

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**AISLAMIENTO DE NANOCELULOSA A PARTIR DEL ALGA
PARDA MACROCYSTIS PYRIFERA MEDIANTE HIDRÓLISIS
ÁCIDA Y POSTERIOR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA EL
ESTUDIO DE SU MORFOLOGÍA (1D Y 2D)**

POR

ING. MÓNICA YOLOTZIN VELASCO GÓMEZ

T E S I S

EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN NANOTECNOLOGÍA

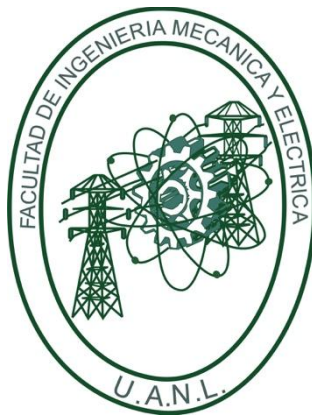
CIUDAD UNIVERSITARIA

MARZO, 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**AISLAMIENTO DE NANOCELULOSA A PARTIR DEL ALGA
PARDA MACROCYSTIS PYRIFERA MEDIANTE HIDRÓLISIS
ÁCIDA Y POSTERIOR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA EL
ESTUDIO DE SU MORFOLOGÍA (1D Y 2D)**

POR

ING. MÓNICA YOLOTZIN VELASCO GÓMEZ

T E S I N A

EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN NANOTECNOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA

MARZO, 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica
Posgrado

Los miembros del Comité de Evaluación de Tesis recomendamos que la Tesis "Aislamiento de nanocelulosa a partir del alga parda *macrocystis pyrifera* mediante hidrólisis ácida y posterior hidrólisis enzimática para el estudio de su morfología (1D y 2D).", realizada por el estudiante Monika Yolotzin Velasco Gómez, con número de matrícula 1843886, sea aceptada para su defensa comorequisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Ingeniería con Orientación en Nanotecnología.

El Comité de Evaluación de Tesis

Dr. Leonardo Chávez Guerrero
Director

Dr. Julio Silva Mendoza
Co-director

Dra. Saida Mayela García Montes
Revisor

Dra. María del Refugio Lara Banda
Revisor

Dra. Sofia Vázquez Rodríguez
Revisor

Vo.Bo.


Dr. Simón Martínez Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Institución 190001

Programa 557511

Acta Núm. 4632

Ciudad Universitaria, a 06 de marzo de 2026.

DEDICATORIA

A las flores que se marchitaron antes de tiempo.

A los retoños que emergieron en la penumbra.

*A las llamas que consumieron lo que ya no debía ser y al río que
trajo consigo una nueva esperanza.*

*A la pequeña Estrella que me reconforta con su brillo eterno,
enseñándome a amar incluso en la muerte.*

*Sus enseñanzas me perseguirán hasta el final de mi vida, y no les
podría estar más agradecida por ello, porque solo de esa forma
me demostraron lo que es vivir.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco abiertamente a mis padres por su apoyo a lo largo de toda mi trayectoria académica, por escucharme y guiarme durante sus visitas, y por alentarme a seguir en este mundo de la investigación científica.

A mis amigas que me hicieron recobrar la seguridad en mí misma, a mis compañeros y catedráticos de la maestría por darme una experiencia completamente diferente y amena a lo que había vivido.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada y a la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (FIME) por darme nuevamente la bienvenida a sus instalaciones y equipos.

Y sobre todo a mi asesor, el Dr. Leonardo Chávez por darme la oportunidad de aprender de su trabajo y vivir nuevas experiencias académicas, su guía y apoyo no solo fue esencial para la elaboración de esta tesis, sino para recordarme lo bonito y enriquecedor que es aprender, investigar y, sobre todo, nunca perder la curiosidad por el mundo y todo aquello que nos rodea.

RESUMEN

El avance tecnológico ha permitido la revalorización de los nanomateriales como factor fundamental en el desarrollo de soluciones sostenibles, ofreciendo la capacidad de transformar diversos sectores mediante sus propiedades físico-químicas únicas a escala nanométrica. En este contexto, la nanocelulosa (NC) emerge como un biopolímero de alto valor debido a su gran resistencia mecánica y biodegradabilidad; sin embargo, la búsqueda de una fuente abundante y sostenible sigue siendo un tema de investigación.

La *Macrocystis Pyrifera* es un alga parda mejor conocida como Kelp gigante por su rápida tasa de crecimiento, con un promedio diario entre los 15 y los 30 cm, alcanzando una longitud de hasta 50 m, contribuyendo a la creación de bosques submarinos. Este aspecto se aprovecha diariamente, catalogándola como una materia prima valiosa para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, mediante la obtención de alginatos destinados a la industria y, a su vez, de bioestimulantes agrícolas. En este trabajo, se utiliza esta macroalga como una alternativa prometedora para la obtención de nanomateriales funcionales a partir de biomasa marina. El proceso para la obtención de NC consistió en cinco fases, comenzando por el tratamiento térmico del alga con agua desionizada para la remoción de componentes de la materia prima, como el fucoidan y el alginato. La segunda fase abarca un tratamiento térmico más agresivo e hidrólisis ácida, en la que se emplean reactivos menos concentrados, como el peróxido de hidrógeno al 50% y pocos mililitros de ácido sulfúrico, aspectos fundamentales de esta investigación. Una vez completada la reacción y obtenida la NC, se procede a la tercera fase, que consiste en la neutralización y purificación de la NC para su posterior secado y formación de películas delgadas, o bien en un tratamiento enzimático con endoglucanasa para romper los enlaces β -1,4 glicosídicos y liberar las fibras de las láminas que la conforman.

Mediante diversas técnicas de caracterización, se validó la integridad estructural y la morfología de la NC aislada de *M. Pyrifera*. Los análisis de FTIR y RMN confirmaron la composición química del material y la remoción de componentes no celulósicos, obteniendo

un índice de cristalinidad de 65.7 mediante hidrólisis ácida y de 66.2 tras el tratamiento enzimático posterior. Estos procesos permitieron la obtención de fibras de NC con diámetros entre 5 y 15 nm, las cuales tienden a entrelazarse para la formación de láminas, tal como se observó a mayor detalle en las micrografías de MEB y MET. Finalmente, mediante imágenes de CLMS, se observó que mientras el ataque ácido conlleva a la formación de láminas de diversos tamaños, se sugiere que el tratamiento enzimático logra fragmentar los bordes de dichas estructuras, facilitando la liberación de fibras individuales.

Este estudio contribuirá al desarrollo de una tecnología sostenible para la producción de NC a partir de fuentes marinas renovables, como la *M. Pyrifera*, promoviendo la innovación en materiales biodegradables y reduciendo el impacto ambiental asociado a la explotación forestal tradicional. Además, la NC derivada de algas podría tener aplicaciones únicas en industrias emergentes, como la biomedicina, la cosmética y los materiales compuestos. La optimización del proceso de extracción de NC a partir de la *M. Pyrifera* no solo ofrece una alternativa sostenible a los métodos tradicionales, sino que también abre nuevas oportunidades para el desarrollo de materiales avanzados con propiedades únicas. Con este protocolo se busca sentar las bases para una producción escalable y eficiente de NC marina, contribuyendo a la transición hacia una economía circular más sostenible y verde.

ÍNDICE

HOJA DE APROBACIÓN	3
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	6
ÍNDICE.....	8
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIACIONES	14
Capítulo 1	16
INTRODUCCIÓN.....	16
1.1 Marco teórico	17
1.1.1 Algas	17
1.1.2 <i>Macrocystis Pyrifera</i>	18
1.1.3 Composición química y propiedades	20
1.1.4 Nanocelulosa	20
1.1.5 Composición química y propiedades	22
1.1.6 Potencial y aplicaciones	23
1.2 Antecedentes	24
1.3 Justificación	28
Capítulo 2	30
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
2.1 Hipótesis	30
2.2 Objetivo general.....	30

2.3 Objetivos específicos	30
Capítulo 3	31
DESARROLLO EXPERIMENTAL	31
3.1 Adquisición de materias primas	31
3.2 Diseño de formulaciones experimentales	31
3.3 Extracción de impurezas y obtención de la materia prima	33
3.3.1 Extracción y eliminación de alginatos (sodio y calcio)	36
3.3.2 Secado y homogeneizado del material	38
3.4 Síntesis y obtención de la nanocelulosa	38
3.5 Obtención de nanofibrillas y fabricación de película	42
3.6 Resumen esquemático del desarrollo experimental	43
3.7 Obtención de los porcentajes de rendimiento	45
3.8 Caracterización	46
3.8.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	46
3.8.2 Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM)	46
3.8.3 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	46
3.8.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	47
3.8.5 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	48
Capítulo 4	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1 Determinación de grupos funcionales mediante espectroscopía FTIR	53
4.2 Mapeo y análisis de espesor de las láminas de NC mediante CLSM	55
4.3 Caracterización morfológica de las láminas de NC mediante MEB	60
4.4 Visualización y determinación de las dimensiones nanométricas mediante MET	62
4.5 Cuantificación de la cristalinidad mediante RMN	63

Capítulo 5	67
CONCLUSIONES.....	67
Capítulo 6	69
RECOMENDACIONES	69
Referencias	71
Anexo 1.....	76
Anexo 2.....	77
Anexo 3.....	78
Anexo 4.....	79
Anexo 5.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Características de los reactivos.

Tabla 3.2. Especificaciones de los tratamientos y de las variables de control del proceso.

Tabla 3.3. Especificaciones técnicas y protocolo de preparación de soluciones

Tabla 4.1. Medidas de las láminas NC individuales pre-enzima.

Tabla 4.2. Medidas de las láminas NC individuales post-enzima.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Filogenia de los órdenes de algas pardas. Entre paréntesis se indica el número de especies dentro de cada orden [10].

Figura 1.2. Ejemplar de la *M. Pyrifera* en crecimiento, fotografiadas contra el bosque de algas y la luz del sol en la isla Anacapa en el Parque Nacional de las Islas del Canal, EE. UU. Foto tomada por: Douglas Klug.

Figura 1.3. Mapa del hábitat natural de la *M. Pyrifera*. Los colores del rango de distribución indican el grado de idoneidad del hábitat. Adaptado de [12].

Figura 1.4. Diversos tamaños y morfologías de materiales a base de celulosa mediante las técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB) o microscopía electrónica de transmisión (MET). (a) Nanocristales de celulosa de origen vegetal; (b) nanofibras de celulosa de origen vegetal; (c) NC bacteriana [16].

Figura 1.5. Ilustración esquemática del aislamiento de NCC y NFC de las paredes celulares de la madera y las plantas, resaltando las estructuras de la NC y sus posibles aplicaciones. Adaptado de [17].

Figura 3.1. Materia prima y vista en microscopio.

Figura 3.2. Autoclave y frascos después del tratamiento de autoclave.

Figura 3.3. Sistema de filtrado con vacío.

Figura 3.4. Segundo lavado de material en baño maría (con y sin agitación).

Figura 3.5. Gelificación de alginato de calcio.

Figura 3.6. Material antes y después del secado.

Figura 3.7. Molino de grano eléctrico (izquierda) y alga molida en un polvo fino (derecha).

Figura 3.8. Alga con peróxido inicial (izquierda) y en el transcurso de 10 minutos (derecha).

Figura 3.9. Apariencia de la reacción en distintos lapsos de tiempo.

Figura 3.10. NC en diálisis.

Figura 3.11. NC en caja Petri sobre el agitador orbital (izquierda), NC en una charola secándose al sol (derecha).

Figura 3.12. Esquema resumido de la metodología utilizada para el aislamiento de NC (ver Anexo 2 y 3). Creado con BioRender

Figura 3.13. Equipo de liofilizado (A) y muestras de NC control y post enzima (B).

Figura 4.1. Muestras de la transparencia/opacidad del fucoidan (A y C) y sus presentaciones en polvo y películas (B). Esferas de alginato de calcio (D y E) y películas de alginato de sodio (F) obtenidas durante el pretratamiento del alga.

Figura 4.2. Comparación de las distintas concentraciones de fucoidan y alginato. Residuos obtenidos del primer y segundo lavado del fucoidan y el alginato de sodio respectivamente (de izquierda a derecha).

Figura 4.3. Demostraciones de transparencia de distintas películas de NC. Ejemplo e un fondo de color (A) y a blanco y negro (B).

Figura 4.4. NC en medio acuoso, tratamiento post-enzima (izquierda) y original (derecha).

Figura 4.5. NC mediante liofilización, post-enzima y original (de izquierda a derecha).

Figura 4.6. Resultados de espectros FTIR en la región $600\text{ cm}^{-1} - 4000\text{ cm}^{-1}$ de la celulosa comercial y la NC aislada de la *M. Pyrifera* comercial.

Figura 4.7. Lámina individual de NC vista desde el MO con escala a color (A) y vista en el LSM (B).

Figura 4.8. Láminas individuales de NC pre (A y B) y post enzima (C y D) vista desde LSM y el MO (de arriba abajo).

Figura 4.9. Láminas individuales de NC pre-enzima, vista desde LSM y el MO (arriba y abajo respectivamente).

Figura 4.10. Láminas individuales de NC post-enzima, vista desde LSM y el MO (arriba y abajo respectivamente).

Figura 4.11. Micrografías MEB de las fibras de NC (obtenidas mediante hidrólisis ácida) en una rejilla de MET a 20,000x (A) y 50,000x (B).

Figura 4.12. Micrografía MEB de NC post enzima en una placa de silicio a 30,000x (A) y 40,000x (B).

Figura 4.13. Micrografías MET de la estructura fibrilar de la NC (A) y distribución del diámetro de las fibras (B).

Figura 4.14. Resultados RMN de NC liofilizada previamente aislada del alga *M. Pyrifera* y asignación de los corrimientos químicos en el espectro obtenido de NC.

Figura 4.15. Comparación de los resultados RMN de CMC liofilizada y NC previamente aislada del alga *M. Pyrifera*.

Figura 6.1. Crecimiento de hongos en muestras de NC antes y después de diálisis (derecha e izquierda respectivamente).

LISTA DE ABREVIACIONES

Abreviatura	Definición
% p/p	Concentración en peso
% p/v	Concentración peso por volumen
% v/v	Concentración volumétrica
~	Aproximadamente
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
<i>A. cellulolyticus</i>	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>
BF	Campo claro
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CLSM	Microscopía Confocal de Barrido Láser
cm ⁻¹	Número de onda
CMC	Carboximetilcelulosa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
g	Gramos
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ICr	Índice de Cristalinidad
kHz	Kilohertz
kV	Kilovoltio
M	Molaridad
<i>M. Pyrifera</i>	<i>Macrocystis Pyrifera</i>
mA	Miliamperio
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido

MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MO	Microscopio óptico
ms	Tiempo de retardo (delay)
mT	Militorr
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NC	Nanocelulosa
NCB	Nanocelulosa bacteriana
NCC	Nanocelulosa cristalina
NFC	Nanofibras de celulosa
NC-E	Nanocelulosa post enzima
NC-HA	Nanocelulosa hidrólisis ácida
nm	Nanómetro
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volumen
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
U/g	Unidades por gramo (actividad enzimática)
v/v	Volumen/volumen
W	Vatio (Watts)
x	Factor de aumento / Magnificación
δ	Desplazamiento químico
µa	Microamperios
µL	Microlitro
µm	Micrómetro

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

La nanocelulosa (NC), un nanomaterial derivado de la celulosa, el polímero natural más abundante en la biosfera ha ganado gran relevancia por sus propiedades físicas, químicas y mecánicas excepcionales [1]. Dentro de las propiedades a destacar se incluye alta resistencia mecánica, biocompatibilidad, capacidad de formar membranas transparentes y propiedades de barrera modulables [1]. Dichas características posicionan a la NC como un material prometedor para aplicaciones en industrias tan diversas como la farmacéutica, cosmética, alimenticia, y de materiales biodegradables [2]. Su uso contribuye significativamente a la reducción de la dependencia de plásticos derivados del petróleo y promueve activamente la sostenibilidad ambiental [2].

El aislamiento tradicional de NC a partir de fibras vegetales (como madera o algodón) es un proceso que, si bien efectivo, a menudo requiere etapas complejas de purificación para eliminar componentes no celulósicos como lignina y hemicelulosa, además de un alto consumo energético para obtener las nanofibras mediante métodos mecánicos o químicos [3]. En este contexto, la exploración de fuentes alternativas y sostenibles es fundamental. El alga parda *M. Pyrifera* emerge como una materia prima particularmente prometedora para la obtención de NC. Su abundancia en ecosistemas marinos costeros, rápido crecimiento y composición química favorable, que incluye polisacáridos estructurales susceptibles a procesos de hidrólisis, la convierten en una opción viable para liberar nanofibras de celulosa [4].

La *M. Pyrifera* es una macroalga de gran importancia ecológica y económica, utilizada ya en diversas aplicaciones industriales, incluyendo la agricultura como biofertilizante y bioestimulante debido a su riqueza en nutrientes, fitohormonas y antioxidantes [4]. Sin embargo, a pesar de su potencial, su utilización para la producción de NC mediante procesos de hidrólisis ácida y enzimática aún es un campo poco explorado, lo

que representa una oportunidad significativa para desarrollar materiales avanzados de base biológica con un menor impacto ambiental.

La obtención de NC mediante hidrólisis ácida es una técnica ampliamente estudiada y aplicada, especialmente utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) debido a su eficacia para romper las regiones amorfas de la celulosa y liberar nanocristales con alta estabilidad en suspensión acuosa [5]. Esta técnica ha sido empleada en diversas fuentes lignocelulósicas, incluidos residuos agroindustriales, fibras vegetales y, recientemente, algas marinas, lo que abre nuevas posibilidades para la valorización de la biomasa marina.

Investigaciones recientes combinan la hidrólisis ácida con tratamientos enzimáticos para optimizar la extracción, logrando NC con propiedades morfológicas específicas en 1D y 2D, además de mejorar la pureza y estabilidad del producto final [6]. Por ejemplo, estudios han reportado que el ácido sulfúrico al 64% a temperaturas moderadas permite obtener nanocristales con tamaños nanométricos adecuados para aplicaciones industriales, con mejor rendimiento y estabilidad que otros ácidos [7]. Además, la NC extraída de algas se ha utilizado para desarrollar hidrogeles con potencial en biomedicina y medio ambiente, lo que evidencia la versatilidad de este material [8]. Estos avances evidencian que la combinación de hidrólisis ácida y enzimática es una estrategia prometedora para obtener NC de algas, alineada con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), al aprovechar recursos renovables y minimizar los impactos ambientales.

1.1 Marco teórico

1.1.1 Algas

Las macroalgas marinas o algas pardas (clase *Phaeophyceae*) son de gran interés debido a su abundancia (Figura 1.1) y a la presencia de polisacáridos estructurales, como la celulosa en sus paredes celulares [9]. La valorización de estos componentes abre nuevas vías para la producción de materiales avanzados, como la nanocelulosa, que puede utilizarse en la fabricación de películas delgadas con propiedades ópticas específicas. Aunque históricamente se han explotado por sus hidrocoloides (alginato, agar y carragenina), actualmente, la creciente demanda de materiales sostenibles y biodegradables ha dirigido la

atención hacia las algas como una fuente innovadora de celulosa y, por ende, de la NC. Este avance representa un hito en la historia de la biotecnología marina, proyectando a las algas como pilares en el desarrollo de materiales de próxima generación, incluidas películas delgadas con aplicaciones ópticas.

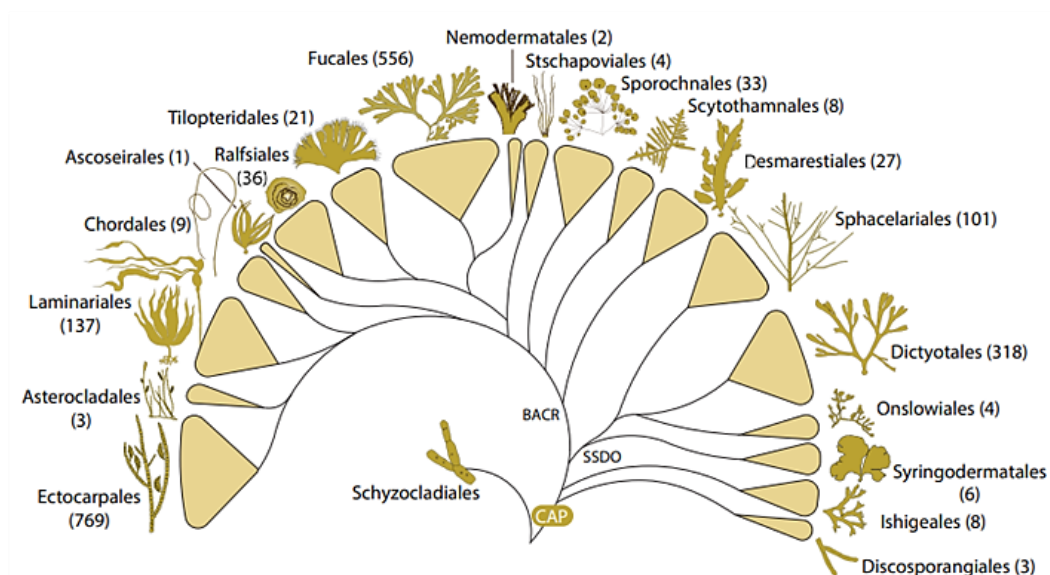


Figura 1.1. Filogenia de los órdenes de algas pardas. Entre paréntesis se indica el número de especies dentro de cada orden [10].

