



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

“DESARROLLO DE UN PROCESO DE  
DESLIGNIFICACIÓN DE *Sargassum* spp. PARA LA  
OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CON POTENCIAL  
EN LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES”

Tesis que presenta

I.A. KARLA JARED AZCORRA MAY

En opción al título de

MAESTRA EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, México  
2021



### **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_

Karla Jared Azcorra May

Mérida, Yucatán, México, a 10 de Noviembre de 2021

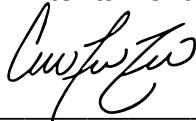
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.  
POSGRADO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Karla Jared Azcorra May titulado **DESARROLLO DE UN PROCESO DE DESLIGNIFICACIÓN DE *Sargassum* spp. PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CON POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES**, fue realizado en la Unidad de Energía Renovable, Bioenergía, ERU 19 y 20 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Raúl Tapia Tussell y Dra. Sara Elena Solís Pereíra, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias en Energía Renovable de este Centro.

Atentamente



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 10 de Noviembre de 2021

## **Agradecimientos**

Al CONACYT por la beca de maestría 753155 otorgada para la realización de este proyecto.

A la SEMAR en conjunto con CONACYT por los fondos de los proyectos No. 305292 y 253986 utilizados para el desarrollo experimental de la investigación.

Al CICY y a la Unidad de Energía Renovable, en especial a los laboratorios ERU 19 y 20, por el espacio para llevar a cabo la parte experimental de este trabajo.

A mi director de tesis, el Dr. Raúl Tapía Tussell, por sus consejos, apoyo y acompañamiento en cada paso de esta investigación, por su paciencia, tiempo.

A mi codirectora, la Dra. Sara Elena Solís Pereira, por ayuda en el planteamiento de objetivos de la investigación, así como por los comentarios y observaciones realizados.

A la Dra. Liliana Alzate Gaviria por sus comentarios y apoyo durante todo el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Elizabeth Ortíz Vázquez, por su apoyo en la revisión de la tesis y sus comentarios para la mejora del trabajo.

A la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, por su apoyo en la revisión de la tesis y comentarios para mejorar la redacción.

A la Dra. Elda Isaura España Gamboa, por sus observaciones y comentarios al momento de revisar la tesis.

Al Dr. Edgar Olguin Maciel por su ayuda en todo momento, apoyándome en la búsqueda bibliográfica, discusión de resultados, apoyo en la redacción y en el desarrollo experimental.

Al Dr. Felipe Barahona Pérez, por su tiempo y disponibilidad para ayudarme en la escritura, discusión de resultados y enseñanzas en técnicas cromatográficas.

Al M.C. Jorge Domínguez, por su ayuda en el desarrollo de la tesis, desde el análisis de datos, estadístico, redacción y discusión de resultados, así como su apoyo en la realización de los análisis FTIR.

A la I.Q.I Tanit Toledano Thompson por su tiempo y enseñanza en el uso de diversos equipos de laboratorio, en especial por la ayuda brindada para el uso del cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC).

Al M.C. Martin Baas López, por la disponibilidad y acceso a diversos equipos bajo su supervisión, así como por el procesado de muestras para análisis elemental.

A la MC. Rubi Chablé por su ayuda en el laboratorio, en el análisis y procesamiento de datos, discusión de resultados y consejos personales y académicos.

A la Lic. Julia González Montilla, por su accesibilidad y apoyo administrativo durante mi estancia en la institución.

A la Ing. Ileana Beatriz Ake Cituk, por su ayuda y orientación durante los procesos durante el posgrado.

A mis compañeros de laboratorio y de generación por los momentos agradables dentro y fuera de la institución. Eros gracias por hacer más ameno el tiempo dentro y fuera del laboratorio, por siempre estar, escucharme y darme ánimos. Rafa gracias por tu amistad y ayuda en todo momento, no te debo una, te debo miles. Así como a todas las personas que me ofrecieron su amistad durante esta etapa, espero conservarla mucho tiempo.

A mi familia que el pilar más importante en mi vida, por siempre apoyarme en mis decisiones e impulsarme a seguir adelante en cada paso, en especial a mi mamá este logro es tan tuyo como mío, sin ti nada de esto hubiera sido posible.

