



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®

Instituto Tecnológico de Orizaba

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

**“APROVECHAMIENTO DE LA BIOMASA SÓLIDA DE SARGAZO COMO
FUENTE DE SUSTANCIAS DE VALOR AGREGADO MEDIANTE
PROCESOS DE EXTRACCIÓN Y DIGESTIÓN ANAEROBIA”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

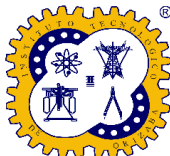
Q. I. ISRAEL DE JESÚS BALDERAS CABALLERO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN

CO-DIRECTOR:

M.C.I.Q. NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTÚ



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO

OCTUBRE 2023



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, 03/octubre/2023

Dependencia: División de Estudios de
Posgrado e Investigación

Asunto: Autorización de Impresión
OPCION: I

C. ISRAEL DE JESÚS BALDERAS CABALLERO
Candidato(a) a Grado de Maestro(a) en:
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA
P R E S E N T E.-

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros e Institutos Tecnológicos Federales del Tecnológico Nacional de México, de la Secretaría de Educación Pública, y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

“Aprovechamiento de la biomasa sólida de sargazo como fuente de sustancias de valor agregado mediante procesos de extracción y digestión anaerobia.”

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA – TÉCNICA – CULTURA®

Cuahtémoc Sánchez R.

Dr. CUAUHTÉMOC SÁNCHEZ RAMÍREZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



OG-13-F06



Av. Oriente 9 Núm.852, Colonia Emiliano Zapata. C.P. 94320 Orizaba, Veracruz.
Tel. 01 (272)1105360 e-mail: dir_orizaba@tecnm.mx technm.mx | orizaba.tecnm.mx



2023
Francisco
VILLA

Orizaba, Veracruz, 22/septiembre/2023
Asunto: Revisión de trabajo escrito

C. CUAUHTÉMOC SÁNCHEZ RAMÍREZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
P R E S E N T E.-

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C.

ISRAEL DE JESÚS BALDERAS CABALLERO

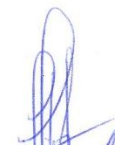
La cual lleva el título de:

**"Aprovechamiento de la biomasa sólida de sargazo como fuente de sustancias de valor
agregado mediante procesos de extracción y digestión anaerobia"**

Y concluyen que se acepta.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA – TÉCNICA - CULTURA®

PRESIDENTE:	DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN
SECRETARIO:	MIQ. NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTÚ
VOCAL:	DR. ERIK SAMUEL ROSAS MENDOZA
VOCAL SUP.:	DR. JUAN MANUEL MÉNDEZ CONTRERAS


FIRMA


FIRMA


FIRMA


FIRMA

TA-09-18



Av. Oriente 9 Núm.852, Colonia Emiliano Zapata. C.P. 94320 Orizaba, Veracruz.
Tel. 01 (272)1105360 e-mail: dir_orizaba@tecnm.mx tecnm.mx | orizaba.tecnm.mx



Declaración de originalidad y cesión de derechos

Orizaba, Veracruz, el día 02 del mes de octubre del año 2023.

El(la) que suscribe

C. Israel de Jesús Balderas Caballero

Declaro que esta tesis, que tiene una extensión de 95 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de la tesis titulada

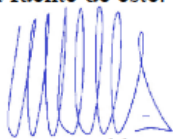
“Aprovechamiento de la biomasa sólida de sargazo como fuente de sustancias de valor agregado mediante procesos de extracción y digestión anaerobia”

del programa: Maestría en Ciencias en Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección del (la) Dr. Alejandro Alvarado Lassman y M.C.I.O. Norma Alejandra Vallejo Cantú y no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

Todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal y, en los casos que así lo requieran, cuento con las debidas autorizaciones de quienes poseen los derechos patrimoniales. Por lo tanto, me hago responsable de cualquier litigio o reclamación relacionada con derechos de propiedad intelectual, exonerando de toda responsabilidad al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba.

También declaro que, al presentar esta tesis, cedo los derechos del trabajo al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba para su difusión, con fines académicos y de investigación, bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: depi_orizaba@tecnm.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.



Israel de Jesús Balderas Caballero

Nombre y firma

DEDICATORIAS

El presente trabajo va dedicado a mis padres que en todo momento conté con su apoyo y motivación para la realización de esta meta propuesta en mi vida y forma parte de mí, como superación personal y profesional.

Al maestro en ciencias Esteban López Sampedro por su orientación, apoyo y amistad de muchos años los cuales seguiremos acumulando.

A toda mi familia que me animaron, me aconsejaron y apoyaron en mi decisión de seguir creciendo personalmente.

Agradezco enormemente a la coordinadora en playa de ZOFEMAT la Biol. Claudia Hernández, por su facilitación para la recolección de la biomasa, así como a los H. Ayuntamiento de Benito – Juárez, Solidaridad – Playa del Carmen, Tulum y Cozumel por su amable atención en la petición para el permiso para la recolección de sargazo. También un agradecimiento al Laboratorio de Ambiental I y II por todas las facilidades otorgadas para realizar este proyecto.

Y finalmente quiero agradecer a mis amigos de laboratorio por el apoyo brindado, Alexa, Francisco, Oscar, Zaira, Karen, Enrique, Carlos, Daniel, Laura, Angélica, Daniel, Leonardo, Susana, Itzel, Joaquín, Diana, Roger, Itzel Gonzáles, Mandí y a los residentes que conocí a lo largo de mi estancia Carolina, Tony, Juan Pablo y Víctor, Gracias a todos.

RECONOCIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alejandro Alvarado Lassman por la aceptación y confianza para formar parte de su grupo de investigación y a la M.C.I.Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú como codirector de este proyecto, así como la orientación y asesoría para lograr el desarrollo experimental dentro y fuera del laboratorio.

También quiero agradecer al comité que está involucrado en este proyecto de tesis, especialmente al Dr. Juan Manuel Méndez Contreras por todas las facilidades y apoyo para la realización del desarrollo experimental, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible concluir. Al Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza por compartir parte de su experiencia y conocimientos durante la maestría.

- Valorización de la biomasa sólida de sargazo: Análisis proximal de las especies *S. natans* VIII, *S. natans* I y *S. fluitans* III, en el litoral adyacente al caribe mexicano de mareas doradas en verano del 2022 (AMIDIQ). Huatulco, Oaxaca, México 30 de mayo al 2 de junio de 2023.
- Comparison of the effect of two solid-liquid extraction methods, on the yields of sodium alginate obtained from three species of *sargassum* solid biomass (IMRC). Cancún, Quintana Roo, México 13 al 18 de agosto de 2023.
- Valorización de la fracción sólida de la biomasa de sargazo, mediante extracción sólido – líquido de compuestos de valor agregado y su aprovechamiento como bionenergético (CIDSER) Orizaba, Veracruz, México 6, 7 y 8 de noviembre de 2023.

Israel de Jesús Balderas Caballero agradece a CONACYT la beca de maestría (944323) para la conclusión de esta investigación.

RESUMEN

“Aprovechamiento de la biomasa sólida de sargazo como fuente de sustancias de valor agregado mediante procesos de extracción y digestión anaerobia”

Elaborado por: Q. I. Israel de Jesús Balderas Caballero

Dirigido por: Dr. Alejandro Alvarado Lassman

M.C.I.Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú

En la presente investigación se valorizó el sargazo mediante dos aplicaciones con la finalidad de resolver problemas ambientales asociados a su arribo masivo a las costas del Caribe Mexicano. Para lograr lo anterior primero se realizó una clasificación y caracterización de las diferentes especies de sargazo en playa delfines de la ciudad de Cancún, Qroo. encontrándose las especies *S. fluitans III*, *S. natans I* y *S. natans VIII* en proporciones de 84, 8 y 8 % respectivamente del total de la biomasa. Se encontró que la mayor retención de humedad fue en la especie *S. natans I* (94.46 ± 2.04 %). En SV no hubo diferencia significativa debido a que las tres especies presentaron valores similares (>80 %). El mayor contenido de proteína (5.81 ± 0.41 %) fue en *S. natans I*. La fibra en las tres especies fue entre 16 – 22 %. El porcentaje de carbohidratos presente fue de 44 – 51 % en la biomasa. *S. fluitans III* y *S. natans VIII* fueron las especies con mayor contenido de minerales 109410 y 97077 mg/Kg respectivamente. A continuación, se realizó la extracción del alginato de sodio por medio de extracción sólido-líquido obteniéndose rendimientos entre $22.76 \pm 1.17 - 27.45 \pm 0.96$ % p/p en las especies *S. natans* y *S. fluitans* mediante un pretratamiento químico a 60 °C y un tiempo de 4 h. El residuo sólido remanente después de la extracción de alginato de sodio fue sometido a digestión anaerobia (DA) obteniéndose rendimientos entre 450 ± 12.0 mL de biogás/ gSV y 670 ± 10.0 mL de biogás/ gSV. La generación de biogás en la DA de la biomasa en fresco en *S. natans I*, *S. natans VIII* y *S. fluitans III* fue de 1152 ± 5.05 mL, 830 ± 4.64 mL y 1090 ± 7.0 mL de biogás/ gSV respectivamente.

ABSTRACT

“Use of the *sargassum* solid biomass as a source of value – added substances through extraction and anaerobic digestion processes”

By: Q. I. Israel de Jesús Balderas Caballero

Advisor (s): Dr. Alejandro Alvarado Lassman

M.C.I.Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú

In this research, *sargassum* was valorized through two applications in order to solve environmental problems associated with its massive arrival to the coasts of the Mexican Caribbean. To achieve the above, first a classification and characterization of the different species of *sargassum* was carried out on Dolphin beach in the city of Cancun, Qroo. finding the species *S. fluitans III*, *S. natans I* and *S. natans VIII* in proportions of 84, 8 and 8 %, respectively, of the total biomass. The highest moisture retention was found in the species *S. natans I* (94.46 ± 2.04 %). In VS there was no significant difference because the three species presented similar values (>80 %). The highest protein content (5.81 ± 0.41 %) was in *S. natans I*. Fiber in the three species was between 16 - 22 %. The percentage of carbohydrates present was 44 - 51 % in the biomass. *S. fluitans III* and *S. natans VIII* were the species with the highest mineral content 109410 and 97077 mg/kg respectively. Next, sodium alginate extraction was carried out by solid liquid extraction obtaining yields between 22.76 ± 1.17 - 27.45 ± 0.96 % W/W in *S. natans* and *S. fluitans* species by chemical pretreatment at 60 °C and a time of 4 h. The solid residue remaining after sodium alginate extraction was subjected to anaerobic digestion (AD) obtaining yields between 450 ± 12.0 mL biogas/ gVS and 670 ± 10.0 mL biogas/ gVS. In the DA of the solid fraction of fresh *sargassum*, the generation of biogas produced in the samples of *S. natans I*, *S. natans VIII* and *S. fluitans III* was 1152 ± 5.05 mL, 830 ± 4.64 mL and 1090 ± 7.0 mL of biogas/ gSV respectively

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	v
NOMENCLATURA	vi
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS.....	9
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	11
1.1. Biomasa sólida de sargazo	11
1.1.1. Clasificación de la biomasa sólida de sargazo	12
1.1.2. Problemática e impacto ambiental de la biomasa sólida de sargazo	14
1.1.3. Aplicaciones potenciales de la biomasa sólida de sargazo	16
1.2. Métodos de extracción	18
1.2.1. Tipos de extracción.....	18
1.2.2. Extracción asistida con microondas	20
1.2.3. Extracción asistida por ultrasonido	20
1.2.4. Extracción supercrítica	20
1.3. Sustancias de valor agregado de la biomasa sólida de sargazo	21
1.3.1. Alginatos.....	21
1.3.1.1. Fuente de obtención del alginato.....	21
1.3.1.2. Estructura química del alginato	22
1.3.1.3. Extracción de alginatos	23
1.4.1. Etapas de la digestión anaerobia.....	25
1.4.2. Digestión anaerobia en estado sólido	29
1.4.3. Aplicaciones de la digestión anaerobia en estado sólido	31
1.4.4. Factores que influyen la SSAD	32
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.1. Muestreo y recolección de la biomasa sólida de sargazo.....	37
2.1.1. Pretratamiento y clasificación de la biomasa	37

2.2.	Caracterización fisicoquímica de la biomasa sólida de sargazo	38
2.3.	Extracción de alginatos	38
2.4.	Determinación de nitrógeno total.....	39
2.5.	Determinación de proteína	40
2.6.	Análisis elemental C, H, O, N, S.....	41
2.7.	Análisis inorgánico y metales	41
2.8.	Determinación de carbohidratos.....	41
2.10.	Actividad metanogénica específica (AME)	42
2.11.	Cálculos estequiométricos	43
2.12.	Análisis espectroscópicos	43
2.12.1.	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier	43
2.12.2.	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (^1H RMN).....	43
2.12.3.	Espectrometría de masas de desorción/ ionización laser asistida por matriz en un tiempo de vuelo (MALDI – TOF/MS)	44
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN		46
3.1.	Muestreo y recolección de la biomasa sólida de sargazo.....	46
3.2.	Clasificación de la biomasa sólida de sargazo	47
3.3.	Caracterización fisicoquímica de la biomasa sólida de sargazo	49
3.4.	Extracción del alginato de sodio	54
3.4.1.	Extracción de alginato de sodio por ultrasonido	58
3.5.	Caracterización del alginato de sodio.....	60
3.5.1.	Espectroscopia FT – IR	60
3.5.2.	Resonancia Magnética Nuclear de ^1H	64
3.5.3.	Ionización – desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI – TOF)	68
3.6.	Caracterización fisicoquímica del inóculo	70
3.7.	Análisis elemental orgánico de la biomasa sólida de sargazo	71
3.8.	Evaluación de la actividad metanogénica específica (AME)	72
3.8.1.	Biomasa sólida de sargazo	72
3.8.2.	Residuo sólido de sargazo.....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		81

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.1	Diferencias morfológicas entre las formas de <i>sargassum</i>	11
1.2	Características de tres formas pelágicas de <i>Sargassum</i> recolectadas durante la inundación del Caribe de 2014/2015.....	14
1.3	Efectos ambientales de las mareas de sargazo en las comunidades de corales y pastos marinos cercanos a la costa.....	16
1.4	Embudo de separación.....	19
1.5	Cartucho con fase sólida y jeringa para elución a presión positiva....	19
1.6	Estructura del alginato en sus monómeros constituyentes (a) y su forma estructural del polímero dependiendo la secuencia adaptada del monómero (b).....	22
1.7	Proceso de extracción y aislamiento del alginato de sodio de sargazo.....	23
1.8	Secuencia metabólica y grupos microbianos que intervienen en la digestión anaerobia.....	25
2.1	Metodología general a desarrollar durante el proyecto.....	36
2.2	Proceso de extracción y aislamiento del alginato de sodio de sargazo	39
3.1	Sitios de recolección y muestreo de la biomasa sólida de sargazo en Playa del Carmen. QROO y playa delfines en Cancún.....	47
3.2	Clasificación de la biomasa de sargazo recolectada conforme a sus características morfológicas: <i>S. natans VIII</i> , <i>S. natans I</i> y <i>S. fluitans III</i>	47
3.3	Composición proximal por especie de biomasa sólida de sargazo en Playa del Carmen y Cancún.....	48
3.4	Obtención de la biomasa sólida del sargazo (A) y fracción líquida (B) para su posterior secado hasta peso constante (C).....	55
3.5	Hidratación de la biomasa sólida de sargazo en formaldehído (a) y ácido clorhídrico (b).....	55

3.6	Fracción líquida del alginato de sodio en su forma soluble (a) y alginato de sodio (b).....	56
3.7	Baño ultrasónico empleado para la extracción (a) y fracción líquida (agua) después de 24 horas de refrigeración (b).....	59
3.8	Espectro FT-IR de alginato de sodio de <i>S. natans I</i>	61
3.9	Espectro FT-IR de alginato de sodio de <i>S. natans VIII</i>	63
3.10	Espectro FT-IR de alginato de sodio de <i>S. fluitans III</i>	64
3.11	Espectro de RMN ^1H de <i>S. natans I</i>	65
3.12	Espectro de RMN ^1H de <i>S. natans VIII</i>	66
3.13	Espectro de RMN ^1H de <i>S. fluitans III</i>	67
3.14	Espectro de MALDI – TOF del alginato de sodio de <i>S. natans I</i>	68
3.15	Espectro de MALDI – TOF del alginato de sodio de <i>S. natans VIII</i>	69
3.16	Espectro de MALDI – TOF del alginato de sodio de <i>S. fluitans III</i>	70
3.17	Volumen de biogás generado por la fracción sólida de sargazo (a) y porcentaje de la composición del biogás (b).....	72
3.18	Volumen de biogás generado por los residuos de la biomasa de sargazo.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1.1	Análisis de las propiedades químicas del sargazo.....	12
1.2	Clasificación taxonómica de especies de sargazo.....	13
1.3	Algunos grupos importantes de enzimas hidrolíticas y sus funciones..	27
1.4	Comparación detallada de la fermentación en estado sólido con la fermentación líquida.....	30
2.1	Métodos para el análisis de la biomasa sólida de sargazo.....	38
3.1	Composición fisicoquímica de diferentes especies de biomasa sólida de sargazo.....	50
3.2	Análisis inorgánico y metales presentes en la biomasa sólida de sargazo.....	53
3.3	Parámetros de experimentación y rendimientos del alginato.....	57
3.4	Caracterización fisicoquímica de los residuos de extracción del alginato.....	57
3.5	Rendimientos de alginato obtenidos mediante extracción por ultrasonido.....	60
3.6	Bandas características del alginato de sodio en FT-IR.....	62
3.7	Caracterización fisicoquímica del inóculo de RSOM.....	71
3.8	Composición elemental de la biomasa sólida de sargazo.....	71
3.9	Caracterización fisicoquímica del digestato después de la DA.....	75

NOMENCLATURA

Nomenclatura	Definición
DA	Digestión anaerobia
CH ₄	Metano
SV	Sólidos volátiles
M	Molaridad
HCl	Ácido clorhídrico
CH ₂ O	Formaldehído
AGCL	Ácidos grasos de cadena larga
AGV	Ácidos grasos volátiles
Ca(Alg) ₂	Alginato de calcio
HAlg	Ácido algínico
C ₂ H ₄ O ₂	Ácido acético
C ₃ H ₆ O ₂	Ácido propiónico
C ₄ H ₈ O ₂	Ácido butírico
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucosa
C ₂ H ₅ OH	Etanol
ST	Sólidos totales
SSAD	Digestión anaerobia seca
DQO _T	Demanda química de oxígeno total
DQO _s	Demanda química de oxígeno soluble
RMN	Resonancia magnética nuclear
MS	Masas exactas
IR	Espectroscopia infrarroja
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio

INTRODUCCIÓN

El caribe es una de las regiones turísticas internacionales más importantes, debido a su biodiversidad, así como su infraestructura turística, generando grandes ingresos económicos locales (López et al., 2021). En los últimos diez años la llegada masiva de *Sargassum spp* a las playas es un tema que actualmente causa severas afectaciones ecológicas y económicas. El mar de los sargazos se considera un área de importancia ecológica ya que contiene un sistema de algas holopelágicas formando grandes expansiones de biomasa, las cuales se constituyen principalmente dos especies: *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans* (Leal et al., 2020). Las masas de algas son ecosistemas altamente productivos, que propician alimento y refugio a una gran variedad de organismos (Vázquez et al., 2021). La reproducción incontrolable de la biomasa sólida de macro algas *Sargassum* aún no es del todo claro, se tiene la convicción que el aumento global en los niveles de CO₂ que han afectado el cambio climático incrementan la acidez y la temperatura de los océanos promoviendo dicha proliferación (Aparicio et al., 2021). La extracción del sargazo de las costas representa un problema adicional ya que el proceso es costoso. Sólo en México, el gobierno federal asignó \$3.2 M de dólares para retirar y extraer la biomasa de sargazo en 2015, aun así, las grandes cantidades de biomasa excedió la capacidad de extracción (Leal et al., 2020). Por lo que encontrar alternativas para la biomasa de macroalgas es de gran importancia. Esta biomasa tiene varias aplicaciones, entre las cuales está su consumo como alimento, además de ser una fuente de gran variedad de compuestos valiosos (como: alginatos (carbohidratos), fucoxantina (carotenoide), esteroide, entre otros) con diferentes aplicaciones y usos en la industria de alimentos por ejemplo, para el desarrollo de películas y revestimientos comestibles para la preservación de alimentos, otra aplicación del sargazo es en la industria agrícola donde los metabolitos como los ácidos grasos, pigmentos, alcaloides y terpenoides tienen propiedades antifúngicas, antivirales, antibacterianas y antiprotozoarias, las cuales ayudan a proteger a las plantas de enfermedades. También las algas marinas tienen usos potenciales en la productividad de los biocombustibles y la biorremediación (Amador

et al., 2021). Múltiples estudios coinciden que la digestión anaerobia (DA) de la biomasa sólida del *Sargassum spp* es factible para la creación de biocombustibles de tercera generación. Sin embargo, la presencia de varios componentes recalcitrantes como SO_4^{2-} , NaCl y metales pesados en concentraciones significativas podrían acumularse y actuar como inhibidores de la DA (López et al., 2021).

Con el presente trabajo se pretende realizar la extracción del AlgNa de *S. natans* y *S. fluitans* para evaluar su rendimiento y comparar con otras especies de sargazo ya reportadas en bibliografía, el empleo de métodos de extracción como lo son líquido-líquido, sólido-líquido (extracción Soxhlet) para aislar y cuantificar mediante métodos cromatográficos los metabolitos para determinar su pureza.

Para poder dar solución al manejo de la problemática del sargazo una opción viable es la DA, mediante acción microbiana y escasez de oxígeno este proceso convertirá la materia orgánica en un biogás (mezcla de metano y dióxido de carbono), el cual se puede aprovechar para generar energía (térmica, mecánica o eléctrica), la biomasa de macroalgas tratada por DA han arrojado resultados aceptables en trabajos de investigación con rendimientos similares a los reportados para la fracción orgánica de residuos orgánicos municipales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar las etapas del proceso de digestión anaerobia de la fracción sólida obtenida del sargazo, así como su potencial energético y su caracterización por cromatografía de los compuestos de valor agregado (fenoles, alginatos, fucoxantina, caroteneoides y esteroides) mediante métodos de extracción líquido-líquido y sólido-líquido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener la fracción sólida del sargazo a partir de trituración y filtración.
2. Realizar el proceso de extracción a la fracción sólida para obtener sustancias de valor agregado.
3. Realizar la digestión anaerobia de la fracción sólida posterior a la extracción evaluando su biodegradabilidad y producción de biogás.
4. Realizar la caracterización mediante métodos espectrofotométricos de los productos obtenidos y su rendimiento.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1. Biomasa sólida de sargazo

El sargazo es una macroalga marina muy importante debido a que proporciona un área de refugio y alimentación para muchas especies, tales como peces, crustáceos y tortugas (Leal-Bautista *et al.*, 2020). El mar de los sargazos se ubica en el océano Atlántico donde sus aguas se caracterizan por ser templadas y tropicales, ahí viven dos especies de macroalga: *Sargassum fluitans* y *Sargassum natans* (Aldana – Aranda, 2020). Estos dos tipos de biomasa sólida son las únicas especies holopelágicas, las cuales tienen formas distintas que las diferencian una de otra como, por ejemplo: *S. fluitans* se compone de las formas III y IV mientras que *S. natans* I, II, VIII y XI (Govindajaran *et al.*, 2019) como se describe en la Figura 1. La disposición o la falta de espinas en el tallo distingue a las especies de *sargassum* como, por ejemplo, toda la biomasa de *Sargassum fluitans* tienen espinas en el tallo (Figura 1.1 A), mientras que la biomasa de *Sargassum natans* tienen tallos lisos (Figura 1.1 B y C) (Schell *et al.*, 2015).