1.1.2 *Macrocystis Pyrifera*

Comúnmente conocida como Kelp gigante (Figura 1.2), esta macroalga destaca por su alta tasa de crecimiento y abundancia, lo que la convierte en una fuente renovable de biomasa para la obtención de NC. Dada su distribución global en aguas templadas y frías y su alta productividad, la *M. Pyrifera* se presenta como un recurso biomarino clave para la obtención sostenible de biomateriales [11]. Más allá de su uso tradicional en la industria alimentaria y de hidrocoloides (alginatos), así como su capacidad para secuestrar dióxido de carbono, la biomasa de *M. Pyrifera* se ha posicionado como un precursor clase para materiales avanzados de alto valor añadido, destacando la extracción de celulosa para aplicaciones nanotecnológicas.



Figura 1.2. Ejemplar de la *M. Pyrifera* en crecimiento, fotografiadas contra el bosque de algas y la luz del sol en la isla Anacapa en el Parque Nacional de las Islas del Canal, EE. UU. Foto tomada por: Douglas Klug.

Geográficamente, la *M. Pyrifera* se distribuye en aguas templadas y frías ($<21^{\circ}\text{C}$) a profundidades de hasta 30 m (Figura 1.3). Su alta productividad biológica y su amplia presencia global aseguran un suministro constante de biomasa para la extracción de NC a escala industrial.

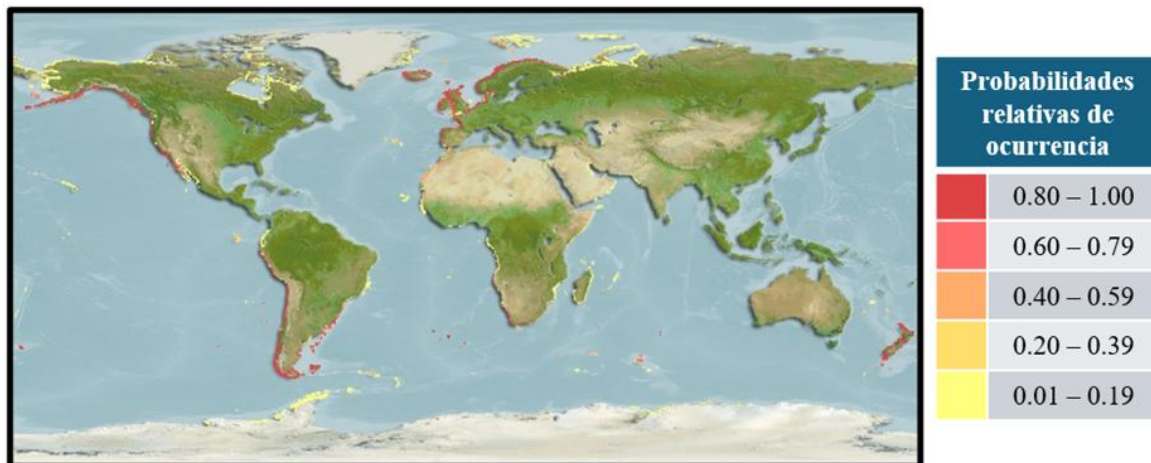


Figura 1.3. Mapa del hábitat natural de la *M. Pyrifera*. Los colores del rango de distribución indican el grado de idoneidad del hábitat. Adaptado de [12].

1.1.3 Composición química y propiedades

Su composición química es notablemente compleja y variable, influida por factores como la estación del año, la ubicación geográfica y las condiciones ambientales. Predominantemente, esta alga está compuesta por carbohidratos, que incluyen polisacáridos estructurales como la celulosa, el alginato y el fucoïdan, así como la laminarina y el carbohidrato de reserva [13]. Además, contiene proteínas, lípidos, vitaminas, minerales (especialmente yodo) y una variedad de compuestos bioactivos, como los polifenoles. La presencia significativa de celulosa en su pared celular, aunque en menor proporción que en plantas terrestres, resulta de particular interés para la extracción de NC, lo que exige métodos de procesamiento específicos para su aislamiento y purificación. Su composición química incluye ácido algínico (20-45%), laminarina, manitol, sales minerales (N, P, K, Ca, Mg), vitaminas (A, B, C, E) y fitohormonas (citoquininas, auxinas) [13].

Las propiedades de la *M. Pyrifera* incluyen características funcionales y estructurales que la convierten en un recurso valioso. Esta posee una alta capacidad de absorción de nutrientes del agua de mar, lo que contribuye a su rápido crecimiento y a su riqueza mineral. Desde una perspectiva mecánica, sus tejidos son robustos y flexibles, adaptados para resistir las fuertes corrientes marinas debido a su morfología externa (un talo de hasta 45 m, con estructuras flotantes (cistos) y fijadores grampón). Además, los polisacáridos extraídos de esta alga, como el alginato, exhiben propiedades gelificantes y espesantes ampliamente utilizadas en la industria alimentaria y farmacéutica, mientras que la celulosa inherente a su estructura permite desarrollar materiales con alta resistencia mecánica y estabilidad [14]. Por otro lado, sus moléculas le confieren propiedades bioestimulantes (que mejoran el crecimiento vegetal y la resistencia al estrés) y mecánicas (flexibilidad estructural para soportar corrientes marinas).

1.1.4 Nanocelulosa

La celulosa es un polisacárido compuesto por moléculas de glucosa, insoluble en agua, rígido y que contiene miles de unidades de β -glucosa [15]. El término nanocelulosa se refiere a la celulosa que posee al menos una dimensión en la escala nanométrica. Asimismo,

el tipo de NC depende directamente de su fuente y del método de extracción. En la Figura 2.4 se muestran los 3 tipos de NC conocidos:

- ✓ Nanocelulosa cristalina (NCC)
- ✓ Nanofibras de celulosa (NFC)
- ✓ Nanocelulosa bacteriana (NCB)

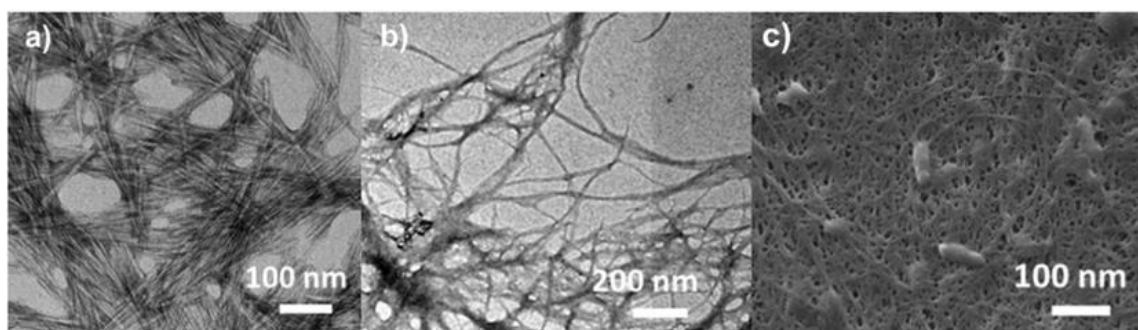


Figura 1.4. Diversos tamaños y morfologías de materiales a base de celulosa mediante las técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB) o microscopía electrónica de transmisión (MET). (a) Nanocristales de celulosa de origen vegetal; (b) nanofibras de celulosa de origen vegetal; (c) NC bacteriana [16].

La NC es un nanomaterial derivado de la celulosa, caracterizado por sus dimensiones nanométricas (generalmente de 5 a 100 nm de diámetro y de varios micrómetros de longitud). A diferencia de la celulosa macroscópica, la NC presenta una superficie específica extremadamente alta, una cristalinidad elevada, una excelente relación resistencia-peso y una alta capacidad de interacción con otros materiales. Estas características la posicionan como un material de próxima generación para el desarrollo de biocompuestos avanzados, películas transparentes, hidrogeles, sistemas de entrega de fármacos y muchos otros productos innovadores [15].

Tradicionalmente, se ha extraído principalmente de fuentes vegetales terrestres, como la madera (pulpa de madera), el algodón y las fibras de plantas anuales (cáñamo, lino, sisal). Sin embargo, el creciente interés por la sostenibilidad y la diversificación de las materias primas ha impulsado la búsqueda de fuentes alternativas. En este contexto, las algas, las bacterias y los residuos agrícolas e industriales han emergido como candidatos

prometedores. En particular, la celulosa contenida en las paredes celulares de ciertas algas, como la *M. Pyrifera*, ofrece una fuente sostenible y renovable de NC con características únicas, abriendo nuevas vías para la valorización de biomasa marina y la reducción de la dependencia de fuentes forestales. La NC, generalmente obtenida de fuentes lignocelulósicas (madera, algodón), presenta, en su variante algal, ventajas como un menor contenido de lignina y estructuras fibrilares intrínsecas. Su composición de cadenas β -1,4 glucano organizadas en regiones cristalinas/amorfas le otorga propiedades ópticas (transparencia ~90% en películas delgadas) y mecánicas (resistencia a la tracción de ~10 GPa) [15]. Estas características la hacen idónea para aplicaciones en empaques biodegradables, dispositivos ópticos y andamios tisulares.

1.1.5 Composición química y propiedades

Químicamente, la NC está compuesta por unidades repetitivas de D-glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos β -(1 $\rightarrow$ 4), formando cadenas lineales que se agrupan en microfibrillas [15]. A nivel molecular, difiere de la celulosa macroscópica por su grado de polimerización más bajo y por una mayor proporción de regiones cristalinas en comparación con las amorfas. La superficie de la NC, rica en grupos hidroxilo (-OH), permite una fácil funcionalización y dispersión en matrices poliméricas, lo que facilita su integración en una amplia gama de materiales compuestos y biocompuestos.

Entre sus propiedades destacan una alta resistencia mecánica y un módulo de Young comparable al del acero, pero con una densidad significativamente menor. Su alta relación superficie-volumen le confiere una gran capacidad de adsorción y reactividad. Además, la NC es transparente a la luz visible, biodegradable, biocompatible, no tóxica y presenta una baja expansión térmica. Estas propiedades la hacen idónea para aplicaciones que requieren ligereza, resistencia, transparencia y sostenibilidad, como películas barreras, envases inteligentes, dispositivos electrónicos flexibles y componentes biomédicos [15]. Su transparencia en las películas de este material se debe principalmente a que las nanofibras que conforman las láminas de la NC se encuentran densamente empaquetadas y los intersticios entre ellas son tan pequeños que impiden la dispersión de la luz.

1.1.6 Potencial y aplicaciones

En el ámbito de los materiales (Figura 1.5), la NC se proyecta como un refuerzo ligero y resistente para polímeros, creando biocompuestos avanzados con mejoras significativas en propiedades mecánicas, térmicas y de barrera, siendo esta última de gran relevancia al otorgar a un material la capacidad de bloquear el paso de líquidos y gases. Sus aplicaciones se extienden a la fabricación de papel y cartón con propiedades mejoradas, envases biodegradables, películas transparentes para pantallas electrónicas y aerogeles superaislantes y absorbentes. En biomedicina, su biocompatibilidad y su alta superficie la hacen valiosa para sistemas de liberación de fármacos, andamios para ingeniería de tejidos y biosensores [17].

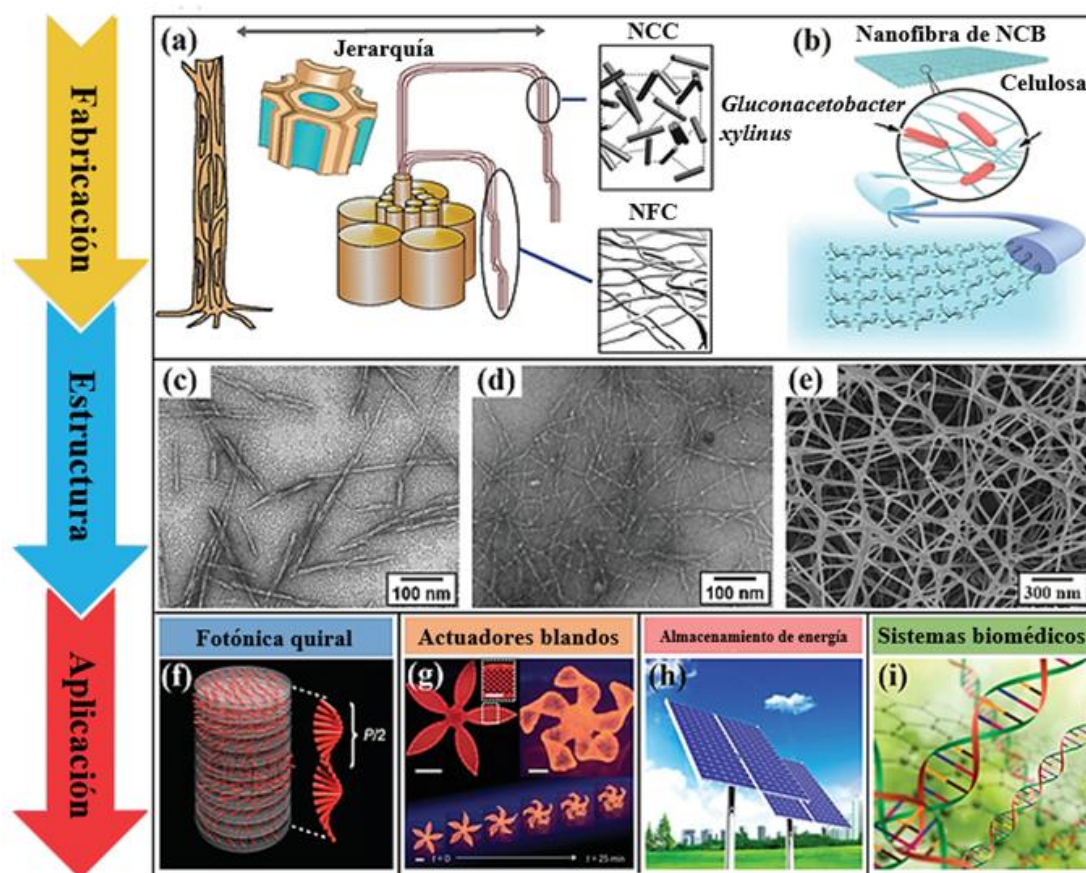


Figura 1.5. Ilustración esquemática del aislamiento de NCC y NFC de las paredes celulares de la madera y las plantas, resaltando las estructuras de la NC y sus posibles aplicaciones. Adaptado de [17].

1.2 Antecedentes

La extracción y purificación de nanocelulosa a partir de diversas fuentes lignocelulósicas, incluyendo las algas, ha sido el foco de intensa investigación en las últimas décadas, buscando desarrollar métodos eficientes, sostenibles y escalables. Tradicionalmente, los métodos de extracción involucran una combinación de tratamientos químicos y mecánicos para liberar las nanofibrillas de celulosa de la matriz lignocelulósica.

Los enfoques químicos comúnmente incluyen la deslignificación (para fuentes vegetales terrestres) y la eliminación de hemicelulosa y pectinas mediante tratamientos alcalinos y de blanqueo, seguidos de hidrólisis ácida o enzimática, para obtener, respectivamente, nanocristales de celulosa o nanofibrillas de celulosa.

Los tratamientos mecánicos, como la homogeneización a alta presión, la molienda o la microfluidización (método en el que se genera alta presión para desintegrar las fibras mediante fuerzas de cizallamiento), son esenciales para la desfibrilación de las microfibrillas de celulosa a escala nanométrica [18].

En el caso particular de las algas pardas como *M. Pyrifera*, los métodos deben adaptarse para lidiar con la presencia de polisacáridos sulfatados y otros componentes que pueden interferir con la extracción de celulosa pura. Investigaciones previas han explorado combinaciones de pretratamientos ácidos o alcalinos suaves, seguidas de tratamientos mecánicos, para aislar la celulosa y, posteriormente, las nanofibrillas, con el fin de optimizar el rendimiento y las propiedades de la NC obtenida.

Los métodos de extracción incluyen tratamientos alcalinos para eliminar lignina/hemicelulosa, seguidos de hidrólisis ácida (H_2SO_4 – 60 %, 45 °C) o mecánica (homogenización a alta presión) para liberar fibrillas de NC. En la *M. Pyrifera*, la optimización requiere considerar su matriz de alginatos, que puede interferir en la purificación, requiriendo etapas de pretratamiento con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o enzimas específicas [18].

En la última década, la ciencia y la tecnología han experimentado avances significativos que han impulsado el interés en la nanotecnología, buscando materiales con propiedades superiores a las encontradas en la escala macroscópica. La NC, tanto por sí sola como refuerzo en nanocompuestos, ha cobrado prominencia debido a la creciente demanda de materiales sostenibles y de alto rendimiento. Este versátil biopolímero, derivado de la celulosa, ha capturado la atención de investigadores de diversas disciplinas gracias a sus propiedades únicas y su potencial en materiales avanzados [18].

La NC puede obtenerse de diversas fuentes, incluidos residuos agroindustriales, forestales y algas marinas (ver Anexo 1), lo que ofrece alternativas ecológicas para la producción de materiales. Investigaciones como las de Ehman [19] y Pérez [20] han explorado la obtención de NC a partir de residuos agroindustriales y de *Agave spp.*, respectivamente, y han destacado su potencial para la generación de productos de alto valor agregado. Además, se han explorado diversas vías para la síntesis y caracterización de NC, incluyendo métodos biotecnológicos, naturales y químicos, lo que permite obtener NC con propiedades específicas para aplicaciones en biomedicina, materiales compuestos y productos de consumo.

Las algas marinas, organismos ecológicamente importantes que juegan un papel crucial en los ecosistemas marinos, contribuyen significativamente a la biodiversidad y al equilibrio ambiental [21]. Dentro de este contexto, la *M. Pyrifera*, conocida como "Kelp gigante", se destaca por su alta productividad y versatilidad en aplicaciones biotecnológicas. Esta alga parda, rica en carbohidratos, minerales, compuestos fenólicos y carotenoides, ha despertado interés en su caracterización y aprovechamiento. Sus extractos se utilizan como bioestimulantes agrícolas gracias a su contenido de fitohormonas y antioxidantes, mejorando la calidad y el rendimiento de diversos cultivos.

En el ámbito biotecnológico, la *M. Pyrifera* es una fuente prometedora para la obtención de NC debido a su alto contenido de polisacáridos estructurales como alginatos y celulosa [22]. La NC extraída de esta alga puede ser utilizada en la fabricación de materiales avanzados con aplicaciones en biomedicina, empaques sostenibles y refuerzos para

polímeros. Además, las algas pardas, como *M. Pyrifera* y *Sargassum spp.*, son objeto de interés debido a su riqueza en compuestos bioactivos y su potencial para aplicaciones industriales y farmacéuticas [23]. Estos organismos marinos son ricos en carbohidratos estructurales y de reserva, como alginatos, fucanos y laminaranes, que representan una fuente valiosa de polisacáridos con propiedades bioactivas.

La extracción de NC a partir de algas marinas, incluyendo las pardas, es un área emergente que busca aprovechar la celulosa presente en sus paredes celulares. Aunque las algas pardas tienen un contenido de celulosa relativamente bajo en comparación con otras fuentes vegetales, su NC puede ser utilizada en la fabricación de materiales avanzados con aplicaciones en empaques biodegradables y productos de cuidado personal. Investigaciones recientes han reportado el aislamiento de nanocelulosa 2D a partir de la pared celular de *Sargassum spp.* [24], una especie de alga parda que ha sido objeto de interés debido a su abundancia y potencial para la producción de materiales avanzados.

Finalmente, otro estudio sienta las bases para futuras investigaciones que busquen optimizar aún más el proceso de aislamiento de NC y explorar nuevas aplicaciones de este material en diferentes sectores, desde la biomedicina hasta la industria alimentaria. La combinación de sostenibilidad, versatilidad y potencial económico de la NC extraída de algas marinas la convierte en un tema de gran interés para investigaciones futuras que promuevan el uso sostenible y la conservación de estos recursos marinos [24].

Pese a la gran cantidad de estudios relacionados con el tema, la *M. Pyrifera* no ha llegado a ser utilizada a profundidad con fines de extracción de NC. Sin embargo, como se mencionó, existen estudios sobre otras algas pardas y sobre material biológico para identificar similitudes respecto de la fase de experimentación.

En términos de experimentación, los estudios difieren en los métodos empleados para la extracción y caracterización de la NC. Se describió un proceso innovador para el aislamiento de nanocelulosa 2D a partir de *Sargassum spp.*, que combina tratamientos químicos y mecánicos en un solo recipiente. Este enfoque simplificado y optimizado

permitió obtener nanoláminas de celulosa, que luego fueron utilizadas para preparar películas delgadas transparentes con una transmitancia del 81%. La caracterización del material se realizó mediante técnicas como FTIR, RMN, espectrofotometría UV-Vis y microscopía [24].

Por otro lado, un grupo de investigadores se enfocaron en la obtención de NC cristalina a partir de las algas árticas *Laminaria digitata* y *Saccharina latissima*. Su metodología incluyó etapas de pretratamiento, hidrólisis ácida y sonicación, y la caracterización se realizó mediante difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión y espectroscopía infrarroja [25]. De manera similar, en otro trabajo se menciona que investigadores desarrollaron un método libre de ácido para la preparación de NC de *Laminaria japonica* (Kelp), mediante un proceso de molienda y sonicación [26].

Otros estudios han explorado diferentes enfoques experimentales. En el primer estudio se detalla la elaboración de un estudio preliminar sobre la producción de NC a partir de algas marinas locales [27], mientras que en otro se investigó la posibilidad de obtener NC de la *Posidonia oceánica* para el tratamiento de textiles [28].

Otro ejemplo destacable menciona el desarrollo de hidrogeles de NC a partir de *Sargassum* spp. para sistemas de liberación controlada de nutrientes [29] y, por último, en otro trabajo utilizaron un proceso modificado con ácido e irradiación con haz de electrones para aislar NC de algas marinas para su uso en compuestos poliméricos biodegradables [30].

