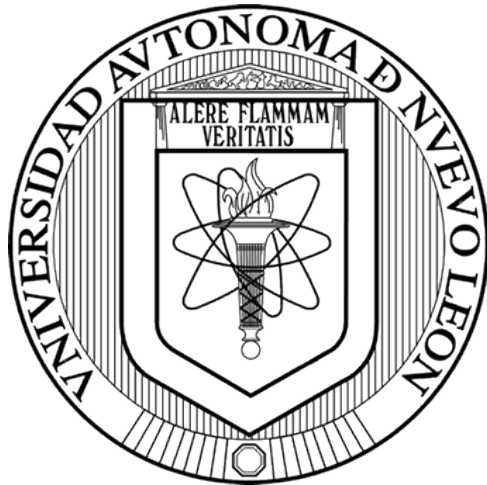


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



PRODUCCIÓN DE MICROCELULOSA Y NANOCELULOSA CRISTALINA
MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LA MICROALGA *Chlorella sorokiniana*
AISLADA EN NUEVO LEÓN, MÉXICO

Por

MAEL SEBASTIÁN CANTÚ MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN en Microbiología Aplicada

Febrero, 2024

“PRODUCCIÓN DE MICROCELULOSA Y NANOCELULOSA CRISTALINA
MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LA MICROALGA *Chlorella sorokiniana*
AISLADA EN NUEVO LEÓN, MÉXICO”

Revisión de la Tesis:

DR. GUSTAVO RAÚL REYNA MARTÍNEZ
Asesor

DR. JULIO CÉSAR BELTRÁN ROCHA
Co-Asesor

DRA. PILAR DEL CARMEN MORALES SAN CLAUDIO
Comité Tutorial

DRA. ALMA ELIZABETH GÓMEZ LOREDO
Comité Tutorial

DR. ULRICO JAVIER LÓPEZ CHUKEN
Comité Tutorial

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
Sub-Directora de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Ciencias Químicas por recibirme y permitir mi continua formación como profesional en el área de ciencias, así como el uso de las instalaciones en el CELAES como lo es principalmente el Laboratorio de Biotecnología.

Al CONACYT por la beca proporcionada para continuar mis estudios y desarrollo de investigación.

A mi Asesor Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez por su tiempo y experiencia.

A mi Co-Asesor Dr. Julio César Beltrán Rocha por su apoyo durante la etapa de escalamiento y diseño de los biorreactores.

Al Dr. Julio Silva Mendoza por guiarme en el proceso de extracción y análisis de nanocelulosa.

Al Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño por permitir el uso de equipo en el Laboratorio de Biología Molecular.

Y al Dr. Alonso Alberto Orozco Flores de la Facultad de Ciencias Biológicas.

TABLA DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	7
A.	Hipótesis	13
B.	Objetivo general.....	13
C.	Objetivos específicos	13
II.	MARCO TEÓRICO.....	15
A.	Microalgas	15
1.	Genero <i>Chlorella</i>	16
2.	<i>Chlorella sorokiniana</i>	17
B.	Celulosa	18
C.	Microcelulosa.....	19
D.	Nanocelulosa.....	20
1.	Nanocelulosa cristalina	21
2.	Nanocelulosa fibral	21
3.	Nanocelulosa bacteriana.....	21
E.	Características de degradación en nanocelulosa	22
F.	Método de extracción de celulosa.....	23
1.	Extracción mecánica	23
2.	Extracción química.....	23
G.	Técnicas de Caracterización de Nanocelulosa.....	24
1.	Microscopio Óptico (MO).....	24
2.	Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).....	25
3.	Difracción de Rayos X (DRX).....	26
4.	Espectroscopia de Infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR).....	27
5.	Método de Azúcares reductores	27
III.	METODOLOGÍA.....	28
A.	Recolección, Aislamiento, Purificación e Identificación de Microalgas.....	28
B.	Biorreactores de columna de burbujeo (BCB) y establecimiento de condiciones de Cultivo	31

1.	Preparación de inóculo y desinfección de los biorreactores	33
2.	Monitoreo de biorreactores	34
C.	Cosecha y liofilización de biomasa de microalgas	34
D.	Extracción y Aislamiento de Nanocelulosa	35
E.	Caracterización de Nanocelulosa.....	36
F.	Disposición de Residuos	37
IV.	RESULTADOS	38
A.	Aislamientos	38
B.	Producción de Biomasa de <i>Chlorella</i>	39
C.	Determinación de Celulosa.....	43
D.	Evaluación de Microcelulosa y Nanocelulosa por Microscopia Óptica y MEB obtenida de <i>C. sorokiniana</i>	44
E.	Caracterización de Microcelulosa y nanocelulosa extraída de <i>C. sorokiniana</i> . 49	
V.	DISCUSIÓN	52
A.	BIOMASA.....	52
B.	CELULOSA.....	53
C.	OBSERVACIÓN NANOCELULOSA.....	54
D.	ANÁLISIS NANOCELULOSA	56
E.	BENEFICIOS Y ALTERNATIVAS DEL PROCESO	59
VI.	CONCLUSIONES	60
VII.	PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....	62
VIII.	REFERENCIAS	64
	APÉNDICE A	72
	APÉNDICE B	75

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Metodología general del proyecto de investigación.	28
Figura 2. Cultivos de <i>C. sorokiniana</i> en medio BBM y LC-Y	30
Figura 3. Estructura con capacidad de 6 biorreactor de columna y diagrama.....	32
Figura 4. Microalgas aisladas del Estado de Nuevo León, México observadas en microscopio óptico a 40X.....	38
Figura 5. Cultivos de <i>C. sorokiniana</i> en biorreactores de columna de burbujeo.	40
Figura 6. Cinética de <i>C. sorokiniana</i> en matraz con medio LC-Y y BBM de 100 mL. 41	
Figura 7. Cinética de <i>Chlorella</i> sp. en matraz con medio LC-Y y BBM de 100 mL....	41
Figura 8. Cinética de <i>C. sorokiniana</i> en biorreactor con medio LC-Y de 1 L	42
Figura 9. Cinética de <i>Chlorella</i> sp. en biorreactor con medio LC-Y de 1 L.....	43
Figura 10. Curva patrón de glucosa.....	44
Figura 11. Nanocelulosa en microscopio óptico.	45
Figura 12. Tabla representativa del grosor de cristal en base a color.....	46
Figura 13. Imagen de MEB del producto celulósico extraído de <i>C. sorokiniana</i> a 200X	46
Figura 14. Imagen de MEB de nanocelulosa a 95000X.....	47
Figura 15. Imagen de MEB de nanocelulosa a 100000X.....	48
Figura 16. Espectro FT-IR de microcelulosa.	49
Figura 17. Difractograma rayos x de microcelulosa.	50
Figura 18. Comparación de nanocelulosa en MO	54
Figura 19. Comparación de Nanocelulosa en SEM	55
Figura 20. Difractograma de rayos x de celulosa extraída de <i>Nannochloropsis</i> sp. (Baba et al., 2016).	58

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el uso de plásticos ha aumentado considerablemente, lo que ha generado un impacto negativo en el medioambiente. Debido a esto, han surgido diversos proyectos, como el de Abdul y colaboradores en 2020, que investigaron la reducción de CO₂ al utilizar biomasa de algas para la producción de plásticos. Por su parte, Omran y colaboradores experimentaron con el uso de micro y nanocelulosa en compuestos de biopolímeros. Por lo que, año con año, los investigadores buscan alternativas para sustituir el uso de plástico en productos por otros que tengan un menor impacto ambiental (Omran et al., 2021).

En el año 2018, la industria de plásticos produjo alrededor de 359 millones de toneladas métricas a nivel global. De estas, casi la mitad se utilizó para empaquetado de un solo uso, mientras que solo un 25% fue reciclado. Como resultado, un 22% de los plásticos terminó en vertederos o se incineró, y el restante 44% se quedó en el ambiente (Zanchetta et al., 2021). Esta es solo una de las múltiples preocupaciones que enfrentamos hoy en día por lo que es importante tomar medidas para reducir la producción y consumo de plásticos.

Muchas organizaciones y negocios se han visto obligados por demanda del público y/o gobierno a comenzar programas para volverse más ecológicos, empezando a comercializar plásticos biodegradables y/o bioplásticos (Zanchetta et al., 2021). Sin

embargo, aquí empieza el problema de desinformación al público, en donde se le hace creer a los consumidores que, mediante el uso de estos términos, el dilema de los plásticos se solucionaría de manera independiente a ellos. La terminología de bioplástico y biodegradable se ha confundido durante mucho tiempo, pensando que van de la mano. Por lo cual es necesario establecer que el término bioplástico emerge por ser derivado de materia prima orgánica, mientras que el término biodegradable habla sobre la degradación de este en el ambiente (UNE-EN 13432:2001/AC:2005).

De acuerdo con la norma europea UNE-EN 13432:2001/AC:2005, un producto se considera biodegradable si tiene una tasa de volatilidad mínima del 50 %, se fragmenta en al menos un 10 % de su peso en fragmentos de menos de 2 mm de tamaño y se degrada en un 90 % en un plazo mínimo de 6 meses.

En la actualidad, existen cuatro tipos principales de plásticos (Zanchetta et al., 2021):

- Plásticos convencionales derivados de petróleo no biodegradables: polietileno (PE), polipropileno (PP) y polietileno tereftalato (PET).
- Bioplásticos no biodegradables: bio-polietileno (Bio-PE) y bio-polietileno tereftalato (Bio-PET).
- Plásticos derivados de petróleo biodegradables: polibutileno adipato-co-tereftalato (PBAT).
- Bioplásticos biodegradables: ácido poli láctico (PLA), celulosa y nanocelulosa.

Algunos de estos plásticos pueden degradarse y convertirse en microplásticos, que actualmente se encuentran en aumento en los océanos. Sin embargo, también pueden degradarse en partículas aún más pequeñas, llamadas nanoplásticos, que no han sido muy estudiados (Leslie et al., 2022). Se han detectado microplásticos en heces e incluso nanoplásticos en la placenta humana. La presencia de plásticos en varios niveles de la cadena alimenticia es preocupante, y es importante investigar más a fondo sus posibles efectos en la salud (Leslie et al., 2022).

El uso excesivo de plásticos a nivel consumidor y su uso esencial en la industria del empaquetado de diversos productos han contribuido a la contaminación por plásticos. Los plásticos se han convertido en una alternativa al vidrio y al papel debido a sus buenas cualidades y mayor rendimiento económico (Arapgirlioglu et al., 2017).

Aunque existen plásticos derivados de petróleo con capacidades biodegradables, estos no son ideales debido a que su producción contribuye a alrededor de 400 millones de toneladas de las emisiones de gases de efecto invernadero (Abdul-Latif et al., 2020). Una alternativa es el uso de biopolímeros biodegradables, como el almidón, alginato, quitina, quitosano y celulosa (Zanchetta et al., 2021).

De estos compuestos, la celulosa es particularmente interesante porque se encuentra en todas las plantas y en la mayoría de las micro y macroalgas. La celulosa es un biopolímero compuesto de monómeros de beta-glucosa que forman cadenas largas.

Cada unidad de glucosa tiene una masa molecular de 162,14 g/mol (Pawcenis et al., 2015). Estas cadenas se adhieren entre sí por enlaces de hidrógeno intramoleculares, enlaces de hidrógeno intermoleculares y fuerzas de van der Waals, lo que da como resultado microfibras (Vanderghem et al., 2012).

La celulosa tiene una función importante en las células, ya que proporciona rigidez para soportar el estrés mecánico o para adaptarse a su entorno. Las plantas y algas tienen entornos diferentes y se enfrentan a diferentes tipos de estrés, por lo que la estructura de la celulosa presente en ellas varía (Moral, 2014).

Es común que en la industria de la celulosa este compuesto sea extraído de árboles debido a su mayor porcentaje en la pared celular. Sin embargo, ésta presenta una mayor cantidad de contaminantes, como lo son las hemicelulosas (xilosa y arabinosa) y la pectina (Popper et al., 2011). Se ha reportado que distintas microalgas como *Nannochloropsis*, *Chlorella* y *Scenedesmus*, así como también macroalgas pertenecientes a los grupos de algas verde, roja y café pueden llegar a contener estos mismos compuestos de celulosa y hemicelulosa en sus paredes, por lo que es una alternativa a explorar como productoras de este biopolímero (Popper et al., 2011).

Una de las ventajas sobre la utilización de microalgas para la extracción de celulosa es la ausencia de lignina en la pared celular la cual requiere más pasos para purificar y aumenta costos (Moral, 2014). Cabe mencionar que la celulosa encontrada en microalgas es muy similar que la observada en plantas terrestres. Asimismo, la extracción

de celulosa a partir de la biomasa microalgal es uno de los múltiples componentes que se pueden aprovechar de la cultivación de ella, contribuyendo a establecer una economía circular (Ross et al., 2021).

Dentro de los biopolímeros obtenibles de la naturaleza, el interés por la microcelulosa y la nanocelulosa emerge debido a múltiples características particulares que tienen gran valor a nivel industrial. La microcelulosa y la nanocelulosa comparten características similares, sin embargo, existen variaciones en la estructura y fuente de la nanocelulosa (Omran et al., 2021).

Se han identificado 3 tipos de nanocelulosa hasta el momento: la nanocelulosa cristalina (NCC), la nanocelulosa fibral (NCF) formadas a partir de celulosa encontrada en plantas y microalgas, y la nanocelulosa bacteriana (NCB) (Omran et al., 2021).

La NCC tiene forma de barra, la cual consiste en cristales de unos cuantos nanómetros. Sus dimensiones varían dependiendo de la fuente de celulosa. La pureza de esta se logra mediante hidrólisis ácida para la remoción de polisacáridos en las fibras y lavados (Rodríguez Liñan, 2016).

Las NFC son nanofibras obtenidas mediante una homogeneización mecánica seguida de un tratamiento enzimático u oxidación química utilizando TEMPO ((2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-yl)-oxyl). Una de las grandes diferencias con la NCC es que la NFC muestra ser más flexible, así como más lignocelulósica en cuestión de composición. Esto

se debe a que es menos pura en comparación. Otra diferencia sería la cristalinidad, siendo de 70 % contra 85 % de la NCC (De France et al., 2017).

La NCB, a diferencia de las mencionadas, es producida por bacterias y hongos. Esta comparte similitudes en propiedades y estructuras, sin embargo, tiene como beneficio la ausencia de lignina y hemicelulosas, resultando en un alto grado de pureza. Así como un alto grado de cristalinidad, capacidad de absorción de agua y susceptibilidad a degradación (Rodríguez Liñan, 2016).

Tanto la nanocelulosa como la microcelulosa son de interés por sus propiedades físicoquímicas, razón por la cual tienen diversas aplicaciones en la industria. Se utilizan en la farmacéutica para la liberación controlada de fármacos, en la biomédica para injertos o prótesis, en la electrónica para pantallas o piezas conductoras de electricidad, e incluso en la industria automovilística para partes mecánicas (Grande Cruz, 2014). Sin embargo, la nanocelulosa presenta un valor agregado debido a su mayor área superficial y mejor capacidad para producir películas delgadas.

Una de las mayores ventajas en la producción de nanocelulosa utilizando microalgas como fuente principal de biomasa se debe a su capacidad de crecimiento en medios de cultivo de bajo costo, su crecimiento relativamente rápido, su consumo de CO₂ atmosférico durante el crecimiento y su capacidad de producción en diversas partes del mundo sin competir por tierras de uso agrícola (Moral, 2014).