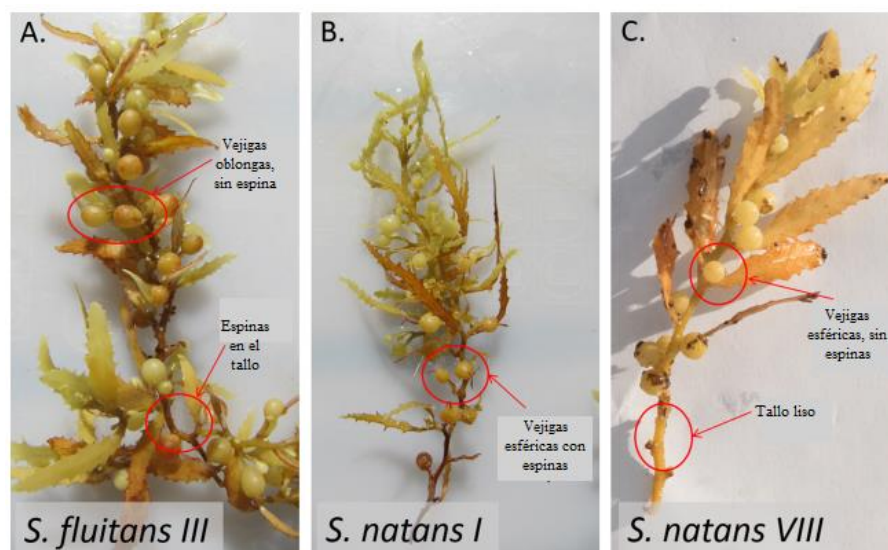


Figura 1.1 Diferencias morfológicas entre las formas de sargassum (Govindajaran *et al.*, 2019).

Esta biomasa sólida posee en su estructura externa unas pequeñas vejigas (también llamados nematocistos) (Figura 1.1 C), las cuales le confieren la capacidad de flotar (Gallegos – Martínez, 2021) y pasan completamente su ciclo de vida flotando en el océano y se reproducen de manera asexual por fragmentación vegetativa (Amador-Castro *et al.*, 2021). Con respecto a sus propiedades se ha encontrado que esta clase de biomasa sólida contiene proteínas, minerales (Ca, P, K, etcétera), colesterol y lípidos, entre otras. Por lo que es importante mencionar que el análisis químico presenta variaciones en la cantidad de moléculas contenidas en la biomasa sólida de sargazo, véase Tabla 1.1 (Nava y Sánchez, 2020).

Tabla 1.1 Análisis de las propiedades químicas del sargazo (Nava y Sánchez, 2020).

Indicador	Sargassum	Indicador	Sargassum
Humedad (g/100 g)	7.40	Magnesio (g/100 g)	0.90
Cenizas (g/100 g)	38.35	Cobre (ppm)	1.0
Proteína (g/100 g)	6.57	Hierro (ppm)	3600.0
Fibra (g/100 g)	6.55	Zinc (ppm)	1600.0
E. etéreo (g/100 g)	1.05	Colesterol (mg/100 g)	4.0
Extracto libre de N ₂ (g/100 g)	40.08	Lípidos totales (g/100 g)	1.93
Energía bruta (MJ/g)	10.48	Ác. Linoleico (C18:2 LA)	6.99
Calcio (mg/100)	3.21	Ác. Linoleico (C18:3 ALA)	2.65
Fósforo (mg/100)	0.1	Ác. Araquidónico (C20:4 AA)	9.83
Sodio (mg/100 g)	20.1	Ác. Cicosapentaenoico (C20:5 EPA)	3.53
Potasio (mg/100 g)	5.77	Ác. Docosahexaenoico (C22:6 DHA)	0.60

1.1.1. Clasificación de la biomasa sólida de sargazo

La biomasa sólida de sargazo, en especial del género *sargassum*, pueden ser de colores pardos, negros y verdes, las especies más representativas de esta biomasa sólida que conforman los mantos flotantes son: *Sargassum natans* (Linnaeus) y *Sargassum fluitans* (Børgesen) (Caballero-Vázquez *et al.*, 2020).

La composición taxonómica (véase Tabla 1.2) del sargazo en el caribe mexicano ha reportado 12 especies de *Chlorophyta*, 14 *Phaeophyceae* y 14 de *Rhodophyta* durante las llegadas a Punta Cancún y Puerto Morelos (Leal-Bautista *et al.*, 2020). Song *et al.*, 2015 identificaron a estas algas marinas como organismos fotosintéticos eucariotas que se pueden clasificar como algas verdes (*Chlorophyceae*), algas rojas (*Rhodophyta*) y algas marrones (*Phaeophyceae*) definidas por sus fitopigmentos.

Tabla 1.2 Clasificación taxonómica de especies de sargazo (Martinez, 2020)

Dominio: Eukaryota	Subclase: Fucophycidae
Reino: Chromista	Orden: Fucales
Filo: Ochrophyta	Familia: Sargassaceae
Clase: Phaeophyceae	Género: <i>Sargassum</i>

El género *Sargassum* pertenece a un conjunto de algas pardas que se clasifican en 265 géneros con más de 1500 especies, obteniendo su color característico del carotenoide fucoxantina (que produce un color marrón) contenido en sus cloroplastos junto con la presencia de taninos feofíceos (Davis *et al.*, 2003).

Diversas fuentes afirman que la biomasa sólida pelágica se compone de las dos especies ya antes mencionadas. Sin embargo, cada especie exhibe una diversidad de formas morfológicas, actualmente se reconocen dos formas de *S. fluitans* (III, IV) y cuatro formas de *S. natans* (I, II, VIII, XI) ver Figura 1.2 A. La disposición o falta de espinas en el tallo (véase Figura 1.2 B), especialmente en la porción distal, distingue entre las especies de *Sargassum*: toda la biomasa sólida de *S. fluitans* tienen espinas, mientras que todo el *S. natans* tienen tallos lisos ver Figura 1.2. Los atributos de la vejiga y la hoja difieren ampliamente entre las distintas especies y formas (véase Figura 1.2 C y D) (Schell *et al.*, 2015).

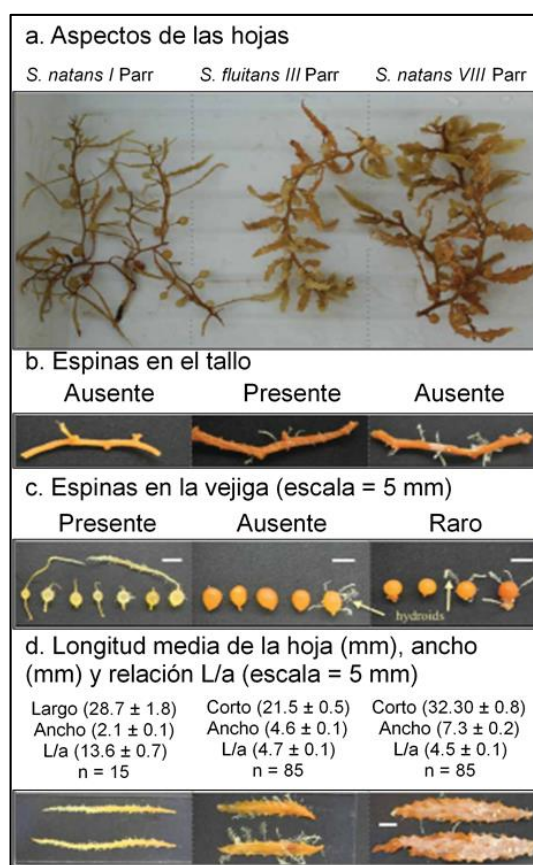


Figura 1.2 Características de tres formas pelágicas de *Sargassum* a, b, c y d (de izquierda a derecha: *S. natans I*, *S. fluitans III* y *S. natans VIII*) recolectadas durante la inundación del Caribe de 2014/2015 (Schell *et al.*, 2015).

1.1.2. Problemática e impacto ambiental de la biomasa sólida de sargazo

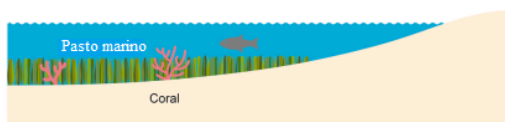
El arribo masivo de la biomasa sólida de sargazo es una manifestación registrada desde la década de 1960. En 2011 se observó la presencia masiva de sargazo en el litoral de Brasil, el cual ha llegado hasta Cuba, Barbados y las Antillas menores (Aldana, 2020). En 2014 la biomasa sólida de sargazo comenzó a llegar a las costas del Caribe mexicano en cantidades inusualmente grandes, alcanzando un pico en septiembre de 2015, cuando aproximadamente 2360 m^3 de biomasa/ km^{-1} llegaron a la costa entre Cancún y Puerto Morelos (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2019). En 2018 la administración de Quintana Roo obtuvo 62 millones de pesos del Fideicomiso Fondo de Desastres Naturales (FONDEN) para el aseo de playas (Torres, 2019).

Hay hipótesis acerca del incremento de esta biomasa que ha llegado al litoral del Caribe. La primera es que la biomasa sólida de sargazo que circula en el mar de los sargazos se trasladó al sur por el calentamiento global. La segunda indica que la biomasa sólida proviene del litoral de Brasil, en donde las salidas de diferentes ríos van eutrofizadas hacia el mar debido al incremento de la deforestación del Amazonas. La tercera hipótesis tiene origen en África, donde la arena del desierto, rica en nutrientes, fertiliza la región y, con ello, se incrementa el crecimiento de la biomasa sólida de sargazo.

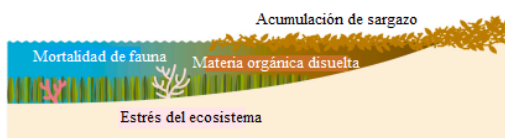
Rodríguez *et al.*, 2016 con base en sus observaciones sugirieron que la biomasa no provenía del Mar de los Sargazos, debido a que es una zona oligotrófica, en contraste con la Región de Recirculación del Atlántico Norte (NARR por sus siglas en Inglés), la cuenca del Amazonas rica en macro y micro nutrientes (p. ej. N₂ y P) y la posible eutrofización de aguas costeras caribeñas aportaron el incremento de la biomasa sólida de sargazo duplicándola en 11 días, comparado con ≥ 50 días en el piélago del Mar de los Sargazos.

Las floraciones de esta biomasa sólida de sargazo tienen efectos negativos en los ecosistemas marinos debido a su naturaleza invasiva (Amador-Castro *et al.*, 2021). Las grandes cantidades de *Sargassum spp.* acumuladas en las playas se descomponen coloreando las aguas cercanas a la costa, generalmente claras, a un color marrón turbio, debido a los lixiviados y las partículas orgánicas ver Figura 1.2 A y 1.2 B (Van Tussenbroek *et al.*, 2017), lo cual induce a una disminución del nivel de O₂ (oxígeno) y un aumento en las concentraciones de nutrientes, taninos y otros compuestos orgánicos, así como H₂S (ácido sulfhídrico) en el agua, provocando la muerte de praderas marinas, fauna y erosión de las playas debido a prácticas inadecuadas para su remoción, ver Figura 1.3 C (Rodríguez y van Tussenbroek, 2020).

A. Antes de la marea de sargazo



B. Durante la marea de sargazo



C. Después de la marea de sargazo

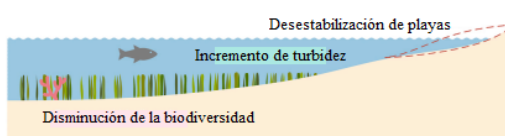


Figura 1.3 Efectos ambientales de las mareas de sargazo en las comunidades de corales y pastos marinos cercanos a la costa (Amador-Castro *et al.*, 2021).

1.1.3. Aplicaciones potenciales de la biomasa sólida de sargazo

La biomasa del sargazo tiene múltiples aplicaciones ya que es la fuente de diversos compuestos valiosos los cuales se describen a continuación:

- Alimentos

Los análisis nutricionales de las algas marinas han identificado altos niveles de carbohidratos, minerales y vitaminas. Hay dos tipos principales de polisacáridos en las algas como son los estructurales y de almacenamiento. Los polisacáridos estructurales son análogos a las plantas terrestres y son principalmente: celulosas, hemicelulosas y xilanos, mientras los polisacáridos de almacenamiento son: carragenina y alginatos (MacArtain *et al.*, 2007).

Especialmente la biomasa sólida del sargazo pelágico posee grandes cantidades de estos carbohidratos especialmente en forma de alginatos y polisacáridos sulfatados, los cuales son utilizados en la industria de alimentos y bebidas como agentes espesantes, gelificantes y estabilizantes para productos como mermeladas, salsas de

frutas y recubrimientos comestibles para productos alimenticios (Amador *et al.*, 2021, Fawzy *et al.*, 2017).

- Salud humana

Las algas producen metabolitos secundarios con aplicaciones relacionadas con la salud, en la biomasa del sargazo se han identificado compuestos potencialmente antioxidantes como la fucoxantina y la feofitina. La fucoxantina es un carotenoide con especial interés por sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios que son asociados a la reducción de padecer cáncer, obesidad y diabetes (Amador *et al.*, 2021). Se ha demostrado que los extractos de la biomasa de *Sargassum siliquastrum* (alga marrón del género *Sargassum*) tiene capacidad antioxidante, por lo que investigadores sugieren que el uso de extractos de algas con fines médicos puede inhibir la peroxidación de los lípidos para beneficio de la salud humana (Nava y Sánchez, 2020).

- Agrícola

Los aprovechamientos de las algas marinas como fuente de sustancia orgánica y nutrientes han llevado a su uso como acondicionadores de suelo, donde muchos estudios han revelado una amplia gama de efectos beneficios de las aplicaciones de extractos de algas marinas en plantas, como germinación, mayor rendimiento de los cultivos, mayor resistencia al estrés biótico y abiótico y mayor vida útil de la poscosecha de productos perecederos (Khan *et al.*, 2009), así como la mejora de la germinación de semillas e incidentes debido al ataque de hongos e insectos y la absorción de nutrientes (Nava *et al.*, 2020, Amador *et al.*, 2021).

- Bioenergía

La biomasa sólida de las macroalgas pardas es ampliamente investigada para obtener bioenergía debido a las características especiales como la ausencia o el muy bajo contenido de polímeros como la lignina, un gran contenido de hidratos de carbono y los bajos niveles de lípidos (Tadesco *et al.*, 2014), estas ventajas convierten a la biomasa sólida del sargazo como materia prima para la obtención de biogás mediante

la digestión anaerobia (DA). El uso de diferentes algas pardas, incluidas las especies de *Sargassum* en DA han obtenido rendimientos máximos de metano (CH_4) de hasta $0.380 \text{ m}^3/\text{kg}$ de SV (Amador *et al.*, 2021).

1.2. Métodos de extracción

Los métodos de extracción con solventes (líquido–líquido) y extracción en fase sólida, son útiles para separar analitos de matrices complejas de muestras antes de su análisis por cromatografía (Gary, 2009). La disociación de un compuesto por aislamiento se basa en el traspaso selectivo del analito de interés desde una mezcla sólida o líquida con otros compuestos hacia una fase líquida (solvente orgánico). El éxito de la técnica dependerá de la inmiscibilidad en el solvente de extracción, entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial.

1.2.1. Tipos de extracción

- Extracción líquido – líquido

El método de extracción con solventes (líquido–líquido) parte de la distribución de un soluto entre dos fases líquidas no solubles entre sí. Esta técnica resulta ser bastante útil si se requiere hacer separaciones aceleradas y libres de sustancias orgánicas e inorgánicas. El equipo más empleado para la separación con disolventes, es el embudo de decantación como el que se muestra en la Figura 1.4. Las extracciones líquido – líquido son muy prácticos, pero tienen ciertas desventajas. Los disolventes para separar se limitan a los que son insolubles con agua (p. ej. muestras acuosas), debido a que forman emulsiones al agitar los disolventes, y se ocupan volúmenes grandes de disolventes que generan un gran problema para eliminar los residuos. (Gary, 2009).

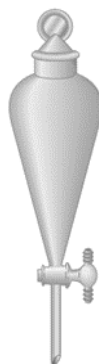


Figura 1.4 Embudo de separación (Gary, 2009).

- Extracción sólido – líquido

La extracción en fase sólida es un procedimiento en el que los grupos funcionales hidrofóbicos se adhieren a superficies de partículas y funcionan de fase extractora. Esto reduce la necesidad de utilizar volúmenes grandes de solventes. También es un proceso físico en el que se relaciona la fase sólida (FS) y la fase líquida (FL). La FS tiende a ser atraída por los analitos que están presentes en el solvente (Viera y Santana, 2015), durante la FS se inserta un cartucho, similar al de una jeringa.

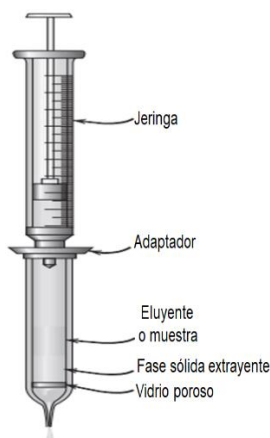


Figura 1.5 Cartucho con fase sólida y jeringa para elución a presión positiva (Gary, 2009).

En el cartucho se inserta la muestra y se hace pasar a través de éste mediante el émbolo (presión positiva), un vacío (presión negativa) o por centrifugación (véase la Figura 1.5). Se separan las trazas de las moléculas, se pre-concentran en la columna,

y se separan de la matriz de la muestra. Posteriormente se pueden extraer con un solvente orgánico p. ej. etanol (CH_3OH) para su análisis por cromatografía. Antes de su análisis se puede concentrar más el solvente (Gary, 2009).

1.2.2. Extracción asistida con microondas

La extracción asistida con microondas (MAE, microwave-assisted extraction), se ocupa para el aislamiento de analitos de materiales naturales, donde el disolvente se calienta rápidamente por radiación de microondas (Ruslan *et al.*, 2019). Los compuestos de analito se separan de la matriz facilitando que pasen al disolvente. La cinética de la extracción emplea la radiación de microondas para acelerar extracción por medio del calentamiento del solvente. El calentamiento por microondas genera 2450 MHz de frecuencia, capaz de evaporar el H_2O presente en la muestra. La MAE tiene como ventaja de emplear tiempos más cortos de extracción, menor cantidad de solvente, menor uso de energía, dando como resultado mayor rendimiento de extracción, así como una mejor precisión y exactitud (Ruslan *et al.*, 2019, Gary, 2009).

1.2.3. Extracción asistida por ultrasonido

Un método de separación sólido-líquido para la obtención de compuestos activos es la extracción dinámica asistida por ultrasonido (DSASE, por sus siglas en inglés). El uso de esta extracción evita inconvenientes tales como mermas y descomposición de compuestos activos y termolábiles debido a sus condiciones de operación cercanas a los $25\text{ }^\circ\text{C}$ (Roldán *et al.*, 2008) y la simplicidad y eficiencia. Se aplican frecuencias a la muestra entre 20-35 kHz (Gu *et al.*, 2005, Rivera *et al.*, 2017), promoviendo el traspaso de analitos desde la muestra hasta el disolvente. La extracción DSASE también se ha empleado en la obtención de compuestos como ésteres organofosforados, blanqueadores, colorantes y polifenoles, utilizando flujos de solvente entre 0.2-1.0 mL/min, obteniendo porcentajes de recuperación por encima del 85 % (Rivera *et al.*, 2017).

1.2.4. Extracción supercrítica

Esta técnica de extracción por fluidos supercríticos o “tecnología de solventes verdes” es semejante a la extracción convencional, siendo una principal diferencia el uso de

un agente extractor como un fluido supercrítico (Roman *et al.*, 2016). El fluido supercrítico es toda sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene propiedades de difundirse a través de sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido (Velasco *et al.*, 2007). El principal solvente supercrítico usado es CO₂. El dióxido de carbono (condiciones críticas temperatura 30.9 °C y presión 73.8 bar) es económico, ecológico con el medio ambiente y generalmente reconocido como seguro por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) y por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés). El CO₂ supercrítico (SC-CO₂) también es sugerido por su alta difusividad combinada con su fuerza solvente fácilmente ajustable. Otra ventaja es que el CO₂ es gas a temperatura y presión ambiente, por lo que su obtención de analitos es fácil. (Herrero *et al.*, 2010).

1.3. Sustancias de valor agregado de la biomasa sólida de sargazo

1.3.1. Alginatos

El alginato tiene diferentes aplicaciones, particularmente en las industrias de alimentos y fármacos empleándose como agentes gelificantes, espesantes y estabilizantes. Las algas pardas son la principal fuente de alginato de uso comercial (Rhein-Knudsen *et al.*, 2017).

1.3.1.1. Fuente de obtención del alginato

El Alg-Na fue descrito por el químico Standford en 1881 (Stephen *et al.*, 2006). Los alginatos son biopolímeros naturales presentes en las paredes celulares y en la matriz intercelular de las macroalgas pardas, y se encuentran como sales de sodio, calcio y magnesio del ácido alginico (Fawzy *et al.*, 2017). Estos polisacáridos están presentes en gran cantidad ~40 % p/p en las macroalgas de la clase Phaeophyceae (Ayarza-León, 2014), con un precio minorista de ~ 12 USD/Kg y un valor global de 300 millones y en aumento (Rheid-Knudsen *et al.*, 2017).

También el material polimérico exocelular semejante a los alginatos es producido por bacterias provenientes del suelo como *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter crococcum*

y varias especies de *Pseudomonas* (Stephen *et al.*, 2006). Existen biomasas sólidas de algas las cuales son cultivadas para la producción de polisacáridos de interés como los alginatos, entre las que se encuentran son: *Ascophyllum nodosum*, *Durvillaea antarctica*, *Durvillaea potatorum*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima*, *Laminaria japónica*, *Ecklonia máxima*, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia nigrescens*, *Lessonia trabeculata* y *Sargassum spp* (Jiménez-Contreras, 2020).

1.3.1.2. Estructura química del alginato

Los alginatos son polisacáridos aniónicos lineales que están formados por unidades de ácidos urónicos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G) ver Figura 1.6 (A), unidos por enlaces glicosídicos 1 $\rightarrow$ 4. Existen diversas formas del enlace glucosídico conforme la secuencia de unión entre los monómeros (Ayarza-León, 2014), esto generará 3 formas estructurales o bloques heteropoliméricos (MG) y/o homopoliméricos (MM o GG) ver Figura 1.6 (B).

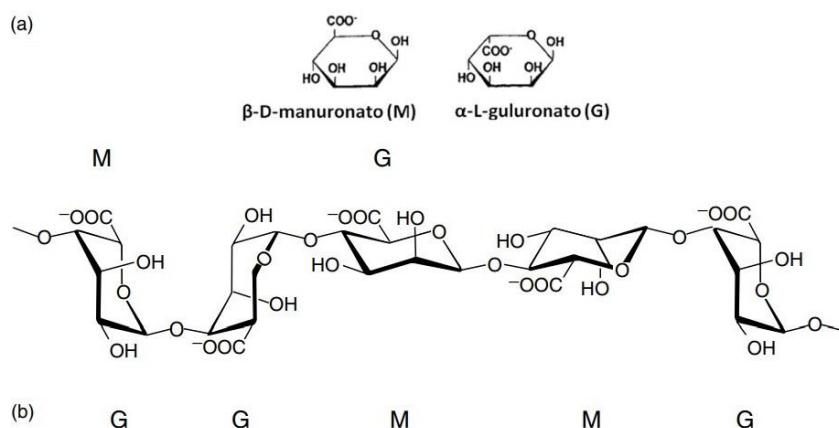


Figura 1.6 Estructura del alginato en sus monómeros constituyentes (A) y su forma estructural del polímero dependiendo la secuencia adaptada del monómero (A) (Ayarza-León, 2014).

La composición química y la masa molecular del alginato pueden variar dependiendo varios factores como la especie de alga de estudio, la variación espacial y estacional, la edad y el tipo de tejido muestreado (Stephen *et al.*, 2006, Fawzy *et al.*, 2017).

