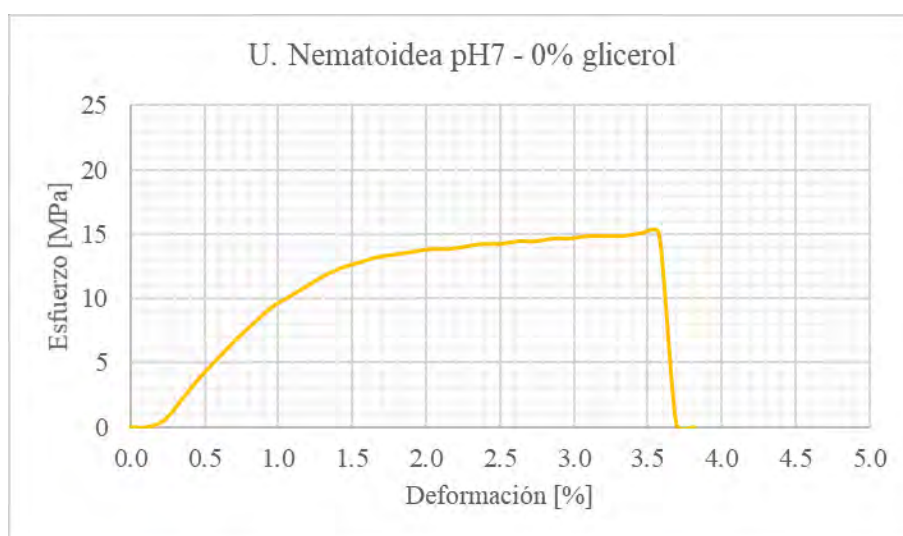
Gráfica 2. FTIR de films de Ulvan con pH13 (0% glicerol y 10% glicerol)

Fuente: Datos tomados en el laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales - PUCP

Al igual que en el caso de los films con concentración de pH7, los films obtenidos a través de extracción básica presentan picos en, aproximadamente, los mismos valores de longitud de onda. Asimismo, las gráficas obtenidas para ambas concentraciones de glicerol (0% y 10%) son similares. El contenido de plastificante no muestra signos de daños en la morfología del Ulvan obtenido. Por lo cual, se puede deducir que, para ambos métodos de extracción realizados en el laboratorio, no se presentó un cambio significativo en la composición de los films de Ulvan obtenidos.

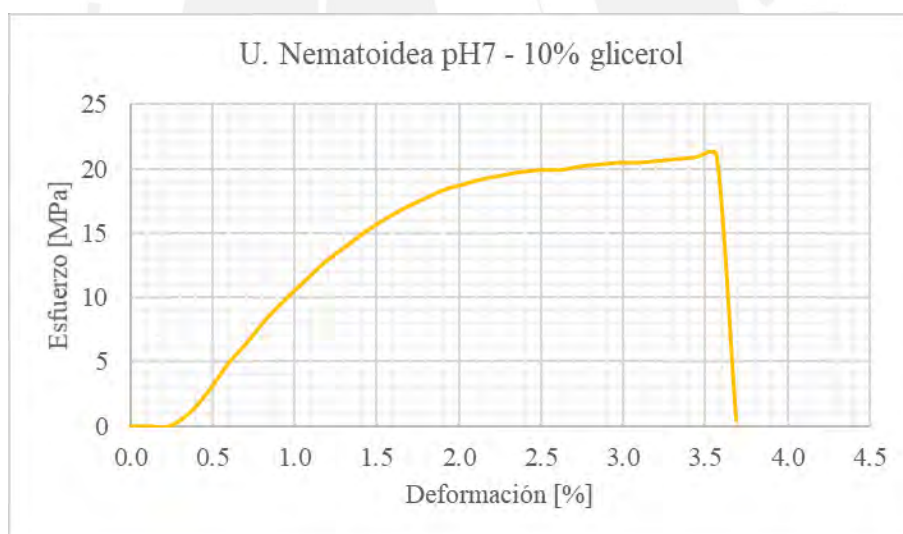
Resultados de Ensayos de tracción

pH7:



Gráfica 3. Curva representativa de ensayo de tracción para U. Nematodea pH7, 0% glicerol

Fuente: Datos tomados en el laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales – PUCP



