



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

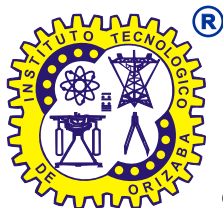
“EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALGINATO DE SODIO A PARTIR DE LA PLANTA ACUÁTICA *ELODEA Densa* EMPLEANDO MÉTODOS CONVENCIONALES Y DE FLUÍDOS SUPERCRÍTICOS”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:
ING. LAURA MUÑOZ GAMBINO

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ARACELI ORTIZ CELISEO

CODIRECTOR DE TESIS:
DRA. LETICIA LÓPEZ ZAMORA





Educación
Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico de Orizaba
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, **15/junio/2026**
Dependencia: División de Estudios de
Posgrado e Investigación.
Asunto: Autorización de Impresión
Opción: I

LAURA MUÑOZ GAMBINO
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA
PRESENTE

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos 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:

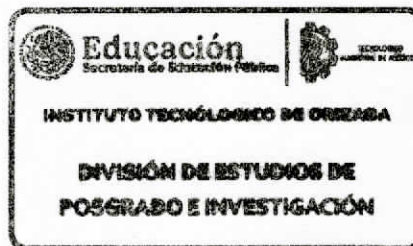
**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALGINATO DE SODIO A PARTIR DE LA PLANTA ACUÁTICA
ELODEA DENSA EMPLEANDO MÉTODOS CONVENCIONALES Y DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.**

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

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica

DR. OSCAR BÁEZ SENTIES
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ccp. Archivo
OBS/NAVC



2026
año de
Margarita
Maza





Instituto Tecnológico de Orizaba
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, **2/marzo/2026**
Asunto: revisión de trabajo escrito

DR. OSCAR BAEZ SENTIES
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE

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

LAURA MUÑOZ GAMBINO

La cual lleva el título de:

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ALGINATO DE SODIO A PARTIR DE LA PLANTA ACUÁTICA
ELODEA DENSA EMPLEANDO MÉTODOS CONVENCIONALES Y DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Y concluyen que se acepta.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®

PRESIDENTE: DRA. ARACELI ORTIZ CELISEO

SECRETARIO: DRA. LETICIA LÓPEZ ZAMORA

VOCAL: DRA. ROSALÍA CERECERO ENRÍQUEZ

VOCAL SUP.: DRA. GUADALUPE LUNA SOLANO

Araceli O

FIRMA

FIRMA

FIRMA

FIRMA

TA-09-18



2026
año de
Margarita
Maza





LICENCIA DE USO OTORGADA POR Laura Muñoz Gambino de nacionalidad Mexicana mayor de edad, con domicilio ubicado en C. Norte 3 LT 6M, CP. 94310, Orizaba, Veracruz en mi calidad de titular de los derechos patrimoniales y morales y autor de la tesis denominada "Extracción y caracterización de alginato de sodio a partir de la planta acuática *Elodea densa* empleando métodos convencionales y de fluidos supercríticos" en adelante "**LA OBRA**" quien para todos los fines del presente documento se denominará "**EL AUTOR Y/O EL TITULAR**", a favor del Instituto Tecnológico de Orizaba del Tecnológico Nacional de México, la cual se registrará por las cláusulas siguientes:

PRIMERA -OBJETO: "**EL AUTOR Y/O TITULAR**", mediante el presente documento otorga al Instituto Tecnológico de Orizaba del Tecnológico Nacional de México, licencia de uso gratuita e indefinida respecto de "**LA OBRA**", para almacenar, preservar, publicar, reproducir y/o divulgar la misma, con fines académicos, por cualquier medio en forma física y a través del repositorio institucional y del repositorio nacional, éste último consultable en la página: (<https://www.repositorionacionalcti.mx/>).

SEGUNDA - TERRITORIO: La presente licencia se otorga, de manera no exclusiva, sin limitación geográfica o territorial alguna, de manera gratuita e indefinida.

TERCERA -ALCANCE: La presente licencia contempla la autorización para formato uso de "**LA OBRA**" en cualquier formato o soporte material y se extiende a la utilización, de manera enunciativa más no limitativa a los siguientes medios: óptico, magnético, electrónico, virtual (red), mensaje de datos o similar conocido por conocerse en medio óptico, magnético, electrónico, en red, mensajes de datos o similar, conocido o por conocerse.

CUARTA - EXCLUSIVIDAD: La presente licencia de uso aquí establecida no implica exclusividad en favor del Instituto Tecnológico de Orizaba; por lo tanto, "**EL AUTOR Y/O TITULAR**" conserva los derechos patrimoniales y morales de "**LA OBRA**", objeto del presente documento.

QUINTA - CRÉDITOS: El Instituto Tecnológico de Orizaba y/o el Tecnológico Nacional de México reconoce que el "**AUTOR Y/O TITULAR**" es el único, primigenio y perpetuo titular de los derechos morales sobre "**LA OBRA**"; por lo tanto, siempre deberá otorgarle los créditos correspondientes por la autoría de la misma.

SEXTA - AUTORÍA: "**EL AUTOR Y/O TITULAR**" manifiesta ser el único titular de los derechos de autor que derivan de "**LA OBRA**" y declara que el material objeto del presente fue realizado por él, sin violentar o usurpar derechos de propiedad intelectual de terceros; por lo tanto, en caso de controversia sobre los mismos, se obliga a ser el único responsable.

Dado en la Ciudad de Orizaba, a los días 25 del mes de junio de 2026.

"**EL AUTOR Y/O TITULAR**"



"**EL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ORIZABA**"



DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a Dios, por ser mi guía, mi fortaleza y mi fuente de sabiduría a lo largo de este camino.

A mi esposo, Carlos, con todo mi amor y admiración, por ser un ejemplo de valentía y fortaleza. Gracias por acompañarme, apoyarme y motivarme incluso en los momentos más difíciles. Este logro también te pertenece, porque tu presencia y tu fuerza me impulsaron a no rendirme.

A mis padres, Enriqueta y Primitivo, por su amor, cariño y apoyo incondicional. Gracias por enseñarme el valor de la perseverancia, el esfuerzo y la importancia de concluir todo aquello que se comienza.

A mis hermanos, Valentina y Alexander, por su cariño y su compañía. Este logro también lleva una parte de ustedes, porque su presencia y amor han sido pilar importante en mi vida.

A mis amigas, Giovanna, Renata y Alondra, quienes han sido parte fundamental en de esta etapa. Gracias por su amistad sincera, su cariño y por acompañarme en los momentos de dificultad y alegría.

A mi familia: Rosy, Elías, Sebastián, Sofia, Axel, Mariana, Pedro, Martha y Goyita, por hacer de este recorrido una experiencia más llevadera y llena de momentos agradables. Gracias por su cariño, apoyo incondicional y su paciencia, especialmente durante las reuniones familiares.

A mis abuelos, Ricardo y Rafaela, quienes ya no han estado físicamente para compartir este logro, pero cuya presencia permanece viva en mi corazón. Esta dedicatoria es especialmente para ustedes, por sus enseñanzas y su amor.

Con profundo amor y gratitud, dedico este logro a todas las personas que, de una manera u otra, han sido parte de mi formación personal y profesional.

RECONOCIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Araceli y mi codirectora de tesis, la Dra. Leticia, por su acompañamiento constante, guía cercana y valiosas aportaciones durante todo el desarrollo de esta investigación. Su apoyo, paciencia y compromiso fueron fundamentales para la consolidación de este trabajo, así como para mi formación académica y profesional.

Asimismo, agradezco a la Dra. Rosalía y a la Dra. Guadalupe por sus valiosas recomendaciones, comentarios y contribuciones, que enriquecieron significativamente a esta investigación.

A los profesores que formaron parte de mi trayectoria educativa, les expreso mi agradecimiento por compartir sus conocimientos, experiencias y herramientas académicas que contribuyeron de manera importante a mi formación profesional y al desarrollo de este proyecto.

A la institución educativa, el Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Orizaba, por brindarme los espacios, recursos y condiciones necesarias para llevar a cabo mis estudios y la realización de esta investigación.

De manera especial reconozco el apoyo otorgado por el CONAHCYT (ahora SECIHTI), a través de su programa de becas con No. 4019894, el cual fue fundamental para el desarrollo de mis estudios de posgrado y la culminación de este trabajo.

Expreso mi reconocimiento al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento brindado para el desarrollo y realización de este proyecto.

Agradezco también al Dr. Gregorio por la oportunidad de realizar una estancia académica en el Instituto de Diseño e Innovación Tecnológica (IDIT) de la Universidad Iberoamericana Puebla, así como el equipo del IDIT por su apoyo, hospitalidad y por propiciar un entorno enriquecedor para el aprendizaje y el intercambio académico.

RESUMEN

Extracción y caracterización de alginato de sodio a partir de la planta acuática *Elodea densa* empleando métodos convencionales y de fluidos supercríticos

Elaborado por: Ing. Laura Muñoz Gambino

**Dirigida por: Dra. Araceli Ortiz Celiseo.
Dra. Leticia López Zamora.**

La presente investigación evaluó el potencial de *Elodea densa* como fuente alternativa para la obtención de alginato de sodio (Alg-Na), mediante la optimización de métodos de extracción convencional y fluidos supercríticos. La caracterización fisicoquímica evidenció diferencias entre las muestras de Ojo de Agua (OA) y Nogales (N), destacando un mayor contenido de grasas y cenizas en OA, lo que influyó en el rendimiento de extracción. En el convencional se utilizaron diferentes solventes a diferente tiempo de hidratación, posterior se aplicaron diseños como Box-Behnken y CDC, en el que se trabajaron puntos alto, central y bajo: TH=72, 60 y 48 h, CAL=11, 9 y 7%, y TC= 120, 80 y 80 min de ambas lagunas, el CDC solo para N con punto central de TH=42 h y TC=100 min y para el método con fluidos supercríticos (FS), se empleó como pretratamiento reemplazando al tiempo de hidratación bajo condiciones: temperatura de 80, 75 y 70 °C, co-solvente de 15, 10 y 5 %, y tiempo de extracción de 3, 2.5 y 2 h con una presión de 3500 psi. De acuerdo a los resultados, el solvente más favorable fue el formaldehído (0.1 %) a 72 h, el cual se aplicó para el método convencional. En OA se obtuvo 21.74 % (72 h de hidratación, 9 % de concentración alcalina y 40 min de calentamiento) y de 17.73 % para N (60 h, 9 % y 80 min), mientras que el diseño central compuesto incrementó el rendimiento hasta 41.31 %. En fluidos supercríticos, las mejores condiciones fueron 70 °C, 5 % de etanol y 2.5 h, obteniéndose un rendimiento de 18.276 % y un modelo con R² de 92.02 %. Los análisis por FT-IR y HPLC confirmaron la obtención de alginato, con mayor pureza en las muestras tratadas con FS, evidenciando que *E. densa* es una fuente viable de Alg-Na.

ABSTRACT

Extraction and characterization of sodium alginate from aquatic plant *Elodea densa* using conventional methods and supercritical fluid

By: Eng. Laura Muñoz Gambino

Advisor(s): PhD Araceli Ortiz Celiseo.

PhD Leticia López Zamora.

This research evaluated the potential of *Elodea densa* as an alternative source for obtaining sodium alginate (Alg-Na), through the optimization of conventional and supercritical fluid extraction methods. Physicochemical characterization revealed differences between the Ojo de Agua (OA) and Nogales (N) samples, highlighting a higher fat and ash content in OA, which influenced the extraction yield. In the conventional method, different solvents were used at different hydration times. Subsequently, designs such as Box-Behnken and CDC were applied, in which high, central, and low points were considered: TH=72, 60, and 48 h, CAL=11, 9, and 7%, and TC=120, 80, and 80 min for both lagoons. The CDC was used only for nitrogen (N) with a central point of TH=42 h and TC=100 min. For the supercritical fluid (SCFs) method, formaldehyde was used as a pretreatment, replacing the hydration time under the following conditions: temperature of 80, 75, and 70 °C, co-solvent of 15, 10, and 5%, and extraction time of 3, 2.5, and 2 h at a pressure of 3500 psi. According to the results, the most favorable solvent was formaldehyde (0.1%) at 72 h, which was applied for the conventional method. In OA, a yield of 21.74% was obtained (72 h hydration, 9% alkaline concentration, and 40 min heating), and 17.73% for N (60 h, 9%, and 80 min), while the composite core design increased the yield to 41.31%. In supercritical fluids, the best conditions were 70 °C, 5% ethanol, and 2.5 h, yielding 18.276% and an R^2 value of 92.02%. FT-IR and HPLC analyses confirmed the production of alginate, with higher purity in the samples treated with SCFs, demonstrating that *E. densa* is a viable source of Alg-Na.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE	iii
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	xi
NOMENCLATURA	xiii
OBJETIVOS	xiv
INTRODUCCIÓN	1
 CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
1.1 Polisacáridos	4
1.2 Generalidades del alginato de sodio	5
1.2.1 Características del alginato de sodio	5
1.2.2 Propiedades del alginato	6
1.2.3 Aplicaciones del alginato de sodio	8
1.3 Métodos de extracción de alginatos	10
1.3.1 Extracción asistida por microondas	11
1.3.2 Extracción asistida por ultrasonido	11
1.3.3 Extracción por fluidos supercríticos	12
1.3.4 Extracción por método convencional	15
1.4 Métodos de caracterización de alginato	17
1.4.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	17
1.4.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	18

1.5 Fuentes de obtención de alginato de sodio	19
1.5.1 Macroalgas	19
1.5.2 Bacterias en la producción de alginato de sodio	21
1.5.3 Algas de agua dulce para obtención de alginato	22
1.6 Generalidades de <i>Elodea densa</i>	23
1.6.1 Características de la planta <i>Elodea densa</i>	24
1.6.2 Aplicaciones de <i>Elodea densa</i>	25
1.7 Antecedentes	26
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Metodología general	31
2.2 Recolección del alga y muestreo de agua de las lagunas	32
2.3 Acondicionamiento y Caracterización de <i>Elodea densa</i>	32
2.3.1 Acondicionamiento de <i>Elodea densa</i>	32
2.3.2 Análisis físicos de <i>Elodea densa</i>	33
2.3.3 Análisis químicos de <i>Elodea densa</i>	33
2.4 Análisis fisicoquímicos del agua	35
2.4.1 Calidad de agua	35
2.4.2 Dureza total del agua	35
2.4.2 Nutrientes	36
2.5 Obtención de alginato de sodio	36
2.5.1 Pretratamiento de algas y extracción ácida de alginato de sodio	36
2.5.2 Extracción alcalina, filtración y precipitación	37
2.6 Diseño de experimentos	37
2.6.1 Diseño Preliminar	37

2.6.2 Diseño Box-Benhken	38
2.6.3 Diseño CDC Equiradial	38
2.6.4 Análisis los modelos cuadráticos	39
2.6.5 Análisis de la superficie de respuesta	40
2.7 Tratamiento con Fluidos Supercríticos (FS)	41
2.7.1 Tratamiento de <i>Elodea densa</i> con CO ₂	41
2.7.2 Obtención de alginato de sodio	41
2.8 Rendimientos del alginato de sodio	42
2.9 Caracterización de alginato de sodio	42
2.9.1 Método de caracterización por FT-IR	42
2.9.2 Método de caracterización por HPLC	43
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Recolección y caracterización de <i>Elodea densa</i>	45
3.1.1 Determinación de características físicas de <i>Elodea densa</i>	45
3.1.2 Determinación de color	46
3.1.3 Análisis químicos de <i>Elodea densa</i>	47
3.2 Análisis de agua de las Lagunas Ojo de Agua y Nogales	50
3.2.1 Calidad de agua	50
3.2.2 Dureza del agua	51
3.2.3 Nutrientes del agua de la Laguna de Ojo de Agua y Nogales	52
3.3 Obtención de alginato de sodio en un diseño 3 ²	53
3.3.1 Análisis estadístico Diseño 3 ²	55
3.4 Optimización de la obtención de alginato de sodio a partir del diseño Box-Behnken	57

3.4.1 Análisis estadístico de Ojo de Agua	59
3.4.2 Análisis estadístico de Nogales	64
3.5 Diseño experimental CDC Equiradial para <i>Elodea densa</i> de la Laguna de Nogales	68
3.5.1 Análisis del diseño experimental CDC	69
3.6 Obtención de Alg-Na con Fluidos Supercríticos	73
3.6.1 Obtención de rendimientos de Alg-Na por FS con el diseño Box-Behnken	75
3.7 Caracterización por FT-IR	81
3.8 Caracterización por HPLC	85
3.8.1 Cromatograma de alginato de sodio obtenido	86
CONCLUSIONES	89
RECOMENDACIONES	92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Estructura de alginato de sodio: a) ácido α -L-gulurónico (G) y b) ácido β -D-manurónico (M) (Montes <i>et al.</i> , 2021)	6
1.2	Origen y propiedades de los alginatos (Rahman <i>et al.</i> , 2024)	7
1.3	Aplicación de alginato de sodio en alimentos: a) calidad y textura en panificación, b) conservación y envasado, c) ablandador de carnes y d) consistencia en lácteos. Fuente: elaborada con BioRender.com	9
1.4	Aplicación de alginato de sodio en la industria farmacéutica, a) impresión de tejido artificial y b) encapsulación de fármacos. (Elaborada con BioRender.com)	10
1.5	Diagrama de fases modificado a fluido supercrítico (Cengel y Boles, 2012)	13
1.6	Proceso de extracción de sólidos con fluido supercrítico (Yousefi <i>et al.</i> , 2021)	14
1.7	Rango de bandas de estiramiento espectroscópico IR de Alg-Na (Guerrero-Pérez y Patience, 2019)	18
1.8	Clasificación de macroalgas: a) <i>Phaeophyta</i> , b) <i>Rhodophyta</i> y c) <i>Clorophyta</i> . (Pereira, 2021)	20
1.9	Algas marrones, a) <i>Macrocystis</i> , b) <i>Laminaria</i> y c) <i>Ascophyllum</i>	21
1.10	Alginato bacteriano (Liu <i>et al.</i> , 2024)	22
1.11	Alga de agua dulce, <i>Spirogyra</i> sp Fuente: https://www.jircas.go.jp/en/database/thaivege/094	23
1.12	<i>Elodea densa</i> (Mehrhoff, 2014)	24
2.1	Metodología general	31
2.2	Recolección de algas y agua, a) Laguna de Ojo de agua y b) Laguna de Nogales	32
2.3	Determinación de propiedades físicas de <i>Elodea densa</i> : a) medición de hojas; b) medición de color con colorímetro FRU	33

2.4	Metodología para pretratamiento y extracción de alginato de sodio	37
2.5	Diseño CDC para la obtención de Alg-Na de <i>Elodea densa</i> Nogales; eje X: tiempo de hidratación (TH, h), eje Y: tiempo de extracción alcalina (TC, min)	39
2.6	Espectrofotómetro FTIR Nicolet™ iS5™	42
2.7	Equipo HPLC Agilent 1260 Infinity modelo G1329B	43
3.1	Determinación de tamaño de hojas de <i>Elodea densa</i>	46
3.2	Gráficas de efectos individuales sobre el rendimiento de alginato de sodio: a) Ojo de agua y b) Nogales	56
3.3	Diagrama de Pareto de efectos estandarizados del rendimiento de Alg-Na de Ojo de Agua con $\alpha = 0.05$	60
3.4	Gráfica de probabilidad normal de residuos (Laguna de Ojo de Agua)	61
3.5	Gráfica de contorno del rendimiento del Alg-Na en la Laguna de Ojo de Agua: a) interacción de tiempo de hidratación (X_1 , h) y concentración alcalina (X_2 , %), b) interacción de tiempo de hidratación (X_1 , h) con tiempo de extracción alcalina (X_3 , min), y c) interacción con concentración alcalina (X_2 , %) y tiempo de extracción alcalina (X_3 , min)	62
3.6	Superficie de respuesta del rendimiento del Alg-Na de la Laguna de Ojo de Agua (RODA): a) interacción de tiempo de hidratación (X_1 , h) y concentración alcalina (X_2 , %), b) interacción de tiempo de hidratación (X_1 , h) con tiempo de extracción alcalina (X_3 , min), y c) interacción con concentración alcalina (X_2 , %) y tiempo de extracción alcalina (X_3 , min)	63
3.7	Diagrama de Pareto de efectos estandarizados del rendimiento de Alg-Na de Nogales con $\alpha = 0.05$ del diseño Box-Behnken	65
3.8	Gráfica de probabilidad normal de residuos (Laguna de Nogales)	66
3.9	Gráfica de contorno de: a) efecto combinado de tiempo de hidratación (TH) y concentración alcalina (CAL), b) efecto de tiempo	67

	de hidratación (TH) y tiempo de extracción alcalina (TC) y c) efecto combinado de CAL y TC, sobre en rendimiento con Nogales	
3.10	Superficie de respuesta del rendimiento de Alg-Na de la Laguna de Nogales de: a) efecto combinado de tiempo de hidratación (TH) y concentración alcalina (CAL), b) efecto de tiempo de hidratación (TH) y tiempo de extracción alcalina (TC) y c) efecto combinado de CAL y TC	68
3.11	Diagrama de Pareto de efectos estandarizados del rendimiento de Alg-Na de Nogales con $\alpha = 0.05$ del diseño CDC equirradial	70
3.12	Gráfica de probabilidad normal de residuos del diseño CDC para Nogales	71
3.13	Análisis de respuesta (%R) con variables TH y TC: gráfica de contorno (a) y superficie de respuesta (b)	72
3.14	Aceites y fenoles de <i>Elodea densa</i> extraída por FS	74
3.15	Diagrama de Pareto de efectos estandarizados del rendimiento de Alg-Na de Ojo de Agua con $\alpha = 0.05$ del diseño Box-Behnken con tratamiento de FS	78
3.16	Gráfica de probabilidad normal de residuos del diseño Box-Behnken con tratamiento con FS para Ojo de Agua	79
3.17	Gráfica de contorno de %R de Alg-Na por tratamiento con FS: a) Temperatura (°C) y concentración de co-solvente (%), b) Temperatura (°C) y tiempo de extracción de fenoles (h) y c) Concentración de co-solvente (%) y tiempo de extracción de fenoles (h)	80
3.18	Superficie de respuesta del rendimiento %R-ODA por tratamiento con FS: a) Temperatura (°C) y concentración de cosolvente (%), b) Temperatura (°C) y tiempo de extracción de fenoles (h) y c) concentración de cosolvente (%) y tiempo de extracción de fenoles (h)	80
3.19	Espectro FT-IR de estándar de alginato de sodio	82

3.20	Espectro FT-IR de estándar de alginato de sodio del método convencional: a) Ojo de Agua y b) Nogales	83
3.21	Espectro FT-IR de estándar de alginato de sodio con tratamiento por FS: a) Ojo de Agua y b) Nogales	84
3.22	Cromatograma de alginato de sodio de SIGMA ALDRICH	85
3.23	Espectro UV de alginato de sodio	86
3.24	Cromatograma de alginato de sodio obtenido: a) Alg-Na por el método convencional y b) Alg-Na con el tratamiento con Fluido Supercrítico	87

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.1	Propiedades de alginato de sodio (Guo <i>et al.</i> , 2020)	8
1.2	Propiedades críticas de disolventes (Sancho y Ovejero, 2023)	15
2.1	Parámetros químicos de <i>Elodea densa</i>	34
2.2	Variables con niveles experimentales para el proceso de obtención de Alg-Na, diseño Box-Behnken	38
3.1	Determinación de color de plantas acuáticas <i>Elodea densa</i>	47
3.2	Parámetros químicos de <i>Elodea densa</i>	48
3.3	Nutrientes de <i>Elodea densa</i>	49
3.4	Parámetros de la calidad de agua	50
3.5	Pruebas de dureza del agua	51
3.6	Nutrientes del agua	52
3.7	Rendimientos de alginato de sodio método convencional y diseño 3 ² con <i>Elodea densa</i>	54
3.8	ANOVA de extracción de alginato de sodio por método convencional del diseño 3 ² con <i>Elodea densa</i> de Ojo de Agua	55
3.9	ANOVA de extracción de alginato de sodio por método convencional del diseño 3 ² con <i>Elodea densa</i> de Nogales	56
3.10	Rendimientos obtenidos de Alg-Na mediante el diseño Box-Behnken	58
3.11	ANOVA de extracción de alginato de sodio por método convencional del diseño Box-Behnken con <i>Elodea densa</i> de Ojo de Agua	59
3.12	ANOVA de extracción de alginato de sodio por método convencional del diseño Box-Behnken con <i>Elodea densa</i> Nogales	65
3.13	Rendimientos de Alg-Na obtenidos mediante un diseño CDC para la Laguna de Nogales	68
3.14	ANOVA de extracción de alginato de sodio por método convencional del diseño CDC con <i>Elodea densa</i> Nogales	69
3.15	Rendimientos preliminares de Alg-Na con pretratamiento con FS	75

3.16	Rendimientos de Alg-Na con tratamiento de fluido supercrítico mediante el diseño Box Behnken de Ojo de Agua (ODA)	76
3.17	ANOVA de extracción de alginato de sodio con tratamientos con FS del diseño Box-Behnken <i>Elodea densa</i> Ojo de Agua	77
3.18	Grupos funcionales del espectro FT-IR en alginato de sodio	82

NOMENCLATURA

Símbolo	Descripción	Unidades
Alg-Na	Alginato de sodio	--
M	Ácido β -L-manurónico	--
G	Ácido α -L-gulurónico	--
FT-IR	Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier	cm ⁻¹
FS	Fluidos supercríticos	--
C ₂ H ₅ OH	Etanol	--
CH ₂ O	Formaldehído	--
L	Luminosidad	--
N	Normalidad	--
R	Rendimiento	%
rpm	Revoluciones por minuto	--
T	Temperatura	°C
V	Volumen	L

OBJETIVOS

Objetivo general

Optimizar la extracción de alginato de sodio a partir de la planta acuática *Elodea densa* proveniente de las lagunas de Nogales y Ojo de Agua.

Objetivos específicos

1. Recolectar e identificar la especie *Elodea densa* provenientes de las lagunas de Nogales y Ojo de Agua, así como determinar sus características físicas.
2. Optimizar la extracción de alginato de sodio mediante un diseño de experimentos las condiciones que afectan en la extracción de alginato de sodio a partir de *Elodea densa* por el método convencional.
3. Realizar una pre-extracción de *Elodea densa* por medio de fluidos supercríticos para comparar el rendimiento de alginato de sodio.
4. Caracterizar el alginato de sodio obtenido a partir de técnicas HPLC y FT-IR

INTRODUCCIÓN

El alginato de sodio es un polisacárido natural que en los últimos años ha aumentado el interés de su obtención debido a sus notables propiedades fisicoquímicas, como su capacidad gelificante y estabilizante gracias a la presencia de cationes en su estructura, su comportamiento estereoselectivo ha tenido un amplio uso, tiene diversas aplicaciones dentro de la industria farmacéutica, alimentaria, entre otras.

La aplicación del alginato de sodio ha mostrado interés en la industria farmacéutica, en la encapsulación de medicamentos, cicatrización de heridas, en el uso de pastas para las prótesis dentales y en biotintas en impresiones de tejidos artificiales. En la alimentaria, se ha utilizado como ingrediente para dar consistencias como espesante y gelificante. Se ha utilizado en la obtención de biopelículas y recubrimientos naturales (Bojorges *et al.*, 2023).

El uso del alginato de sodio está determinado por su estructura química y composición, lo que hace que su caracterización sea un aspecto fundamental, al igual que el proceso de obtención. La extracción del alginato ha representado uno de los mayores desafíos, ya que los rendimientos varían significativamente según las condiciones de extracción aplicadas. En este sentido, diversas variables han sido objetos de estudio en los procesos de obtención, tales como el tiempo de extracción, pH, temperatura e incluso concentración de carbonato de sodio (Na_2CO_3) (Montes *et al.*, 2021). Estos factores influyen directamente en la eficiencia del proceso y en la calidad del alginato obtenido, por lo que múltiples investigaciones exploran su comportamiento en relación con las diferentes fuentes de extracción y los métodos empleados.

El método empleado tradicionalmente es por el convencional que se trabaja en tres etapas: 1) pretratamiento, 2) extracción ácida y 3) extracción alcalina). Sin embargo, la problemática de este proceso, es el uso del formaldehído como solvente en la etapa 1), ya que puede presentar riesgos para la salud, además, esta etapa del proceso conlleva a tiempos muy largos, entre 24 hasta 72 h. Para mitigar el uso el uso del

solvente dañino y reducir el tiempo del pretratamiento, se han implementado estrategias con procesos de extracción sustentables como es el caso del método de extracción asistida por ultrasonido (UAE) y asistida por microondas (MAE).

Dentro de las fuentes de extracción, las algas marinas son la materia prima principal en la obtención de alginato de sodio debido a la alta concentración de ácido algínico. Sin embargo, presenta la problemática de temporalidad y requiere de cuidados para su transporte. Por lo que el objetivo de esta investigación se plantea el uso de una nueva fuente: *Elodea densa*, una planta acuática considerada invasora en diversas regiones del mundo debido a su rápido crecimiento y a la capacidad de sus raíces para fijarse en cualquier zona del fondo acuático (Zehnsdorf *et al.*, 2015).

Además del uso de *Elodea densa*, se propuso incorporar un nuevo método de extracción para la obtención de alginato de sodio: la extracción con fluidos supercríticos (FS), la cual reemplaza parte de la etapa 1). Este método se emplea para eliminar grasas, lípidos, fenoles y otros compuestos bioactivos presentes en *Elodea densa*, a fin de realizar posteriormente las extracciones ácida y alcalina, evaluando las variables que intervienen en el proceso y que permiten obtener un rendimiento eficiente y un producto de calidad.

Para ello, se desarrolló primero el método convencional con el propósito de estudiar las variables que permiten alcanzar un buen rendimiento. Los datos obtenidos se sometieron a un diseño Box–Behnken para optimizar el proceso y determinar las condiciones más estables, como la concentración de Na_2CO_3 y el tiempo de extracción alcalina, que posteriormente se aplican en el pretratamiento con FS.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Polisacáridos

Los polisacáridos son carbohidratos de largas cadenas que se forman por enlaces glucosídicos y presentan características poliméricas, se encuentran en abundancia en diversos alimentos animales, vegetales y algas. Los polisacáridos desempeñan papeles esenciales en la determinación de la textura, calidad y valor nutricional en los alimentos. Las algas, forman polisacáridos sulfatados en la pared celular que están incrustados en forma de celulosa y están compuestos por fucoidanos y alginatos (Jayasingue *et al.*, 2022).

Los alginatos presentan sales de alginato de calcio (Ca^{2+}), alginato de magnesio (Mg^{2+}) y alginato de sodio (Na^+), que dependen de la selectividad de los enlaces de forma estructura y presentan pesos moleculares bajos, medianos y altos. Además, se forman mediante macroestructuras lineales o ramificadas, las cuales se modifican con facilidad mediante métodos físicos, químicos o enzimáticos. También poseen un elevado grado de quiralidad que influye en su solubilidad en agua, y no son tóxicos para el ser humano (Khachatryan *et al.*, 2022).