1.3.1.3. Extracción de alginatos

Para extraer el alginato de la biomasa de algas estas se pueden utilizar húmeda o seca (Ayarza-León, 2014) y se puede describir esquemáticamente de acuerdo a la Figura 1.7. En el primer paso, el alginato insoluble tiene una composición de contraión determinado por el equilibrio de intercambio iónico con el agua de mar (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , etc.). Se realiza un pre-tratamiento del alga el cual se trata con formol para la remoción de compuestos fenólicos los cuales dan un color indeseable (Ayarza-León, 2014).

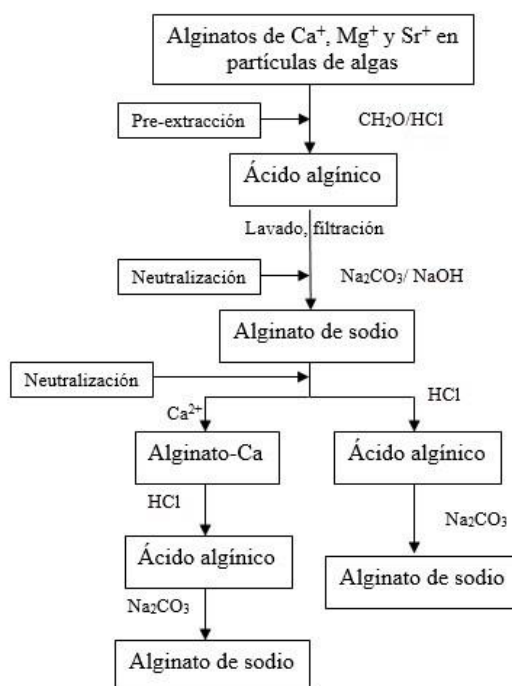
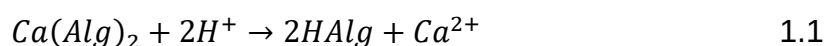
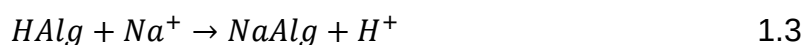
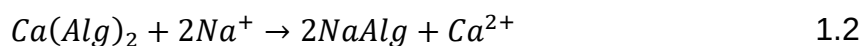


Figura 1.7 Proceso de extracción y aislamiento del alginato de sodio de sargazo (Stephen *et al.*, 2006).

Para extraer del tejido de las algas se utiliza un ácido mineral como el ácido clorhídrico a una concentración de 0.1-0.2 M para convertir el Alg-Ca en ácido algínico de acuerdo a la Ecuación 1.1.



En el segundo paso el ácido algínico se disuelve mediante una neutralización con un álcali preferentemente en su forma de sodio debido a su solubilidad en agua fría (Fertah *et al.*, 2017), como el Na_2CO_3 o NaOH , en este paso compiten procesos de intercambio iónico y neutralización ácido-base de acuerdo a las Ecuaciones 1.2-1.3 (Ayarza-León, 2014).



La fracción sólida de la biomasa del sargazo se puede eliminar mediante procedimientos físicos como es el tamizado, flotación, centrifugación y filtración. Existen dos métodos de purificación (véase Figura 1.7). El primer método por alginato de calcio, en la cual se añade una solución de CaCl_2 para luego remplazar el ion de Ca^{2+} por H^+ con adición de HCl diluido dando lugar al ácido algínico insoluble. Finalmente se neutraliza con un álcali en solución acuosa formando una pasta. El segundo método se precipita el ácido algínico en alginato de sodio y se repiten los pasos del primer método. Para precipitar el Alg-Na se utiliza la adición de un solvente orgánico como por ejemplo etanol (Stephen *et al.*, 2006, Ayarza-León, 2014).

1.4. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia (DA), es una degradación microbiana en escasez de O_2 que da lugar a una combinación de gases (CH_4 y CO_2) denominado “biogás” y una suspensión acuosa o “lodo” que incluye los microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica (Lorenzo y Obaya, 2005; Hernández y Delgadillo, 2011; Parras-Huerta, 2015). La DA se emplea para obtener el uso benéfico de los residuos orgánicos en cuanto a conservación y recuperación de energía, la DA actúa a través de una serie de procesos microbiológicos complejos donde diversos tipos de bacterias trabajan en 4 etapas (véase Figura 1.8) siendo estas la hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Las bacterias que involucradas en el proceso de la DA son sensibles a las condiciones ambientales (temperatura, presión, etc.).

por lo que es importante equilibrar una variedad de factores para maximizar las posibilidades de lograr un diseño óptimo y una operación eficiente (Filer *et al.*, 2019). Durante la DA el producto principal obtenido (biogás) es una mezcla de gases CH_4 (50 a 70 %) y CO_2 (30 a 50 %) y pequeñas proporciones de otros componentes (N_2 , O_2 , H_2 y H_2S) (Angelidaki y Sanders, 2004). La porción de biogás producido es variable y oscila ~350 L/ kg de sólidos volátiles (Lorenzo y Obaya, 2005), el cual puede ser utilizado como comburente para el calentamiento o co-generación de electricidad y calor (Parras-Huerta, 2015).

1.4.1. Etapas de la digestión anaerobia

La DA es un proceso biológico natural en el que las bacterias deterioran la materia orgánica en ambientes con poco o nada de oxígeno. Además de la producción de energía renovable. Las ventajas de la DA incluye la minimización de emisiones de gases de efecto invernadero, olor, patógenos y la producción de un digestato líquido con capacidad fertilizante (González *et al.*, 2015). La DA consta de 4 etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis ver Figura 1.8. (Molino *et al.*, 2013, González *et al.*, 2015, Filer *et al.*, 2019).

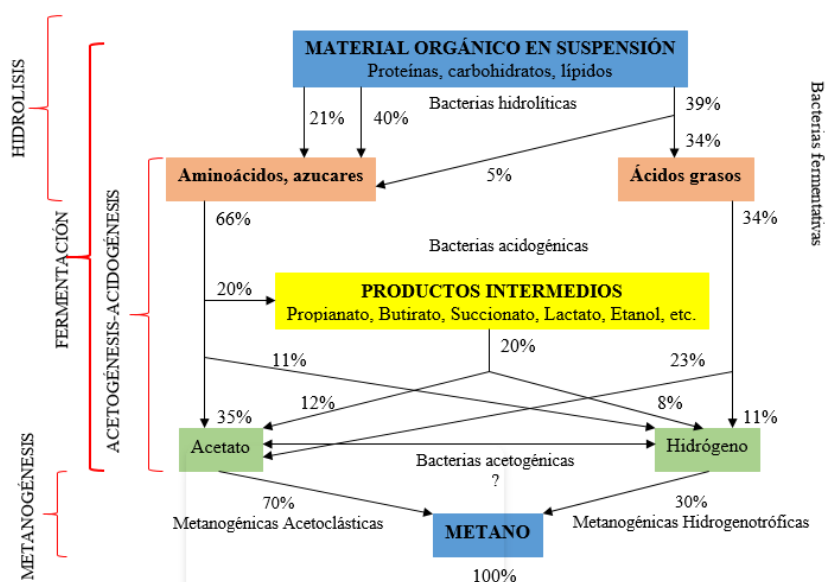


Figura 1.8 Secuencia metabólica y grupos microbianos que intervienen en la digestión anaerobia (Torres y Pérez, 2010).

La hidrólisis de la materia orgánica compleja (carbohidratos, proteínas y lípidos) se lleva a cabo mediante enzimas extracelulares que son excretadas por diferentes microorganismos. Estas moléculas hidrolizadas incluyen $\text{NH}_2\text{-R-COOH}$, $(\text{CH}_2\text{O})_n$, ácidos grasos de cadena larga (AGCL) y alcoholes. En las siguientes etapas, estas moléculas se convierten en ácidos grasos volátiles (AGV), hidrógeno y dióxido de carbono durante la acidogénesis y metanogénesis. La degradación de AGCL en acetato e hidrógeno se realiza por bacterias obligadas acetogénicas productoras de hidrógeno. Finalmente, la metanogénesis se lleva a cabo por las arqueas metanogénicas y es considerada como una fase limitante en la DA de los sustratos fácilmente degradables (González *et al.*, 2015).

- Hidrólisis

La materia orgánica polimérica no puede ser empleada directamente por los microorganismos a menos que se hidrolicen en compuestos solubles para que puedan ser absorbidos y utilizados por los microorganismos como sustrato y fuente de alimento. La hidrólisis de estas partículas se lleva a cabo por enzimas extracelulares excretadas por las bacterias fermentativas (Campos – Pozuelo, 2001), anaerobios estrictos como bacteroides, clostridium y bacterias facultativas como estreptococos (Adekunle *et al.*, 2015), que actúan en el exterior celular por lo que son consideradas exoenzimas, por lo tanto, la hidrólisis es la conversión de los polímeros en sus respectivos monómeros (Lorenzo y Obaya, 2005). Los microorganismos secretan diferentes enzimas lo que permite descomponer diferentes tipos de materia orgánica (Ecuaciones 1.4-1.7).

<i>Lípidos</i> → <i>Ácidos grasos</i>	1.4
<i>Polisacáridos</i> → <i>Monosacáridos</i>	1.5
<i>Proteínas</i> → <i>Aminoácidos</i>	1.6
<i>Ácidos nucleicos</i> → <i>Purinas y Pirimidina</i>	1.7

Por ejemplo, celulosa a azúcares o alcoholes y proteínas a péptidos o aminoácidos,

por enzimas hidrolíticas como lipasas, proteasas, celulasas, amilasas, etc., ver Tabla 1.3. (Molino *et al.*, 2013, Adekunle *et al.*, 2015). La velocidad de descomposición durante la etapa de hidrólisis dependerá de la naturaleza del sustrato (Adekunle *et al.*, 2015).

Tabla 1.3 Algunos grupos importantes de enzimas hidrolíticas y sus funciones (Adekunle *et al.*, 2015).

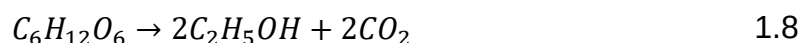
Enzima	Sustrato	Producto de descomposición
Proteinasa	Proteína	Aminoácidos
Celulasa	Celulosa	Celobiosa y glucosa
Hemicelulasa	Hemicelulosa	Azúcares: glucosa, xilosa, manosa y arabinosa
Amilasa	Almidón	Glucosa
Lipasa	Grasas	Ácidos grasos y glicerol
Pectinasa	Pectina	Azúcares: galactosa, arabinosa, ácido galacturónico

- Acidogénesis

En esta etapa las bacterias acidogénicas facultativas y obligatorias, convierten los productos de la hidrólisis en sustratos metanogénicos (Al Seadi *et al.*, 2008), los compuestos orgánicos solubles que comprenden los productos de la etapa anterior, son degradados en ácidos orgánicos de cadena corta tales como ácido acético (CH_3COOH), propiónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$), y butírico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) (Lorenzo y Obaya, 2005, Adekunle *et al.*, 2015). La acumulación de hidrógeno formado como producto intermedio contribuye en el producto final producido durante el proceso de digestión, durante esta fase los hidratos de carbono simples, ácidos grasos y aminoácidos son convertidos en ácidos orgánicos y alcoholes (Adekunle *et al.*, 2015, Parra-Huertas, 2015).

- Acetogénesis

Los productos de la acidogénesis, los cuales las bacterias metanogénicas no pueden convertir directamente en metano, son convertidos en sustratos metanogénico durante la acetogénesis (Al Seadi *et al.*, 2008) como ácidos grasos volátiles y alcoholes los cuales son oxidados en sustratos metanogénicos como acetato, hidrogeno y dióxido de carbono (Adekunle *et al.*, 2015, Parra-Huertas, 2015). La reacción de la acetogénesis se puede representar conforme a la siguiente Reacción 1.8 (Molino *et al.*, 2013).

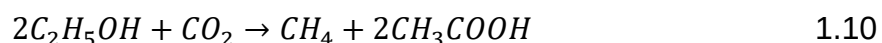


Los AGV de cadenas de carbono con más de dos unidades y los alcoholes con cadenas de carbono de más de una unidad son oxidados en acetato e hidrógeno (Al Seadi *et al.*, 2008, Parra-Huertas, 2015). Los procesos acetogénicos son energéticamente difíciles (Campos – Pozuelo, 2001), por lo que necesitan colaborar con el siguiente grupo de microorganismos formadores de metano (Adekunle *et al.*, 2015) u otros microorganismos consumidores de hidrógeno, ya que la energía libre de la reacción dependerá de la presión parcial del hidrogeno del medio (Campos, 2001). Durante la metanogénesis, el hidrógeno se convierte en metano, por lo tanto, la acetogénesis y la metanogénesis suelen ir en paralelo, como simbiosis de dos grupos de organismos (Al Seadi *et al.*, 2008).

- Metanogénesis

Es la fase limitante de la DA de sustratos fácilmente degradables, la lenta tasa de crecimiento de las archaeas da como resultado la acumulación de AGV y la inhibición de la actividad de los microorganismos metanogénicos (González *et al.*, 2015). En la fase metanogénica la producción de metano y dióxido de carbono se lleva a cabo por los productos intermediarios y por bacterias metanogénicas en condiciones anaeróbicas estrictas (Adekunle *et al.*, 2015).

El 70 % del metano formado se origina a partir del acetato, mientras que el 30 % se produce de la conversión de hidrógeno y dióxido de carbono de acuerdo a las Reacciones 1.9-1.11 (Al Seadi *et al.*, 2008, Molino *et al.*, 2013).



La metanogénesis está influenciada por las condiciones de operación, la composición de la materia orgánica, la tasa de alimentación, la temperatura y el pH (Al Seadi *et al.*, 2008). En esta fase se puede clasificar dos grupos de microorganismos en función del sustrato principal, tal es el caso de los hidrogenotróficos consumidores de hidrógeno y fórmico y los acetoclásticos consumidores del acetato, metanol y aminas (Campos – Pozuelo, 2001).

1.4.2. Digestión anaerobia en estado sólido

La DA se puede clasificar en tres categorías: húmeda, semiseca y seca o en estado sólido (SSAD por sus siglas en inglés) basado en los sólidos totales (ST) del sustrato (Jansson *et al.*, 2019, Arelli *et al.*, 2021). De acuerdo a lo anterior los digestores anaeróbicos se dividen en las siguientes categorías según el contenido de sólidos totales (ST): procesos húmedos (10 % ST), semisecos (10-20 % ST) y secos (>20 % ST) (Arelli *et al.*, 2018). La SSAD (ST > 15-20 %) ha alcanzado un gran interés de investigación a nivel mundial debido a sus ventajas, tales como un menor requerimiento de agua, un mayor rendimiento de metano y la generación de digestato espeso (ST entre 8 a 10 %) en comparación con DA húmeda (ST < 10 %) (Arelli *et al.*, 2021). Una comparación detallada se puede resumir en la Tabla 1.4. La SSAD es adecuada para sustratos como desechos agrícolas, desechos sólidos urbanos y desechos alimenticios, etc. siendo lo que contienen un alto contenido de ST (Arelli *et al.*, 2021). La SSAD ha comenzado a tener un rol importante en las áreas química, farmacéutica y ambiental para un desarrollo sustentable en la industria.

Tabla 1.4 Comparación detallada de la fermentación en estado sólido con la fermentación líquida (Chen, 2013).

Fermentación en estado sólido	Fermentación líquida
No hay agua libre y el contenido de agua del sustrato es bajo.	El agua es el componente principal del cultivo.
Los microorganismos absorben nutrientes del sustrato sólido húmedo; existe un gradiente de concentración de nutrientes.	Los microorganismos absorben nutrientes del cultivo líquido; no hay un gradiente de concentración de nutrientes.
El sistema de cultivo consta de tres fases (gas, líquido, sólido) y el gas es la fase continua.	El sistema de cultivo se compone principalmente de líquido; la fase líquida es la fase continua.
El tamaño de la inoculación es grande, $\geq 10\%$.	El tamaño de inoculación es pequeño, $\leq 10\%$.
El oxígeno requerido proviene de la fase gaseosa; bajo consumo de energía.	El oxígeno requerido proviene del oxígeno disuelto; hay una mayor cantidad de oxígeno disuelto.
Los microorganismos se adsorben o penetran en el sustrato.	Los microorganismos se distribuyen uniformemente en el sistema de cultivo
Al final de la fermentación, el medio es un sustrato en estado húmedo y las concentraciones de productos es alta	Al final de la fermentación, el medio es líquido, y las concentraciones de productos son bajas
Alta tasa de producción y alto rendimiento del producto	Baja tasa de producción y bajo rendimiento del producto.
La mezcla es difícil y el crecimiento del microorganismo está restringido por la difusión de nutrientes.	La mezcla es fácil y el crecimiento de microorganismos no está restringido por la difusión de nutrientes.
Heterogeneidad	Homogeneidad
Actividad de agua baja	Actividad de agua alta

A diferencia con la DA-líquida, la principal ventaja de la SSAD es un suministro suficiente de oxígeno, hay menos agua residual orgánica y mayor rendimiento de producto en la SSAD.

Se pueden crear productos de alto valor agregado mediante SSAD ocupando residuos industriales y agrícolas como sustrato. Actualmente los productos de SSAD incluyen alimentos tradicionales (vinagre, salsa de soja, especias aromatizantes); células microbianas (proteína unicelular, espirulina, hongos comestibles, etc.); enzimas microbianas (amilasa, glucosidasa, celulasa); y otros metabolitos microbianos (nucleótidos, lípidos, vitaminas, aminoácidos, etc.) (Chen, 2013).

1.4.3. Aplicaciones de la digestión anaerobia en estado sólido

La SSAD tiene la ventaja de una capacidad del tratamiento de materias primas, un consumo bajo de agua y una producción de metano a gran volumen (Li *et al.*, 2022). El ambiente sólido es muy similar al hábitat mohos (hongos filamentosos) por lo tanto la SSAD es una tecnología favorable que puede utilizar ampliamente los recursos renovables, a continuación, se describirá brevemente las diferentes aplicaciones de la SSAD:

- La SSAD en la industria farmacéutica y química

La SSAD demostrado amplias aplicaciones tal es el caso de la producción de ácido láctico y ácido cítrico mediante el cultivo de hongos filamentosos o bacterias utilizando como sustrato yuca, remolacha, bagazo y residuos agrícolas como sustrato. La SSAD se ha utilizado para la obtención de metabolitos secundarios como antibióticos (antibacterianos, antisépticos, etcétera), toxinas bacterianas, auxinas (hormonas vegetales), fármacos y alcaloides, así como otra variedad de productos para la producción de biosurfactantes, ácido glutámico, aminos, pigmentos, vitaminas, carotenoides y goma xantana entre otros (Chem, 2013).

- La SSAD aplicada a energía y protección ambiental

Los residuos agrícolas a veces son ricos en nutrientes propiciando un hábitat óptimo

para el crecimiento de microorganismos, por lo cual son utilizados para producir productos de alto valor. La SSAD se ha aplicado para la obtención de biocombustibles, biopesticidas, biotransformación y biorremediación. Otra aplicación es la biotransformación de cultivos y desechos para el mejoramiento en el valor nutricional, donde algunos residuos podrían usarse para producir sustancias ricas en proteínas. La biotransformación de sustratos lignocelulósicos en alimentos para animales tiene amplia aplicación (Chem, 2013).

1.4.4. Factores que influyen la SSAD

- Nutrientes

Los microorganismos anaerobios requieren de nutrientes como el carbono, nitrógeno, fósforo y minerales para su desarrollo. Cada uno tiene roles importantes como por el ejemplo, el carbono es fundamental para el crecimiento celular además de ser rico en materiales orgánicos. El nitrógeno y el fósforo desempeñan un papel en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y el amonio es la forma del nitrógeno que utilizan los microorganismos metanogénicos, pero en altos niveles inhibirán su crecimiento. La relación C/N juega un papel importante en el proceso de digestión, por lo que se recomienda una relación óptima de 25:1 (Steudler *et al.*, 2020).

- Relación inóculo – alimentación

Un factor importante en la SSAD es la relación F/I esto debido a que una carga demasiado alta puede provocar una sobreproducción de AGV por el exceso de cargas orgánicas conduciendo a un pH ácido y la inhibición de los microorganismos metanogénicos por lo que se recomienda una relación entre 2:1-5:1 de F/I (Steudler *et al.*, 2020).

- pH

Un pH óptimo para la SSAD es de 6.8-7.2. Sin embargo, los microorganismos requieren de diferentes pH, por ejemplo, los microorganismos acidogénicos requieren un pH de 5.5-6.5, a comparación de los metanogénicos que son activos en un pH 6.5-

8.2 con un pH óptimo de 7.0 (Steudler *et al.*, 2020). La capacidad buffer de un sistema de DA para mantener la variación de pH es evaluando la alcalinidad y juega un papel importante en la biodegradación anaeróbica que influye en la actividad de las enzimas hidrolíticas y en el crecimiento de microorganismos metanogénicos (Angelidaki y Sanders, 2004, Al Seadi *et al.*, 2008).

- Temperatura

La temperatura es un parámetro que afecta la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos (Angelidaki y Sanders, 2004), así como al rendimiento del proceso, dependiendo del rango de temperatura en el que los microorganismos trabajen eficazmente (Sáez-Rico, 2017). La SSAD opera comúnmente en condiciones mesófilas ($\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) o termófilas de ($\sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$). Un rendimiento de metano (CH_4) durante la SSAD-termofílica es alta comparándola con la SSAD-mesófila debido a que los microorganismos metanogénicos también crecen en óptimas condiciones de $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Steudler *et al.*, 2020).

- Inhibidores

Existe una gran variedad de compuestos que inhiben la SSAD provocando cambios en los microorganismos, inestabilidad del proceso y rendimientos bajos de CH_4 . La materia orgánica degradable conduce a una rápida hidrólisis y acidificación, causando una producción excesiva de AGV que inhibe a los metanógenos (Steudler *et al.*, 2020). El amoníaco libre es producto de la degradación de los compuestos nitrogenados, es esencial para el crecimiento bacteriano y la neutralización de AGV, además es la principal causa de la inhibición debido a su permeabilidad en la membrana celular y en la fase de metanogénesis (Chen *et al.*, 2008). Los iones de metales como sodio, potasio, calcio y magnesio pueden ser liberados por la descomposición de la materia orgánica, son necesarios para el crecimiento microbiano, aunque también afectan la tasa de crecimiento como cualquier otro nutriente a altas concentraciones. Otros inhibidores son los metales pesados como el cromo, hierro, cobalto, cobre, zinc, cadmio y níquel, una característica de estos metales es que no son biodegradables,

por lo que pueden llegar a acumularse en concentraciones potencialmente tóxicas provocando alteraciones y/o fallas en el digestor (Chen *et al.*, 2008).

- Agitación

La velocidad de agitación puede afectar la generación de gas, una velocidad alta puede quebrar los agregados de microorganismos y los flóculos que se pudieron haber formado disminuyendo así la cantidad de gas generado (Campos, 2001).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describirá la metodología ver Figura 2.1 y las determinaciones a seguir para el cumplimiento de los objetivos propuestos a este tema de investigación.