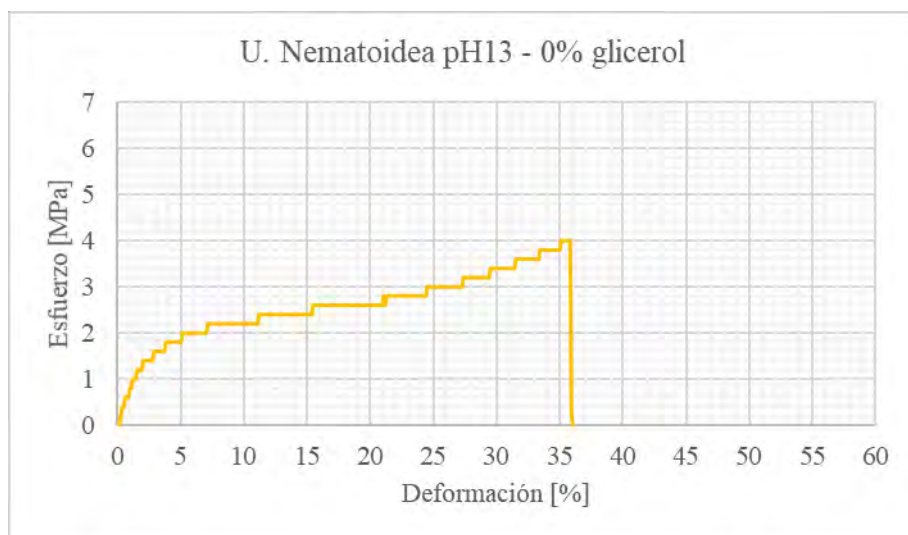
Gráfica 4. Curva representativa de ensayo de tracción para U. Nematodea pH7, 10% glicerol

Fuente: Datos tomados en el laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales – PUCP

Para los films obtenidos a partir de extracción neutra, la adición de glicerol aportó significativamente en la deformación máxima antes de la rotura. Este punto pasó de estar ubicado en 16MPa para una deformación del 3% a 20MPa para una deformación del 3.5%. El

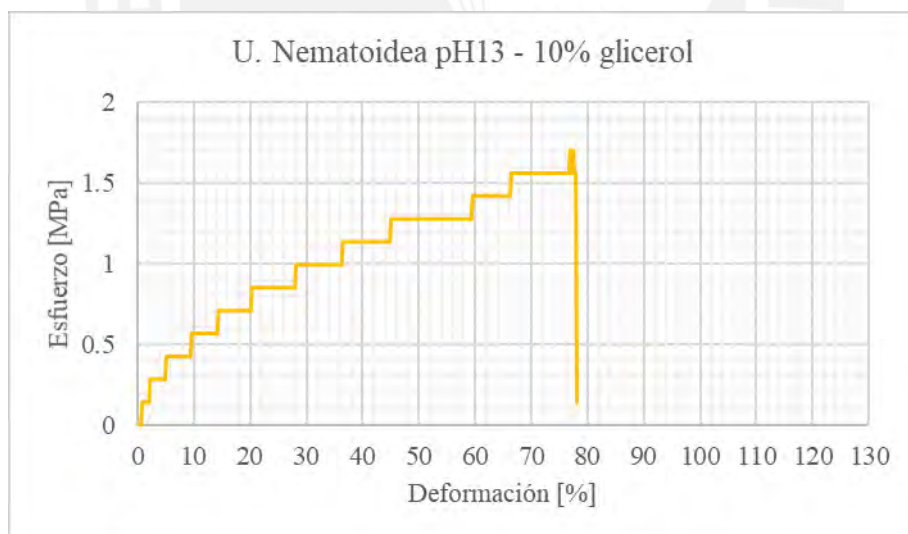
cambio más notorio se dio en la máxima resistencia a la tracción previo a la rotura, mas no en el porcentaje de estiramiento.

pH13:



Gráfica 5. Curva representativa de ensayo de tracción para U. Nematodea pH13, 0% glicerol

Fuente: Datos tomados en el laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales – PUCP