La complejidad de las estructuras de los polisacáridos presenta modificaciones químicas de acuerdo a la diversidad de las fuentes de obtención, lo que resulta con propiedades fisicoquímicas diferentes y da paso a diversas aplicaciones industriales: la alimentaria, farmacética, agrícola, entre otras, en las cuales influyen como hidratante, gelificante, agente emulsificante y de espesamiento (Yao *et al.*, 2023). Uno de los polisacáridos más importantes es el alginato de sodio debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades antibacterianas y facilidad de formación de gel, siendo uno de los más abundantes en las algas marrores (Nam *et al.*, 2024)

1.2 Generalidades del alginato de sodio

El alginato es el nombre general para describir las sales de sodio del ácido algínico y ha sido ampliamente estudiado debido a su amplia gama de aplicaciones, el cual ha sido utilizado por ser abundante en la naturaleza. Se encuentra presente en las algas pardas como polisacáridos en conjunto con fucoidanos y laminarano. En estas algas, el alginato representa un 40 % en materia seca en toda su composición y es el principal responsable de la flexibilidad y resistencia mecánica de las hojas de las algas (Abka *et al.*, 2022).

Las propiedades presentes en el alginato dependen de las diferentes fuentes de extracción, entre ellas se encuentran las algas pardas, las cuales se recolectan en las regiones costeras como el Caribe y Península de Baja California. Además, ciertos microorganismos son capaces de sintetizar alginatos bacterianos, particularmente bacterias del suelo. De igual forma se pueden encontrar en plantas acuáticas principalmente aquellas que ocasionan proliferaciones acuáticas (Hasnain *et al.*, 2020).

1.2.1 Características del alginato de sodio

El alginato de sodio (Alg-Na) se presenta en forma de gel como ácido algínico dentro de las paredes celulares de las algas, el alginato comercial presenta una masa molar relativa variante entre 32-400 kDa (Saji *et al.*, 2022). Su estructura química consta de dos ácidos: β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G) (Figura 1.1), los cuales están enlazados y forman mezclas homogéneas entre ellos (MM o GG), así también mezclas heterogéneas (MG o GM), lo que conlleva a las diferentes propiedades fisicoquímicas para su aplicación (Moreno-Rivas *et al.*, 2024). Los bloques G se presentan en forma de gel de fuerza alta y, por tanto, contienen una alta porosidad. Sin embargo, los bloques M son de fuerza media y con alta resistencia a la extracción que hacen que sea de poros más pequeños. La secuencia de los bloques depende de la procedencia del alginato, de la condición de extracción y las concentraciones de soluciones que se

utilicen en el proceso de extracción. Por tanto, para alginato de sodio, el bloque G es mayormente predominante en un 70 % (Guo *et al.*, 2020).

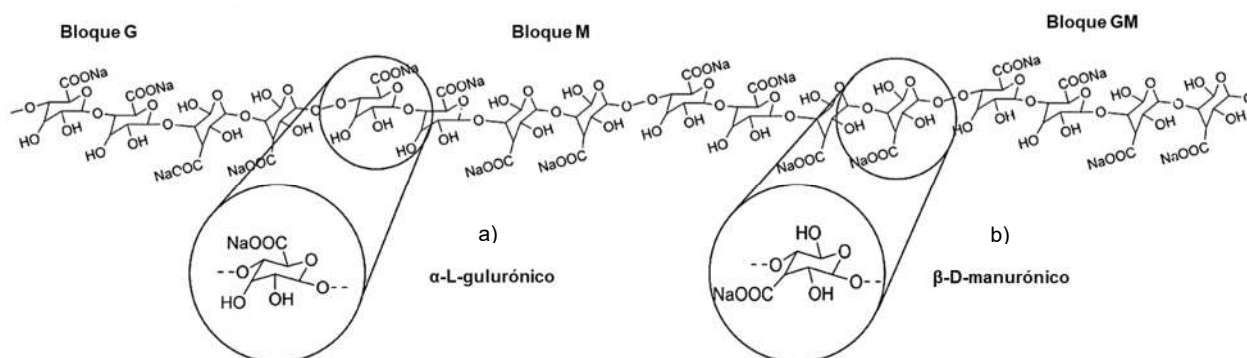


Figura 1.1 Estructura de alginato de sodio: a) ácido α -L-gulurónico (G) y b) ácido β -D-manurónico (M) (Montes *et al.*, 2021)

1.2.2 Propiedades del alginato

El Alg-Na presenta propiedades como agente espesante, estabilizador, agente formador de películas y gelificante, dichas propiedades se deben a las diferentes fuentes de extracción, algunas algas dan en la extracción como resultados geles fuertes (especie *Durvillaeae*) o de consistencia media (especie *Laminaria digitata*) (Figura 1.2) (Rahman *et al.*, 2024).

Las desventajas que presenta el Alg-Na son: la lenta solubilidad en agua fría y ocasiona una solución muy espesa, es insoluble en éter, cloroformo y alcohol etílico, e incluso se ha estudiado que su solubilidad depende del pH, la concentración y la fuerza iónica del solvente. El Alg-Na se encuentra estable en el entorno de pH alcalino hasta un valor de 10, rebasando este valor provoca un efecto de despolimerización lo que causa una descomposición estructural de la molécula modificando de un polímero a monómero, por otra parte, el alginato con su estructura heterogénea precipita en el entorno ácido de pH 3-4 (Guo *et al.*, 2020).

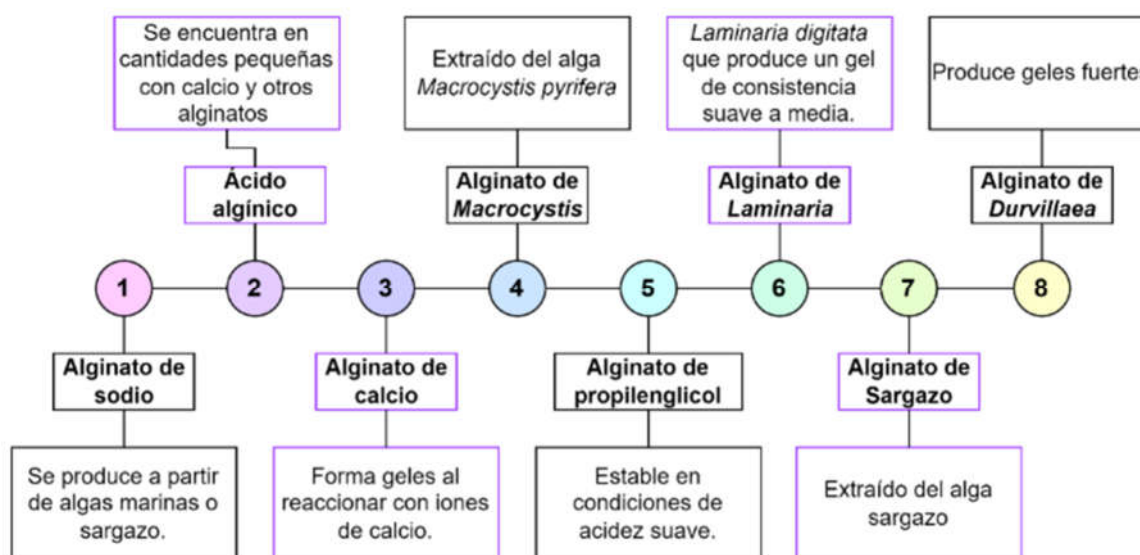


Figura 1.2 Origen y propiedades de los alginatos (Rahman *et al.*, 2024)

La viscosidad de los alginatos depende de la longitud de su estructura molecular y de su masa molar, es decir, si este presenta una masa molar alta formará una solución de alta viscosidad y viceversa, lo cual dependerá de la aplicación industrial. Por lo tanto, la masa molar puede seleccionarse para ajustar la velocidad y la rigidez del gel; sin embargo, una masa molar inadecuada podría generar fuerzas de corte elevadas durante su inyección, lo que ocasionaría daños en aplicaciones sensibles, como en productos farmacéuticos inyectables (Guo *et al.*, 2020).

La formación de hidrogeles de alginato de sodio, poseen retención de agua, flexibilidad y capacidad de sintonización, por lo que es viable para modificaciones químicas o la composición de otros materiales. Además, el alginato de sodio puede gelificar rápidamente en condiciones suaves y en estado hidrofílico, lo que favorece su aplicación en diversos campos. Estas propiedades del alginato de sodio se deben a la formación de su estructura con respecto a los bloques M y G (apartado 1.2.1), en el cual el M da lugar a la flexibilidad y G en geles resistentes (Cao *et al.*, 2025). En la Tabla 1.1 se muestran algunas de las propiedades que caracterizan al Alg-Na.

Tabla 1.1 Propiedades de alginato de sodio (Guo *et al.*, 2020)

Propiedad	Descripción
Capacidad de gelificación	Se debe a la interacción iónica de su estructura
Biocompatibilidad	Se adapta con facilidad para aplicaciones médicas
Hidrofilico	Absorbe agua con facilidad, útil para los cosméticos
Biodisponibilidad controlada	Presenta matrices poliméricas para liberación de fármacos en el cuerpo
Flexibilidad mecánica	Alcanza deformarse y recuperar su forma original, es excelente para las biopelículas

1.2.3 Aplicaciones del alginato de sodio

El alginato, como polisacárido de origen natural, ha captado atención significativa en diversos campos por las propiedades y aplicaciones versátiles que presenta. Además, es de baja toxicidad, biodegradable y alta viscosidad, por lo que es objeto de investigación en diversas industrias, principalmente en la: alimentaria, farmacéutica (biotintas) y agrícola (bioestimulantes) (Bojorges *et al.*, 2023).

Industria alimentaria. Se utiliza como: estabilizador de alimentos, aglutinante y espesante, sus geles son directamente aplicados en los alimentos para mejorar la calidad, textura y cambio de color sin alterar el sabor de los alimentos (Figura 1.3a), para la conservación y envasado de los mismos ya que minimiza la actividad bacteriana (Figura 1.3b) (Xue *et al.*, 2024). Se ha empleado como ingrediente texturizante, emulsionante y sustituto de grasas, ablandador de carnes (Figura 1.3c), recubrimiento comestible natural, para dar una mejor consistencia de los lácteos y mejorar su conservación (Figura 1.3d) (Torabi *et al.*, 2021).

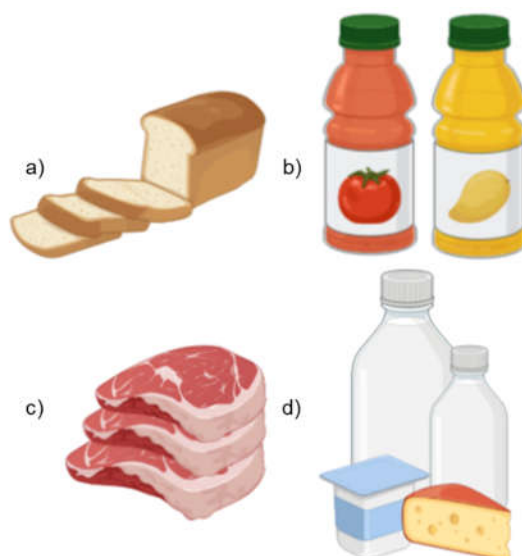


Figura 1.3 Aplicación de alginato de sodio en alimentos: a) calidad y textura en panificación, b) conservación y envasado, c) ablandador de carnes y d) consistencia en lácteos.

Fuente: elaborada con BioRender.com

Industria farmacéutica: el Alg-Na posee múltiples propiedades funcionales, entre las que destacan su actividad antibacteriana, así como sus efectos potenciales antidiabéticos y antiobesidad, lo que ha impulsado su amplio uso en aplicaciones farmacéuticas. Uno de los usos innovadores es la incorporación de biotintas para impresión 3D de tejidos añadiendo otros polisacáridos para formar hidrogeles capaces de formar filamentos de forma controlada, lo cual permite que la biotinta presente un amplio rango de viscosidades facilitando fabricación de estructuras tridimensionales con aplicaciones en ingeniería (Figura 1.4a). (Piras y Smith, 2020).

Adicionalmente, el Alg-Na se emplea en sistemas de encapsulación de fármacos, donde la matriz polimérica favorece la liberación controlada y sostenida del principio activo al entrar en contacto con el entorno fisiológico, mejorando así una eficacia en la absorción (Figura 1.4b) (Ye *et al.*, 2024).

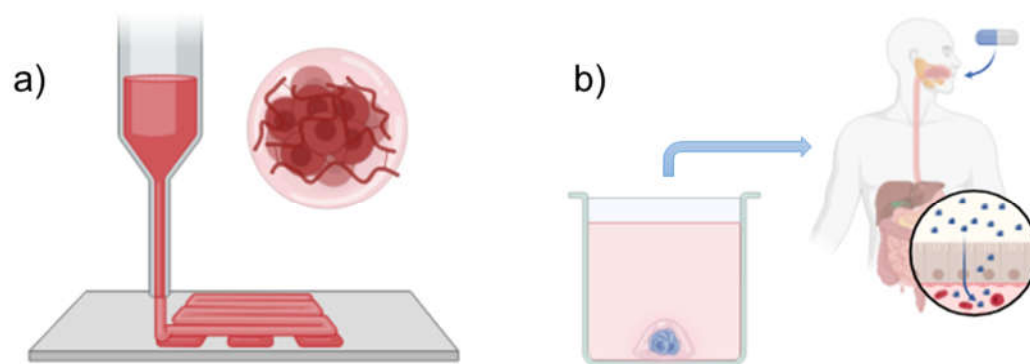


Figura 1.4 Aplicación de alginato de sodio en la industria farmacéutica, a) impresión de tejido artificial y b) encapsulación de fármacos. (Elaborada con BioRender.com)

Bioestimulantes: investigaciones recientes ha generado impacto sobre las propiedades del alginato en la generación de fertilizantes lo cual es crucial para la agricultura sostenible. El alginato produce matrices de polímeros favoreciendo su aplicación como recubrimiento en una barrera adicional y modulando la liberación de nutrientes en condiciones ambientales como humedad del suelo o pH. Para garantizar una buena aplicación, se requiere un Alg-Na de alta pureza. Por ello, es fundamental emplear una técnica de extracción que mejore la eficiencia del proceso, permita obtener un producto de mejor calidad en menos tiempo y reduzca el uso de solventes que generan desechos y prolongan el tiempo de obtención (Szopa *et al.*, 2025).

1.3 Métodos de extracción de alginatos

Las sales presentes en el ácido algínico generalmente son magnesio, calcio y sodio, siendo este último el más comúnmente extraído. La obtención de alginato mediante métodos convencionales requiere de una fase como tratamiento de las algas que oscila entre 24 y 72 h, esto con el fin de eliminar los lípidos y fenoles de las paredes celulares de las algas y garantizar la seguridad y calidad del producto final. En este contexto, han surgido alternativas basadas en principios de la química verde en el tratamiento de algas que optimizan el proceso mejorando el rendimiento del producto

(Rahman *et al.*, 2024). Entre los métodos más estudiados destacan la extracción asistida por microondas y la extracción asistida por ultrasonido, los cuales han sido evaluados en comparación con la extracción del método convencional. Asimismo, investigaciones recientes han explorado el uso de fluidos supercríticos como estrategia innovadora mostrando resultados eficientes y sostenibles (Ummat *et al.*, 2021).

1.3.1 Extracción asistida por microondas

La extracción asistida por microondas tiene la ventaja de automatizar el proceso de extracción, esto conlleva, una alternativa para la mejora de eficiencia energética en el proceso de la obtención de Alg-Na. Además, el método presenta un objetivo importante: calidad del producto y eficiencia del proceso. El objetivo de este método es optimizar los factores como temperatura, tiempo de extracción y la relación entre cantidad de solventes a utilizar. Se basa en aplicar ondas electromagnéticas no ionizantes a frecuencias de 300 MHz a 300 GHz y la transferencia de energía ocurre por mecanismos de conducción iónica y rotación dipolar. El solvente más utilizado, es el etanol por su bajo costo y menos contaminante (Souza *et al.*, 2024). Los equipos de microondas se caracterizan principalmente por cuatro componentes: 1) generador de microondas, 2) guía de ondas, 3) recipiente en el cual se coloca la muestra y 4) circulador, este último permite que las ondas se distribuyan de manera homogénea por toda la muestra (Gomez *et al.*, 2020). Las variables de operación en este método es la potencia de microondas (W) y la temperatura (°C).

1.3.2 Extracción asistida por ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido tiene como objetivo reducir el tiempo del proceso, la temperatura y la cantidad de solvente a utilizar, además es de los métodos de extracción más efectivos para aumentar el rendimiento de la extracción. Es necesario conocer los parámetros físicos como: potencia, frecuencia y longitud de onda (Rutkowska *et al.*, 2017), los cuales determinan la intensidad ultrasónica para la clasificación de ultrasonidos como: de baja frecuencia, (16 a 100 kHz) y alta frecuencia

(20 y 400 kHz). En la elección del disolvente, los parámetros físicos son: viscosidad, tensión superficial y presión del vapor, además de la solubilidad de la muestra que se realizará su extracción. El parámetro más importante es la temperatura de extracción, ya que un aumento inadecuado puede reducir cualquiera de los parámetros descritos anteriormente, afectando significativamente la forma estructural del Alg-Na (Sanjaya *et al.*, 2022).

1.3.3 Extracción por fluidos supercríticos

La extracción por fluidos supercríticos es una técnica amigable con el ambiente, haciendo cumplir los principios de Química verde, presenta ventaja, a diferencia de la convencional de no generar desechos, ya que el fluido que se utiliza como solvente se logra recuperar (Gallego *et al.*, 2019).

Para entender el proceso de extracción por este método es necesario conocer el fundamento principal de un fluido supercrítico, el cual se considera un punto intermedio entre un líquido y un gas. El fluido supercrítico (FS) se describe a partir del diagrama de fases, el cual se define por tres líneas: sublimación, fusión y vaporización (Figura 1.5). La vaporización es un punto característico de las fases, ya que en este punto es la última etapa por desaparecer el cual se denomina punto crítico, describiendo a la presión y temperatura como críticas y superior a ello, se encuentra el fluido supercrítico (zona sombreada). Un componente puro que se considera en estado supercrítico, presenta características de temperatura y presión excedidas de los valores críticos, en los cuales las fases como gas y líquido ya no existen (Slota *et al.*, 2025).

La extracción por fluidos supercríticos de compuestos bioactivos es de gran interés, principalmente para la obtención de Alg-Na, siendo el más importante para la industria alimentaria. El proceso de extracción es vital para obtener un buen rendimiento del producto y con alta pureza para su aplicación, como se observa en la Figura 1.6, la cual describe las partes básicas del sistema de la extracción por fluido supercrítico. Se

compone de una fuente del fluido (normalmente CO_2), una celda que contiene el sólido a tratar, una bomba para presurizar el gas, un recipiente de recolección del extracto. En el caso del CO_2 , este gas se convierte en un fluido supercrítico a una presión y temperatura superiores a 31.1°C y 7.29 MPa (Yousefi *et al.*, 2021).

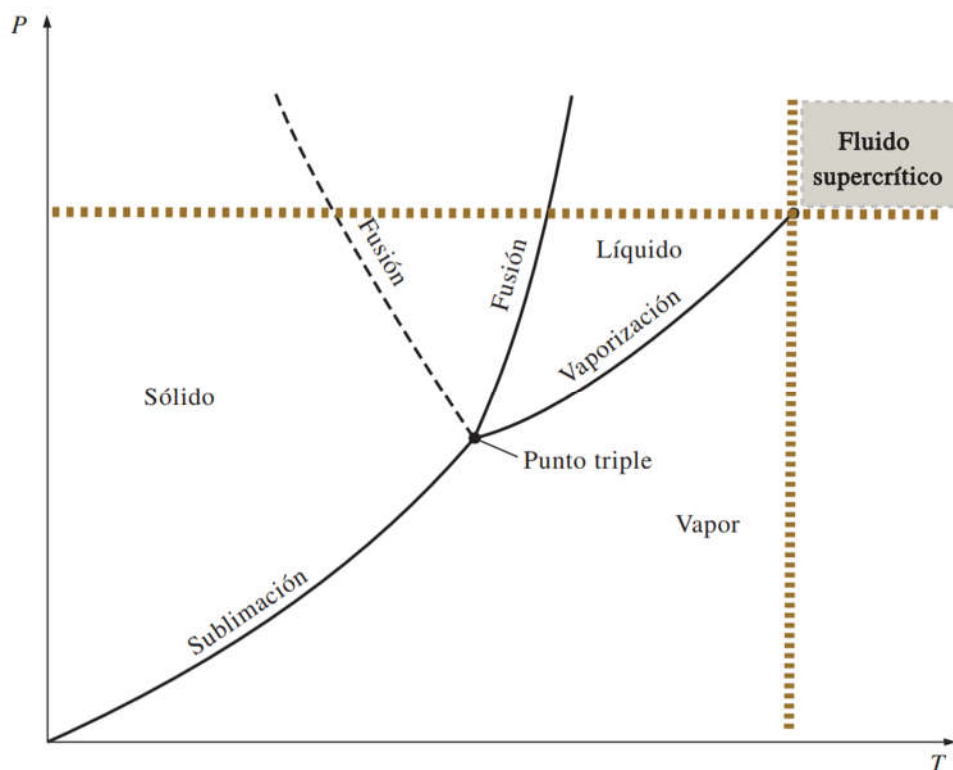


Figura 1.5 Diagrama de fases modificado a fluido supercrítico (Cengel y Boles, 2012)

La extracción con el sistema de fluidos supercríticos se lleva a cabo mediante los siguientes pasos: 1) presurización y ajuste de temperatura: se eleva la presión y la temperatura por encima de la presión crítica del solvente a utilizar; 2) extracción, el fluido supercrítico fluye a través de un lecho fijo de partículas sólidas y disuelve los componentes extraíbles del sólido, después el disolvente se alimenta al extractor y recircula al lecho fijo y 3) separación, donde el solvente se descomprime a una presión inferior a la crítica (Brunner, 2010).

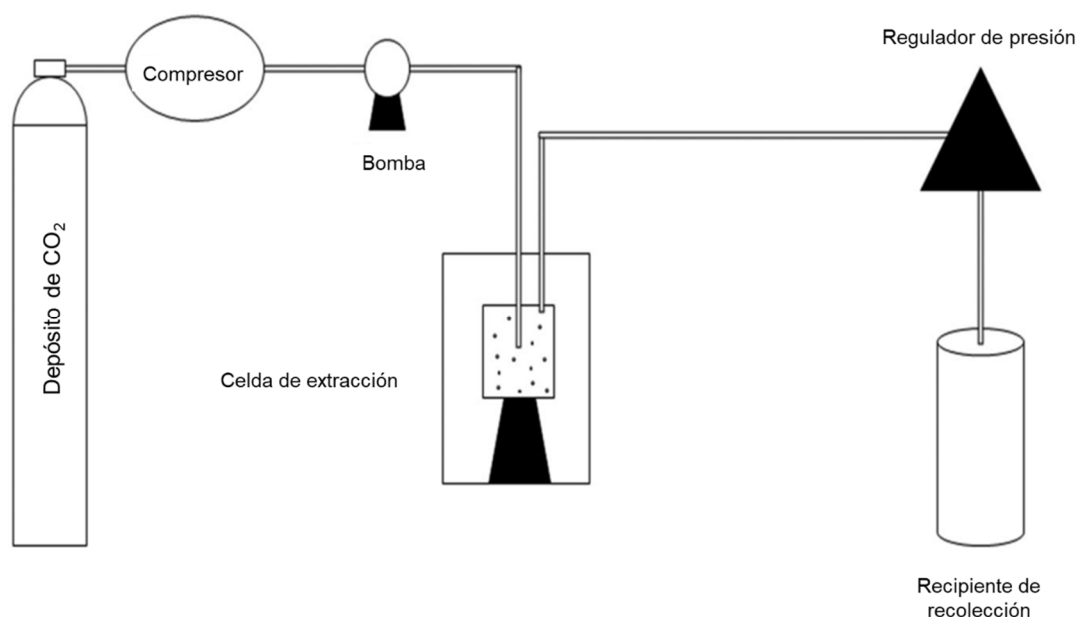


Figura 1.6 Proceso de extracción de sólidos con fluido supercrítico (Yousefi *et al.*, 2021)

Existen diferentes estudios de los tipos de solventes que se han comportado como un fluido supercrítico, en la Tabla 1.2, se describen las condiciones críticas de los solventes más comunes que se emplean en los fluidos supercríticos. El solvente CO₂ se ha utilizado debido que es de baja toxicidad, no inflamable, baja temperatura y presión crítica, bajo costo y recuperable (Santos *et al.*, 2019).

La extracción por FS es de gran interés en el campo de compuestos bioactivos debido a sus ventajas en la transferencia de masa, propiedades termodinámicas y seguridad en el uso del solvente (principalmente (CO₂). En investigaciones recientes, este proceso se ha utilizado en aplicaciones como: descafeinar el café, extracción de compuestos bioactivos (ácidos grasos, lípidos, terpenoides) que mantienen las propiedades del producto mejor que los extractos obtenidos por métodos convencionales. El uso de CO₂ se puede utilizar como pretratamientos para la obtención de algún compuesto de interés, en el cual mejora la eficiencia en el rendimiento (López-Limón *et al.*, 2024).

Tabla 1.2 Propiedades críticas de disolventes (Sancho y Ovejero, 2023)

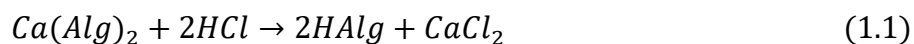
Disolvente	T_c (°C)	P_c (MPa)	ρ_c (kg·m³)
Dióxido de carbono	30.9	7.37	468
Hexafloruro de azufre	45.5	3.77	735
Óxido nitroso	36.4	7.25	452
Trifluorometano	26	4.82	525
Amoniaco	132.3	11.35	235
Xenón	16.5	5.84	1110
Agua	373.9	22.06	322
Metanol	239.4	8.09	272
Etanol	240.7	6.14	276
2-Propanol	235.1	4.76	273
Etano	32.2	4.88	203
Eteno	9.1	5.04	214
Propano	96.6	4.25	217
Tolueno	318.5	318.5	292

1.3.4 Extracción por método convencional

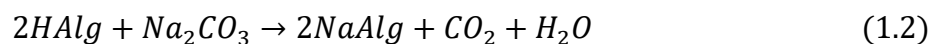
El proceso más utilizado para la obtención de alginato de sodio es la extracción por solventes, este método conlleva un tiempo prolongado y cantidades grandes de solventes y agua destilada en su proceso. Además, es necesario eliminar componentes fenólicos mediante una solución de formaldehído para tener una extracción eficiente de Alg-Na. Se consideran diversos parámetros para su extracción como: temperatura, pH y concentraciones de reactivos (Contreras, 2020). Los pasos que conlleva la extracción por el método convencional son los siguientes:

Las algas llevan un proceso de pretratamiento para eliminar los fenoles presentes en las paredes de las hojas, se realiza con formaldehído, Bojorges *et al.* (2023)

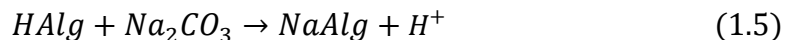
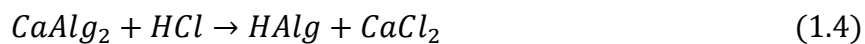
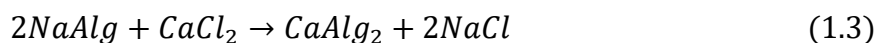
proponen etanol y acetona al 70 % en este proceso, a continuación, se realiza un cambio iónico con una solución de HCl o H₂SO₄ a baja concentración, dando paso a la reacción de pre-extracción (Ec. 1.1), en la que sucede una transformación de alginato de calcio a ácido algínico.



La reacción de extracción alcalina (Ec. 1.2), ocurre a partir de la conversión de ácido algínico, se realiza la obtención del alginato de sodio (como sal) por un medio alcalino. Normalmente con carbonato de sodio (Na₂CO₃) para la obtención conversión del ácido algínico (Naranjo-Guamaní, 2019).



En el método de conversión del ácido algínico a alginato, suceden tres reacciones en un solo paso, cuando se añade CaCl₂ se forma un complejo $CaAlg_2$, (Ec. 1.3). Al añadir ácido clorhídrico (HCl) se obtiene el ácido algínico (Ec. 1.4) y al añadir el Na₂CO₃ para la conversión completa del alginato de sodio (Ec. 1.5). La finalidad es realizar un cambio iónico completo de la sal de calcio con la de sodio y neutralización con ácido-base.



Las rutas han mostrado un notable crecimiento en los rendimientos de alginato de sodio al utilizar algas pardas como fuentes principales. No obstante, se han probado algunos métodos de extracción como una vía para optimizar el proceso, considerando las extracciones y conversiones en una única etapa, sin requerir múltiples tratamientos.

El conocimiento de la estructura y composición del Alg-Na es fundamental, ya que los distintos métodos de extracción pueden dar lugar a productos con presencia de impurezas o trazas de otros compuestos. Por ello, es necesario evaluar la pureza empleando métodos analíticos; no obstante, las técnicas espectroscópicas son las más utilizadas debido a su precisión y confiabilidad.

1.4 Métodos de caracterización de alginato

En la caracterización de Alg-Na, se consideran de acuerdo con sus propiedades, entre ellos la solubilidad con los solventes, ya que en la mayoría de los análisis espectroscópicos emplean solventes para la caracterización. Los métodos más destacados en el análisis de alginato de sodio son: espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) y cromatografía líquida de alta resolución HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) (Clayden *et al.*, 2001).

1.4.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier indicará los principales grupos funcionales que existen en la molécula. La medición de los espectros IR se ocupan para todas las fases (líquido, sólido o gaseoso), aplicando una gota (en el caso de los líquidos) entre dos placas de sal de NaCl o KBr, que son transparentes ante la luz de IR y no causan interferencia en las mediciones de los grupos funcionales de interés. En gases, se utiliza una celda de gas con ventanas transparentes, en la cual la muestra se introduce y se sella para evitar fugas. Para las muestras sólidas, se disuelven en solventes comunes como cloruro de metileno (CH_2Cl_2), tetracloruro de carbono (CCl_4). Las muestras de consistencia tipo “gel” se coloca en una celda más larga (Dutta, 2017).

Este método, la radiación IR atraviesa la muestra y parte de ella, es absorbida, el espectro resultante representa la absorción de la radiación creando una “huella” molecular de la muestra. La frecuencia de absorción IR depende de las vibraciones,

mientras que la intensidad de: la eficacia de transferencia de energía a la molécula, la cantidad que se transmite y el detector (Guerrero-Pérez y Patience, 2019).