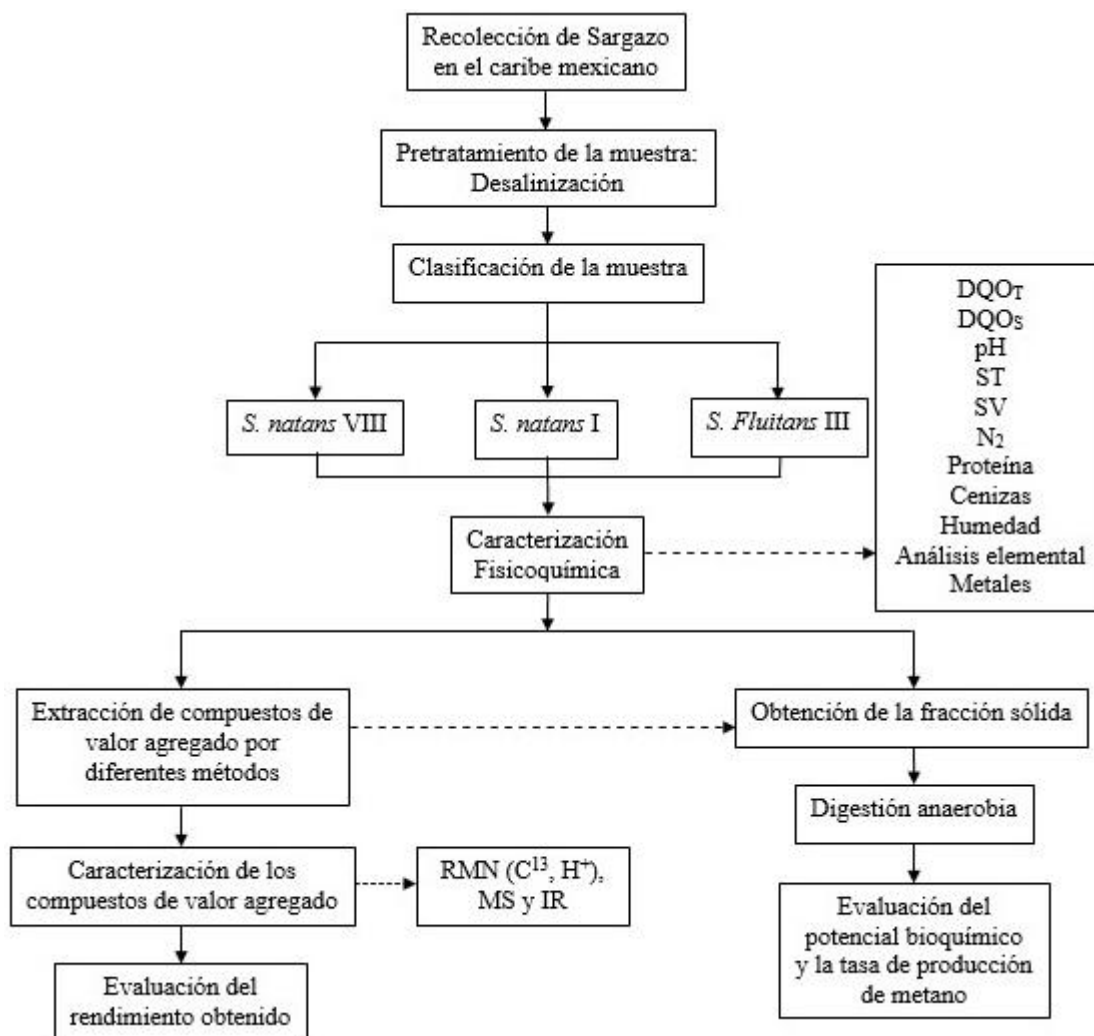


Figura 2.1 Metodología general a desarrollar durante el proyecto.

2.1. Muestreo y recolección de la biomasa sólida de sargazo

La recolección de la biomasa se realizó en dos diferentes fechas con una diferencia de 30 días entre cada recolección, siguiendo los reportes del semáforo de la Red de Monitoreo del Sargazo de Quintana Roo (Organización no gubernamental), donde se publica diariamente las Playas con más presencia de biomasa sólida de sargazo para recolección y muestreo. Para poder recolectar la biomasa en el litoral adyacente a la costa del Caribe, se emitió un escrito dirigido a la Zona Federal Marítimo Federal (ZOFEMAT). Se recolectó aproximadamente 20 kg de biomasa en peso húmedo. Se transportó la biomasa con bolsas de hielo gel de 400 ml de la marca Thincol como refrigerante y se almacenó en bolsas de polietileno de alta densidad con zipper y válvula de 11x16" /27.9x40.6 cm y un volumen aproximado de 1 gal/ 3.79 L de la marca V Vesta precision, y se sellaron al vacío con una selladora de mano de la marca V Vesta precision-Vac' n Seal. La biomasa recolectada se almaceno y se congelo hasta su posterior análisis.

2.1.1. Pretratamiento y clasificación de la biomasa

La biomasa pelágica se lavó y enjuago con agua potable para desalinizar, eliminar arena, restos de coral y conchas. posteriormente se separó en sus formas de *S. natans I*, *S. natans VIII* y *S. fluitans III* conforme lo descrito por Schell *et al.*, 2015. La biomasa fue procesada para reducir el tamaño como se describe a continuación, se trituró por separado las especies *S. natans I*, *S. natans VIII* y *S. fluitans III* en una procesadora de alimentos marca Oster modelo BLSTXPN7003 (Xpert Series™ Oster, China) con una potencia de 2 HP con cuchillas quirúrgicas para reducir el tamaño de la muestra aproximadamente de 1 a 2 mm durante 20-30 segundos con una dilución 1:1 con agua destilada, posteriormente se separó la fracción líquida (FL) de la fracción sólida (FS) utilizando una malla de nylon con tamaño de poro de 150 µm. Finalmente, la biomasa sólida se secó en una estufa de secado marca Riossa a 60 ± 2 °C hasta peso constante.

2.2. Caracterización fisicoquímica de la biomasa sólida de sargazo

En la Tabla 2.1 se resume los análisis fisicoquímicos realizados a la FS de la biomasa de sargazo.

Tabla 2.1 Métodos para el análisis de la biomasa sólida de sargazo

Determinación	Unidad	Método
Sólidos Totales (ST)	%	Método gravimétrico 2540 G Standard Methods
Sólidos Totales Volátiles (STV)		
Cenizas		
Humedad	%	NMX-AA-16-1984
pH	-	NMX-AA-013-SCFI-2006
Nitrógeno Total	%	NMX-AA-24-1984
Proteína	%	AOAC 2001.11
Fibra	%	AOAC 985.29
Grasas	%	AOAC 920.39

2.3. Extracción de alginatos

Los alginatos son polisacáridos que se encuentran en las algas pardas y están compuestos por polímeros lineales de ácidos β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G). la secuencia de monómeros (M, G) cambia mucho dependiendo de la fuente (especies de algas o tejido). Para extraer los alginatos se realizó el procedimiento descrito por Fertah *et al.*, 2017 con algunas modificaciones, ver Figura 2.2, las muestras de *S. natans I*, *S. natans VIII*, *S. fluitans III* y mezcla de ambas, fueron secadas a 60 ± 2 °C hasta peso constante. Se hidrataron en una solución de formaldehído al 2 % v/v durante 24 horas para la eliminación de pigmentos. Transcurrido el tiempo de hidratación se filtró y se lavó con agua destilada y se agregaron a una solución de ácido clorhídrico 0.2 M y se dejaron reposar durante otras 24 horas.

Transcurrido el tiempo se filtraron y se lavaron nuevamente las muestras con agua destilada, las fracciones solidas se colocaron en una solución al 2 % p/v de carbonato de sodio Na_2CO_3 haciendo referencia a los trabajos de Torres *et al.*, 2007. Las fracciones solubles recolectadas se centrifugaron y los polisacáridos se precipitaron con etanol al 95 %, el precipitado se lavó dos veces con acetona y se repurificó con etanol y se secó a temperatura ambiente.

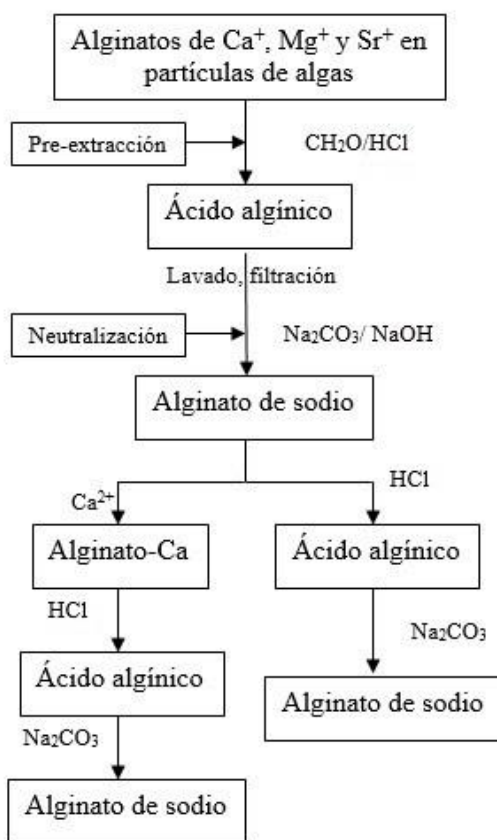


Figura 2.2 Proceso de extracción y aislamiento del alginato de sodio de sargazo (Stephen *et al.*, 2006).

2.4. Determinación de nitrógeno total

El método Kjeldahl fue dividido en tres procesos básicos de acuerdo con la norma mexicana NMX-AA-24-1984. La digestión: para la descomposición del nitrógeno orgánico se emplearon de 30-50 mg de muestra, sulfato de potasio y sulfato de cobre

como catalizador y ácido sulfúrico (H_2SO_4) en un digestor modelo MDD-08-P. El resultado final es una disolución de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La destilación: se empleó un micro-destilador Labconco modelo 65000, donde se adiciono un exceso de álcali (NaOH) a la mezcla ácida de digestión para convertir NH_4^+ en NH_3 donde la ebullición y la condensación del NH_3 gaseoso se recibe en una solución conocida de ácido bórico al 4%. La cuantificación: la cantidad de N_2 en la muestra se calcula cuantificando los iones amonio presentes en la solución de ácido bórico y titulándose con ácido sulfúrico 0.02 N. el porcentaje de nitrógeno se calculó mediante la Ecuación 2.1.

$$\%N = \frac{G * N * 0.14}{M} * 100 \quad 2.1$$

Donde:

G = mililitros de ácido gastados en la titulación.

N = normalidad del ácido empleado en la titulación.

0.14 = miliequivalente del nitrógeno.

M = peso de la muestra, en mg.

2.5. Determinación de proteína

La materia orgánica se digiere con un ácido mineral (H_2SO_4) para convertir la proteína en sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mediante un punto de ebullición elevado por la adición de sulfato de potasio (K_2SO_4) y sulfato de cobre (CuSO_4) como catalizador. El amoniaco es liberado por destilación alcalina con vapor y se cuantifica volumétricamente con ácido estandarizado. El contenido de proteína en la biomasa se estima a partir del nitrógeno presente multiplicando por un factor. Un factor de 6.25 (Milledge *et al.*, 2020). El porcentaje de proteína se calculó mediante la Ecuación 2.2.

$$\% P = \%N * F \quad 2.2$$

Donde:

% P = porcentaje de proteína

% N = porcentaje de nitrógeno

F = factor de conversión

2.6. Análisis elemental C, H, O, N, S

El análisis elemental se determinó mediante un analizador por combustión (Elementar, vario Macro cube, Langenselbold, Germany) con capacidad para determinar nitrógeno (N), carbono (C), hidrógeno (H) y azufre (S), el contenido de oxígeno se realizó por diferencia de peso de acuerdo por Tadesco y Daniel, 2019, para el pesado de las muestras se utilizó una Microbalanza (Mettler Toledo, modelo XP6, Greifensee, Switzerland).

2.7. Análisis inorgánico y metales

La determinación de calcio (Ca), cobre (Cu), hierro (Fe), magnesio (Mg), potasio (K), Sodio (Na), zinc (Zn) y manganeso (Mn) de la biomasa sólida de sargazo fueron analizadas mediante los métodos EPA3051a y EPA6010 vigentes. La concentración elemental se determinó por un espectrómetro de absorción atómica (PerkinElmer, AAnalyst 400 AA, Waltham, MA, USA). La determinación de fósforo (P) se determinó por colorimetría a través de un espectrómetro UV-Vis (PerkinElmer, Lambda 25, Waltham, MA, USA).

2.8. Determinación de carbohidratos

El contenido de carbohidratos se realizó por diferencia de peso de acuerdo a la Ecuación 2.3 descrita por Oyesiku y Egunyomi, 2014.

$$\text{CHO (\%)} = 100 - \% \text{ Humedad} + \% \text{ Cenizas} + \% \text{ Grasas} + \% \text{ Proteína} + \% \text{ Fibra} \quad 2.4$$

2.9. Aclimatación del inóculo

El inóculo utilizado se recolectó del efluente de un reactor de lecho fijo a escala piloto de un volumen útil de 1000 L operado a temperatura ambiente, ubicado en el Instituto Tecnológico de Orizaba ($18^{\circ}51'19.887$ N – $97^{\circ}5'53.85$ O). El inóculo se trasladó al laboratorio de ambiental I, incubándose a una temperatura mesofílica de $35 - 40$ °C. El inóculo se caracterizó fisicoquímicamente (ST, SVT, cenizas y pH) de acuerdo con Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Antes de ser utilizado el inóculo se desgasificó durante 7 días. El pH del inóculo fue de 7.02 ± 0.01 , el contenido de cenizas fue de 31.71 ± 0.75 , sólidos totales (ST) fue de 3.88 ± 0.08 %, sólidos volátiles (SV) fue de 2.65 ± 0.07 %, Demanda Química de Oxígeno total (DQO_T) fue de 74.12 ± 1.23 %, Demanda Química de Oxígeno soluble (DQO_S) fue de 48.9 ± 1.27 %.

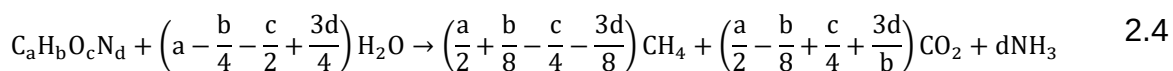
2.10. Actividad metanogénica específica (AME)

La cuantificación de la Actividad Metanogénica Específica (AME) fue de acuerdo a la metodología descrita por Torres *et al.*, 2010 con algunas modificaciones. Los biorreactores consistían en matraces Erlenmeyer de 125 mL con un volumen de trabajo de 112 mL, los cuales fueron llenados con la FS y RFS. Se montó a parte un control positivo (C+) con sacarosa como referencia para la producción de biogás y fuente de carbono. El volumen del inóculo y del sustrato adicionado se calculó a una relación 2:1 en función de los sólidos volátiles mediante la aplicación web Online Biogas App (OBA; <https://biotransformers.shiny3.apps.io/oba1/>). Los reactores se ajustaron al inicio de cada ensayo a un pH de 7.06 ± 0.09 y se purgaron con N_2 al 99.9 % (Praxair México S. de R.L. de C.V.) durante 2 minutos para desplazar el oxígeno presente y crear condiciones anaerobias. La temperatura de incubación de los reactores fue de 35 ± 2 °C hasta que la producción de biogás fue <1 % del volumen acumulado. Durante los días de incubación el reactor se agito constantemente a 600 rpm. En los ensayos AME en los que se aplicara agitación se requiere que la concentración del inóculo sea de $2.0 - 5.0$ gSVT/L (Torres *et al.*, 2010) para que el inóculo garantice un eficiente contacto entre la biomasa y el sustrato.

Los resultados se expresaron en ml como el volumen de gas en condiciones estándar (273 K y 1 atm), los ensayos y mediciones se realizaron por duplicado ($n=2$).

2.11. Cálculos estequiométricos

El potencial bioquímico teórico de metano (TBMP) y la fórmula empírica ($C_aH_bO_cN_d$) se determinó a partir de la composición elemental presente en la biomasa sólida de sargazo empleando la ecuación de Buswell (Ecuación. (2.4)) y la ecuación de Boyle (Ecuación. (2.5)) (Mhatre *et al.*, 2019 y Anchinas *et al.*, 2016).



$$\text{Rendimiento teórico de metano} = \frac{\left(\frac{a}{2} + \frac{b}{8} - \frac{c}{4} - \frac{3d}{8}\right) * 22.4}{12a + b + 16b + 14c} \left(\frac{mLCH_4}{gSV}\right) \quad 2.5$$

Donde 22.4 es el volumen (L) de 1 mol de gas a temperatura y presión estándar.

2.12. Análisis espectroscópicos

2.12.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Los espectros de FT-IR del alginato de sodio se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro (Thermo Fischer Scientific, Nicolet™ iS™50, Waltham, MA, USA) en pellets de KBr al 10 % w/w. Las muestras se secaron al vacío durante 8 horas a 56 °C. Se tomaron un total de 32 barridos a una resolución de 4 cm⁻¹ a una región de 4000-400 cm⁻¹ a temperatura ambiente.

2.12.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (¹H RMN)

El espectro de RMN de las muestras de alginato de sodio se determinaron en un espectrómetro (Bruker, Avance III™ 500 MHz, Billerica, MA, USA) y se disolvieron en agua deuterada o dióxido de deuterio (D₂O). Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm), referidos al TMS (tetrametil silano) que corresponde a la señal del disolvente de referencia interna.

2.12.3. Espectrometría de masas de desorción/ ionización laser asistida por matriz en un tiempo de vuelo (MALDI – TOF/MS)

El análisis por MALDI – TOF se realizó en espectrómetro de masas (Bruker Microflex®, LRF, Billerica, MA, USA) equipado con un láser de nitrógeno (337 nm), el análisis fue llevado a cabo en modo ión positivo del espectro de masas para los datos sobre un rango de masa de 1000 a 200,000 Da. Las condiciones operativas fueron lineales con una polaridad positiva y un voltaje de 20 kV de aceleración.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Muestreo y recolección de la biomasa sólida de sargazo

La primera recolección se llevó a cabo el día 5 de julio de 2022 de acuerdo con la Norma Mexicana NMX-AA-15-1985 (Protección al ambiente-Contaminación del suelo-Residuos Sólidos Municipales-Muestreo-Método de Cuarteo, en el municipio de Solidaridad-Playa del Carmen, Qroo., México, escogiendo como puntos de muestreo en playa fundadores (latitud 20°37'14.833" N longitud 87°4'28.645" O) y Playacar (latitud 20°36'51.171" N longitud 87°4'45.005" O). El segundo muestreo se llevó a cabo el día 3 de agosto de 2022 en playa delfines (latitud 21°3'43.286" N longitud 86°46'45.179" O) de la ciudad de Cancún perteneciente al municipio de Benito Juárez. Estos dos puntos de recolección fueron seleccionados debido a que fueron las zonas reportadas con mayor presencia de biomasa ver Figura 3.1. El muestreo en Playa del Carmen se realizó a pie de playa y en Cancún el muestreo se realizó a 10 metros mar adentro.

Se tomó aproximadamente 20 kg de biomasa en peso húmedo en cada recolección, transportándolas con bolsas de hielo gel de 400 ml de la marca Thincol como refrigerante y almacenando en bolsas de polietileno de alta densidad con zipper y válvula de 11x16" /27.9x40.6 cm y un volumen aproximado de 1 gal/ 3.79 L de la marca V Vesta precision, y sellándolas al vacío con una selladora de mano de la marca V Vesta precision-Vacín Seal. La biomasa recolectada se almacenó y se congeló hasta su posterior análisis. Para poder recolectar la biomasa en el litoral adyacente a la costa del Caribe, se emitió un escrito dirigido a la Zona Federal Marítimo Federal (ZOFEMAT) obteniendo respuesta satisfactoria de los municipios de Benito Juárez-Cancún, Solidaridad-Playa del Carmen, Tulum y Cozumel.



Figura 3.1 Sitios de recolección y muestreo de la biomasa sólida de sargazo en Playa del Carmen. QROO (foto izquierda) y playa delfines en Cancún (foto derecha).

3.2. Clasificación de la biomasa sólida de sargazo

Durante la llegada masiva de la biomasa de sargazo a las playas del Caribe mexicano en verano de 2022, se identificaron dos tipos de biomasa *S. fluitans* III y una de estas especies con dos morfologías pelágicas distintas: *S. natans* I y *S. natans* VIII (Figura 3.2).



Figura 3.2 Clasificación de la biomasa de sargazo recolectada conforme a sus características morfológicas A) *S. natans* VIII, B) *S. natans* I y C) *S. fluitans* III.

De acuerdo con García-Sánchez *et al.*, 2020 la biomasa de la especie *S. fluitans III* presenta espinas en el tallo lo que la diferencia de los morfotipos *S. natans I* y *S. natans VIII* las cuales son de tallos lisos, además estos morfotipos se diferencia una de otra por la forma de las vejigas que les confiere la capacidad de flotar y en el tamaño de las hojas, siendo más anchas en el morfo tipo *S. natans VIII*.

S. fluitans III y *S. natans I* fueron las especies más comunes recolectadas en Cancún y Playa del Carmen, oscilando entre 8 – 84 % y 27 – 67 % de la biomasa fresca recolectada, mientras que la especie *S. natans VIII* fue de 6 – 8 % (Figura 3.3).

a)



b)



Fig. 3.3 Composición proximal de la biomasa sólida de sargazo en Playa del Carmen (a) y Cancún (b).

Vázquez-Delfín *et al.*, 2021 reportaron valores para *S. fluitans III* del 81 %, *S. natans I* 15 % y *S. natans VIII* del 4 % en el mismo sitio de recolección (Playa delfines, Cancún). Sin embargo, García-Sánchez *et al.*, 2020 reportaron desde 2016 que la composición de la biomasa comprendía solo las especies *S. fluitans III* y *S. natans VIII*, siendo *S. fluitans III* la más predominante durante todo su periodo de estudio con un promedio >60 %. De 2016 a 2019 *S. natans VIII* disminuyó su abundancia de 41 a 3 %, *S. natans I* empezó a tener registro en 2018 aumentando su presencia relativa entre 23 % a 31 % en 2019. La biomasa sólida de sargazo suele estar conformada por la mezcla de

sus especies y morfotipos, pero la abundancia varía según la región, por ejemplo, la especie *S. natans I* predomina en el mar de los sargazos, *S. natans VIII* es una especie poco común en el mar de los sargazos, predominando en las corrientes de las Antillas, el Atlántico tropical occidental y el Caribe oriental, mientras que *S. fluitans III* es la más común de las especies. Por lo tanto, conocer la composición de las especies de la biomasa sólida de sargazo nos puede proporcionar indicadores sobre el origen de dicha biomasa (García et al., 2020).

3.3. Caracterización fisicoquímica de la biomasa sólida de sargazo

Los estudios acerca de la composición fisicoquímica de la biomasa sólida de sargazo, son limitados cuando se aplican a las especies *S. natans* y *S. fluitans* debido a que los análisis de la composición fisicoquímica se encuentran en muestras mixtas y no por especie. Esta composición fisicoquímica de dichas especies, así como el de otras muchas algas varían de acuerdo con la ubicación geográfica y la estación del año (Amador et al., 2021 y Barbot et al., 2016). En la tabla 3.1 se resume la composición proximal de las especies *S. natans I*, *S. natans VIII* y *S. fluitans III* recolectadas en los municipios de Playa del Carmen y Cancún.

El contenido de humedad es un parámetro importante por considerar cuando esta biomasa sólida se emplea para bioprocesos (Amador et al., 2021). El alto contenido de humedad > 90 % encontrado en *S. natans I*, *S. natans VIII* y *S. fluitans III* de las especies recolectadas en Cancún son datos aproximados a los reportados en bibliografía. Park et al., 2008 y Barbot et al., 2016 reportan que el contenido típico de agua en la biomasa sólida de las algas pardas oscila entre 79 – 90 % del peso húmedo y estos valores pueden variar debido a que las algas pardas son las especies con el mayor contenido de agua. Milledge et al., 2020 reportó valores próximos de las mismas especies obtenidas de Islas Turcas y Caicos las cuales mostraron porcentaje de humedad que oscilaba entre 82 – 87 % de la biomasa total. Sin embargo, se observó que el contenido de humedad fue menor en las muestras sargazo recolectadas en Playa del Carmen con ~83 %, es posiblemente que se deba a que la muestra estuviese secándose por efecto del sol ya que las muestras fueron recolectadas en playa y no

mar adentro como la biomasa en Cancún.