En cuanto a las similitudes, la mayoría de los estudios comparten el objetivo de obtener NC a partir de algas marinas como alternativa sostenible a las fuentes tradicionales. Los métodos de extracción suelen incluir etapas de pretratamiento para eliminar componentes no celulósicos, seguidas de hidrólisis (ácida o enzimática) y/o de métodos mecánicos (sonicación, homogeneización) para liberar las nanofibras. La caracterización del material se realiza mediante técnicas comunes, como microscopía, espectroscopía y difracción de rayos X, para determinar su tamaño, morfología, cristalinidad y propiedades químicas.

A pesar de las semejanzas, existen diferencias significativas en los detalles de los protocolos experimentales, incluidas las especies de algas empleadas, las condiciones de reacción y los métodos de purificación. Estas diferencias pueden influir en las propiedades finales de la NC obtenida, lo que destaca la necesidad de optimizar los procesos de extracción y caracterización para cada tipo de alga y cada aplicación específica.

La investigación sobre la obtención de NC a partir de algas marinas se encuentra en una etapa de desarrollo prometedora, con diversos estudios que demuestran la viabilidad de utilizar estos recursos renovables para la producción de materiales avanzados. La diversidad de enfoques experimentales y las similitudes en los objetivos resaltan la importancia de continuar explorando y optimizando los procesos de extracción y caracterización para aprovechar al máximo el potencial de las algas marinas como fuente de NC sostenible gracias a la alta tasa de renovación biológica de las algas y a la optimización de las condiciones de hidrólisis ácida.

1.3 Justificación

La creciente demanda global de algas marinas, la cual supera la capacidad de recolección silvestre, ha impulsado un notable crecimiento en su acuicultura [31]. La evidencia de ello se respalda en la duplicación de la producción mundial de algas cultivadas entre los años 2000 y 2012, así como un aumento global de más de 20 millones de toneladas en la producción total de algas desde 2001, según informes de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) [32]. Este crecimiento coincide con una expansión significativa en la acuicultura global, donde casi 10 millones de toneladas de productos de algas provinieron de esta actividad entre 2011 y 2015. En 2015, la acuicultura generó 29.4 millones toneladas de las 30.4 millones de toneladas de algas producidas, dejando la recolección silvestre en solo 1.1 millones de toneladas [32]. La mayoría de los países asiáticos, con Indonesia en primer lugar, son los principales impulsores de esta expansión [32]. Este panorama acentúa no solo la viabilidad económica de las algas como recurso, sino también la necesidad estratégica de valorizar aún más esta biomasa cultivada. Al centrar este estudio en el aislamiento de NC de *M. Pyrifera*, se busca contribuir a la diversificación de productos de alto valor añadido derivados de la acuicultura de algas,

optimizando así el aprovechamiento de un recurso renovable y reforzando la sostenibilidad de la cadena de valor marina.

El estudio asimismo se alinea con las actuales prioridades globales de desarrollo sostenible y la necesidad de una transición hacia una economía circular. La exploración de fuentes alternativas y sostenibles de NC, como la *M. Pyrifera*, contribuye directamente a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 de las Naciones Unidas, particularmente en relación con la producción y consumo responsables (ODS 12), la acción por el clima (ODS 13) y la vida submarina (ODS 14) [33]. La utilización de este recurso marino renovable para la obtención de NC mediante métodos combinados de hidrólisis ácida y enzimática representa una estrategia innovadora para valorizar biomasa marina que, de otro modo, podría considerarse un residuo, reduciendo la dependencia de fuentes terrestres y disminuyendo el impacto ambiental asociado a procesos convencionales [34].

Además, la caracterización morfológica mediante técnicas como la microscopía de barrido láser (LSM), microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión (MET) para adquirir una vista detallada de la NC aislada e identificación de estructuras 1D y 2D, incluyendo técnicas de caracterización espectroscópicas como la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y la resonancia magnética nuclear (RMN), son cruciales. Su estudio permitirá comprender mejor sus propiedades estructurales intrínsecas y superficiales, lo cual es fundamental para predecir y facilitar su aplicación en diferentes sectores industriales con un enfoque sostenible [35]. La investigación propuesta llenará vacíos importantes en el conocimiento sobre la extracción y caracterización de NC de esta especie de algas pardas, complementándolo con la ya conocida y explotada extracción de alginato de sodio para aplicaciones industriales. Se espera que los hallazgos contribuyan al desarrollo de materiales innovadores que no solo puedan mejorar la competitividad industrial, sino que también promuevan activamente los principios de la economía circular y la bioeconomía.

Capítulo 2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Al optimizar el tiempo de reacción y la concentración de ácido sulfúrico durante la hidrólisis, junto con la aplicación de un proceso de purificación y posterior hidrólisis enzimática, se obtendrá una nanocelulosa con mayor cristalinidad y pureza, resultando en propiedades estructurales y ópticas mejoradas para las películas elaboradas.

2.2 Objetivo general

Aislar y caracterizar nanocelulosa de alta pureza y rendimiento a partir del alga *Macrocystis Pyrifera* mediante hidrólisis ácida y posterior hidrólisis enzimática para evaluar su morfología.

2.3 Objetivos específicos

- Aislar y purificar nanocelulosa a partir del alga parda *Macrocystis Pyrifera* mediante hidrólisis ácida y tratamiento enzimático secuencial para optimizar el aprovechamiento de la biomasa.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y morfológicas de la nanocelulosa obtenida mediante técnicas multiescala (FTIR, RMN, CLSM, MEB y MET) para determinar su composición química (pureza) y grado de cristalinidad.
- Evaluar la influencia del método de aislamiento y del tratamiento secuencial sobre la morfología de la nanocelulosa.

Capítulo 3

DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se detalla la metodología experimental empleada para el aislamiento de nanocelulosa a partir de un alga comercial mediante hidrólisis ácida y posterior hidrólisis enzimática.

3.1 Adquisición de materias primas

Las materias primas empleadas en el desarrollo de esta experimentación fueron, en su mayoría, proporcionadas por proveedores, salvo el alga cuyo suministro fue externo y su grado de pureza es alimenticio (100% natural). En la Tabla 3.1 se presentan detalles importantes sobre los reactivos empleados en esta investigación.

Reactivo	Grado de pureza / Actividad	Marca
Agua purificada	Industrial	Suministro externo
Agua desionizada	Laboratorio (>99%)	Sigma Aldrich
Hidróxido de sodio (pellets)	Laboratorio (>99%)	Sigma Aldrich
Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	Laboratorio (>99%)	Sigma Aldrich
Cloruro de calcio (CaCl_2)	Laboratorio (>99%)	Sigma Aldrich
Peróxido de hidrógeno (50%)	Técnico (50% p/p en H_2O)	QuimyGraf
Ácido sulfúrico (H_2SO_4)	Reactivo ACS (95.0-98.0%)	J.T. Baker
Hidrato de ácido fosfotúngstico	Analítico (microscopía)	Sigma Aldrich
Endoglucanasa (<i>A. cellulolyticus</i>)	Bioquímico (≥ 2.0 U/mg de proteína)	Sigma Aldrich

Tabla 3.1. Características de los reactivos.

3.2 Diseño de formulaciones experimentales

Todos los reactivos utilizados se emplearon tal como se recibieron, sin purificación adicional. El estudio se realizó bajo condiciones experimentales constantes de temperatura, agitación, tiempo, cantidad de materia prima y de reactivos para evaluar la reproducibilidad del método de obtención, las cuales se presentarán a lo largo de este capítulo. Se realizaron un total de 20 experimentos para estandarizar el proceso, de los cuales, al final, tres se

utilizaron para determinar los porcentajes de rendimiento en la obtención de fucoïdan, alginato de calcio y nanocelulosa. Las soluciones realizadas se presentan en la Tabla 3.2, donde se aclaran el proceso en el que se lleva a cabo, el material o reactivos utilizados, la relación (líquido/líquido o sólido/líquido) y los valores constantes de temperatura, velocidad y tiempo definidos para optimizar el proceso y obtener un porcentaje de rendimiento aceptable para la NC.

Nombre del proceso	Material / Reactivo	Relación	Temperatura	Tratamiento	Tiempo
Extracción y eliminación de impurezas (fucoïdan)	Alga, agua purificada	1:11 p/v	80 °C	Agitación a 300 rpm incrementando hasta 700 rpm	1 h
			120 °C	Autoclave	1 h
	Agua purificada Suspensión inicial	1:21 p/v	80 °C	Agitación a 500 rpm	30 min
Extracción y eliminación de alginato de sodio	Agua purificada Na ₂ CO ₃	1:5 p/v	Ambiente	Agitación 200 rpm	15 min
Obtención de alginato calcio	Agua purificada, CaCl ₂	1:40 p/v	Ambiente	Agitación 200 rpm	15 min
Hidrólisis ácida	Alga tratada, H ₂ O ₂	1:10 p/v	80 °C	Baño maría, agitación a 300 rpm	2 h
	H ₂ O ₂ , H ₂ SO ₄	45:1 v/v	40 °C	Agitación 100 rpm	10 min
Hidrólisis enzimática	NC, endoglucanasa	33.3:1 v/v	50 °C	Agitación a 150 rpm	72 h
Preparación muestra MET	NC, Hidrato de ácido fosfotúngstico	20:1 v/v	Ambiente	Agitación en vortex a 100 rpm	2 min

Tabla 3.2. Especificaciones de los tratamientos y de las variables de control del proceso.

A su vez, en la Tabla 3.3 se presentan los datos de las concentraciones finales de los reactivos proporcionados por los proveedores, así como la preparación de las soluciones necesarias para la experimentación.

Solución / Reactivo	Concentración final	Preparación
Na_2CO_3	10% p/v	10 de alga + 100 mL de agua purificada
CaCl_2	2.5% p/v	10 g de alga + 400 mL de agua purificada
H_2O_2	50% p/p	Directo en alga tratada
Solución piraña ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$)	45:1 v/v	45 mL H_2O_2 + 1 mL H_2SO_4
NC + Endoglucanasa	~6 U/g celulosa	10 ml de NC + 300 μL
NC + Hidrato de ácido fosfotúngstico	4.76% v/v	200 μL NC + 10 μL hidrato de ácido fosfotúngstico

Tabla 3.3. Especificaciones técnicas y protocolo de preparación de soluciones.

3.3 Extracción de impurezas y obtención de la materia prima

La materia prima inicial se adquiere de la marca Alimentos Colpac, mediante botes que contienen aproximadamente 100 g de algas marinas Kelp en polvo (Figura 3.1), los cuales son comercializados como un alimento saludable que mantiene activo el metabolismo y que por ende no contiene ningún otro ingrediente a parte de este. El alga adquirida debe pasar primeramente por un tratamiento de extracción de fucoïdan, no puede utilizarse directamente una vez obtenida para que la materia prima a tratar sea lo más pura posible.



Figura 3.1. Materia prima y vista en microscopio.

En una balanza se pesan 50 g del contenido de un bote de Alga, y en otra charola la cantidad restante para confirmar la cantidad de material a tratar, la cantidad total debe rondar entre los 100-110 g. El material se vacía en dos frascos de 1000 mL (marca Pyrex), cada frasco con la cantidad de 50 g, con la ayuda de un embudo, así como un agitador magnético y 550 mL de agua purificada en cada uno. La separación del polvo en dos frascos garantiza que la extracción sea completa y no solo en ciertas zonas, además de que se optimiza el proceso y se obtiene una mayor cantidad de materia prima.

Ambos frascos se ponen en baño maría a 80 °C e iniciando con una agitación de 300 rpm hasta llegar a 700 rpm durante 1 hora, cuidando que el material se agite y que las paredes del frasco estén limpias. Transcurrido el tiempo, ambos frascos se introducen en la autoclave, dejándolos 30 minutos a 120 °C, esperando otros 30 minutos a que la presión de la autoclave baje y ambos frascos puedan ser retirados. Los frascos extraídos (Figura 3.2) deben mostrar una separación de material (parte inferior) y fucoidan (parte superior). Se extrae el fucoidan con una pipeta eléctrica y una pipeta graduada de vidrio de 10 mL, depositándolo en una charola de silicón de 20 cm de ancho por 40 cm de largo, almacenándola en un horno de secado hasta que el material restante esté listo.

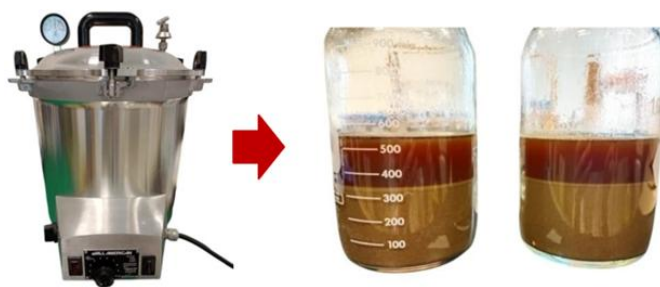


Figura 3.2. Autoclave y frascos después del tratamiento de autoclave.

El material restante se deposita en un solo frasco con ayuda de un embudo y agregando 500 mL de agua purificada de forma gradual, cuidando la posición del agitador magnético. El frasco se deja en baño maría a 80 °C con una agitación de 500 rpm durante 30 minutos.

Se prepara el material necesario para realizar el vacío mientras transcurre el tiempo de baño maría. Se instala la bomba de vacío de la marca LACHOI con una filtración de diafragma de 15 L/min, conectando la manguera de entrada a un Kitasato de 1000 mL y un embudo Buchner, instalando en el embudo una malla de filtración #70 para evitar que pase la menor cantidad de material posible (Figura 3.3).



Figura 3.3. Sistema de filtrado con vacío.

Se vacía el contenido del frasco dentro de la malla en el embudo una vez pasado el tiempo de baño maría; el vaciado debe realizarse por partes para vaciar el frasco por completo y así extraer la mayor cantidad de líquido posible del material. Se pasa el material con ayuda de una espátula a un frasco nuevo de 1000 mL, agregando a su vez un agitador. El líquido sobrante del matraz se puede vaciar en otra charola de silicón, dejándola a su vez en el horno de secado para poder analizarla mediante FTIR una vez obtenida la película de fucoidan y verificar su composición.

Finalmente, una vez vaciado su contenido, se repite el proceso agregando otros 500 mL de agua purificada al frasco con material para que pase por un segundo lavado en baño maría (Figura 3.4). Se debe de realizar un total de cuatro lavados, almacenando el líquido obtenido de los últimos dos lavados, los cuales se centrifugan a 4000 rpm durante 25 minutos para recuperar la mayor cantidad de material posible que se haya pasado a través de la malla de filtración. Entre cada lavado se debe observar un cambio en el líquido filtrado, viéndose más limpio con cada lavado.



Figura 3.4. Segundo lavado de material en baño maría (con y sin agitación).

3.3.1 Extracción y eliminación de alginatos (sodio y calcio)

Pese al lavado repetido para la extracción de fucoidan, el alga aún presenta un alto porcentaje de alginato. Para obtener una mayor eficiencia de aislamiento y pureza de la NC (sin posterior tratamiento enzimático), el alga se somete a un proceso de obtención de alginato, que puede realizarse previamente a tres lavados para la remoción de fucoidan y al filtrado por bomba de vacío.

En un vaso de precipitado de 600 mL se agrega un agitador magnético, 100 mL de agua purificada y 10 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3), el cual se coloca en una plancha de agitación a 200 rpm hasta que el Na_2CO_3 se disuelva por completo. El alga húmeda (20 g aproximadamente) se agrega a la solución, dejándolo en agitación a 200 rpm y 50 °C durante 1 h. Después de 10 min, la viscosidad de la solución aumentará, impidiendo la movilidad del agitador, para este caso existen dos opciones.

- ✓ Aumentar la agitación a 400 rpm.
- ✓ De no solucionarse, el agitador debe ser removido y limpiado dentro del mismo frasco con ayuda de una piseta con agua purificada, continuando el proceso apoyándose de un batidor de varillas para realizar agitación manual, cumpliendo lapsos de 1 min de agitación cada 15 min hasta completar el tiempo estipulado.

Seguidamente, mientras la solución aún se encuentre caliente, se distribuye en 6 tubos de centrifuga de 50 mL, centrifugándolos a 4000 rpm durante 30 min. Los materiales

obtenidos en este paso constan del alginato de sodio (líquido) y la materia prima (sólido) a utilizar para su posterior secado y aislamiento de NC. Es posible realizar otro lavado con tratamiento térmico, no obstante, el alginato de sodio obtenido posterior al primer lavado será de menor concentración y no será óptima para el proceso de gelificación en forma de esferas.

En un cristizador de vidrio de la marca Corning Pyrex, capacidad de 2500 mL, diámetro de 190 mm x altura de 100 mm, se coloca en una plancha de agitación a 20 rpm, agregando un agitador magnético, 400 mL de agua purificada y 10 g de cloruro de calcio (CaCl_2). Mientras el CaCl_2 se termina de disolver, en un soporte universal se coloca un embudo de separación (decantación) de vidrio 250 mL en forma de pera de la marca Pyrex. La salida del embudo de separación se coloca encima del cristizador y a un lado del agitador, no completamente en el centro, como se muestra en la Figura 3.5, para que las esferas de alginato de calcio no se concentren en el agitador y se aglomeren entre sí.



Figura 3.5. Gelificación de alginato de calcio.

El alginato de sodio se coloca en el embudo de separación (cuidando que la llave de paso se encuentre cerrada). Al abrir la llave de paso de forma controlada, se forman esferas de alginato de calcio por gelificación al entrar en contacto con la solución. Finalmente, las esferas de alginato de calcio se lavaron sucesivamente con un colador y agua para eliminar los residuos, posteriormente se almacenan en un recipiente con agua purificada. El alginato de sodio obtenido puede llegar a conservarse en un frasco de 1000 mL hasta por cinco días, mientras que alginato de calcio se puede conservar en un frasco de conserva durante un periodo prolongado de tiempo (superior a 60 días) una vez que haya pasado por un proceso

de estilización en la autoclave a 110 °C durante 1 h, además, de que el frasco no haya sido abierto o su agua haya sido contaminada.

3.3.2 Secado y homogeneizado del material

Finalmente, todo el material obtenido mediante la bomba de vacío y la centrifuga, se distribuye en 2 charolas de silicón (Figura 3.6) y se colocan en el horno de secado, dejándolo activado durante 15 horas a 50 °C.

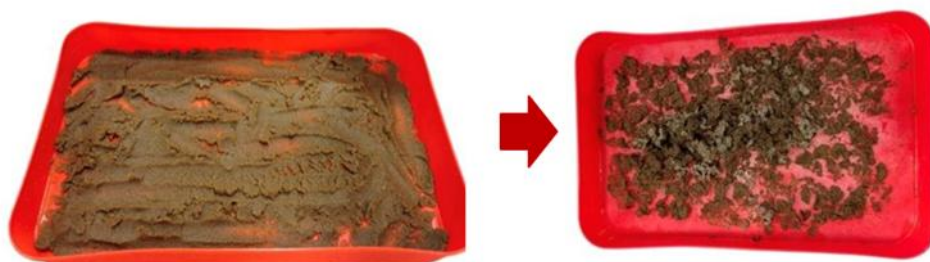


Figura 3.6. Material antes y después del secado.

El material seco se separa de las charolas para posteriormente tritarlo en un molinillo de grano eléctrico con una molienda superfina de alta velocidad 28000 rpm durante un minuto. El material resultante (Figura 3.7) será aproximadamente un 60% del peso original, mientras que el otro 40% corresponde al fucoidan obtenido en láminas.



Figura 3.7. Molino de grano eléctrico (izquierda) y alga molida en un polvo fino (derecha).

3.4 Síntesis y obtención de la nanocelulosa

En un frasco de 1000 mL de la marca Pyrex se agrega un agitador magnético, 15 g de alga (obtenida mediante el tratamiento previo) y 150 mL de peróxido de hidrógeno al

50%, dejándolo en baño maría a 80 °C con 300 rpm durante 2 horas, cuidando que las paredes estén limpias con ayuda de una piseta con peróxido. A los 10 minutos se aprecia un cambio de color, de su café inicial a verde, así como un aumento de viscosidad, apreciando una mayor agitación a partir de la hora y media hasta dos horas, cuidando que el agitador no pierda movilidad y que no se manchen las paredes (Figura 3.8).

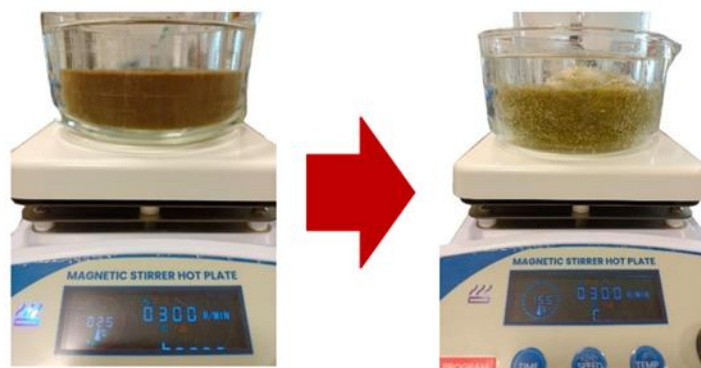


Figura 3.8. Alga con peróxido inicial (izquierda) y en el transcurso de 10 minutos (derecha).

10 minutos antes de completar las dos horas se agrega a parte en un vaso de precipitado de 100 mL unos 45 mL de peróxido de hidrógeno con 1 mL de ácido sulfúrico (reactivo J.T. Baker) y un agitador, dejándolo en agitación durante 9-10 minutos a 40 °C hasta que ambos se disuelvan por completo. Se comprueba el pH antes de vaciar la mezcla de peróxido y ácido sulfúrico en el frasco de 1000 mL, este tendrá un valor de cero.

Se aumenta la agitación entre (500 – 600) rpm una vez agregada la mezcla de peróxido y ácido sulfúrico al frasco con el material, dejándolo así mismo en baño maría a 80°C durante otra hora más. Durante el transcurso de este periodo ocurren cambios de color a unos más claros (Figura 3.9), y se debe abrir cada 15 minutos el frasco o cuando se genere una gran cantidad de espuma, aumentando así la velocidad poco a poco hasta que la espuma se elimine y lavando las paredes con la piseta de peróxido. Se apaga la temperatura de la plancha con el paso de la hora, abriendo el frasco y lavando paredes por última vez antes de dejarlo en agitación durante 24 horas aproximadamente.