Cabe señalar que los compuestos con un momento dipolar absorben la radiación infrarroja de acuerdo al grupo funcional característico del Alg-Na. A medida que el Alg-Na absorben energía, la molécula vibra y por tanto se estira y dobla, de acuerdo a su geometría estructural. El rango de bandas de acuerdo a cada grupo funcional de manera general se muestra en la Figura 1.7, en la cual las bandas características del Alg-Na se encuentran ¹ los estiramientos para los O-H en rangos de 3200-3400 cm^{-1} , de C-H y COO^- entre los 1590 y 1610 cm^{-1} . Los grupos correspondientes de los C-H de α -L-gulurónico es de 900 cm^{-1} y la banda de 860 cm^{-1} es de C-H de ácido β -manurónico. Los estiramientos de los grupos funcionales del Alg-Na dependerán de acuerdo a la formación de su estructura molecular (Guo y Zhang, 2020).

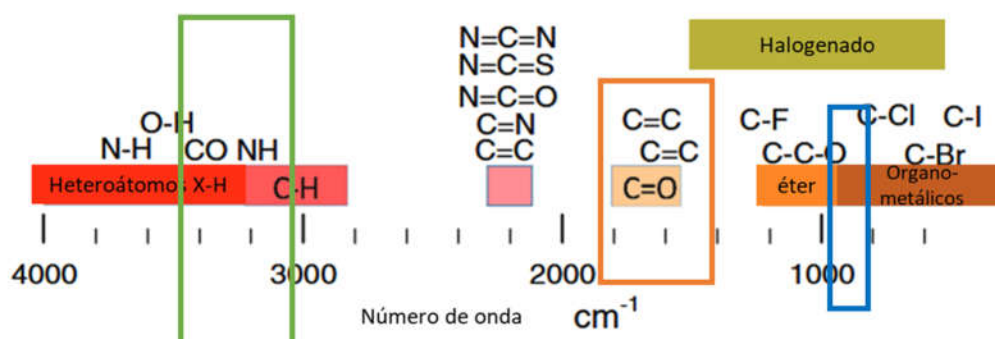


Figura 1.7 Rango de bandas de estiramiento espectroscópico IR de Alg-Na (Guerrero-Pérez y Patience, 2019)

1.4.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las herramientas más importantes en la analítica aplicada en el análisis de entidades químicas. El objetivo del método es intentar separar y cuantificar el producto principal, cualquier impureza de reacción, todos los intermedios sintéticos disponibles y cualquier producto de degradación. El HPLC es el método es el más preciso y ampliamente utilizado para determinar la estabilidad del producto (Bhardwaj *et al.*, 2015).

La técnica de HPLC se basa en la separación de los componentes de una muestra mediante su paso a través de una columna. El proceso inicia con la inyección de la muestra líquida, cuyos componentes viajan a través de la fase estacionaria mientras un líquido (fase móvil) es impulsado a alta presión por una bomba. El disolvente utilizado en esta técnica puede ser polar o no polar, dependiendo de la naturaleza de la muestra; además, debe tener una alta pureza, por lo que se emplean solventes de grado HPLC. Para el Alg-Na se requiere como disolvente ácido fosfórico, ya que no es soluble en otros como acetona, alcohol y requiere de un solvente que no interfiera en el cambio estructural de la molécula (Ali, 2022).

1.5 Fuentes de obtención de alginato de sodio

Las principales fuentes de obtención del alginato son las algas marinas, conocidas como macroalgas, las cuales presentan características renovables y sostenibles, por lo que las convierte en una excelente opción para obtener biopolímeros convirtiéndose en un interés por sus aplicaciones (Moore y Colbert, 2024), también se encuentran las bacterias patógenas que han atribuido a la obtención de alginato de sodio (Abka-Khajouei *et al.*, 2022) y un nuevo estudio que abarca a partir de algas de agua dulce, sin embargo, se sigue estudiando debido a que las características de éstas son diferentes a la de las algas marinas.

1.5.1 Macroalgas

Las algas son organismos acuáticos fotosintéticos, pertenecen al dominio *Eukaryota* pertenece al reino *Plantae* y *Chromista*, contienen proteínas, aminoácidos, polisacáridos, vitaminas, minerales, pigmentos, entre otros componentes, debido a ello, se utilizan en actividades biológicas como antiviral, antimicrobianos o antibacterial. Las macroalgas se caracterizan por su composición celular que se observa en las paredes de las hojas, su adaptación depende de la disposición de luz solar y la temperatura del agua. Se clasifican de acuerdo a su pigmentación y composición química, de las cuales existen tres tipos diferentes de especies (Figura

1.8): *Phaeophyceae* (algas marrones), *Rhodophyta* (algas rojas) y *Chlorophyta* (algas verdes) (Pereira, 2021).

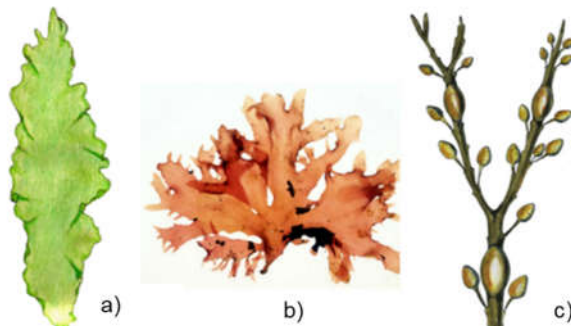


Figura 1.8 Clasificación de macroalgas: a) *Phaeophyta*, b) *Rhodophyta* y c) *Chlorophyta*.
(Pereira, 2021)

- **Macroalgas verdes y rojas**

Las algas verdes se diferencian por sobrevivir en aguas saladas o dulces. Son características debido a color verde, su pigmentación es idéntica a las plantas vasculares que contienen clorofilas y carotenoides. Estas algas pertenecen al reino *Plantae*. Las algas rojas tienen clorofila, ficobilinas y algunos carotenoides como pigmentos fotosintéticos, su característica principal como lo dice su nombre, es de color rojo (Pereira, 2021).

- **Macroalgas marrones**

Estas macroalgas constituyen una fuente rica en polisacáridos, lo que les confiere una gran relevancia en la obtención de alginatos. En particular, las algas pardas son las principales materias primas utilizadas, destacando especies como *Macrocystis*, *Laminaria* y *Ascophyllum* (Figura 1.9). Así mismo, se han reportado buenos rendimientos en la extracción a partir de otros géneros, como: *Alaria*, *Eisenia*, *Nercocystis*, *Sargassum*, *Cystoseira* y *Fucus* (Rahman *et al.*, 2024).

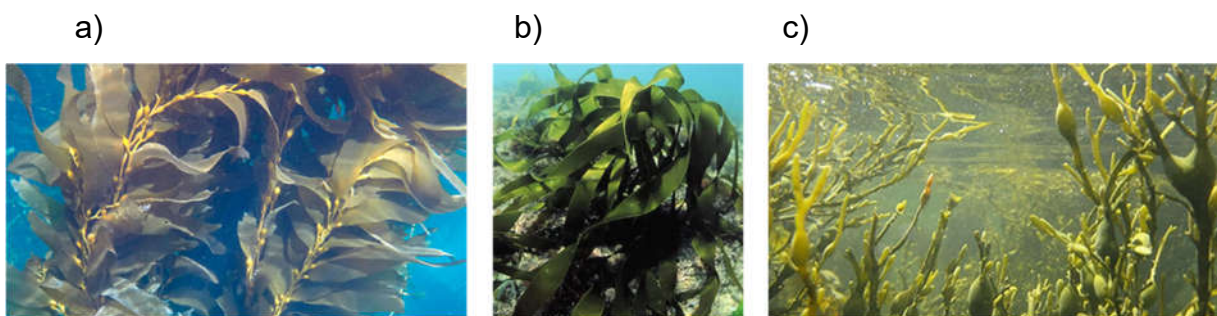


Figura 1.9. Algas marrones, a) *Macrocyctis*, b) *Laminaria* y c) *Ascophyllum*

De acuerdo a Saji *et al.* (2022), los rendimientos que se han obtenido de *Macrocyctis* 21.5 %, de *Laminaria digitata* se ha reportado entre 33 - 39 % y *Ascophyllum* de 38 % de alginato de sodio. Algunas de las especies varían su rendimiento de acuerdo a las características fisicoquímicas del alga, la especie de *Sargassum* ha presentado rendimientos de entre 30-35 %, entre su clasificación se encuentran otras algas como: *S. binderi* con 28.7 % de rendimiento, *S. muticum* de 13.57 ± 0.13 %, *Sargassum sp* de 24.56% y *S. siliquosum* de 38.9 %. Las algas de *Ascophyllum nodosum* varía su rendimiento entre 22 a 30 % y *Laminaria digitata* con 25 a 44 % (Ahmad *et al.*, 2021).

1.5.2 Bacterias en la producción de alginato de sodio

En comparación con los métodos tradicionales, la obtención de alginato mediante cultivo bacteriano ofrece ventajas como un proceso más limpio, fácil separación y purificación, así como un enfoque más sostenible. De acuerdo con Abka *et al.* (2022), la obtención de alginato sucede en bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias no patógenas como *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas fluorescens* y bacterias del suelo como *Azotobacter vinelandii*.

Las bacterias patógenas y no patógenas tienen la capacidad de producir alginato en grandes cantidades como parte de su proceso de excreción, generalmente observado en forma de biopelículas (Figura 1.10). El alginato producido por *P. aeruginosa* presenta una calidad superior en comparación con el obtenido de otras bacterias; sin embargo, su cultivo requiere volúmenes elevados y, por ello, la producción resulta más

costosa (Hurtado *et al.*, 2022). Entre sus desventajas se tiene que, a pesar de su alta calidad, la cantidad de alginato que puede producirse de forma controlada es limitada, debido a las estrictas condiciones necesarias para el crecimiento bacteriano (Liu *et al.*, 2024).

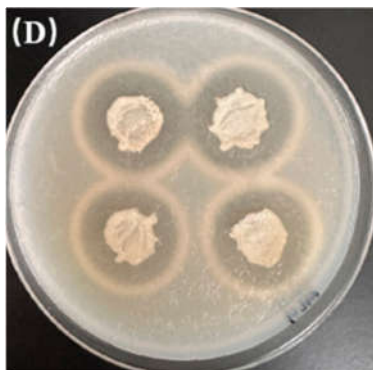


Figura 1.10 Alginato bacteriano (Liu *et al.*, 2024)

Muchas de las investigaciones en la extracción de Alg-Na demuestran que las algas marinas son eficaces como fuentes de obtención, sin embargo, presentan la problemática que se encuentran en la costa y solo en ciertas estaciones del año, además conlleva un proceso cuidadoso para su traslado. Por lo que el uso de algas de agua dulce, se está explorado como una nueva alternativa para la obtención del Alg-Na.

1.5.3 Algas de agua dulce para obtención de alginato

Las algas de agua dulce presentan propiedades similares a las algas de agua salada, sin embargo, existen pocas investigaciones sobre ellas y el rendimiento que se ha reportado ha sido menor con respecto a las algas marinas. Naranjo-Guamaní (2019), realizó la extracción de alginato de sodio a partir de un alga de agua dulce de la familia *Zygnemataceae*, reportando un rendimiento de alginato de 6.08 %, empleando la extracción por el método convencional demostrando que existe la presencia de una mínima cantidad de alginato de sodio.

El alga de agua dulce de la familia *Zygnemataceae*, conocida comúnmente como escoria de estanque (*Spirogyra* sp), ha sido de una de las algas verdes más evolutiva con su característica de tener una forma filamentosa y de pared lisa, sin poros (Figura 1.11). La escoria de estanque habita en superficies rocosas húmedas e incluso alrededor de otras algas acuáticas, se encuentra también en ríos, lagos y tanques, en las zonas que no tienen gran fluidez el agua y suele crecer al existir algas de alguna otra especie sobrepoblada y poca oxigenación (Busch y Hess, 2022).



Figura 1.11 Alga de agua dulce, *Spirogyra* sp Fuente:
<https://www.jircas.go.jp/en/database/thaivege/094>

Una fuente prometedora de alginato de sodio es la planta acuática *Elodea densa*, la cual se caracteriza por su amplia distribución geográfica y su alta disponibilidad a lo largo del año, además ofrece ventajas desde el punto de vista ambiental y económico.

1.6 Generalidades de *Elodea densa*

La planta acuática *Elodea densa* (o mejor conocida como *Egeria densa*), pertenece a la familia *Hydrocharitaceae*, con nombre común elodea brasileña (Figura 1.12), esta alga se considera una amenaza para los ecosistemas acuáticos ya que es invasiva por encima de su distribución, su propagación es rápida en climas templados y cálidos. La Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (EPPO), por su adaptabilidad, la ha catalogado como una especie de plantas exóticas invasoras (Rimac *et al.*, 2018).



Figura 1.12 *Elodea densa* (Mehrhoff, 2014)

En diversos países, *E. densa* se considera como una plaga por su rápida invasión y adaptación ecológica, debido a ello, se han buscado métodos de control de propagación. Al igual que cualquier otra maleza, existen métodos físicos (mediante extracción manual), químicos o biológicos que logran la eliminación física de *E. densa* a corto plazo, por ejemplo, el método en el control químico se realiza con cobre y herbicidas, lo cual genera un impacto negativo en el ecosistema acuático. El control biológico, se utiliza organismos como hongos (*Fusarium* sp.) y peces de especie conocida *Ctenopharyngodon idella*, lo que conlleva a grandes desventajas la adaptación de estas dos especies (Curt *et al.*, 2010).

1.6.1 Características de la planta *Elodea densa*

La ubicación de *E. densa* principalmente es en lagos y estanques de acuarios por sus características, ha demostrado la capacidad de captar nutrientes del cuerpo del agua y realizar la fotosíntesis incluso a bajas cantidades de CO₂ y luz, lo que le hace eficiente para colonizar diferentes sistemas (Melo-Páez *et al.*, 2021). Por su crecimiento, *Elodea densa* disminuye la velocidad del agua provocando la sedimentación de partículas en suspensión, así aumenta la disponibilidad de luz. El objetivo principal de *Elodea densa* es en el aspecto ambiental, lo que genera microhábitats utilizados como refugio y criadero (Gomes *et al.*, 2023).

La planta *E. densa* es de tipo suculenta, perenne y se propagan con facilidad, presenta hojas cercanas de entre 2 a 6 cm de grosor y entre 10-90 cm de largo. Los tallos rara vez presentan ramificaciones, los cuales al romperse logran formar nuevas plantas. Sus hojas son completamente lisas, sin poros y de color verde brillante (CABI, 2019), además poseen cloroplastos, paredes finas y una cutícula delgada.

Su hábitat es en agua dulce entre 1 a 2 m de profundidad, proveniente de América del Sur (Brasil, Uruguay y Argentina). Se encuentra en lagos principalmente de poca fluidez, se adapta a cualquier clima principalmente en templados, en temporadas de invierno su reproducción es menor, sin desaparecer. Presenta productividad de 497 g de peso seco/m²/mes, ha logrado reemplazar la vegetación completa de plantas acuáticas nativas del agua, la problemática que presenta es amplia como obstrucción de vías pluviales, es apta para sedimentos, sin embargo, es problema para los peces (Hardiningtyas *et al.*, 2020).

1.6.2 Aplicaciones de *Elodea densa*

Elodea densa tiene la capacidad de tolerar niveles de pH que van de 6.5 a 10 y su crecimiento se debe a la disponibilidad de CO₂, asimismo es resistente a la desecación por lo que es ventaja para el uso en humedales artificiales en el tratamiento de aguas residuales. Se ha comprobado que esta planta acuática es apta para la eliminación de contaminantes en el agua (Białowiec *et al.*, 2019).

Esta planta ha sido empleada como alternativa en el desarrollo de procesos biotecnológicos de fitorremediación para la remoción de metales pesados, como Pb(II) y Cr(III), en sistemas acuáticos. Su eficacia se atribuye a su capacidad de biosorción y bioacumulación, mediante la cual adsorbe, transporta y retiene tanto nutrientes como diversos contaminantes presentes en los cuerpos de agua. Su crecimiento estable y alta adaptabilidad favorece su implementación en este tipo de aplicaciones (Melo-Páez *et al.*, 2021).

Las plantas acuáticas como *Elodea densa* han despertado un creciente interés como fuente de energía renovable, debido a su potencial para la producción de biocombustibles y biogás mediante procesos termoquímicos y biológicos. Su elevada productividad y disponibilidad la convierten en una biomasa adecuada para su aprovechamiento energético. En este contexto, *Elodea densa* ha sido estudiada en diversas rutas de conversión, incluyendo tecnologías electroquímicas microbianas, pirólisis y digestión anaerobia. Estos procesos se basan en la degradación de la biomasa, permitiendo la generación de energía y valorización de sus componentes. Las plantas acuáticas como *E. densa*, ha despertado interés como fuente de energía renovable, ya que es una fuente energética por el potencial de generar biocombustible y biogás en procesos termoquímicos y biológicos. Debido a que es una fuente de energía renovable, tiene una aplicación en el uso de tecnologías electroquímicas microbianas, pirólisis y digestión anaeróbica (Dutta *et al.*, 2021).

1.7 Antecedentes

Naranjo-Guamaní (2019), realizó la extracción de alginato de sodio por el método convencional a partir del alga de agua dulce perteneciente a la familia *Zygnemataceae* mediante tres etapas: pretratamiento (formol al 0.1 % y HCl-pH 4), extracción alcalina (Na_2CO_3 1.5% a 1-2 h con 50-95°C) y purificación de la muestra utilizando CaCl_2 al 10%, posteriormente realizó un intercambio iónico con $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ con HCl a 0.5 M y neutralizó con Na_2CO_3 ; y precipitó con HCl con pH de 1.5-2, finalmente neutralizó dos veces con Na_2CO_3 . Se obtuvo un 6.08% de rendimiento y se realizó la comparación con el alga *Macricystis pyrifera* con un 27.84% de rendimiento utilizando la misma metodología.

Okolie *et al.* (2020), realizaron una investigación donde emplearon diferentes métodos de extracción de alginato de sodio, a partir de extractos de algas *Ascophyllum nodosum*. En la extracción convencional, utilizaron etanol al 80% en el pretratamiento del extracto de alga durante 20 h a temperatura ambiente para eliminar pigmentos y proteínas, finalmente la extracción se realizó con HCl (0.01 M) a 70°C durante 3 h. La

precipitación de la muestra fue con centrifuga a 3000 rpm por 20 min. La extracción se realizó con Na_2CO_3 al 3% durante 3 h. El filtrado se realizó con etanol a temperatura ambiente, el producto obtenido se liofilizó utilizando secado por congelación. La extracción por microondas de alginato de sodio del extrado del alga se realizó a con una solución HCl al 0.01M. La irradiación con microondas se realizó durante 15 min a 90°C (3 veces). Finalmente se añadió una solución de Na_2CO_3 (3 %) a 100°C por 10 min. Se precipitó con etanol y se dejó a temperatura ambiente (3 h). La extracción asistida por ultrasonido, se realizó con una sonda ultrasónica de 750 W. La parte de preextracción, se diluyó con HCl y se sonicó de forma continua, se ocuparon los mismos reactivos en menor concentración para la extracción. Los resultados de los rendimientos obtenidos para el método convencional fue del 72 %, por microondas del 56 % y por asistida por ultrasonido en 70 %.

No existen referencias de la extracción de alginato de sodio a partir de fluidos supercríticos, sin embargo, a continuación se describen algunas investigaciones que servirán de referencia para esta investigación.

Ho *et al.* (2020), estudiaron la extracción a base de agua subcrítica de compuestos fenólicos de la planta *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. La planta llevó un tratamiento para eliminación de humedad y molienda. La extracción con agua subcrítica de la planta, se realizó en un reactor de volumen interno de 56 mL, el cual se calienta por baño termostático que usa silicona como fluido calefactor. Se ocupó 6 g de la planta molida a una velocidad de 5 mL/m, con una temperatura de 150°C y presión de 10 bar, en un tiempo de 45 min. Posteriormente, la muestra obtenida se filtró a vacío y se liofilizó. Bajo las condiciones descritas, concluyen que eliminaron el 60% de contenido fenólico.

Nesic *et al.* (2023), realizaron la comparación de la extracción de alginato mediante microondas y de manera convencional a partir del alga *Sargassum*. De acuerdo con la metodología convencional, ocuparon partículas de 50-80 mm de sargazo en seco, con

un tratamiento de ácido clorhídrico (0.1M) por 24 h a temperatura ambiente y 200 rpm y una solubilización en medio alcalino con Na_2CO_3 por 3 h a 90 °C. Posteriormente hicieron una comparación con extracción por microondas, en condiciones estáticas y con el sargazo húmedo, con un caudal másico de biomasa de 0.6-0.8 g/min. La extracción se realizó con agua caliente por 3 h a 90°C y 200 rpm. De acuerdo con el método convencional se obtuvieron rendimientos del 32%, este método ocupa diversos solventes para la extracción y los tiempos son altos. Con las algas pretratadas y por microondas, se obtuvo un rendimiento de 32-36 %, con menos solventes y en menor tiempo.

Nam *et al.* (2024), obtuvieron alginato a partir del alga *Undaria pinnatifida* utilizando Na_2CO_3 y HCl al 0.1 M por extracción asistida por microondas. Los rangos de la relación sólido/líquido fueron de 20-100 g/L, la temperatura de extracción se trabajó en 50-90°C y las concentraciones de 1-10%. El alga se mantuvo en un solvente alcalino (15 mL) en el sistema de microondas durante 5 min. Posteriormente, se llevó a centrifugar a 8000 rpm por 10 min para separar la muestra de los sobrenadantes. La muestra se neutralizó con HCl y se añadió agua desionizada para obtener el rendimiento mediante HPLC, finalmente, el sobrenadante se precipitó con etanol hasta obtener el alginato sódico. Posteriormente, se lavó con etanol, metanol y acetona, la muestra se secó a 70°C para su caracterización, de acuerdo con los resultados se observó un rendimiento del 37% con una concentración de solvente de 5% a una temperatura de 80°C y una relación sólido/líquido de 18 g/L en un tiempo de 5 min.

López-Limón *et al.* (2024), evaluaron la aplicación de CO_2 (99.5 % de pureza) supercrítico para el pretratamiento de C-ficocianina (CPC) considerando los parámetros de presión, temperatura y el cosolvente (etanol-99.5% de pureza) para la evaluación del rendimiento y eficiencia de su extracción a partir *Arthrospira maxima* (espirulina). La espirulina se deshidrató durante 4 h a 41°C y se llevó a un procesador de alimentos para la molienda. Posteriormente se llevó al equipo de CO_2 con un

recipiente de extracción de 450 mL de capacidad, con 90 g de espirulina. Ésta se acondicionó con perlas de borosilicato para integrar la biomasa, se trabajó en presiones de 17, 24 y 31 Mpa, temperaturas de 45, 60 y 75°C y el cosolvente al 10%. El caudal se mantuvo en 22 g/min durante 120 min. Se sometió a extracción acuosa continuamente de ultracongelación y liofilización, obteniendo el producto de color azul. El mejor rendimiento obtenido fue de 18.35 % y el más bajo fue de 10.50 %, comparando con otras investigación donde obtuvieron un rendimiento del 9.35% a diferentes parámetros a los descritos. El color obtenido de esta microalga, es la primer característica notada como un producto altamente puro.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología general

En la Figura 2.1, se describe de forma general los pasos de la metodología propuesta, la cual inicia por la recolección de muestra, posteriormente el pretratamiento del alga con diferentes solventes y finalmente la extracción alcalina.

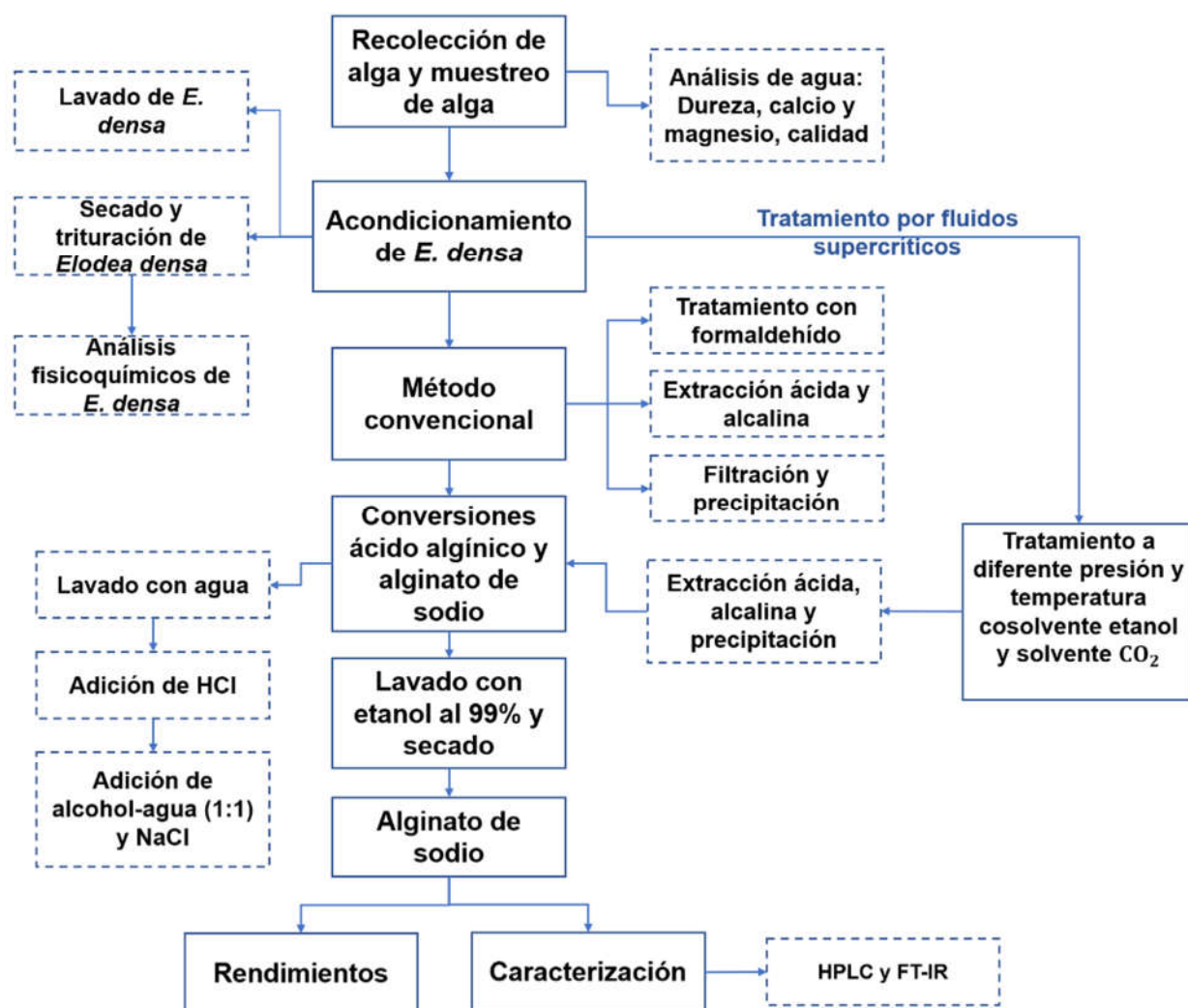


Figura 2.1 Metodología general

2.2 Recolección del alga y muestreo de agua de las lagunas

La planta acuática *Elodea densa*, se recolectó en dos puntos diferentes de la región: Laguna de Ojo de Agua (Figura 2.2a) ubicada en las coordenadas 19°40'49"N 99°00'36"O / 19.68027778, -99.01 18.86013°N, 97.08145°O, y Laguna de Nogales (Figura 2.2b) con coordenadas 18°49'21"N y 97°09'45"O, ambas lagunas ubicadas en el estado de Veracruz, presentando temperaturas de 16 y 18°C. Por otra parte, se tomaron muestras de agua de ambas lagunas para determinar si presenta algún efecto en la obtención de los resultados, para ello, la muestra de agua se obtuvo bajo la norma NMX-AA-003-1980, y posteriormente se conservaron a 4°C para sus análisis posteriores.

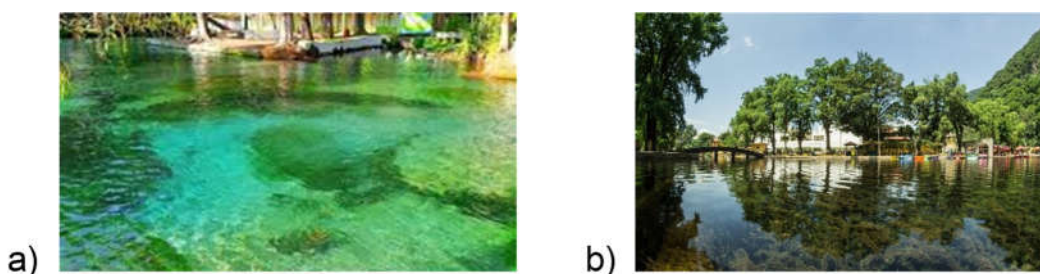


Figura 2.2 Recolección de algas y agua, a) Laguna de Ojo de Agua y b) Laguna de Nogales

2.3 Acondicionamiento y Caracterización de *Elodea densa*

2.3.1 Acondicionamiento de *Elodea densa*

Las muestras se trasladaron al laboratorio de investigación, donde se eliminaron los contaminantes presentes: arena, plásticos y plantas en descomposición, se lavaron con agua potable para eliminar completamente los residuos presentes. Posteriormente, las muestras de *E. densa* se expusieron al sol durante 2-3 días a temperatura ambiente (26 °C) para eliminar el exceso de agua, seguido, se sometió a un secado convectivo empleando un secador por charolas marca VEVOR a 40 °C durante 6 horas. Finalmente, se procedió a la trituration de las muestras con un molino pulverizador marca 800A a 1600 rpm por 5 min.

2.3.2 Análisis físicos de *Elodea densa*

La planta acuática se identificó en el herbario del Departamento de Biología de Organismos y Sistemas en la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de Peñuela, además, midió el tamaño de las hojas con un Vernier Digital Inoxidable Lcd Pie Rey (0 - 6/150 mm), como se observa en la Figura 2.3a y se determinó la luminosidad del color (Ec. 2.1) mediante un colorímetro marca FRU (Figura 2.3b).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L *)^2 + (\Delta a *)^2 + (\Delta b *)^2} \quad (2.1)$$

donde, **a** indica el color en el eje verde-rojo (valores negativos indican verde y valores positivos indican rojo), **L** representa la luminosidad con un rango de 0 (negro) y 100 (blanco) y **b** indica el color en el eje azul-amarillo (valor negativo indica azul, valor positivo indica amarillo).