## Índice

<b>Listado de tablas</b> .....	<b>iv</b>
<b>Listado de figuras</b> .....	<b>v</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>viii</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>3</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
1.1. El sargazo en el Caribe mexicano .....	3
1.2. El nuevo mar de los sargazos .....	4
1.3. Composición de las macroalgas.....	9
1.3.1. Alginatos.....	9
1.3.2. Celulosa.....	10
1.3.3. Hemicelulosa .....	11
1.3.4. Lignina .....	12
1.4. Valorización del sargazo .....	16
1.4.1. Alginato de sodio .....	17
1.4.2. Bioabsorción .....	18
1.4.3. Biocombustibles.....	18
1.5. Deslignificación .....	25
1.5.1. Procesos químicos.....	26
1.5.2. Procesos biológicos .....	27
<b>Justificación</b> .....	<b>32</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>33</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>33</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>33</b>
<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>33</b>

<b>Capítulo 2.....</b>	<b>34</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>34</b>
2.1. Estrategia experimental.....	34
2.2. Colecta y acondicionamiento de la materia prima.....	35
2.3. Caracterización de la materia prima .....	36
2.3.1. Contenido de humedad y cenizas .....	36
2.3.2. Contenido de fenoles totales.....	37
2.3.3. Análisis de elementos orgánicos (CHNS).....	38
2.3.4. Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	38
2.3.5. Cuantificación de lignina y carbohidratos .....	38
2.4. Identificación de compuestos fenólicos en la lignina.....	39
2.4.1. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM) .....	41
2.4.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	42
2.5. Deslignificación del sargazo .....	43
2.5.1. Tratamiento con hidróxido de sodio .....	43
2.5.2. Oxidación con peróxido de hidrógeno .....	44
2.5.3. Hidrólisis enzimática .....	44
2.6. Extracción de alginato .....	45
2.6.1. Trazabilidad de metales .....	46
2.7. Análisis estadístico.....	46
<b>Capítulo 3.....</b>	<b>47</b>
<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>47</b>
3.1. Caracterización de la biomasa .....	47
3.2. Identificación de fenoles en la lignina .....	50
3.2.1. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.....	52
3.2.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	53
3.3. Deslignificación .....	55

3.4. Rendimiento de alginato.....	57
3.4.1. Trazabilidad de metales.....	58
<b>Conclusiones.....</b>	<b>62</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>63</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>64</b>



## Listado de tablas

<b>Tabla 1.1.</b> Rendimientos de alginatos en especies de <i>Sargassum</i> .....	10
<b>Tabla 1.2.</b> Composición de las algas pardas .....	12
<b>Tabla 1.3.</b> Contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa en especies <i>Sargassum</i> .....	16
<b>Tabla 1.4.</b> Rendimientos de bioetanol a partir de <i>Sargassum</i> .....	22
<b>Tabla 3.1.</b> Caracterización del <i>Sargassum</i> spp., en base seca. FT= Fenoles Totales.....	48
<b>Tabla 3.2.</b> Compuestos encontrados mediante Cromatografía de Gases-Masas (T.R.= Tiempo de Retención).....	53
<b>Tabla 3.3.</b> Compuestos fenólicos encontrados en las muestras de lignina por HPLC (*En base seca) .....	55
<b>Tabla 3.4.</b> Trazabilidad de metales durante el proceso de extracción de alginato .....	59
<b>Tabla 3.5.</b> Caracterización de la biomasa residual. *En base seca .....	60