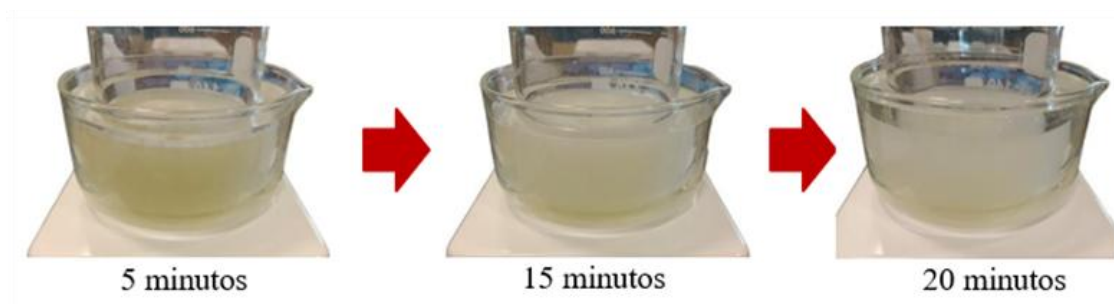


Figura 3.9. Apariencia de la reacción en distintos lapsos de tiempo.

Después de 24 horas se comprueba que el agitador esté sucio, de ser así se reemplaza por uno nuevo y el material adherido al agitador anterior se puede desechar. El frasco con el nuevo agitador se coloca en la autoclave a 120 °C durante 1 hora, dejando un rango de 30 a 40 minutos extra para que se baje la presión y pueda ser abierta. Una vez transcurrido el tiempo se vuelve a colocar el frasco en agitación, sin el baño maría, aprovechando el calor producido de la misma autoclave para que el resto de suciedad se adhiera al agitador nuevo durante otra hora más.

El líquido obtenido se vacía en tubos de fondo cónico de 50 mL (aproximadamente 6 tubos por frasco) para centrifugarlos a 4000 rpm durante 25 minutos. El líquido restante tendrá un pH bajo de 1.0, el cual se desecha en un contenedor especial. El material del fondo de los tubos es NC, a los cuales se le agregan 33 mL de agua desionizada a cada uno, la cual debe ser calentada en microondas durante 1 minuto y medio antes de vaciarla a los tubos, facilitando el desprendimiento de la NC del tubo. Se esperan entre 5 a 10 minutos antes de agitar todos los tubos y vaciar su contenido en un vaso de precipitado de 400 mL con un agitador magnético limpio. Se mide su pH, siendo este un valor inferior a 7, para ello se debe tomar en consideración lo siguiente:

- ✓ Si el valor es inferior a 2 se agrega un pellet de hidróxido de sodio.
- ✓ Si el valor es mayor a dos se agrega gota por gota una solución de agua desionizada con hidróxido de sodio, con un valor entre 12-14 pH.

Esto se debe realizar mientras el vaso de precipitado esté en agitación y con una temperatura aproximada a 50 °C, hasta que el valor de pH sea 7 (neutro). Con la

neutralización se apreciará un cambio de color de amarillo/verdoso a blanco. Nuevamente se pasará por un proceso de lavados, vaciando la NC a tubos de fondo cónico para centrifugarlos con las mismas condiciones (4000 rpm durante 25 minutos), verificando entre lavados que el pH siga siendo neutro y disminuyendo la cantidad de agua desionizada caliente:

- ✓ **Primer lavado:** 200 mL de agua desionizada caliente (50 °C) repartidos entre los tubos.
- ✓ **Segundo lavado:** 100 mL de agua desionizada caliente (50 °C) repartidos entre los tubos.
- ✓ **Tercer lavado:** 40 mL de agua desionizada caliente (50 °C) repartidos entre los tubos.

En total se deben realizar tres lavados.

La NC resultante se dejará en diálisis mediante tubos de membrana de celulosa regenerada (Figura 3.10) durante 48-72 h para eliminar sales existentes (entre más tiempo mejor).



Figura 3.10. NC en diálisis.

Finalmente, transcurridas las 48-72 h se vacía con cuidado la NC en charolas flexibles o cajas Petri cuadradas según la cantidad de NC obtenida, colocando los recipientes en un agitador orbital a una velocidad máxima de 20 rpm durante 3 minutos (Figura 3.11), cambiándolo de posición cada 3 minutos para que la sustancia se encuentre uniforme. Por consiguiente, se deja secar al sol hasta que se forme la película.

En caso de que no haya sol se puede dejar en la estufa a 42 °C, cuidando que no quede directamente en la parte inferior (directo al metal) para evitar que la película se

fracture. El uso de una estufa se considera por temas de practicidad y evitar impurezas en la superficie de la película. El secado al sol directo (sin cubierta alguna) puede provocar la contaminación de la película final debido a partículas suspendidas en el aire, por lo que se recomienda el uso de un desecador de vidrio para vacío, si se realiza de esta forma.

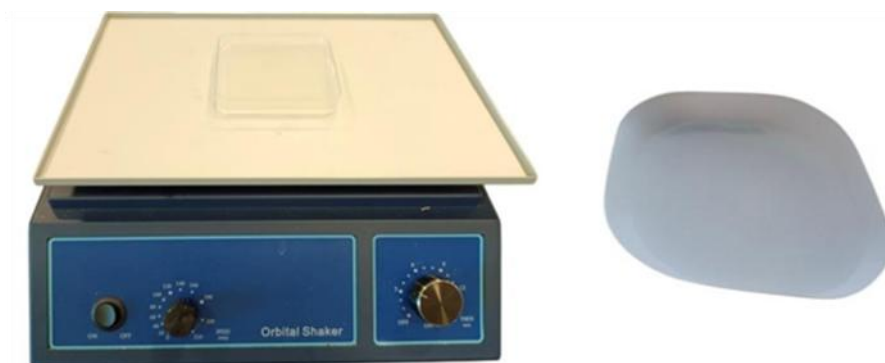


Figura 3.11. NC en caja Petri sobre el agitador orbital (izquierda), NC en una charola secándose al sol (derecha).

Una vez seca solo se retira con ayuda de una espátula y se verifica que sea transparente.

3.5 Obtención de nanofibrillas y fabricación de película

Se obtienen nanoláminas de celulosa mediante el tratamiento térmico único, por lo que una vez aislada la NC se debe pasar por el tratamiento enzimático para la obtención de nanofibras.

La endoglucanasa es una enzima que actúa en la celulosa, dividiendo la lámina en fibras de las cuales está compuesta. Se divide la NC obtenida previamente en 4 tubos de centrifuga de 20 mL, etiquetándolos cada uno como C, E1, E2 y E3, las cuales corresponden a una muestra de control y tres que se someterán a la enzima para ver las diferencias posteriores mediante LSM, SEM y MET.

La cantidad de enzima utilizada depende de la NC a utilizar, por ejemplo, para 10ml de muestra en cada tubo, se requiere agregar 200 μ l de endoglucanasa. Los tres tubos etiquetados como E1, E2 y E3 se someten a agitación una vez agregada la enzima para posteriormente dejarlos en una incubadora a 50 °C durante 3 días.

Posteriormente, los tubos se deben calentar a 80 °C durante 15 minutos para desactivar la enzima. Se sigue un proceso de lavado mediante agua desionizada caliente para quitar los residuos de endoglucanasa de la NC y evitar interferencias a la hora del análisis morfológico de muestras.

En total se deben realizar 3 lavados con 20 mL de agua desionizada caliente por tubo, centrifugándolos a 4000 rpm durante 30 minutos, así como comprobar el pH de cada lavado para tener un control de este.

Una vez que la NC haya sido lavada sucesivas veces, se realizará el mismo procedimiento de vaciado para la obtención una película.

3.6 Resumen esquemático del desarrollo experimental

En la Figura 3.12 se muestra un esquema de la metodología utilizada, destacando sus fases más importantes: tratamiento del alga, tratamiento térmico e hidrólisis ácida, neutralización y purificación, secado y, finalmente, tratamiento enzimático, las cuales se explicaron a detalle en los subtemas de este capítulo, los cuales consisten en los siguientes puntos:

1. Lavado del alga con agua purificada en una plancha de calefacción, bajo agitación.
2. Lavado posterior en autoclave para mayor extracción de impurezas.
3. Filtración mediante vacío para la obtención de la materia prima (alga tratada) y de fucoidan (impurezas).
4. Secado de la materia prima y molienda.
5. Preparación de una solución de Na_2CO_3 con la materia prima en una plancha de calefacción, bajo agitación.
6. La solución se somete a centrifugación para obtener alginato de sodio (sobrenadante) y la materia prima (precipitado).
7. El alginato de sodio pasa por un proceso de esferificación en una solución con CaCl_2 , mientras que la materia prima continúa en un proceso de secado y posterior molienda.

8. Comienza el proceso de hidrólisis ácida para la obtención de NC en una plancha de calefacción, hasta lograr una reacción estable (sin acumulación de gas).
9. Una vez conseguida una reacción estable, el frasco se introduce en la autoclave para completarla y obtener la NC.
10. Transcurrido el tiempo de reacción en la autoclave, la solución pasa por un proceso de neutralización.
11. Una vez neutralizado, se procede a la purificación mediante lavados con agua desionizada hasta que el sobrenadante parezca agua.
- 12.1. El primer caso consiste en usar la solución de NC con poca agua desionizada para formar películas delgadas mediante secado.
- 12.2. El segundo consiste en emplear la solución de NC en el tratamiento enzimático para obtener nanofibras.

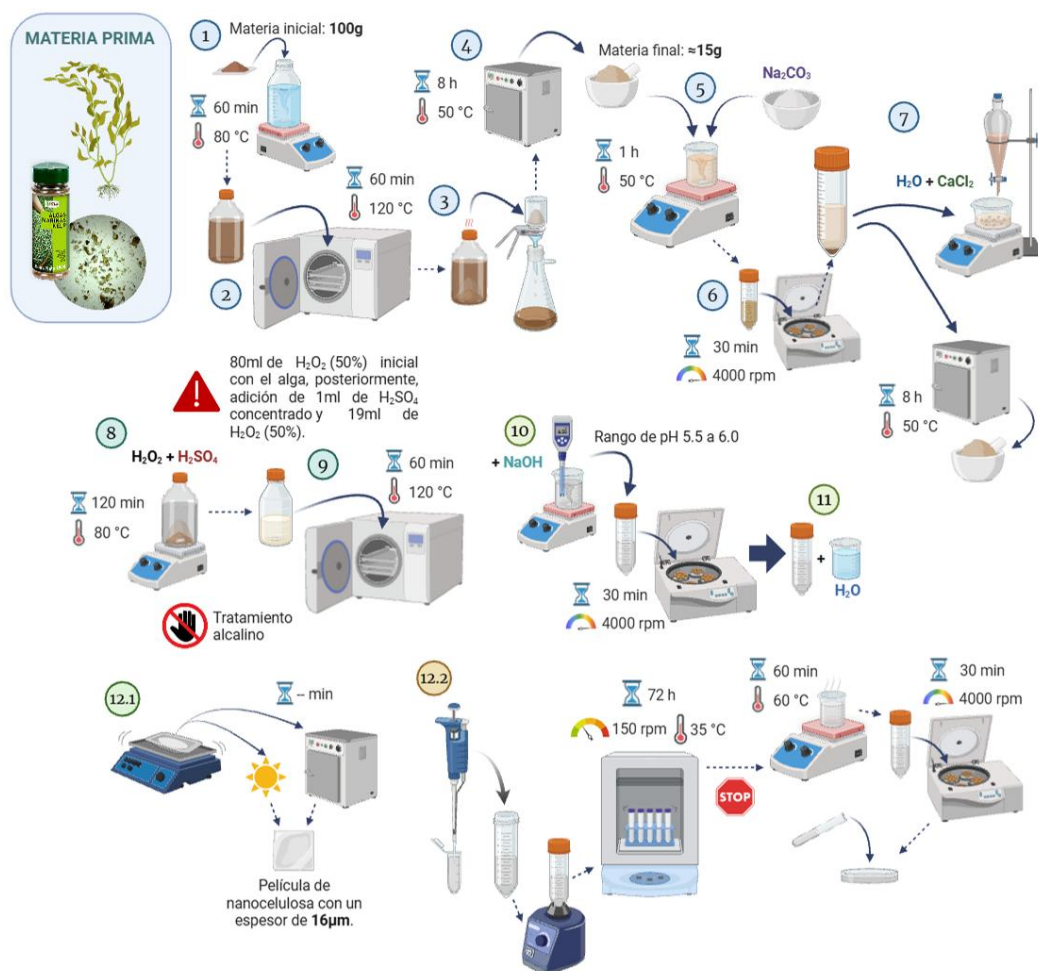


Figura 3.12. Esquema resumido de la metodología utilizada para el aislamiento de NC (ver Anexo 2 y 3). Creado con BioRender.

3.7 Obtención de los porcentajes de rendimiento

Se evaluó el porcentaje de rendimiento de los elementos aislados (fucoidan, alginato y NC). La fórmula utilizada [36] para calcular el rendimiento de fucoidan y alginato se muestra en la ecuación 1:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left(\frac{P_f}{P_i} \right) * 100 \quad (1)$$

Donde: P_f es el peso final del material seco en gramos y P_i es el peso inicial del material usado para la extracción en gramos.

Por otro lado, para calcular el porcentaje de rendimiento de la NC se requieren los valores:

- Materia prima inicial utilizada (alga) para el aislamiento de la NC.
- La solución NC obtenida después de la hidrólisis ácida (la solución debe dejar de asentarse para retirar el exceso de agua desionizada de los lavados).
- El peso inicial de la NC líquida antes de pasar por el proceso de secado.
- El peso final de la película de NC tras el secado.

Las fórmulas utilizadas se muestran a continuación [36]:

$$\% \frac{m}{v} = \left(\frac{m_s}{v_s} \right) * 100 \quad (2)$$

Donde: m_s es la masa soluto de la NC en gramos y v_s corresponde al volumen de la solución de la NC en mililitros. Este cálculo debe realizarse primero para cada experimentación. Una vez obtenido, se calcula la masa de NC seca total del experimento realizado mediante la siguiente fórmula:

$$M = \left(\frac{\% \frac{m}{v}}{100} \right) * v_t \quad (3)$$

Donde: $\% \frac{m}{v}$ corresponde al resultado de la ecuación 2 para determinar el porcentaje masa/volumen y v_t corresponde al volumen total de la solución de la NC en mililitros. Este

cálculo debe realizarse primero para cada experimentación. Por último, con los datos previos obtenidos se calcula el porcentaje de rendimiento de la NC mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left(\frac{M}{m_i} \right) * 100 \quad (4)$$

Donde: M corresponde a la masa total de NC seca y m_i a la materia prima inicial utilizada para el experimento, ambos valores en gramos.

3.8 Caracterización

3.8.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica no destructiva se emplea para el análisis de la composición molecular de las muestras mediante la obtención e identificación de sus grupos funcionales. Los espectros se obtuvieron mediante un espectrofotómetro FTIR Compacto IRAffinity-1S de la empresa Shimadzu Corporation, utilizando el modo ATR para las muestras en forma de película y polvo. La configuración utilizada fue de 30 a 64 escaneos, resolución 2.0 con un rango de 500 a 4000 cm^{-1} . Los resultados obtenidos se graficaron posteriormente en el programa OriginPro 9.0 para la identificación de grupos funcionales y comparación de espectros.

3.8.2 Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM)

Con un microscopio de barrido láser ZEISS LSM 700 se obtuvieron los perfiles de altura para estudiar la topografía de la muestra de NC mediante un láser con emisión a 405 nm. Las imágenes obtenidas se adquirieron con un aumento de 100x y una resolución de 512x512 píxeles, utilizando por lo menos 150 capas para la construcción de cada imagen. Para la observación de la muestra se utilizó una dispersión en vortex obtenida mediante la adición de 10 μl de NC en aproximadamente 0.6 mL de agua desionizada. Posteriormente se depositó 100 μl de solución sobre obleas de silicio de primera calidad (pulidas en una sola cara) de la marca Alpha Nanotech Inc, las cuales se adhirieron posteriormente a un portaobjetos de vidrio con lápiz adhesivo.

3.8.3 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Mediante esta técnica se observó la morfología de la NC. Debido a su composición orgánica, es requerido que las muestras previamente vistas en el CLSM sean recubiertas con

oro, esto se realizó mediante un recubridor rotativo con bomba Quorum Q150R Plus, aplicando 25 mA como corriente de pulverización durante 25 segundos, con un factor de herramienta 5.

Su análisis se realizó con un microscopio electrónico de barrido (MEB) Hitachi SU8020. Para la colocación de las muestras en el equipo, las placas de silicio recubiertas se adhirieron directamente sobre una cinta de grafito doble cara que se fijó al porta muestras del equipo. Las muestras fueron observadas aplicando un voltaje de aceleración de 5 kV y 10 μ A, a una distancia de trabajo de 8.5 mm.

Las imágenes obtenidas por MEB se analizaron con el software ImageJ, en el que se realizaron 40 mediciones del diámetro de las fibras individuales de la muestra de NC.

3.8.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

En este caso, para su análisis se utilizó un microscopio electrónico de transmisión modelo TITAN G2 80-300 de la marca FEI, a un voltaje de aceleración de 300 kV. Todas las muestras se prepararon mediante el siguiente procedimiento. Se preparó una solución de NC (pre y post tratamiento enzimático) en un Eppendorf de 0.5ml, añadiendo 200 μ l de nanocelulosa y 10 μ l de ácido fosfotúngstico hidrato para microscopio de la marca Sigma Aldrich. Posteriormente se utilizó un vortex para obtener una solución homogénea.

Se colocó una gota de la solución homogénea preparada sobre una rejilla de cobre recubierto con una película de carbón con patrón lacey. Finalmente, las rejillas con cada muestra se dejaron secar durante 2 h en una estufa a 40 °C. Para las imágenes obtenidas se empleó la técnica de imagen por campo claro (BF).

Asimismo, las imágenes obtenidas con MET se analizaron con el software ImageJ, en el que se realizaron 90 mediciones del diámetro de las fibras individuales de la muestra de NC.

3.8.5 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Las muestras obtenidas mediante el tratamiento de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática se almacenaron previamente en tubos de centrifuga de 50 mL (15 mL de solución en seis tubos) y se congelaron a -20°C durante 3 días. Posteriormente, los tubos de centrifuga se colocaron sin tapa en un liofilizador de laboratorio VirTis Freezemobile 25XL (Figura 3.13) con condiciones de -150°C a 500 mT durante 3 días. El material obtenido se separó con pinzas para mejorar su lectura previa en el equipo de caracterización.

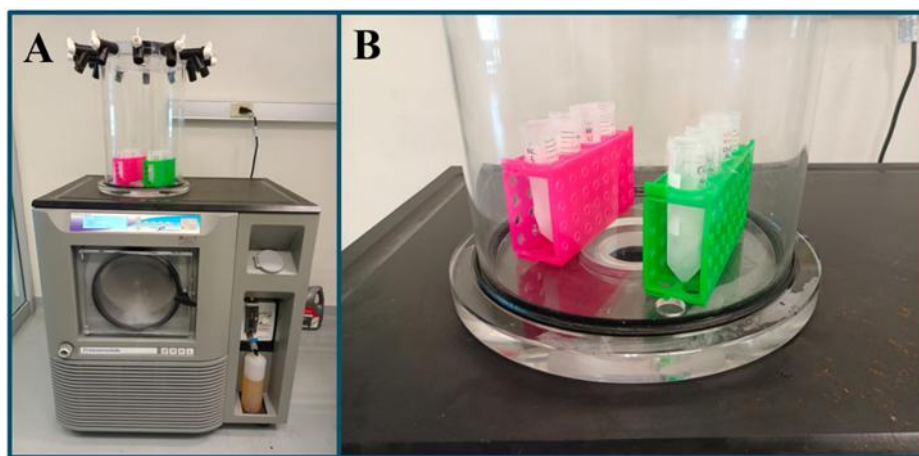


Figura 3.13. Equipo de liofilizado (A) y muestras de NC control y post enzima (B).

La caracterización por RMN de la NC se obtuvo a 23°C en un espectrómetro Bruker Avance III de 500 MHz, el cual se encuentra equipado mediante una sonda sólida que opera en el ángulo mágico y utiliza rotores de circonio de 4 mm con tapas de turbina Kel-F, con un tubo de relajación de $D_1 = 4$ ms y un tiempo de contacto de 2.82 ms. Las muestras de celulosa se colocaron en los rotores y se hicieron girar a 10 kHz. Los experimentos de polarización cruzada de ^{13}C se adquirieron a 125,55 MHz y los espectros se referenciaron externamente al estándar de adamantino (δ 38.5 ppm). Las condiciones de optimización de Hartmann-Hahn se lograron ajustando los tiempos de contacto a una potencia CP de 85 W para el canal de carbono.

Los resultados obtenidos se analizaron y graficaron con el software OriginPro, y se elaboraron curvas de deconvolución de los espectros empleando un ajuste de líneas mediante la función de Lorentz.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la *M. Pyrifera* se obtuvo consecutivamente tres materiales básicos, siendo estos el fucoidan (polvo y películas delgadas), alginato de sodio/calcio (solución, polvo, películas delgadas, esferas secas y húmedas) y NC (solución y películas delgadas); mientras que, como materiales avanzados se obtuvo NC post enzima (solución y películas delgadas). Para cada material se realizó un análisis riguroso mediante una o varias técnicas de caracterización previamente explicadas en este documento, junto con su preparación, con el fin de determinar su composición y morfología.