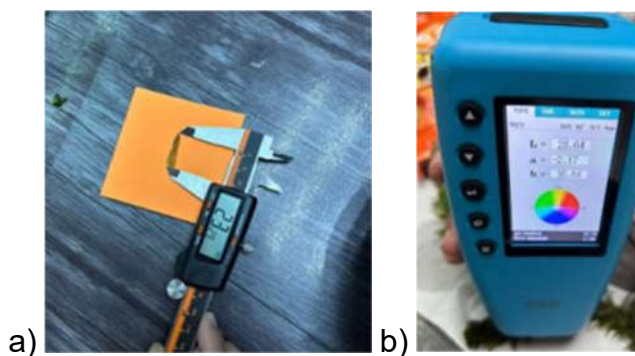


Figura 2.3 Determinación de propiedades físicas de *Elodea densa*: a) medición de hojas; b) medición de color con colorímetro FRU

2.3.3 Análisis químicos de *Elodea densa*

Cenizas: se tomaron 10 g de muestra seca, se incineró a 550°C por 3 h en mufla marca MF-3 y se pesaron en balanza analítica marca OHAUS, posteriormente se realizó el cálculo con la Ecuación 2.2.

$$\%cenizas = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso final}} * 100 \quad (2.2)$$

Grasas: se realizó mediante el equipo de Soxhlet, que consta de un ciclo de evaporación y de condensación utilizando una parrilla eléctrica marca Koblenz modelo PEKM1000EG. En el extractor principal, se colocaron 5 g de alga seca y triturada dentro de un cartucho de papel filtro, el disolvente que se utilizó fue hexano, por 5 h. Después de la extracción, se eliminó el hexano mediante evaporación en un rotavapor marca IKA modelo RV 8 para obtener solo la grasa extraída. Posteriormente, se determinó el porcentaje de grasas empleando la Ecuación 2.3. Cabe resaltar que el peso de la muestra de alga se realizó en balanza analítica marca OHAUS, serie Adventurer, modelo AX423.

$$\% Grasa = \frac{\text{Peso de la grasa extraída}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad (2.3)$$

Nutrientes: se tomaron 10 g de muestra seca, se incineró a 550°C por 3 h en mufla marca MF-3, una vez obtenida la ceniza, se aforó en 100 mL de agua desionizada. Posteriormente, se tomó 1 mL de dicha solución y se diluyó en 100 mL de agua desionizada. Se utilizó el fotómetro de mesa de la marca Hanna Instruments model HI83099. Los parámetros analizados se muestran en la Tabla 2.1, en la que se describen los métodos que se trabajaron para cada caso, descritos en el Manual de Standard Methods.

Tabla 2.1. Parámetros químicos de *Elodea densa*

Nutriente	Método
Fósforo (P, PO_4^{3-} y P_2O_5)	Aminoácido de Standard Methods (18a Ed)
Sulfatos (SO_4^{2-})	Turbidimétrico o nefelométrico para sulfatos
Nitratos (NO_3^- N y NO_3^-)	Reducción de cadmio
Calcio	Oxalato

2.4 Análisis fisicoquímicos del agua

Las características de *Elodea densa* dependen del entorno en el que se encuentre, por lo que se requirió analizar parámetros fisicoquímicos del agua. El análisis de agua de ambas lagunas (Ojo de agua y Nogales) se analizaron bajo los criterios ecológicos del agua. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

2.4.1 Calidad de agua

La prueba de calidad de agua se realizó mediante un medidor multiparámetro marca Hach, modelo HQ40D. Para dicho análisis, se tomó la muestra del agua y se introdujo el sensor multiparamétrico, se registraron datos como: pH, porcentaje de saturación de oxígeno y oxígeno disuelto (Norma NOM-127-SSA1-2021), la Temperatura se determinó de forma directa con un termómetro acuerdo a la Norma NMX-AA-072-SCFI-2001.

2.4.2 Dureza total del agua

El método empleado para la determinación de la dureza total del agua fue bajo la Norma NMX-AA-072-SCFI-2001, se utilizó una cantidad de entre 25 y 50 mL de muestra y se colocó en un matraz Erlenmeyer, se adicionó 1-2 mL de buffer de amoniaco-cloruro de amonio para ajustar el pH a 10. Posteriormente, se añadieron 0.2 g de indicador negro de eriocromo T, titulando con EDTA (0.01 N). La dureza total se determinó mediante la Ecuación 2.4. En la determinación de calcio (Ec. 2.5) y magnesio (Ec. 2.6), se colocaron en un matraz 25 mL de muestra y se añadió 0.1 g del indicador metalocrómico y titulando con EDTA (0.1 M).

$$\text{Dureza Total (mg/L de CaCO}_3\text{)} = \frac{V_{EDTA} \text{ (mL)} \times N_{EDTA}}{V \text{ de muestra (mL)}} \quad (2.4)$$

$$[Ca^{2+}](mg/L) = \frac{V_{EDTA} \text{ (mL)} \times N_{EDTA} \times 40.08 \times 1000}{V_{muestra} \text{ (mL)}} \quad (2.5)$$

$$[Mg^{2+}](mg/L) = \frac{V_{EDTA\ Total} \times V_{EDTA\ para\ Ca} \times N_{EDTA}}{V_{muestra}(mL)} \quad (2.6)$$

2.4.2 Nutrientes

Se tomó una alícuota de 10 mL de la muestra de agua de la Laguna correspondiente y se transfirió a un matraz aforado de 100 mL con agua desionizada. Posteriormente, se tomó 1 mL de dicha solución y se diluyó en 100 mL de agua desionizada. Se utilizó el fotómetro de mesa de la marca Hanna Instruments model HI83099. Los parámetros analizados fueron:

- Fósforo (P , PO_4^{3-} y P_2O_5): mediante el método de Aminoácido de Standard Methods (18a Ed)
- Sulfatos (SO_4^{2-}): por Turbidimetría o nefelométrica para sulfatos
- Nitratos (NO_3^- y NO_3^-): mediante reducción de cadmio
- Calcio: por el método de oxalato

2.5 Obtención de alginato de sodio

Se utilizaron 20 g de alga triturada, las cuales se sometieron a la eliminación de grasas con hexano en una proporción 1:3 p/v durante 2 h. Posteriormente, se retiró el hexano por decantación para la eliminación parcial y se dejó a temperatura ambiente para volatilizar por completo el hexano por 30 min. A continuación, se realizó el pretratamiento y extracción.

2.5.1 Pretratamiento de algas y extracción ácida de alginato de sodio

Se realizó un pretratamiento de las algas utilizando el solvente correspondiente (formaldehído, acetona o etanol) con el fin de eliminar aceites y compuestos fenólicos que pudieran interferir en el proceso de obtención de alginato de sodio, utilizando tres tiempos: 24, 48 y 72 h. Posteriormente, el solvente se retiró por decantación y el material se lavó dos veces con agua destilada (250 mL) para asegurar su eliminación

completa. A continuación, se llevó a cabo la extracción ácida empleando HCl (1 N) para ajustar el pH a un rango de 3 a 4, se mantuvo en agitación a 800 rpm por 15 minutos en parrilla calentamiento y agitación marca IKA® C-MAG modelo HS 7, (Figura 2.4). Finalmente, se procedió a la extracción alcalina.



Figura 2.4. Metodología para pretratamiento y extracción de alginato de sodio

2.5.2 Extracción alcalina, filtración y precipitación

Después de la extracción con ácido, se añadió una solución Na_2CO_3 , al 10 %, el cuál ajustó el pH a 10, se mantuvo en agitación a 800 rpm durante 2 h a 80 °C en parrilla calentamiento y agitación marca IKA® C-MAG modelo HS 7. Posteriormente, la muestra obtenida, se filtró a vacío utilizando papel filtro de poro abierto, con el fin de eliminar sólidos no solubles en la muestra. Se realizó la precipitación a 60 °C añadiendo la solución de cloruro de calcio al 10 %, se filtró el alginato de sodio, se lavó con etanol y se dejó secar a temperatura ambiente, finalmente se trituro en un mortero con pistilo conservando el alginato de sodio.

2.6 Diseño de experimentos

2.6.1 Diseño Preliminar

A partir de la metodología descrita por Moore y Colbert (2024) y Okolie *et al.* (2020) modificadas, se realizó un estudio preliminar para la obtención de alginato de sodio

cambiando las variables para este análisis. Se empleó un diseño 3^2 , considerando como variables independientes el tipo de solvente: formaldehído (0.1 %), acetona (70 %) y etanol (70 %), y tiempo de hidratación (24, 48 y 72 h).

2.6.2 Diseño Box-Benhken

A partir de los resultados obtenidos en el diseño 3^2 , se implementó el diseño Box-Behnken para incrementar el rendimiento de Alg-Na, siendo las variables independientes: tiempo de hidratación (X_1 : TH), concentración de Na_2CO_3 (X_2 : CAL) y tiempo de extracción alcalina (X_3 : TC), la variable de respuesta es el rendimiento de alginato de sodio (R). En la Tabla 2.2, se observan los factores con niveles experimentales que conllevan en el proceso de extracción para obtener el rendimiento óptimo, este diseño se aplicó para las algas de ambas lagunas.

Tabla 2.2 Variables con niveles experimentales para el proceso de obtención de Alg-Na, diseño Box-Behnken

Variable Independiente	Símbolo	Niveles		
		-1	0	+1
TH (h)	X_1	48	60	72
CAL (%)	X_2	7	9	11
TC (min)	X_3	40	80	120

2.6.3 Diseño CDC Equiradial

El diseño CDC Equiradial se aplicó solo en el proceso de obtención de alginato de sodio de *Elodea densa* de Nogales, en virtud de los resultados obtenidos, a partir del diseño Box-Behnken se determinó que la concentración de Na_2CO_3 no presentó un efecto significativo. Se consideraron como variables independientes TH (X_1) y TC (X_3), cuyas condiciones se muestran en la Figura 2.5, empleando una $\alpha=\pm 1.4142$ para los

puntos equirradiales. De igual forma, se encuentra el punto central como: $X_1=42$ h y $X_3=100$ min, mientras que X_2 se mantuvo constante en 10 %.

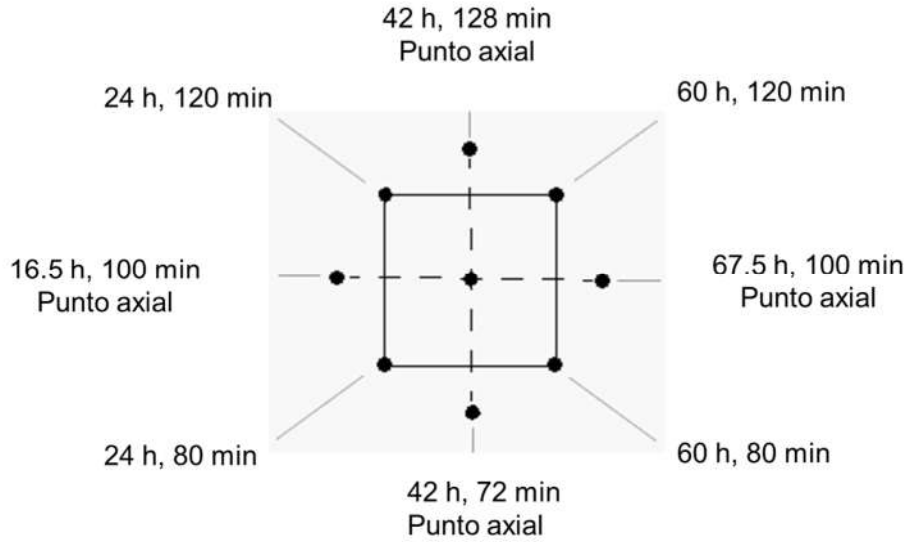


Figura 2.5. Diseño CDC para la obtención de Alg-Na de *Elodea densa* Nogales; eje X: tiempo de hidratación (TH, h), eje Y: tiempo de extracción alcalina (TC, min)

2.6.4 Análisis los modelos cuadráticos

A partir de los modelos de segundo orden (Ec. 2.7), los cuales se ajustaron a la curvatura que aproxime a la variable de respuesta (% R) de cada modelo para encontrar el conjunto óptimo de condiciones de operación para TH (h), CAL (%) y TC (min) (Montgomery, 2017).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \quad (2.7)$$

El modelo de segundo orden se utilizó con el fin de obtener el punto estacionario en cada caso, el cual se puede obtener mediante una solución general, utilizando la notación matricial, tal como se describe en la Ec. 2.8, que comprende la estructura completa de las Ecs. (2.9, 2.10 y 2.11) (Montgomery, 2017).

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + x' b + x' B x \quad (2.8)$$

donde

$$x = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_k \end{bmatrix} \quad b = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_1 \\ \hat{\beta}_2 \\ \vdots \\ \hat{\beta}_k \end{bmatrix} \quad y \quad B = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_{11}, & \hat{\beta}_{12}/2, & \dots, & \hat{\beta}_{1k}/2 \\ \hat{\beta}_{12}/2 & \hat{\beta}_{22}, & \dots, & \hat{\beta}_{2k}/2 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \text{simetrica} & & & \hat{\beta}_{kk} \end{bmatrix} \quad (2.9, 2.10 \text{ y } 2.11)$$

b es el vector de los coeficientes de regresión de primer orden, y B es una matriz simétrica cuya diagonal se forma a partir de los coeficientes de los términos cuadráticos puros. Una vez definidos los coeficientes, se obtuvo los valores estacionarios mediante la Ec. (2.12).

$$x_0 = \hat{\beta}_0 + \frac{1}{2} B^{-1} b \quad (2.12)$$

Posteriormente a la obtención de los valores estacionarios, se determinó el punto estacionario mediante la Ec. (2.13).

$$\hat{y}_0 = \hat{\beta}_0 + \frac{1}{2} x_0^T b \quad (2.13)$$

2.6.5 Análisis de la superficie de respuesta

Posteriormente al hallazgo del punto estacionario, se caracterizó la superficie de respuesta. Se calcularon las raíces del polinomio en el software Matlab R2022a, utilizando la función eig(B), como resultado se puede esperar: valores (+) dando un mínimo, valores (-) dando un máximo o valores con signos alternos (+, -) que da lugar al punto de silla. Estos valores se determinan a partir de la ecuación canónica (Ec. 2.14).

$$\hat{y} = \hat{y}_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (2.14)$$

donde, las w_i son las variables transformadas y las λ_i son valores propios o llamados raíces características de la matriz B.

2.7 Tratamiento con Fluidos Supercríticos (FS)

Se realizó la extracción con FS, con el fin de sustituir el uso de hexano y formaldehído en la eliminación de aceites y compuestos fenólicos del alga, se utilizó un sistema equipado con una bomba dosificadora marca LEWA ecoflow® M400 (LEWA GmbH, Alemania) y una celda de extracción de 450 mL. Para cada corrida se emplearon 50 g de alga seca y triturada, previamente acondicionada con perlas de vidrio de borosilicato de 3 mm de diámetro a fin de mejorar la distribución del flujo y la eficiencia del proceso. Como disolvente se empleó dióxido de carbono (CO₂) de grado industrial con una pureza del 99.5 %, y como co-solvente se utilizó etanol (5, 10 y 20 %).

2.7.1 Tratamiento de *Elodea densa* con CO₂

En el tratamiento de *Elodea densa*, se realizaron las pruebas preliminares a diferentes presiones (2000, 3500 y 4000 psi) y temperatura (45, 60, 70 y 80°C), se llevaron a cabo las extracciones con y sin co-solvente en algunas pruebas. Se trabajó bajo un caudal de 14 g/min para el CO₂ durante 2 y 3 h. De igual forma, se trabajaron bajo condiciones de un diseño Box-Behnken, el cual se consideraron como variables independientes: temperatura (70, 75 y 80 °C), la concentración de etanol (5, 10 y 15 %) y el tiempo de extracción (2, 2.5 y 3 h), manteniendo la presión estable de 3500 psi.

2.7.2 Obtención de alginato de sodio

Posterior al tratamiento de *Elodea densa* con FS, a las algas se les añadieron 200 mL de agua destilada con el fin de hidratarlas, realizando posteriormente la extracción ácida con HCl a 1N, el tiempo utilizado se describe en el apartado 2.5.1. Después se adicionó Na₂CO₃ a la concentración con el mejor rendimiento obtenido del método convencional del diseño Box-Behnken, donde el análisis de modelos cuadráticos y de superficie de respuesta se realizaron con lo descrito en el apartado 2.6.4 y 2.6.5. Finalmente, se filtró y se lavó el alginato de sodio con etanol-agua (1:1), el alginato obtenido se llevó a un proceso de secado a temperatura ambiente y se colocó en bolsas con sellado al vacío para su conservación.

2.8 Rendimientos del alginato de sodio

El rendimiento de Alg-Na por ambos métodos, se determinó mediante la Ecuación 2.15, donde g inicial corresponde a los gramos usados de alga seca desde la hidratación y g de alginato obtenido es el producto final en la filtración.

$$R (\%) = \frac{g_{\text{alginato obtenido}}}{g_{\text{inicial}}} * 100 \quad (2.15)$$

2.9 Caracterización de alginato de sodio

La caracterización de Alg-Na se realizó mediante dos tipos de estudios: espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) y Cromatografía de Líquida de Alta Resolución (HPLC).

2.9.1 Método de caracterización por FT-IR

Se realizó el procedimiento de background en el equipo de FT-IR, con el fin de obtener un espectro de referencia del ambiente y del sistema óptico, eliminando interferencias debidas al vapor de agua u otras señales instrumentales. Posteriormente, se colocó una muestra de Alg-Na de 2-3 mg en un molde en el que se aplicó presión para formar una pastilla, ésta se llevó al equipo de FT-IR marca Nicolet™ iS5™ (Figura 2.6), se obtuvo el espectro correspondiente con picos definidos, el cual se identificó el grupo funcional característico a la estructura del alginato obtenido.



Figura 2.6 Espectrofotómetro FTIR Nicolet™ iS5™

2.9.2 Método de caracterización por HPLC

Las condiciones en el análisis de HPLC para alginato de sodio obtenido se realizaron bajo el método descrito por Hanan A. *et al.* (2013). El análisis del HPLC se realizó en un equipo marca Agilent 1260-Infinity II equipado con columna Kinetex phenyl-hexyl 100 A (150 x 4.6 cm, 5 μ m) (Figura 2.7). La fase móvil consistió en una mezcla de agua y ácido fosfórico (0.05 %), con pH de 7 ajustado con NaOH (5 M). Se realizó con separación cromatográfica por el método isocrático. Se utilizó absorción en detección UV a 200 nm y un volumen de inyección de 20 μ L. El caudal de la fase móvil se estableció en 0.7 mL/min, antes de la inyección de cada solución de muestra, el sistema de HPLC se equilibró durante 30 min con la fase móvil para asegurar la estabilidad de la línea base y condiciones de análisis. Para la preparación de las muestras, se pesaron 100 mg de cada muestra y se adicionó 1 mL de fase móvil. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a sonicación durante 15 min con el fin de favorecer su completa disolución y homogenización. Después del proceso de sonicación, las muestras se centrifugaron a 11,000 rpm durante 15 min para separar posibles partículas insolubles o residuos sólidos. El sobrenadante obtenido se filtró mediante una membrana de 0.22 μ m antes de su inyección al sistema cromatográfico. El estándar de alginato de sodio se preparó a una concentración de 1 mg/mL utilizando la fase móvil como solvente de disolución.

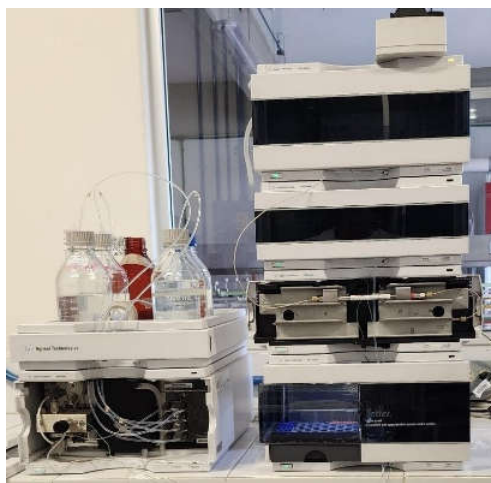


Figura 2.7 Equipo HPLC Agilent 1260 Infinity modelo G1329B

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Recolección y caracterización de *Elodea densa*

Las plantas acuáticas recolectadas fueron sometidas a un proceso de limpieza, posteriormente se tomaron muestras para analizar el contenido de humedad, el cual se obtuvo un 91 %, lo que se considera superior al reportado por Mello *et al.* (2025) para algas pardas del género *Sargassum*, cuyo intervalo oscila entre 60 y 70 %. Esta diferencia puede atribuirse, al tipo de organismo y a su estructura morfológica, ya que las plantas acuáticas como *Elodea densa* presentan tejidos más blandos y con mayor capacidad de retención de agua en comparación con las algas pardas.

Asimismo, el método y condiciones de recolección influyen de manera significativa en el contenido de humedad. Mientras que el *Sargassum* suele recolectarse en zonas costeras, donde puede experimentar deshidratación parcial por exposición de aire y sol, las plantas de este estudio fueron recolectadas directamente del medio acuático, lo que favorece la conservación de su contenido hídrico. El 91 % sugiere una alta hidratación del tejido vegetal.

3.1.1 Determinación de características físicas de *Elodea densa*

La planta acuática se identificó y clasificó en el Herbario de Departamento de Biología de Organismos y Sistemas de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de Peñuela, identificándose que pertenece a la especie *Elodea densa*.

Se determinó que el tamaño de las hojas de Ojo de Agua varía entre 12.76 y 19.20 mm en promedio y las de la Laguna de Nogales oscila entre 23.29 y 28.30 mm, como se observa en la Figura 3.1. El tallo se presentó entre 1 y 3 m para *E. densa* de Nogales y 1 a 1.8 m para Ojo de Agua.



Figura 3.1 Determinación de tamaño de hojas de *Elodea densa*

3.1.2 Determinación de color

Los valores obtenidos en la determinación de color de *Elodea densa*, se sometieron a CIELAB y a partir de la ecuación de luminosidad (Ec.1), los resultados se describen en la Tabla 3.1, en la cual los valores en donde los valores negativos indican los colores verdes (a) y los valores positivos colores amarillos (b). La muestra 1 y 2, proveniente de la Laguna de Ojo de Agua con ΔE que oscila entre 5.27 y 6.74, indicando colores entre verdes ligeramente oscuros y amarillos poco perceptible con tonos ligeramente marrones. Mientras que las muestras 3 y 4, provenientes de la Laguna de Nogales, presenta un color ligeramente verde oscuro (con ΔE de 6.71) con matices de amarillo y verde (con ΔE de 6.32).

De acuerdo con Wang *et al.*, (2019), el color de las hojas de *Elodea densa* varía respecto a las condiciones ambientales (agua limpia o contaminada) y la profundidad en la que se encuentre puede existir la variación en la pigmentación de las hojas. Cabe señalar que las muestras de Ojo de Agua se tomaron en la parte superficial (muestra 1) y a mayor profundidad, con una diferencia aproximada de 80 cm (muestra 2). En Nogales, las muestras se recolectaron bajo las mismas condiciones; sin embargo, la zona de muestreo presentó mayor sombra que en Ojo de Agua.

Tabla 3.1. Determinación de color de plantas acuáticas *Elodea densa*

Lagunas	Muestra	a	b	L	ΔE
Ojo de Agua	1	-7.38	19.18	23.95	5.27
		-6.89	14.74	26.25	
	2	-6.78	14.74	26.25	6.74
		-8.79	20.73	24.64	
Nogales	3	-3.54	16.61	19.13	6.71
		-4.10	12.53	24.44	
	4	-2.17	16.84	28.64	6.32
		-4.10	12.53	24.44	

3.1.3 Análisis químicos de *Elodea densa*

La caracterización química se realizó utilizando muestras de *Elodea densa* acondicionadas, el proceso de secado resulta fundamental ya que favorece la concentración de los compuestos presentes en la planta y facilita la posterior extracción de alginato de sodio. Asimismo, otro parámetro importante es el tamaño de partícula (1 a 2 mm), lo que incrementa el área de contacto y optimiza la eficiencia del proceso de extracción. Los parámetros químicos: minerales (cenizas), nutrientes y grasas fueron necesarios para conocer la composición de la planta y la diferencia que hay entre ambas lagunas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 3.2, *Elodea densa* muestra una diferencia en el contenido de minerales entre Ojo de Agua y Nogales, con valores de 23.9 y 15.35 %, respectivamente. Esta variación puede atribuirse a factores ambientales, como el hábitat y la dinámica de la corriente en los sitios de muestreo, los cuales influyen en la disponibilidad y absorción de minerales, por lo que *Elodea densa* no se ve afectado significativamente en su crecimiento ni sus propiedades químicas (Thiébaud, 2023).

Otro parámetro químico interesante en la planta acuática es la grasa, en el que presentaron valores de 36.48 % y 27.81 %, respectivamente. El contenido de grasa representa la fracción de compuestos insolubles en agua, dicha grasa conlleva una función como la composición de la membrana celular de las hojas de la planta acuática y facilitar el proceso fotosintético (Li *et al.*, 2020).

Tabla 3.2. Parámetros químicos de *Elodea densa*

Parámetro químico	Ojo de Agua	Nogales
Cenizas (%)	23.9	15.35
Grasas (%)	36.48	27.81
pH	6.4	6

Flores (2025), reportó que la composición de las algas pardas de la especie *S. natans* y *S. fluitans*, presentaron 5.36 % de grasa y 18.4 % de cenizas. El porcentaje de cenizas del sargazo se encontró entre los valores obtenidos de *Elodea densa*, mientras que la grasa, se observó que la planta acuática presentó mayor cantidad, lo que podría presentar afectaciones en el proceso de extracción.

Se determinó el pH en las muestras de *Elodea densa* con el objetivo de evaluar posibles variaciones entre ambas lagunas; sin embargo, los resultados obtenidos mostraron valores similares. Esto sugiere que, en esta planta acuática, el pH no ejerce influencia significativa sobre el contenido de grasas y cenizas bajo las condiciones estudiadas.

Debido que *E. densa* es una planta con alta capacidad de absorción, se realizó un análisis de nutrientes que contiene. En la Tabla 3.3 se observa que en Ojo de Agua hay mayor concentración de nutrientes, lo que provoca una mayor actividad biológica benéfica para su crecimiento. En tanto, Nogales presenta valores más bajos, probablemente por un ambiente menos estable o eutrófico. De acuerdo con Zhi *et al.*

(2024), en lagos poco profundos existe una carga moderada de nutrientes, lo que favorece completamente el crecimiento de *E. densa*, como es el caso de Ojo de Agua. Sin embargo, para Nogales se encontraron las plantas en mayor profundidad por lo que los nutrientes están en menor concentración. Las concentraciones de nutrientes en los dos sitios de estudio mostraron diferencias claras entre Ojo de Agua y Nogales. En general, *Elodea densa* de Ojo de Agua presentó valores más elevados en fósforo, fosfatos y sulfatos en comparación con la de Nogales. El calcio no fue detectado en ninguna de las dos plantas.

Tabla 3.3 Nutrientes de *Elodea densa*

Nutriente	Ojo de Agua	Nogales
	ppm	ppm
Fósforo (P)	2.85 ± 0.78	1.59 ± 0.96
Fosfatos (PO_4^{-3})	8.75 ± 2.47	4.80 ± 3.10
Oxido de Fósforo (P_2O_5)	6.50 ± 1.84	2.28 ± 0.42
Sulfatos (SO_4^{2-})	9.99 ± 0.00	4.96 ± 0.00
Nitratos ($\text{NO}_3^- \text{N}$)	3.30 ± 1.27	1.19 ± 1.40
(NO_3^-)	14.542 ± 5.866	3.409 ± 5.232
Calcio	0.0	0.0

Las plantas absorben N y P del agua y sedimento, y su concentración de tejidos aumenta cuando el medio es más rico en nutrientes. Sin embargo, un alto contenido de nitratos induce procesos de eutrofización (Yang *et al*, 2025). Por otra parte, los sulfatos contribuyen al equilibrio de fosfatos y nitratos en el crecimiento de la planta.

Las concentraciones obtenidas de los nutrientes influyen de manera indirecta en la producción de alginato al modificar su crecimiento, la fisiología y la composición bioquímica de *E. densa*. En ambientes con alta disponibilidad de N y P, como Ojo de Agua, favorece el crecimiento rápido de las algas debido al incremento de proteínas y compuestos energéticos. Sin embargo, estudios en macroalgas pardas productoras de alginato de sodio, han demostrado que este tipo de condiciones puede reducir la proporción de polisacáridos estructurales, ya que la energía metabólica se dirige a la

producción de biomasa y no a la formación de compuestos de la pared celular (Smart *et al.*, 2022).

3.2 Análisis de agua de las Lagunas Ojo de Agua y Nogales

El muestreo se realizó de acuerdo con la NMX-AA-003-1980, en el cual se tomó la temperatura en la Lagunas de Ojo de Agua y Nogales, dando como resultado 19.5 y 17.5 °C, respectivamente.

3.2.1 Calidad de agua

La calidad del agua indica si es apta para su uso, al igual que para observar cómo influye el crecimiento de *Elodea densa* de ambas lagunas. Los parámetros que definen a la calidad del agua son: pH, conductividad, oxígeno disuelto y % de saturación (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Parámetros de la calidad de agua

Parámetros	Ojo de Agua	Nogales
pH	6.48 ± 0.026	6.84 ± 0.09
Oxígeno disuelto (mg/L)	6.87 ± 0.14	6.49 ± 0.04
% de Saturación	95.73 ± 1.10	86.53 ± 0.57

Tanto los parámetros de pH como de oxígeno disuelto, presentaron una variabilidad menor al 1 %, lo que ambos sitios se encuentran dentro de los rangos adecuados para el desarrollo de plantas acuáticas como *Elodea densa*. En particular, el pH registrado indica condiciones ligeramente ácidas, lo cual coincide con lo reportado en la literatura para el crecimiento y fotosíntesis de esta planta. Estudios como Białowiec *et al.* (2019), señala que *E. densa* tolera el pH entre los rangos 6.5 a 10.

En cuanto al oxígeno disuelto indican una adecuada oxigenación del agua en ambos sitios. El umbral mínimo es de 5 mg/L para las plantas acuáticas, sin embargo, los

datos obtenidos son buen indicador con la actividad fotosintética de *Elodea densa* (Davies, 2023). El porcentaje de saturación presenta una variabilidad del 22 % entre ambas lagunas, se debe que en Ojo de Agua presentó mayor densidad de plantas con mayor disponibilidad de luz, mientras que para Nogales en la zona de recolección de muestras presentó menor actividad fotosintética, es decir, menor luz.