Asimismo, debido a la gran versatilidad de las microalgas como microorganismos, son capaces de crecer en aguas residuales. Se ha planteado explorar la posibilidad de utilizar estos organismos como base para la producción de celulosa y su transformación a nanocelulosa mediante un tratamiento de hidrólisis ácida. Además, se considera su implementación en un sistema de biorrefinería o tratamiento de aguas para obtener la nanocelulosa como uno de los múltiples productos, resultando así en una economía circular (Ross et al., 2021).

A. Hipótesis

La microalga *Chlorella sorokiniana* aislada de Nuevo León tiene la capacidad de producir celulosa en su pared celular y es posible su transformación a microcelulosa y/o nanocelulosa mediante una extracción química a base de ácido sulfúrico y peróxido de hidrogeno.

B. Objetivo general

Producir, extraer y transformar la celulosa encontrada en la pared celular de la microalga *Chlorella sorokiniana* a micro- y nanocelulosa.

C. Objetivos específicos

1. Obtener el cultivo axénico de *Chlorella sorokiniana*.

2. Diseñar, construir y montar biorreactores de bajo costo.
3. Evaluar la producción de biomasa en medio convencional (BBM) y medio experimental (LC-Y).
4. Extraer y transformar la celulosa a microcelulosa y/o nanocelulosa mediante una hidrólisis ácida a partir de biomasa de *Chlorella sorokiniana*.
5. Caracterizar la microcelulosa y/o nanocelulosa mediante técnicas de FT-IR, DRX y Microscopia electrónica de Barrido.

II. MARCO TEÓRICO

A. Microalgas

Las microalgas son microorganismos que han existido en el planeta Tierra durante aproximadamente 2.5 millones de años y pertenecen al dominio Eucariota (Finlay & Esteban, 2009). Estos microorganismos pueden encontrarse en cualquier parte de la tierra y en diversas conformaciones. Son capaces de adaptarse a diferentes ambientes, desde mares y ríos hasta tierras e incluso el Ártico. Su metabolismo principal es mediante la fotosíntesis; sin embargo, algunas son capaces de subsistir utilizando otras fuentes de carbono orgánico. El metabolismo de supervivencia de un alga puede ser autótrofo, heterótrofo o mixotrófico (Evert & Eichhorn, 2013).

Algunos grupos pertenecientes a este dominio son los haptófitos, dinoflagelados, diatomeas, algas amarillas y algas verdes. En el caso de las algas verdes, estas contienen pigmentos fotosintéticos como la clorofila a, b y carotenoides, los cuales les otorgan su coloración verde. Comúnmente se encuentran sin flagelos, pero algunas poseen 2 o más flagelos. La superficie de la célula puede presentar glicoproteínas, polisacáridos no celulósicos y celulosa (Zabed et al., 2019).

La pared celular puede variar entre géneros y especies; sin embargo, existen ciertos elementos que comúnmente están presentes en algunas de ellas, como la

hemicelulosa (xilosa, arabinosa y D-manosa), celulosa, pectina, agar, alginato y fucano (Zabed et al., 2019). Dada la gran adaptabilidad de las microalgas, se ha buscado utilizarlas en numerosos proyectos con la intención de desarrollar e implementar nuevas tecnologías para abordar los problemas contemporáneos. En la Tabla 1 se pueden observar las distintas algas que se utilizan en la industria y los productos obtenidos respectivos. Una de las algas más estudiadas es del género *Chlorella*, debido a su capacidad para producir diversos compuestos de valor, así como a su fácil propagación (Evert & Eichhorn, 2013).

Tabla 1. Algunos productos que se generan en la industria a partir de microalgas (Spolaore et al., 2006).

Microalga	Producto	Referencia
<i>Chlorella</i>	Alimento acuicultura y biodiésel.	(Pulz & Scheibenbogen, 1998)
<i>Haematococcus</i>	Astaxantina	(Pulz & Gross, 2004)
<i>Porphyridium</i>	Ácido araquidónico	(Wen & Chen, 2003)
<i>Arthrospira</i>	Ácido linoleico	(Apt & Behrens, 1999)
<i>Dunaliella</i>	β-Caroteno	(Brown et al., 1999)

1. Genero *Chlorella*

El género *Chlorella* forma parte de las microalgas verdes, las cuales se caracterizan por su coloración verde y su amplia tolerancia a la temperatura. Pueden cultivarse en un rango de temperaturas que va desde los 15 a los 40 °C. Estas algas tienen

la capacidad de crecer tanto de manera autótrofa en medios inorgánicos, como heterótrofa o mixotrófa. El tamaño de las células varía según la especie, oscilando entre 2 y 12 μm de diámetro. A pesar de ser organismos unicelulares e inmóviles, se pueden encontrar de manera individual o en conjuntos irregulares. Se destaca por su alta tasa de reproducción en comparación con otras algas, lo que la convierte en una opción atractiva para la producción de biomoléculas y biodiésel (Masojídek & Torzillo, 2008).

No obstante, la composición de la pared celular de *Chlorella* tiende a variar según la especie. Se ha informado que contiene celulosa, hemicelulosa (xiloglucano, oligosacáridos de manano, D-glucurono), pectina y ulvano (Zanchetta et al., 2021). El porcentaje de celulosa en *Chlorella vulgaris* ha sido observado en un rango entre el 10% y el 47% del peso seco (Zanchetta et al., 2021).

2. *Chlorella sorokiniana*

La especie *C. sorokiniana* es una de las *Chlorella* más pequeñas dentro del género, con un tamaño que oscila entre 2 y 5 μm (Masojídek & Torzillo, 2008). De esta especie se han obtenido diversos productos de interés, como aminoácidos, péptidos, fitohormonas, vitaminas y minerales. Una de las ventajas destacadas de estas algas es su bajo costo de producción y su fácil escalabilidad (Kotrbaček et al., 2015). En el ámbito de proyectos ambientales, se ha encontrado que la aplicación de la biomasa de *C. sorokiniana* es capaz de mejorar la disponibilidad de nitrógeno en el suelo. Además, su

extracto ha demostrado aumentar la actividad de endoglucanasa en plantas de tomate (Gonçalves, 2021).

Para esta especie, se han reportado producciones de biomasa que alcanzan los 1.2 g/L en 6 días bajo condiciones autotróficas, con una composición que incluye un 37.7% de proteínas, 1.37% de fibra, 20.93% de lípidos, 6.2% de minerales, 6.29% de humedad y 27.51% de carbohidratos, utilizando medio TAP y reemplazando el ácido acético por ácido clorhídrico (Kumar et al., 2014).

B. Celulosa

Un biopolímero que ha despertado considerable interés en la industria en los últimos años es la celulosa. Este material se encuentra abundantemente en la naturaleza y ha demostrado ser renovable, degradable y versátil. Se estima que anualmente se producen al menos 7.5×10^5 toneladas de celulosa (Habibi et al., 2010). La celulosa es un polisacárido compuesto por cadenas de glucosa unidas por enlaces β -1,4-O-glucosídicos, y se encuentra mayormente en la pared celular de plantas y protistas, como microalgas y macroalgas. El porcentaje de celulosa en la pared celular varía entre organismos e incluso dentro de la misma especie. Existen cinco tipos diferentes de celulosa (I, II, III, IV y V), de los cuales los tipos I y II se encuentran en la naturaleza. La diferencia entre estos cinco tipos radica en la cantidad de cadenas (1 o 2) y su paralelismo, lo que resulta en diferentes estructuras con diferentes grados de rigidez (I > II > III > IV > V) (Zanchetta et al., 2021).

En cuanto a las características de la celulosa, cabe destacar que es insoluble en agua debido a sus largas cadenas y alto peso molecular. Sin embargo, mediante diversos procesos, es posible convertir la celulosa en nanocelulosa (Wulandari et al., 2016).

C. Microcelulosa

La celulosa microcristalina (MCC) es un polvo blanco, inodoro, insípido y de flujo libre que se obtiene a partir de la pulpa de madera. Se trata de un tipo de celulosa que ha sido parcialmente hidrolizada o descompuesta para crear cristales más pequeños. La MCC es un excipiente común, es decir, un ingrediente inactivo, en productos farmacéuticos. Se utiliza para la fabricación de tabletas y cápsulas, y también puede desempeñar funciones como agente de volumen, aglutinante y desintegrante (García et al., 2006).

La MCC presenta diversos beneficios, entre ellos (López-Velázquez et al., 2020):

1. **Sustancia natural y segura:** Derivada de la pulpa de madera, la MCC es una sustancia natural no tóxica y segura para el consumo humano.
2. **Neutralidad en sabor y olor:** Es insípida e inodora, lo que significa que no afecta el sabor ni el olor de los alimentos o bebidas.
3. **Agente de volumen:** Funciona como agente de volumen, lo que puede ser beneficioso para aumentar el volumen de alimentos o bebidas. Esto puede

resultar útil para personas que buscan perder peso o que tienen dificultades para comer.

4. **Agente antiespumante:** La MCC actúa como agente antiespumante, ayudando a prevenir la formación de espuma en los alimentos. Esto puede ser útil para productos propensos a apelmazarse, como polvos y gránulos, así como otros productos que pueden sufrir de esta condición.

D. Nanocelulosa

La nanocelulosa es un material con un gran potencial en el área biomédica debido a su morfología, que es muy similar a la del colágeno, su baja citotoxicidad y su fácil manipulación (Kummala et al., 2018). Aunque toda la nanocelulosa proviene de la celulosa, no todas las partículas se comportarán de la misma manera. Las propiedades de la nanopartícula pueden variar dependiendo del método de extracción y de su origen. Otros factores importantes a tener en cuenta son la madurez de las fibras, el método de separación y las condiciones en las que crecieron. Se estima que su resistencia a la tensión es alrededor de 130 GPa, lo cual está por encima del Kevlar (60-125 GPa) y ligeramente por debajo del acero, que tiene 200 GPa (Dufresne, 2013). La nanocelulosa puede encontrarse en tres formas distintivas: nanocelulosa cristalina, nanocelulosa fibral y nanocelulosa bacteriana.

1. Nanocelulosa cristalina

La nanocelulosa cristalina (NCC) se puede obtener mediante extracción química para eliminar las partes amorfas, lo que resulta en un cristal rectangular con alta cristalinidad. Se puede observar que las partículas tienen un ancho de 10-20 nm y un largo de 100-250 nm (Ross et al., 2021). Estas partículas poseen propiedades eléctricas, ópticas y magnéticas, lo que las hace muy útiles en la industria tecnológica, automotriz y médica (Rodríguez Liñan, 2016).

2. Nanocelulosa fibral

La nanocelulosa fibral (NCF) consiste en fibras entrelazadas por cristales y partes amorfas, con longitudes de 500-2000 nm y un diámetro de 4-10 nm (Ross et al., 2021). Se presenta en forma acuosa con una gran viscosidad. Principalmente se obtiene de la madera y se utiliza comúnmente en la industria del papel y cartón (Rodríguez Liñan, 2016).

3. Nanocelulosa bacteriana

La nanocelulosa bacteriana (NCB), como su nombre indica, proviene de bacterias. A diferencia de la NCC y la NCF, esta es secretada y es más pura debido a la ausencia de otros polímeros como alginato, lignina y pectina (Omran et al., 2021). Sin embargo, es similar a la NCF, donde presenta características filamentosas a diferencia de los cristales de la NCC. La producción de la NCB se realiza en cultivo estático o en agitación; sin

embargo, el tipo de cultivo afectará las propiedades de la nanocelulosa. En el caso de los cultivos estáticos, se obtiene una membrana gelatinosa, mientras que los que tienen agitación resultan en una masa irregular o pellet (Omran et al., 2021). Basándose en las necesidades de la aplicación, se selecciona el tipo de cultivo. Este es el tipo más costoso de nanocelulosa.

E. Características de degradación en nanocelulosa

Debido al tamaño y a las propiedades fisicoquímicas, se pensaba que la nanocelulosa podría ser un problema para el medioambiente al afectar comunidades microbianas al final de su vida útil propuesta. En un estudio realizado en 2016 por Singh et al., se utilizaron dos consorcios anaeróbicos diferentes para intentar degradar NCC y NCF previamente extraídas mediante ácido sulfúrico. Se encontró que la degradación de NCC es ligeramente más rápida que la de NCF, debido a diferencias en las diversas rutas metabólicas posibles presentes dentro de la comunidad microbiana para la degradación de celulosa. Estas rutas fueron identificadas mediante la amplificación de genes del consorcio, así como por los cambios en la composición del consorcio. Las constantes cinéticas de degradación observadas en dicho estudio fueron de 0.69 ± 0.04 semana⁻¹ para NCC y 0.58 ± 0.05 semana⁻¹ para NCF. Se concluyó que la nanocelulosa en ambas formas no presenta un peligro para el ambiente y que puede ser fácilmente biodegradada sin inducir estrés en los consorcios (Singh et al., 2016).

F. Método de extracción de celulosa

1. Extracción mecánica

La extracción mecánica funciona homogeneizando la materia a alta presión o con fuerza mecánica, lo que resulta en nanofibras. Se han reportado distintos métodos mecánicos; no obstante, los más comunes son mediante alta presión y/o macerado. A pesar de que este método consume una alta cantidad de energía, se han buscado maneras de facilitar el proceso mediante pretratamientos. Estos pretratamientos, en su mayoría químicos, utilizan ácidos y bases. El producto final de una extracción mecánica son las fibras de NCF, que se muestran gelatinosas. Sin embargo, si la concentración aumenta durante la homogeneización, el gel aumenta su viscosidad y las máquinas no logran bombear el producto (Dufresne, 2013). En esencia, la NCF es el conjunto de la nanocelulosa cristalina y sus partes amorfas. Una desventaja de la utilización de este proceso es el posible daño a la estructura cristalina. No obstante, este método es mucho más escalable a nivel industrial que su contraparte (Omran et al., 2021).

2. Extracción química

La extracción química se utiliza mayormente para la obtención de NCC. Este método se basa en el uso de ácido para la hidrólisis, que elimina las partes amorfas adheridas a los cristales (Omran et al., 2021). Durante la hidrólisis, los iones de hidrógeno penetran las cadenas de celulosa en las zonas amorfas y cortan los enlaces glucosídicos, dando como

resultado cristales. Los ácidos más comunes para este proceso son el HCl y H₂SO₄. La utilización de ácido sulfúrico es más común debido a la reacción que tiene con los grupos hidroxilos en la superficie de la celulosa, formando grupos éster aniónicos que ayudan con la dispersión de la nanocelulosa en el agua. Sin embargo, la termoestabilidad se ve afectada por esto, y es necesario neutralizar las nanopartículas con hidróxido de sodio (Dufresne, 2013). Algunas moléculas que podrían estar presentes y afectar la pureza son la lignina, pectina, hemicelulosa y otros polímeros encontrados en las fibras. La ventaja de este método sobre el mecánico es la menor probabilidad de causar daño a la estructura, pero es más costoso. Se han empezado a desarrollar nuevos protocolos de extracción que utilizan hidrólisis enzimática, oxidación por TEMPO (C₉H₁₈NO) e hidrólisis por gases ácidos (Omran et al., 2021).