## Listado de figuras

<b>Figura 1.1.</b> Especies de sargazo encontradas en el Caribe mexicano durante los eventos de 2018-2019 [15] .....	4
<b>Figura 1.2.</b> El mar del sargazo y el nuevo mar de los sargazos [19] .....	5
<b>Figura 1.3.</b> Cobertura de sargazo en km <sup>2</sup> en el océano Atlántico a lo largo de los años [8] .....	6
<b>Figura 1.4.</b> Presencia de sargazo en el mes de julio a partir del 2011 [8] .....	7
<b>Figura 1.5.</b> Promedios mensuales de la densidad de sargazo registrada de 2010 a 2018 [20] ...	8
<b>Figura 1.6.</b> Estructura química de la celulosa [36] .....	11
<b>Figura 1.7.</b> Estructura molecular de la hemicelulosa [36] .....	11
<b>Figura 1.8.</b> Monolignoles principales asociados a la biosíntesis de la lignina. a) alcohol <i>p</i> -coumárico, b) alcohol coniferílico, c) alcohol sinapílico [39] .....	13
<b>Figura 1.9.</b> Biosíntesis de la lignina [40] .....	14
<b>Figura 1.10.</b> Diagrama del proceso de extracción de alginato [26] .....	17
<b>Figura 1.11.</b> Métodos más usados para la extracción de energía en las macroalgas .....	20
<b>Figura 1.12.</b> Proceso para la producción de bioetanol lignocelulósico [72] .....	21
<b>Figura 1.13.</b> Producción de biogás a partir de algas [24] .....	24
<b>Figura 1.14.</b> Estructura de las principales enzimas involucradas en la designificación. a) Lacasa obtenida de <i>Trametes versicolor</i> , b) Lignina peroxidasa obtenida de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , c) Manganeso peroxidasa obtenida de <i>P. chrysosporium</i> [39] .....	28
<b>Figura 1.15.</b> Oxidación del ABTS en presencia de la lacasa [91] .....	30
<b>Figura 2.1.</b> Diagrama de flujo de la estrategia experimental .....	34
<b>Figura 2.2.</b> Costas del Caribe mexicano [11] .....	35
<b>Figura 2.3.</b> Lavado del sargazo y molino Pagani Serie 25 .....	36
<b>Figura 2.4.</b> Rampa de calentamiento .....	37
<b>Figura 2.5.</b> Reactor hidrotérmico .....	40
<b>Figura 2.6.</b> Extracción con cloroformo y rotoevaporador IKA RV10 .....	40
<b>Figura 2.7.</b> Columna utilizada para filtrar las muestras .....	41
<b>Figura 2.8.</b> Cromatógrafo de gases Agilent 7890B GC acoplado a un espectro de masas Agilent 5977B GC/MSD .....	42
<b>Figura 2.9.</b> Cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC con columna Zorbax Eclipse C18 ...	43
<b>Figura 3.1.</b> Contenido de carbohidratos en el <i>Sargassum</i> spp. ....	49
<b>Figura 3.2.</b> Espectro FTIR del <i>Sargassum</i> spp .....	50

**Figura 3.3.** FTIR del control de lignina (SC-489763) comparada con la lignina obtenida del *Sargassum* spp y de la biomasa residual .....51

**Figura 3.4.** Cromatograma obtenido por CG-EM de la lignina del *Sargassum* ..... 52

**Figura 3.5.** Cromatogramas obtenidos por HPLC a) Mezcla de estándares b) Muestra de lignina de *Sargassum*. \*1= Estándar de ácido gálico, 2= Estándar de ácido vainíllinico, 3= Estándar de ácido *p*-coumárico, 4= Estándar de siringaldehído .....54

**Figura 3.6.** Variación en el contenido de lignina y carbohidratos durante los tratamientos. T.1= Tratamiento con NaOH al 1%, T.2= Tratamiento con NaOH al 3%, T.3= Tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2.5%, T.4= Tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3.5%, T.5= Tratamiento con extracto enzimático (EE), T.6= Tratamiento con Lacasa Reactiva (LR), T.7= Tratamiento con EE+mediador, T.8= Tratamiento con LR+mediador.....56

**Figura 3.7.** a) Biomasa residual generada en la extracción de alginato b) *Sargassum* spp c) Alginato de sodio obtenido del *Sargassum*.....58