3.2.2 Dureza del agua

La dureza del agua determinada por la concentración de calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) constituye un factor clave en la fisiología de las plantas acuáticas. En las pruebas de dureza del agua de Ojo de Agua y Nogales (Tabla 3.5), los valores bajos de dureza total indican un sistema con escasa mineralización, lo que da respuesta al valor de 0 ppm del nutriente reportado en el apartado 3.1.3 (calcio) de *Elodea densa* de ambas lagunas. A nivel ecológico, las plantas acuáticas responden factores ambientales, incluyendo la química del agua. Estudios recientes indican que variables como la disponibilidad de nutrientes, la luz y composición iónica determinan la estructura de las hojas y el proceso de crecimiento (De Morais *et al.*, 2024).

Tabla 3.5 Pruebas de dureza del agua

Parámetros	Ojo de Agua	Nogales
Dureza Total (mg/L)	1.82 ± 0.48	1.5 ± 0.43
Dureza de calcio (mg/L)	1.57 ± 0.36	0.76 ± 0.51
Dureza de magnesio (mg/L)	0.25 ± 0.18	0.713 ± 0.188

En conjunto, los resultados muestran que, ambos sitios presentan aguas blandas, las variaciones resaltan la composición iónica del agua como un factor determinante en la productividad y calidad de compuestos derivados de las plantas acuáticas, principalmente *Elodea densa*.

3.2.3 Nutrientes del agua de la Laguna de Ojo de Agua y Nogales

Los nutrientes son esenciales para el agua y para la vida acuática, y su concentración puede variar según las condiciones del entorno. De acuerdo a la Tabla 3.6, el cloro libre a altas concentraciones es dañina para *Elodea densa*, ya que dicha planta se desarrolla mejor en un valor cercado a 0 mg/L, como cualquier otra planta acuática. El valor obtenido en ambas lagunas es no significativo, por lo que es favorable en su crecimiento. No existen datos específicos documentados sobre el nivel de cloro libre que debe mantener el agua para *Elodea densa*, ya que la planta es conocida por tener tolerar rangos amplios de condiciones de agua.

Tabla 3.6 Nutrientes del agua

Nutrientes	Ojo de Agua	Nogales
Cloro libre (mg/L)	0.005 ± 0.007	0.025 ± 0.021
Calcio (mg/L)	0 ± 0	0 ± 0
Nitratos $\text{NO}_3\text{-N}$ (mg/L)	0.55 ± 0.778	2.35 ± 3.323
NO_3^- (mg/L)	0.7 ± 0.989	3.2 ± 4.52
Mg^{2+} (mg/L)	7.5 ± 3.535	12.5 ± 3.53

De acuerdo a Martemyanov y Tikhonenkov (2022), la planta similar a *Elodea densa*, *Elodea canadensis*, debe mantener niveles de calcio y magnesio entre valores de 10 a 50 mg/L de agua. Por lo que dichos valores se toman como referencia para observar que tanto el calcio como magnesio puede afectar en la formación celular de las plantas, sin embargo, en los valores obtenidos, se puede observar que los nutrientes de magnesio y calcio para *E. densa*, favorece su desarrollo.

En relación con los nitratos, se registraron concentraciones 22 % mayores en Nogales en comparación con Ojo de Agua. Los nitratos constituyen una fuente esencial de nitrógeno para las algas, siendo fundamentales para la síntesis de proteínas, clorofila y ácidos nucleicos (Yaakob *et al.*, 2021). Una mayor disponibilidad de nitratos genera desequilibrios fisiológicos o competencia con fitoplancton. A pesar de que en los

nutrientes de *Elodea densa* (apartado 3.1.3) describe que en Ojo de Agua presenta mayor cantidad de nitratos en comparación con la de Nogales, esto se debe que existe Nitrógeno desde los sedimentos y no de manera homogénea como en Nogales. En relación al magnesio (Mg^{2+}) mostró valores en un 22% elevados en Nogales que en Ojo de Agua. Este elemento es esencial en la fotosíntesis, ya que forma parte de la molécula de clorofila. Su mayor disponibilidad favorece a la actividad fotosintética en plantas acuáticas y, en consecuencia, el crecimiento de organismos productores de alginato (Zhang *et al.*, 2024).

En general, los resultados muestran que, aunque ambos sitios presentan aguas blandas, existen diferencias en la proporción de calcio y magnesio que podría afectar la calidad del alginato. Ojo de Agua, con mayor contenido de calcio, podría favorecer la formación de alginatos con mejores propiedades estructurales, mientras que Nogales con mayor concentración de magnesio, podría favorecer una mayor actividad fotosintética ayudando a otro tipo de plantas en su crecimiento. Estas variaciones resaltan la importancia iónica del agua como un factor determinante en la productividad y calidad de compuestos derivados de las algas (Santana *et al.*, 2024).

3.3 Obtención de alginato de sodio en un diseño 3²

En la Tabla 3.7, se presentan los resultados del diseño 3², propuesto en la sección 2.6. Los resultados comprueban que la planta acuática *Elodea densa* es apta como fuente de obtención de Alg-Na, mostrando rendimientos de con 7.61% para la planta de Ojo de Agua y 5.08 % para la planta de Laguna de Nogales, dichos resultados fueron mejores en comparación con Naranjo-Guamani (2019) quien obtuvo un 6.08 % de la planta acuática de la familia *Zignemataceae* y un 43 % con alga *Laminaria digitata* (alga marina) y, empleando las mismas condiciones, para ambas algas.

Tabla 3.7 Rendimientos de alginato de sodio método convencional y diseño 3² con *Elodea densa*

Método	Hidratación	Tiempo (h)	Rendimiento de Alg-Na (%)	
			Ojo de agua	Nogales
Preliminar	Formaldehído	12	7.61	5.08
3 ²	Formaldehído (0.1 %)	72	15.66	31.01
		48	11.05	20.89
		24	10.01	15.01
	Etanol (70 %)	72	4.17	2.04
		48	2.93	0.408
		24	4.98	7.66
	Acetona (70%)	72	--	--
		48	2.44	0.150
		24	0.17	0.20

De acuerdo a los resultados con el método preliminar, se observó que, a tiempos de hidratación altos, se incrementa la eliminación de fenoles, logrando un incremento en el rendimiento del producto. Los rendimientos más altos se alcanzaron en ambas lagunas con 72 h de hidratación, empleando formaldehído al 0.1 %. La diferencia de rendimientos se debe a la sensibilidad de la planta ante mayor tiempo de hidratación y por las condiciones de cada hábitat en las que se encontraron.

Okolie *et al.* (2020), mencionan que las algas de la especie *A. nodosum* y *Macrocystis pyrifera* produjeron de 18 – 23 % y 24 % de alginato de sodio, respectivamente. Utilizaron etanol (80 %) durante 20 h para remover pigmentos y proteínas. Mientras que Montes *et al.* (2021), obtuvo el 24 % de *A. nodosum*, utilizando solo formaldehído para la eliminación de fenoles en un tiempo de 18 h. Estos valores son 22 % y 12 % más altos que lo obtenido con *Elodea densa* en Ojo de Agua y Nogales, respectivamente, confirmando que puede ser una fuente competitiva bajo condiciones optimizadas.

Por otro lado, Abka-Khajouei *et al.* (2022), reportaron un rendimiento del 5.1 % para *S. henslowianum* utilizando etanol al 95 % en el pretratamiento durante 24 h, resultados que son comparables con los obtenidos en este trabajo al emplear etanol y acetona, donde se registraron valores bajos, especialmente con acetona. Esto refuerza la idea de que estos solventes son menos eficientes para la extracción de alginato bajo las condiciones evaluadas.

3.3.1 Análisis estadístico Diseño 3²

El análisis de ANOVA (con nivel de significancia del 95 %), el efecto de los factores y las ecuaciones de la regresión lineal se determinaron sobre los rendimientos de alginato de sodio (Alg-Na) empleando el software Minitab® 20.3. Dicho análisis, permite interpretar de manera integral la influencia de las variables del proceso (solvente y tiempo) sobre el rendimiento de alginato de sodio obtenido a partir de *Elodea densa* (Tabla 3.8).

Tabla 3.8 ANOVA de extracción de alginato de sodio por método convencional del diseño 3² con *Elodea densa* de Ojo de Agua

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	Valor F	Valor-p
Lineal	210.592	4	52.648	10.51	0.021
Solvente	206.70	2	103.350	20.63	0.008
Tiempo	3.892	2	1.946	0.39	0.701
Error	20.038	4	5.009		
Total	230.630	8			

El ANOVA para la muestra de Ojo de Agua indica que el modelo es estadísticamente significativo ($p = 0.021 < 0.05$), lo que confirma que las variables evaluadas explican una proporción importante de la variabilidad en el rendimiento. Al desglosar los factores, se observa que el tipo de solvente tiene un efecto significativo ($p = 0.008$), siendo el principal responsable de las diferencias en los rendimientos. Por el contrario, el tiempo de hidratación no presenta un efecto significativo ($p = 0.0701$).

En la muestra de Nogales (Tabla 3.9), el modelo lineal de igual forma resulta significativo ($p=0.047 < 0.05$). Se observa que el factor solvente es significativo ($p = 0.018$), mientras que el tiempo no muestra significancia estadística ($p = 0.694$). Esto confirma una tendencia consistente en ambas procedencias: el tipo de solvente domina el proceso de extracción, mientras que el tiempo tiene un efecto secundario dentro de los niveles evaluados.

Tabla 3.9 ANOVA de extracción de alginato de sodio por método convencional del diseño 3^2 con *Elodea densa* de Nogales

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	Valor F	Valor-p
Lineal	888.02	4	222.01	6.66	0.047
Solvente	861.32	2	430.66	12.93	0.018
Tiempo	26.70	2	13.35	0.40	0.694
Error	133.27	4	33.32		
Total	1021.29	8			

A partir de las gráficas de Efectos Individuales (Figura 3.2), se valida la significancia del solvente obtenido a partir del ANOVA, siendo el formaldehído el solvente que incrementa el rendimiento del Alg-Na, en tanto que el comportamiento del tiempo de hidratación muestra su falta de significancia, aunque tiempos altos contribuyen al incremento del rendimiento.

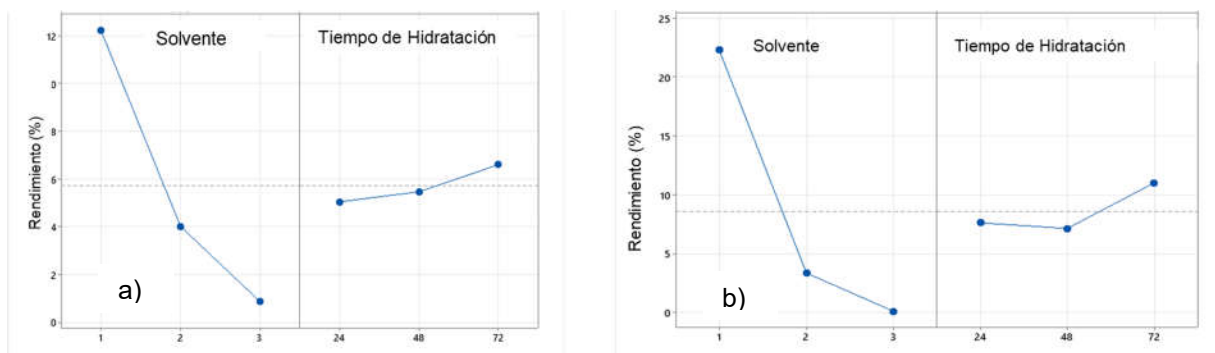


Figura 3.2. Gráficas de efectos individuales sobre el rendimiento de alginato de sodio: a) Ojo de agua y b) Nogales

Las ecuaciones (3.1) y (3.2) muestran los modelos de regresión de la Laguna de Ojo de Agua y Nogales, cuyo factor de determinación (R^2 ajustado) fueron 82.62 %, y 73.9 %, respectivamente. lo que indica que el modelo de Ojo de Agua describe adecuadamente el comportamiento del proceso. La falta de ajuste para el modelo obtenido para la Laguna de Nogales puede deberse a la influencia de factores externos como las características del agua o a su composición química.

$$R_O (\%) = 5.712 + 6.53x_1 - 1.69x_2 - 4.84x_3 - 0.66X_1 - 0.24X_2 + 0.90X_3 \quad (3.1)$$

$$R_N (\%) = 8.60 - 0.97x_1 - 1.45x_2 + 2.45x_3 + 13.71x_1 - 5.23x_2 - 8.48x_3 \quad (3.2)$$

Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Saji *et al.* (2022), quienes señalan que el efecto del solvente es primordial y la concentración aplicada varía de acuerdo a cada fuente de extracción. A pesar de que *Elodea densa* presenta mayor porcentaje de grasas que las algas pardas, requiere de menor concentración de acetona y etanol, ya que ambos solventes llegan a penetrar más la pared celular durante la hidratación, por lo que rompe los enlaces del ácido algínico para lograr una conversión completa al realizar las extracciones ácida y alcalina.

3.4 Optimización de la obtención de alginato de sodio a partir del diseño Box-Behnken

Los resultados obtenidos del rendimiento en la extracción de Alg-Na a partir de *Elodea densa*, mediante el diseño Box-Behnken (Tabla 3.10) muestran variaciones importantes en función de las condiciones experimentales evaluadas. En la Laguna Ojo de Agua, el mayor rendimiento fue de 21.74 %, seguido por 21.71%. En Nogales, el rendimiento máximo fue de 17.73 %, obtenido en las condiciones centrales del diseño (60 h de TH, 9 % de CAL y 80 min de TC). Esta diferencia se asocia a la calidad de las plantas, como se observó en los nutrientes de *E. densa* y de igual forma en la calidad del agua.

En relación a las variables del proceso, se observa que el tiempo de hidratación (TH) influye en el rendimiento cuando se combina con concentraciones adecuadas de Na_2CO_3 , favoreciendo la extracción en valores intermedios y altos. Este comportamiento es consistente con lo reportado por Mohammed *et al.* (2020), quienes señalan que variables como la temperatura de extracción, la concentración álcali, el volumen del álcali que depende de la relación de algas secas y tiempo de extracción son determinantes en la eficiencia de obtención de Alg-Na. De igual forma, consideran que la temperatura adecuada para la extracción es de 80 °C, ya que, por encima de este valor, el alginato comienza a degradarse en la extracción álcali afectando las propiedades como la disminución de la viscosidad y, por ende, no se logra el precipitado.

Tabla 3.10 Rendimientos obtenidos de Alg-Na mediante el diseño Box-Behnken

Corrida	TH (X_1) h	CAL (X_2) %	TC (X_3) min	Rendimiento (%)	
				Ojo de Agua (RODA)	Nogales (RN)
1	48	7	80	12.30	2.31
2	72	7	80	13.69	9.7
3	48	11	80	21.71	11.39
4	72	11	80	13.76	8.89
5	48	9	40	14.00	9.79
6	72	9	40	21.74	7.43
7	48	9	120	21.00	2.22
8	72	9	120	20.99	0.77
9	60	7	40	5.75	1.01
10	60	11	40	8.25	1.16
11	60	7	120	6.60	6.42
12	60	11	120	8.55	9.02
13	60	9	80	9.65	17.73
14	60	9	80	9.90	15.45
15	60	9	80	9.50	14.96

3.4.1 Análisis estadístico de Ojo de Agua

El análisis de varianza presentado en la Tabla 3.11 permite evaluar la significancia estadística de las variables involucradas en la extracción de alginato de sodio mediante el diseño Box-Behnken para *E. densa* de Ojo de Agua.

Tabla 3.11 ANOVA de extracción de alginato de sodio por método convencional del diseño Box-Behnken con *Elodea densa* de Ojo de Agua

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	Valor F	Valor-p
Modelo	419.204	9	46.578	7.27	0.021
Lineal	31.272	3	10.424	1.63	0.295
X₁	0.171	1	0.171	0.03	0.877
X₂	24.256	1	24.256	3.79	0.109
X₃	6.845	1	6.845	1.07	0.349
Cuadrado	351.032	3	117.011	18.27	0.004
X₁*X₁	293.345	1	293.345	45.80	0.001
X₂*X₂	38.561	1	38.561	6.02	0.058
X₃*X₃	2.580	1	2.580	0.40	0.554
Interacción de 2 factores	36.900	3	12.300	1.92	0.244
X₁* X₂	21.809	1	21.809	3.41	0.124
X₁* X₃	15.016	1	15.016	2.34	0.186
X₂* X₃	0.076	1	0.076	0.01	0.918
Error	32.021	5	6.404		
Falta de ajuste	31.939	3	10.646	260.73	0.004
Error puro	0.082	2	0.041		
Total	451.225	14			

De acuerdo con el diagrama de Pareto de efectos estandarizados (Figura 3.3) muestra la magnitud e importancia de los factores que influyen en el rendimiento de alginato de sodio considerando un nivel de significancia (α) de 0.05. Cabe mencionar que la línea roja con valor 2.571 representa el valor crítico; por lo tanto, aquellos efectos que superan dicha línea son estadísticamente significativos.

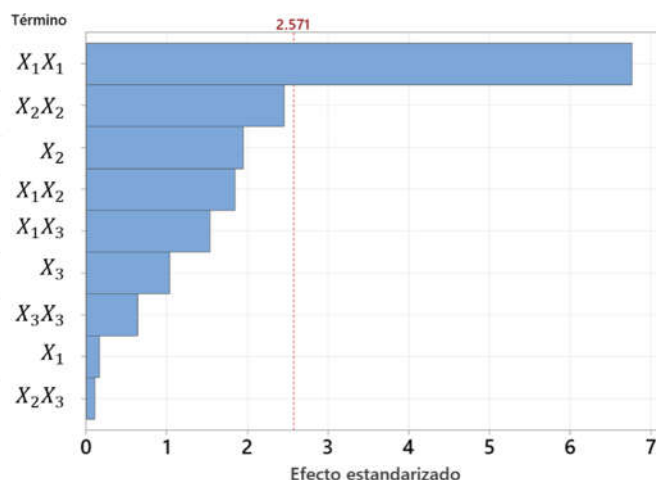


Figura 3.3. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados del rendimiento de Alg-Na de Ojo de Agua con $\alpha = 0.05$

Se observa que el término tiempo de hidratación cuadrático (X_1^2) es el único que supera el valor crítico ($\alpha = 0.05$), lo que significa que es el factor más significativo del modelo, lo que sugiere la posible presencia de un punto óptimo. Por otro lado, el término concentración alcalina (X_2^2) presenta un cercano al límite de significancia, indicando que podría ser una influencia secundaria en el proceso de extracción, aunque no determinante bajo las condiciones evaluadas.

Este comportamiento puede explicarse debido a que los tiempos de hidratación limitan la impregnación del álcali en la pared celular, mientras que los tiempos excesivos pueden provocar la degradación parcial del alginato de sodio. Por ello, el efecto cuadrático significativo refleja la necesidad de optimizar este parámetro para maximizar el rendimiento de extracción.

La ecuación (3.3) representa el modelo de regresión del modelo de Ojo de agua, cuyo factor de determinación (R^2 ajustado) es de 80.13 %, lo que indica que los datos se ajustaron al modelo y el 19.87 % de la variación total no pudo ser explicado por él. Estadísticamente la falta de ajuste no es significativa, lo que muestra que el modelo está adaptado a la variable de respuesta (rendimiento de Ojo de Agua). La ecuación

de regresión refuerza lo mencionado en el ANOVA, ya que muestra que el coeficiente cuadrático, (X_1^2) tiene mayor magnitud que los términos lineales.

$$\begin{aligned} \% R_{ODA} = & 9.68 - 0.146X_1 + 1.741X_2 + 0.925X_3 + 8.91 X_1^2 - 3.23X_2^2 + 0.84 X_3^2 \\ & - 2.33 X_1X_2 - 1.94X_1X_3 - 0.14X_2X_3 \end{aligned} \quad (3.3)$$

En la Figura 3.4 se observa la gráfica de probabilidad normal de los residuos, en la que la mayoría de los residuos estandarizados están dentro de los límites normal, es decir, que presentan un comportamiento aproximadamente normal. Las ligeras desviaciones en algunos puntos se deben al error experimental mencionado del 19.87 %, el cual no afecta significativamente la validez del modelo.

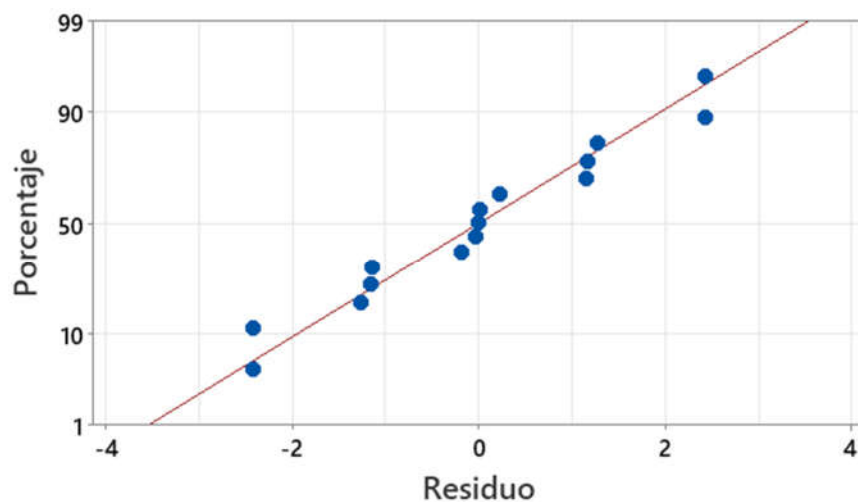


Figura 3.4. Gráfica de probabilidad normal de residuos (Laguna de Ojo de Agua)

La gráfica de contorno (Figura 3.5b) muestran que el rendimiento del Alg-Na de la Laguna de Nogales se ve influenciado por la interacción del tiempo de hidratación (TH) y el tiempo de extracción (TC), tendiendo a formar una región óptima entre los rangos de $56\text{ }^{\circ}\text{C} \geq \text{TH} \geq 62\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $48\text{ min} \geq \text{TC} \geq 91\text{ min}$, lo que permitiría explorar en dicha región a fin de buscar la maximización del rendimiento. Las Figuras 3.5a y 3.5c,

muestran claramente un comportamiento de punto de silla, haciendo evidente la no influencia de la concentración alcalina.

En la superficie de respuesta (Figura 3.6), se observa el comportamiento de las diferentes combinaciones de efectos en los que el rendimiento depende de ellos, mostrando la adecuación del modelo cuadrático para describir el sistema, evidenciando efectos de interacción y curvatura. La presencia de un comportamiento tipo punto de silla en la interacción CAL-TH y CAL-TC, sugiere que el proceso es altamente sensible a cambios de estas variables evaluadas, en tanto que la interacción TC – TH sugiere una tendencia a alcanzar un máximo.

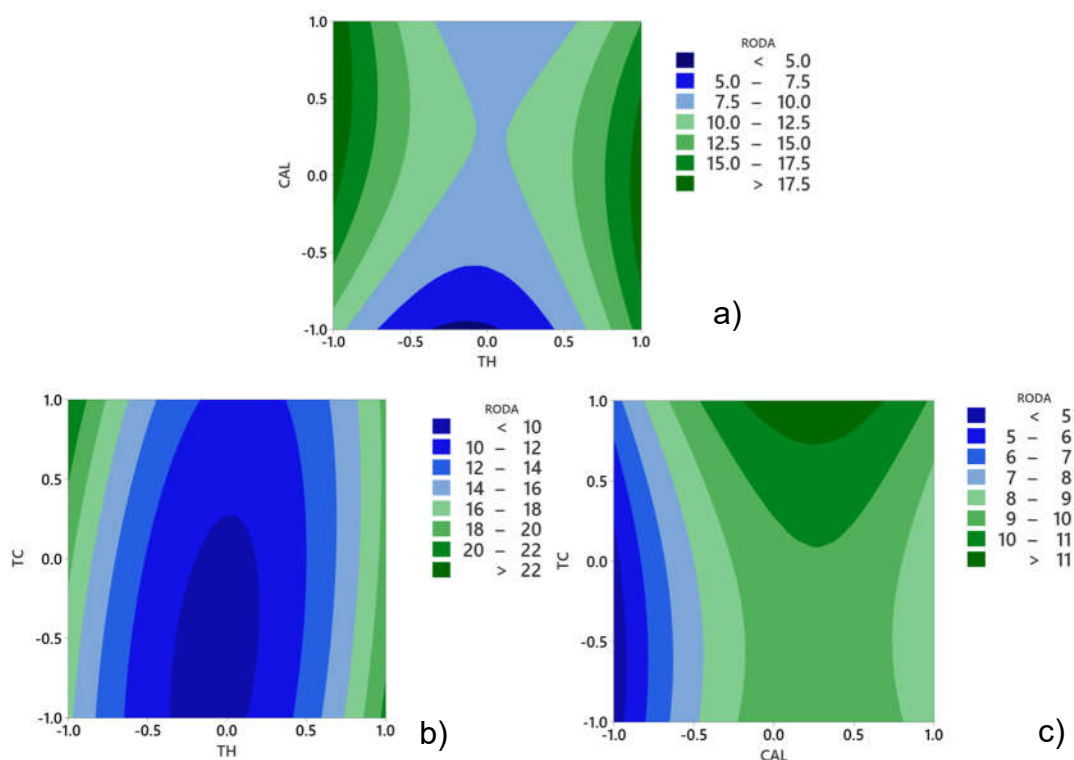


Figura 3.5 Gráfica de contorno del rendimiento del Alg-Na en la Laguna de Ojo de Agua: a) interacción de tiempo de hidratación (X_1 , h) y concentración alcalina (X_2 , %), b) interacción de tiempo de hidratación (X_1 , h) con tiempo de extracción alcalina (X_3 , min), y c) interacción con concentración alcalina (X_2 , %) y tiempo de extracción alcalina (X_3 , min).

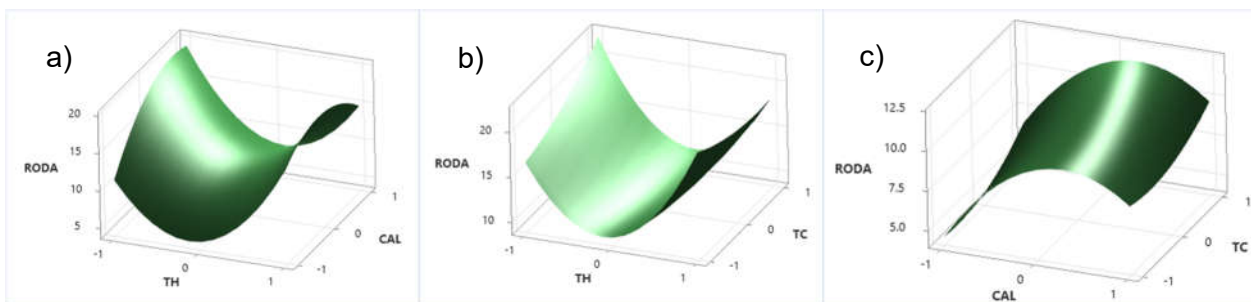


Figura 3.6 Superficie de respuesta del rendimiento del Alg-Na de la Laguna de Ojo de Agua (RODA): a) interacción de tiempo de hidratación (X_1 , h) y concentración alcalina (X_2 , %), b) interacción de tiempo de hidratación (X_1 , h) con tiempo de extracción alcalina (X_3 , min), y c) interacción con concentración alcalina (X_2 , %) y tiempo de extracción alcalina (X_3 , min).

Al comparar los hallazgos con Mohammed *et al.* (2020), que reportaron que la optimización de extracción de alginato de sodio a partir de *Sargassum* se logró empleando concentración de Na_2CO_3 de 3.75 % y el tiempo de extracción alcalina de 6 h a 80 °C, obteniendo un rendimiento del 21.21 %. Estas condiciones reflejan un proceso relativamente eficiente, caracterizando un consumo relativo de concentración álcali y el tiempo de extracción moderados, lo cual sugiere una facilidad en la liberación del alginato desde la pared celular del alga.

En comparación entre ambas materias primas, *Elodea densa* se considera una buena alternativa como fuente de alginato de sodio, en este estudio permitió alcanzar el rendimiento ligeramente superior al reportado para *Sargassum*, con condiciones diferentes.

El punto estacionario obtenido a partir del modelo experimental (Ec. 3.4), obtenidos a partir de la Ec. (2.12) se localizó en TH de 0.0470, con CAL de 0.2628 y TC de -0.4744, representando los valores naturales de TH= 61 h, CAL=12 % y TC=61 min, en la que se obtuvo una respuesta de rendimiento de Alg-Na de Ojo de Agua de 9.66 % a partir de la Ec (2.13). De acuerdo al análisis canónico del modelo experimental (Ec. 3.4), muestra la presencia de signos alternos en las raíces obtenidas, lo que indica al punto

estacionario como un punto de silla. Es decir, que la variable de respuesta, rendimiento de Ojo de Agua (%R_{ODA}), aumenta en algunas direcciones y en otras disminuye en el entorno del espacio experimental, por lo que no hay un máximo ni un mínimo local.

$$\hat{y} = 9.6627 - 3.3471w_1^2 + 0.7354w_2^2 + 9.1317w_3^2 \quad (3.4)$$

3.4.2 Análisis estadístico de Nogales

Los rendimientos de alginato de sodio obtenidos de *Elodea densa* de Nogales evidencian la variabilidad considerable con valores 0.77 % y 17.73 %, lo que confirma la influencia de las variables del proceso sobre la eficiencia de extracción. Este comportamiento es consistente de acuerdo a los resultados del análisis de varianza (Tabla 3.12), donde se observa que el modelo global no resulta estadísticamente significativo ($p = 0.316$). Sin embargo, el análisis detallado de los términos del modelo se muestra que el efecto cuadrático del tiempo de extracción (X_3^2) es significativo ($p=0.031$), indicando la presencia de curvatura en la respuesta. Esto confirma que el rendimiento no responde de manera lineal a este factor, sino que podría existir un valor óptimo. De acuerdo con los efectos lineales de TH (X_1), CAL (X_2) y TC (X_3) no son significativos ($p > 0.05$).

En el diagrama de Pareto (Figura 3.7), el término CC (efecto cuadrático del tiempo de extracción, X_3^2) sobrepasa el valor crítico (2.571) lo que indica que es la única variable estadísticamente significativa en el modelo.