G. Técnicas de Caracterización de Nanocelulosa

1. Microscopio Óptico (MO)

Este microscopio utiliza un lente de objetivo variable (10X, 40X, 100X), un lente ocular, una fuente de luz, una plataforma y un condensador. Se emplea un portaobjetos transparente para permitir el paso de la luz hacia el lente, lo que nos permite observar el espécimen. El enfoque de la muestra se logra mediante el tornillo macrométrico y micrométrico. Es un microscopio bastante sencillo y fácil de usar; no obstante, tiene sus limitaciones, como la resolución de la imagen. Al utilizar mayores magnificaciones, la imagen puede empezar a perder resolución, y esto es directamente proporcional al tamaño

de la apertura focal. A mayor aumento, menor apertura, y menos luz entra al lente. A pesar de estas desventajas, su función principal es la observación preliminar de muchos especímenes (Wollman et al., 2015).

La microcelulosa y/o nanocelulosa bajo el microscopio óptico tiene una característica especial que ayuda a diferenciarla. Los cristales de nanocelulosa que forman láminas al ser transparentes logran causar una difracción de la luz utilizada para observar la muestra, lo que provoca que se aprecien colores en la partícula. Estos colores representan la longitud de onda y están directamente relacionados con el grosor de la partícula (Chávez-Guerrero et al., 2022).

2. Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

A diferencia del microscopio óptico, el microscopio electrónico de barrido utiliza un haz de electrones para construir una imagen. Siendo un microscopio de alta tecnología, se le pueden adaptar detectores especializados para muestras que lo requieran. Una de las grandes ventajas del MEB es su alta resolución de hasta ~1 nm, la creación de imágenes tridimensionales y su sencillez de uso. Para la preparación de una muestra, es necesario recubrirla con partículas de oro o algún compuesto para darle propiedades conductoras. Con esta técnica, es posible evaluar la morfología, matriz y formas de cristalización de diversos materiales (Rodríguez Liñan, 2016).

3. Difracción de Rayos X (DRX)

La difracción de rayos X es una técnica que tiene como fundamento la difracción de rayos en el rango de 0.01 nm a 10 nm a través de sólidos. Es uno de los métodos más importantes para determinar la estructura de productos naturales complejos. Funciona como un método cualitativo para la identificación de compuestos cristalinos. Todos los cristales de un compuesto tienen una difracción específica, y es por esto que se logra identificar mediante la comparación del patrón contra la muestra (Skoog et al., 2007).

La muestra se prepara mediante la trituración del compuesto hasta obtener cristales muy finos y homogéneos. Se coloca en un portaobjetos que contiene una cavidad, normalmente hecho de vidrio, aluminio, bronce o Lucita. Se le coloca una superficie de vidrio esmerilado, cerámica o cartón y se introduce al equipo. El haz de rayos X atraviesa la muestra, y ocurre una reflexión que debe cumplir con el principio de Bragg. Para la interpretación del diagrama, se calcula el ángulo de difracción con la ecuación de Bragg y recurriendo a la base de datos disponible por el Centro Internacional para Datos de Difracción se puede identificar hasta más de 477,000 materiales (Skoog et al., 2007).

4. Espectroscopia de Infrarrojos con Transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica de espectrometría trabaja sobre el espectro infrarrojo medio y se fundamenta en la detección de ondas de luz que pasan a través de la muestra. La muestra es sometida a un haz de luz, y en esta, la luz puede ser absorbida o atravesada. La luz que coincide con el detector es analizada por la computadora y se genera una gráfica con la información correspondiente de las longitudes de onda. Una de las mayores ventajas es que la medición toma muy poco tiempo y no es necesaria la utilización de reactivos. Los instrumentos de transformada de Fourier mejoraron la técnica de IR debido a que usa menos elementos ópticos ni rendijas; por ende, no hay atenuación de la radiación. Otra ventaja es su alta resolución y replicabilidad (Skoog et al., 2007).

5. Método de Azúcares reductores

El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) funciona para determinar la concentración de azúcares reductores totales. El fundamento de la técnica se basa en la reacción redox al utilizar DNS, oxidando los azúcares y propiamente reduciéndose a sí mismo durante una reacción endotérmica. Un mol de glucosa reacciona con un mol de DNS. Mediante esta reacción colorimétrica, se observa un cambio de color de amarillo a rojo, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de glucosa presente (Negrulescu et al., 2012). Debido a que la celulosa puede ser hidrolizada mediante celulasas, resultando en glucosa, esta puede ser medida mediante el método descrito.

III. METODOLOGÍA

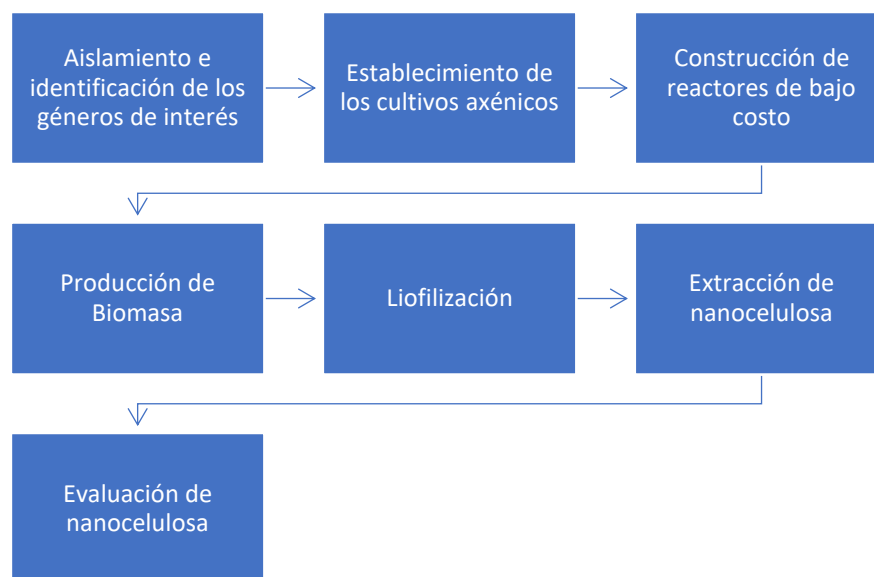


Figura 1. Metodología general del proyecto de investigación.

A. Recolección, Aislamiento, Purificación e Identificación de Microalgas

Las microalgas utilizadas en el presente proyecto fueron definidas en base a su previo análisis en la literatura donde se consideraba el género, su posible presencia de celulosa, así como por su posible aislamiento en la región geográfica. Para esto se tomaron muestras del río La Silla bajo las coordenadas 25.606335°N, -100.261471°O. Asimismo se tomó una cepa de *Chlorella sorokiniana* del cepario disponible en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, la cual fue aislada del río Pesquería en el estado de Nuevo León.

Para el aislamiento e identificación de géneros de las microalgas encontradas en las muestras de río, se buscó separar los diferentes géneros por series de dilución en placa. Se utilizaron 2 distintos medios para su comparación, el medio convencional Bold Basal Medium (BBM) (Lloyd et al., 2021) y el medio experimental LC-Y (Beltrán-Rocha et al., 2021).

Medio BBM contiene NaNO_3 2.94 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.17 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mM, K_2HPO_4 0.43 mM, KH_2HPO_4 1.29 mM, NaCl 0.43 mM, solución hierro 0.9 μM , solución boro 9 μM , solución EDTA 8.5 μM y solución elementos traza ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.50 μM , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.36 μM , MoO_3 0.26 μM , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.31 μM , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.084 μM).

Medio LC-Y se reporta con concentraciones de KNO_3 5 mM, KH_2PO_4 1 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.25 mM, H_3BO_3 46 μM , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 9.15 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 765 nM, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 320 nM, $(\text{NH}_4)_6\text{M}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15 nM, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and Na_2EDTA 20 μM .

Para el muestreo se tomaron 10 mL de agua de río y fueron llevadas al microscopio óptico. Una vez identificada la presencia de microalgas se inocularon matraces con 1 mL de la muestra en 50 mL de los medios BBM y LC-Y previamente descritos. Las condiciones de incubación fueron a 9500 lux durante un fotoperiodo 24:0 (L:O), agitación 150 rpm y 27-30 °C. Posterior a 7 días de incubación se tomaron 20 microlitros del cultivo y se sembraron en placa. Para la preparación de placas se le agregó

1.5% de agar bacteriológico a los medios, se manejaron las mismas condiciones de temperatura, fotoperiodo y lux que durante su etapa inicial en matraz. El crecimiento en placa ayudó para reducir el número de células y simplificar el levantamiento de colonias individuales de los cuales potencialmente se pueden obtener cultivos unialgales. Posteriormente, para la identificación de las microalgas se utilizó un microscopio óptico (x40) para observar las características morfológicas de las células. Esta fase se repitió las veces necesarias hasta obtener géneros aislados.



Figura 2. Cultivos de *C. sorokiniana* en medio BBM y LC-Y

Una vez identificadas se inocularon nuevamente en matraces de 100 mL con los medios LC y BBM, incubándose a las mismas condiciones para iniciar el proceso de obtención de un cultivo axénico. Después de 14 días se tomaron alícuotas y se observó en microscopio para determinar el crecimiento del cultivo axénico.

Al momento que los cultivos se determinaran libres de contaminación, se mantuvieron en matraz durante la duración de la investigación mediante cambios a medios nuevos para mantenerlos activos. Si durante la observación de los cultivos se evidenció alguna contaminación por bacterias y/o hongos, se le suplementó al medio de cultivo con un antibiótico y antifúngico comercial de la marca BioWest. Esto se realizó tomando muestras de 1 mL del cultivo para ser tratadas en 5 mL de medio con el producto comercial, dando una concentración previamente reportada por (Reyna Martínez, 2013) de 500 UI/mL Penicilina G, 500 µg/mL Estreptomicina y 1.25 µg/mL Anfotericina B. Posterior a 36 horas de exposición, se tomó 1 mL del inóculo en tratamiento y se sembró en 50 mL de medio BBM y LC-Y sin antibiótico.

B. Biorreactores de columna de burbujeo (BCB) y establecimiento de condiciones de Cultivo

Para la construcción de los biorreactores se utilizaron materiales reciclados y de bajo costo (PET). La incubación y manejo se llevó a cabo utilizando cajas de cartón que tuvieran el suficiente espacio para almacenar 6 botellas PET de 1.5 L. Una vez que se obtuvo la caja se le hicieron 6 ranuras para poder colocar 5 cm del cuello de la botella dentro y así mantenerlas posicionadas. Para lograr que las botellas permanecieran en su lugar se requirió que la caja estuviera elevada y para esto se usaron 2 vigas de cartón, así como bloques de hielo seco reciclados de un servicio de paquetería. Posterior a tener la estructura (Figura 10-A) lista se recubrió el interior de la caja con papel aluminio para

maximizar la dispersión de luz dentro de ella. Se colocaron 2 tiras LED (luz fría) equivalentes a 3 metros de manera distribuida para el aprovechamiento de luz.

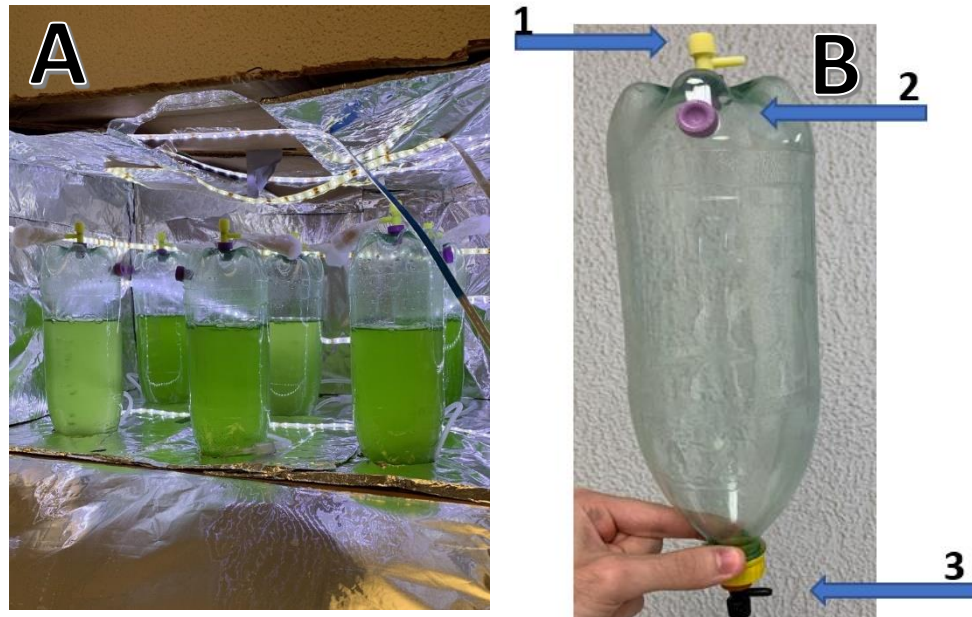


Figura 3. A) Estructura con capacidad de 6 reactores de 1.5 L. B) Biorreactor de columna de burbujeo. 1) Escape de aire; 2) Tapón de goma para facilitar toma de muestra; 3) Regulador de flujo de aire.

Para la modificación de las botellas (Figura 3-B) se les realizaron 3 perforaciones: en la tapa, el fondo y lateral para diferentes funciones. Por la perforación lateral se le agregó un tapón de goma para facilitar la introducción de una jeringa y hacer los conteos celulares. La perforación de la tapa se hizo para introducir un regulador de flujo, el cual va conectado a una bomba de aire. Y finalmente la perforación del fondo tiene como función el proveer un escape para el aire inyectado. Las botellas se utilizaron de manera invertida para facilitar posicionamiento e inyección de aire.

Posteriormente se le conectaron a las botellas, mangueras de plástico y válvulas antirretorno, así como un filtro membrana de nilón de 0.2 μm para prevenir la contaminación durante el bombeo de aire ambiental.

1. Preparación de inóculo y desinfección de los biorreactores

Se inocularon matraces de 100 mL con 1 colonia proveniente de los cultivos en placa de la cepa de los medios LC y BBM. Durante este proceso se llevó a cabo el monitoreo del cultivo mediante una curva de crecimiento, efectuando conteos celulares cada 48 horas para cada una de las cepas. Los matraces se dejaron en incubación hasta que empezara a cambiar su coloración a amarilla alcanzando su fase estacionaria. Una vez identificada en que días ocurre la fase exponencial, este proceso se repitió una vez más para realizar la transferencia del inóculo al biorreactor durante la fase de mayor densidad celular.

La desinfección de los biorreactores se realizó con lavados utilizando detergente comercial y etanol al 70%, así como exposición a luz UV (UV-C 254nm) por al menos 30 minutos para la minimización de contaminación. Se esterilizaron 900 mL de medio por cada biorreactor.

Finalmente, cuando el cultivo en matraz (100 mL) alcanza su fase exponencial, este es vertido por completo en el biorreactor junto con los 900 mL de medio. Se trabajó

bajo una campana de flujo laminar. Esto como control de esterilidad ante la posible contaminación de bacterias y hongos.

El crecimiento de las cepas en los biorreactores se llevó a cabo bajo condiciones de 27 °C, 4500 luxes de intensidad lumínica, ciclos de luz 16:8 horas e inyección de aire ambiental entre 0.1-0.5 vvm.

2. Monitoreo de biorreactores

Se realizaron conteos celulares utilizando una cámara de Neubauer para monitorear los cultivos en los biorreactores, así como para construir una curva de crecimiento. Además de realizar un conteo, esto nos sirvió para descartar el crecimiento de hongos y/o bacterias en los biorreactores. En dado caso de observarse contaminación el biorreactor se retiraba y se descartaba y se comenzaba de nuevo el proceso.