Se replicó al menos cinco veces la experimentación con los valores estandarizados para validar y asegurar la reproducibilidad de la metodología. Por otro lado, se llevaron a cabo tres experimentos para determinar los porcentajes de rendimiento de los elementos aislados (ver Anexo 4), haciendo uso de las ecuaciones presentadas y obteniendo los siguientes porcentajes de rendimiento, partiendo de la materia prima (control) y expresados en porcentaje en masa sobre una base seca:

- ✓ Fucoidan $\approx 40\%$
- ✓ Alginato $\approx 50\%$
- ✓ Nanocelulosa $\approx 10\%$

En la Figura 4.1 se presentan dos de los materiales básicos previamente indicados. Ambos materiales se obtuvieron en la fase de pretratamiento del alga y se conservaron en distintas presentaciones. Por ejemplo, en la Figura 4.1B se revelan tres películas de fucoidan a diferentes concentraciones, las cuales se obtuvieron mediante distintos lavados del alga mediante centrifugado y, a su vez, polvo obtenido mediante la molienda/pulverización de las mismas películas elaboradas. Dependiendo de su concentración, las películas presentan distintos niveles de transparencia y fragilidad, observando que a mayor concentración las

películas son opacas y se fracturan con facilidad, mientras que, por el contrario, estas se vuelven menos frágiles e incluso poseen cierta transparencia (Figura 4.1A).

Por el contrario, la Figura 4.1D y F poseen imágenes relacionadas con el alginato de calcio y sodio respectivamente, en donde este último, posee una transparencia mayor que las películas de fucoidan obtenidas. De la misma forma, algunas de las películas de alginato de sodio mostraron mayor fragilidad y opacidad; no obstante, estos resultados se deben a residuos de fucoidan en el alginato durante el centrifugado, lo que afecta sus propiedades.

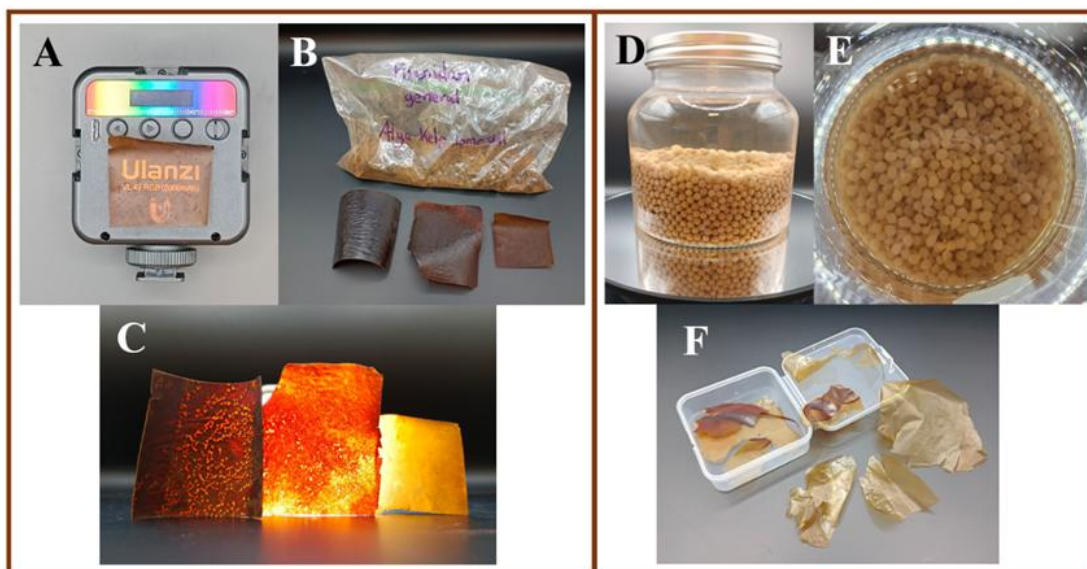


Figura 4.1. Muestras de la transparencia/opacidad del fucoidan (A y C) y sus presentaciones en polvo y películas (B). Esferas de alginato de calcio (D y E) y películas de alginato de sodio (F) obtenidas durante el pretratamiento del alga.

A su vez, se almacenaron muestras de las soluciones del primer y segundo lavado, mediante centrifuga, tanto del fucoidan como del alginato de calcio extraídos. Su diferencia de concentración se aprecia mejor en la Figura 4.2, donde se resalta un contraste de color entre las cuatro muestras tomadas.



Figura 4.2. Comparación de las distintas concentraciones de fucoidan y alginato. Residuos obtenidos del primer y segundo lavado del fucoidan y el alginato de sodio respectivamente (de izquierda a derecha).

Posterior al tratamiento de hidrólisis ácida y neutralización, se obtuvieron películas de NC (Figura 4.3), con las cuales se obtuvo un nivel de transparencia considerable, indicando de esta forma que la remoción de sales e impurezas fue eficiente a simple vista.



Figura 4.3. Demostraciones de transparencia de distintas películas de NC. Ejemplo en un fondo de color (A) y a blanco y negro (B).

De igual importancia, en la Figura 4.4 se observa la comparación entre la NC obtenida mediante la combinación de hidrólisis ácida y enzimática (izquierda) y la NC obtenida únicamente mediante hidrólisis ácida. Este comportamiento de dispersión de las fibras de la NC en un medio acuoso reveló una notable diferencia con respecto a la tendencia de flotación entre la NC original y la NC post-enzima.



Figura 4.4. NC en medio acuoso, tratamiento post-enzima (izquierda) y original (derecha).

Se observó que las fibras de la NC tratada con endoglucanasa son propensas a ascender y mantenerse estables, flotando incluso persistentemente después del reposo. En cambio, la NC sin tratamiento enzimático mostró una tendencia a sedimentarse en el fondo.

Estos resultados se atribuyen a su reducción significativa en la longitud y peso molecular de las fibras, el cual es una consecuencia directa del uso enzimático por romper los enlaces de la NC. Las fibras cortas exhiben una morfología menos densa que resulta en un aspecto clave en la flotación. Más adelante, se dará a conocer de manera más puntual la morfología de ambas.

Además, el uso del NMR requirió de una muestra sólida, por lo que una muestra de las soluciones previas se secó mediante liofilizado para ser caracterizadas (Figura 4.5).

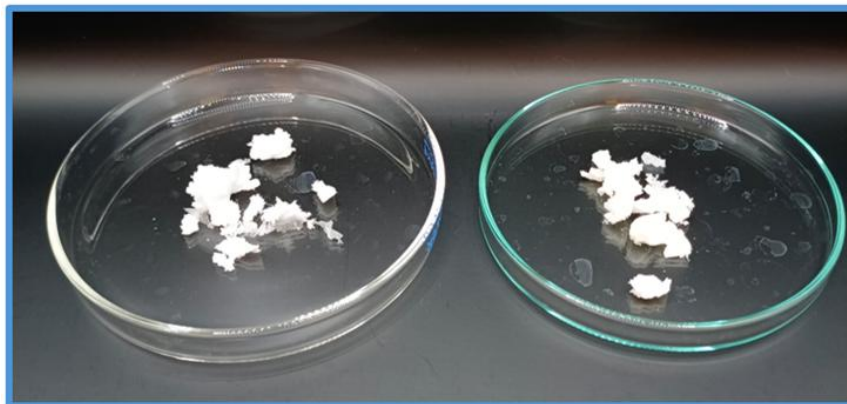


Figura 4.5. NC mediante liofilización, post-enzima y original (de izquierda a derecha).

4.1 Determinación de grupos funcionales mediante espectroscopía FTIR

Mediante esta técnica se confirmó la estructura química de la NC aislada de *M. Pyrifera*, así como se validó la remoción de componentes no celulósicos (fucoidan y alginato) para comprobar la eficacia del proceso de purificación y la adecuada obtención de la NC. En la Figura 4.6 se presentan los resultados obtenidos mediante este método, en los que el espectro de la NC-HA (NC obtenida mediante hidrólisis ácida) exhibió las bandas de absorción clave que confirman la naturaleza celulósica del material, en concordancia con el espectro de la celulosa comercial (Sigma Aldrich) de referencia. La banda ancha e intensa entre 3335 cm^{-1} (NC) y 3336 cm^{-1} (celulosa comercial) es característica del estiramiento del grupo -OH la cual evidencia los múltiples grupos hidroxilo y la fuerte presencia de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares en la estructura [37].

Adicionalmente, el pico alrededor de $2900\text{-}2925\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a la vibración de tensión del C-H alifático de los anillos de pirano, confirmando la estructura fundamental del esqueleto de carbohidratos [38]. En la región de bajas frecuencias, se observaron las vibraciones características de los enlaces de la celulosa, por ejemplo, en las bandas en 1160 cm^{-1} y 1050 cm^{-1} se asocian a las vibraciones de estiramiento asimétrica y simétrica, respectivamente, de los grupos C-O-C y C-O. De particular relevancia, el pico en 898 cm^{-1} es el indicador clave del enlace $\beta\text{-}1,4$ glucosídico, el cual define la estructura principal de la celulosa [39], confirmando que la integridad del polisacárido no se vio comprometido

durante el proceso de estructuración. Además, la presencia de una señal definida en 1430 cm^{-1} se relaciona con la vibración de flexión del CH_2 sensible a la cristalinidad [39], sugiriendo una alta proporción de regiones cristalinas en la celulosa comercial, la cual no es evidente en la NC obtenida. El espectro NC-E corresponde a la NC tratada mediante vía enzimática, la cual presenta los mismos grupos funcionales que la muestra NC-HA con bandas con mayor definición en los picos 3509 y 3390 cm^{-1} , lo cual sugiere una redistribución en la red de puentes de hidrógeno tras la hidrólisis enzimática [40]. De la misma forma, el pico en 2925 cm^{-1} es más prominente en ambas NC que en la celulosa comercial, lo que puede indicar una mayor exposición de los grupos alifáticos debido al incremento del área superficial por el tratamiento enzimático [40].

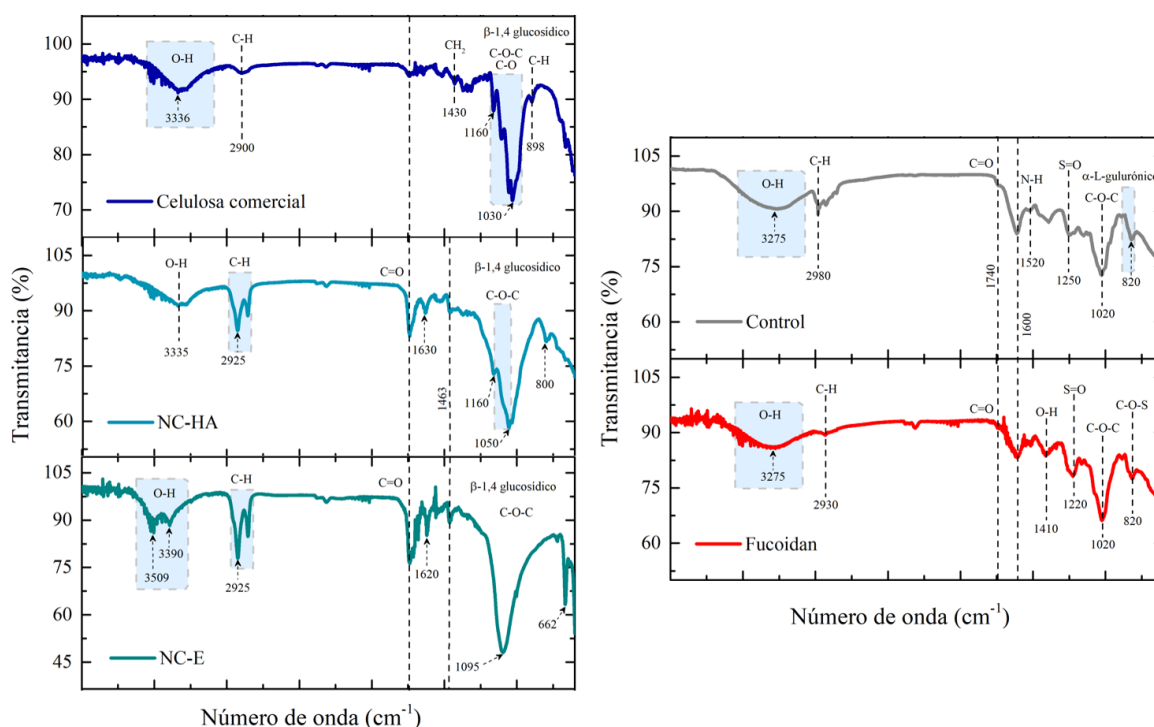


Figura 4.6. Resultados de espectros FTIR en la región $600\text{ cm}^{-1} - 4000\text{ cm}^{-1}$ de la celulosa comercial y la NC aislada de la *M. Pyrifera* comercial.

Por otra parte, en la misma Figura 4.6 se presenta la comparación con el material de control (material comercial de kelp) y el fucoidan de referencia fue fundamental para evaluar la pureza de la NC. La muestra control mostró señales de grupos sulfato en 1250 cm^{-1} y una señal débil en 1520 cm^{-1} , asociada a las vibraciones de flexión del enlace N-H (Amida II),

presentes debido al contenido proteico de las algas pardas [42], lo cual no se evidencia en las muestras de NC comerciales y aisladas mediante la experimentación propuesta. Ambas señales son fundamentales para refutar una remoción parcial de elementos no deseados de la NC. El fucoidan, un polisacárido sulfatado abundante en las algas pardas, presenta señales diagnósticas fuertes en 1220 cm^{-1} (vibración de tensión S=O de los grupos sulfato) y en 820 cm^{-1} (asociada a C-O-S) [40]. Es crucial notar que el espectro de la NC no presentó absorción significativa en ninguna de estas dos regiones, lo que demuestra la disminución parcial o incluso la eliminación completa exitosa del fucoidan y la reducción del contenido de azúcares sulfatados en la matriz del alga marina. Respecto a la pureza, se observó un pico de intensidad media en 1740 cm^{-1} en la NC, atribuible a trazas residuales de C=O (posiblemente de ácidos carboxílicos/ésteres o remanentes mínimos de hemicelulosa). No obstante, la intensidad drásticamente reducida de este pico en comparación con el material de control y el fucoidan es un indicador positivo de la alta pureza lograda tras el aislamiento.

Con estos espectros se confirma la identidad celulósica y, de manera crucial para esta fuente biológica, se valida la efectividad de los tratamientos de purificación empleados en esta investigación.

4.2 Mapeo y análisis de espesor de las láminas de NC mediante CLSM

Antes de realizar una prueba destructiva de caracterización o recubrir con oro la muestra, se realizó un estudio sobre la distribución espacial de la NC mediante CLSM, con la cual se obtiene una visualización tridimensional y no destructiva de la estructura del material.

Se ha comprobado mediante el microscopio óptico (MO) que existe una interferencia óptica debido a los diferentes índices de refracción del sustrato y muestra (láminas de NC), la cual produce una gama de colores bajo la luz blanca del microscopio, teniendo un comportamiento similar al descubrimiento de Geim y Novoselov en 2004 al lograr visualizar el grafeno [41, 42].

Con el uso exclusivo del MO se ha estimado que el espesor se puede determinar fácilmente, sin necesidad requerida de técnicas más complejas que comprometan el cambio estructural del material, y a su vez, determinar si la experimentación se realizó de manera satisfactoria. En la Figura 4.7A, se muestra una lámina individual de NC, en donde a su vez se aprecian diversos colores que se relacionan con un espesor en específico (nm), mientras que en la Figura 4.7B es la vista mediante el LSM.

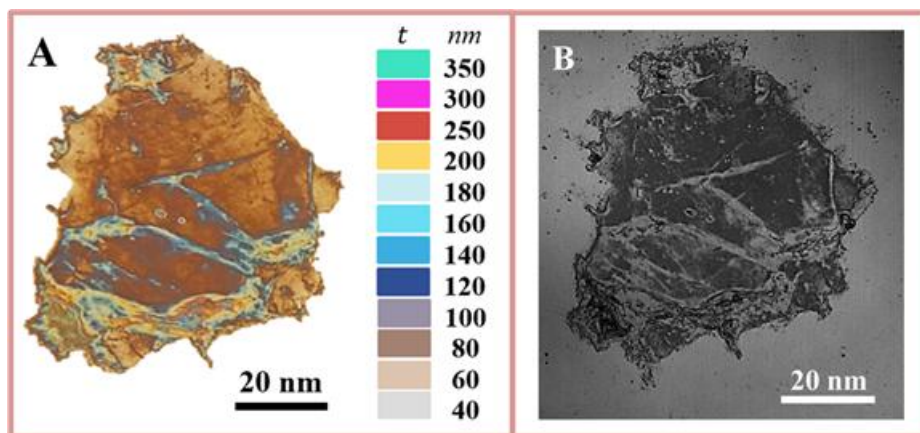


Figura 4.7. Lámina individual de NC vista desde el MO con escala a color (A) y vista en el LSM (B).

Esta técnica facilitó la evaluación de la topografía superficial y el grosor de las nanoláminas encontradas en un rango de espesor entre 90 hasta 200 nm aproximadamente para el primer caso mostrado.

Por otro lado, en la Figura 4.8 se presentan los resultados de la lámina individual (A y B) y con adición de enzimas (C y D). Para este caso se midió la lámina individual de cada una, siendo el largo (eje Y) y ancho (eje X) aproximados de las dos láminas respectivas, obteniendo los siguientes datos:

- ✓ Figura 4.8A,B – corresponde a 100.81 μm de largo por 74.53 μm de ancho.
- ✓ Figura 4.8C,D – corresponde a 85.34 μm de largo por 61.17 μm de ancho.

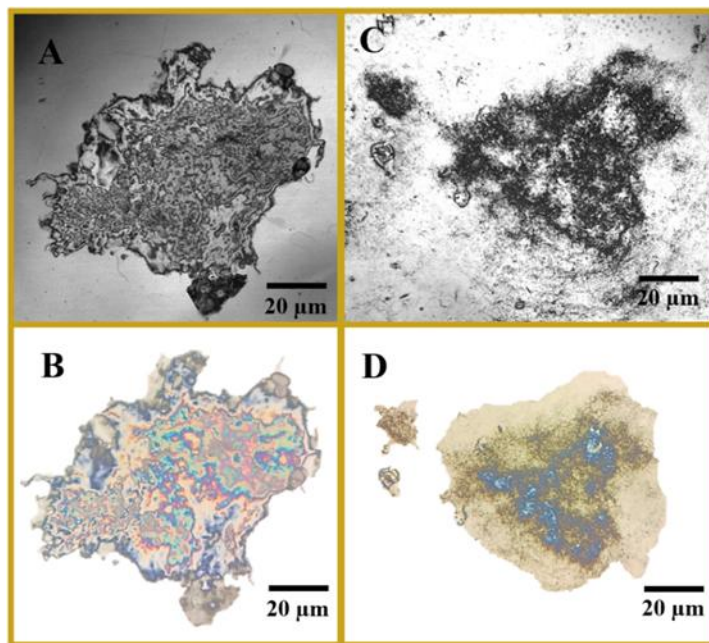


Figura 4.8. Láminas individuales de NC pre (A y B) y post enzima (C y D) vista desde LMS y el MO (de arriba abajo).

Al comparar ambas láminas se puede suponer, sin necesidad de un equipo avanzado de caracterización, cómo la endoglucanasa logró romper en poco tiempo (72 h) los enlaces β -1,4 glicosídicos que conforman a la NC, esto de manera aleatoria para observar detalladamente las fibras que conforman a una lámina. A su vez, una diferencia notoria al exponer la NC a la enzima, es el cambio de colores, notándose en su mayoría el azul, encontrándose en el rango de 120 nm aproximadamente, un valor más bajo que la NC obtenida exclusivamente mediante hidrólisis ácida.

Mediante estos resultados se puede deducir que en consecuencia del tratamiento pre y post enzima, se siguen obteniendo láminas de NC, es decir, regiones planas conformadas por una gran cantidad de fibras.

Como se mencionó en el capítulo 3, la NC se encuentra en un sustrato (oblea de silicio), en la cual se encuentran diversas láminas individuales (Figura 4.9), teniendo una superficie mayormente limpia y libre de sales o alguna otra impureza. La selección de

múltiples imágenes permite documentar que el proceso de hidrólisis provoca una fragmentación no homogénea del material. La presencia de láminas con geometrías y tamaños disímiles sugiere que la concentración del ácido y el tiempo de exposición afectan la degradación del material, resultando en las cuatro láminas presentadas en la Figura 4.8 y 4.9, las cuales pertenecen a un mismo sustrato.

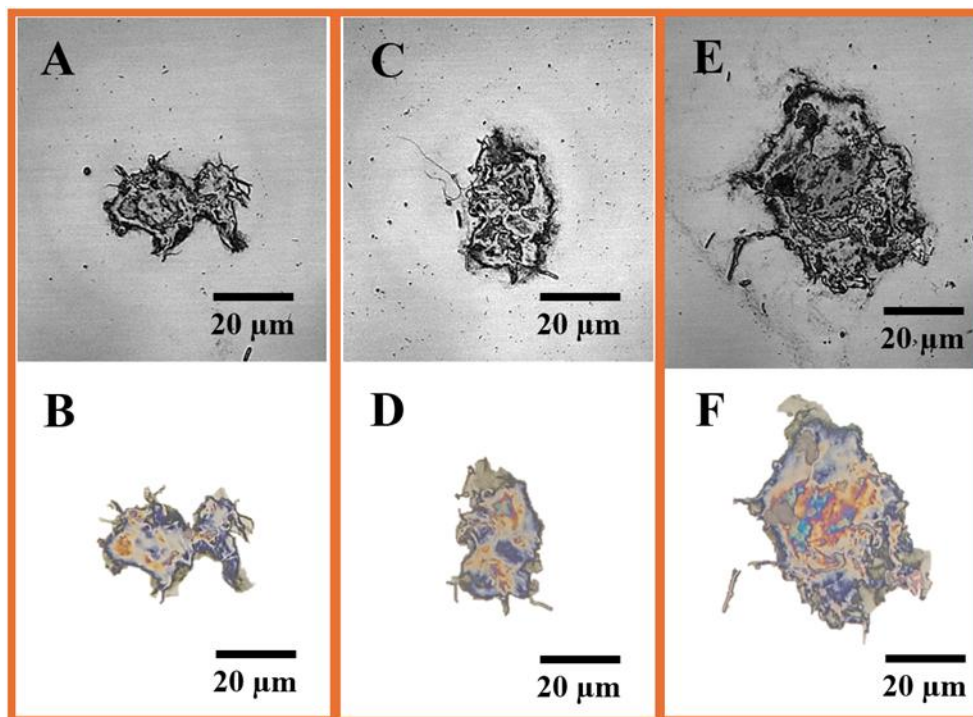


Figura 4.9. Láminas individuales de NC pre-enzima, vista desde LMS y el MO (arriba y abajo respectivamente).