Tabla 3.1 Composición fisicoquímica de diferentes especies de biomasa sólida de sargazo

Cancún			
Parámetro	<i>S. natans I</i>	<i>S. natans VIII</i>	<i>S. fluitans III</i>
Humedad (%)	93.26 ± 0.39	94.46 ± 2.04	93.17 ± 1.30
ST (%)	85.52 ± 0.39	91.16 ± 2.04	89.76 ± 1.30
SV (%)	85.10 ± 0.36	86.46 ± 0.16	82.44 ± 0.30
Cenizas (%)	16.07 ± 0.36	14.58 ± 0.18	15.84 ± 0.30
DQO _T (g/L)	54.43 ± 7.61	9.63 ± 2.16	51.17 ± 5.06
DQO _s (g/L)	10.97 ± 4.19	6.45 ± 2.00	3.28 ± 0.65
Proteína (%)	5.81 ± 0.41	4.92 ± 0.25	5.00 ± 0.31
Grasas (%)	0.42 ± 0.03	0.51 ± 0.08	0.36 ± 0.02
Carbohidratos (%)	51.35 ± 0.43	49.20 ± 0.33	46.36 ± 0.09
Fibra (%)	22.31 ± 0.41	20.69 ± 0.72	16.61 ± 0.02
pH	7.34 ± 0.02	6.40 ± 0.06	7.16 ± 0.03
Playa del Carmen			
Humedad (%)	83.44 ± 1.07	83.84 ± 0.95	83.66 ± 0.53
ST (%)	94.42 ± 1.07	94.95 ± 0.95	94.49 ± 0.53
SV (%)	77.37 ± 0.44	83.24 ± 0.13	77.85 ± 0.43
Cenizas (%)	22.63 ± 0.44	16.76 ± 0.13	22.15 ± 0.43
Proteína (%)	6.04 ± 0.15	3.30 ± 0.05	5.98 ± 0.48
pH	6.73 ± 0.14	6.36 ± 0.16	6.88 ± 0.10

El contenido de cenizas en la biomasa sólida del sargazo puede variar entre valores reportados del 18 – 55 % en base seca. Milledge *et al.*, 2020 reportaron valores que oscilan entre 34 – 47 % en base seca en las especies de *S. natans* y *S. fluitans* recolectadas en Islas Turcas y Caicos. Oyesiku y Egunyomi, 2014 reportaron valores aproximados de 9 % de cenizas en muestra mixta recolectada en Nigeria, este valor está muy por debajo de los reportados en bibliografía. En esta investigación se observaron los valores de cenizas en dos sitios de recolección son diferentes, encontrando que el contenido de las muestras recolectadas en Cancún oscila entre 14 – 16 % mientras que en las muestras recolectadas en Playa del Carmen oscila entre 16 – 22 % debido a que la biomasa puede contener grandes cantidades de sales inorgánicas, ya que contiene polisacáridos capaces de captar compuestos presentes en su hábitat (Amador *et al.*, 2021).

El porcentaje de sólidos totales fue mayor en las muestras recolectadas en Playa del Carmen donde se observó que mantuvo un porcentaje del 94 % entre cada especie, mientras que en las muestras recolectadas en Cancún variaron entre especie siendo *S. natans VIII* con 91.16 ± 2.04 %, mientras que *S. natans I* (85.52 ± 0.39) y *S. fluitans III* (89.76 ± 1.30) fueron menores. Sin embargo en los sólidos volátiles no hubo estadísticamente una diferencia ya que en las tres especies de estudio se encuentran entre 77.37 ± 0.44 y 86.46 ± 0.16 % respectivamente. Los ST y SV son parámetros importantes debido a que a concentraciones superiores al 50 % se consideran valores idóneos para la DA en la producción de biogás como, metano, dióxido de carbono, etc. (Wang *et al.*, 2016).

El contenido de proteína varía según la especie, el área geográfica, la estación o las condiciones ambientales (Balboa *et al.*, 2016), siendo generalmente menor en las algas marrones (3 ± 15 % del peso seco) comparado con las algas rojas o verdes (10 ± 47 % del peso seco) (Patarra *et al.*, 2011). Las proteínas son interesantes por su valor nutricional con funciones estructurales, en la biomasa sólida del sargazo de Cancún se reporta que en sus tres especies arroja valores que oscilan entre 5.81 ± 0.41 % (*S. natans I*), 4.92 ± 0.25 % (*S. natans VIII*) y 5.00 ± 0.28 % (*S. fluitans III*)

siendo similares los resultados de acuerdo con Patarra *et al.*, 2011, y con los encontrados por Milledge *et al.*, 2020 con las mismas especies de estudio donde reporta valores que van del 3 al 17 %. Sin embargo, en Playa del Carmen se observó que si hay diferencia significativa entre el contenido de proteína entre especies donde el mayor porcentaje encontrado fue <6 % atribuido a las biomásas sólidas de *S. natans I* y *S. fluitans III*. La proteína en la biomasa sólida del sargazo constituye una fuente común de alimento para animales. Los diferentes métodos de análisis y la cantidad variable de proteína generan incertidumbre para la estimación real en las diferentes biomásas sólidas del sargazo (Amador *et al.*, 2021).

Los lípidos es uno de los componentes minoritarios en las algas marinas con valores inferiores al < 5 % en base seca (Amador-Castro *et al.*, 2021, Roesijadi *et al.*, 2010), gran parte del contenido de lípidos se conforma por ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's). Las algas marinas poseen ácidos grasos esenciales, que permite una alternativa como suplemento dietético o parte de una dieta (McArtain *et al.*, 2007). Los estudios indican que el contenido de lípidos en las especies *S. natans* y *S. fluitans* oscilan entre 0.01 – 4.56 % del peso seco del alga. En esta investigación se reportan valores de entre 0.36 – 0.51 %. Vázquez *et al.*, 2021 reporto valores de hasta 3.4 % un valor superior a los encontrados por Oyesiku y Egunyomi, 2014 de 2.75 %.

En la presente investigación se encontró que el contenido de fibra en la biomasa recolectada en Cancún fue de 16 – 22 %. Las biomásas de algas pueden ser una fuente valiosa de fibras utilizada en la dieta humana (Hernández-López *et al.*, 2014). Está biomasa posee grandes cantidades de carbohidratos como alginatos y polisacáridos sulfatados los cuales son considerados como fibras que en gran medida no pueden ser digeridos por el ser humano (Amador-Castro *et al.*, 2021). Además, la determinación de fibra puede ser un factor esencial para las reacciones posteriores en la DA para la producción de CH₄, (Hernández – López, 2014). Milledge *et al.*, 2020 reportó que el contenido de fibra en las especies de estudio es entre 31 – 37 % lo que equivale que un gran porcentaje de valor energético no está disponible para los seres humanos y animales de estómago simple.

La biomasa sólida del sargazo es fuente de dos tipos de polisacáridos: estructurales y de almacenamiento. La celulosa, hemicelulosa y xilanos son ejemplos de polisacáridos estructurales análogos a las plantas terrestres, los de almacenamiento son aquellos que incluyen alginatos, fucoidanos y carragenina (MacArtain *et al.*, 2017). Los carbohidratos representan el 25 – 60 % del peso seco, aunque también pueden oscilar de 30 – 50 % (Amador-Castro *et al.*, 2021, Devault *et al.*, 2021). Sin embargo, las especies *S. natans* y *S. fluitans* son ricos en carbohidratos alcanzando valores de hasta el 78 % según lo reportado por Milledge *et al.*, 2020. En este trabajo se reportaron valores desde 41 – 56 % de carbohidratos valor semejante a lo reportado por Oyesiku y Egunyomi (2014) con un porcentaje de 57.3 ± 0.21 . Por lo que esta biomasa fuente de carbohidratos e pueden ser aprovechados para la producción de etanol y bioplásticos por acción microbiana (Davis *et al.*, 2021).

En la Tabla 3.2 se resume la composición de sales inorgánicas y metales presentes por especie de sargazo.

Tabla 3.2 Análisis inorgánico y metales presentes en la biomasa sólida de sargazo

Determinación/ especie	<i>S. natans I</i>	<i>S. natans VIII</i>	<i>S. fluitans III</i>
Calcio (CaO, mg/Kg)	66040.0	66800.0	70210.0
Magnesio (MgO, mg/Kg)	4450.0	17540.0	13310.0
Sodio (Na ₂ O, mg/Kg)	0.4470	4340.0	17190.0
Potasio (K ₂ O, mg/Kg)	4470.0	7600.0	8070.0
Fósforo (P ₂ O ₅ , mg/Kg)	660.0	670.0	450.0
Hierro (Fe, mg/Kg)	80.0	31.0	90.0
Cobre (Cu, mg/Kg)	10.0	6.0	10.0
Zinc (Zn, mg/Kg)	50.0	29.0	30.0
Manganeso (Mn, mg/Kg)	60.0	61.0	50.0
Total	75820.447	97077.0	109410.0

La concentración mineral de la biomasa sólida de sargazo en este estudio demuestra que la especie con mayor concentración es *S. fluitans III* con un total de 109,410 mg/Kg, esto tiene como limitación al ser considerada una alternativa a la alimentación humana y animal, así como la fabricación de compostas y fertilizantes, debido a que las formas orgánicas e inorgánicas de metales y metaloides tienen diferentes grados de toxicidad (Davis *et al.*, 2021). La acumulación de componentes inorgánicos puede estar relacionada con factores que tiene la biomasa de sargazo desde su florecimiento de origen hasta alcanzar la playa, donde esta es sometida a condiciones ambientales diversas como la temperatura, salinidad, pH, etc. La biodisponibilidad de compuestos inorgánicos puede ser afectada por la capacidad de absorción de la biomasa influenciada por la edad del tejido y la composición estructural (Vázquez–Delfín *et al.*, 2021, Thompson *et al.*, 2020). Salgado – Hernández *et al.*, 2022 reportó una concentración de 168,600.0 mg/ kg en la fracción sólida de la mezcla de *sargassum*. Para la DA los macronutrientes (p. ej. Na, K, Mg, Ca y P) son importantes durante el crecimiento de las bacterias anaerobias, así como su actividad metabólica y estabilidad del biorreactor (Wall *et al.*, 2014). Sin embargo, una alta concentración de sodio de 17190.0 mg/ kg presente en la especie de *S. fluitans III* puede inhibir el crecimiento y la función metabólica de los metanógenos deshidratando las células mediante la presión osmótica (Thompson *et al.*, 2020).

3.4. Extracción del alginato de sodio

Para la extracción del polisacárido (alginato de sodio) de las tres especies *S. natans I*, *S. natans VIII* y *S. fluitans III*, se utilizó el método de extracción reportado por Fenoradosa *et al.*, 2010 y Fertha *et al.*, 2017. Estos dos métodos se seleccionaron debido a que se obtienen rendimientos entre 10 – 50 %. La primera etapa consistió en triturar las especies *S. natans I*, *S. natans VIII* y *S. fluitans III* en una procesadora de alimentos marca Oster modelo BLSTXPN7003 (Xpert Series™ Oster, China) con una potencia de 2 HP con cuchillas quirúrgicas para reducir el tamaño de la muestra aproximadamente de 1 a 2 mm durante 20-30 segundos con una dilución 1:1 con agua destilada, el propósito de reducir la biomasa sólida del sargazo tiene como principal

ventaja que, durante el tratamiento con formol, ácido y álcali puedan penetrar más a fondo y extraer rápidamente de las paredes celulares de la biomasa si se ha reducido su tamaño (McHugh, 1987). Posteriormente se separó la fracción líquida (FL) utilizando una malla de nailon con tamaño de poro de 150 μm , como se muestra en la Figura 3.4 A y B. Finalmente la biomasa sólida se secó en una estufa de secado marca Riossa a 60°C hasta peso constante ver Figura 3.4 C.

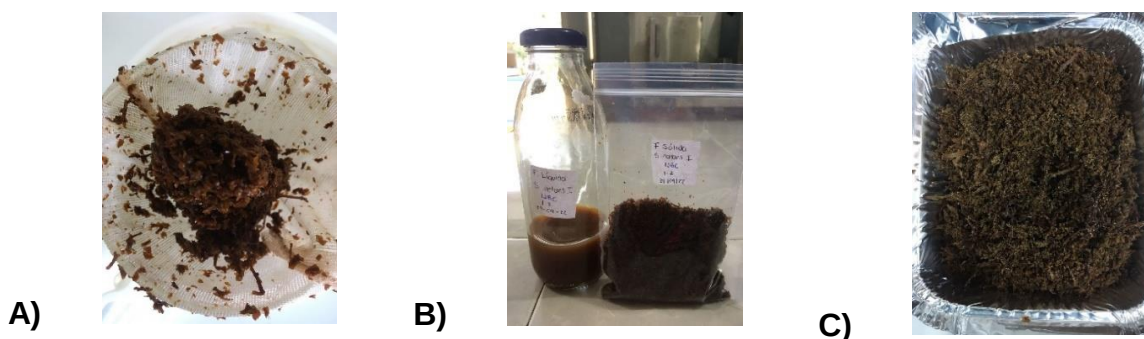


Figura 3.4 Obtención de la biomasa sólida del sargazo (A) y fracción líquida (B) para su posterior secado hasta peso constante (C).

La segunda etapa consistió en el pretratamiento de la biomasa sólida hidratándola en una solución de formaldehído (CH_2O) al 2% v/v durante una noche a temperatura ambiente, para la eliminación de pigmentos ver Figura 3.5 (A). El CH_2O reacciona con los fenoles presentes en la biomasa sólida de sargazo produciendo compuestos insolubles (Hernández *et al.*, 2012).

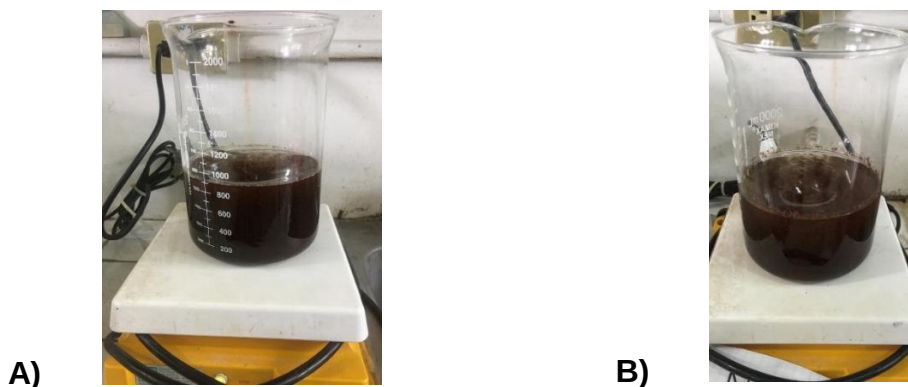
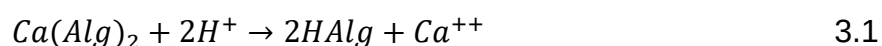


Figura 3.5 Hidratación de la biomasa sólida de sargazo en formaldehído (a) y ácido clorhídrico (b).

Al término de la hidratación, se filtró al vacío y el residuo se lavó con agua destilada. Posteriormente se realizó una extracción en medio ácido con HCl 0.2 M v/v ver Figura 3.5 (B) durante una noche a temperatura ambiente para la eliminación de sales presentes en la biomasa sólida, este tratamiento ácido es esencial para convertir las sales del alginato de calcio y otros iones como: Sodio (Na^+) y Potasio (K^+) en un ácido alginico insoluble (Hernández *et al.*, 2012) por lo tanto para obtener una extracción eficiente primero se trata la biomasa sólida de sargazo con ácido mineral diluido antes de usar el álcali (McHugh, 1987) ver Ecuación 3.1 - 3.2.



Además, el ácido clorhídrico elimina los compuestos fenólicos solubles en el ácido mineral, la importancia de eliminar estos fenoles radica en que se previene la formación de productos de oxidación-polimerización de color marrón y pérdida de viscosidad durante la extracción alcalina (McHugh, 1987). Transcurrido el tiempo se filtró al vacío y se lavó el residuo con agua destilada.

Para la extracción alcalina se realizó empleando una solución de Na_2CO_3 al 2% p/v durante 5 horas a 60°C con el único fin de convertir el alginato en su forma soluble y pueda separarse de la biomasa sólida de sargazo mediante filtración. Una vez finalizado el tiempo se filtró al vacío y la FL obtenida se precipito con etanol al 96 % Figura 3.6 (A).

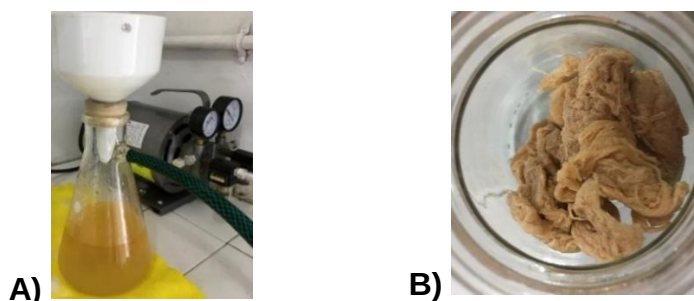


Figura 3.6 Fracción líquida del alginato de sodio en su forma soluble (a) y Alginato de sodio (b).

El precipitado obtenido se lavó dos veces con acetona para eliminar impurezas. Después se volvió a precipitar con etanol y se secó a temperatura ambiente Figura 3.6 (B). En la tabla 3.3 se resume los parámetros y el rendimiento obtenido para cada especie de biomasa sólida de sargazo.

Tabla 3.3 Parámetros de experimentación y rendimientos del alginato

Especie	CH ₂ O Tiempo (h)	HCl Tiempo (h)	Na ₂ CO ₃		Rendimiento (%)
			Tiempo (h)	Temperatura (°C)	
<i>S. natans I</i>	24	24	5	60	27.45 ± 0.96
<i>S. natans VIII</i>	24	24	5	60	22.76 ± 1.17
<i>S. fluitans III</i>	24	24	5	60	22.79 ± 0.01

El residuo que queda después de los tratamientos de extracción se lavó con agua se caracterizó fisicoquímicamente (Tabla 3.4), y se almaceno para su posterior uso como sustrato en la DA. En la tabla 3.3 se observa que la especie con mayor recuperación de alginato de sodio es la especie *S. natans I* con un 27 % en p/p en comparación con las otras especies. De acuerdo con Fertah *et al.*, 2017 la temperatura puede ser un parámetro importante que puede afectar el rendimiento durante el proceso de extracción ya que en este caso una temperatura de 60 °C, así como el tamaño de partícula de ~2 mm fueron condiciones apropiadas para obtener rendimientos óptimos de extracción.

Tabla 3.4 Caracterización fisicoquímica de los residuos de extracción del alginato

Residuo	ST (%)	Cenizas (%)	Humedad (%)	SV (%)
<i>S. natans I</i>	26.7236 ± 2.30	50.1725 ± 1.32	73.2764 ± 2.30	13.3356 ± 1.51
<i>S. natans VIII</i>	10.0414 ± 0.18	62.8419 ± 1.16	89.9586 ± 0.18	3.7311 ± 0.13
<i>S. fluitans III</i>	10.7425 ± 0.58	48.2120 ± 0.42	89.2575 ± 0.58	5.5622 ± 0.27

3.4.1. Extracción de alginato de sodio por ultrasonido

Para un proceso de extracción más ecológico y eficiente que minimice el uso de reactivos químicos como el proceso de extracción por ultrasonido, permite que este método reduzca los tiempos de extracción mayor a 4 veces que el método convencional sin afectar la estructura química del alginato. La frecuencia de ultrasonido puede influir en las propiedades del alginato permitiendo una óptima formación del gel por la interacción hidrofóbica y la actividad interfacial (Flórez-Fernández *et al.*, 2019). Sin embargo, hay pocos estudios sobre el uso del método de extracción por ultrasonido para compuestos de recursos marinos (Youssof *et al.*, 2017). Se empleó el método propuesto por Flórez-Fernández *et al.*, 2019 con algunas modificaciones. La biomasa sólida de sargazo se recolecto en playa delfines (latitud 21°3'43.286" N longitud 86°46'45.179" O) de la ciudad de Cancún perteneciente al municipio de Benito Juárez, México. La biomasa sólida de sargazo se desalinizo con agua potable y se clasifico por especie (*S. natans I*, *S. natans VIII* y *S. fluitans III*) posteriormente se trituraron en una procesadora de alimentos marca Oster modelo BLSTXPN7003 (Xpert Series™ Oster, China) con una potencia de 2 HP con cuchillas quirúrgicas para reducir el tamaño de la muestra aproximadamente de 1 a 2 mm durante 20-30 segundos con una dilución 1:1 con agua destilada, después se secaron en una estufa de secado marca Riossa a 60°C hasta peso constante. La composición proximal en base seca se reporta en la Tabla 3.1.

Las especies de la biomasa sólida de sargazo se pesaron y se remojaron en agua destilada en una proporción 20:1 líquido-sólido. Para la extracción se utilizó un limpiador ultrasónico 180/400W (Vevor®) a una temperatura de 25 °C a diferentes intervalos de tiempo 5-30 minutos ver Figura 3.7. A, la muestra en suspensión fue centrifugada por 10 minutos a 4500 rpm en una centrifuga marca HERMLE Z 323, donde se separó la fracción líquida de la sólida. La fracción líquida se almaceno a 4 °C por 24 horas, posteriormente se separó el agua de la fracción de alginato ver Figura 3.7 B.



Figura 3.7 Baño ultrasónico empleado para la extracción (a) y fracción líquida (agua) después de 24 horas de refrigeración (b).

A la fracción de alginato de calcio se le agregó el jugo de limón como sustituto del ácido mineral (usualmente ácido clorhídrico o ácido sulfúrico) como parte de un proceso ecológico. El ácido cítrico del limón actúa como un ácido suave y además como agente quelante de metales propiciando el intercambio iónico para la conversión del alginato a ácido alginico insoluble (Fawzy *et al.*, 2017), este es el primer paso del proceso de extracción, la eliminación de los contraiones mediante un intercambio catiónico. Los alginatos son producidos principalmente en las algas pardas en la matriz intracelular en forma de gel, la cual contiene iones de Na^+ , Ca^+ , Mg^+ , Sr^+ y Ba^+ , de esta manera la composición de los contraiones está determinada por el equilibrio de intercambio iónico con el agua de mar (Pawar *et al.*, 2012). Se ajusta el pH a 3.00 y se deja reposar 60 minutos a temperatura ambiente, para convertir el alginato de calcio en ácido alginico, se agrega carbonato de sodio a la fracción orgánica y de ser necesario se puede calentar la solución a 50 °C. Posteriormente para precipitar el alginato se le agregó alcohol etílico al 95 % debido al alto contenido de agua del ácido alginico. En la tabla 3.5 se resumen los parámetros y el rendimiento obtenido para cada especie de biomasa sólida de sargazo obtenido por ultrasonido.

En la Tabla 3.5 se observa que los rendimientos se van dando en aumento conforme pasa el tiempo notándose una tendencia casi lineal entre el tiempo de ultrasonido y el rendimiento del alginato, debido a que la extracción por ultrasonido se basa en el fenómeno de cavitación de burbujas generadas por las ondas del ultrasonido.

Tabla 3.5 Rendimientos de alginato obtenidos mediante extracción por ultrasonido.

Tiempo (min.)	Especie		
	<i>S. natans I</i>	<i>S. natans VIII</i>	<i>S. fluitans III</i>
5	5.91 %	10.35 %	10.20 %
10	11.27%	12.66 %	36.07 %
15	12.60 %	13.27 %	40.73 %
20	12.98 %	23.14 %	45.33 %
30	27.0 %	23.78 %	53.17 %

En la Tabla 3.5 se observa que los rendimientos se van dando en aumento conforme pasa el tiempo notándose una tendencia casi lineal entre el tiempo de ultrasonido y el rendimiento del alginato, debido a que la extracción por ultrasonido se basa en el fenómeno de cavitación de burbujas generadas por las ondas del ultrasonido. La cavitación genera turbulencias y colisiones entre las partículas a altas velocidades, así como perturbaciones en dichas partículas transformando las ondas de sonido en energía mecánica en las interfaces líquido-sólido facilitando la liberación de los componentes de la matriz sólida. El método por ultrasonido mejora la extracción de compuestos de alto peso molecular de la biomasa sólida de sargazo, la mayor parte de los polisacáridos se pueden liberar de las células rotas al inicio del proceso de ultrasonido a una potencia adecuada (Flórez-Fernández *et al.*, 2017). De acuerdo con Flórez-Fernández *et al.*, 2019 para obtener polímeros de alginato de sodio se requieren tiempos de ultrasonido de 30 minutos lo que favorece la extracción.