C. Cosecha y liofilización de biomasa de microalgas

La recolección de biomasa se llevó a cabo al finalizar el ciclo de crecimiento del cultivo, este basándonos en la cinética realizada durante 35 días. Al término del cultivo se procedió a centrifugar (Thermo Electron IEC Centra-CL3R) en tubos Falcón de 50 mL a 4,000 rpm x 15 min a 4 °C. Posterior a la centrifugación se realizaron lavados con agua

desionizada con el objetivo de remover las sales del medio. Esto se ejecuta 2 veces y finalmente se colocan en el congelador para posteriormente ser liofilizadas.

Una vez que se recolectó la biomasa, se procedió a colocar en frascos para su liofilización. La biomasa se introdujo a la liofilizadora (Thermo Electron Corporation MODULY0D) bajo las siguientes condiciones: 48 horas, -52 °C y 300 Torr. Se pesó la biomasa seca para estimar la producción de gramos por litro de la microalga.

D. Extracción y Aislamiento de Nanocelulosa

Para la extracción y aislamiento de microcelulosa y nanocelulosa se siguió el protocolo propuesto por Chávez-Guerrero y colaboradores en 2022 donde se utilizan 3 reactivos: peróxido de hidrogeno, ácido sulfúrico e hidróxido de sodio. Por cada gramo de biomasa seca se emplean 30 mL de H₂O₂ (30%) y 1 mL de H₂SO₄ concentrado.

En un matraz se colocó 20 mL de H₂O₂ y se calentó a 90 °C en una plancha (Thomas Scientific Hotplate/Stirrer). Una vez que alcanzo esta temperatura y se agregó 1 gramo de biomasa seca y se mantuvo en agitación con un agitador magnético durante 1 hora. Posterior a la hora se agregó 10 mL de H₂O₂ y 1 mL de H₂SO₄ durante otra hora bajo las mismas condiciones. Finalmente, se tomó el matraz y se colocó dentro de la autoclave (Tuttnauer 2540 Heidolph) durante 1 hora a 110 °C y 10 psi. Al finalizar su duración en la autoclave se neutralizó con NaOH.

Se retiró el matraz y se vació el líquido en tubos Eppendorf de 2 mL para ser centrifugados (Beckman Coulter Microfuge 16) a 14,000 rpm durante 10 min y se le realizaron lavados con agua desionizada para remover sales y otros componentes restantes de la digestión. Resultando en un pellet de color blanco (Chávez-Guerrero et al., 2022).

E. Caracterización de Nanocelulosa

Para la determinación de microcelulosa y nanocelulosa presente se realizó el método de DNS para azúcares reductores (Negrulescu et al., 2012) Utilizando celulasas (durante 24 horas) se podrá evaluar la cantidad de glucosa en la muestra a partir de la digestión de la muestra. Por cada molécula de glucosa interactuara una molécula de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Está produciendo una coloración naranja o roja debido a la reducción de los azúcares (Bello Gil et al., 2006). La evaluación de la estructura de MCC y NCC se llevó a cabo bajo microscopio óptico y MEB. Primero se situó en un portaobjetos para su observación en microscopio óptico a 40X y 100X. Al observar nanocelulosa en MO, se aprecian distintos colores sobre la partícula. Estas debido a la difracción de la luz blanca. Una vez confirmado, la muestra se colocó en láminas de silicio para llevarse al SEM previo a su tratamiento con partículas de oro. En este el haz de electrones interactúa con las partículas de oro para detectar la estructura de la partícula de NCC/MCC. En base a las imágenes obtenidas se puede hacer una comparación de la estructura obtenida de la partícula contra la reportada por otros autores. El propósito del

SEM es buscar si la partícula es rectangular, lisa y pequeña. Posteriormente, se lleva a FTIR donde se podrán identificar grupos funcionales mediante la observación de las diferentes intensidades obtenidas y sus picos correspondientes, así como es posible apreciar la pureza de la NCC/MCC extraída. Finalmente, con el DRX se puede hacer una interpretación de la cristalinidad del material, así como la estructura del cristal si se desea.

F. Disposición de Residuos

La disposición de residuos generados se llevó a cabo siguiendo los lineamientos establecidos por la Facultad de Ciencias Químicas (PR-CLB-SRR/002) utilizando el sistema de identificación y disposición en contenedores asignados para cada uno de los reactivos utilizados y/o generados. Estos siendo principalmente la neutralización de ácidos y esterilización de material con residuos celulares.

IV. RESULTADOS

A. Aislamientos

Durante el proceso de aislamiento e identificación se lograron observar diversos géneros de microalgas (Figura 4). De las cuales se lograron aislar *Chlorella* sp., *Pseudanabaena* sp. y *Acutodesmus* sp. Sin embargo, debido a su naturaleza se descartó *Pseudanabaena* sp. debido a que al ser cianobacteria no contienen celulosa en su pared celular. Así mismo, *Acutodesmus* sp. se logró propagar en placa, sin embargo, perdió viabilidad cuando se inoculaba en medio líquido. Debido a que el género *Chlorella* presento buena viabilidad y adaptación a las condiciones de estudios se decidió seleccionarla.

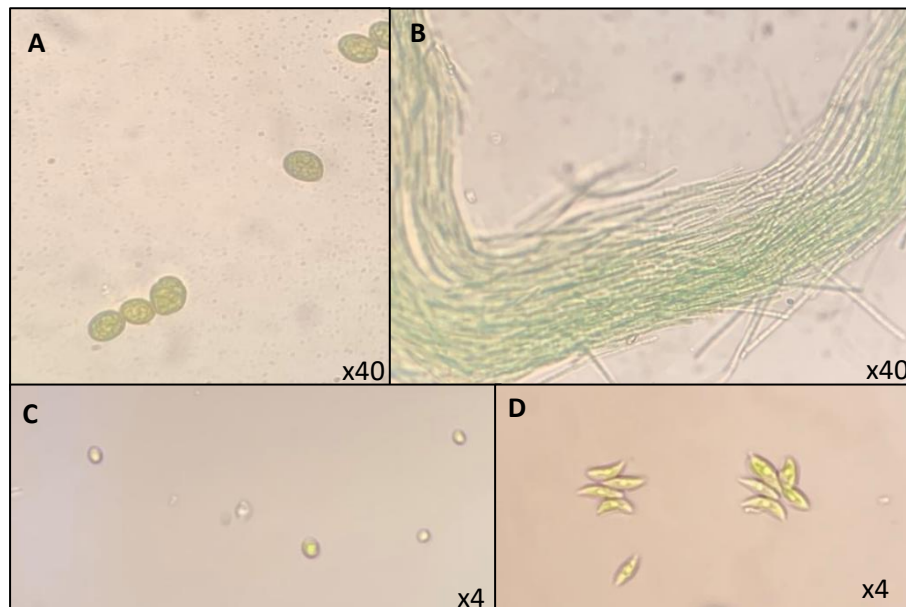


Figura 4. Microalgas aisladas del Estado de Nuevo León, México observadas en microscopio óptico a 40X. A- *Chlorella* sp.; B- *Pseudanabaena* sp.; C- *Chlorella sorokiniana*; D- *Acutodesmus* sp.

Debido a que *Chlorella* es uno de los géneros más estudiados, se tenía la certeza que la pared celular de aquella contendría celulosa en su pared celular. Debido a que no se secuenció la cepa se le asignó el termino sp. para su uso en el proyecto y como diferenciador de la cepa *C. sorokiniana*. Aun cuando ambas microalgas pertenecen al mismo género, se logra apreciar una gran diferencia en el tamaño de las células. *C. sorokiniana* tiene un diámetro de entre 2 a 4 μm . Mientras que *Chlorella* sp. oscila entre los 6-10 μm .

B. Producción de Biomasa de *Chlorella*

Durante casi 40 días se monitoreó el crecimiento de ambas cepas a nivel matraz y biorreactor. Se contaron las células en una cámara Neubauer y se calculó la concentración celular de estas. Se encontró que ambas cepas llegan a su fase exponencial alrededor de los 14 días y concluyen su ciclo de crecimiento a los 37 días. Sin embargo, una diferencia muy notoria entre ambas microalgas es la concentración que se llegó a alcanzar en los 37 días.



Figura 5. Cultivos de *C. sorokiniana* en biorreactores de columna de burbujeo.

Como se puede observar en la Figura 6, durante la fase de crecimiento en matraz *C. sorokiniana* alcanzo una concentración celular en promedio de 1.48×10^8 células/mL a los 17 días cuando se cultivó en medio LC-Y mientras que solamente alcanzo 5.7×10^8 células/mL en medio BBM a los 19 días.

De la misma manera, en la Figura 7 se observa las mismas condiciones y tendencias ahora para *Chlorella* sp. alcanzando 5.80×10^6 células/mL a los 37 días en medio LC-Y y 1.18×10^6 células/mL en medio BBM.

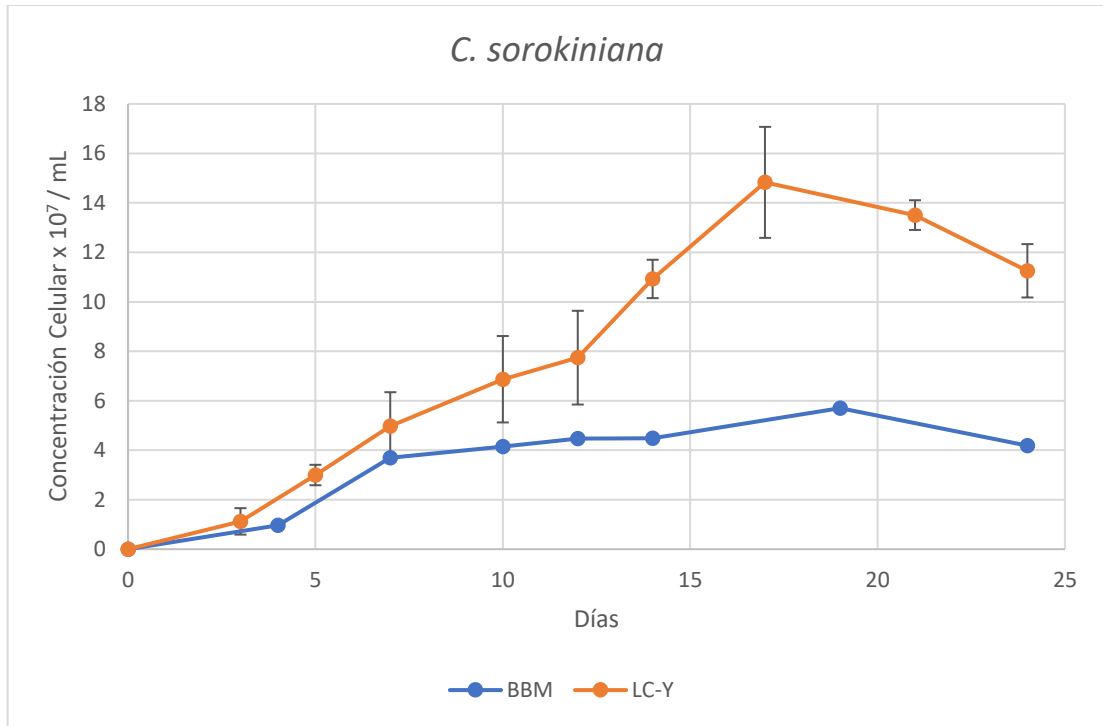


Figura 6. Cinética de *C. sorokiniana* en matraz con medio LC-Y y BBM de 100 mL. Promedio \pm error estándar LC-Y y BBM ; n=3, n=0.

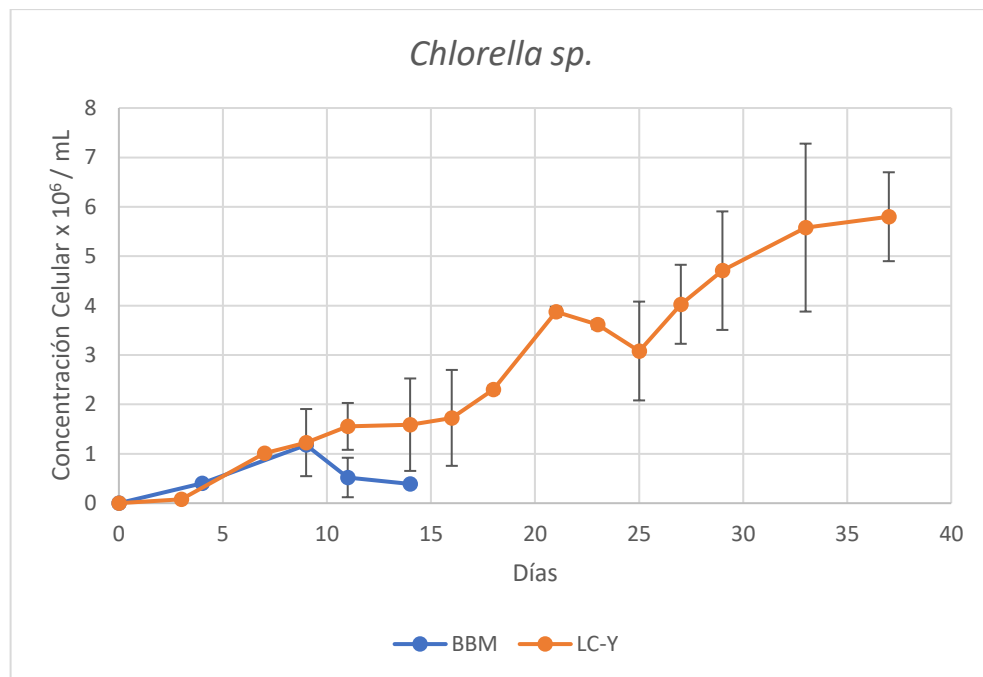


Figura 7. Cinética de *Chlorella sp.* en matraz con medio LC-Y y BBM de 100 mL. Se observa como promedio \pm error estándar; n=3.

Para su escalamiento en biorreactor se realizaron cultivos de 100 mL de ambas algas en medio LC-Y durante 14 días. Se contó la concentración del matraz y se transfirió el medio al biorreactor de 1 L para realizar una nueva curva en donde se obtuvo que *C. sorokiniana* (Figura 8) alcanzó 2.05×10^8 a los 35 días, mientras que *Chlorella* sp. (Figura 9) solamente alcanzó 1.3×10^7 células/mL a los 27 días. Se logra apreciar que el cultivo creció en promedio más uniforme a diferencia de su comportamiento en matraz. Uno de los factores que se incorporó durante proceso de escalación a diferencia del matraz fue la utilización de burbujeo en columna a diferencia de agitación en matraz, este pudiera contribuir con una mejor agitación y prevención de células aglomeradas dando como resultado un crecimiento más uniforme.