Se realizaron seis mediciones en total, de las cuales la mitad corresponde al largo y la otra mitad al ancho de las láminas presentadas en la Figura 4.9. En la Tabla 4.1 se muestran estas mediciones, en las que se observó una mayor variedad de formas y tamaños debido al tratamiento aplicado.

Lámina	Largo	Ancho
AB	25.61 μm	37.58 μm
CD	42.34 μm	21.83 μm
EF	59.83 μm	46.57 μm

Tabla 4.1. Medidas de las láminas NC individuales pre-enzima.

No obstante, tanto en la Figura 4.8CD y la Figura 4.10, no se logra observar un comportamiento similar, ya que, al ser tratada con la enzima, las fibras se liberan y cubren la mayor parte del silicio, mostrándose una gran cantidad de superficies oscuras y grises en el fondo.

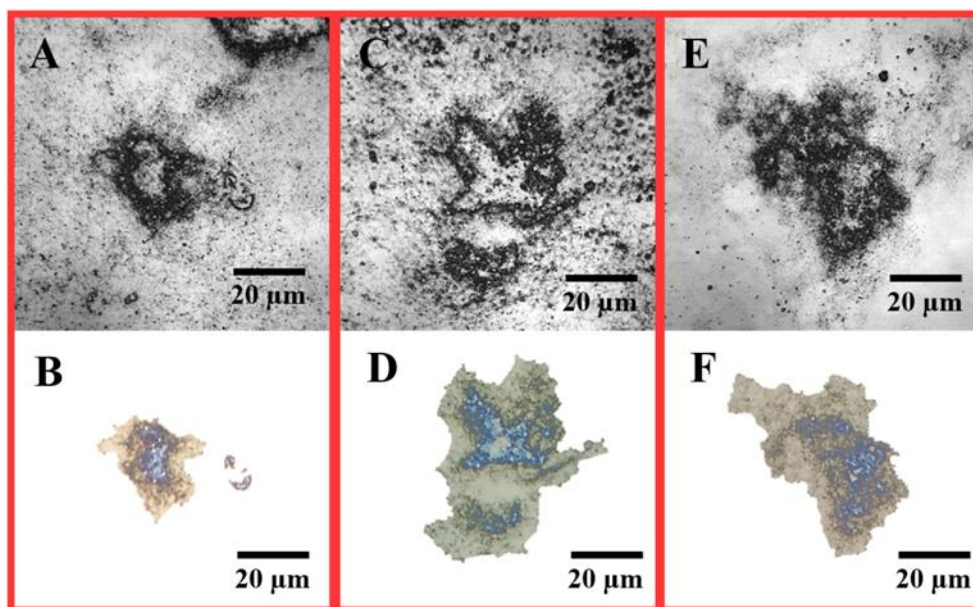


Figura 4.10. Láminas individuales de NC post-enzima, vista desde LMS y el MO (arriba y abajo respectivamente).

De la misma forma, se obtuvieron seis mediciones para determinar el largo y el ancho de las tres láminas observadas en la Figura 4.10. En la Tabla 4.2 se muestran las medidas correspondientes, tomando como referencia sus bordes nítidos para delimitarla sin considerar las fibras sueltas.

Lámina	Largo	Ancho
AB	17.79 μm	9.80 μm
CD	32.37 μm	26.32 μm
EF	48.81 μm	29.54 μm

Tabla 4.2. Medidas de las láminas NC individuales post-enzima.

Estos resultados serán discutidos en la sección de MEB y MET.

4.3 Caracterización morfológica de las láminas de NC mediante MEB

En la Figura 4.11 se muestran dos micrografías que corresponden a una muestra de NC depositada sobre una rejilla para MET. En ambas se puede apreciar una parte de la estructura laminar de la NC, estando compuesta por fibras entrelazadas entre sí. Para la Figura 4.11 se midió el diámetro de 40 fibras. En la Figura 4.11B se puede visualizar con mayor nitidez el diámetro de las fibras, las cuales tienen un rango de entre 5 hasta 15 nm, mientras que el largo de estas varía en consecuencia al tratamiento aplicado, resultando en nanofibras cortas o largas, las cuales, a su vez, toman un comportamiento distinto con respecto a su longitud. La celulosa al ser un material con baja densidad, las nanofibras de menor longitud tienden a flotar o, por consiguiente, permanecen estables en una suspensión (agua desionizada) por mayor tiempo, mientras que las de longitud mayor tienen de aglomerarse en el fondo, así como se observa en la Figura 4.11.

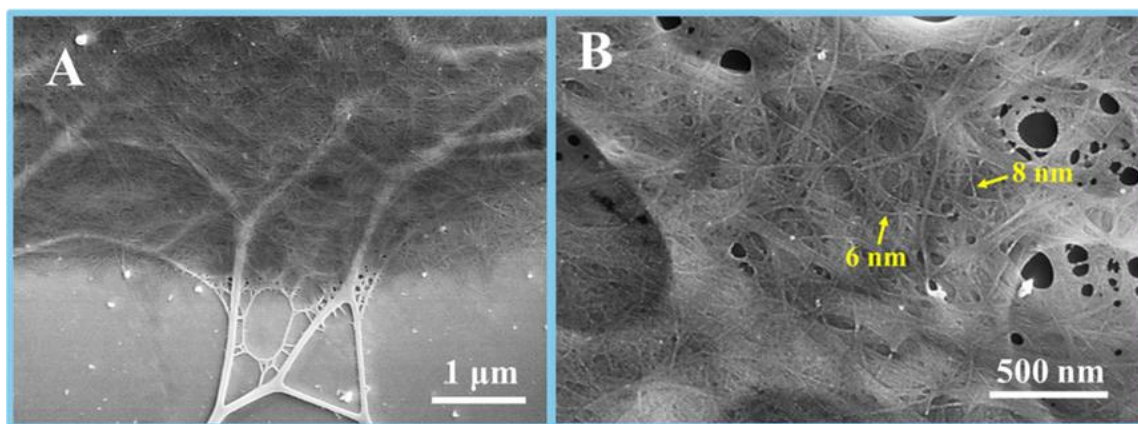


Figura 4.11. Micrografías MEB de las fibras de NC (obtenidas mediante hidrólisis ácida) en una rejilla de MET a 20,000x (A) y 50,000x (B).

La evaluación morfológica de NC obtenida tras el tratamiento enzimático se realizó con la micrografía de la Figura 4.12A, en donde se destacan fibras individuales con diámetros que se aproximan a los 10 nm. Esta morfología resultó en consecuencia del efecto de la endoglucanasa en la estructura de la NC, en donde se indujo una fragmentación controlada de las fibras que durante la hidrólisis ácida se encontraban aglomeradas para formar láminas de celulosa. Este acomodo de fibras reduce la superficie de contacto, obteniendo una dispersión más estable y homogénea. Al aumentar la magnificación (Figura 4.12B), las fibras se vuelven más nítidas, permitiendo observar las fibras que conforman la

lámina fragmentada de la NC post enzima, así como la visualización de restos inactivos de la enzima (secciones esféricas blancas).

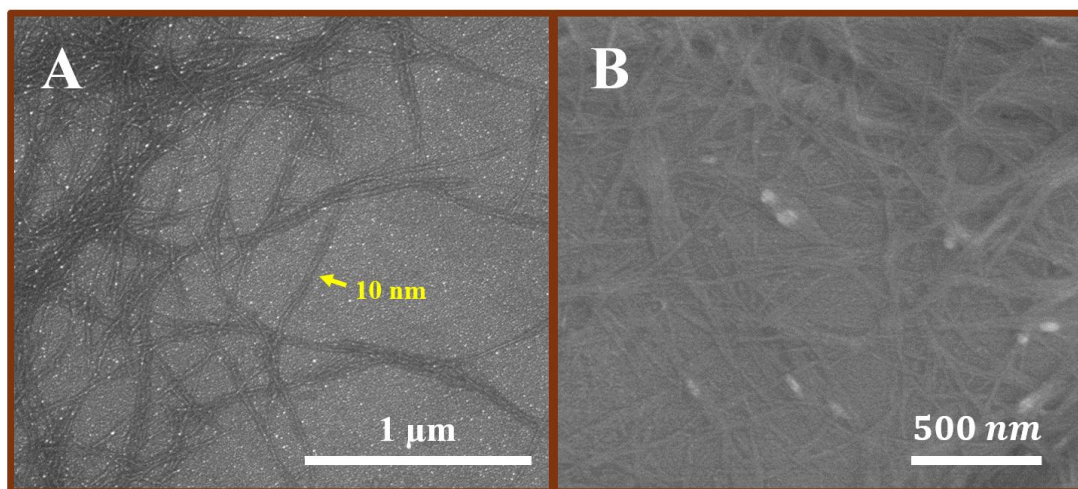


Figura 4.12. Micrografía MEB de NC post enzima en una placa de silicio a 30,000x (A) y 40,000x (B).

Las imágenes de LMS presentadas en la sección anterior permiten observar la formación de agregados laminares a escala micrométrica, mientras que las micrografías de MEB revelan la morfología de las láminas que los conforman. La heterogeneidad detectada mediante LMS en la muestra NC-HA, junto con la apariencia fragmentada observada en MEB, indica un ataque agresivo, pero irregular, del ácido sobre la biomasa de *M. Pyrifera*. Mientras que a escala micrométrica predominan láminas grandes e irregulares con bordes definidos, el análisis por MEB evidencia una superficie erosionada y un marcado proceso de deslaminación. Este fenómeno sugiere que la hidrólisis ácida penetra en las capas de la pared celular, rompiendo las interacciones intermoleculares y provocando el desprendimiento de láminas de distintos tamaños.

En contraste, la morfología de la NC-E presenta una organización estructural distinta tanto a escala micrométrica como a escala nanométrica. Las imágenes de LMS revelan una red de agregados con una apariencia más ramificada y menos compacta que los observados en la muestra de NC-HA, sugiriendo una mayor interacción entre las unidades estructurales. Al analizar estas muestras mediante MEB, se sugiere que el tratamiento enzimático

promueve un proceso de desfibrilación progresiva de la NC. A diferencia de la deslaminación irregular provocada por el ácido, la endoglucanasa permite separar las fibras a lo largo de su eje longitudinal. Esta transición de escalas implica la suposición de que la hidrólisis enzimática es un método más conservador y eficiente para obtener arquitecturas fibrilares individuales y homogeneidad superficial.

4.4 Visualización y determinación de las dimensiones nanométricas mediante MET

Para complementar la caracterización estructural, en la Figura 4.13 se presenta una imagen de MET utilizada para determinar con mayor precisión las dimensiones nanométricas de las fibras, así como para obtener una mayor resolución de las láminas que las conforman. Al comparar los resultados de esta sección con los del MEB, se observa una diferencia significativa en la resolución, lo que permite una visualización clara de la composición de las láminas de NC obtenida mediante hidrólisis ácida. La imagen revela una morfología bien definida, pero con diferentes tamaños de láminas, lo cual es característico de una NC amorfa.

Mediante el análisis y la medición de por lo menos 30 fibras (90 mediciones para la elaboración del histograma), se realizó una distribución estadística con las dimensiones obtenidas. Se encontró que el diámetro promedio de estas fibras es de 3.57 ± 0.07 nm, no obstante, se puede apreciar en el acercamiento de la Figura 4.13A que una fibra individual presenta secciones lineales dentro de ella, estas corresponden a su estructura molecular conformada por su larga cadena de moléculas de D-glucosa unidas entre sí, determinando un espacio de 0.3 nm entre sí.

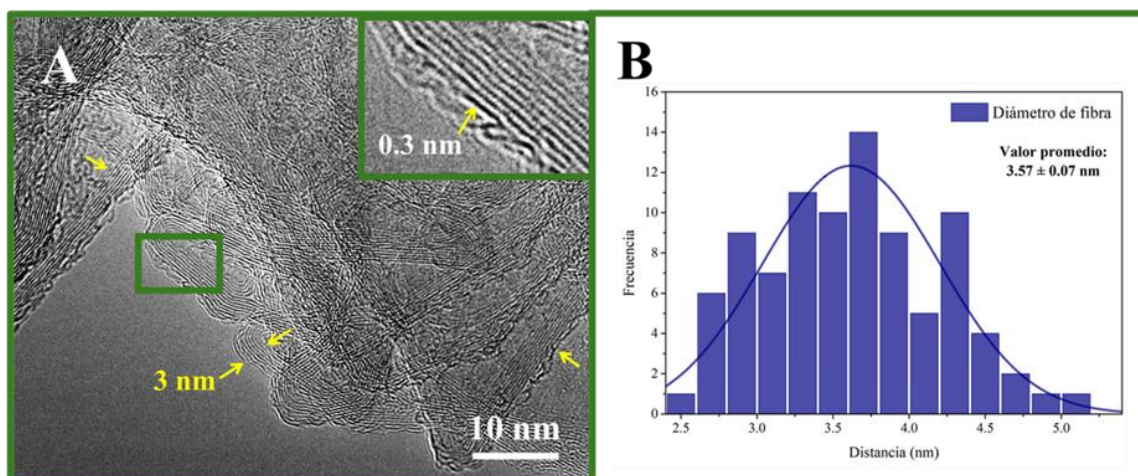


Figura 4.13. Micrografías MET de la estructura fibrilar de la NC (A) y distribución del diámetro de las fibras (B).

4.5 Cuantificación de la cristalinidad mediante RMN

Esta técnica de espectroscopía se realizó para determinar la cristalinidad de la NC. En el segundo espectro obtenido de la Figura 4.14 se confirma la estructura de la celulosa mediante la asignación de corrimientos químicos (δ) a los carbonos del anillo de glucosa (pirano). Se pueden observar específicamente, que la señal en $\delta \approx 104.85$ ppm se asigna al carbono anomérico (C_1); las señales en $\delta \approx 74.6$ ppm corresponden a los carbonos secundarios del anillo ($C_{2,3,5}$); $\delta \approx 83.85$ ppm se atribuye al carbono (C_4); y $\delta \approx 62.86$ ppm al carbono terminal (C_6). La coherencia de estos valores con los datos reportados para la celulosa valida la identidad del polisacárido aislado del alga marina [43]. Además de la identificación estructural, el espectro es crucial para el análisis de la cristalinidad de la NC (Figura 4.14), ya que se observa una resolución de picos en las señales C_4 y C_6 , indicando la coexistencia de regiones morfológicas distintas. Los componentes más estrechos (a mayores δ) en los picos C_4 $\delta \approx 89$ ppm y C_6 $\delta \approx 65$ ppm se atribuyen a los dominios cristalinos de la celulosa (Celulosa I), mientras que los componentes más anchos, ubicados a $\delta \approx 83.85$ ppm C_4 y $\delta \approx 62.86$ ppm C_6 , se asignan a las regiones amorfas o las superficies expuestas [43]. Esta diferencia permite el cálculo del índice de cristalinidad (ICr) y sugiere que la NC obtenida posee un alto grado de organización estructural, junto con regiones amorfas accesibles para posibles modificaciones químicas o funcionales.

La cristalinidad se determinó utilizando la región C₄ del espectro [43]. El ICr se calcula mediante la relación entre el área de la región cristalina (87-93 ppm) y el área total (80-93 ppm). Las curvas de deconvolución (Anexo 5) se obtuvieron mediante el programa Origin (Figura 4.14).

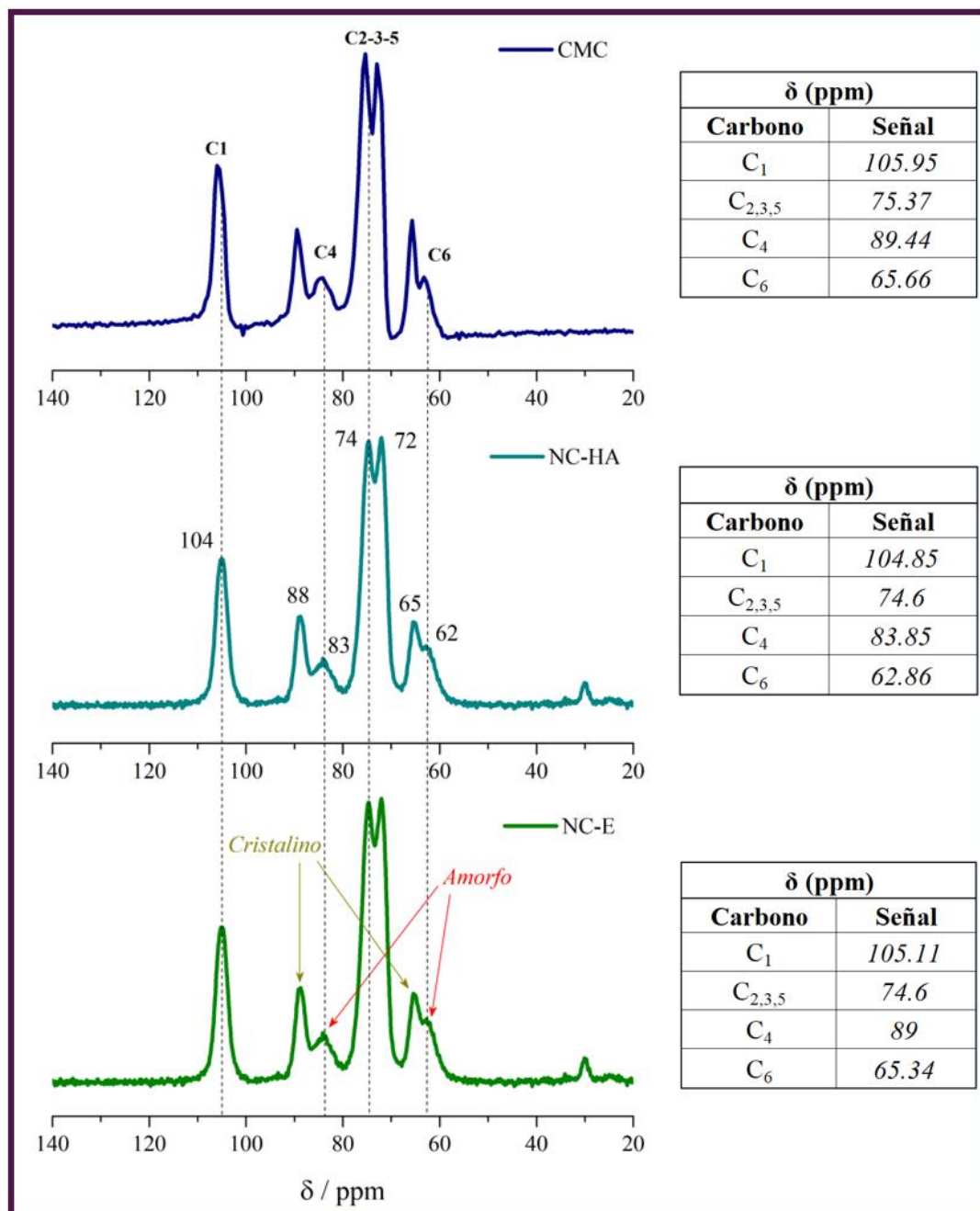


Figura 4.14. Comparación de los resultados de RMN de CMC liofilizada y de muestras de NC obtenidas mediante hidrólisis ácida (NC-HA) y posterior tratamiento enzimático (NC-E). Asignación de los corrimientos químicos característicos a las regiones cristalinas y amorfas de los espectros obtenidos.

A su vez, en la misma figura se observan otros dos espectros obtenidos. El espectro de la parte superior corresponde a una muestra liofilizada de carboximetilcelulosa (CMC) comercial de la marca Sigma Aldrich. Se puede apreciar la similitud entre el espectro de CMC y NC-HA, permitiendo confirmar la identidad química y pureza de la NC aislada a partir de la *M. Pyrifera* en comparación con la CMC.

El ligero desplazamiento entre ambos espectros da lugar a una ligera variación de valores que en Origin permiten calcular el ICr con los datos de la señal carbono C4 y la función Lorentz en el programa ya mencionado (ver Anexo 5), obteniendo que para la muestra CMC se tiene un ICr de 57.3, mientras que para la muestra de NC-HA aislada es de 65.7. Con esta información se puede deducir que el proceso de hidrólisis ácida resultó eficiente para obtener un nivel de pureza ligeramente superior a la CMC comercial, logrando remover fracciones amorfas y otros polisacáridos de la pared celular del alga.

En el análisis del tercer espectro (NC-E) se identificaron cambios sutiles pero determinantes en los desplazamientos químicos de los carbonos C4 y C6 al compararlo con la NC-HA. La mayor definición de la señal de C4 cristalino (~89 ppm) es consistente con el valor de ICr de 66.2 obtenido mediante la deconvolución de picos. Este resultado, ligeramente superior al de la hidrólisis ácida, sugiere que el complejo enzimático actuó preferentemente sobre las secciones desordenadas de la NC.

Los resultados presentados demuestran que por sí sola, la hidrólisis ácida es efectiva para la obtención de NC a partir del alga parda *M. Pyrifera*. La caracterización mediante FTIR y NMR confirmó la identidad química del polímero y la eliminación de componentes no celulósicos, lo que permitió obtener un material cuyo orden estructural es comparable al de uno comercial.