**Figura 3.8.** Contenido de carbohidratos en la biomasa residual, después de la extracción de alginato .....61

## Resumen

Las arribaciones masivas de sargazo pelágico a las costas del Caribe mexicano, se han convertido en un problema ecológico y socio-económico que requiere atenderse de forma integral. En este estudio, se realizó una caracterización exhaustiva del *Sargassum* spp. y se evaluaron diferentes pretratamientos químicos y enzimáticos, para obtener compuestos de alto valor agregado, bajo un esquema de cero residuos. Uno de los compuestos identificados en el sargazo fue el ácido *p*-coumárico, con una concentración de 3.14 mg/g de sargazo, este compuesto es el precursor de los monolignoles en la síntesis de la lignina. Sobre los procesos de deslignificación, el mejor tratamiento fue el de peróxido de hidrógeno al 2.5%, logrando una remoción de más del 50% de lignina presente en la biomasa inicial, mientras que los tratamientos enzimáticos, no lograron porcentajes altos de remoción de lignina, pero incrementaron su relación de carbohidratos en base seca. En cuanto a la búsqueda de compuestos con valor agregado, se evaluó un proceso de extracción de alginato, el cual logró la disminución en la concentración de cinco metales por debajo del límite de detección, así como la reducción en la concentración del Zinc y Aluminio en un 95 y 75%, respectivamente. La biomasa residual de este proceso, contiene una relación C:N de 20.35 que la hace viable para la obtención de biogás. De esta manera, bajo este esquema de cero residuos, se pueden obtener varios productos con valor agregado a partir del *Sargassum* spp, lo que permitiría convertir a esta biomasa en una materia prima de interés y no una problemática ambiental y socioeconómica.

## Abstract

Massive arrivals of Sargasso on the Mexican Caribbean has been become an ecological and socioeconomic problem that needs to be addressed in an integral way. In this study, an exhaustive characterization of *Sargassum* spp., was carried out and different enzymatic and chemical treatments were evaluated to obtained value added compounds under a zero waste scheme. One of the compounds identified on Sargasso was *p*-coumaric acid on a concentration of 3.14 mg/g of Sargasso, this is a precursor of monolignols on lignin biosynthesis. About delignification treatments, the best treatment was peroxide of hydrogen at 2.5%, achieving 50% of lignin remotion compared with the initial biomass, meanwhile, enzymatic treatmeant did not accomplish high lignin remotion, but obtained an increment in the carbohydrates rate. In order to get value added compounds, an alginate extraction process was evaluated and reached the reduction in concentration of five metal under their detection limit and the decreased of the 95 and 75% of zinc and aluminum, respectively. The residual biomass of the process has a carbon-nitrogen ratio of 20.35, which makes it viable to use on biogas production. In this way, under the zero waste scheme, it is possible to obtained several value added compounds from *Sargassum* spp., that may allow to turn this biomass into a feedstock of interest instead of a socioeconomic and environmental issue.

## Introducción

La proliferación de sargazo que se ha presentado en el Caribe en los últimos años, representa un reto importante por las afectaciones ambientales, sociales y económicas que conlleva. Las arribazones masivas de sargazo comenzaron a presentarse a partir del 2011, hasta ese momento se desconocían las causas que originaron el fenómeno y si éste sería permanente. La tendencia sugiere que este fenómeno continuará e incluso podría ir en aumento [1].

Las arribazones representan un problema ecológico y socioeconómico en la región [2]; la acumulación de esta biomasa en las playas y su posterior descomposición afecta los ecosistemas costeros, la industria turística y representa un riesgo para la salud humana [3].

A pesar de que el sargazo sirve como hábitat para numerosas especies, las cantidades extraordinarias representan un factor de estrés en los ecosistemas marinos [4] ya que los grandes volúmenes presentes en el mar impiden el paso de la luz solar, reduciendo los niveles de oxígeno disuelto y pH; también se han observado mayores concentraciones de nitrógeno y fósforo debido a la presencia de esta macroalga, lo que puede originar la eutrofización del agua [5].

Durante 2018, se registró la mortalidad masiva de numerosas especies de fauna, que se atribuyó a la descomposición del sargazo en las playas [6] por la generación de amonio y sulfuro de hidrógeno; además de las afectaciones a peces y crustáceos, se originan malos olores y una coloración marrón en el mar, si estos eventos continúan, la calidad del agua en la región y los arrecifes cercanos podrían tener daños irreversibles. Así mismo, el sulfuro de hidrógeno es tóxico y puede ocasionar problemas de salud pública.