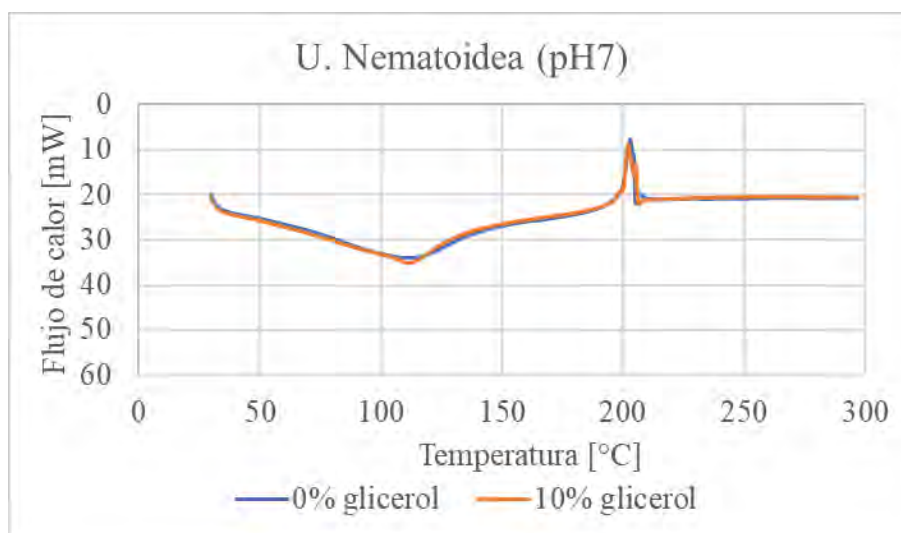
Gráfica 6. Curva representativa de ensayo de tracción para U. Nematodea pH13, 10% glicerol

Fuente: Datos tomados en el laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales – PUCP

Para este caso, al agregar glicerol, se presentó una reducción en la resistencia mecánica del film, pero aumentó el porcentaje de deformación. Los films obtenidos a partir de extracción básica son más flexibles que los descritos anteriormente. Para 0% de glicerol, el esfuerzo

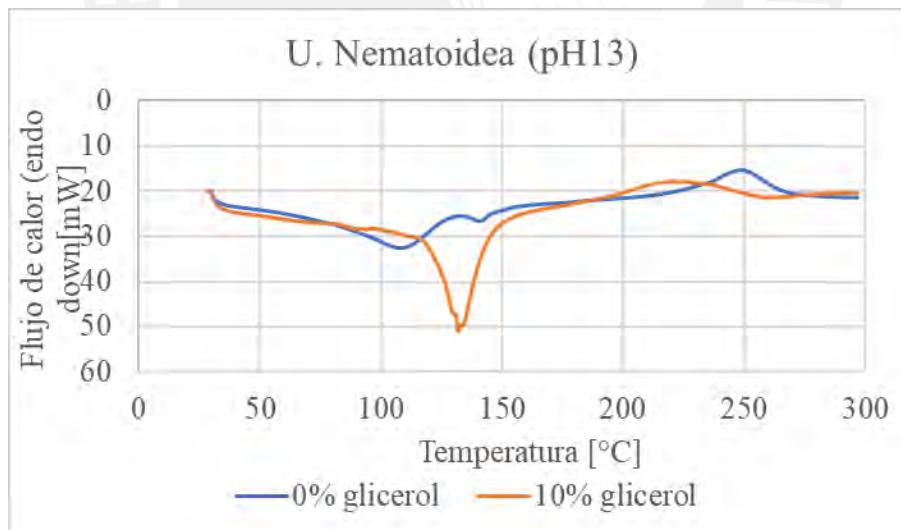
promedio fue de 4.3MPa para una deformación máxima promedio de 32.2%, mientras que para 10% de glicerol fue de 1.22MPa para una deformación máxima promedio de 71.4%.