3.5. Caracterización del alginato de sodio

3.5.1. Espectroscopia FT – IR

El espectro de FT-IR del producto obtenido de la especie *S. natans I*, se muestra en la Figura 3.8 donde se observa una banda ancha a 3464.68 cm^{-1} la cual es asignada a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H, la banda a 2925.34 cm^{-1} y 1617.20 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones de estiramiento C-H y vibraciones de estiramiento

asimétrico O-C-O del carboxilato, respectivamente. A 1421.20 cm^{-1} es asignado a la vibración de deformación C-OH contribución de la vibración de estiramiento asimétrico O-C-O del grupo carboxilato. Las señales de 1330.45 cm^{-1} , 1093.83 cm^{-1} y 1029.75 cm^{-1} pueden ser atribuidas a la deformación C-C-H y O-C-H, de las vibraciones de estiramiento C-O de los anillos de piranosa. La señal de 948.47 cm^{-1} es indicativo de la presencia del ácido uránico de las vibraciones de estiramiento C-O (Fenoradosa *et al.*, 2010). de los residuos de ácido uránico, y 903.99 cm^{-1} a la deformación del C¹-H de los residuos del ácido β -manurónico. La banda de 849.37 cm^{-1} parece ser característica de residuos de ácido manurónico. La región anomérica ($950\text{--}750\text{ cm}^{-1}$) es la más discutida en los carbohidratos (Fertah *et al.*, 2017, Fenoradosa *et al.*, 2010, Leal *et al.*, 2008).

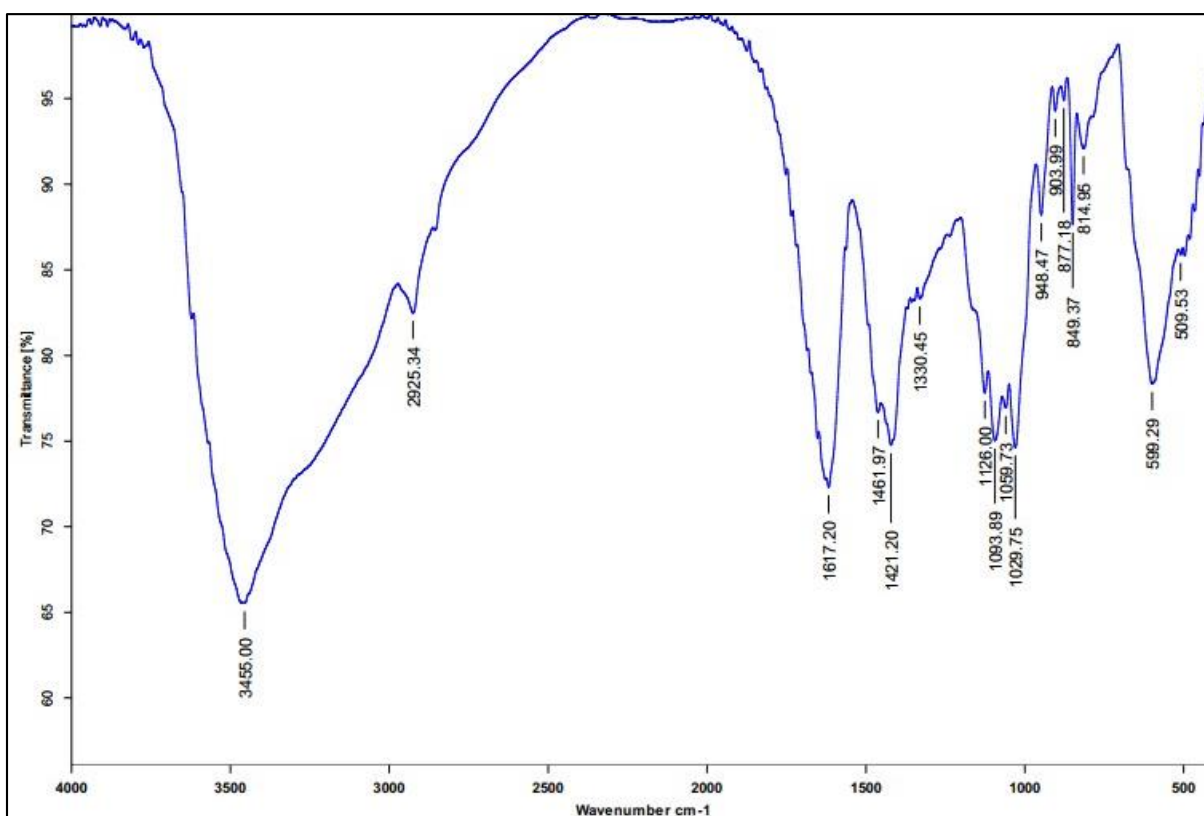


Figura 3.8 Espectro FT-IR de alginato de sodio de *S. natans I.*

En la tabla 3.6 se resumen las señales características e importantes de 3500 – 1600 cm^{-1} para los alginatos de sodio de las tres especies de biomasa sólida de sargazo.

Tabla 3.6 Bandas características del alginato de sodio en FT-IR.

Bandas	Asignación
Banda ancha a 3500.00 cm^{-1}	Vibraciones de estiramiento O – H.
Señal débil a 2900.00 cm^{-1}	Vibraciones de estiramiento C – H.
Banda a 1600.00 cm^{-1}	Vibraciones de estiramiento asimétrico O – C – O.
Banda intensa a 1400.00 cm^{-1}	Vibración simétrica de estiramiento de C = O

El espectro de FT-IR del producto obtenido de la especie *S. natans* VIII, se muestra en la Figura 3.9, donde se observa una banda ancha a 3455.01 cm^{-1} la cual es asignada a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H, la banda 1630.10 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones de estiramiento C-H y vibraciones de estiramiento asimétrico O-C-O del carboxilato, respectivamente. A 1459.70 cm^{-1} es asignado a la vibración de deformación C-OH contribución de la vibración de estiramiento asimétrico O-C-O del grupo carboxilato. Las señales de 1330.55 cm^{-1} , 1092.59 cm^{-1} y 1029.89 cm^{-1} pueden ser atribuidas a la deformación C-C-H y O-C-H, de las vibraciones de estiramiento C-O de los anillos de piranosa. La señal de 948.95 cm^{-1} es indicativo de la presencia del ácido urónico de las vibraciones de estiramiento C-O (Fenoradosa *et al.*, 2010), de los residuos de ácido urónico, y 903.55 cm^{-1} a la deformación del C¹-H de los residuos del ácido β -manurónico. La banda de 849.55 cm^{-1} parece ser característica de residuos de ácido manurónico. La región anomérica (950-750 cm^{-1}) es la más discutida en los carbohidratos (Fertah *et al.*, 2017, Fenoradosa *et al.*, 2010, Leal *et al.*, 2008).

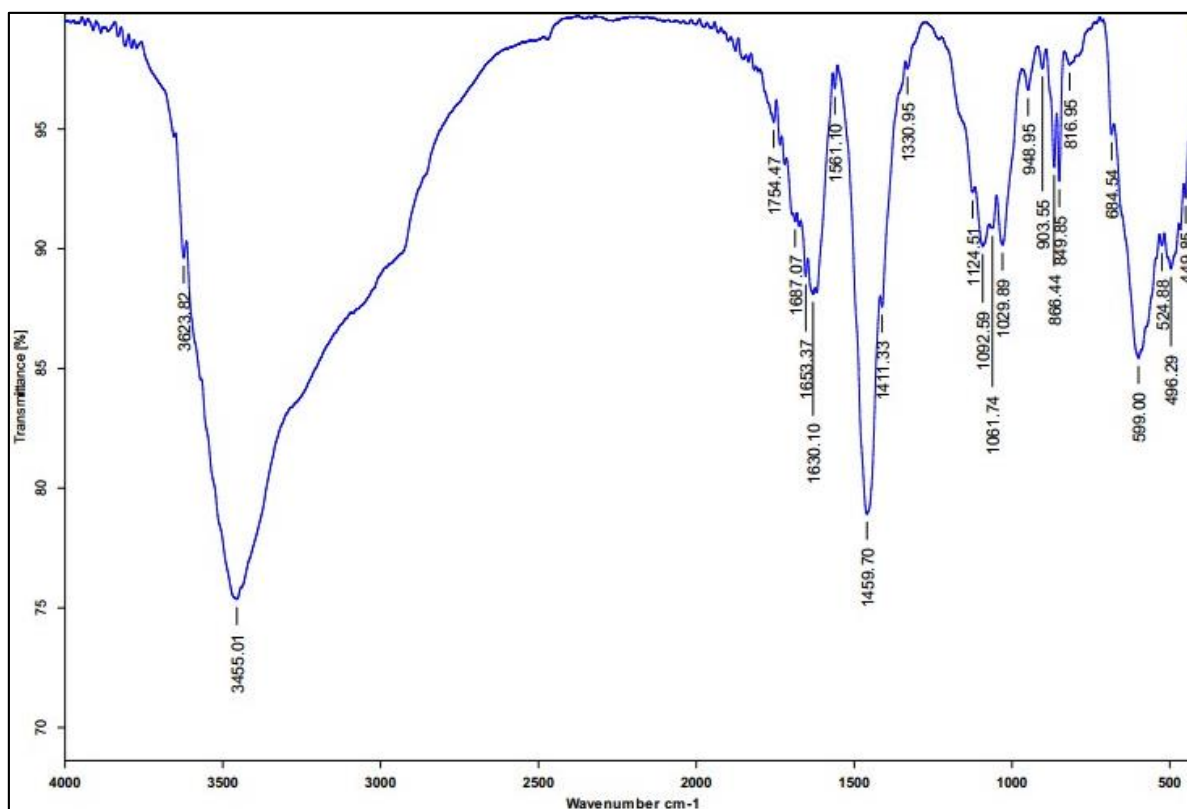


Figura 3.9 Espectro FT-IR de alginato de sodio de *S. natans* VIII.

En el espectro de FT-IR del producto obtenido de la especie *S. fluitans* III, se muestra en la Figura 3.10, donde se observa una banda ancha a 3405.32 cm^{-1} la cual es asignada a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H, la banda a 2980.29 cm^{-1} y 1616.56 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones de estiramiento C-H y vibraciones de estiramiento asimétrico O-C-O del carboxilato, respectivamente. A 1448.99 cm^{-1} es asignado a la vibración de deformación C-OH contribución de la vibración de estiramiento asimétrico O-C-O del grupo carboxilato. Las señales de 1124.63 cm^{-1} , 1091.42 cm^{-1} y 1029.18 cm^{-1} pueden ser atribuidas a la deformación C-C-H y O-C-H, de las vibraciones de estiramiento C-O de los anillos de piranosa. En este espectro no se visualiza la señal de 948.00 cm^{-1} como en los otros espectros anteriores, donde esta señal es indicativa de la presencia del ácido urónico de las vibraciones de estiramiento C-O (Fenoradosa *et al.*, 2010), de los residuos de ácido urónico.

La señal de 903.50 cm^{-1} corresponde a la deformación del $\text{C}^1\text{-H}$ de los residuos del ácido β -manurónico. La banda de 866.21 cm^{-1} parece ser característica de residuos de ácido manurónico. La región anomérica ($950\text{-}750\text{ cm}^{-1}$) es la más discutida en los carbohidratos (Fertah *et al.*, 2017, Fenoradosa *et al.*, 2010, Leal *et al.*, 2008).

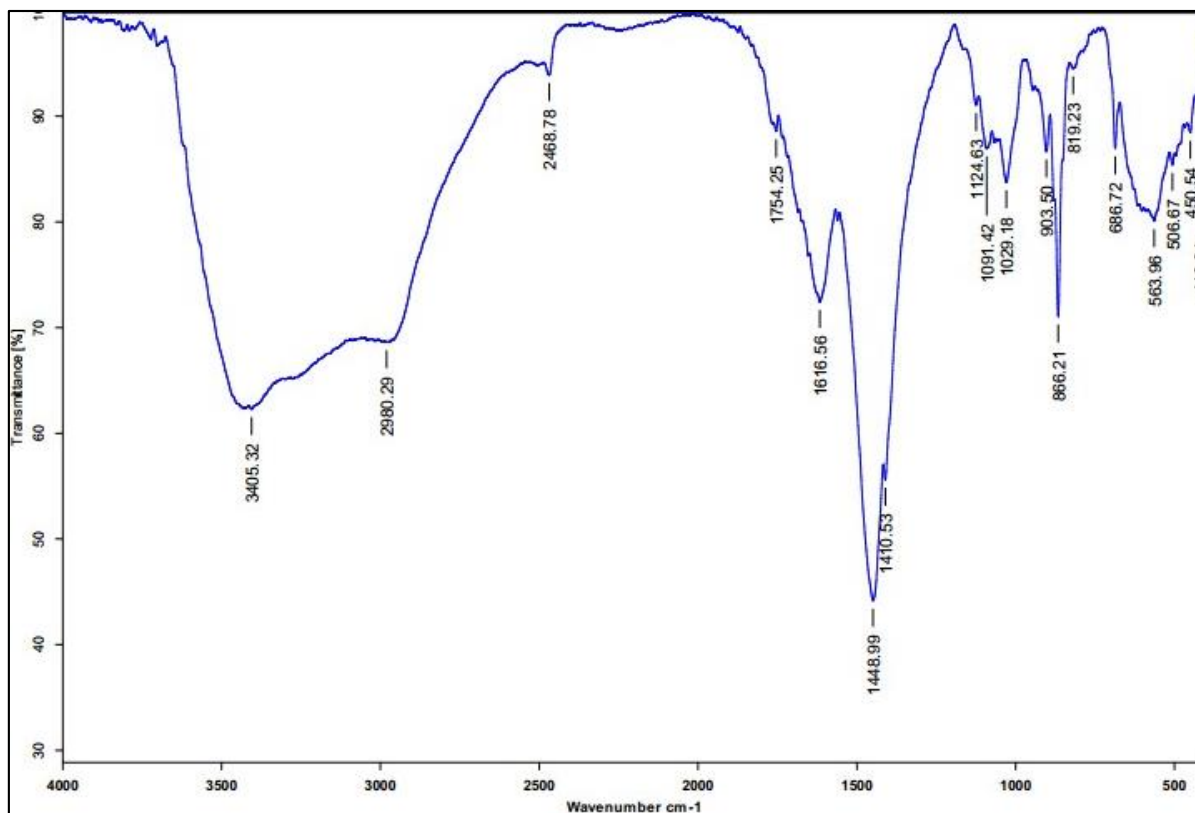


Figura 3.10 Espectro FT-IR de alginato de sodio de *S. fluitans* III.

3.5.2. Resonancia Magnética Nuclear de ^1H

La espectroscopia de RMN es una técnica eficiente para estudiar la composición y estructura de los alginatos (Abka-khajouei *et al.*, 2022, Salomonsen *et al.*, 2009), aunque para cada especie la composición y el rendimiento de estos polisacáridos varían en función de la estación, la edad y ubicación geográfica (Fawzy *et al.*, 2017, Sari-Chmayssem *et al.*, 2016, Llanes *et al.*, 1997).

A nivel molecular los alginatos son monómeros lineales de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) y pueden estar constituidos por bloques M, G y MG (Fertah *et al.*, 2014). Las soluciones de estos polímeros son muy viscosas para obtener buenos espectros por lo que se requiere realizar una hidrólisis ácida parcial o total (p. ej. HCl 0.5 N a 100 °C/ 1 h) de la cadena del alginato, la hidrólisis altera significativamente, por lo que es un proceso largo, laborioso y necesario para reducir dicho parámetro (Salomonsen *et al.*, 2009, Llanes *et al.*, 1997). Una temperatura adecuada para realizar el análisis de RMN ^1H puede registrar una buena resolución en la región espectral de campo bajo de los protones anoméricos (Fertah *et al.*, 2014). En la Figura 3.11 se observa el espectro de RMN de ^1H del alginato de sodio de la biomasa de *S. natans I* en el cual se puede observar señales que conforman los grupos de las cadenas M y G similares a lo que reporta Jiménez – Contreras (2020).

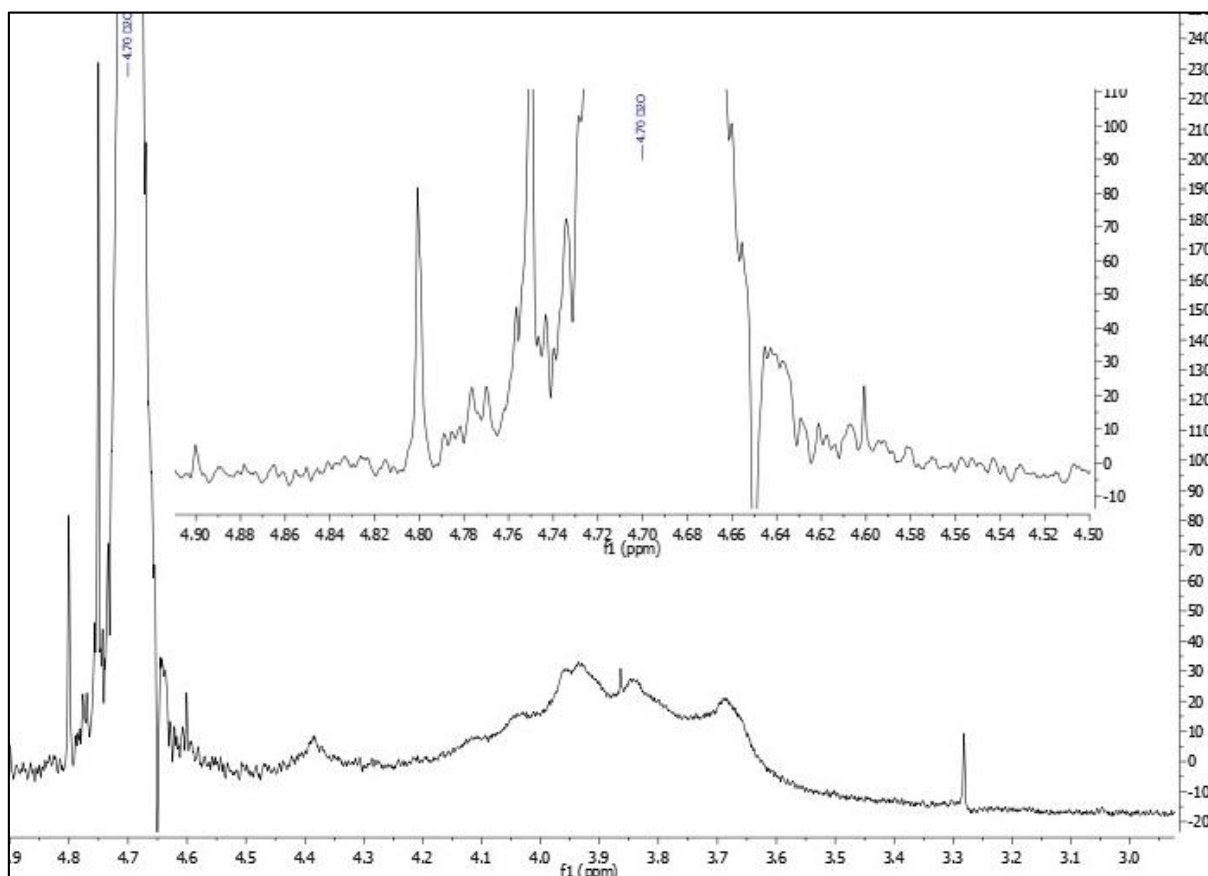


Figura 3.11 Espectro de RMN ^1H de *S. natans I*.

Estos espectros de RMN ^1H de los polisacáridos pueden dividirse en dos regiones donde pueden observarse las resonancias correspondientes de los protones de los anillos de azúcar de 3.2 a 4.4 ppm y la de los protones anoméricos de 4.4 a 5.6 ppm (González *et al.*, 2015). En 4.80 ppm se observa la señal del protón anomérico del ácido gulurónico, en 4.75 ppm el protón H-5 del ácido gulurónico y en 4.60 ppm el protón anomérico del ácido manurónico.

En la Figura 3.12 se observa el espectro de RMN de ^1H del alginato de sodio de la biomasa de *S. natans VIII* en comparación con el espectro de la biomasa de *S. natans I* se observa en 4.90 ppm la señal del protón anomérico del ácido gulurónico, en 4.76 ppm el protón H-5 del ácido gulurónico y en 4.65 ppm el protón anomérico del ácido manurónico.

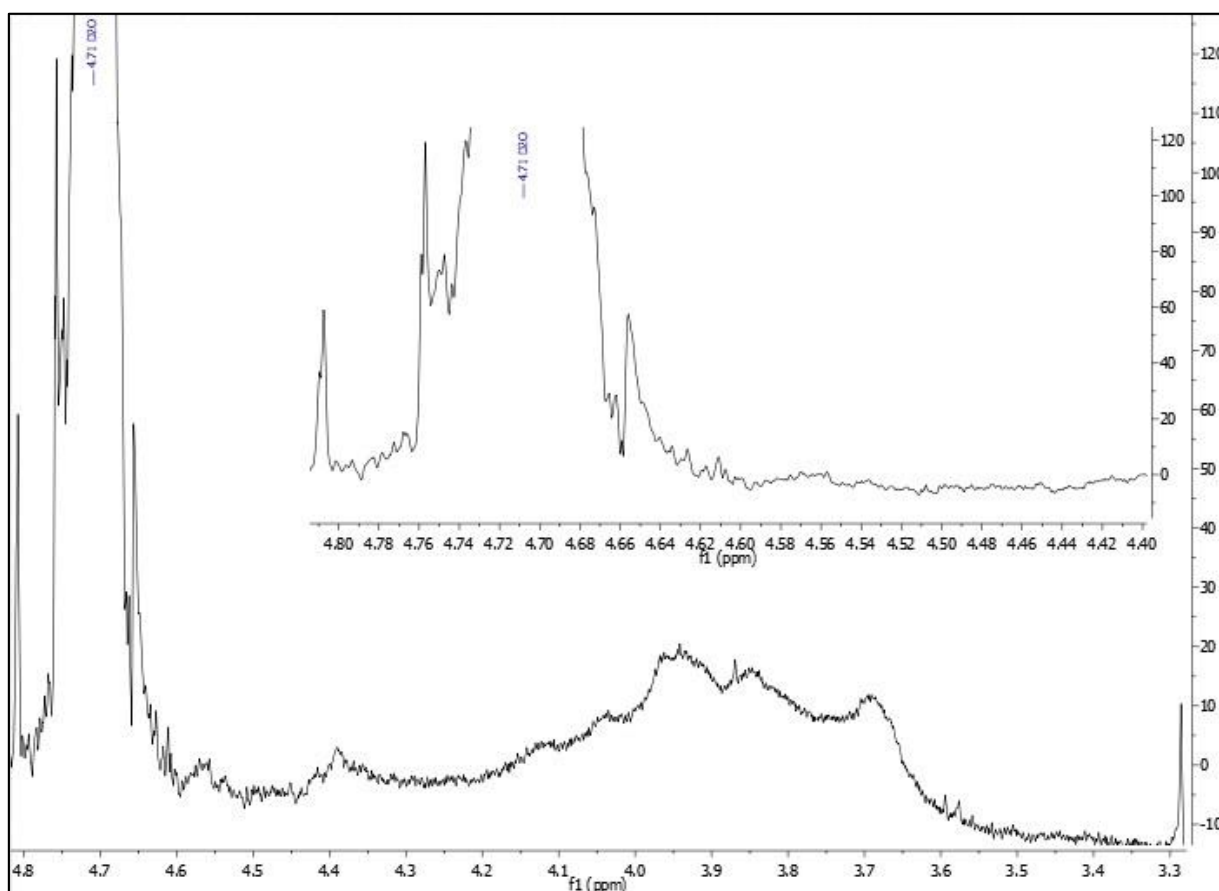


Figura 3.12 Espectro de RMN ^1H de *S. natans VIII*.