En la ecuación (3.5), el modelo de regresión presenta un factor de determinación (R^2 ajustada) de 74.18 %, aunque existe un porcentaje alto de falta de ajuste (27.69%), a partir del análisis de las gráficas de contornos, se podrán proponer nuevas regiones de trabajo.

$$\begin{aligned} \% R_N = & 16.05 + 0.13X_1 + 1.38X_2 - 0.12X_3 + 3.66 X_1^2 - 4.31X_2^2 - 7.33 X_3^2 - 2.47 X_1X_2 \\ & - 0.23X_1X_3 - 0.61X_2X_3 \end{aligned} \quad (3.5)$$

Tabla 3.12 ANOVA de extracción de alginato de sodio por método convencional del diseño Box-Behnken con *Elodea densa* Nogales

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	Valor F	Valor-p
Modelo	322.184	9	35.798	1.60	0.316
Lineal	15.441	3	15.147	0.23	0.872
X₁	0.146	1	0.146	0.01	0.939
X₂	15.180	1	15.180	0.68	0.448
X₃	0.115	1	0.115	0.01	0.946
Cuadrado	280.582	3	93.527	4.17	0.079
X₁*X₁	29.907	1	49.517	2.21	0.198
X₂*X₂	52.179	1	68.655	3.06	0.141
X₃*X₃	198.496	1	198.496	8.85	0.031
Interacción de 2 factores	26.161	3	8.720	0.39	0.767
X₁* X₂	24.453	1	24.453	1.09	0.344
X₁* X₃	0.207	1	0.207	0.01	0.927
X₂* X₃	1.501	1	1.501	0.07	0.806
Error	112.172	5	22.434		
Falta de ajuste	107.801	3	35.934	16.44	0.058
Error puro	4.370	2	2.185		
Total	434.356	14			

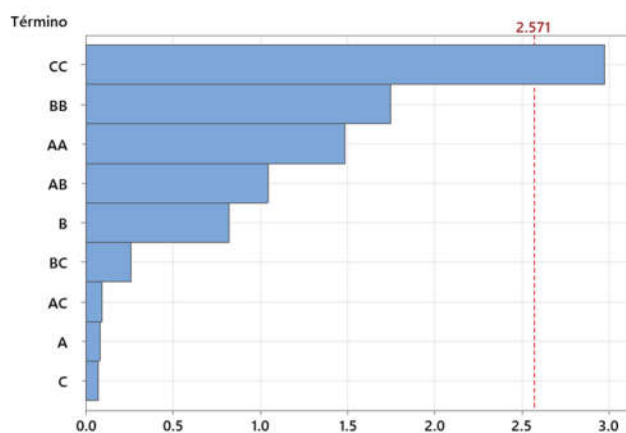


Figura 3.7. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados del rendimiento de Alg-Na de Nogales con $\alpha = 0.05$ del diseño Box-Behnken

La gráfica de probabilidad normal de los residuos de *Elodea densa* de Nogales (Figura 3.8), muestra que la mayoría de los puntos se distribuyen cercanos a la línea de referencia, lo que indica siguen aproximadamente una distribución normal. Los resultados obtenidos indican que el supuesto de normalidad se cumple, aunque las desviaciones observadas podrían estar asociadas en las combinaciones de las variables para esta planta, así como la influencia de efectos externos no controlables.

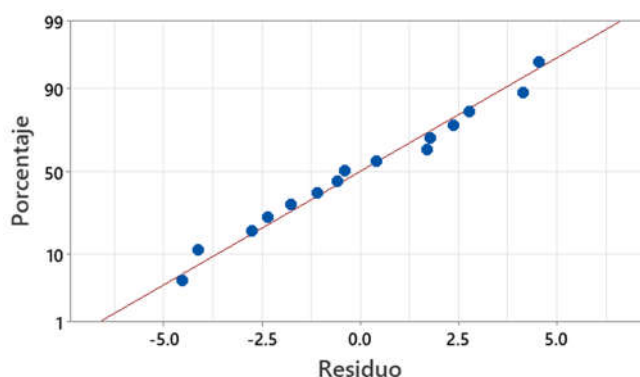


Figura 3.8. Gráfica de probabilidad normal de residuos (Laguna de Nogales)

A partir de las gráficas de contornos (Figura 3.9), se puede observar que se generan, en cada combinación de variable, regiones de optimización, determinando de la Figura 3.9a $53 \text{ h} \geq \text{TH} \geq 67 \text{ h}$ y $10 \% \geq \text{CAL} \geq 12 \%$; de la Figura 3.9b $54 \text{ h} \geq \text{TH} \geq 67 \text{ h}$ y $65 \text{ min} \geq \text{TC} \geq 94 \text{ min}$ Y de la Figura 3.9C $11 \% \geq \text{CAL} \geq 12 \%$ y $74 \text{ min} \geq \text{TC} \geq 85.6 \text{ min}$, lo que permitirá proponer zonas de búsqueda más estrechas.

En la superficie de respuesta (Figura 3.10), se observa el comportamiento de las diferentes combinaciones de efectos en los que el rendimiento depende de ellos, mostrando una curvatura pronunciada, característica del modelo cuadrático. Lo que indica la existencia de óptimas condiciones de operación para maximizar la respuesta ($\%R_N$).

El punto estacionario obtenido a partir del modelo experimental (Ec. 3.4), obtenidos a partir de la Ec. (2.12) se localizó en TH de 0.0330, con CAL en 0.1517 y TC de -0.0150,

representando los valores naturales de TH = 60 h, CAL = 11 % y TC = 79 min, cuya respuesta del rendimiento de Alg-Na, obtenida a partir de la Ec. (2.13) es de 16.16 %. El análisis canónico del modelo experimental (Ec. 3.6), muestra la presencia de signos alternos en las raíces obtenidas, lo que clasifica al punto estacionario como un punto de silla. Esto indica que la variable de respuesta %R_N aumenta en algunas direcciones del espacio experimental y disminuye en otras, por lo que el punto estacionario no representa un máximo ni un mínimo local.

$$\hat{y} = 16.1577 - 7.3658w_1^2 - 4.4616w_2^2 + 3.8474w_3^2 \quad (3.6)$$

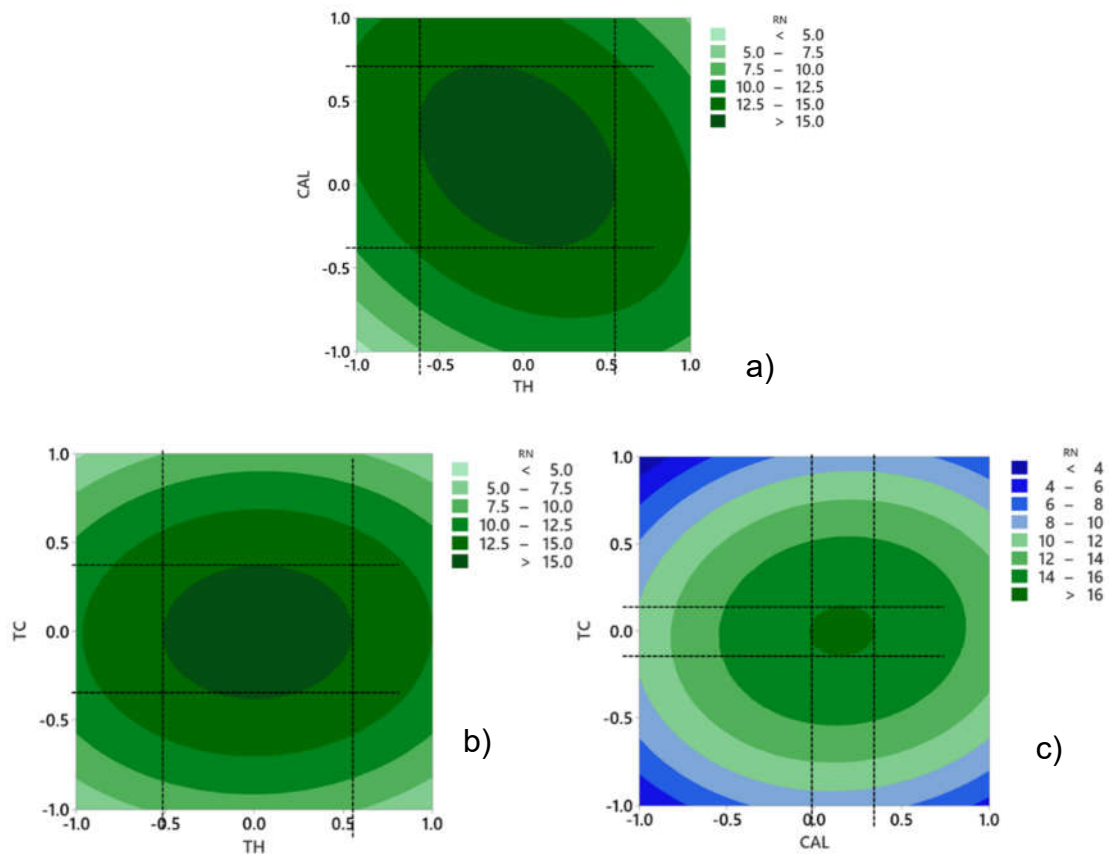


Figura 3.9 Gráfica de contorno de: a) efecto combinado de tiempo de hidratación (TH) y concentración alcalina (CAL), b) efecto de tiempo de hidratación (TH) y tiempo de extracción alcalina (TC) y c) efecto combinado de CAL y TC, sobre el rendimiento con Nogales

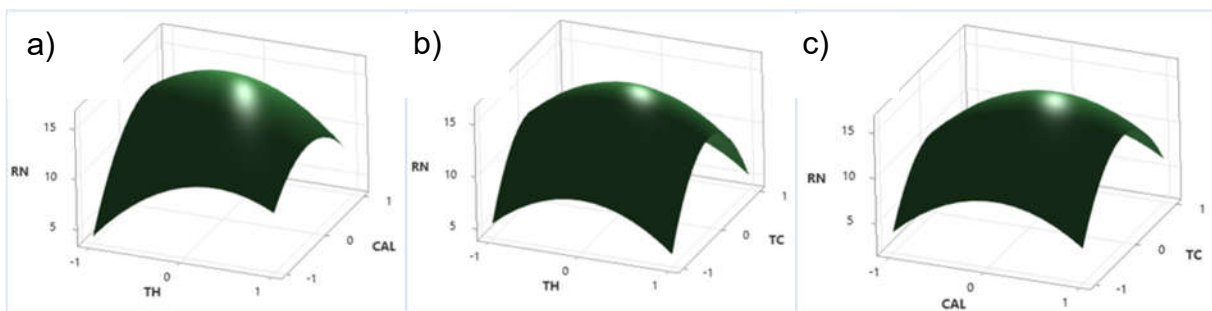


Figura 3.10 Superficie de respuesta del rendimiento de Alg-Na de la Laguna de Nogales de: a) efecto combinado de tiempo de hidratación (TH) y concentración alcalina (CAL), b) efecto de tiempo de hidratación (TH) y tiempo de extracción alcalina (TC) y c) efecto combinado de CAL y TC

3.5 Diseño experimental CDC Equiradial para *Elodea densa* de la Laguna de Nogales

A partir de los resultados obtenidos del diseño Box – Benhken, se determinó que la variable de concentración alcalina no influía significativamente, lo que permitió establecerla como una variable constante (CAL = 10 %), y aplicando las condiciones establecidas en la sección 2.6.3, se obtuvieron los rendimientos de Alg-Na que se muestran en la Tabla 3.13, los cuales presentan el mejor rendimiento de 41.31 %, 23.58 % superior al obtenido con el diseño Box-Benhken.

Tabla 3.13 Rendimientos de Alg-Na obtenidos mediante un diseño CDC para la Laguna de Nogales

Corrida	TH (X ₁) h	TC (X ₃) min	Rendimiento (%)
1	24	80	30.07
2	60	80	17.31
3	24	120	23.13
4	60	120	19.36
5	16.5	100	12.69
6	67.5	100	16.2
7	42	72	37.45
8	42	128	41.31
9	42	100	20.09

Tabla 3.13 (Continuación)

Corrida	TH (X ₁) h	TC (X ₃) min	Rendimiento (%)
10	42	100	19.41
11	42	100	34.98
12	42	100	23.91
13	42	100	21.13

3.5.1 Análisis del diseño experimental CDC

El ANOVA efectuado al diseño CDC (Tabla 3.14), muestra que el modelo general no resulta significativo ($p = 0.073$), no obstante, los términos cuadráticos si resultan significativos ($p = 0.016$) lo que indica la presencia de curvatura, lo que sugiere la posible presencia de un punto óptimo (Box *et al.*, 2025).

Tabla 3.14 ANOVA de extracción de alginato de sodio por método convencional del diseño CDC con *Elodea densa* Nogales

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor-p
Modelo	5	660.622	132.124	3.35	0.073
Lineal	2	16.762	8.381	0.21	0.813
X₁	1	16.722	16.722	0.42	0.536
X₃	1	0.04	0.04	0	0.975
Cuadrado	2	623.655	311.828	7.92	0.016
X₁*X₁	1	237.317	237.317	6.02	0.044
X₃*X₃	1	305.487	305.487	7.75	0.027
Interacción de 2 factores	1	20.205	20.205	0.51	0.497
X₁* X₃	1	20.205	20.205	0.51	0.497
Error	7	275.767	39.395		
Falta de ajuste	3	110.652	36.884	0.89	0.518
Error puro	4	165.116	41.279		
Total	12				

En el diagrama de Pareto de efectos estandarizados (Figura 3.11), se observa que los términos cuadráticos TC^2 y TH^2 , superan la línea de significancia (2.635), lo que indica que estos factores son estadísticamente significativos y tienen la mayor influencia sobre la variable de respuesta. En general, el diagrama valida los factores influyentes ya mencionados en el ANOVA, los términos cuadráticos.

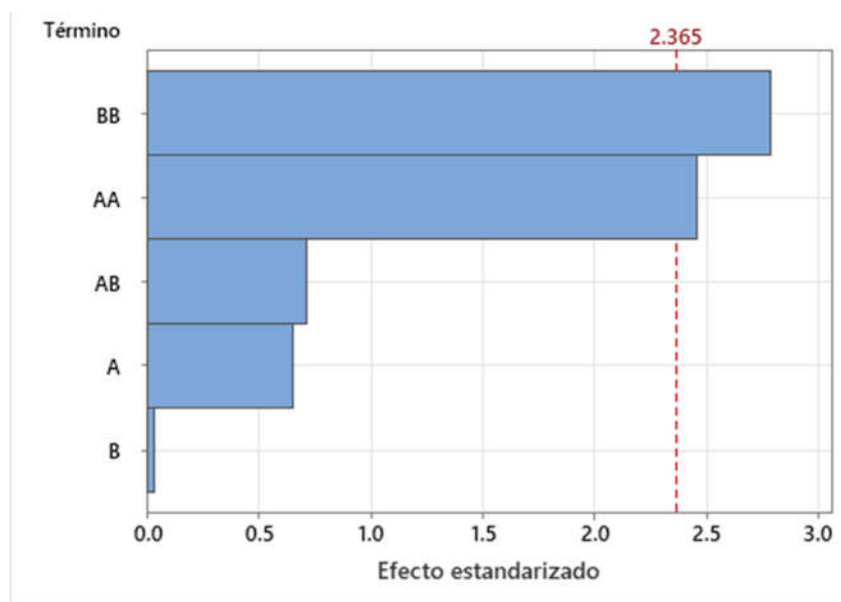


Figura 3.11. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados del rendimiento de Alg-Na de Nogales con $\alpha = 0.05$ del diseño CDC equirradial

En la ecuación (3.7), el modelo de regresión presenta un factor de determinación (R^2 ajustado) de 49.51 %, incrementándose un 78.8% con respecto al obtenido con el diseño Box.Benhken (sección 3.4.2). Aunque continua sin ser un modelo confiable, se puede inferir que la interacción del Tiempo de hidratación (TH) y el tiempo de extracción alcalina (TC), influyen significativamente en el rendimiento del proceso. Siendo los términos cuadráticos los que presentan mayor influencia sobre el rendimiento en comparación con los términos lineales, lo que coincide con lo obtenido en el ANOVA y el diagrama de Pareto.

$$\% R = 23.90 - 1.45X_1 + 0.07X_3 + 5.84 X_1^2 + 6.63X_3^2 + 2.25X_1X_3 \quad (3.7)$$

En general, el modelo obtenido describe el comportamiento del proceso de extracción de alginato de sodio en un rango experimental aceptable, sin embargo, su capacidad limitada requiere de una evaluación adicional o redefinir las variables del modelo.

En el gráfico de probabilidad normal de residuos (Figura 3.12) indica que la mayoría se distribuyen de manera aproximada a la recta de referencia, lo que sugiere que los residuos siguen cerca de una distribución normal. Sin embargo, se identifican desviaciones en los extremos, en particular con los valores más altos de residuo, lo que podría ser la presencia de valores atípicos en la experimentación.

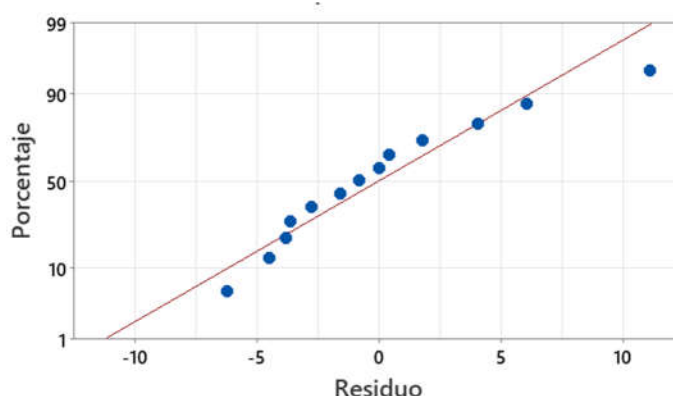


Figura 3.12. Gráfica de probabilidad normal de residuos del diseño CDC para Nogales

La gráfica de contorno (Figura 3.13a) permite identificar regiones límite que pueden considerarse para la obtención de un punto óptimo. Estas regiones se encuentran definidas entre $54 \text{ h} \geq \text{TH} \geq 69 \text{ h}$ y $8 \% \geq \text{TC} \geq 13 \%$ y $47 \text{ }^{\circ}\text{C} \geq \text{TH} \geq 63 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8 \% \geq \text{TC} \geq 14 \%$, donde sería importante explorar para futuras investigaciones.

La gráfica de superficie de respuesta (Figura 3.13b), se muestra un punto de silla en este comportamiento indica que el sistema presenta interacción entre los factores y que no existe un óptimo, sin embargo, en conjunto con la gráfica de contorno, confirman el comportamiento no lineal del modelo.

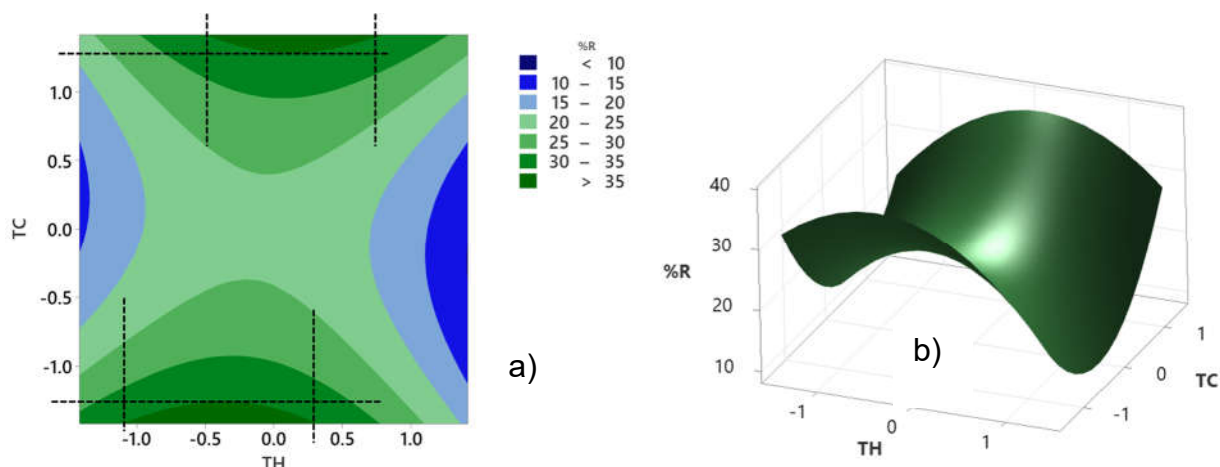


Figura 3.13. Análisis de respuesta (%R) con variables TH y TC: gráfica de contorno (a) y superficie de respuesta (b)

El punto estacionario se determinó a partir del modelo descrito en la Ec. (3.7). Posteriormente, mediante la aplicación de la Ec. (2.12), se obtuvieron los valores codificados de TH = 0.1294 y TC de - 0.0272. La transformación de estos valores a unidades naturales correspondió a TH = 62 h y TC = 79 min, con una respuesta del rendimiento de Alg-Na obtenida de la Ec (2.13) es de 23.80 %.

El análisis canónico del modelo experimental (Ec. 3.8), evidenció que los valores propios asociados a las variables canónicas fueron positivos. Esto indica que el punto estacionario corresponde a un mínimo local de la superficie de respuesta (%R), ya que la respuesta aumenta al alejarse de dicho punto en cualquier dirección del espacio experimental. Por lo tanto, el rendimiento obtenido de 23.80 % representa la respuesta estimada en el punto estacionario.

$$\hat{y} = 23.8052 + 5.0427w_1^2 + 7.4273w_2^2 \quad (3.8)$$

El diseño CDC equiradial confirma que la planta acuática *Elodea densa* proveniente de la Laguna de Nogales requiere un menor tiempo de hidratación en comparación con la de la Laguna de Ojo de Agua. Este comportamiento se sustenta en los resultados reportados en la sección 3.1.3, donde se evidencia que la muestra de

Nogales presenta menor cantidad de nutrientes en la pared celular de esta, de igual forma, presenta menor cantidad de grasas y cenizas, por lo que un tiempo de hidratación prolongado puede afectar negativamente el proceso de extracción de alginato de sodio en esta muestra.

Asimismo, con respecto a la calidad del agua (sección 3.2), los resultados demuestran que las condiciones del ambiente acuático, Ojo de Agua favorece para la producción de biomasa por la disponibilidad de nutrientes y actividad fotosintética, mientras que Nogales, con condiciones más limitantes, promueve la formación de tejidos con mayor contenido estructural, lo que se traduce en un mejor rendimiento de extracción.

3.6 Obtención de Alg-Na con Fluidos Supercríticos

El tratamiento con FS se realizó con el fin de sustituir al formaldehído que se utilizó en el método convencional debido a que, en la etapa de hidratación, *Elodea densa* requiere tiempos muy prolongados (hasta 72 h). Por lo que se decidió emplear a CO₂ como fluido supercrítico. La ventaja que se observó durante la extracción, es que el solvente es inerte por lo que da paso a un proceso más eficaz en la extracción.

Cabe mencionar que el tratamiento con FS es necesario debido a la presencia de fenoles y aceites en *Elodea densa*, por lo que requiere de presiones altas y con co-solvente para la eliminación de aceites, ya que estos interfieren en el proceso de extracción de alginato de sodio. De acuerdo con López-Hortas *et al.* (2022), que la eliminación de fenoles y aceites con un fluido supercrítico no afecta tanto a la planta como al aceite. No existen investigaciones documentadas que empleen FS como pretratamiento para la eliminación de fenoles en plantas acuáticas. No obstante, existen métodos como extracción asistida por microondas (MAE), en donde han reportado rendimientos de 30.43 % de alginato de sodio (Torabi *et al.*, 2021), en un tiempo de 60 min.

En la Figura 3.14, se observan algunos de los aceites extraídos de *Elodea densa*, bajo diferentes condiciones. Las muestras 1 y 2, se utilizaron 4000 y 3500 psi de presión con co-solvente etanol (20 %), la muestra 3, se realizó a baja presión (2000 psi) y 45 °C sin co-solvente, mientras que la muestra 4 se obtuvo en condiciones: 2000 psi a 70 °C y co-solvente etanol (20 %). Por lo tanto, la extracción de aceites y fenoles depende de la temperatura, la presión y la adición del co-solvente.

En este estudio se utilizó CO₂ como fluido supercrítico en el tratamiento de *Elodea densa* para la eliminación de fenoles, aceites y grasas presentes en las paredes celulares, posteriormente se realizó la extracción de acuerdo a la mejor condición obtenida en el diseño Box-Behnken, apartado 3.4.1 considerando solo las variables concentración alcalina (CAL, X₂) y tiempo de extracción (TC, X₃) finalmente se analizó las diferencias de rendimientos en ambas lagunas (%R).

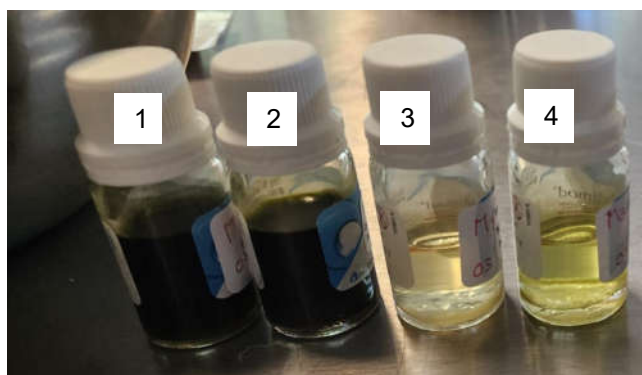


Figura 3.14 Aceites y fenoles de *Elodea densa* extraídas por FS

Los rendimientos obtenidos mediante el tratamiento con CO₂ (Tabla 3.15), mostraron que las mayores recuperaciones fueron de 14.47 % y 13.14 % para las muestras de Ojo de Agua y Nogales, respectivamente.

Tabla 3.15 Rendimientos preliminares de Alg-Na con pretratamiento con FS

Tratamiento	Presión (psi)	Temperatura (°C)	Co-solvente (%)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
inicial	2000	45	s/c	2h	3.6
1o	4000	70	20	2	3.81
2o	2000	70			5.355
3o	3500	80			5.675
4o	3500	60			2.795
5o	3500	70	s/c	3	2.65
6o	3500	70	10	3	14.47
1n	2000	70	20	2	7.345
2n	4000	70			6.575
3n	3500	80			13.14
4n	3500	60			4.39

Nota: “o” para *E. densa* de Ojo de Agua y “n” para *E. densa* de Nogales

Estos rendimientos se alcanzaron utilizando tiempos de extracción de 3 h para Ojo de Agua y 2 h para Nogales. Aunque corresponden a la misma especie, las diferencias en los tiempos de tratamiento pueden atribuirse a su composición química. De acuerdo con los análisis realizados, *Elodea densa* procedente de Ojo de Agua presentó mayor contenido de grasas, lo que podría dificultar la extracción y requiere tiempos más prolongados durante el tratamiento con FS.

Debido a que las condiciones con mejor rendimiento se registraron con una presión de 3500 psi, se consideró como constante para la evaluación del tratamiento en el diseño Box-Behnken, empleando posteriormente la extracción ácida (HCl, 1N) y la extracción alcalina con una concentración de Na_2CO_3 (CAL) de 9 % y un tiempo de extracción (TC) de 40 min. Dicha condición se obtuvo un mejor rendimiento en la sección 3.4.2 en el diseño Box-Behnken.

3.6.1 Obtención de rendimientos de Alg-Na por FS con el diseño Box-Behnken

En la Tabla 3.16 se describen los rendimientos obtenidos bajo el diseño Box-Behnken para la laguna de Ojo de Agua, establecido en la sección 2.7.1

Tabla 3.16 Rendimientos de Alg-Na con tratamiento de fluido supercrítico mediante el diseño Box Behnken de Ojo de Agua (ODA)

Tratamiento	Temperatura (T, °C)	Co-solvente (C, %)	Tiempo (t, h)	Rendimiento (%)
1	70	5	2.5	14.898
2	80	5	2.5	15.762
3	70	15	2.5	18.276
4	80	15	2.5	10.637
5	70	10	2	9.713
6	80	10	2	11.532
7	70	10	3	14.390
8	80	10	3	10.292
9	75	5	2	12.532
10	75	15	2	3.929
11	75	5	3	6.493
12	75	15	3	10.853
13	75	10	2.5	14.714
14	75	10	2.5	13.149
15	75	10	2.5	13.984

Se obtuvo un incremento del 22 % de rendimiento con respecto al preliminar, con 15 % de concentración del co-solvente (etanol) y 2.5 h a 70 °C, descrito en el tratamiento 3, lo que sugiere que una mayor proporción de cosolvente favorece la extracción en estas condiciones. Sin embargo, el menor rendimiento (3.929 %) se obtuvo en el tratamiento 10 (75 °C, 15 % de co-solvente y 2 h), lo que indica que la combinación de tiempo corto y temperatura intermedia puede afectar negativamente el proceso. En los puntos centrales, se pueden observar valores más consistentes, lo que indica buena distribución de los datos.

En el análisis de varianza (Tabla 3.17) se evaluó mediante un nivel de significancia del 95 % ($\alpha = 0.05$). El modelo en general resulta significativo, la variable independiente temperatura (T) la que muestra un efecto significativo ($p = 0.027$).

Tabla 3.17 ANOVA de extracción de alginato de sodio con tratamientos con FS del diseño Box-Behnken *Elodea densa* Ojo de Agua

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Media cuadrática	Valor F	Valor-p
Modelo	9	182.129	20.2366	18.92	0.002
Lineal	3	17.066	5.6888	5.32	0.052
T	1	10.248	10.2479	9.58	0.027
C	1	4.483	4.4834	4.19	0.096
t	1	2.335	2.3352	2.18	0.2
Cuadrado	3	96.226	32.0754	30	0.001
T*T	1	14.577	14.5774	13.63	0.014
C*C	1	4.013	4.0133	3.75	0.11
t*t	1	73.266	73.2665	68.52	0
Interacción de 2 factores	3	68.836	22.9455	21.46	0.003
T*C	1	18.073	18.0732	16.9	0.009
T*t	1	8.752	8.752	8.18	0.035
C*t	1	42.011	42.0112	39.29	0.002
Error	5	5.347	1.0693		
Falta de ajuste	3	4.12	1.3734	2.24	0.324
Error puro	2	1.227	0.6133		
Total	14	187.476			

Los términos cuadráticos son y significativos, lo que indica un efecto de curvatura del modelo, lo que sugiera la posible presencia de un punto óptimo. Las interacciones resultaron significativas, siendo la más destacada la interacción de C*t ($p = 0.002$). Esto evidencia que el efecto de cada variable influye en la combinación con las otras, principalmente entre concentración de cosolvente y tiempo. Por lo que es importante evaluar dichas variables para investigaciones futuras en la eliminación de fenoles

El diagrama de Pareto (Figura 3.15) se observa que las tres interacciones (BC, AB y AC), dos términos cuadráticos (CC y AA) y un factor independiente (A), superan la

línea de referencia (2.571), lo que confirma que la temperatura, es la variable más influyente en el proceso de extracción.