Resultados de DSC



Gráfica 7. Termograma de DSC para U. Nematodea pH7

Fuente: Datos tomados en el laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales – PUCP



Gráfica 8. Termograma de DSC para U. Nematodea pH13

Fuente: Datos tomados en el laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales – PUCP

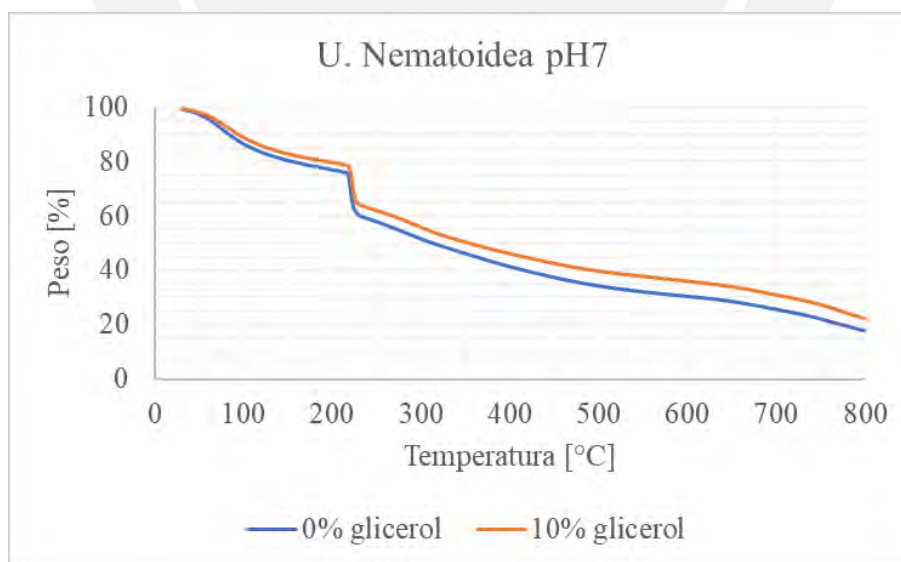
De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de los ensayos de DSC, se obtuvo que los films obtenidos por extracción neutra presentan un pico endotérmico aproximadamente a 110°C desde 10mW hasta 32mW aproximadamente. Las muestras obtenidas a partir de extracción

básica sin plastificante mostraron un comportamiento similar respecto al pico endotérmico; sin embargo, las muestras con 10% de glicerol presentaron una mayor temperatura aproximada de 130°C. Este desplazamiento del pico endotérmico representa una mayor estabilidad térmica de las muestras obtenidas por extracción básica al agregar plastificante en un 10% respecto al peso del Ulvan presente en la mezcla.

También, las muestras con pH7 muestran un pico exotérmicos aproximadamente 200°C. Las muestras de pH13 presentan este pico a temperaturas más altas, a 250°C (0% glicerol) y a 220°C (10% glicerol) aproximadamente. Este pico exotérmico está relacionado a la degradación térmica de las muestras, lo cual se refleja también en los resultados de TGA.

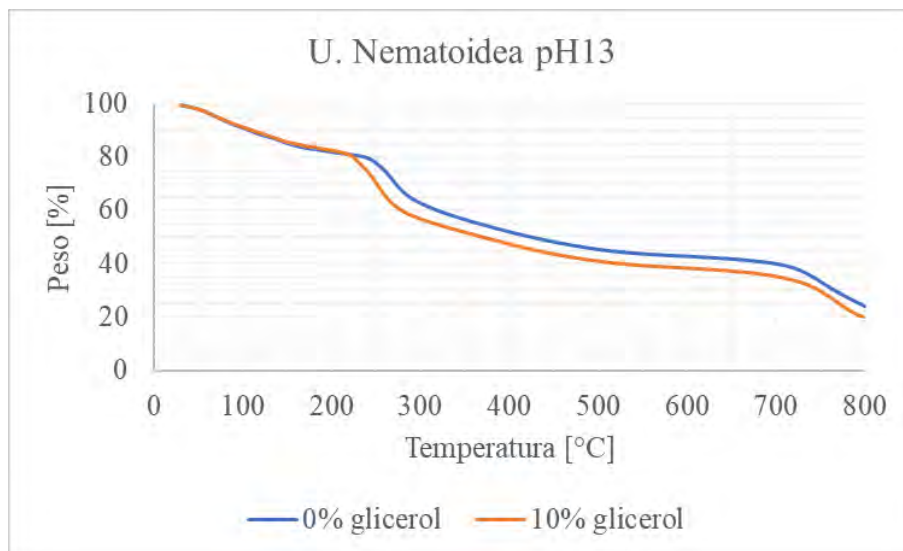
La presencia de plastificante no afecta significativamente la ubicación de los picos endotérmicos de las muestras, pero el método de extracción sí generó un desplazamiento de los mismos.