La región del Caribe posee múltiples sitios de anidación de tortugas marinas, a pesar de que el sargazo que se encuentra mar adentro beneficia el desarrollo de tortugas jóvenes al proveerles un medio de transporte y alimentación, las grandes cantidades que se acumulan en la arena pueden representar una amenaza, ya que actúa como una barrera impidiendo el paso de las tortugas al mar, en algunas regiones del Caribe se han reportado disminución en la anidación [7].

Las algas que arriban a las costas de México provienen del nuevo mar de los sargazos, que en 2018 contaba con veinte millones de toneladas de biomasa [8]. México no cuenta con la

infraestructura necesaria para recolectar y disponer de manera adecuada esas cantidades de sargazo [1].

Las acciones para mitigar este problema tienen una visión a corto plazo y están enfocadas a la recolección en las playas, sobre todo en las de mayor importancia turística; para la recolección en tierra se ha optado por el uso de maquinaria, estas causan la compactación de la arena, también pueden ser responsables de la destrucción de nidos de tortugas y provocar la erosión de las playas.

Hasta el momento, no existen sitios en el estado capaces de recibir todo el sargazo que arriba; en un inicio se optó por enterrar o disponer el sargazo en manglares, camellones, tiraderos clandestinos, zonas con menos importancia turística y en menor medida en rellenos sanitarios; esto puede causar afectaciones al manto freático por los lixiviados generados.

Es necesario transformar la problemática del sargazo en oportunidades de aprovechamiento de este recurso. Se han explorado alternativas para valorizar el material, desde la elaboración de libretas, zapatos, fertilizantes, forrajes, la extracción de alginatos y fucoidanes, hasta la producción de biocombustibles, su uso en la industria alimentaria y como fertilizante se ve limitado por la presencia de metales pesados [9].

Los carbohidratos presentes en el sargazo se pueden utilizar para la obtención de biocombustibles, contribuyendo a disminuir el uso de combustibles fósiles y a diversificar la matriz energética de la región. Así como para la producción de alginatos, este proceso ha sido ampliamente estudiado en algas pardas, sin embargo, la presencia de metales en el sargazo podría limitar su uso.

Este trabajo busca explorar alternativas para el aprovechamiento integral de esta macroalga, poniendo en marcha procesos con cero generación de residuos, que permitan la obtención de biocombustibles y productos con valor agregado, logrando así reducir los impactos negativos asociados a las arribaciones de sargazo y al uso de combustibles fósiles.

# Capítulo 1

## Antecedentes

### 1.1. El sargazo en el Caribe mexicano

Las macroalgas son organismos eucariontes, se pueden dividir en tres grupos taxonómicos de acuerdo a la composición de sus pigmentos fotosintéticos, algas verdes *Chlorophyta*, rojas *Rhodophyta* y cafés *Phaeophyta* [10]. El sargazo presente en el Caribe mexicano se conforma por grupos de algas marinas pardas (*Phaeophyta*), con subgrupo pelágico, estas algas flotan libremente en el océano [2].

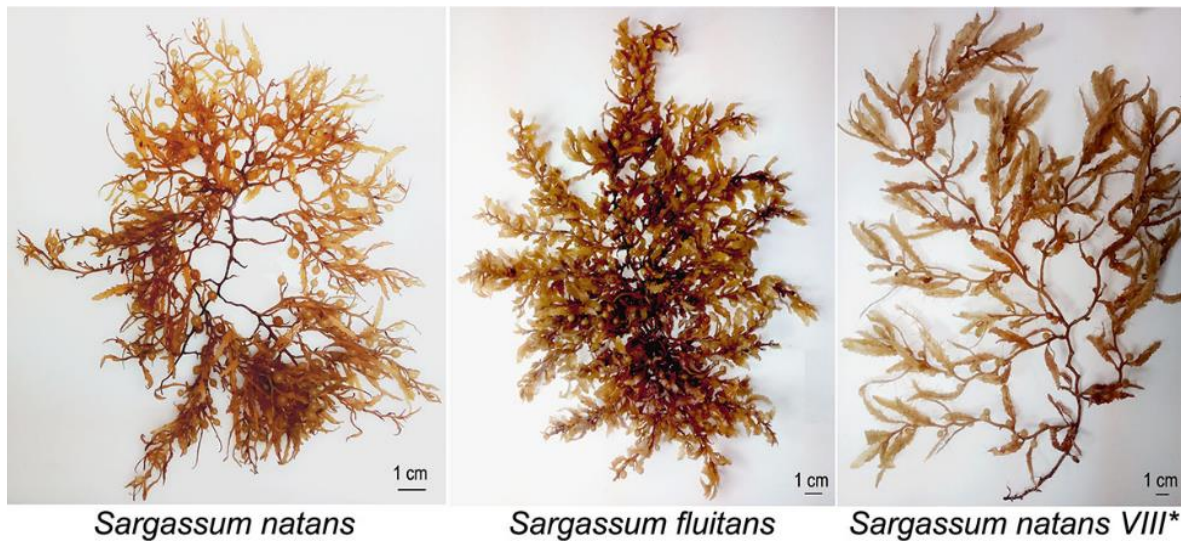
Las algas pertenecientes a la división *Phaeophyta* se caracterizan por su color café pálido-amarillento, su diámetro es de 20-80 cm, poseen un tallo ramificado con abundante follaje y filoides acerrados, además de numerosos nematocitos que funcionan como flotadores [4].