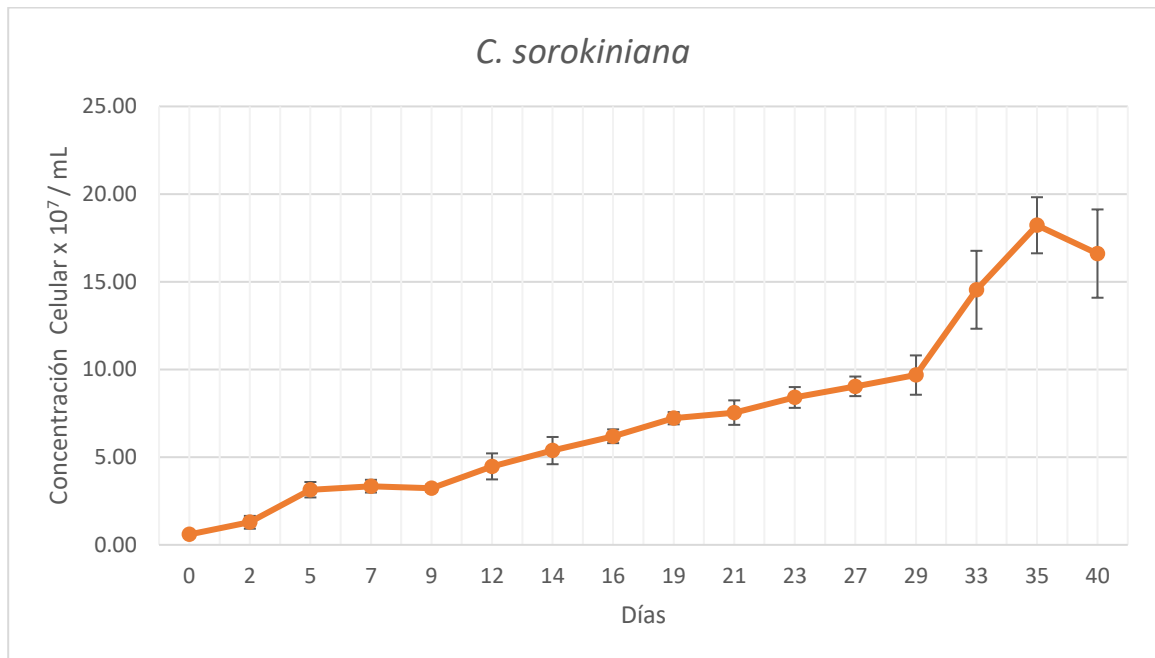


Figura 8. Cinética de *C. sorokiniana* en biorreactor con medio LC-Y de 1 L, se observa como promedio \pm error estándar; n=4.

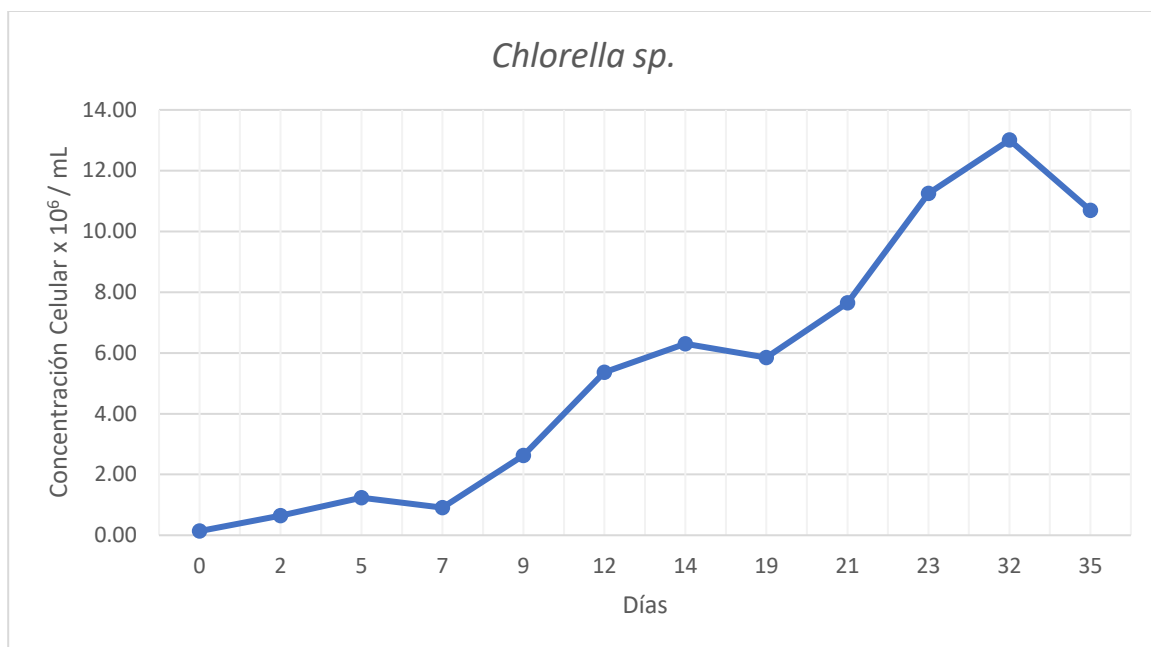


Figura 9. Cinética de *Chlorella sp.* en biorreactor con medio LC-Y de 1 L; n=1

Debido a constantes problemas de contaminación durante la fase de escalamiento con *Chlorella sp.* solamente se logró cultivar un biorreactor. Al finalizar la curva se recolectó la biomasa de los biorreactores y se obtuvo en promedio 1.23 ± 0.31 g/L de *C. sorokiniana* y 2.0 g/L de *Chlorella sp.*

C. Determinación de Celulosa

Una vez obtenida la celulosa de la biomasa algal, mediante el uso de celulasas se realizó la digestión de la cual, posteriormente se obtuvo una coloración anaranjada para la prueba de azúcares reductores. Indicativo de la presencia de celulosa, debido a la reacción de la glucosa y DNS. Utilizando una curva de calibración (Figura 10) fue posible calcular un promedio de $9 \pm 0.67\%$ de celulosa en relación con la biomasa seca para *C.*

sorokiniana mientras que *Chlorella sp.* no indicó un valor significativo de celulosa para la prueba.

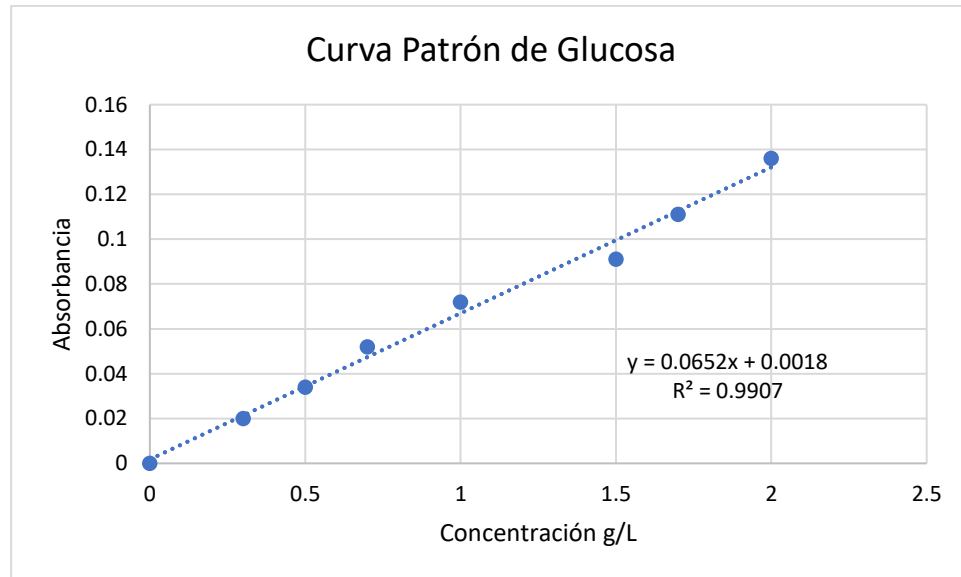


Figura 10. Curva patrón de glucosa.

D. Evaluación de Microcelulosa y Nanocelulosa por Microscopia Óptica y MEB obtenida de *C. sorokiniana*.

Durante la extracción y aislamiento de microcelulosa y nanocelulosa se logró observar como el peróxido de hidrógeno funcionaba como blanqueador al remover la coloración verde debido a la clorofila, así como la remoción de hemicelulosa y otros polímeros que se pudieran encontrar. Mediante el uso del ácido sulfúrico se realizó la hidrólisis de la celulosa y se hicieron cortes en las cadenas para producir microcelulosa y nanocelulosa. Obteniéndose un pellet gelatinoso de coloración blanca.

La microcelulosa y nanocelulosa extraída se observó mediante microscopio óptico lo cual nos permitió observar la estructura de la partícula, lo que nos dio un indicio de que la celulosa obtenida se encontraba en forma micro o nano cristales. Una particularidad de la microcelulosa y/o nanocelulosa cristalina es que aun siendo transparente se logra apreciar una coloración en el microscopio debido a la difracción de luz. Esta difracción se observa en diferentes colores, los cuales están relacionados directamente con el grosor de la partícula. Debido a que el cristal es de forma irregular, podemos ver varios colores en un solo cristal. En la Figura 11 podemos ver varios cristales con diferentes colores. En la Figura 12 tenemos una representación de los colores y los grosores observables en el cristal. Se presentan zonas con grosores de entre 80 nm (café) y 350 nm (turquesa).

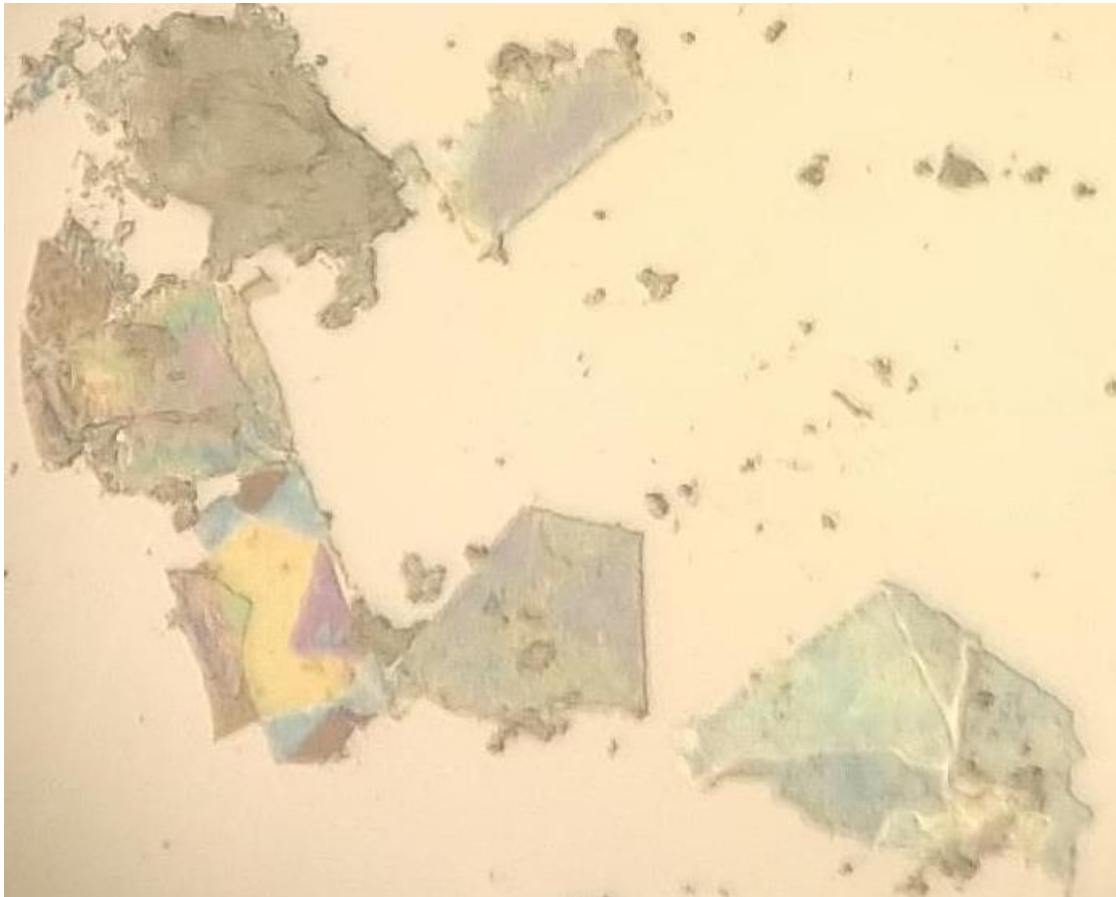


Figura 11. Nanocelulosa en microscopio óptico.

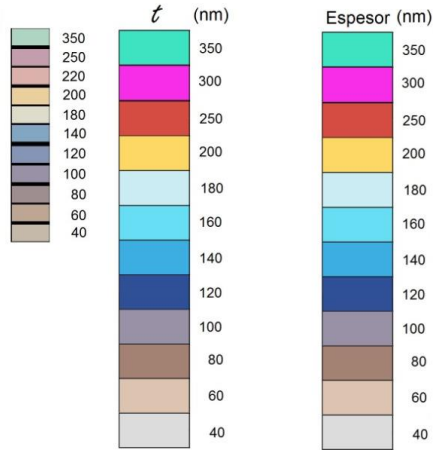


Figura 12. Tabla representativa del grosor de cristal en base a color.

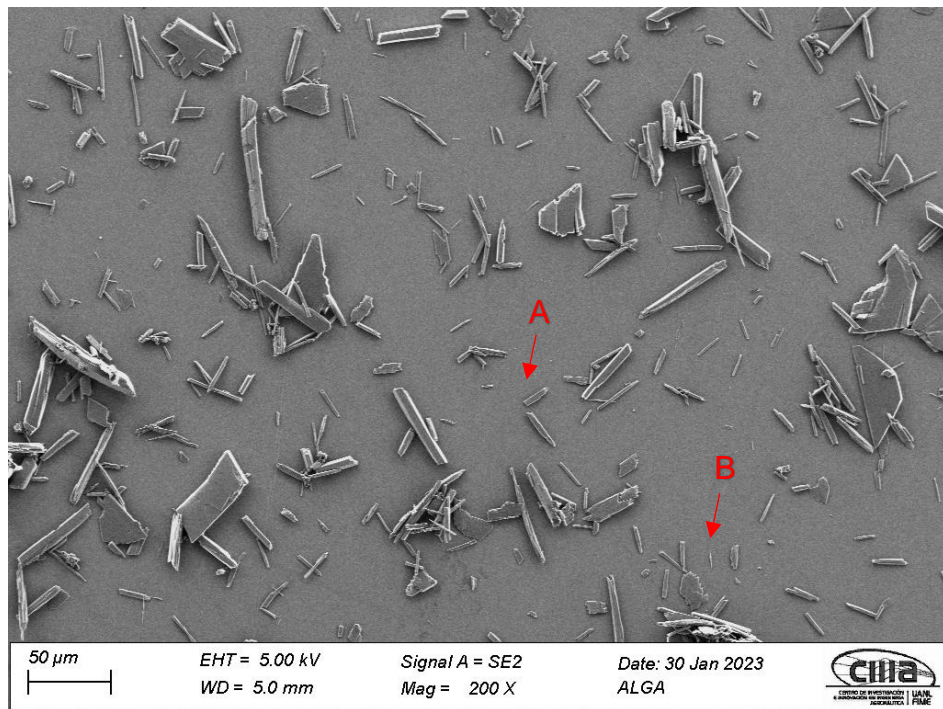


Figura 13. Imagen de MEB del producto celulósico extraído de *C. sorokiniana* a 200X. Se observan cristales de distintos tamaños indicando MCC y NCC. A) Los fragmentos de MCC rondan entre 1-50 micrómetros. B) Los fragmentos de NCC se estiman entre 100-500 nanómetro

Mediante el uso del MEB. Se observan las muestras de microcelulosa y nanocelulosa a mayor magnificación. Las imágenes se tomaron a bajo voltaje para evitar daño a estructuras de la muestra. La morfología de una de las partículas (Figura 14) observadas se detalla con una superficie rugosa e irregular posiblemente por la presencia de las partes amorfas de la celulosa que no fueron removidas correctamente durante la hidrólisis ácida. Se midió el tamaño de la partícula obteniendo una longitud de 1262 nm y un grosor de 330 nm promedio, clasificándola como microcelulosa en la escala micrométrica.