Resultados de TGA



Gráfica 9. Gráfica de TGA para U. Nematodea pH7

Fuente: Datos tomados en el laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales – PUCP



Gráfica 10. Gráfica de TGA para U. Nematoides pH13

Fuente: Datos tomados en el laboratorio de Polímeros y Bionanomateriales – PUCP

De acuerdo a los resultados de las pruebas de TGA, las muestras presentan estabilidad térmica hasta aproximadamente 200 a 220°C. Llegado este punto, las muestras tienen un cambio abrupto en el porcentaje de peso y luego mantienen la misma tendencia de pérdida. Comparando estos resultados con los obtenidos en el ensayo de DSC, el punto en el que las muestras presentan este cambio de masa coincide con el pico exotérmico visto en las gráficas anteriores (200°C para pH7 y 220°C a 250°C para pH13). Las muestras de extracción neutra (pH7) muestran una caída más pronunciada que las de extracción básica (pH13), al igual que los picos e intervalos reflejados en DSC. El primer tramo de pérdida de masa de ambas gráficas refleja la pérdida de humedad presente en cada una de las muestras; esta humedad representaba aproximadamente el 20% de la masa total de cada film. El segundo intervalo en el cual las muestras tienen una mayor pérdida de masa se encuentra aproximadamente a 700°C para cada caso. Esta segunda etapa puede referirse como la cantidad de material inorgánico presente en cada film, este representa un 20% del total de masa aproximadamente. Los residuos pueden ser atribuidos a los grupos sulfatos y ácidos urónicos característicos del Ulvan.

Impacto del proyecto

Impacto ambiental

La tendencia de optar por tecnologías más eco-amigables ha dirigido a muchas empresas a reemplazar a los plásticos tradicionales derivados de fuentes fósiles como el petróleo por plásticos de origen biológico.

Los efectos que este cambio trae consigo son

- Reducción en la dependencia de combustibles fósiles
- Mejora del medioambiente
- Reducción de la huella de carbono

Las materias primas utilizadas en este proceso de producción pueden ser recuperadas y recicladas en nuevos componentes, lo que disminuiría la necesidad de una constante producción de artículos nuevos.

Impacto económico

La comunidad internacional ha entendido la obligación y necesidad de fortalecer el cambio hacia una “economía baja en carbono” en aras de tener un futuro sostenible.

Los plásticos tradicionales requieren de combustibles fósiles como materia prima. Hoy en día, aproximadamente el 4% de la producción mundial de petróleo está destinada a la producción de plásticos sintéticos como el PE y el PP, mayormente dirigidos a la fabricación de bolsas para retail, envases, aparatos, entre otros. Realizar el cambio a bioplásticos reduciría la dependencia del petróleo; del mismo modo, reducirá la fluctuación de los precios y la creciente escasez del petróleo (ZeaPlast, 2012).

Por otro lado, gracias a la tendencia ecológica tanto por empresas productoras/vendedoras como por los clientes de las mismas, el etiquetar a algunos de sus productos como eco-

amigables o que cuentan con componentes de origen biológico puede influir de manera positiva en la venta de estos dispositivos o artículos.

Según la Agencia Internacional de Energías Renovables (IRENA), alcanzar los Acuerdos de París (suscrito en la Cumbre Mundial del Clima, 2015), exige duplicar la cuota de renovables en la generación eléctrica hasta situarla en el 57% a nivel mundial en 2030. Lo que requerirá aumentar la inversión anual en energías renovables desde los 330 mil millones de dólares (actualidad) hasta los 750 mil millones de dólares.