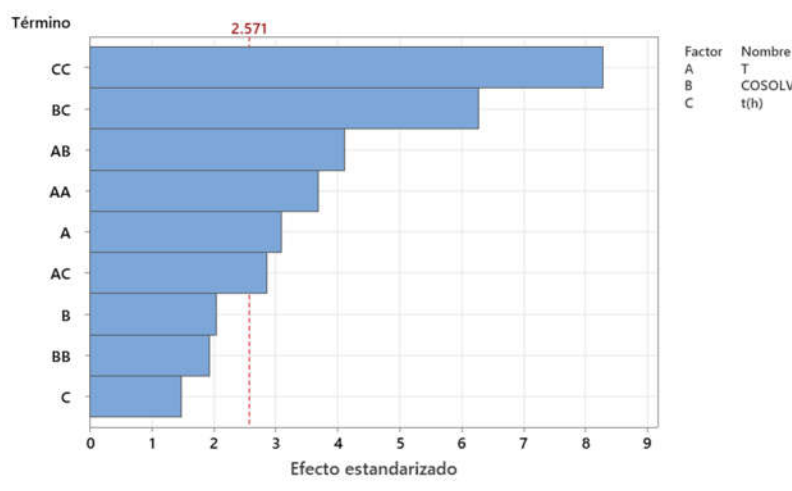


Figura 3.15. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados del rendimiento de Alg-Na de Ojo de Agua con $\alpha = 0.05$ del diseño Box-Behnken con tratamiento de FS

La relación entre las variables evaluadas con respecto a la variable de respuesta se concentra en el modelo de regresión (Ec. 3.9), donde T corresponde a la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), C a la concentración del co-solvente (%) y t el tiempo de extracción de fenoles (h). El modelo obtenido muestra un ajuste del factor de determinación (R^2 ajustado) del 92.01 %, siendo que sólo el 7.99 % de la variación total no pudo ser explicada, evidenciándose un buen ajuste a los datos obtenidos.

$$\begin{aligned} \%R_{ODA} = & 219 - 9.82 T + 3.82 C + 121.6 t + 0.0795 T^2 + 0.0417 C^2 - 17.82 t^2 \\ & - 0.0850 TC - 0.592 Tt + 1.296 Ct \end{aligned} \quad (3.9)$$

La gráfica de probabilidad normal de los residuos (Figura 3.16) muestran que, aunque se muestra una ligera dispersión de los puntos en general muestran una tendencia, lo que indica que los residuos siguen una distribución normal aproximada. No se observan desviaciones relevantes. En conclusión, el modelo es adecuado y cumple

con el supuesto de normalidad, validando la confiabilidad de los resultados obtenidos para el rendimiento de Alg-Na.

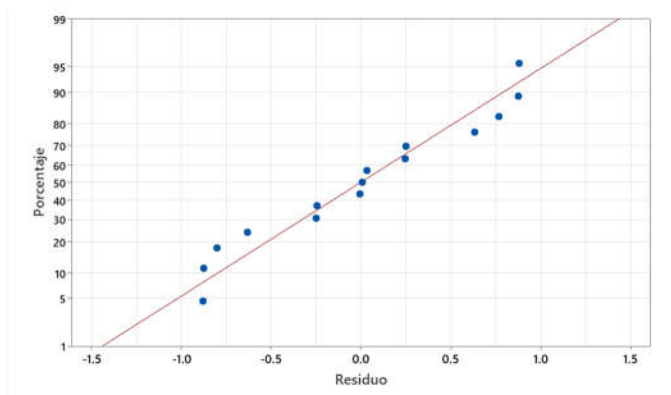


Figura 3.16. Gráfica de probabilidad normal de residuos del diseño Box-Behnken con tratamiento con FS para Ojo de Agua

Las gráficas de contorno del rendimiento (%R), se presentan en la Figura 3.17. Se puede observar que la interacción co-solvente (C%) – tiempo (t) (Figura 3.17c), presenta una región de optimización entre $5\% \geq C \geq 10\%$ y $2\text{ h} \geq t \geq 3\text{ h}$, donde sería factible encontrar el rendimiento óptimo del proceso.

La gráfica de superficie de respuesta (Figura 3.18), muestra una tendencia de la temperatura (T) a mejorar el rendimiento a valores altos (Figura 3.18a y 3.18b), en tanto que de manera clara se observa la tendencia hacia la maximización en la interacción de tiempo (t) y co-solvente (C) (Figura 3.18c). Desde el punto de vista fisicoquímico, este comportamiento puede atribuirse al efecto del cosolvente en la modificación de polaridad del medio supercrítico, facilitando la solubilización de aceites y fenoles, mientras que el tiempo (t) permite a que el extracto se vaya liberando poco a poco desde el interior de la planta (McHugh y Krukonis, 2013).

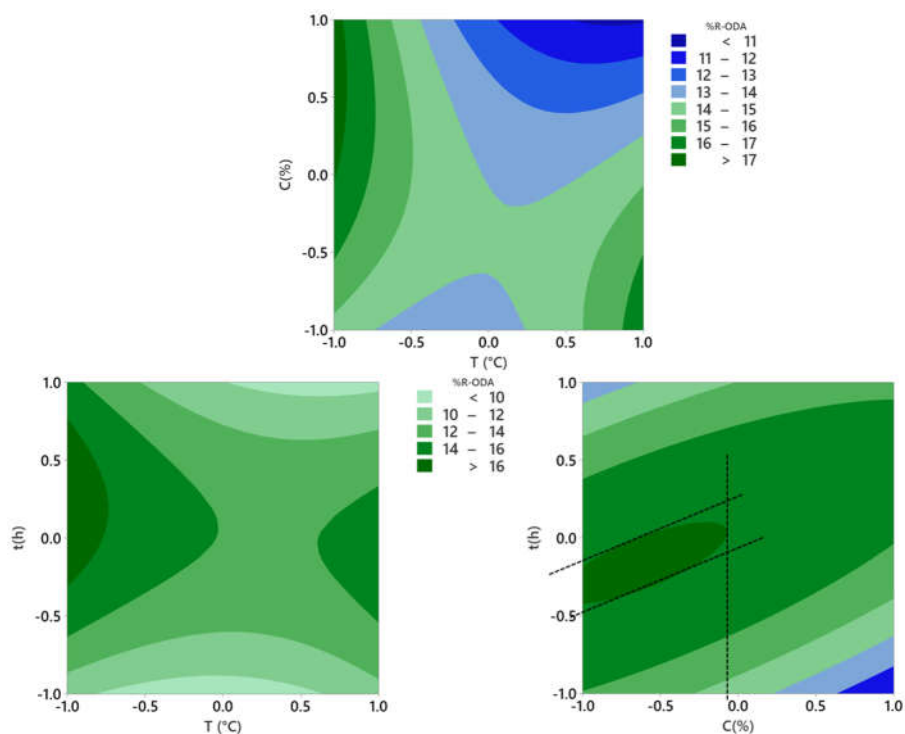


Figura 3.17. Gráfica de contorno de %R de Alg-Na por tratamiento con FS: a) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y concentración de co-solvente (%), b) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y tiempo de extracción de fenoles (h) y c) Concentración de co-solvente (%) y tiempo de extracción de fenoles (h)

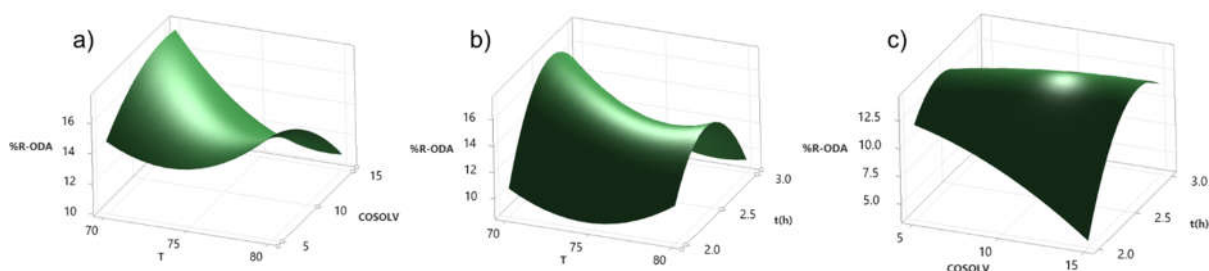


Figura 3.18. Superficie de respuesta del rendimiento %R-ODA por tratamiento con FS: a) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y concentración de cosolvente (%), b) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y tiempo de extracción de fenoles (h) y c) concentración de cosolvente (%) y tiempo de extracción de fenoles (h)

El punto estacionario se determinó a partir del modelo descrito en la Ec. (3.8). Posteriormente, mediante la aplicación de la Ec. (2.12), se obtuvieron los valores

codificados de T de 62.471, C de -12.1042 y t de 1.9287, con valores reales de: T=70°C, C=15 % y t=2.4 h, con una respuesta del rendimiento de Alg-Na obtenida de la Ec (2.13) es de 6.41 %.

El análisis canónico del modelo experimental (Ec. 3.9), presentó valores propios de diferente signo, lo que indica que el punto estacionario corresponde a un punto de silla, descartando la existencia de un máximo o mínimo global dentro de la región experimental evaluada.

$$\hat{y} = 6.41 - 17.8982w_1^2 + 0.0207w_2^2 + 0.128 w_3^2 \quad (3.9)$$

En general, el rendimiento de Alg-Na bajo tratamiento con CO₂, no puede maximizarse mediante la variación independiente de los factores, sin embargo, la interacción entre co-solvente y tiempo, se presentan como los factores predominantes en la definición de las condiciones óptimas del proceso. Asimismo, se observa un incremento del 11.88%, en el coeficiente de determinación (R_{ajust}^2) con respecto al obtenido por el método convencional, es decir, el modelo propuesto presenta un ajuste adecuado y una alta capacidad de describir el comportamiento del proceso bajo las condiciones evaluadas.

3.7 Caracterización por FT-IR

Los espectros FT-IR se basa bajo el estándar con alginato de sodio (Figura 3.19), presenta rasgos característicos de los grupos funcionales de O-H, que corresponden a vibraciones en 3224.31 y 3500 cm⁻¹. En los desplazamientos 1594.61 cm⁻¹ se encuentran los estiramientos correspondientes a los grupos carboxilo y 1407.35 cm⁻¹ a C-OH. El principal estiramiento generado en FT-IR, se presenta para las bandas de COO⁻, con 1026.50 cm⁻¹, tal como se describen en la Tabla 3.18, en las que se observa una comparación con el alginato de sodio obtenido. Los desplazamientos del alginato de sodio varían de acuerdo al tipo de fuente de obtención y a sus propiedades fisicoquímicas que presenta.

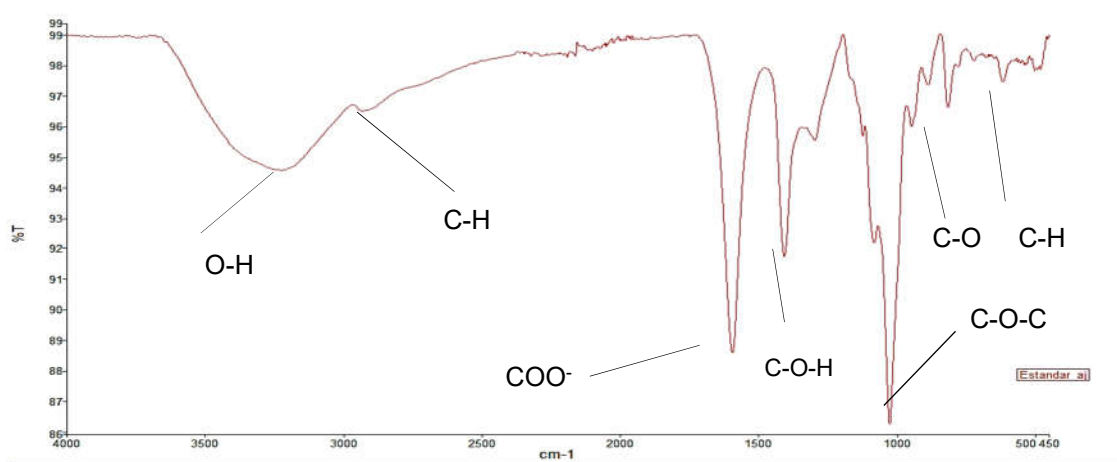


Figura 3.19 Espectro FT-IR de estándar de alginato de sodio

En la Figura 3.20a, se muestra el comportamiento del Alg-Na obtenido de la Laguna de Ojo de Agua por el método convencional explicado en el apartado 2.6.2 del diseño Box-Behnken, utilizando 48 h de TH, con 11 % de concentración alcalina y 80 min de tiempo de extracción. La Figura 3.20b, se observa el comportamiento del Alg-Na de la Laguna de Nogales por el método convencional con formaldehído (0.1 %) a 72 h de hidratación, con 10 % de concentración de Na_2CO_3 y 2 h de tiempo de extracción a 80 °C. Los desplazamientos de los grupos funcionales característicos se muestran en la Tabla 3.18, comparando con el estándar de alginato de sodio, en la cual se muestra las vibraciones de los estiramientos de los grupos similares a los de Nogales.

Tabla 3.18 Grupos funcionales del espectro FT-IR en alginato de sodio

Grupo funcional	Longitud de onda de Alg-Na (cm^{-1})				
	Estándar	OA conv.	NO conv	OA FS	NO FS
O-H	3224.31	3566.23	3370.88	3335.24	3351.64
C-H	2980	3315.53	2850	2900	2890.11
COO⁻	1594.81	2356.69	1589.12	1630.15	1520.32
C-O-H	1407.35	1646.80	1410.45	1412.07	1414.78
C-O-C	1026.50	1324.62	1073.33	1069.40	1078.33
C-O	820	871	871.98	872.23	872.11
C-H	600	861	712.50	540.27	650.10

Se observa una variabilidad del 19.48 % de desplazamientos del Alg-Na del estándar y de Ojo de Agua en el grupo funcional principal del Alg-Na (COO^-), debido a que las características químicas de *Elodea densa* de dicho lugar resultaron elevadas principalmente en grasas, los nutrientes de igual forma resultaron elevados en comparación con la de Nogales. Es por ello que la variación se le atribuye principalmente a la falta de eliminación de grasas. De igual forma, los nutrientes del agua, en Nogales se presentó menores concentraciones, eso limita al crecimiento acelerado de la planta, sin embargo, puede favorecer a la concentración de polisacáridos en la pared celular, es por ello que *E. densa* de Nogales presenta una variación del 22 % en COO^- siendo en todos los demás inferiores.

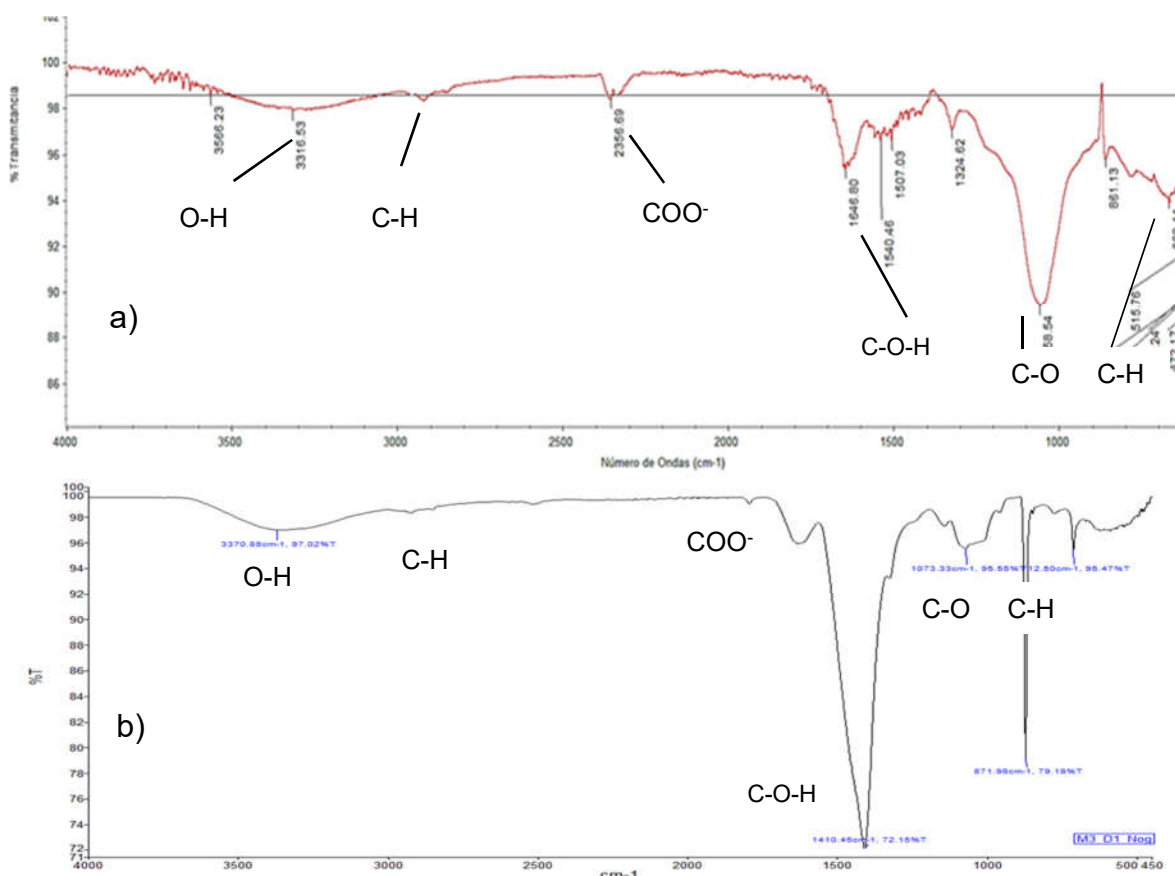


Figura 3.20 Espectro FT-IR de estándar de alginato de sodio del método convencional: a) Ojo de Agua y b) Nogales

Los desplazamientos obtenidos con el tratamiento de CO_2 para la eliminación de fenoles favorece con lo observado en los espectros FT-IR (Figura 3.20), ya que se

acercan más a los del alginato de sodio estándar (ver Tabla 3.16). Se observan una pequeña diferencia entre los grupos funcionales, principalmente en los valores de Ojo de Agua, como se mencionó, es debido a los nutrientes que esta presenta.

En la Figura 3.21a, se observan los picos principales del Alg-Na, dicho espectro se obtuvo bajo las condiciones de: 2000 psi a 70 °C por 2 h y para la muestra de Nogales con fluidos supercríticos (Figura 3.21b) con 3500 psi a 80 °C durante 2 h. Cabe mencionar que los bloques M y G del alginato de sodio varían ligeramente en las diferentes condiciones trabajadas y corresponden a los grupos de C-O y C-H. Por lo tanto, *Elodea densa* demuestra que es buena fuente de obtención de alginato de sodio, sin embargo, el estudio de las condiciones para un eficiente proceso y un alginato puro, requiere de ajustar más variables.

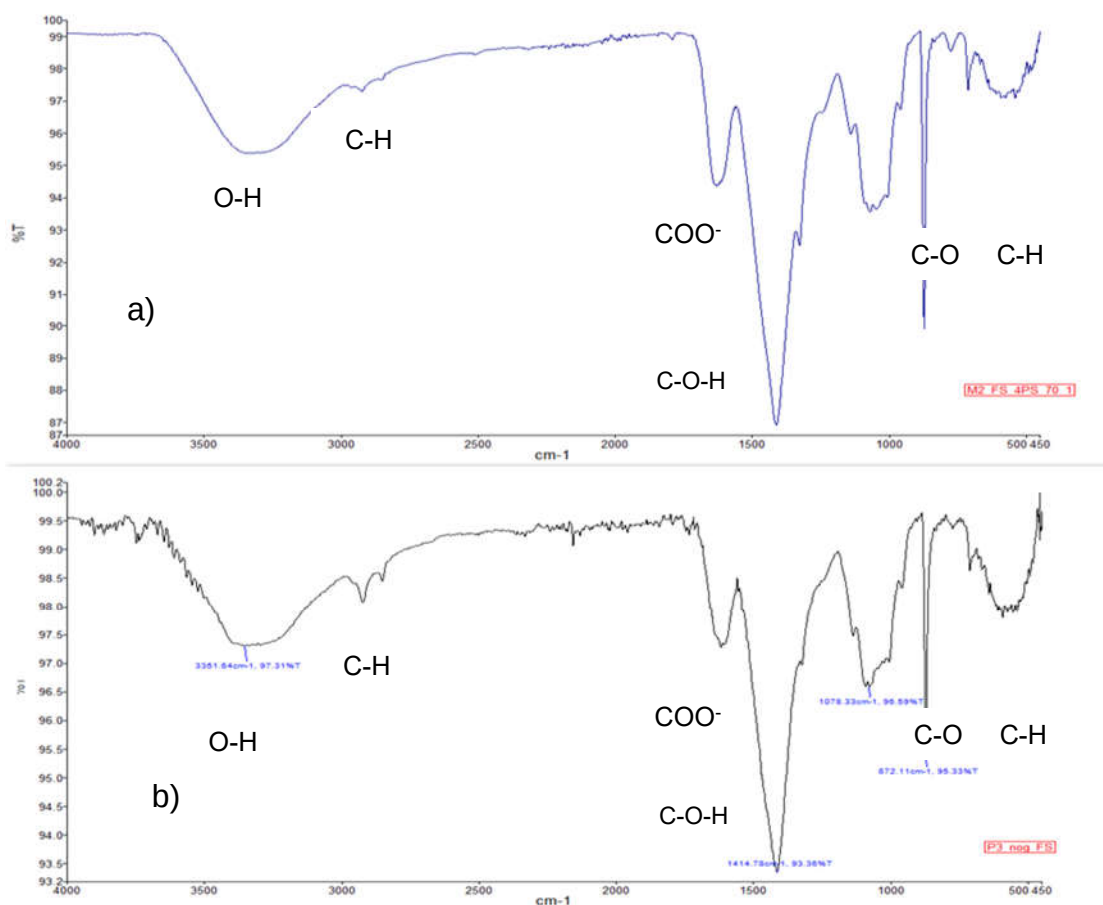


Figura 3.21. Espectro FT-IR de estándar de alginato de sodio con tratamiento por FS: a) Ojo de Agua y b) Nogales

3.8 Caracterización por HPLC

De acuerdo con la caracterización de HPLC del alginato de sodio, se detectó en una longitud de onda de 200 nm, en donde se observó el pico en un tiempo de retención de 1.04 min (Figura 3.22), indicando una respuesta significativa de absorción en dicha región. El comportamiento observado se debe a que la columna usada (Kinetex phenyl-hexyl 100 A, 150 x 4.6 cm, 5 μ m) es para compuestos aromáticos. Los resultados indican que el alginato de sodio presenta un comportamiento cromatográfico característico bajo las condiciones utilizadas, evidenciando cambios importantes de absorbancia en tiempos cortos de retención.

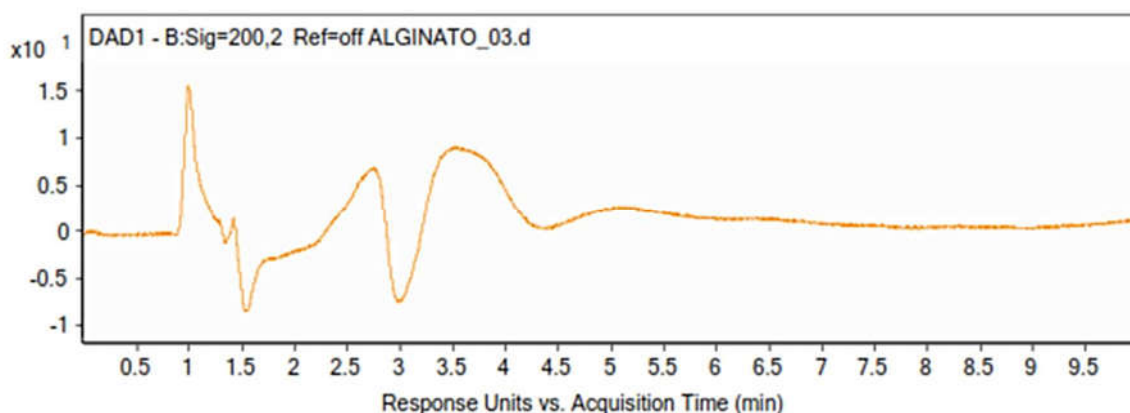


Figura 3.22. Cromatograma de alginato de sodio de SIGMA ALDRICH

En la Figura 3.23 muestra el espectro UV del alginato de sodio obtenido en un rango de longitud de onda entre 190 y 300 nm. Se observó una absorbancia máxima cercana a 190 nm, con un valor aproximado de 40 UA, seguida de una disminución pronunciada de señal conforme aumentó la longitud de onda. A partir de los 210 nm, la absorbancia permaneció cercana a cero, dicho comportamiento espectral obtenido es característico de compuestos polisacáridos (Carter *et al.*, 2023).



Figura 3.23. Espectro UV del alginato de sodio

3.8.1 Cromatograma de alginato de sodio obtenido

La Figura 3.24 muestra la comparación entre los cromatogramas del alginato de sodio obtenido mediante el método convencional y el alginato obtenido mediante el tratamiento con FS. El cromatograma correspondiente al método convencional (Figura 3.23a), se observan múltiples señales desde el pico principal alrededor de un tiempo de retención de 1.5 min. Dicho pico corresponde a la corrida 6 de Ojo de Agua (apartado 3.4) con un tiempo de hidratación (TH) de 72 h, la concentración alcalina Na_2CO_3 de 9 % (CAL) y 40 min de tiempo de extracción alcalina (TC) con un rendimiento de 21.74 %. El pico detectado es característico de los componentes hidrofílicos del alginato de sodio, este comportamiento ha sido reportado en estudios cromatográficos de polisacáridos y biopolímeros analizados mediante técnicas HPLC (Lesellier, 2012).

La Figura 3.24b presenta el cromatograma del alginato de sodio usando el tratamiento con el fluido supercrítico de CO_2 , obtenido mediante detección UV a 200 nm. El perfil cromatográfico se observa en un tiempo de 1.5 min, posteriormente, la señal disminuye rápidamente manteniéndose estable. A diferencia del cromatograma obtenido por el método convencional, en esta muestra una notable reducción de señales secundarias,

es decir, que el comportamiento observado sugiere que el tratamiento con FS favoreció la eliminación de impurezas presentes en el alginato de sodio, produciendo una muestra más definida. Cabe mencionar que las condiciones trabajadas en este proceso fue de la corrida 3 del diseño Box-Behnken de Ojo de Agua (apartado 3.6.1), temperatura de 70 °C, concentración de cosolvente de 15 % y el tiempo de extracción de 2.5 h. En este análisis, se demuestra que el uso de CO₂ supercrítico mejora los procesos de purificación y estabilidad del alginato, permitiendo disminuir interferencias analíticas y obtener perfiles cromatográficos más definidos. Estudios recientes reportan que este tipo de tratamientos mejora la estabilidad y pureza de biomateriales (Al-Sakkari *et al.*, 2020).

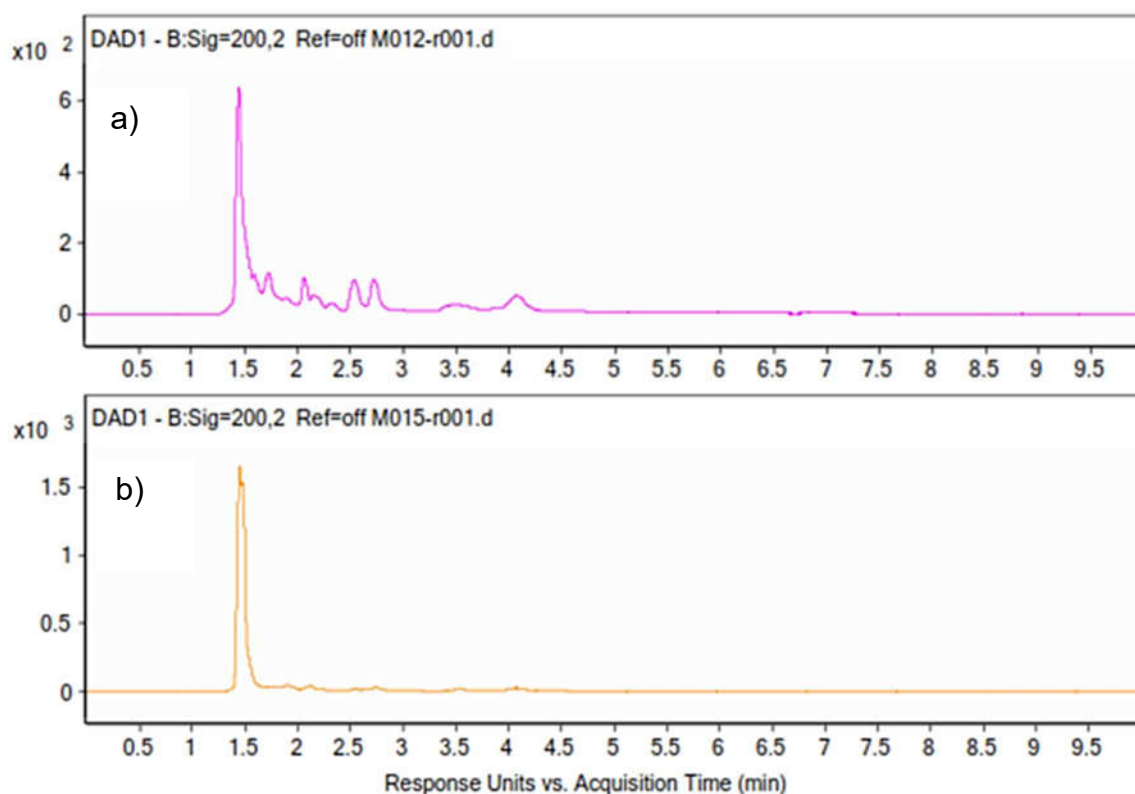


Figura 3.24 Cromatograma de alginato de sodio obtenido: a) Alg-Na por el método convencional y b) Alg-Na con el tratamiento con Fluido Supercrítico

Los resultados obtenidos son consistentes con lo reportado por Kakita *et al.* (2024), quienes desarrollaron un método HPLC con derivación fluorescente para el análisis de

ácidos urónicos derivados del alginato, donde utilizaron una longitud de excitación de 288 nm y 470 nm para la emisión, con fase móvil de acetonitrilo/agua en la cual llevó la separación completa de ambos ácidos (M y G) en un tiempo de 60 min. No reportan con exactitud los tiempos exactos del tiempo de retención, sin embargo, mencionan que la separación cromatográfica aumentó el grado oligomerización del alginato y su comportamiento fue similar a los cromatogramas que se obtuvo en esta investigación. De manera similar, el método HPLC validado para la determinación de Alg-Na en formulaciones farmacéuticas reportado por Hanan *et al.* (2013), mostró picos cromatográficos en un tiempo de retención de 2.65 ± 0.1 min, utilizando detección de 200 nm y una columna C₁₈ bajo condiciones isocráticas. Los autores indicaron que el pico obtenido presentó adecuada simetría y buena reproducibilidad cromatográfica similares a las observadas en este estudio.

CONCLUSIONES

Se evaluó de manera íntegra el potencial de la planta acuática *Elodea densa* como alternativa para la obtención de Alginato de sodio, considerando su caracterización fisicoquímica para el planteamiento de la optimización del proceso de extracción bajo enfoques experimentales diferentes. A partir de los resultados obtenidos, se demuestra que esta especie representa una opción viable como fuente de obtención.