En la Figura 3.13 se observan las señales de la biomasa de *S. fluitans III* en 4.82 ppm se observa la señal del protón anomérico del ácido gulurónico, en 4.77 ppm el protón H-5 del ácido gulurónico y en 4.67 ppm muy débilmente el protón anomérico del ácido manurónico. Estas señales son aproximadamente semejantes a las reportadas por Salomonsen *et al.*, 2009 indica que una señal a 5.07 ppm correspondiente al protón anomérico del ácido gulurónico, otra a 4.70 ppm que corresponde al protón anomérico del ácido manurónico y al H-5 del ácido gulurónico adyacente al ácido manurónico y a 4.46 ppm al protón H-5 del ácido gulurónico adyacente al ácido gulurónico.

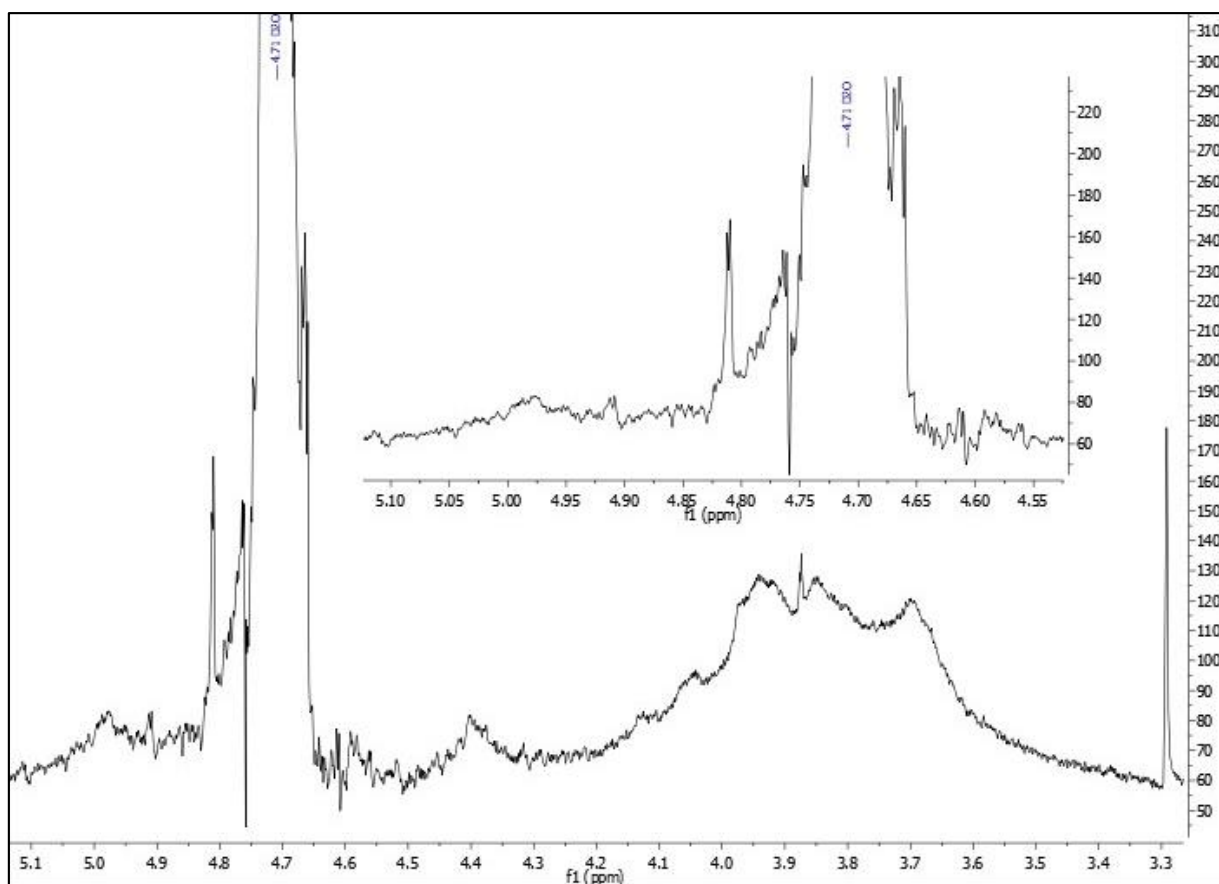


Figura 3.13 Espectro de RMN ¹H de *S. fluitans III*.

3.5.3. Ionización – desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI – TOF)

El uso de la espectrometría de masas (MS) radica en proporcionar una alta especificidad al momento de determinar el peso molecular en los átomos o moléculas de la muestra que son separados en relación a su masa/ carga (m/z), por lo que esta técnica permite la detección de biopolímeros y macromoléculas (Hung *et al.*, 2012). La estructura del polímero del Alg-Na consta de una barrera alrededor de los grupos funcionales COO^- en donde los bloques G (ácido gulurónico) forman estructuras plegadas y rígidas. Los alginatos se encuentran como sales de Na^+ , K^+ o NH_4^+ , y el PM del alginato suele ser ~60.000 a 700.000 Da, dependiendo de su uso y aplicación (Abka-khajoui *et al.*, 2022), p. ej. Aceites/grasas, saborizantes, células prebióticas, polifenoles, vitaminas, antioxidantes, etc. (Hung – Ching *et al.*, 2017).

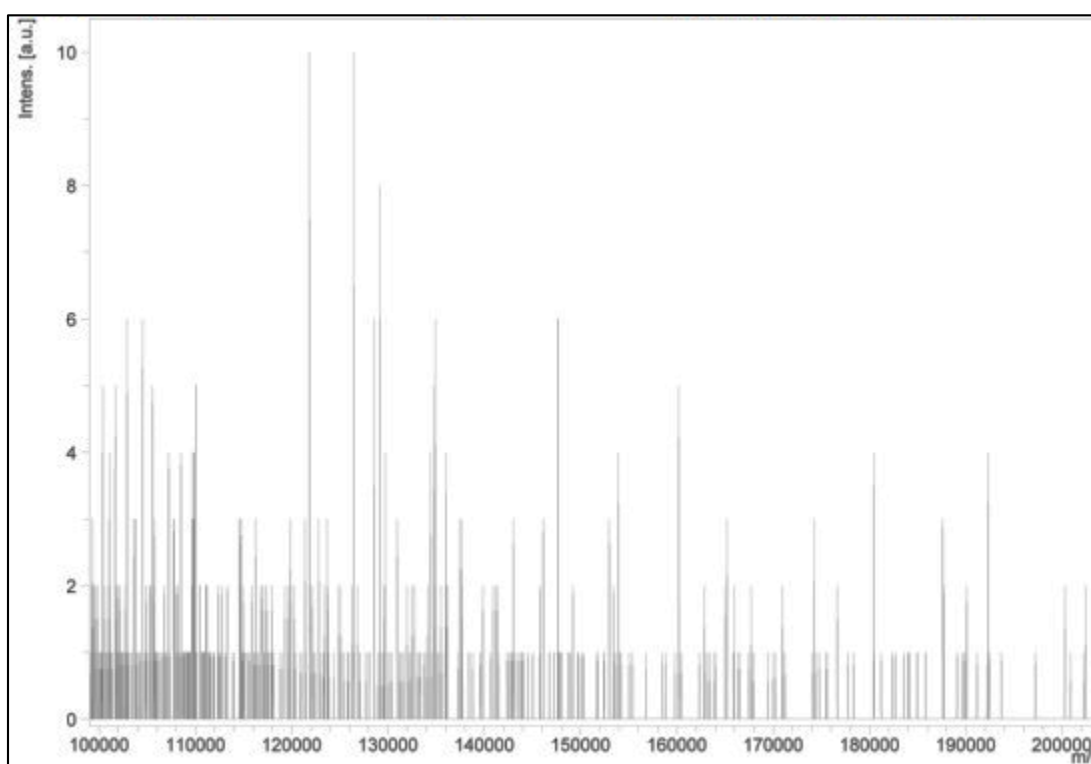


Figura 3.14 Espectro de MALDI – TOF del alginato de sodio de *S. natans I.*

Sin embargo, el uso de la espectrometría de MALDI-TOF se empleó como una alternativa para la caracterización del Alg-Na extraído en esta presente investigación. En las Figura 3.14 – 3.16 se muestran los espectros de las muestras de alginato extraídos de las biomásas de *S. natans I*, *S. natans VIII* y *S. fluitans III* respectivamente.

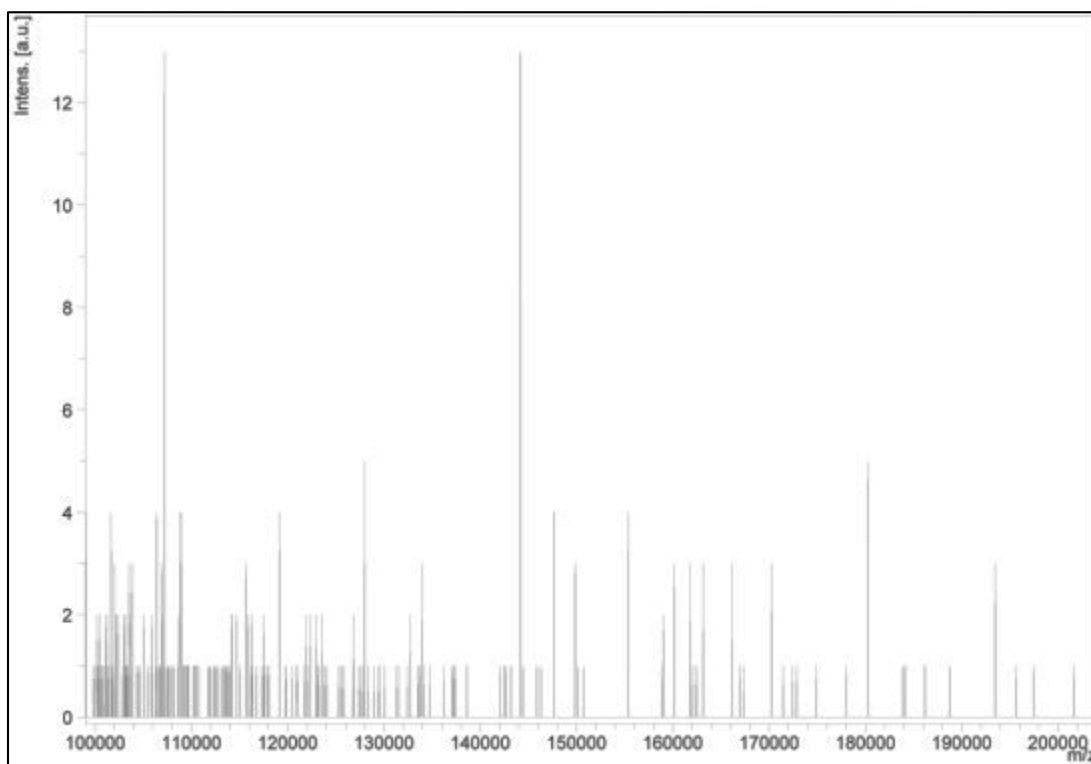


Figura 3.15 Espectro de MALDI – TOF del alginato de sodio de *S. natans VIII*.

Por lo tanto, se recomienda que antes de su caracterización y análisis las muestras de Alg – Na sean sometidas a pretratamiento antes de su detección para hacer comparación entre muestras hidrolizadas totalmente o parcialmente.

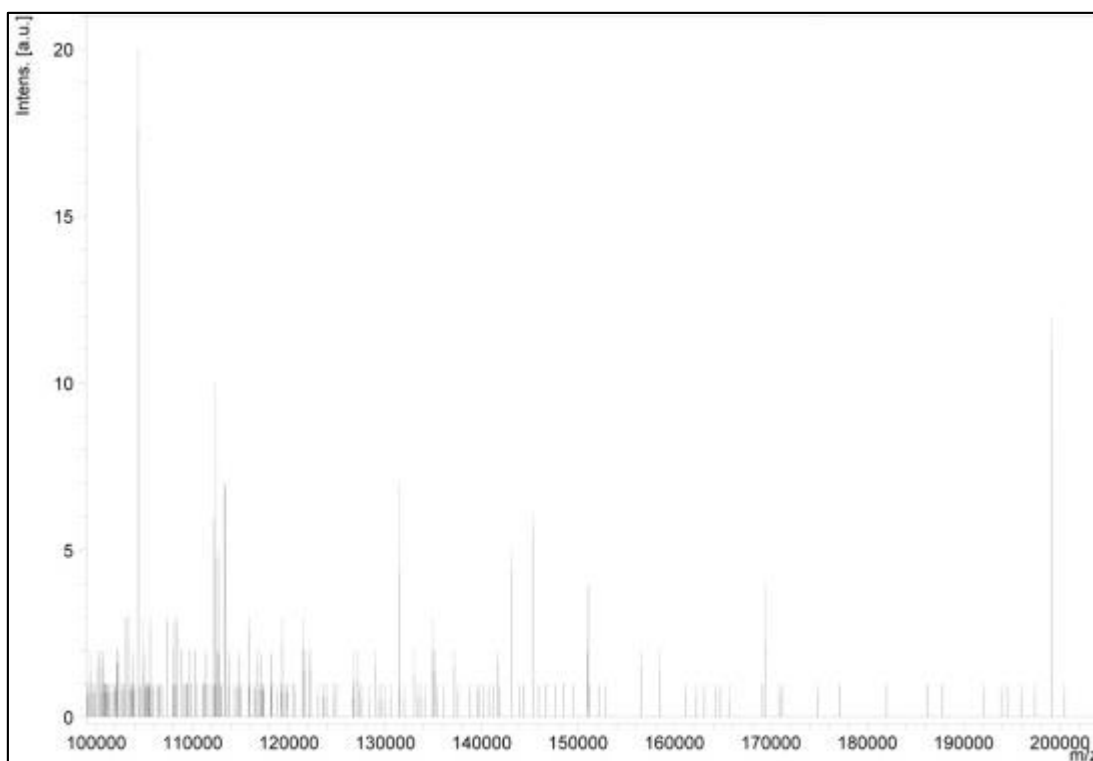


Figura 3.16 Espectro de MALDI – TOF del alginato de sodio de *S. fluitans* III.

3.6. Caracterización fisicoquímica del inóculo

El inóculo se recolectó de un reactor de lecho fijo (RLF) que opera a escala piloto y a temperatura ambiente, utilizado para procesar residuos sólidos orgánicos municipales (RSOM). El RLF se encuentra en la planta piloto del Instituto Tecnológico de Orizaba. El inóculo fue recolectado e incubado por 15 días a 35 – 40 °C, alimentándolo con residuos sólidos de frutas y verduras seleccionados, para aclimatar los microorganismos presentes y poder asegurar la producción de biogás (CH_4 y CO_2). En la Tabla 3.7 se resumen los parámetros y resultados obtenidos durante la caracterización de dicho inóculo.

Tabla 3.7 Caracterización fisicoquímica del inóculo de RSOM.

Parámetro	Unidad	Resultado
pH	-	7.02 ± 0.01
ST	%	3.8860 ± 0.08
SV	%	2.6538 ± 0.07
DQO _T	g/L	74.12 ± 1.23
DQO _s	g/L	48.9 ± 1.27

3.7. Análisis elemental orgánico de la biomasa sólida de sargazo

El análisis elemental orgánico en la fracción sólida de sargazo (Tabla 3.8) muestra que la relación C: N en la especie *S. natans I* es menor (8.83) comparándolo con otros autores como Salgado – Hernández *et al.*, 2022 donde reporta (18.6) en especies mixtas de *sargassum*. Otro autor como Milledge *et al.*, 2020 reporta relaciones C: N en la especie de *S. natans I* (22.14), *S. natans VIII* (17.40) y *S. fluitans III* (18.62) que son mucho mayores a los encontrados en la presente investigación.

Tabla 3.8 Composición elemental de la biomasa sólida de sargazo.

Determinación	<i>S. natans I</i>	<i>S. natans VIII</i>	<i>S. fluitans III</i>
C (%):	36.58	36.20	30.21
H (%):	4.85	5.03	3.82
O (%):	38.45	35.77	43.72
N (%):	4.14	4.20	3.78
S (%):	1.08	3.78	0.91
Relación C: N	8.83	8.62	7.99
Fórmula empírica	C _{3.04} H _{4.81} O _{2.40} N _{0.21}	C _{3.01} H _{4.99} O _{2.23} N _{0.29}	C _{2.51} H _{3.78} O _{2.73} N _{0.26}

Estos bajos valores pueden representar complicaciones en la DA donde se recomiendan que la relación óptima debe encontrarse en el rango de 20 – 30:1

(Salgado – Arreguín, 2022), por lo que se propone que una co-digestión con otros sustratos puede compensar los bajos índices de C: N y ayudar a la reducción la alta concentración de sales presentes en la biomasa (Amador-Castro *et al.*, 2021).

3.8. Evaluación de la actividad metanogénica específica (AME)

3.8.1. Biomasa sólida de sargazo

La DA es un proceso en el cual los microorganismos, en ausencia de oxígeno, promueve la degradación de compuestos orgánicos como: carbohidratos, proteínas y lípidos, en productos más simples como el metano y dióxido de carbono. La AME es un método que sirve para determinar la capacidad de asimilación de las bacterias metanogénicas para producir biogás (Torres *et al.*, 2010). En la Figura 3. 17a se observa la generación de biogás producido en las muestras de *S. natans I*, *S. natans VIII* y *S. fluitans III* que fue de 1152 ± 5.05 mL, 830 ± 4.64 mL y 1090 ± 7.0 mL de biogás/gSV respectivamente.

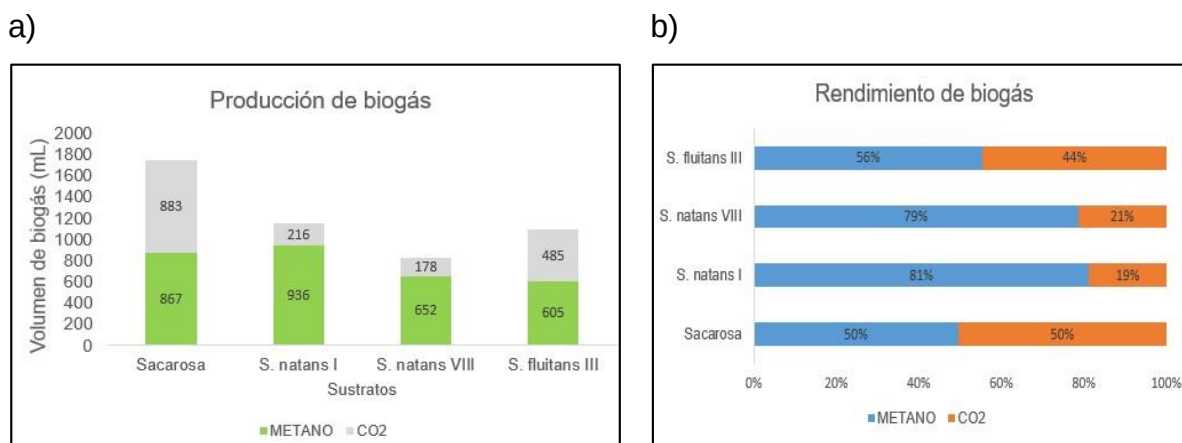


Figura 3.17 Volumen de biogás generado por la fracción sólida de sargazo (a) y porcentaje de la composición del biogás (b).

La baja producción de metano en la especie *S. fluitans III* se puede deber a la gran acumulación de sales minerales presentes (Ca, Na, K y Mg), el bajo índice de relación C: N (7.99), así como el contenido de carbohidratos que pueden afectar significativamente la estabilidad y el rendimiento en la DA (Laiq Ur Rehman *et al.*, 2019), el color verde representa el volumen teórico de CH₄ y en color verde representa

el volumen teórico de CH₄ y en color gris el volumen de CO₂, en la Figura 3.17b se observa la composición del biogás obtenido con cada biomasa de sargazo en términos de porcentaje de metano y dióxido de carbono siendo similares *S. natans I* y *S. natans VIII* entre 79 – 81 % ± 2 %. asumiendo una conversión total estequiométrica de la materia orgánica en metano y dióxido de carbono.

Gran parte de las algas son considerados sustratos potenciales para la DA, por lo tanto, los rendimientos de CH₄ en la DA varía entre las especies de biomasa sólida de sargazo, así como la localización y composición química estacional de la biomasa (Milledge *et al.*, 2020). Durante la DA la composición del sustrato es importante para los microorganismos durante la estabilidad del proceso y producción de biogás, durante la descomposición de la materia orgánica en este bioproceso, la relación C: N se considera de suma importancia ya que se ha demostrado que la eficiencia del rendimiento de esta mejora utilizando proporciones adecuadas (Adunkele *et al.*, 2015). Debido a que los microorganismos utilizan el carbono como energía y al nitrógeno para síntesis de proteínas, por lo que se han reportado que la relación C: N óptima es entre 20 – 30: 1 (Salgado – Arreguín, 2022).

La presencia de diversos compuestos recalcitrantes como sulfatos (SO_4^{2-}), cloruro de sodio (NaCl) y metales pesados pueden acumularse en concentraciones significativas y actuar como inhibidores de la DA (López – Aguilar *et al.*, 2020), otros factores como el contenido de proteína, grasa, fibra y carbohidratos son factores que influyen en los rendimientos de biogás. Los microorganismos que llevan a cabo las reacciones de degradación en las 4 etapas de la DA difieren mucho en cuanto fisiología, necesidad nutricional, cinética de crecimiento, por lo que mantener un equilibrio entre los microorganismos formadores de ácido y los microorganismos formadores de metano, conduce a una inestabilidad del reactor y como efecto negativo a un bajo rendimiento de metano (Adunkele *et al.*, 2015).

3.8.2. Residuo sólido de sargazo

Pocos han sido los estudios acerca de la producción de biogás empleando los residuos

de la biomasa de algas a nivel laboratorio y planta piloto. En el caso del residuo sólido de la biomasa de sargazo posterior a la extracción de compuestos de valor agregado (alginato) se sometió a proceso de DA, observando en la Figura 3.18 que hubo producción de biogás obteniendo en el residuo de *S. natans I* (670 ± 10.0 mL de biogás/gSV), seguido del residuo de *S. natans VIII* (650 ± 12.0 mL de biogás/gSV) y por ultimo del residuo de *S. fluitans III* (450 ± 15.0 mL de biogás/gSV) esto demuestra que la recalcitrancia de las paredes celulares de las macroalgas es un obstáculo para el ataque bacteriano para la degradación de la biomasa durante la DA. Sin embargo, el uso de residuos de la biomasa posterior a los procesos de extracción puede ser eficaces durante la conversión de biogás debido al pretratamiento al que fueron previamente sometidas.

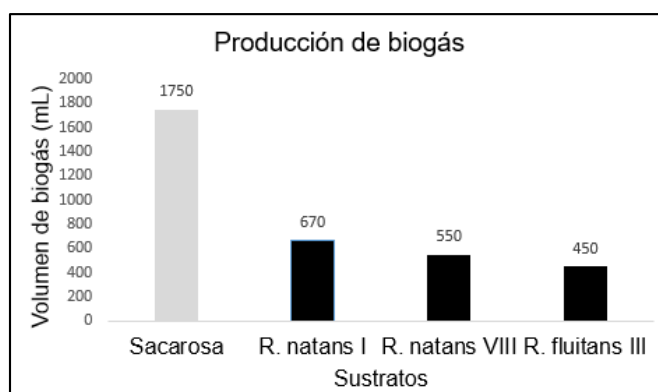


Figura 3.18 Volumen de biogás generado por los residuos de la biomasa de sargazo.