Conclusiones

- El método de extracción del Ulvan de las algas verdes afecta a las propiedades físicas de los bioplásticos fabricados. Mientras que, para extracciones neutras (pH7) y básicas (pH13), los films podían ser manipulados con facilidad, los obtenidos a partir de una extracción ácida presentaron una consistencia viscosa, por lo cual se adhirieron fuertemente al molde y no se pudo disponer de ellos sin dañarlos. Este resultado puede variar si se disminuye la cantidad de Ulvan disuelto en agua destilada, ya que se está trabajando con una relación de 1:100. Por lo tanto, este tercer método de extracción no fue considerado para los ensayos de caracterización del material.
- El rendimiento de extracción de Ulvan respecto a la cantidad de alga procesada obtenido en el presente proyecto fue de 6.89% para muestras de medio básico (pH13), 14.13% para muestras de medio neutro (pH7) y de 9.68% para muestras de medio ácido (pH0). Este rendimiento puede ser mejorado realizando un estudio más profundo para la combinación de parámetros durante los procesos realizados.
- El glicerol favorece la flexibilidad y la elasticidad de las láminas producidas. Esto se evidenció en el caso de las láminas a base de Ulvan de medio básico. La lámina con 0% de glicerol se rompió debido a que, al secarse, la superficie de la lámina se contrae, creando tensiones triaxiales. Estas tensiones pueden agrietar o romper el material si este no es lo suficientemente resistente. Sin embargo, para el caso de las láminas fabricadas a partir de Ulvan de medio acuoso, la lámina con 0% de glicerol no se rompió, pero su textura y apariencia era más frágil, por lo que debió ser manipulada con más cuidado que en los casos con 10%, 15% y 20% de glicerol en peso.
- La adición de plastificantes como el glicerol, en una concentración de hasta 10% en peso respecto al Ulvan, no afecta significativamente la composición de los films fabricados. Se evidenció la similitud en las gráficas de FTIR, ya que las películas reaccionaron

aproximadamente a las mismas longitudes de onda, los picos presentados corresponden a los grupos presentes comúnmente en la estructura del Ulvan. Del mismo modo, la concentración de pH determinada por el método de extracción realizado tampoco muestra signos de haber degradado la estructura molecular de las películas obtenidas.

- El método de extracción de Ulvan afecta el rendimiento mecánico de las películas producidas. Las muestras obtenidas a partir de extracción neutra (pH7) tuvieron una resistencia a la tracción de 16MPa con una deformación máxima del 3%; mientras que las muestras de extracción básica alcanzaron un valor promedio de 4.3MPa para una deformación del 32.2%. La presencia de glicerol afectó las propiedades de ambos tipos de films. Para los films de extracción neutra, la resistencia mecánica pasó a ser de 20MPa para una deformación máxima promedio de 3.5%; del mismo modo, las muestras de extracción básica redujeron su resistencia mecánica a 1.22MPa, pero aumentaron su deformación máxima hasta 71.4%. Para todos los ensayos realizados, las muestras se rompieron en la zona de contacto entre las mismas y las mordazas que las sujetaban debido a la presión ejercida por las mordazas. Por lo tanto, el resultado de esfuerzos de tracción no es completamente representativo de la resistencia real de los films obtenidos. Solo el caso de pH13 con 10% de glicerol obtuvo una deformación significativa en longitud y ancho de la probeta, formándose una “gargantilla” en la zona central de la muestra; sin embargo, la zona de rotura fue en los extremos de la muestra por las razones descritas.
- El método de extracción del Ulvan afecta significativamente a las propiedades de estabilidad térmica del mismo. En los resultados de los ensayos de DSC, se mostró un desplazamiento de los picos exotérmicos de las películas fabricadas. Sin embargo, para las muestras con pH13 con un porcentaje en peso del 10% de glicerol, el pico endotérmico se desplazó hacia la derecha, lo que denota una mayor estabilidad térmica de las muestras. Relacionando estos resultados con los obtenidos por el ensayo de TGA, se puede reflejar

el pico exotérmico de cada grupo de muestras (pH7 y pH13) como dos distintas pendientes de pérdida de masa de las muestras, donde se evidencia que las muestras obtenidas a partir de NaOH (pH13) funden a una mayor temperatura que aquellas obtenidas a partir de agua destilada (pH7), además de que el tiempo o energía requerida para el cambio de fase para las muestras neutras es significativamente más corto que el requerido para las muestras de pH13.

- De acuerdo a todos los resultados obtenidos, de espectroscopía, mecánicos y térmicos, se pudo evidenciar que el porcentaje de plastificante empleado en el presente proyecto (10% relativo al peso de Ulvan en la muestra) no degrada la estructura molecular del Ulvan ni afecta significativamente las propiedades mecánicas del mismo ni las propiedades de estabilidad térmica como los picos endotérmicos y exotérmicos. La mayor diferencia está denotada por el método de extracción del Ulvan. Las muestras obtenidas por medio ácido (pH0) fueron descartadas por la composición de los films y por su dificultad de manipulación, mientras que las muestras de pH7 y pH13 sí pudieron ser manipuladas y caracterizadas. Las muestras obtenidas por un medio básico (pH13) mostraron un mejor rendimiento mecánico en cuando a deformación máxima alcanzada, así como una mayor estabilidad térmica.