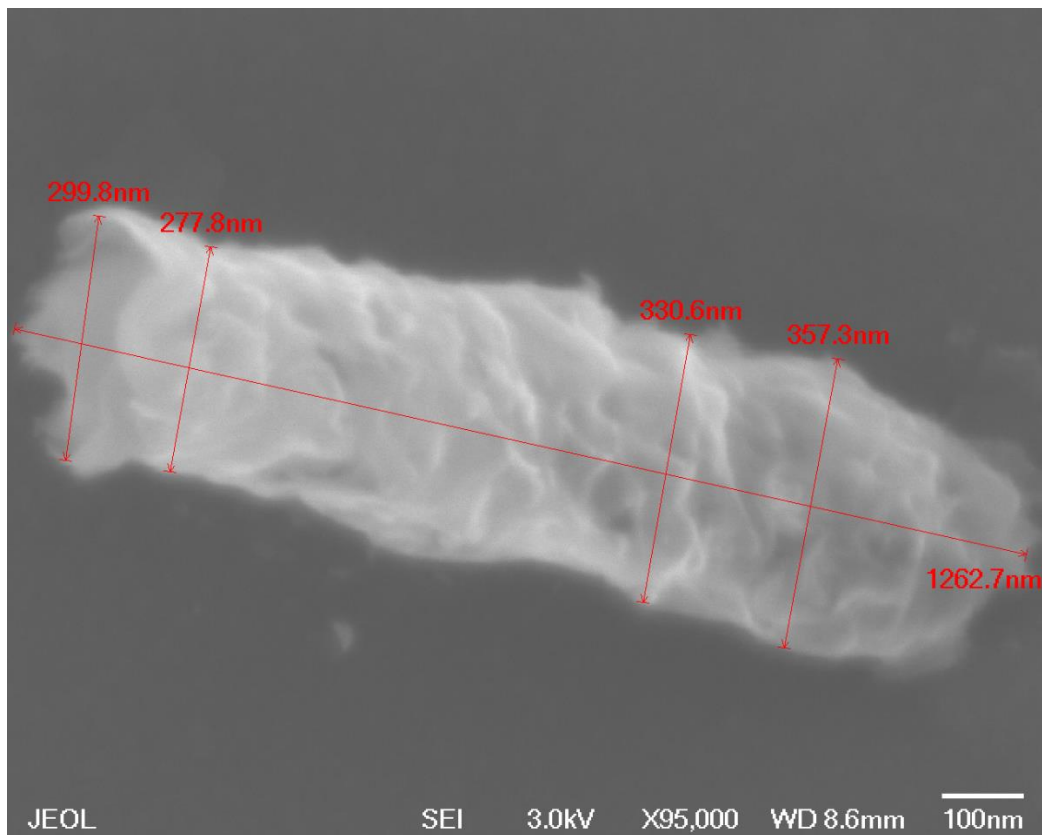


Figura 14. Imagen de MEB de nanocelulosa a 95000X.

En la Figura 15 se observa otra partícula donde se detalla cómo se componen los cristales rígidos. Estos cristales delgados y estructurados a diferencia de la previa imagen tienen ausente la parte amorfa de la celulosa. Resultado en una partícula con mayor cristalinidad, así como midiendo entre 53.8 nm a 108.1 nm. Concluyendo que se observa nanocelulosa debido a sus parámetros nanométricos. Esta estructura cristalina es la partícula que se buscaba como producto final de la extracción y transformación de la biomasa.

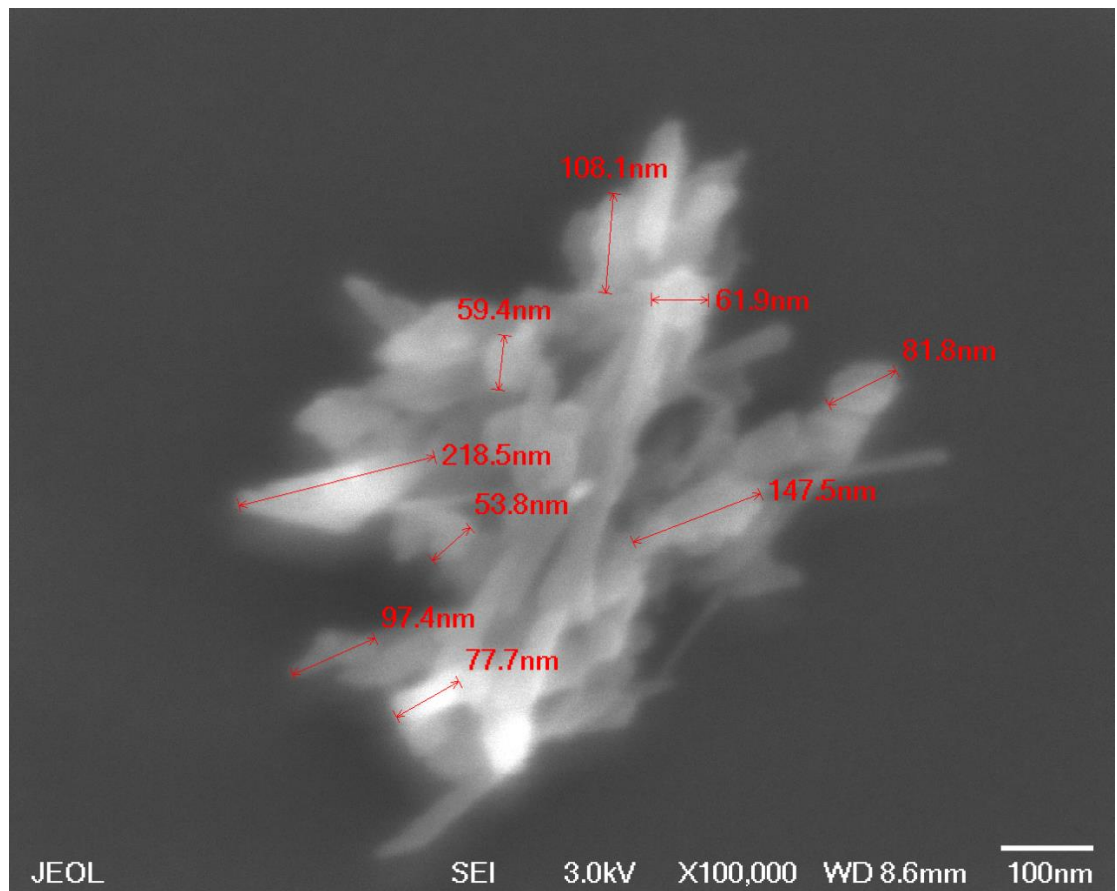


Figura 15. Imagen de MEB de nanocelulosa a 100000X. La partícula se compone de distintos cristales midiendo en un rango de 53 nm – 108.1 nm.

E. Caracterización de Microcelulosa y nanocelulosa extraída de *C. sorokiniana*.

En la Figura 16 se puede observar los resultados de la prueba FT-IR. Donde se aprecian 2 picos dentro del rango de $3600-3100\text{ cm}^{-1}$ los cuales sugieren la presencia de N-H (3492 cm^{-1}) y O-H (3395 cm^{-1}). Seguido de estos tenemos 2 picos más en 2922 cm^{-1} y 2851 cm^{-1} pertenecientes a los grupos CH_2 y CH_3 alifáticos. Así como la presencia de los picos 1682 cm^{-1} para C=O y 1619 cm^{-1} y C=C. Finalmente, la característica vibración del grupo C-O-C en la región 1100 cm^{-1} atribúyete a la estructura de la celulosa. En base lo reportado por algunos autores como BABA, se especula que el pico en el rango $1750-1680\text{ cm}^{-1}$ puede representar un pico de contaminación por presencia de hemicelulosas, así como también el pico en el rango $1620-1500\text{ cm}^{-1}$ debido a que el grupo carboxilo puede indicar la presencia de lípidos extraídos de la pared celular (Baba et al., 2016).

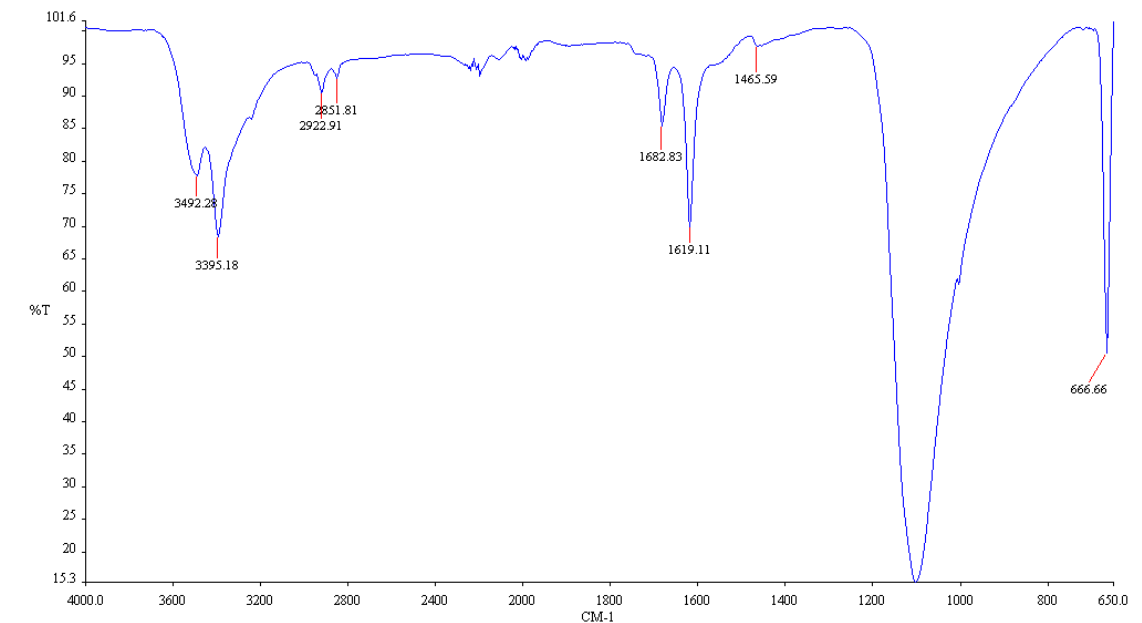


Figura 16. Espectro FT-IR de microcelulosa.

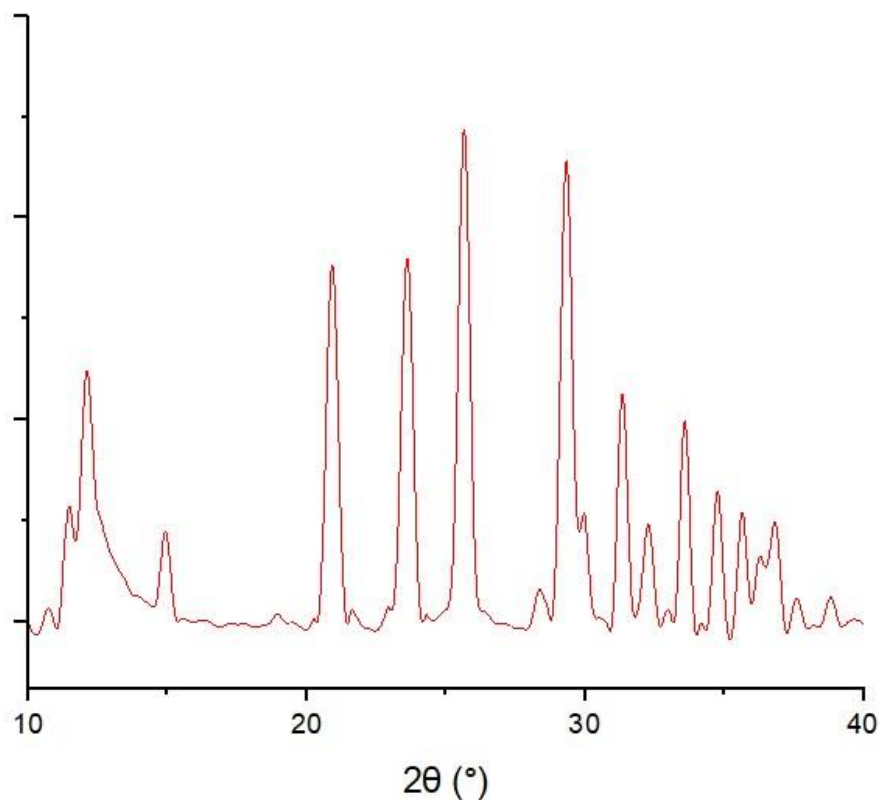


Figura 17. Difractograma rayos x de microcelulosa.

En la Figura 17 se observa el difractograma obtenido de la muestra. En ella se observan los picos característicos encontrados en la estructura de la nanocelulosa los cuales son 3 principales. El primero pico a 15 grados, el segundo pico a 24 grados y un pico a 34 grados. Así mismo se observan distintos picos cristalinos adicionales que no tienen relación con la celulosa. Cada uno de los picos extras presentes se consideran cristales contaminantes. Estos pueden representar los contaminantes de hemicelulosas y/o lípidos que se pudieron co-cristalizar a la nanocelulosa durante la neutralización de la muestra, así como igual existe la posibilidad de la absorción de minerales dentro de la

microalga debido a la alta concentración en el medio LC-Y. La presencia de estos picos concuerda con los picos observados durante el FT-IR.

V. DISCUSIÓN

A. BIOMASA

La producción y transformación de celulosa a nanocelulosa utilizando microalgas del género *Chlorella* resulta ser posible debido a varias pruebas realizadas. Uno de los logros que se obtuvieron durante este proyecto fue el escalamiento de la producción de biomasa. Esta demostró ser eficaz debido a lograr una producción de 1.23 ± 0.31 g/L con *C. sorokiniana* la cual había producido en el pasado tan solo 0.24 g/L de biomasa seca en reactores de 14.5 L (Reyna Martínez, 2013). Otros autores como Do y colaboradores reportaron una producción de biomasa para *C. sorokiniana* en el medio BG-11 de apenas 0.96 g/L de manera autotrófica y 2.45 g/L de manera heterotrófica, agregando 2 g/L de glucosa en reactores de 4 L (Do et al., 2020). La utilización de una fuente de carbono adicional al CO₂ ambiental consiguió un mayor rendimiento hablando de biomasa seca sin embargo esta adición de glucosa es un costo extra además de un factor de riesgo en cuestión de contaminación de cultivo. Sin embargo, dado que el uso de azúcares es un foco de contaminación en reactores que no cuentan con un alto sistema de inocuidad no se optó por esta condición para el proyecto presente. No obstante, el rendimiento obtenido en el cultivo autotrófico fue menor al alcanzado en este experimento para *C. sorokiniana*.

Por otro lado, se obtuvieron 2 g/L de biomasa seca para *Chlorella* sp. aislada recientemente del río La Silla la cual en cuestión a producción de biomasa está por encima

de la *C. sorokiniana* previamente identificada, podría ser de interés secuenciar e identificar por técnicas moleculares para su aplicación en otros respectivos proyectos. Mas sin embargo este mayor rendimiento de gramos por litro en biomasa no resulto beneficioso para el proyecto debido a ausencia de célula en la pared celular y una tasa de crecimiento más lenta, incrementado el riesgo de crecimiento de otro microorganismo.