La reproducción del sargazo pelágico se realiza por fragmentación vegetativa, sus requerimientos nutricionales son mínimos, el crecimiento óptimo se lleva a cabo a temperaturas entre 24-30°C; en condiciones óptimas de crecimiento puede duplicar su masa en diez días [4].

Las arribazones que se han presentado en el estado de Quintana Roo son excepcionalmente ricas en términos de diversidad y abundancia; en punta Cancún y Puerto Morelos se encontraron las especies *Chlorophyta*, *Phaeophyta* y *Rhodophyta*, con tallas que van de 10 a más de 40 cm, el taxón más importante es del género *Sargassum* con más del 80% de peso seco por kilogramo recolectado [11].

En los eventos observados entre 2018 y 2019, se encontró que la biomasa que arribó está formada por componentes pelágicos, y estos varían en función de la localidad y la estacionalidad, en la figura 1.1 se presentan las especies más representativas y abundantes encontradas en esos eventos, las cuales son *Sargassum fluitans*, *S. natans* y un morfo tipo *S. natans VIII* [12].





**Figura 1.1.** Especies de sargazo encontradas en el Caribe mexicano durante los eventos de 2018-2019 [15]

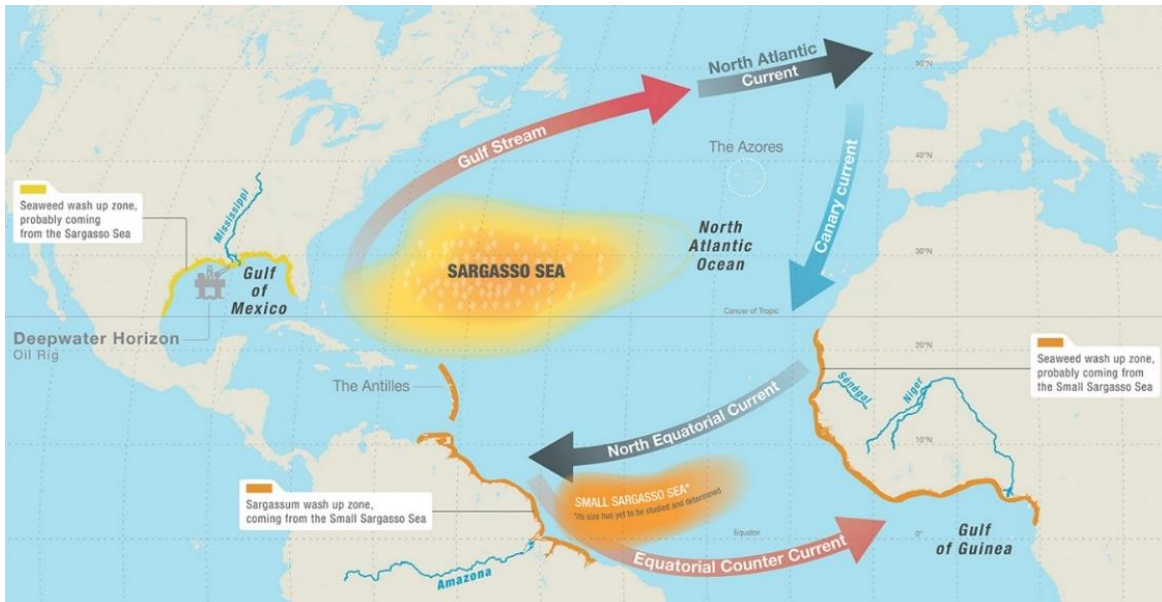
Las especies de *S. fluitans* y *S. natans* poseen aerocistos que favorecen su flotación y transporte por las corrientes marinas, la presencia de estas especies en el Atlántico se ha relacionado con el Mar de los Sargazos, región presente en el Atlántico norte con una extensión de 3 millones de kilómetros cuadrados y una biomasa aproximada entre 4 y 11 millones de toneladas flotantes [13].