Bibliografía

- Fernando Valero-Valdivieso, M., Ortegón, Y., & Uscategui, Y. (2013). *BIOPOLÍMEROS: AVANCES Y PERSPECTIVAS BIOPOLYMERS: PROGRESS AND PROSPECTS*. 80, 171–180.
- Joyce E Brading, B. W., T Georg-plant, M. M., & Hardy, D. M. (1954). *The Polysaccharide from the Alga Ulva lactuca. Purification, Hydrolysis, and Methylation of the Polysaccharide*.
- Kidgell, J. T., Magnusson, M., de Nys, R., & Glasson, C. R. K. (2019). Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function. In *Algal Research* (Vol. 39). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101422>
- Lahaye, M., & Robic, A. (2007). Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. In *Biomacromolecules* (Vol. 8, Issue 6, pp. 1765–1774). <https://doi.org/10.1021/bm061185q>
- Robic, A., Gaillard, C., Sassi, J. F., Leral, Y., & Lahaye, M. (2009). Ultrastructure of Ulvan: A polysaccharide from green seaweeds. *Biopolymers*, 91(8), 652–664. <https://doi.org/10.1002/bip.21195>
- Shi, L. (2016). Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100>
- Torres, F. G., Author, F., Gonzales, K. N., Sc, M., Sc Fernando Torres, M. G., Sanchis, M. J., Carsí, M., López, D., Gómez, C., Eceiza, A., & Gea, S. (n.d.). *Algal Research Ulvan polysaccharide-based materials Doped with Lithium Sulfate Salts as Solid Biopolymer Electrolytes for Energy Storage Applications Opposed Reviewers: Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation*.

- Troncoso, O. P., Torres, F. G., & Gonzales, K. N. (n.d.). *Bioprocessing of Green Macroalgae-derived Polysaccharides for the Development of a Novel Polymeric Material*.
- Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C., & Attia, H. (2013). Effect of extraction conditions on the yield and purity of ulvan extracted from *Ulva lactuca*. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.013>
- ¿Bolsas de plástico fabricadas con algas marinas? Una bacteria lo hace posible. I'MNOVATION. <https://www.imnovation-hub.com/es/ciencia-y-tecnologia/bolsas-plastico-fabricadas-algas-marinas/>
- World Wildlife Fund (19 de junio de 2019). *The lifecycle of plastics*. <https://www.wwf.org.au/news/blogs/the-lifecycle-of-plastics#gs.2sj3sl>
- Laura Parker (7 de junio de 2019). *The world's plastic pollution crisis explained*. National Geographic. <https://www.nationalgeographic.com/environment/article/plastic-pollution>
- Amalia Delgado Rodríguez (10 de julio de 2018). *El Tecnopor: la amenaza invisible*. Clima de cambios – PUCP. <https://www.pucp.edu.pe/climadecambios/noticias/el-tecnopor-la-amenaza-invisible/>
- ZeaPlast (2012). *Tipos de bioplásticos*. <http://www.zeaplast.cl/tipos-de-bioplásticos+-21>
- ZeaPlast (2012). *Bioplásticos vs plásticos tradicionales*. <http://www.zeaplast.cl/bioplásticos-vs-plásticos-tradicionales+-22>
- ACCIONA (2020). *Energías Renovables*. https://www.accion.com/es/energias-renovables/?_adin=02021864894
- Murillo, Y. (2014). *Estado actual de la Biodiversidad y Biomasa de Macroalgas en la playa Chérrepe – Provincia de Chepén, Mayo-Diciembre 2013* [Tesis de licenciatura,

Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo]. Repositorio institucional UNPRG.

<https://hdl.handle.net/20.500.12893/781>

- Arellanos, M. (2019). *Desarrollo de un biopolímero a partir de residuos orgánicos* [Tesis de titulación, Universidad Abierta Y A Distancia De México]. Repositorio institucional UnADM. <http://www.repositorio.unadmexico.mx:8080/jspui/handle/123456789/196>