B. CELULOSA

La producción de celulosa por parte de *C. sorokiniana* resultó ser baja en comparación a otras especies. Se obtuvo en promedio $9 (\pm) 0.67$ % de celulosa, equivalente a alrededor de 90 mg por cada gramo de biomasa al final de la extracción respecto a la biomasa seca de *C. sorokiniana*. Otros autores como Northcote y colaboradores analizaron la especie *C. pyrenoidosa* en un medio definido de sales en el cual obtuvo 15% p/p de celulosa en la pared celular (Northcote et al., 1958). Este porcentaje difiere del obtenido en este proyecto debido a que existen varios reportes donde se afirma que hay una variación de celulosa en la pared celular entre especies de *Chlorella*. Así como también las condiciones durante la extracción son un factor influyente para el mejoramiento en la eficiencia de extracción (Rabetafika et al., 2014). Se ha reportado que cuando se adiciona glucosa al medio el porcentaje de carbohidratos en la pared celular disminuye, mientras que usando ácido acético como fuente de carbono se obtienen mejores rendimientos (Zanchetta et al., 2021).

C. OBSERVACIÓN NANOCELULOSA

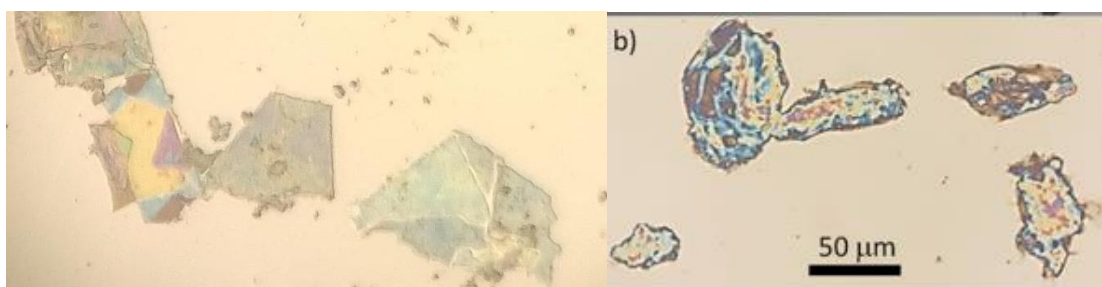


Figura 18. Comparación de nanocelulosa en MO. Derecha: Proyecto. Izquierda: Chávez-Guerrero et al., 2022.

Una particularidad de la MCC y CNC obtenida en este proyecto fue la estructura de la partícula. En la mayoría de los casos otros autores como Chávez-Guerrero y colaboradores obtienen partículas irregulares con un relieve de superficie muy variada (Chávez-Guerrero et al., 2022). En la figura 18 se puede observar una comparación lado a lado de las muestras obtenidas posterior a su hidrólisis utilizando un microscopio óptico. Del lado izquierdo tenemos la muestra obtenida en el proyecto donde la superficie se muestran lisas y de un grosor uniforme, debido a la coloración que se logra apreciar el grosor oscila alrededor de 140 – 160 nm. Por otro lado; los resultados de Chávez-Guerrero se observa una variación en la superficie donde la coloración percibida es muy variada con cuestión al grosor de las partículas. El grosor de las partículas influye sobre las diferentes aplicaciones que se les pueden dar, las partículas de mayor grosor tienen una mayor resistencia mecánica ideales para refuerzos y materiales compuestos (Kim et al., 2016). Mientras que las más delgadas tienen una mayor capacidad de absorción, adecuada para aplicaciones como materiales de relleno y agentes espesantes (Kim et al., 2016).

Asimismo, las partículas muestran un relieve irregular mientras que las obtenidas en el proyecto parecen tener cortes más estructurados y rectos.

Al observar la nanocelulosa en el MEB se mostró una estructura compuesta de barras delgadas y largas. Esta es comparable con los que se reporta como nanocelulosa cristalina, la cual consiste en barras sin partes amorfas a diferencia de la nanocelulosa fibral (Rodríguez Liñan, 2016). En la Figura 19 se puede observar una comparación entre la CNC obtenida en el proyecto contra la obtenida por Aziz y colaboradores (Aziz et al., 2021).

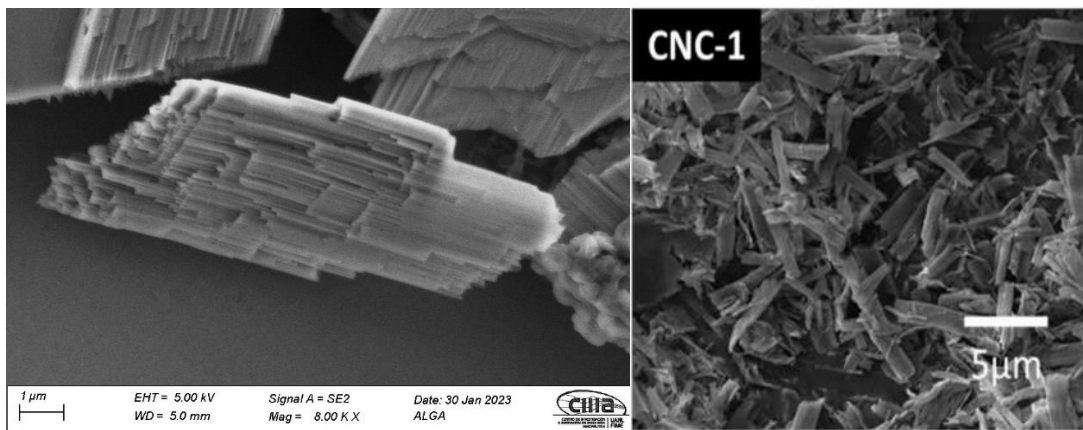


Figura 19. Comparación de Nanocelulosa. Izquierda: Cantu, 2022. Derecha: (Aziz et al, 2021)

Ellos obtuvieron diferentes resultados de CNC mediante la utilización de hojas de papel recicladas (sin tinta) a una hidrólisis ácida (usando H_2SO_4) en diferentes intensidades. En la imagen de la derecha está el resultado obtenido posterior a una hidrólisis de 30 minutos donde se observó que no todas las partes amorfas fueron removidas de los cristales. Resultando en largas partículas con un bajo índice de

cristalinidad y una superficie de apariencia áspera. Mientras que en la Figura 24 se realizó una hidrólisis ácida durante 90 minutos obteniendo partículas más pequeñas y delgadas con un mayor índice de cristalinidad (84%) (Aziz et al., 2021). Dado que la metodología que se siguió en este proyecto tomó como tiempo de hidrólisis 60 minutos, los resultados a comparar se asemejen un poco a ambas metodologías, el tamaño de escala encontrado durante la hidrólisis de 30 minutos y la remoción de partes amorfas de 90 minutos. Las partículas en el presente proyecto como en la hidrólisis de 30 min mostraron un tamaño mayormente en la escala micrométrica, y un bajo porcentaje en la escala nanométrica. Mientras que una hidrólisis de 90 minutos resultó mayormente en tamaño nanométrico.

D. ANÁLISIS NANOCELULOSA

El análisis del FT-IR sirvió para comparar los picos obtenidos con otros autores. Los picos característicos de la nanocelulosa tanto estructurales como grupos funcionales mostraron muy poca variación en intensidad en comparación a otros autores y sin embargo se registraron otros picos que pudieran atribuir a sustancias ajenas que pudieran ser residuos del medio o productos formados durante la hidrólisis o neutralización.

En particular, los picos en las regiones de 3492 cm^{-1} y 3395 cm^{-1} se atribuyen a la presencia de grupos hidroxilo (-OH) libres o enlazados con otras moléculas, como grupos carboxilo (-COOH), aminas (-NH₂), amidas (-CONH₂), o grupos fenólicos (-C-6H₅-OH). Estos picos son similares a los que se reportan en la literatura para la celulosa y sugieren que la muestra de nanocelulosa contiene grupos hidroxilo en su estructura (David, 2001).

Además, se observaron picos en las regiones de 2922 cm^{-1} y 2851 cm^{-1} , que se atribuyen a la vibración de los grupos CH_2 y CH_3 alifáticos presentes en la estructura de la celulosa. Estos picos son también consistentes con la literatura y proponen que la muestra de nanocelulosa contiene grupos alifáticos (David, 2001).

La presencia de un pico en la región de 1682 cm^{-1} se atribuye a la vibración del grupo $\text{C}=\text{O}$ enlazado a una amina primaria ($-\text{NH}_2$), lo que sugiere la posibilidad de que la muestra de nanocelulosa contenga grupos aminos en su estructura. Por otro lado, el pico en la región de 1619 cm^{-1} se atribuye a la vibración del grupo $\text{C}=\text{C}$ enlazado a una amina secundaria ($-\text{NH}-$), lo que sugiere la presencia de grupos aminos secundarios (David, 2001). Por último, el pico en la región de 1100 cm^{-1} se atribuye a la vibración del grupo $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, que es característico de la estructura de la celulosa.

Con el apoyo del Dr. Francisco Avalos quien tiene una amplia experiencia en química analítica y en conjunto a los resultados obtenidos, se sugiere que la muestra de nanocelulosa es consistente con la estructura y los grupos funcionales esperados para la celulosa. Sin embargo, se observa una diferencia en la intensidad del pico en la región de 3395 cm^{-1} lo que puede deberse a la presencia de una amina primaria y secundaria. La presencia de aminos en nanocelulosa atribuye a varios efectos beneficiosos como un aumento en absorción y dispersión de agua, biocompatibilidad y propiedades mecánicas (Ashraf et al., 2017).

En los resultados obtenidos de la prueba de difracción de rayos x se logró observar picos característicos de la estructura de la nanocelulosa. Estos picos son comparables con los de otros autores como Baba y colaboradores que utilizaron una cepa de *Nannochloropsis* sp en la figura 25 (Baba et al., 2016) y Herrera y colaboradores quienes utilizaron puntas de abacá para la producción de nanocelulosa (Herrera et al., 2019). Estos 3 picos se encuentran en el rango de 16-18, 22-24 y 34-36 grados.

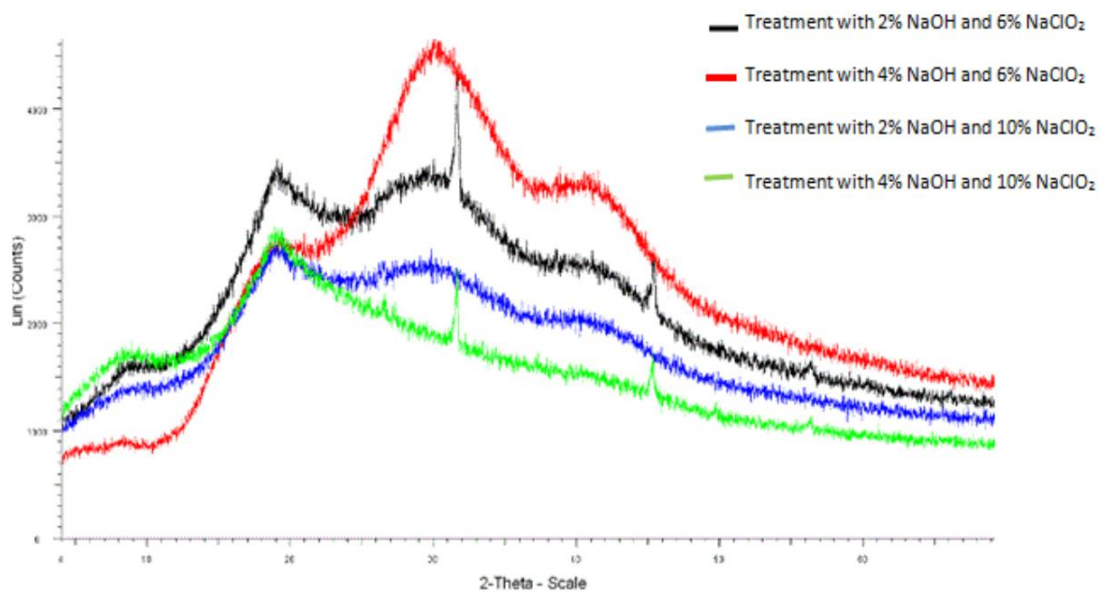


Figura 20. Difractograma de rayos x de celulosa extraída de *Nannochloropsis* sp. (Baba et al., 2016).

A diferencia de los otros autores, la muestra presentada en este proyecto mostró más picos presentes en el difractograma. Estos picos se pueden atribuir a posible ruido del equipo, así como a la presencia de otros compuestos como se logró observar durante el FT-IR.

E. BENEFICIOS Y ALTERNATIVAS DEL PROCESO

La elección de utilizar microalgas en lugar de otras plantas para la producción de celulosa puede ser más rentable por diversas razones. En primer lugar, las microalgas presentan una tasa de crecimiento notablemente superior, proporcionando una fuente continua de materia prima de manera más rápida y eficiente. Además, su menor demanda de recursos, incluyendo la capacidad de crecer en agua salina o residual, reduce la presión sobre recursos hídricos y elimina la competencia por tierras agrícolas (Masojídek & Torzillo, 2008).

La capacidad de las microalgas para generar productos secundarios valiosos, como bioetanol, antioxidantes y vitaminas, durante el proceso de producción añade un valor adicional. Su flexibilidad en la ubicación de cultivo, al poder crecer en cualquier lugar del mundo siempre que se cumplan sus condiciones de crecimiento, elimina restricciones geográficas y la competencia por tierras específicas. Además, la eficiencia en el uso del espacio, al no requerir grandes extensiones de tierra, contribuye a su atractivo como una opción más rentable y sostenible para la producción de celulosa (Masojídek & Torzillo, 2008).

En resumen, la utilización de microalgas ofrece beneficios económicos significativos al ser más eficientes, sostenibles y capaces de generar productos secundarios valiosos.

VI. CONCLUSIONES

Se logró mejorar la producción de biomasa de *C. sorokiniana* a mayor escala utilizando biorreactores, en el cual fue posible cultivar la microalga aislada de *C. sorokiniana* y alcanzar una concentración de 1.23 g/L. De esta biomasa siendo posible extraer celulosa y ser transformada a nanocelulosa mediante una extracción química aceptando la hipótesis con respecto a la producción y transformación de la biomasa a nanocelulosa.

Los resultados obtenidos durante la caracterización de la muestra sugieren la presencia de grupos funcionales adicionales que comúnmente no se presentan en la estructura de la nanocelulosa. Basándonos en la literatura e interpretando los resultados del espectro se concluyó la presencia de aminas primarias y/o secundarias.

Mediante el uso de la extracción química se logró extraer y transformar la celulosa a nanocelulosa obteniendo como promedio un $9 \pm 0.67\%$ de la biomasa al final del proceso de extracción mediante hidrólisis ácida. Esto resultando en alrededor de 90 mg por cada gramo de biomasa utilizada (tomando en cuenta el error estándar).

La nanocelulosa obtenida mediante el uso de microalgas se observó de manera similar a la obtenida por *agave salmiana* (Rodríguez Liñan, 2016) y sargazo (Chávez-Guerrero et al., 2022). Aunque el método de extracción es similar, podemos inferir que

la producción con microalgas puede llegar a ser más redituable debido a diversos factores como lo es el costo y productos secundarios. Estos pudieran ser bioetanol, antioxidantes y vitaminas que fueran extraídas en diferentes fases durante el proceso. Así como también otra ventaja importante es la inexistente competencia por tierra con otros cultivos agrícolas de interés, las microalgas pueden crecer en cualquier lugar del mundo, siempre y cuando se cumplan sus mínimas condiciones de crecimiento, por lo que en este proyecto se emplea el medio LC-Y el cual está diseñado para cumplir con los nutrientes necesarios para el crecimiento de algas y además es más barato que los otros en el mercado.