Pese a que el proceso de hidrólisis enzimática logra un cambio en la estructura de las fibras de la NC, ese mismo cambio trae en consecuencia el uso de grandes cantidades de muestra para la elaboración de muestras, por lo que consiguientemente, estas mismas que se llegan a formar no logran poseer el peso suficiente debido a la reducción de su densidad efectiva

de la red, consiguiendo que un análisis por NMR resulte ser complicado o, por el contrario, requiera de una mayor cantidad de biomasa para poder llevarse a cabo. Sin embargo, con estos resultados se observa que, mediante la hidrólisis ácida, es posible diseñar materiales nanoestructurados, mientras que con la hidrólisis enzimática se pueden obtener materiales con características funcionales específicas.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

La presente investigación abordó el aprovechamiento de la biomasa de la macroalga *M. Pyrifera* para la obtención de un nanomaterial, enfrentando el reto de eliminar de manera eficiente elementos indeseados como fucoidanos y alginatos. Para ello, se validó una metodología basada en pretratamientos de purificación mediante lavados y centrifugación seguidos de una hidrólisis ácida (H_2SO_4 al 1% y H_2O_2 al 50%) y una hidrólisis enzimática secuencial con endoglucanasa. Este enfoque experimental permitió confirmar la hipótesis planteada, demostrando que la combinación de métodos optimiza las propiedades de pureza y cristalinidad de la NC aislada para la formación de películas transparentes de este material.

Se comprobó que, a pesar de que la NC representa un porcentaje minoritario en la composición de la *M. Pyrifera* ($\approx 10\%$), esta macroalga es una fuente viable para la extracción simultánea de sus componentes. La metodología empleada permitió una separación efectiva de las fracciones, logrando un alto rendimiento en la recuperación de materiales y validando al alga como precursor sustentable, lo cual puede aplicarse a procesos de biorrefinería.

La caracterización mediante FTIR y RMN confirmó que la hidrólisis ácida es un paso fundamental para la eliminación de componentes no celulósicos, como la hemicelulosa y polisacáridos sulfatados. La correspondencia de las señales obtenidas con los estándares de referencia evidenció la alta pureza de la NC. Los resultados sugirieron que la aplicación de la endoglucanasa actúa como un agente de modificación selectivo que ataca preferentemente las zonas amorfas. Este tratamiento incrementó el índice de cristalinidad (ICr) de la NC previamente aislada (de 65.7 tras la hidrólisis ácida a 66.2 mediante la enzima), transformando la morfología laminar generada por el ácido en una estructura de fibras individualizadas, con diámetros controlados entre 5 y 15 nm, según lo observado mediante MEB y MET. Por otro lado, el uso del CLSM permitió identificar una transición morfológica

significativa: mientras que la hidrólisis ácida genera estructuras laminares de diversos tamaños, el tratamiento enzimático facilita la fragmentación de estas láminas para la liberación de fibras individuales

Se concluye que la morfología final del material está intrínsecamente ligada a la selectividad de las variables de hidrólisis presentadas en el trabajo. Mientras que el tratamiento con H_2SO_4 al 1% actúa de forma agresiva, rompiendo la NC en láminas heterogéneas, la incorporación de la endoglucanasa permite fragmentar los bordes de dichas láminas. Esta ruptura dirigida de los enlaces β -1,4-glucosídicos en las regiones desordenadas conduce a una estructura menos densa y más dispersa en medio acuoso, evitando la aglomeración propia de los métodos puramente químicos.

Finalmente, se determinó que la morfología de fibras cortas e individualizadas está relacionada con las propiedades ópticas de las películas obtenidas. Se sugiere que esta organización estructural promueve una mayor uniformidad y una reducción drástica de la opacidad, ya que la alta individualización de las fibras minimiza la dispersión de la luz blanca. Este trabajo no solo proporciona una comprensión de la relación estructura-propiedad, sino que facilita el diseño de biomateriales de alto rendimiento, promoviendo una economía circular al utilizar recursos marinos regionales de manera eficiente.

Capítulo 6

RECOMENDACIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, la metodología para el aislamiento de NC logró asentarse y optimizarse durante su elaboración, sin embargo, se recomienda analizar aplicaciones para los componentes obtenidos, desde la NC hasta el fucoidan. Además, debido a que la NC es un elemento orgánico, es recomendable que durante todo el proceso de extracción se haga uso de guantes y cubrebocas para evitar su contaminación (Figura 6.1), ya que de lo contrario se pueden presentar el crecimiento de hongos que invalidan los materiales aislados.

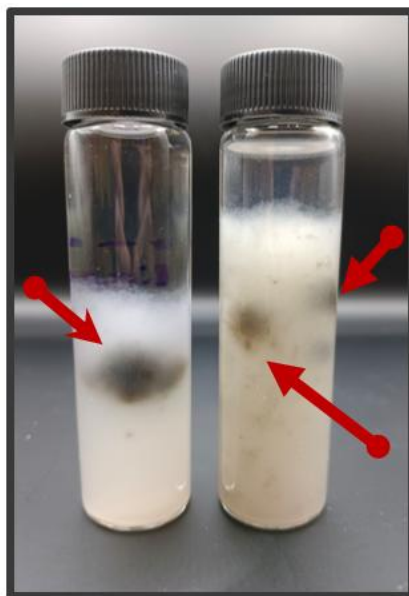


Figura 6.1. Crecimiento de hongos en muestras de NC antes y después de diálisis (derecha e izquierda respectivamente).

El uso de equipo y material contaminado también es un riesgo que se puede presentar si se trabaja con otros materiales, la identificación y clasificación de elementos para el aislamiento de NC también es recomendado.

Por último, durante el proceso de diálisis también existe riesgo de contaminación por dos razones, contenedor o agua desionizada contaminada. Los tubos de diálisis de membrana de celulosa regenerada deben ser utilizados con guantes limpios y desinfectados, por otro lado, el contenedor debe encontrarse limpio y seco previo a su uso. El agua desionizada utilizada para este proceso puede utilizarse posteriormente para otras muestras de diálisis como máximo 3 veces y no más de 20 días. Los restos de NC que se queden en el agua por accidente son susceptibles a ser consumidos por hongos.

Referencias

- [1] Lucía, Á. L. M., Vladimir, M. T. H., & Franklin, J. I. (2019). La nanocelulosa: Una estructura producida por la naturaleza. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/116842?show=full>
- [2] Nanocelulosa, la clave para fabricar papel más resistente y ecológico. (n.d.). <https://nordeste.conicet.gov.ar/nanocelulosa-la-clave-para-fabricar-papel-mas-resistente-yecologico/>
- [3] Pérez, R. H., Castillo, A. Á., Paredes, A. O., & Delgado, A. M. S. (2023). Obtención de nanocelulosa a partir de residuos postcosecha. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 16(30), 1e-47e.
- [4] Tasende, M. G. (2011). Las algas como recurso. Valorización. Aplicaciones industriales y tendencias. ResearchGate. [https://www.researchgate.net/publication/259285610_Las_algas_como_recurso_Valorizaci on_Aplicaciones_industriales_y_tendencias](https://www.researchgate.net/publication/259285610_Las_algas_como_recurso_Valorizaci_on_Aplicaciones_industriales_y_tendencias)
- [5] Leong, S. L., Tiong, S. I. X., Siva, S. P., Ahamed, F., Chan, C., Lee, C. L., Chew, I. M. L., & Ho, Y. K. (2022). Morphological control of cellulose nanocrystals via sulfuric acid hydrolysis based on sustainability considerations: An overview of the governing factors and potential challenges. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(4), 108145. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108145>
- [6] Pérez, R. H., Castillo, A. Á., Paredes, A. O., & Delgado, A. M. S. (2021). Obtención de nanocelulosa a partir de residuos postcosecha. *Mundo Nano Revista Interdisciplinaria En Nanociencia Y Nanotecnología*, 16(30), 1e-47e. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69662>
- [7] Bondeson, D., Mathew, A., & Oksman, K. (2006). Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. *Cellulose*, 13(2), 171–180. <https://doi.org/10.1007/s10570-006-9061-4>
- [8] Celi Suquillo, K. M. (2023). Obtención de hidrogeles de nanocelulosa a partir de fibras de abacá: elaboración de hidrogeles a partir de nanocelulosa de abacá mediante el método de síntesis hidrotermal (Bachelor's thesis, Quito: EPN, 2023.).

- [9] El espejismo de las algas | Heinrich-Böll-Stiftung - Ciudad de México | México y el Caribe. (2023, November 14). Heinrich-Böll-Stiftung - Ciudad De México | México Y El Caribe. <https://mx.boell.org/es/2023/11/14/el-espejismo-de-las-algas>
- [10] Bringloe, T. T., Starko, S., Wade, R. M., Vieira, C., Kawai, H., De Clerck, O., ... Verbruggen, H. (2020). Phylogeny and Evolution of the Brown Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39(4), 281–321. <https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1787679>
- [11] Gaiero, M., Yang, J. S., Goosen, N. J., & De Moura Bell, J. M. (2025). *Macrocystis pyrifera* in the circular economy: advances in cultivation, processing, and industrial integration. *Food and Bioproducts Processing*. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2025.09.020>
- [12] Computer Generated Species Distribution Map. (n.d.). <https://www.sealifebase.se/summary/Macrocystis-pyrifera.html>
- [13] Pérez-Alva, A., Ramírez-Rodrigues, M. A., Baigts-Allende, D. K., Martínez-Jiménez, L. A., & Ramírez-Rodrigues, M. M. (2023). *Macrocystis pyrifera*: A Potential Source of Bioactive Compounds. *Current Nutrition & Food Science*, 20(4), 505–512. <https://doi.org/10.2174/1573401319666230601110804>
- [14] Menandro, P.S., Misiuk, B., Brown, C.J. et al. Multispectral multibeam backscatter response of heterogeneous rhodolith beds. *Sci Rep* 13, 20220 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46240-7>
- [15] Seddiqi, H., Oliaei, E., Honarkar, H. et al. Cellulose and its derivatives: towards biomedical applications. *Cellulose* 28, 1893–1931 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03674-w>
- [16] Castro-Ramos, A., Ramírez-Luna, F., & Susano-Hernández, X. E. (2022). NANOCELULOSA: UN MATERIAL CON POTENCIAL EN EL TRATAMIENTO DE HERIDAS EN LA PIEL. *Deleted Journal*, 1–13. <https://doi.org/10.32399/icuap.rdic.2448-5829.2022.23.823>
- [17] Lv, P., Lu, X., Wang, L., & Feng, W. (2021). Nanocellulose-Based functional materials: from chiral photonics to soft actuator and energy storage. *Advanced Functional Materials*, 31(45). <https://doi.org/10.1002/adfm.202104991>
- [18] Trache, D., Tarchoun, A. F., Derradji, M., Hamidon, T. S., Masruchin, N., Brosse, N., & Hussin, M. H. (2020). Nanocellulose: From fundamentals to advanced applications. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00392>

- [19] Ehman, N. V., Aguerre, Y. S., Vallejos, M. E., Felissia, F. E., & Area, M. C. (2023). Nanocellulose addition to recycled pulps in two scenarios emulating industrial processes for the production of paperboard. *Maderas Ciencia Y Tecnología*, 25. <https://doi.org/10.4067/s0718-221x2023000100438>
- [20] Pérez, R. H., Castillo, A. Á., Paredes, A. O., & Delgado, A. M. S. (2021). Obtención de nanocelulosa a partir de residuos postcosecha. *Mundo Nano Revista Interdisciplinaria En Nanociencia Y Nanotecnología*, 16(30), 1e–47e. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69662>
- [21] Cotas, J., Gomes, L., Pacheco, D., & Pereira, L. (2023). Ecosystem services provided by Seaweeds. *Hydrobiology*, 2(1), 75–96. <https://doi.org/10.3390/hydrobiology2010006>
- [22] Ilyas, R. A., & Atikah, M. S. N. (2021). Production of nanocellulose from sustainable algae marine biomass. In *Seminar on Advanced Bio-and Mineral based Natural Fibre Composites (SBMC2021)*; Institute of Tropical Forestry and Forest Product (INTROP), Universiti Putra Malaysia: Serdang, Malaysia (pp. 1-9).
- [23] Li, Y., Zheng, Y., Zhang, Y., Yang, Y., Wang, P., Imre, B., Wong, A. C. Y., Hsieh, Y. S. Y., & Wang, D. (2021). Brown Algae carbohydrates: structures, pharmaceutical properties, and research challenges. *Marine Drugs*, 19(11), 620. <https://doi.org/10.3390/md19110620>
- [24] Mendoza, J. S., Terán, A. T., Herrera, L. E., Camacho, O. P., & Guerrero, L. C. (2022). Aislamiento de nanocelulosa 2D a partir de la pared celular de *Sargassum* spp. *Química Hoy*, 11(04), 19-27.
- [25] Bogolitsyn, K., Parshina, A., Aleshina, L., Prusskii, A., Tokko, O., Polomarchuk, D., ... & Savrasova, Y. (2024). Nanocrystalline cellulose from Arctic brown algae *Laminaria digitata* and *Saccharina latissima*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 31, 100416.
- [26] Wu, J., Zhu, W., Shi, X., Li, Q., Huang, C., Tian, Y., & Wang, S. (2020). Acid-free preparation and characterization of kelp (*Laminaria japonica*) nanocelluloses and their application in Pickering emulsions. *Carbohydrate Polymers*, 236, 115999.
- [27] Zainuddin, Z., Zaini, H. H. M., & Mohammad-Noor, N. (2021). Preliminary Study on Nanocellulose Production in Local Seaweeds. *International STEM Journal*, 2(1), 36-42.

- [28] Mateu Lozano, L. (2020). Estudio de la posibilidad de obtención de nanocelulosa extraída del alga Posidonea Oceánica para el tratamiento de textiles.
- [29] Rodríguez-Quesada, J., Rodríguez Mora, K., Bernal-Samaniego, C. A., Jirón-García, E. G., & Rojas-Alvarado, C. (2024). Development of Nanocellulose Hydrogels from Sargassum Seaweed as Controlled Nutrient Release Systems and their Application in Germination. *Ecological Engineering & Environmental Technology (EEET)*, 25(11).
- [30] Kim, J. H., Jeong, J. J., & Lee, J. S. (2024). Eco-Friendly Isolated Nanocellulose from Seaweed Biomass via Modified-Acid and Electron Beam Process for Biodegradable Polymer Composites. *Journal of Composites Science*, 8(7), 253.
- [31] Denoeud, F., Godfroy, O., Cruaud, C., Heesch, S., Nehr, Z., Tadrent, N., Couloux, A., Brillet-Guéguen, L., Delage, L., Mckeown, D., Motomura, T., Sussfeld, D., Fan, X., Mazéas, L., Terrapon, N., Barrera-Redondo, J., Petroll, R., Reynes, L., Choi, S., . . . Cock, J. M. (2024). Evolutionary genomics of the emergence of brown algae as key components of coastal ecosystems. *Cell*, 187(24), 6943-6965.e39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.10.049>
- [32] FAO. 2024. Versión resumida de El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024. La transformación azul en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/cd0690es>
- [33] Svenja Heesch, Martha Serrano-Serrano, Josué Barrera-Redondo, Rémy Luthringer, Akira F. Peters, Christophe Destombe, J. Mark Cock, Myriam Valero, Denis Roze, Nicolas Salamin, Susana M. Coelho, Evolution of life cycles and reproductive traits: Insights from the brown algae, *Journal of Evolutionary Biology*, Volume 34, Issue 7, 1 July 2021, Pages 992–1009, <https://doi.org/10.1111/jeb.13880>
- [34] Cepal, N. (2016, July 7). La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe. Objetivos, metas e indicadores mundiales. <https://www.sidalc.net/search/Record/dig-cepal-11362-40155/Description>
- [35] Jiang, S.; Peng, X.; Wu, Z.; Cui, H.; Wei, L.; Shao, G.; Liu, N.; Wei, L. Seaweed residue as a low-cost source for producing cellulose nanofibrils with ultraviolet shielding properties. *RSC Advances* 2025, 15 (39), 32882–32893. <https://doi.org/10.1039/d5ra03784k>.
- [36] Borja, J. (2018). Obtención y caracterización de nanocelulosa a partir de biomasa residual. [Tesis de Maestría, Universidad XYZ].

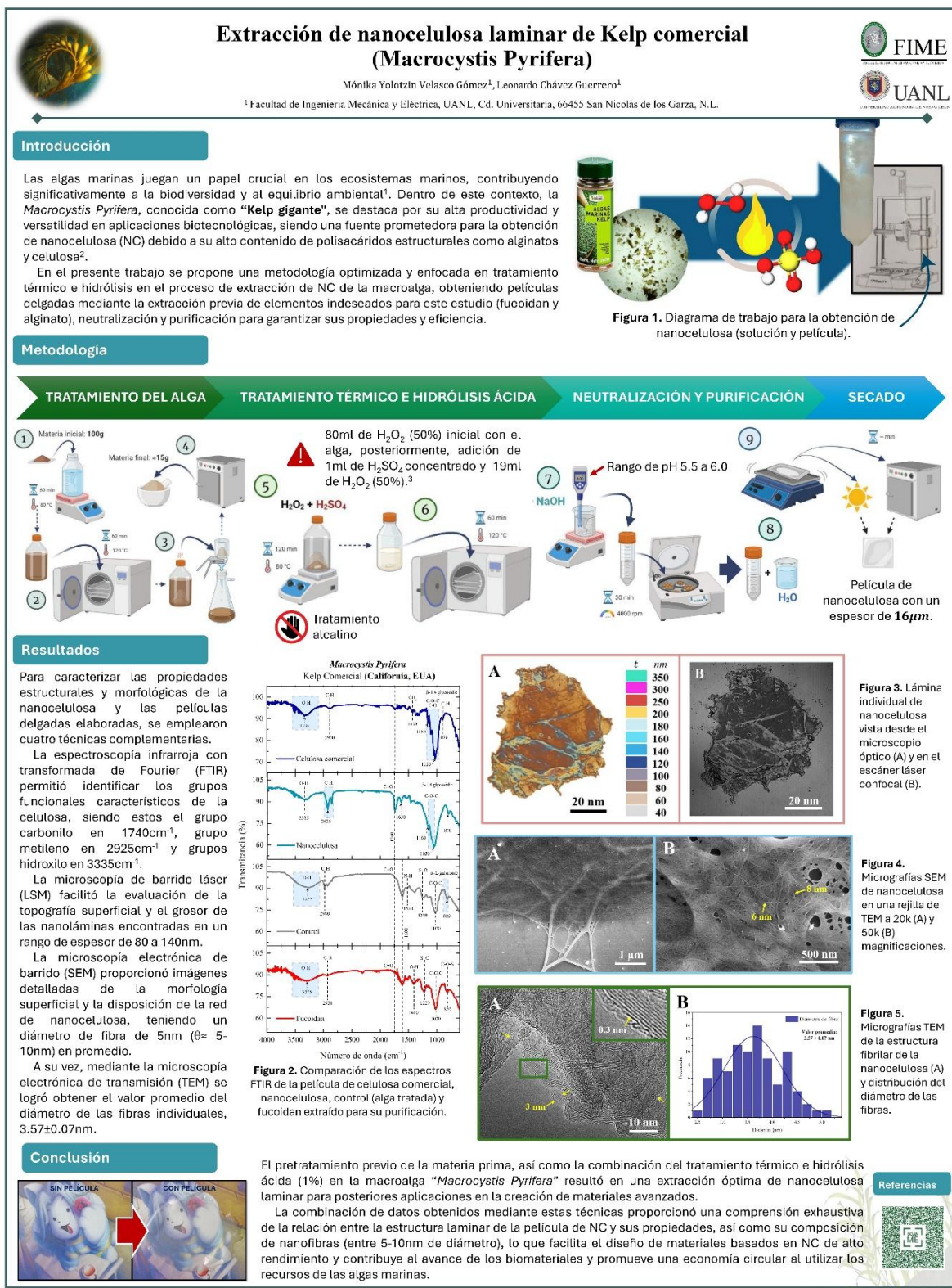
- [37] Lin, N., Dufresne, A. (2014). Nanocellulose in biomedical applications: From basic science to emerging products. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 6(4), 381-408.
- [38] Li, B., et al. (2008). Chemical modifications and structure/activity relationships of fucoidans: A review. *Carbohydrate Polymers*, 72(4), 579-591.
- [39] Niemi, C.; Mortensen, A. M.; Rautenberger, R.; Matsson, S.; Gorzsás, A.; Gentili, F. G. Rapid and accurate determination of protein content in North Atlantic seaweed by NIR and FTIR spectroscopies. *Food Chemistry* 2022, 404, 134700. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134700>.
- [40] Novoselov, K., Geim, A., Morozov, S. et al. Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene. *Nature* 438, 197–200 (2005). <https://doi.org/10.1038/nature04233>
- [41] Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E. et al. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol Biofuels* 3, 10 (2010). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>
- [42] Brisola, J.; Andrade, G. J. S.; De Oliveira, S. A.; Viana, R. M. R.; De Sousa Faria Tischer, P. C.; Tischer, C. A. Covalent immobilization of lipase on bacterial cellulose membrane and nanocellulose. *Materials Research* 2022, 25. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2021-0350>.
- [43] Oh, H., Yoo, D. I., Shin, Y., Kim, H. C. (2005). Crystallinity of cellulose measured by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 340(13), 2374-2379.