También se puede observar en la Tabla 3.9 que después del proceso de DA hay una reducción de ST y SV en comparación de la concentración inicial, los cuales pueden provenir de oligoelementos presentes en el residuo y que fueron aprovechados por los microorganismos en la DA, también se observó un aumento en el porcentaje de humedad el cual pudo deberse al inóculo.

Tabla 3.9 Caracterización fisicoquímica del digestato después de la DA.

Residuo	ST (%)	Cenizas (%)	Humedad (%)	SV (%)
<i>S. natans I</i>	5.6506 ± 0.27	2.3288 ± 0.19	94.3494 ± 0.27	5.6628 ± 0.25
<i>S. natans VIII</i>	4.4792 ± 0.13	0.2511 ± 0.03	95.5208 ± 0.13	4.5369 ± 0.13
<i>S. fluitans III</i>	5.7268 ± 0.21	2.5159 ± 0.52	94.2732 ± 0.21	5.6811 ± 0.23

Osman *et al.*, 2019 investigaron mediante DA la producción de biogás utilizando como sustrato los residuos industriales de la macroalga *L. Japónica* posterior a la extracción de alginato obteniendo un volumen acumulativo de metano de 182 NmL/gSV. Borbot *et al.*, 2015 también empleó el residuo de la macroalga *L. Japónica*, procedente de la industria en ensayos continuos y discontinuos a nivel laboratorio logrando obtener un volumen de metano de 174 CH₄ mL/gSV. Jiménez – Contreras (2020) utilizó el residuo de *sargassum spp* posterior a la extracción de alginato mediante un tratamiento ácido – alcalino, como sustrato para la DA obteniendo un volumen de metano de 23.73 CH₄ mL/gSV.

Al emplear pretratamientos químicos en la biomasa puede modificar la estructura facilitando la biodegradabilidad de ésta, p. ej. el uso de álcalis en la biomasa esta experimentara solvatación y saponificación ayudando a degradar los componentes de celulosa y lignina aumentando la concentración de hidratos de carbono disponibles para la DA, en el caso de pretratamientos con ácidos acelerara la despolimerización de la hemicelulosa en la biomasa (Chikani *et al.*, 2022).

El reutilizar los residuos de la biomasa para generar biogás por medio de la DA puede ofrecer una alternativa ecológica con el medio ambiente para una materia prima de fácil obtención (Osman *et al.*, 2019) y reducir la dependencia de los combustibles fósiles derivados del petróleo (Akbarian *et al.*, 2022) favoreciendo la formación de una economía circular.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Los pretratamientos mecánicos utilizados beneficiaron la estructura física de la biomasa en esta investigación, el lavado con agua potable ayudo a eliminar impurezas presentes como por ejemplo, plástico y arena, además ayudo a eliminar sales que a una concentración mayor pudo afectar o inhibir la producción de biogás y la caracterización fisicoquímica, además la reducción del tamaño de sargazo permitió la fácil manipulación de la biomasa para poder aumentar la relación superficie – volumen durante la experimentación, además de facilitar la combinación de otro pretratamiento (p.ej. químico) en la biomasa, el tamaño de partícula (1 – 2 mm) ayudo a aumentar la hidrólisis de carbohidratos presentes en la biomasa durante la DA.

La biomasa de sargazo fue evaluada por sus características y propiedades como fuente potencial de alginato. Con el tratamiento químico se obtuvieron rendimientos entre el 22 y 27 % en peso seco a una temperatura de 60 °C durante 4 horas, por su parte la extracción con ultrasonido se redujo el tiempo y el uso de reactivos minimizando la generación de residuos. Se observó que los rendimientos en las biomazas *S. natans I* y *VIII* fueron iguales que en la extracción química, sin embargo, en la biomasa *S. fluitans III* se obtuvo el doble de rendimiento (53.17 %) esto probablemente se debió a que las ondas de sonido transformadas en energía mecánica facilito la liberación de los componentes de la matriz y el tamaño de partícula de ~1 mm. Estos rendimientos de alginato obtenidos son semejantes a otras biomazas de algas reportadas en bibliografía.

Se observó en la DA que el método de Torres *et al.*, permitió cuantificar la máxima capacidad de producción de metano por los microorganismos anaerobios en la fracción sólida de la biomasa de sargazo, los rendimientos obtenidos fueron de 1152 ± 5.05 mL (*S. natans I*), 830 ± 4.64 mL (*S. natans VIII*) y 1090 ± 7.0 mL (*S. fluitans III*) de biogás/gSV, el porcentaje de relación de CH₄ oscilo entre 56 a 81 % y de CO₂ de 19 a 44 % lo cual es semejante a lo reportado en bibliografía. En el residuo de la biomasa posterior al pretratamiento (químico) se obtuvieron rendimientos en

S. natans I de 670 ± 10.0 mL, *S. natans VIII* 650 ± 12.0 mL y *S. fluitans III* 450 ± 15.0 mL de biogás/gSV respectivamente, queda analizar el digestato para poder darle un uso como fertilizante o sustrato a las plantas.

En los espectros de FT-IR se observaron las señales características del alginato principalmente a $3405.32 - 3455 \text{ cm}^{-1}$ correspondientes a los enlaces OH, a $2925.34 - 2980.29 \text{ cm}^{-1}$ se observó señales muy débiles en los tres espectros la cual pertenece a los enlaces CH, a $1616.56 - 1630.10 \text{ cm}^{-1}$ los enlaces carboxilato y entre $1421.20 - 1459.70 \text{ cm}^{-1}$ los enlaces carbonilo. En el análisis de RMN se apreciaron las señales en las regiones de los protones hidroxilo (-OH) a $4.60 - 4.67$ ppm el protón anomérico del ácido manurónico y de los protones anoméricos entre $4.80 - 4.82$ ppm y $4.75 - 4.77$ ppm. En los espectros de MALDI-TOF se observó que el P.M. del polisacárido fue mayor a 200,000 m/z, en estos espectros de MALDI y RMN no se pueden apreciar bien la distribución de los bloques M y G debido a que el polímero no está despolimerizado y dificulta su distribución por lo que se puede concluir que está conformado por alrededor de 925 a 930 bloques.

RECOMENDACIONES

La biomasa sólida de sargazo no está exenta de limitaciones, muchas propuestas, aplicaciones y análisis se centran en otras especies del genero *sargassum*, por lo que se debería continuar haciendo investigaciones a nivel laboratorio y planta piloto para proponer una alternativa a las especies *S. natans* y *S. fluitans* debido a su escasa bibliografía y que han causado afectaciones en los arrecifes, a especies marinas y principalmente al turismo en el litoral adyacente al caribe mexicano.

Durante la DA la hidrólisis se considera una etapa limitante ya que en ella se produce la degradación de varios compuestos en azúcares simples y además depende de varios factores. La biomasa de sargazo posee una estructura compleja difícil de degradar, por lo que se recomienda realizar un pretratamiento previo con el único propósito de aumentar la biodisponibilidad de sustrato en la DA y aumentar la eficiencia en comparación con la biomasa no tratada, por lo que se sugiere emplear otros pretratamientos no empleados en esta investigación como los térmicos, biológicos, microondas, etcétera.

Se recomienda que después del proceso de obtención de compuestos de valor agregado como el alginato, es necesario realizar una hidrólisis ácida parcial o total para despolimerizar el compuesto y así obtener buenos espectros de RMN y MS para su fácil caracterización y distribución de los monómeros. También se recomienda realizar un diseño de experimentos cuando se requiera el análisis de RMN donde la temperatura sea la variable independiente, ya que esta puede influir en el resultado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adenkule, K.F. y J.A. Okolie. 2015. A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. **6**(3):205-212.

Al Seadi, T., D. Rutz, H. Prassl, M. Köttner, T. Finsterwalder, S. Volk y R. Janssen. 2008. Handbook of Biogas. University of Southern Esbjerg, Denmark.

Aldana-Aranda, D. 2020. Presentación: México ante el sargazo. *Ciencia*. **71**(4):6-7.

Angelidaki, I. y W. Sanders. 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Environmental Science and Bio/Technology*. **3**:117-129.

Amador-Castro, F., T. García-Cayuela, H.S. Alper, V. Rodríguez-Martínez y D. Carrillo-Nieves. 2021. Valorization of pelagic sargassum biomass into sustainable applications: Current trends and challenges. *Journal of Environmental Management*. **283**:112013.

Aparicio, E., R.M. Rodríguez-Jasso, C.D. Pinales-Márquez, A. Loredó-Treviño, A. Robledo-Olivo, C.N. Aguilar, E.T. Kostas y H.A. Ruiz. 2021. High-pressure technology for *Sargassum* spp biomass pretreatment and fractionation in the third generation of bioethanol production. *Bioresource Technology*. **329**:124935.

Arelli, V., S. Begum, G.R. Anupoju, K. Kuruti, y S. Shailaja. 2018. Dry anaerobic co-digestion of food waste and cattle manure: impact of total solids, substrate ratio and

thermal pre-treatment on methane yield and quality of biomanure. *Bioresource Technology*. **253**:273–280.

Arelli, V., N.K. Mamindlapelli, S. Begum, S. Juntupally y G.R. Anupoju. 2021. Solid state anaerobic digestion of food waste and sewage sludge: impact of mixing ratios and temperature on microbial diversity, reactor stability and methane yield. *Science of the Total Environment*. **793**(1): 148586.

Ayarza-León, J.L. 2014. Los alginatos: 20000 usos de las algas submarinas. *Revista de Química PUCP*. **28**(1-2):19-23.

Barbot, Y.N., H. Al-Ghaili y R. Benz. 2016. A Review on the Valorization of Macroalgal Wastes for Biomethane Production. *Marine Drugs*. **14**(6):120.

Balboa, E.M., C. Gallego-Fábrega, A. Moure. y H. Domínguez. 2016. Study of the seasonal variation on proximate composition of oven-dried *Sargassum muticum* biomass collected in Vigo Ria, Spain. *J. Appl. Phycol.* **28**:1943-1953.

Caballero-Vázquez, J.A., G. Acosta-González y C. Hernández-Zepeda. 2020. El sargazo, un fenómeno complejo. *Ciencia*. **71**(4):14-19.

Chen, Y., J.J. Cheng. y K.S. Creamer. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*. **99**(10):4044-4064.

Chen, H. 2013. Modern solid state fermentation: Theory and practice. Beijing, China. People's Republic. Springer.

Campos-Pozuelo, A.E. 2001. Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Tesis de doctorado. Escola tècnica superior d'Enginyeria Agrària. Departament de Medi Ambient i Ciències del Sòl. Laboratori d'Enginyeria Ambiental (LEA). España.

Davis, T.A., B. Volesky y A. Mucci. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*. **37**(18):4311-4330.

Fawzy, M.A., M. Gomaa, A.F. Hifney, y K.M. Abdel-Gawad. 2017. Optimization of alginate alkaline extraction technology from *Sargassum latifolium* and its potential antioxidant and emulsifying properties. *Carbohydrate Polymers*. **157**:1903-1912.

Fertha, M., A. Belfkira, E.M. Dahmane, M. Taourirte y F. Brouillette. 2017. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. *Arabian Journal of Chemistry*. **10**:3707 – 3714.

Filer, J., H.H. Ding y S. Chang. 2019. Biochemical Methane Potential (BMP) Assay Method for Anaerobic Digestion Research. *Water*. **11**(5):921.

Flórez-Fernández, N., M. López-García, M.J. González-Muñoz, J.M. López-Vilariño y H. Domínguez. 2017. Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from *Sargassum muticum*. *Journal of Applied Phycology*. **29**:1553-1561.

Flórez-Fernández, N., H. Dominguez y M.D. Torres. 2019. A green approach for alginate extraction from *Sargassum muticum* brown seaweed using ultrasound-assisted technique. *International Journal of Biological Macromolecules*. **124**:451-459.

Gallegos-Martínez, M. 2021. Caracterización de *Sargassum* spp del caribe mexicano y su uso potencial como biosorbente de especies iónicas. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de México. México.

Gary, D. Christian. 2009. Química analítica. McGraw Hill. México. D.F.

García-Sánchez, M., C. Graham, E. Vera, E. Escalante-Mancera, L. Álvarez-Filip y B.I. van Tussenbroek. 2020. Temporal changes in the composition and biomass of beached pelagic *Sargassum* species in the Mexican Caribbean. *Aquatic Botany*. **167**:103275.

González-Fernández, C., B. Sialve y B. Molinuevo-Salces. 2015. Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. *Bioresource Technology*. **198**:896-906.

Govindajaran, F.A., L. Cooney, K. Whittaker, D. Bloch, R.M. Burdorf, S. Canning, C. Carter, S.M. Cellan, F.A.A. Eriksson, H. Freyer, G. Huston, S. Hutchinson, K. Mckeegan, M. Malpani, A.M. Raymond, K. Ouellette, R.P. Rockney, M. Shultz y A.N.S. Siuda. 2019. The distribution and mitochondrial genotype of the hydroid *Aglaophenia latecarinata* is correlated with its pelagic *Sargassum* substrate type in the tropical and subtropical western Atlantic Ocean. *PeerJ*. **18**(7):7814.

Gu, X., J. Cai, X. Zhu y Q. Su. 2005. Dynamic ultrasound-assisted extraction of polyphenols in tobacco. *Journal of separation science*. **28**(18):2477-2481.

Hernández, M.S. y L.R.M. Delgadillo. 2011. Adm1 aplicación en anaerobio digestión de residuos sólidos y agua residual. *Tumbaga*. **6**:29-42.

Hernández-Carmona, G., Y.E. Rodríguez-Montesinos, D.L. Arvizu-Higuera, R. Reyes-Tisnado, J.I. Murillo-Álvarez y M. Muñoz-Ochoa. 2012. Technological Advance for Alginate Production in Mexico. *Ingeniería Investigación y Tecnología*. **13**(2):155-168.

Herrero, M., J.A. Mendiola, A. Cienfuentes y E. Ibáñez. 2010. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*. **1217**:2495-2511.

Jansson, A.T., R.J. Pantivoh, L. Sárvári-Horváth y M.J. Taherzadeh. 2019. Dry Anaerobic Digestion of Food and Paper Industry Wastes at Different Solid Contents. *Fermentation*. **5**(2):40.

Jiménez-Contreras, L.F. 2020. Aprovechamiento del alga marina *Sargassum* spp. mediante digestión anaerobia y tratamiento en medio ácido. Tesis de maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Mérida Yucatán, México.

Khan, W., U.P. Rayirath, S. Subramanian, M.N. Jithesh, P. Rayorath, D.M. Hodges, A.T. Critchley, J.S. Craigie, J. Norrie y B. Prithivira. 2009. Seaweed Extracts as

Biostimulants of Plant Growth and Development. *Journal Plant Growth Regulation*, **28**:386-399.

Leal-Bautista, R. M., R. Tapia-Tussell y L. Alzate-Gaviria. 2020. Usos potenciales del sargazo. *Ciencia*. **71**(4):52-57.

Leal, D. B. Matsuhiro, M. Rossi y F. Caruso. 2008. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydrate Research*. **343**(2):308-316.

Li, J., S. Jin, D. Wan, H. Li, S. Gong y V. Novakovic. 2022. Feasibility of annual dry anaerobic digestion temperature-controlled by solar energy in cold and arid areas. *Journal of Environmental Management*. **318**(15):115626.

López-Aguilar, H., G. Kennedy-Puentes, J. Gómez, E. Huerta-Reynoso, M.R. Peralta-Pérez, F. Zavala-Díaz de la Serna y A. Pérez-Hernández. 2021. Practical and Theoretical Modeling of Anaerobic Digestion of *Sargassum* spp. in the Mexican Caribbean. *Polish Journal of Environmental Studies*. **30**(4):3151-3161.

Lorenzo-Acosta. Y. y M.C. Obaya-Abreu. 2005. La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. **39**(1):35-48.

MacArtain, P., C.I.R. Gill, M. Brooks, R. Campbell y I.R. Rowland. 2007. Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutrition Reviews*. **65**(12):535–543.

Martínez-Rodríguez, L.I. 2020. Composición de isotopos estables de carbono y nitrógeno en especies pelágicas de sargazo. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. México.

McHugh, D.J. 1987. Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. Food and Agriculture Organization of the United Nations. USA.

Mhatre, A., S. Gore, A. Mhatre, N. Trivedi, M. Sharma, R. Pandit, A. Anil y A. Lali. 2019. Effect of multiple product extractions on bio-methane potential of marine macrophytic green alga *Ulva lactuca*. *Renewable Energy*. **132**:742-751.

Milledge, J.J., S. Maneein, E. Arribas-López y D. Bartlett. 2020. Sargassum Inundations in Turks and Caicos: Methane Potential and Proximate, Ultimate, Lipid, Amino Acid, Metal and Metalloid Analyses. *Energies*. **13**:1523.

Molino, A., F. Nanna, Y. Ding, B. Bikson y G. Braccio. 2013. Biomethane production by anaerobic digestion of organic waste. *Fuel*. **103**:1003-1009.

Nava-Jiménez, I.A. y H. Sánchez-Hernández. 2020. El sargazo del mar caribe mexicano. *Ciencia*. **71**(4):58-61.

Oyesiku, O.O. y A. Egunyomi. 2014. Identification and chemical studies of pelagic masses of *Sargassum natans* (Linnaeus) Gaillon and *S. fluitans* (Borgessen)

Borgesen (brown algae), found offshore in Ondo State, Nigeria. African Journal of Biotechnology. **13**(10):1188-1193.

Park, J.I., H.C. Woo y J.H. Lee. 2008. Production of Bio-energy from Marine Algae: Status and Perspectives. Korean, Chem. Eng. Res. **46**(5):833-844.

Parras-Huerta, R.A. 2015. Anaerobic digestion: biotechnological mechanisms in waste water treatments and their application in food industry. Producción + limpia. **10**(2):142-159.

Patarra, R.F., L. Paiva, A.I. Neto, E. Lima y J. Baptista. 2011. Nutritional value of selected macroalgae. J. Appl. Phycol. **23**:205-208.

Pawar, S.N. y K.J. Edgar. 2012. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. Biomaterials. **33**:3279-3305.

Rhein-Knudsen, N., M. Tutor-Ale, F. Ajalloueian y A.S. Meyer. 2017. Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: Sargassum spp. and Padina spp. Food Hydrocolloids. **71**:236-244.

Rivera, J.D., Y.M. Correa y J.P. Penagos. 2017. Comparision of different extraction methods for giberelic acid obtention from corn (Zea mays L.). Revista Colombiana de Química, **46**(2):45-50.

Rodríguez-Martínez, R.E. y B.I. van Tussenbroek. 2020. El sargazo en los pastos marinos y arrecifes. *Ciencia*. **71**(4):28-33.

Rodríguez-Martínez, R.E., A.E. Medina-Valmaseda, P. Blanchon, L.V. Monroy-Velázquez, A. Almazán-Becerril, B. Delgado-Pech, L. Vásquez-Yeomans, V. Francisco y M.C. García-Rivas. 2019. Faunal mortality associated with massive beaching and decomposition of pelagic Sargassum. *Marine Pollution Bulletin*. **146**:201-205.

Rodríguez-Martínez, R.E., B.I. van Tussenbroek y E. Jordán-Dahlgren. 2016. Afluencia masiva de sargazo pelágico a la costa del Caribe mexicano (2014-2015). Florecimientos algales nocivos en México. Ensenada, México. CICESE. 352-365.

Roldán-Gutiérrez, J.M, J. Ruiz-Jiménez y M.D. Luque de Castro. 2008. Ultrasound assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction. *Talanta* **75**(5):1369-1375.

Román-Páez, M.A., C.M. Rivera-Narváez, L.M. Cardona-Bermúdez, L.M. Muñoz, D.D. Gómez, C. Passaro-Carvalho y J.M. Quiceno-Rico. (2016). Guía de extracción por fluidos supercríticos: Fundamentos y aplicaciones. SENA. (consultado marzo, 2021).

Sáez-Rico, J. 2017. Diseño de un reactor anaerobio para la digestión de fangos. Tesis de licenciatura. Universidad politécnica de Valencia. España.

Salgado-Arreguín, A.M. 2022. Estudio de la digestión anaerobia del sargazo (*Sargassum spp.*), como una fuente potencial de producción de un bioenergético. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

Salgado-Hernández, E., A.I. Ortiz-Ceballos, S. Martínez-Hernández, E.S. Rosas-Mendoza, A.E. Dorantes-Acosta, A. Alvarado-Vallejo y A. Alavarado-Lassman. 2023. Methane Production of *Sargassum* spp. Biomass from the Mexican Caribbean: Solid Liquid Separation and Component Distribution. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. **20**:2019.

Schell, J.M., D.S. Goodwin y A.N.S. Siuda. 2015. Recent *Sargassum* inundation events in the Caribbean: shipboard observations reveal dominance of a previously rare form. *Oceanography*. **28**(3):8–10.

Smetacek, V. y A. Zingone. 2013. Green and golden seaweed tides on the rise. *Nature*. **504**:84–88.

Song, M., H. Duc-Pham, J. Seon y H. Chul-Woo. 2015. Overview of anaerobic digestion process for biofuels production from marine macroalgae: A developmental perspective on brown algae. *Korean J. Chem. Eng.* **32**:567–575.

Stephen, A.M., G.O. Phillips y P.A. Williams. 2006. Alginates. In Food Polysaccharides and Their Applications. Taylor & Francis Group. USA.

Steudler, S., A. Werner y J.J. Cheng. 2020. Solid State Fermentation: Research and Industrial Applications. Springer. Switzerland.

Tedesco, S., T. Marrero Barroso y A.G. Olabi. 2014. Optimization of mechanical pretreatment of Laminariaceae spp. biomass-derived biogas. *Renew. Energy*. **62**:527–534.

Torres-Beristain, B. 2019. El sargazo en las costas mexicanas. *La ciencia y el Hombre*, **32**(1).

Torres-Lozada P. y A. Pérez. 2010. Actividad metanogénica específica: una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*. **9**:5-14.

Van Tussenbroek, B.I., H.A. Hernández-Arana, R.E. Rodríguez-Martínez, J. Espinoza-Avalos, H.M. Canizales-Flores, C.E. González-Godoy, M.G. Barba-Santos, A. Vega-Zepeda y L. Collado-Vides. 2017. Severe impacts of brown tides caused by *Sargassum* spp. on near-shore Caribbean seagrass communities. *Marine Pollution Bulletin*. **122**:272-281.

Vázquez-Delfín, E., Y. Freile-Pelegrín, A. Salazar-Garibay, E. Serviere-Zaragoza, L.C. Méndez-Rodríguez y D. Robledo. 2021. Species composition and chemical characterization of *Sargassum* influx at six different locations along the Mexican Caribbean coast. *Science of the Total Environment*. **795**:148852.

Velasco, R., H. Villada y J. Carrera. 2007. Applications of Supercritical Fluids in the Agroindustry. *Información Tecnológica*. **18**:53-65.

Viera-Santana, S. y J.J. Santana-Rodríguez. 2015. Técnicas analíticas avanzadas para la extracción y preconcentración de contaminantes emergentes en muestras líquidas. *Revista de la Academia Canaria de Ciencias*. **25**:77-95.

Wang, X., X. Duan, J. Chen, K. Fang, L. Feng, Y. Yan y Q. Zhou. 2016. Enhancing anaerobic digestion of waste activated sludge by pretreatment: effect of volatile to total solids. *Environmental Technology*. **37**(12):1520-1529.

Youssof, L., L. Lallemand, P. Giraud, F. Soulé, A. Bhaw-Luximon, O. Meilhac, C.L. D'Hellencourt, D. Jhurry y J. Couprie. 2017. Ultrasound-assisted extraction and structural characterization by NMR of alginates and carrageenans from seaweeds. *Carbohydrate Polymers*. **166**:55-63.