Se llega a la conclusión en base a resultados porcentuales obtenidos que la utilización de microalgas para la producción de nanocelulosa es posible. Sin embargo, queda área de mejora para ser más eficiente.

Concluyendo que la especie *C. sorokiniana* específicamente proveniente de Nuevo León es capaz de producir una cantidad extraíble y transformable de celulosa. Así como el género *Chlorella* aún siendo productora de celulosa no logra ser una opción viable para la generación de nanocelulosa a nivel industria debido al bajo rendimiento.

Finalmente, todo esto se suma a la investigación para seguir encontrando materiales ecológicos y biodegradables que algún día se buscan normalizar debido a sus múltiples beneficios.

VII. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Durante el desarrollo del proyecto se generaron diversas preguntas que no pudieron ser resueltas bajo los resultados obtenidos u procesos empleados.

Un ejemplo pendiente por explorar fue el origen de los contaminantes presentes en las muestras de nanocelulosa; ¿estos grupos funcionales son provenientes de la célula o del medio de cultivo? También existe la posibilidad de ser un producto generado durante la extracción de celulosa o transformación a nanocelulosa. Un diseño experimental que tome en cuenta estos factores podría ayudar a identificar la fuente proveniente de estos grupos funcionales.

Otro diseño experimental donde se involucren factores de tiempo de crecimiento, costo de empleo y extracción, así como pureza de producto final podría ser un siguiente paso para el análisis de rentabilidad del proyecto a escala industrial. Mismo que integre el proceso a una biorrefinería o la utilización de un alga con una mayor producción queda como posibilidad en el futuro de los bioplásticos.

Como parte de la búsqueda por un material sustentable queda la exploración de incluir este proceso dentro del esquema de una biorrefinería o así mismo formar una economía circular para maximizar los productos, el uso de reactivos y biomasa. El desarrollo de un sistema para tratamiento de aguas y extracción de compuestos podría volver el proceso bastante rentable, siendo que las microalgas son capaces de producir

ácidos grasos polisaturados, lípidos, antioxidantes y fitohormonas, se podría indagar más sobre el proceso de extracción de nanocelulosa como subproducto de algún proceso para la extracción de los compuestos previamente mencionado. Así mismo, la utilización de aguas residuales para la generación de biomasa funcionaría como doble propósito, producción de compuestos y reutilización de nutrientes.

A futuro es posible seguir este proyecto y realizar pruebas adicionales para proporcionar una mejor caracterización en cuestión a termoestabilidad y electroconducción con el propósito de darle una aplicación más apropiada a este proceso y producto en la industria.

VIII. REFERENCIAS

- Abdul-Latif, N. I. S., Ong, M. Y., Nomanbhay, S., Salman, B., & Show, P. L. (2020). Estimation of carbon dioxide (CO₂) reduction by utilization of algal biomass bioplastic in Malaysia using carbon emission pinch analysis (CEPA). *Bioengineered*, *11*(1), 154–164. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1718471>
- Apt, K. E., & Behrens, P. W. (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology*, *35*, 215–226.
- Arapgirlioglu, H., Atika, A., Elliot, R. L., & Turgeon, E. (2017). *RESEARCHES ON SCIENCE AND ART IN 21st CENTURY TURKEY* (Vol. 1).
- Ashraf, S. S. M., Hossain, M. A., & Islam, S. S. (2017). Amine-Functionalized Nanocellulose for Biomedical Applications. *Advance Materials*, *120*.
- Aziz, M. A., Zubair, M., & Saleem, M. (2021). Development and testing of cellulose nanocrystal-based concrete. *Case Studies in Construction Materials*, *15*. <https://doi.org/10.1016/j.cscm.2021.e00761>
- Baba, S., Baba, M. B., & Kassouar, S. (2016). Physicochemical analysis of cellulose from microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *African Journal of Biotechnology*, *15*(24), 1201–1207. <https://doi.org/10.5897/ajb2016.15321>
- Bello Gil, C., Bocourt, C., & Maqueira, D. (2006). Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. *ICIDCA*, *2*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664006>
- Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Rodríguez-Fuentes, H., Reyna-Martínez, G. R., Osornio-Berthet, L., García-Martínez, M., Dagmar-Barceló Quintal, I., & López-Chuken, U. J. (2021). Some implications of natural increase of pH in microalgae

- cultivation and harvest by autoflocculation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(5), 836–842. <https://doi.org/10.3856/vol49-issue5-fulltext-2691>
- Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., & Trenerry, C. (1999). The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 11, 247–255.
- Chávez-Guerrero, L., Toxqui-Terán, A., & Pérez-Camacho, O. (2022). One-pot isolation of 2D nanocellulose. *Journal Applied Phycology*, 34, 637–645. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02643-5>
- David, B. (2001). Structure Determination from Powder Diffraction. En *INTERNATIONAL UNION OF CRYSTALLOGRAPHY* (Número 25).
- De France, K. J., Hoare, T., & Cranston, E. D. (2017). Review of Hydrogels and Aerogels Containing Nanocellulose. En *Chemistry of Materials* (Vol. 29, Número 11, pp. 4609–4631). <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b00531>
- Do, T. C. Van, Tran, D. T., Le, T. G., & Nguyen, Q. T. (2020). Characterization of Endogenous Auxins and Gibberellins Produced by *Chlorella sorokiniana* TH01 under Phototrophic and Mixtrophic Cultivation Modes toward Applications in Microalgal Biorefinery and Crop Research. *Journal of Chemistry*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4910621>
- Dufresne, A. (2013). Nanocellulose: A new ageless bionanomaterial. *Materials Today*, 16(6), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.004>
- Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2013). *Raven Biology of Plants* (8th ed.). W. H. Freeman and Company Publishers.

- Finlay, B. J., & Esteban, G. F. (2009). Can biological complexity be rationalized? *BioScience*, 59(4), 333–340. <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.4.11>
- García, R., Bordallo López, E., Cordero, D., & Ga Dez, F. L. (2006). *CELULOSA MICROCRISTALINA*.
- Gonçalves, A. L. (2021). The use of microalgae and cyanobacteria in the improvement of agricultural practices: A review on their biofertilising, biostimulating and biopesticide roles. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/app11020871>
- Grande Cruz, C. (2014). *Desarrollo de nanocompuestos basados en celulosa bacteriana para aplicaciones biomédicas*. Universidad de Valencia.
- Habibi, Y., Lucia, L. A., & Rojas, O. J. (2010). Cellulose Nanocrystals. *Chemical Reviews*, 110, 3479–3500. <https://doi.org/10.1021/cr900339w>
- Herrera, M., Sinche, L., & Bonilla, O. (2019). Obtención de Nanocelulosa a partir de Celulosa de Puntas de Abacá. *Afinidad: Revista de química teórica y aplicada*, 76(June), 123–131.
- Kim, S. K., Kim, S. Y., Lee, S. Y., & Park, S. J. (2016). Effect of Nanocellulose Thickness of its Properties and Applications. *Carbohydrate Polymers*, 140, 151–161.
- Kotrbaček, V., Doubek, J., & Doucha, J. (2015). The *chlorococcalean* alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. *Journal of Applied Phycology*, 27(6), 2173–2180. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0516-y>
- Kumar, K., Dasgupta, C. N., & Das, D. (2014). Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. *Bioresource Technology*, 167, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.118>

- Kummala, R., Xu, W., Xu, C., & Toivakka, M. (2018). Stiffness and swelling characteristics of nanocellulose films in cell culture media. *Cellulose*, *25*(9), 4969–4978. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1940-y>
- Leslie, H. A., van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., & Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment International*, *163*(December 2021), 107199. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>
- Lloyd, C., Tan, K. H., Lim, K. L., Valu, V. G., Fun, S. M. Y., Chye, T. R., Mak, H. M., Sim, W. X., Musa, S. L., Ng, J. J. Q., Bte Nordin, N. S., Bte Md Aidzil, N., Eng, Z. Y. W., Manickavasagam, P., & New, J. Y. (2021). Identification of microalgae cultured in Bold's Basal medium from freshwater samples, from a high-rise city. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84112-0>
- López-Velázquez, L. Y., Salgado-García, S., Turrado-Saucedo, J., Hidalgo-Moreno, C. I., Ortiz-García, C. F., Córdova-Sánchez, S., Saucedo-Corona, A. R., & Canché-Escamilla, G. (2020). Celulosa y microcelulosa de residuos del cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agro Productividad*, *13*(4). <https://doi.org/10.32854/agrop.vi.1591>
- Masojídek, J., & Torzillo, G. (2008). Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set*, 2226–2235. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00830-2>
- Moral, A. (2014). Microalgas para la extracción de celulosa de alta pureza. *Conama 2012, October*, 1–16. <https://doi.org/10.13140/2.1.3244.2886>

- Negrulescu, A., Patrulea, V., Mincea, M. M., Ionascu, C., Vlad-Oros, B. A., & Ostafe, V. (2012). Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(12), 2176–2182. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532013005000003>
- NORTHCOTE, D. H., GOULDING, K. J., & HORNE, R. W. (1958). The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. *The Biochemical journal*, 70(3), 391–397. <https://doi.org/10.1042/bj0700391>
- Omran, A. A. B., Mohammed, A. A. B. A., Rahimian Kolor, S. S., & Pretu, M. (2021). Micro- and Nanocellulose in Polymer Composite Materials: A Review. *Polymers*, 13(231). <https://doi.org/doi.org/10.3390/polym13020231>
- Omran, A. A. B., Mohammed, A. A. B. A., Sapuan, S. M., Ilyas, R. A., Asyraf, M. R. M., Kolor, S. S. R., & Petru, M. (2021). Micro-and nanocellulose in polymer composite materials: A review. En *Polymers* (Vol. 13, Número 2, pp. 1–30). <https://doi.org/10.3390/polym13020231>
- Pawcenis, D., Thomas, J. L., Łojewski, T., Milczarek, J. M., & Łojewska, J. (2015). Towards determination of absolute molar mass of cellulose polymer by size exclusion chromatography with multiple angle laser light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 1409, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.042>
- Popper, Z. A., Michel, G., Hervé, C., Domozych, D. S., Willats, W. G. T., Tuohy, M. G., Kloareg, B., & Stengel, D. B. (2011). Evolution and diversity of plant cell walls: From algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 567–590. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103809>

- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*, 635–648.
- Pulz, O., & Scheibenbogen, K. (1998). Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *59*, 123–151.
- Rabetafika, H. N., Bchir, B., Blecker, C., Paquot, M., & Wathelet, B. (2014). Comparative study of alkaline extraction process of hemicelluloses from pear pomace. *Biomass and Bioenergy*, *61*(0), 254–264.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.12.022>
- Reyna Martinez, G. R. (2013). *AISLAMIENTO DE MICROALGAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL CONTRA EL LINFOMA MURINO L5178Y-R.*
- Rodríguez Liñan, C. Y. (2016). *Obtención de nanocelulosa a partir del agave salmiana y su uso en la preparación de películas conductoras.*
<http://eprints.uanl.mx/18036/1/1080238510.pdf>
- Ross, I. L., Shah, S., Hankamer, B., & Amiralian, N. (2021). Microalgal nanocellulose – opportunities for a circular bioeconomy. *Trends in Plant Science*, *26*(9), 924–939.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.05.004>
- Singh, G., Chandoha-Lee, C., Zhang, W., Renneckar, S., Vikesland, P. J., & Pruden, A. (2016). Biodegradation of nanocrystalline cellulose by two environmentally-relevant consortia. *Water Research*, *104*, 137–146.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.073>

- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principios de análisis instrumental*. En <https://Medium.Com/> (6th ed.). Cengage Learning. <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>
- Vanderghem, C., Jacquet, N., Danthine, S., Blecker, C., & Paquot, M. (2012). Effect of physicochemical characteristics of cellulosic substrates on enzymatic hydrolysis by means of a multi-stage process for cellobiose production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *166*(6), 1423–1432. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9535-1>
- Wen, Z. Y., & Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Adv*, *21*, 273–294.
- Wollman, A. J. M., Nudd, R., Hedlund, E. G., Leake, M. C., & Leake, M. C. (2015). IX. An account of Mr. Leeuwenhoek's microscopes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, *41*(458), 503–519. <https://doi.org/10.1098/rstl.1739.0085>
- Wulandari, W. T., Rochliadi, A., & Arcana, I. M. (2016). Nanocellulose prepared by acid hydrolysis of isolated cellulose from sugarcane bagasse. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, *107*(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/107/1/012045>
- Zabed, H. M., Akter, S., Yun, J., Zhang, G., Awad, F. N., Qi, X., & Sahu, J. N. (2019). Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *105*(July 2020), 105–128. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.048>
- Zanchetta, E., Damergi, E., Patel, B., Borgmeyer, T., Pick, H., Pulgarin, A., & Ludwig, C. (2021). Algal cellulose, production and potential use in plastics: Challenges and

opportunities. *Algal Research*, 56(July 2020), 102288.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102288>

APÉNDICE A

LISTA DE ABREVIACIONES

CO ₂	Dióxido de Carbono
NCC	Nanocelulosa Cristalina
NCF	Nanocelulosa Fibril
NCB	Nanocelulosa Bacteriana
nm	Nanómetros
µm	Micrometros
mm	Milímetros
µM	Micromolar
mM	Milimolar
g/L	Gramos por Litro

GPa	Gigapascal
UV	Ultravioleta
MO	Microscopio Óptico
MEB	Microscopio Electrónico de Barrido
DRX	Difracción de Rayos X
FTIR	Espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
h	Horas
rpm	Revoluciones por Minuto
mL	Mililitros
L	Litros

µg

Microgramos

UI

Unidades Internacionales

LED

Diodo Emisor de Luz

vvm

Volumen de Aire por Volumen de Medio

por minuto

kV

Kilovoltio

APÉNDICE B

MEDIOS Y SOLUCIONES

Medio LC-Y: Por cada 100 mL de agua desionizada se agregan 500 uL de la solución A, 500 uL de la solución B, 100 uL de la solución C, y 400 uL de la solución D, se agita y se procede a esterilizar. La esterilización se lleva a cabo en autoclave mediante calor húmedo a 15 Psi por 20 min. Se aconseja mantener en refrigeración la solución hasta ser utilizada.

Medio BBM: Por cada 100 mL de agua desionizada se agregan 1 mL de solución KH_2PO_4 , 100 uL de solución $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 uL de solución $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 uL de solución NaNO_3 , 100 uL de solución K_2HPO_4 , 100 uL de solución NaCl , 100 uL de solución EDTA, 100 uL de solución de hierro, 70 uL de solución Boro y 100 uL de solución metales traza. La esterilización se lleva a cabo en autoclave mediante calor húmedo a 15 PSI por 20 min. Se aconseja mantener en refrigeración la solución hasta ser utilizada.

Preparación de Placas: Siguiendo las respectivas indicaciones de cada medio, se agrega 1.5 g de agar bacteriológico por cada 100 mL de medio líquido y se disuelve con ayuda de un agitador magnético y calor. Se esteriliza en autoclave mediante calor húmedo a 15 Psi por 20 min y se vierte en placas.