El alto contenido de humedad (91 %) de *E. densa* se le atribuye a su naturaleza como planta sumergida, con tejidos blandos y mayor retención de agua, esta característica relevante, ya que implica la necesidad de un adecuado acondicionamiento previo, particularmente en etapas de secado y reducción de partícula para favorecer la eficiencia en la extracción de alginato de sodio. Asimismo, se identificaron diferencias morfológicas entre ambas plantas, el tamaño de Nogales (23-29 – 28.30 mm) en comparación con Ojo de Agua (12.76 -19.20). En Ojo de Agua, se observó un incremento del 22 % en el contenido de cenizas y 22 % en grasas en comparación con Nogales, así como concentraciones mayores nutrientes los cuales favorecen una mayor actividad biológica y crecimiento de *Elodea densa*.

El diseño preliminar permitió identificar que el formaldehído (0.1 %) fue el mejor solvente, con tiempos de hidratación altos (72 h) para las plantas acuáticas de ambas lagunas. La aplicación de este diseño permitió profundizar en la comprensión del sistema de extracción, permitiendo analizar variables más influyentes.

El diseño Box-Behnken aplicado en la Laguna de Ojo de Agua permitió alcanzar rendimientos favorables al igual que en la Laguna de Nogales, observando que los efectos cuadráticos de tiempo de hidratación (TH) fue el más significativo en combinación con valores intermedios y altos de la concentración alcalina (CAL), alcanzando un 9.66 % de rendimiento, con un R^2 ajustada de 80.13 %, en un TH de 61 h, con CAL de 12% y TC de 61 min. A pesar de mostrar un comportamiento en el punto estacionario como punto de silla, se observó que el rendimiento puede lograr aumentar entre el espacio experimental estudiado.

El diseño Box-Behnken para la Laguna de Nogales, la variable significativa fue el tiempo de extracción, indicando la presencia de curvatura en el rendimiento de Alg-Na, se obtuvo un rendimiento óptimo del 16.16 % con R^2 ajustada de 74.18 % en TH de 60 h, con CAL de 11 % y TC de 79 min, evidenciando el comportamiento de punto de silla, lo que favorece el entorno estudiado, dando apertura de un estudio en futuras investigaciones.

La diferencia de rendimientos se debe a los nutrientes de las algas y a la calidad del agua, se observó que hubo diferencias en la caracterización fisicoquímica por ello, los rendimientos varían en cada sitio, a pesar de ser la misma especie, en Ojo de Agua requiere de más tiempo de hidratación que en Nogales.

Debido a la variabilidad de *E. densa* de Nogales, se implementó el diseño CDC equirradial, el cual permitió evidenciar que el proceso de extracción presenta una alta sensibilidad a los cambios de variables, este diseño mejoró parcialmente la descripción del proceso, obteniendo un rendimiento máximo de 41.31 % con TH de 42 h y 128 min de TC, influyendo los efectos cuadráticos, es decir, son estadísticamente significativos. El modelo presentó un R^2 de 49.51 %, una mejoría con respecto al diseño Box-Behnken, en el que indica que el rendimiento puede obtenerse bajo condiciones intermedias (TH = 62 h y TC = 79 min), obteniendo un mínimo del 23.80 %, lo que da ventaja ya que permite evaluar en esos rangos para obtener un mayor rendimiento de Alg-Na para Nogales.

Un aspecto relevante del estudio fue la implementación de fluidos supercríticos utilizando CO₂ como pretratamiento, con el objetivo de sustituir el uso de formaldehído y reducir los tiempos de hidratación. Los resultados demostraron que esta técnica no solo es viable, sino que además permite mejorar significativamente los rendimientos de extracción. En el diseño Box-Behnken se realizó con *E. densa* de Ojo de Agua, en el que se evaluó bajo las variables: temperatura (T), concentración de cosolvente (C,%) y tiempo de extracción de fenoles (h), en donde las variables influyentes fueron las interacciones entre ellas, obteniendo un R^2 ajustado del 92.02 %, mejorando en un

14.84 % de ajuste en comparación con el método convencional (respecto a Ojo de Agua). De acuerdo a lo obtenido, la interacción del co-solvente (C %)-tiempo (t), fue el más destacado y donde permite evaluar el rendimiento de C entre 5 al 10 % y en rangos de t de 2 a 3 h. El comportamiento de acuerdo al análisis canónico mostró un punto de silla.

La caracterización por FT-IR confirmó la presencia de los grupos funcionales característicos del alginato de sodio, mostrando diferencias en los estiramientos de O-H, COO- y C-OH (3316.53, 1646.80 y 1324.62 cm^{-1} , respectivamente). Existe una diferencia en los resultados de Ojo de Agua en el método convencional, ya que presentó más grasas y cenizas. Mientras que los desplazamientos con el tratamiento de CO_2 , se encontró una similitud en las vibraciones de los enlaces de los grupos funcionales. En Nogales, los desplazamientos se acercan entre sí tanto por el método convencional, como de fluidos supercríticos.

En el análisis cromatográfico, mostró un pico principal alrededor de 1.5 min de retención y una rápida estabilización, indicando una adecuada elución de los componentes principales del polímero. La muestra tratada con CO_2 presentó un perfil más homogéneo en comparación con el método convencional, evidenciado menor señales de impurezas. Los resultados obtenidos coinciden con estudios recientes de HPLC reportados en la literatura, donde el alginato presenta tiempos de retención cortos debido a su naturaleza hidrofílica y polar. Así mismo, en el análisis de fluidos supercríticos, demuestran que favorecen en la purificación y estabilidad estructural del alginato, mejorando su comportamiento cromatográfico y reduciendo interferencias analíticas. En general, los resultados confirman que el tratamiento con FS representa una alternativa eficiente para obtener alginato de sodio con mayor pureza y con análisis cromatográficos más definidos.

RECOMENDACIONES

Con base a los hallazgos obtenidos en esta investigación, se plantean diversas sugerencias orientadas a mejorar las condiciones identificadas y fortalecer el proceso de extracción. Acondicionar adecuadamente las plantas, desde el lavado y el secado convectivo para generar mayor concentración de las propiedades de la planta acuática y evitar la descomposición de la materia prima.

Analizar la planta acuática *Elodea densa* en cada muestreo, ya que sus características fisicoquímicas pueden cambiar de acuerdo a la calidad del agua y determinar principalmente grasas y cenizas, variables base para la determinación y el tiempo de extracción, en el caso del método convencional.

Realizar un estudio del tiempo de desgrasado con hexano, así como la concentración, en función del contenido de grasas de la planta acuática a fin de favorecer la eliminación de aceites y fenoles

En la hidratación, en esta investigación se utilizó concentraciones distintas en el diseño preliminar, con formaldehído (0.1 %), acetona y etanol (70 %), lo recomendable es realizar el tratamiento o la hidratación con estos solventes bajo la misma concentración para observar si beneficia la eliminación de fenoles y obtener un buen rendimiento de alginato de sodio.

Es fundamental realizar las soluciones (HCl, Na₂CO₃, CaCl₂) en la concentración indicada, ya que un mal cálculo, puede alterar las extracciones tanto ácida como alcalina. Asimismo, el tamaño de las partículas es un factor relevante, pues influye directamente en la manipulación durante las filtraciones. Si las partículas son demasiado pequeñas, la muestra tiende a volverse muy densa, por ello, que en el acondicionamiento de *Elodea densa* se recomienda utilizar un tamiz número 40 para obtener un tamaño de partícula adecuado.

En la eliminación de fenoles con FS, se recomienda utilizar perlas de borosilicato dentro de la celda de extracción durante la preparación de la muestra, de lo contrario podría obstruir las líneas del gas y causar un aumento de presión y causar fugas en las llaves de paso causando un desajuste en la presión ya establecida. Es primordial mantener estable tanto la temperatura y la presión crítica durante la eliminación de fenoles, de lo contrario, provocaría un desajuste en la evaluación de variables.

Respecto a los análisis cromatográficos, se recomienda realizar utilizando diferentes longitudes de onda y detectores para obtener una caracterización más completa del alginato de sodio. Evaluar el efecto de distintas condiciones como columna (recomendable usar C₁₈), composición de fase móvil y flujo, con el fin de optimizar la separación y resolución de los picos obtenidos. Desarrollar estudios adicionales sobre identificación y cuantificación de oligómeros de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G) mediante métodos cromatográficos de mayor resolución.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abka-Khajouei, R.; Tounsi, L.; Shahabi, N.; Patel, A.K.; Abdelkafi, S.; Michaud, P. (2022). Structures, Properties and Applications of Alginates. *Mar. Drugs* 20, 364. <https://doi.org/10.3390/md20060364>
- Ahmad, A., Mubarak, N., Jannat, F., Ashfaq, T., Santulli, C., Rizwan, M., . . . Ali, S. (2021). A Critical Review on the Synthesis of Natural Sodium Alginate Based Composite Materials: An Innovative Biological Polymer for Biomedical Delivery Applications. *Processes*, 9(1), 137. <https://doi.org/10.3390/pr9010137>
- Ali, A. H. (2022). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry*, 6, 10-20. DOI: [10.29328/journal.aac.1001026](https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001026).
- Al-Sakkari, E. G., Abdeldayem, O. M., Genina, E. E., et al. (2020). New alginate-based interpenetrating polymer networks for water treatment: A response surface methodology based optimization study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 772–785. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.220>
- Bhardwaj, S. K., Dwivedi, K., Agarwa, D. (2015). A Review: HPLC Method Development and Validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 5(4): 78-81. ISSN-2231-5012.
- Białowiec, A., Sobieraj, K., Pilarski, G., & Manczarski, P. (2019). The Oxygen Transfer Capacity of Submerged Plant *Elodea densa* in Wastewater Constructed Wetlands. *Water*, 11(3), 575. <https://doi.org/10.3390/w11030575>
- Bojorges, H., López-Rubio, A., Martínez-Abad, A., Fabra, M. J. (2023). Overview of alginate extraction processes: Impact on alginate molecular structure and technological properties. *Trends in Food Science & Technology*, 140, 104142. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104142>
- Box, G. E. P., Hunter, J. S., & Hunter, W. G. (2005). *Statistics for experimenters: Design, innovation, and discovery* (2nd ed.). Wiley. ISBN: 13 978-0471-71813-0
- Busch, A., & Hess, S. (2022). A diverse group of underappreciated Zygnematophytes deserves in-depth exploration. *Applied Phycology*, 3(1): 306-323. <https://doi.org/10.1080/26388081.2022.2081819>
- Brunner G. (2010). Applications of supercritical fluids. *The Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*; 1:321-342. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-073009-101311. PMID: 22432584.
- CABI. (19 de noviembre de 2019). *Digital Library*. Obtenido de <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.20491>

- Cao, J., Wu, B., Yuan, P., Liu, Y., & Hu, C. (2025). Research Progress of Sodium Alginate-Based Hydrogels in Biomedical Engineering. *Gels*, 11(9), 758. <https://doi.org/10.3390/gels11090758>
- Carter, J. B., Huffaker, R., Singh, A., & Bean, E. (2023). A review of hydrochemical analysis using ultraviolet-visible absorption spectroscopy and machine learning. *Science of the Total Environment*, 901, 165826. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165826>
- Çengel, Y. A., & Boles, M. A. (2012). *Termodinámica* (7.a ed.), pp. 124. McGraw-Hill. ISBN 978-607-15-0743-3
- Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. (2001). *Organic Chemistry*. Oxford, pp. 48, 65-67. ISBN-0-19-850346-6
- Contreras, L. F. (2020). *Aprovechamiento del alga marina Sargassum spp. mediante digestión anaerobia y tratamiento en medio ácido*, Tesis doctoral. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Yucatán. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/3396>
- Curt, M., Curt, G., Aguado, P., Fernández, J. (2010). Proposal for the Biological Control of *Egeria densa* in Small Reservoirs: A Spanish Case Study. *Journal of Aquatic Plant Management*. 48: 124-127. https://www.researchgate.net/publication/287758814_Proposal_for_the_biological_control_of_Egeria_densa_in_small_reservoirs_A_spanish_case_study
- Davies, E. (2023). The decrease in diurnal oxygen production in *Elodea* under the influence of high geomagnetic variability: the role of light, temperature and atmospheric pressure. *Int J Biometeorol* 67, 821–834. <https://doi.org/10.1007/s00484-023-02457-9>
- De Morais Sobral, D., De Menezes, C. M. B., De Araújo, G. P., Pedrosa, L. P., Junior, Roque, B. A. C., Santos, L. B. D., Benachour, M., & Santos, V. A. D. (2024). Ultrasonic control of aquatic macrophytes in reservoirs: An integrated review. *Research Society And Development*, 13(6), e2213645914. <https://doi.org/10.33448/rsd-v13i6.45914>
- Dutra, J. d., Fonseca Passos, M., Fernando da Silva, T., y Mockaitis, G. (2021). Pyrolysis and anaerobic digestion of the *Egeria densa* biomass in different pretreatment conditions for potential use as a substrate in the generation of bioproducts. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101772. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101772>
- Dutta, A. (2017). Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization Chapter 4. Fourier Transform Infrared. India: *Elsevier*, 73-93. ISBN: 978-0-323-46140-5
- Flores Mendoza, O. M. (2025). *Implementación de tecnologías de valorización en una biorrefinería de sargazo mediante simulación* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, División de Ciencias Naturales e Ingeniería,

Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Ciudad de México, México.
<http://ilitia.cua.uam.mx:8080/jspui/handle/123456789/1251>

Gallego, R., Bueno, M., y Herrero, M. (2019). Sub-and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plants, food-by-products, seaweeds and microalgae-An update. *Trends in Analytical Chemistry*, 198-213, 116; <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.030>

Gomes, N., de Araújo Costa, D., Martins, D., Rocha, S., Sousa-Pinto, I., y Antunes, C. (2023). Insights into the fauna associated with *Egeria densa* at the upper section of the international Minho River estuary (NW Iberian Peninsula) 3 decades after its establishment. *Journal of Coastal Conservation*, 27(37): <https://doi.org/10.1007/s11852-023-00962-y>

Gomez, L., Tiwari, B., Garcia-Vaquero, M. (2020). Emerging extraction techniques: Microwave-assisted extraction. *Sustainable Seaweed Technologies*, pp. 207-224. ISBN 978-0-12-817943c-7

Guerrero-Pérez, M. O., y Patience, G. S. (2019). Experimental methods in chemical engineering: Fourier transform infrared spectroscopy-FTIR. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98; 25-33; DOI: [10.1002/cjce.23664](https://doi.org/10.1002/cjce.23664)

Guo, X., Wang, Y., Qin, Y., Shen, P., y Peng, Q. (2020). Structures, properties and application of alginic acid: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162(1): 618-628. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2020.06.180](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.180).

Guo, Y. y Zhang, S. (2020). New extraction technology and characterization of sodium alginate. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 474 (052092) ISSN 1755-1315. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/474/5/052092>

Hanan Awad, Hassan Y. Aboul-Enein, A Validated HPLC Assay Method for the Determination of Sodium Alginate in Pharmaceutical Formulations (2013). *Journal of Chromatographic Science*, 51 (3), 208–214, <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms129>

Hardiningtyas, S. D., Aziz, F., Santoso, J., y Uji. (2020). Characterization of aquatic plant (*Egeria densa*) pre-treated by alkaline hydrogen peroxide. Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 404 (012028). Doi:[10.1088/1755-1315/404/1/012028](https://doi.org/10.1088/1755-1315/404/1/012028).

Hasnain, Md Saquib, Jameel E., Mohanta, B., Dhara, A.K., Alkahtani, S., Nayak, A. (2020). Alginates: sources, structure, and properties. *Alginates in Drug Delivery*., 1-17. ISBN 9780128176405.

Ho, T. C., Kim, M. H., Cho, Y. J., Park, J. S., Nam, S. Y., Chun, B. S. (2020). Gelatin-sodium alginate-based films *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. freeze-dried

powder obtained by supercritical water extraction. *Food Packaging and Shelf Life*, 24(1): 100469. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100469>

Hurtado, A., Aljabali, A. A., Mishra, V., Tambuwala, M. M., y Serrano-Aroca, Á. (2022). Alginate: Enhancement Strategies for Advanced Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9): 4486. <https://doi.org/10.3390/ijms23094486>

Jayasingue, G., Jinadasa, B., Sadaruwam, N. (2022). Pathway of sodium alginate synthesis from marine brown algae, *Sargassum wightii* from Sri Lanka. *Discover Food* 2(1), 2 DOI: [10.1007/s44187-021-00001-5](https://doi.org/10.1007/s44187-021-00001-5)

Kakita, H., Seki, S., Ishijima, H. y Yanaoka, N. Uronic acid and their oligomer microanalysis by normal-phase partition chromatography with fluorescence derivatization (2024). *J Appl Phycol* 36, 685–695. <https://doi.org/10.1007/s10811-023-03027-7>

Khachatryan, K., Khachatryan, G., y Ciesielski, W. (2022). Special Issue on Polysaccharides: From Extraction to Applications. *Applied sciences*, 12(23), 12461; <https://doi.org/10.3390/app122312461>

Lesellier, E. (2012). Efficiency in supercritical fluid chromatography with different superficially porous and fully porous particles ODS bonded phases. *Journal of Chromatography A*, 1228, 89-98. DOI: [10.1016/j.chroma.2011.11.058](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.058)

Li, J., Liu, L.-N., Meng, Q., Fan, H., & Sui, N. (2020). The roles of chloroplast membrane lipids in abiotic stress responses. *Plant Signaling & Behavior*, 15(11), 1807152. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1807152>

Liu, X., Zhao, W., Li, Y., Sun, Z., Lu, C., y Sun, L. (2024). Genome Analysis of a Polysaccharide-Degrading Bacterium *Microbulbifer* sp. HZ11 and Degradation of Alginate. *Marine drugs*, 22, 569. <https://doi.org/10.3390/md22120569>

López-Limón, J. L., Hernández-Cázares, A. S., Hidalgo-Contreras, J. V., Romero De la Vega, G., Mellado-Pumarino, R. A., Ríos-Corripio, M. A. (2024). Effect of supercritical CO₂ extraction as pretreatment to obtain C-phycoerythrin from spirulina (*Arthrospira maxima*). *The Journal of Supercritical Fluids*, 215, 106428. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2024.106428>

López-Hortas, L., Rodríguez, P., Díaz-Reinoso, B., Gaspar, M. C., de Sousa, H. C., Braga, M. E. M., & Domínguez, H. (2022). Supercritical fluid extraction as a suitable technology to recover bioactive compounds from flowers. *The Journal of Supercritical Fluids*, 188, 105652. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2022.105652>

McHugh, M. y Krukonis, V. (2013) Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice. Elsevier 2a Edición. pp. 100-110. ISBN: 0-7506-9244-8

Marthemyanov, V. I. y Tikhonenkov D. V. (2022) Assessment of the tolerance range of salinity for invasive waterweed *Elodea canadensis* Michaux by parameters of water-salt homeostasis. *Biological Invasions*, 24 (12). DOI:[10.1007/s10530-022-02885-5](https://doi.org/10.1007/s10530-022-02885-5)

Mohammed, A., Rivers, A., Stuckey, D. C., & Ward, K. (2020). Alginate extraction from *Sargassum* seaweed in the Caribbean region: Optimization using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 245, 116419. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116419>

Mehrhoff, L. J., (2014). Método de Evaluación Rápida de Invasividad (MERI) para especies exóticas en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. http://sivicoff.cnf.gob.mx/ContenidoPublico/MenuPrincipal/07Fichas%20tecnicas_OK/02Fichas%20tecnicas/Fichas%20t%C3%A9cnicas%20CONABIO_especies%20ex%C3%B3ticas/Fichas%20plantas%20invasoras/D_E/Egeria%20densa.pdf

Melo-Páez, A. C., Narvaéz-Flórez, S., Mosquera-Vivas, C., Calvo-Saad, M. (2021). Evaluation of the Biostability of *Elodea* (*Egeria densa*) and Orange Peel as Bioadsorbent Materials for Pb (II) and Cr (III) in Solution. *Food and Environmental Engineering*. 43 (1), 1-11. <https://doi.org/10.15446/ing.investig.95432>

Mello, Pedro Afonso Vasconcelos Paes, Cristiane Nunes da Silva, and Bernardo Dias Ribeiro. (2025). "Valorization of Residual Biomass from *Sargassum filipendula* for the Extraction of Phlorotannins and Pigments Using Eutectic Solvents" *Processes* 13, no. 5: 1345. <https://doi.org/10.3390/pr13051345>

Montes, L., Gisbert, M., Hinojosa, I., Sineiro, J., y Moreira, R. (2021). Impact of drying on the sodium alginate obtained after polyphenols ultrasound-assisted extraction from *Ascophyllum nodosum* seaweeds. *Carbohydrate Polymers* 272, 118455. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118455>.

Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments* (9th ed.). Wiley. ISBN: 9781119113478

Moore, E., Colbert, D. (2024). Ocean Plastics: Extraction, Characterization and Utilization of Macrialgae Biopolymers for Packaging Applications. *Sustainability*, 16, 7175. <https://doi.org/10.3390/su16167175>

Moreno-Rivas, Ibarra-Gutiérrez, M. J., Fernández Quiroz, D., Lucero Acuña, A., Burgara Estrella, A., Zavala Rivera, P. (2024). pH-Responsibe Alginate/Chitosan Gel Films: An Alternative for Removing Cadmium and Lead from Water. *Gels*, 10, 669. <https://doi.org/10.3390/gels10100669>

Nam, H.-B., Lee, K. H., Yoo, H. Y., Park, C., Lim, J. M., Lee, J. H. (2024). Rapid and High-Yield Recovery of Sodium Alginate from *Undaria pinnatifida* via Microwave-Assisted Extraction. *Processes*, 12, 208. <https://doi.org/10.3390/pr12010208>

Naranjo-Guamaní, D.R. (2019). *Obtención de Alginatode sodio a partir de algas de agua dulce de la familia Zynemataceae, mediante reacciones de intercambio iónico para ser utilizado como gelificante*, Tesis de Ingeniero Químico Industrial, Universidad Internacional SEK, Quito. <https://repositorio.uisek.edu.ec/handle/12345>

Nesic, A., De Bonis, M. V., Dal Poggetto, G., Ruocco, G., Santagata, G. (2023). Microwave Assited Extraction of Raw Alginate as a Sustainable and Cost-Effective Method to Treat Beach-Accumulated Sargassum Algae. *Polymers*, 15, 2979. <https://doi.org/10.3390/polym15142979>

NMX-AA-003-1980, Secretaria de Comercio (1980). Aguas residuales-Muestreo. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166762/NMX-AA-003-1980.pdf>

NMX-AA-007-SCFI-2000, Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (2000). Análisis de agua-Determinación de la Temperatura en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/NMX-AA-007-SCFI-2000.pdf>

NMX-AA-072-SCFI-2001, Secretaría de Economía (2001). Análisis de agua-Determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166788/NMX-AA-072-SCFI-2001.pdf>

NOM-127-SSA1-2021, Diario Oficial de la Federación (2022). Agua para uso y consumo humano, Límites permisibles de la calidad de agua. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5650705&fecha=02/05/2022#gsc.tab=0

Okolie, C. L., Mason, B., Mohan, A., Pitts, N., Udenigwe, C. C. (2020). Extraction technology impacts on the structure-function relationship between sodium alginate extracts and their in vitro prebiotic activity. *Food Bioscience*, 37, 100672. DOI: [10.1016/j.fbio.2020.100672](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100672)

Pereira, L. (2021). Macroalgae. *Encyclopedia*, 177-188. <https://doi.org/10.3390/enciclopedia1010017>

Piras, C. C., & Smith, D. K. (2020). Multicomponent polysaccharide alginate-based bioinks. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(36), 8171-8188. DOI: [10.1039/D0TB01005G](https://doi.org/10.1039/D0TB01005G)

Rahman, M., Shahid, A., Hossain, T., Sheikh, S., Rahman, S., Uddin, N., Rahim, A., Khan, R., Hossain, I. (2024). Sources, extractions, and applications of alginate: a review. *Discovery Applied Sciences*, 6(8) 443. DOI: [10.1007/s42452-024-06151-2](https://doi.org/10.1007/s42452-024-06151-2)

Rimac, A., Stanković, I., Alegro, A., Gottstein, S., Koletić, N., Vuković, N., . . . Žižić-Nakić, A. (2018). The Brazilian elodea (*Egeria densa* Planch.) invasion reaches Southeast Europe. *International Journal of Field Research on Biological Invasions*, 7(4): 381-389. <https://doi.org/10.3391/bir.2018.7.4.05>.

Rutkowska, M., Namieśnik, J., Konieczka, P. (2017). Chapter 10-Ultrasound-Assisted Extraction. *The Applications of Green Solvents in Separation Processes*, ISBN: 9780128054437. pp.301-324. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805297-6.00010-3>

Saji, S., Hebden, A., Goswami, P., y Du, C. (2022). A Brief Review on the Development of Alginate Extraction Process and Its Sustainability. *Sustainability*, 14, 5181. <https://doi.org/10.3390/su14095181>

Sanjaya, Y. A., Sampe Tola, P., y Rahmawati, R. (2022). Ultrasound-assited Extraction as a Potential Method to Enhanced Extraction of Bioactive Compound. *3rd International Conference Eco-Innovation in Science, Engineering, and Technology*, 191-198. <http://dx.doi.org/10.11594/nstp.2022.2729>

Sancho, J. L., Ovejero Escudero, G. (2003). Procesos con Fluidos Supercríticos. *Real Sociedad España de Química*, 4, 15-23. ISSN 1575-3417.

Santana, I., Felix, M., & Bengoechea, C. (2024). Seaweed as Basis of Eco-Sustainable Plastic Materials: Focus on Alginate. *Polymers*, 16(12), 1662. <https://doi.org/10.3390/polym16121662>

Santos, D. T., Santana, Á. L., Meireles, M. A., Petenate, A. J., Silva Keven, E., Albarelli, J. Q., . . . Hatami, T. (2019). Supercritical Antisolvent Precipitation Process. Fundamentals, Applications and Perspectives. Suiza: Springer. pp. 51-55. ISBN 978-3-030-26998-2

Słota, P., Harasym, J., & Jacukowicz-Sobala, I. (2025). Supercritical Fluid Extraction—A Sustainable and Selective Alternative for Tannin Recovery from Biomass Resources. *Applied Sciences*, 15(11), 5914. <https://doi.org/10.3390/app15115914>

Smart, J.N., Schmid, M., Paine, E.R. Britton, D., Revill, A., Hurd, C.L. (2022) Seasonal ammonium uptake kinetics of four brown macroalgae: Implications for use in integrated multi-trophic aquaculture. *J Appl Phycol* 34, 1693–1708. <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02743-w>

Souza, D.E.S.; Melo, J.J.C.d.; Santos, F.F.d.; Vasconcelos, A.L.d.S.; Jesus, A.d.S.d.; Freitas, L.d.S.; Souza, R.L.d.; Soares, C.M.F. (2024) Microwave-Assisted vs. Conventional Extraction of Moringa oleifera Seed Oil: Process Optimization and Efficiency Comparison. *Foods*, 13, 3141. <https://doi.org/10.3390/foods13193141>

Szopa, D., Pstrowska, K., y Witek-Krowiak, A. (2025). Chitosan-Coated Alginate Matrices with Protein-Based Biostimulants: A Controlled-Release System for Sustainable Agriculture. *Materials*, 18(3), 591. <https://doi.org/10.3390/ma18030591>

Thiébaud, G. (2023). Impact of Mechanical Removal on the Regeneration and Colonization Abilities of the Alien Aquatic Macrophyte *Egeria densa*. *Life*, 13(10), 2004. <https://doi.org/10.3390/life13102004>

Torabi, P., Hamdami, N., y Keramat, J. (2021). Microwave-assisted extraction of sodium alginate from brown macroalgae *Nizimuddiniana zanardini*, optimization and physicochemical properties. *Separation Science and Technology*, 57(6), 872-885. <https://doi.org/10.1080/01496395.2021.1954020>

Ummat, V., Sivagnanam, S. P., Rajauria, G., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2021). Advances in pre-treatment techniques and green extraction technologies for bioactives from seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 90–106. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.018>

Wang Y, Chen X, Liu J, Hong Y, He Q, Yu D, Liu C and Dingshanbayi H (2019) Greater Performance of Exotic *Elodea nuttallii* in Response to Water Level May Make It a Better Invader Than Exotic *Egeria densa* During Winter and Spring. *Front. Plant Sci.* 10:144. doi: 10.3389/fpls.2019.00144

Xue, S., Li, C., y Xiong, Z. (2024). Preparation of Complex Polysaccharide Gels with *Zanthoxylum bungeanum* Essential Oil and Their Application in Fish Preservation. *Gels*, 10, 533. <https://doi.org/10.3390/gels10080533>

Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Aswathnarayana Gokare, R., & Ambati, R. R. (2021). Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells*, 10(2), 393. <https://doi.org/10.3390/cells10020393>

Yang, W., Liu, X., Hu, W., Xin, Y., Hu, W., Yang, W., & Liu, S. (2025). Role of submerged macrophytes in restoring eutrophic lakes. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 10(5), 172–181. <https://doi.org/10.22161/ijeab.105.18>

Yao, T., Ma, M., & Sui, Z. (2023). Structure and Function of Polysaccharides and Oligosaccharides in Foods. *Foods*, 12(20), 3878; <https://doi.org/10.3390/foods12203872>

Ye, S., Xie, C., Agar, O. T., Barrow, C. J., Dunshea, F. R., y Suleria, H. A. (2024). Alginates from Brown Seaweeds as a Promising Natural Source: A Review of Its Properties and Health Benefits. *Food Reviews International*, 40(9), 2682-2710. <https://doi.org/10.1080/87559129.2023.2279583>

Yousefi, M., Rahimi-Nasrabadi, M., Mirsadeghi, S., & Pourmortazavi, S. M. (2021). Supercritical Fluid Extraction of Pesticides and Insecticides from Food Samples and Plant Materials. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 51(5), 482–501. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1743965>

Zhang, H., Yu, R., Xia, Y., Liu, J., Tu, R., Shi, J., & Dai, H. (2024). Effect of magnesium and calcium ions on the strength and biofunctionality of GelMA/SAMA composite hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B*, 12(41), 10692–10704. <https://doi.org/10.1039/D4TB00666F>

Zehnsdorf, A., Hussner, A., Eismann, F., Röncke, H. (2015). Management options of invasive *Elodea nuttallii* and *Elodea canadensis*. *Limnologica*, 51, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2014.12.010>

Zhi, Y., Wang, W., Li, W., Cao, Y., & Xia, M. (2024). Increased Nutrient Levels Induce Different Allocation Strategies Between Canopy-Forming and Rosette-Like Submerged Macrophytes. *Water*, 16(22), 3196. <https://doi.org/10.3390/w16223196>