Anexo 1

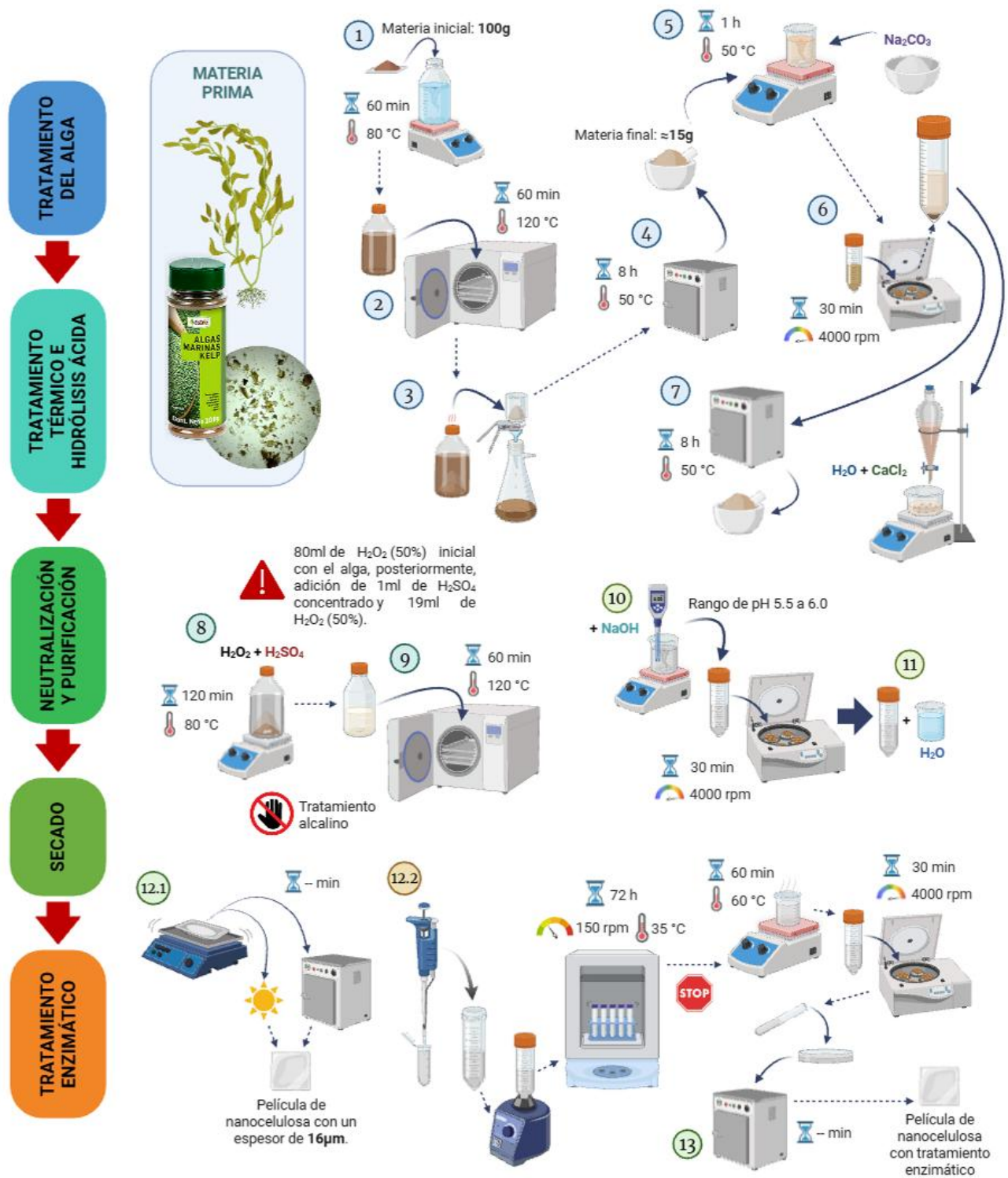
Núm.	Materia prima	Método	Concentración de reactivos	Condiciones	Rendimiento Obtención	Técnicas de caracterización
1	Sargassum spp.	Un solo recipiente Hidrólisis ácida	Hidróxido de sodio Peróxido de hidrógeno (30%) Ácido sulfúrico concentrado (98%) Agua desionizada	70 °C 60 minutos 110 °C autoclave 60 minutos	Obtención de películas transparentes	FTIR, RMN, UV-Vis, microscopía de barrido láser, microscopía electrónica de barrido
2	Laminaria digitata	Hidrólisis ácida	Peróxido de hidrógeno (65%)	45 °C 45 minutos	Alto (sin especificar)	SEM, TEM, XRD, FTIR
3	Sargassum siliquosum	Tratamiento alcalino	4.5% NaOH	80 °C 2 horas	Moderado (sin especificar)	Análisis de cristalinidad
4	Posidonia oceanica	Extracción convencional	Soluciones ácidas Agua caliente	Altas temperaturas por varias horas	-	Análisis químico estructural
5	Chlorella sorokiniana	Extracción química	Peróxido de hidrógeno (65%)	-	Alto (sin especificar)	XRD, FTIR
6	Laminaria japonica	Explosión de vapor	Sin especificar	Altas temperaturas (165-170 °C)	-	FTIR, TGA
7	Sargassum siliquosum	Tratamiento alcalino Hidrólisis ácida	NaOH 45% Peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico	80 °C por 2 horas	Moderado (sin especificar)	Análisis cristalino, XRD
8	Mezcla de algas pardas	Extracción de líquido presurizado	Varios, entre ellos ácido sulfúrico	Alta presión	Alta (sin especificar)	Técnicas de purificación (separación de membranas)
9	Fibra de abaca	Hidrólisis ácida	Peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico	45 °C repetidas veces	Alta (sin especificar)	SEM, AFM

Anexo 2

XXXVIII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD POLIMÉRICA DE MÉXICO



Anexo 3



Anexo 4

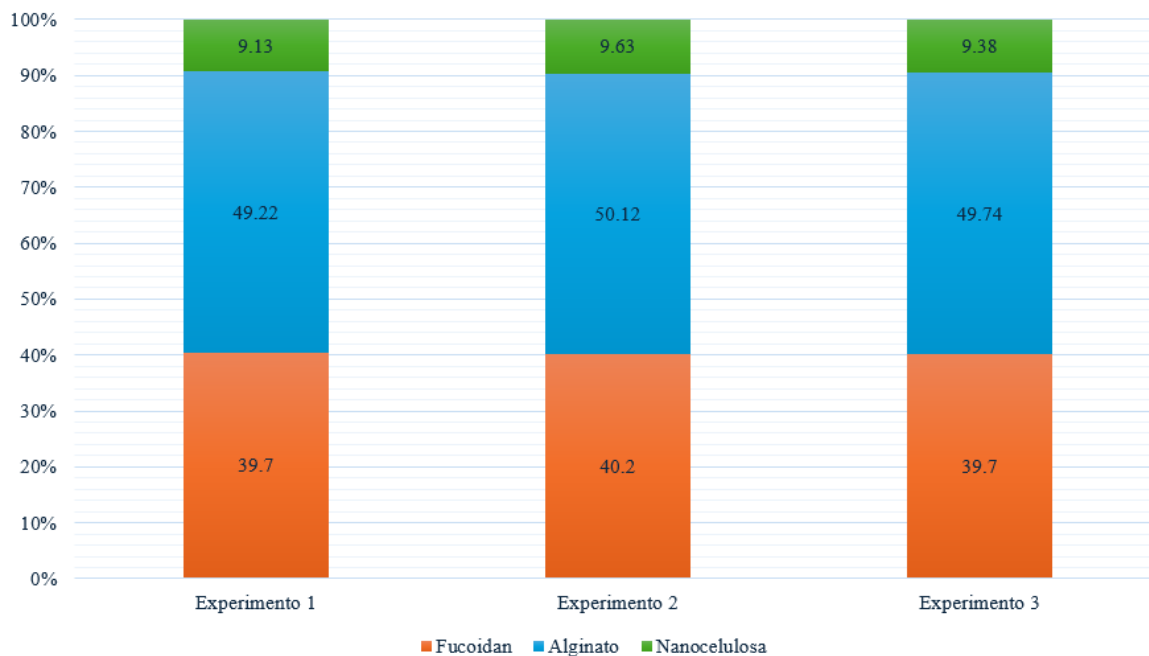
Porcentajes de rendimiento

FUCOIDAN		
<i>Materia prima inicial</i>	<i>Materia final para ExtA</i>	<i>% de rendimiento</i>
50	19.85	39.70%
50	20.1	40.20%
50	19.85	39.70%

ALGINATO DE SODIO/CALCIO		
<i>Materia prima</i>	<i>Materia final</i>	<i>% de rendimiento</i>
50	24.61	49.22%
50	25.06	50.12%
50	24.87	49.74%

NANOCELULOSA						
<i>Materia prima inicial</i>	<i>Húmedo (ml)</i>	<i>Peso inicial</i>	<i>Peso final</i>	<i>% m/v</i>	<i>Masa NC seca total</i>	<i>% de rendimiento</i>
8	26	1.18	0.73	2.807692308	0.73	9.13%
8	34	1.26	0.77	2.264705882	0.77	9.63%
8	24	1.1	0.75	3.125	0.75	9.38%

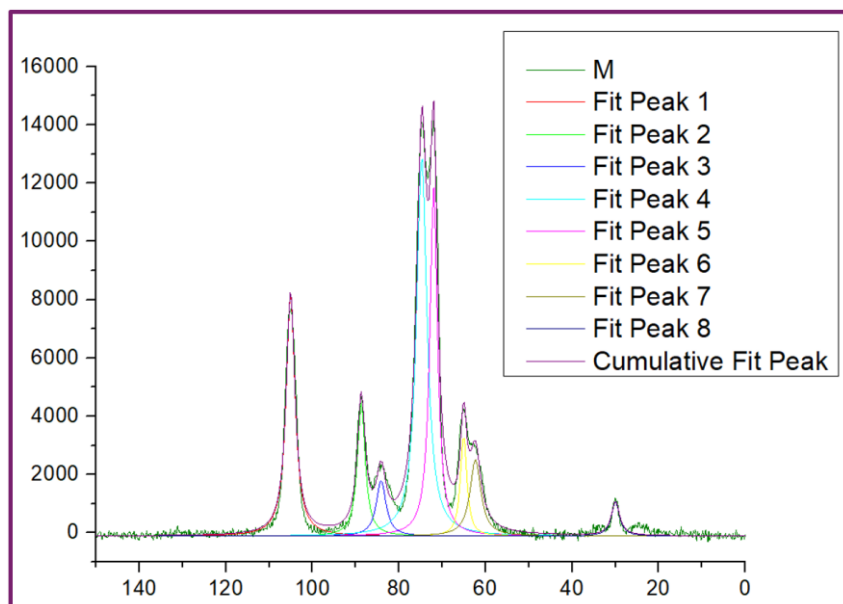
Rendimiento - Porcentaje en masa (base seca)



Anexo 5

NMR – Muestra NC-HA

Análisis: Lorentz



Model	Lorentz		
Equation	$y = y_0 + (2 \cdot A / \pi) \cdot (w / (4 \cdot (x - xc)^2 + w^2))$		
Reduced Chi-Sqr	35968.15382		
Adj. R-Square	0.9881		
		Value	Standard Error
Peak1(D)	y0	-117.06551	3.28145
Peak1(D)	xc	105.05627	0.00851
Peak1(D)	w	2.44328	0.02435
Peak1(D)	A	32184.39998	229.38788
Peak1(D)	H	8385.95746	58.41956
Peak2(D)	y0	-117.06551	3.28145
Peak2(D)	xc	88.71871	0.01517
Peak2(D)	w	2.16405	0.04826
Peak2(D)	A	15575.47191	274.39699
Peak2(D)	H	4581.98777	62.42586
Peak3(D)	y0	-117.06551	3.28145
Peak3(D)	xc	84.14552	0.04104
Peak3(D)	w	2.70006	0.13438
Peak3(D)	A	8128.07621	317.78717
Peak3(D)	H	1916.43677	56.0311
Peak4(D)	y0	-117.06551	3.28145
Peak4(D)	xc	74.755	0.00874
Peak4(D)	w	2.87915	0.02641
Peak4(D)	A	59190.01736	564.74861
Peak4(D)	H	13087.74115	61.55388
Peak5(D)	y0	-117.06551	3.28145
Peak5(D)	xc	72.00095	0.00717
Peak5(D)	w	2.11393	0.02429
Peak5(D)	A	39792.74288	495.52269
Peak5(D)	H	11983.78832	74.2321
Peak6(D)	y0	-117.06551	3.28145
Peak6(D)	xc	65.07634	0.02044
Peak6(D)	w	1.74911	0.07267
Peak6(D)	A	9596.39179	415.33429
Peak6(D)	H	3492.77344	77.61291
Peak7(D)	y0	-117.06551	3.28145
Peak7(D)	xc	62.34256	0.04401
Peak7(D)	w	3.05403	0.1271
Peak7(D)	A	12586.83648	515.04173
Peak7(D)	H	2623.75704	56.65365
Peak8(D)	y0	-117.06551	3.28145
Peak8(D)	xc	29.99036	0.05826
Peak8(D)	w	2.25595	0.1665
Peak8(D)	A	4170.32174	219.95766
Peak8(D)	H	1176.84841	60.78214

Análisis en C4 Muestra NC-HA

Valor pico 2	Valor pico 3
1.56E+04	8.13E+03
x	y

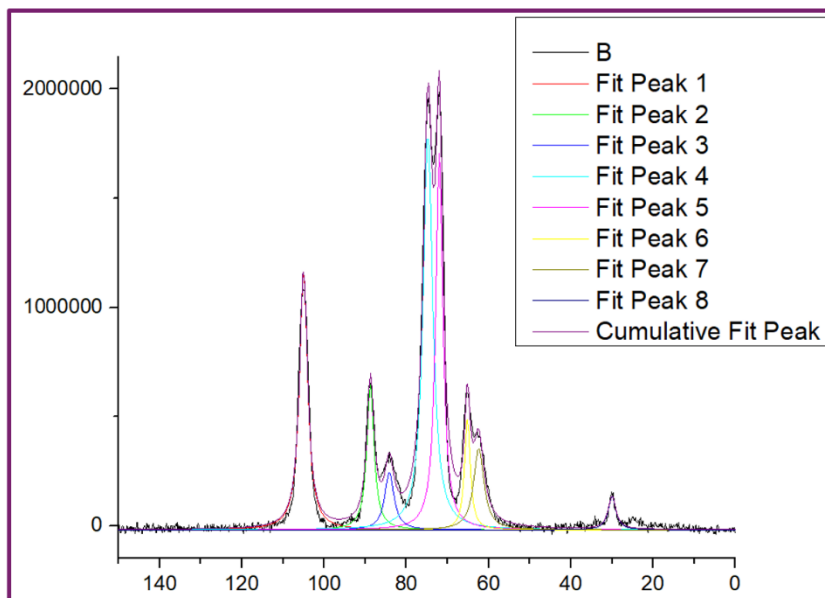
Operaciones

$IC = x/x + y$	6.57E-01
	(6.57E-01)*100
Valor ICr	65.7

Valores tomados de los picos 2 y 3 (orden de izquierda a derecha)

NMR – Muestra NC-E

Análisis: Lorentz



Model	Lorentz		
Equation	$y = y_0 + (2^2 A / \pi) * w / (4 * (x - xc)^2 + w^2)$		
Reduced Chi-Sqr	7.26362E8		
Adj. R-Square	0.98758		
		Value	Standard Error
Peak1(B)	y0	-19973.85462	452.00164
Peak1(B)	xc	105.03757	0.00819
Peak1(B)	w	2.38622	0.02342
Peak1(B)	A	4.45264E6	31246.09495
Peak1(B)	H	1.18792E6	8152.78482
Peak2(B)	y0	-19973.85462	452.00164
Peak2(B)	xc	88.75899	0.01426
Peak2(B)	w	2.11753	0.04524
Peak2(B)	A	2.20382E6	37007.11373
Peak2(B)	H	662564.20357	8699.69288
Peak3(B)	y0	-19973.85462	452.00164
Peak3(B)	xc	84.15535	0.04074
Peak3(B)	w	2.696	0.13275
Peak3(B)	A	1.12299E6	43155.10698
Peak3(B)	H	265178.36059	7732.29139
Peak4(B)	y0	-19973.85462	452.00164
Peak4(B)	xc	74.78293	0.00815
Peak4(B)	w	2.7732	0.02509
Peak4(B)	A	7.93605E6	72830.10461
Peak4(B)	H	1.82182E6	8436.42694
Peak5(B)	y0	-19973.85462	452.00164
Peak5(B)	xc	72.00987	0.00669
Peak5(B)	w	2.09007	0.02263
Peak5(B)	A	5.66438E6	64528.30269
Peak5(B)	H	1.72533E6	9982.41974
Peak6(B)	y0	-19973.85462	452.00164
Peak6(B)	xc	65.17346	0.01814
Peak6(B)	w	1.65785	0.06457
Peak6(B)	A	1.33666E6	52625.86885
Peak6(B)	H	513281.4844	10709.4998
Peak7(B)	y0	-19973.85462	452.00164
Peak7(B)	xc	62.40801	0.04064
Peak7(B)	w	3.02678	0.11961
Peak7(B)	A	1.78225E6	66886.18666
Peak7(B)	H	374858.58348	7668.81298
Peak8(B)	y0	-19973.85462	452.00164
Peak8(B)	xc	29.98197	0.06116
Peak8(B)	w	2.21573	0.17477
Peak8(B)	A	533274.08314	30053.48139
Peak8(B)	H	153219.62982	8459.09496

Análisis en C4 Muestra NC-E

Valor pico 2	Valor pico 3
2.20E+06	1.12E+06
x	y

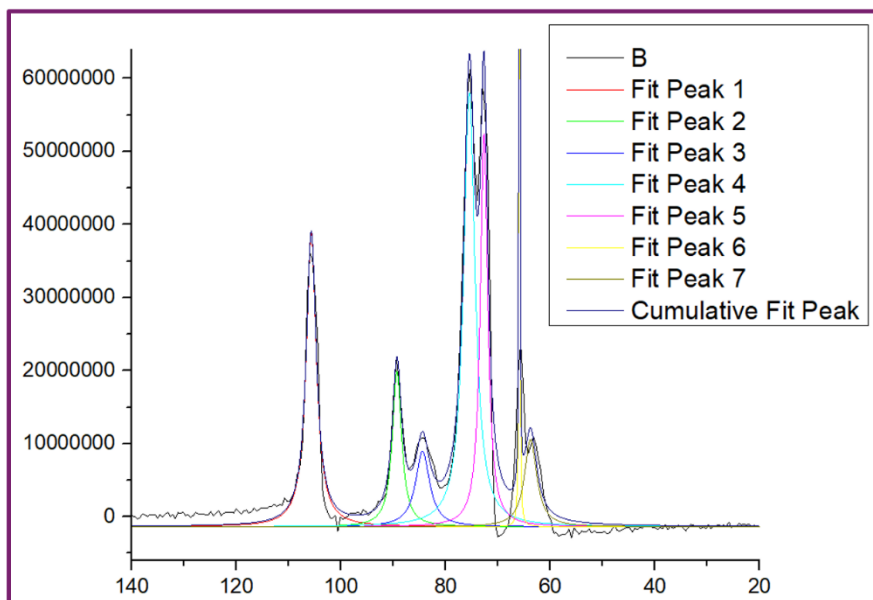
Operaciones

$IC = x/x + y$	6.62E-01
	$(6.62E-01) * 100$
Valor ICr	66.2

Valores tomados de los picos 2 y 3 (orden de izquierda a derecha)

NMR – Muestra CMC

Análisis: Lorentz



Model	Lorentz		
Equation	$y = y_0 + (2^*A/PI)*(w/(4*(x-xc)^2 + w^2))$		
Reduced Chi-Sqr	5.5566E12		
Adj. R-Square	0.96169		
		Value	Standard Error
Peak1(B)	y0	-1.39904E6	197225.81449
Peak1(B)	xc	105.69539	0.04987
Peak1(B)	w	2.3422	0.14667
Peak1(B)	A	1.47899E8	6.81419E6
Peak1(B)	H	4.01995E7	1.71337E6
Peak2(B)	y0	-1.39904E6	197225.81449
Peak2(B)	xc	89.32345	0.09253
Peak2(B)	w	2.13065	0.29844
Peak2(B)	A	7.15084E7	8.09529E6
Peak2(B)	H	2.13661E7	1.80772E6
Peak3(B)	y0	-1.39904E6	197225.81449
Peak3(B)	xc	84.42439	0.243
Peak3(B)	w	3.2727	0.81493
Peak3(B)	A	5.32684E7	1.05446E7
Peak3(B)	H	1.0362E7	1.46666E6
Peak4(B)	y0	-1.39904E6	197225.81449
Peak4(B)	xc	75.49027	0.04521
Peak4(B)	w	2.64153	0.14777
Peak4(B)	A	2.46887E8	1.26259E7
Peak4(B)	H	5.95006E7	1.67376E6
Peak5(B)	y0	-1.39904E6	197225.81449
Peak5(B)	xc	72.67102	0.03586
Peak5(B)	w	1.70964	0.12578
Peak5(B)	A	1.44559E8	1.01236E7
Peak5(B)	H	5.38295E7	2.13381E6
Peak6(B)	y0	-1.39904E6	197225.81449
Peak6(B)	xc	65.89987	0.00805
Peak6(B)	w	1.73117E-4	--
Peak6(B)	A	3.77524E10	--
Peak6(B)	H	1.38831E14	--
Peak7(B)	y0	-1.39904E6	197225.81449
Peak7(B)	xc	63.76964	0.18145
Peak7(B)	w	2.85491	0.57393
Peak7(B)	A	5.37084E7	7.55783E6
Peak7(B)	H	1.19765E7	1.56302E6

Análisis en C4

Muestra CMC

Valor pico 2	Valor pico 3
7.15E+07	5.33E+07
x	y

Operaciones

$IC=x/x+y$	5.73E-01
	$(5.73E-01)*100$
Valor ICr	57.3

Valores tomados de los picos 2 y 3 (orden de izquierda a derecha)