## 1.2. El nuevo mar de los sargazos

Las especies del género *Sargassum* se asocian con el mar de los sargazos, delimitado por las corrientes oceánicas del Golfo de México, de regiones ecuatoriales y de las Canarias; esta extensa área, caracterizada por estar cubierta de esta especie marina flotante, fue descubierta en el siglo XVI por Cristóbal Colón. Este ecosistema es rico en diversidad marina, representa una zona de alimentación y refugio para muchas especies [8].

A partir del arribazón ocurrido en 2011, gracias a observaciones satelitales, se registraron cantidades importantes de sargazo en el océano Atlántico, esta nueva área fue denominada como en “el gran cinturón de sargazo del Atlántico” o “el nuevo mar de los sargazos”, en la figura 1.2 se observa la ubicación geográfica del mar de los sargazos y del nuevo mar de los sargazos [8].

La evidencia apunta a que el nuevo mar de los sargazos se originó en la costa de África occidental y se ha desplazado por corrientes marinas hacia América [8], su crecimiento probablemente se ha favorecido debido al exceso de nutrientes en las aguas del Amazonas y en las costas de Brasil [14], así como a aumentos en la temperatura en la superficie del océano [15].



**Figura 1.2.** El mar del sargazo y el nuevo mar de los sargazos [19]

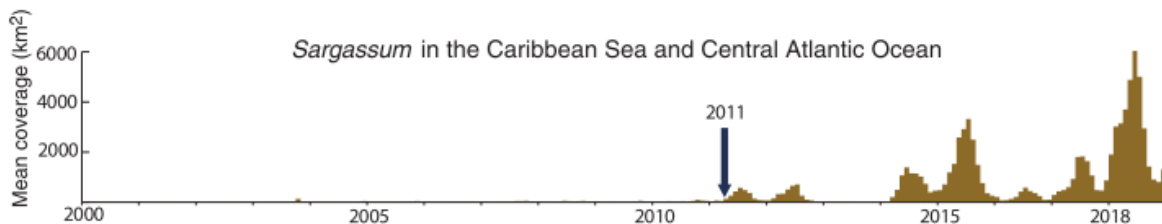
Diversos autores han intentado explicar qué fue lo que originó la presencia de sargazo en la región del nuevo mar de los sargazos, una teoría es que durante el invierno 2009-2010, inusuales y fuertes corrientes de viento desplazaron especies de *Sargassum* desde el mar de los sargazos hasta el extremo este del Atlántico norte, donde su crecimiento se vio favorecido por las grandes cantidades de nutrientes vertidos en la desembocadura del Amazonas, este incremento de nutrientes se puede deber a la actividad humana y a la pérdida de vegetación en la zona [16].

Aún no se ha llegado a un acuerdo sobre las causas de este fenómeno y por qué ha seguido siendo recurrente con el paso de los años, todo indica que el sargazo seguirá proliferando y causando afectaciones en el Caribe.

La costa del Caribe mexicano comprenden 865 km de playas, durante el evento de 2015, se recolectaron 71,353 m<sup>3</sup> de sargazo en cinco municipios; en promedio se removieron 318.9 m<sup>3</sup> de sargazo por kilómetro de playa, se estima que durante el mes de septiembre se tuvieron valores de hasta 19,603 m<sup>3</sup> de sargazo por kilómetro de playa [3].

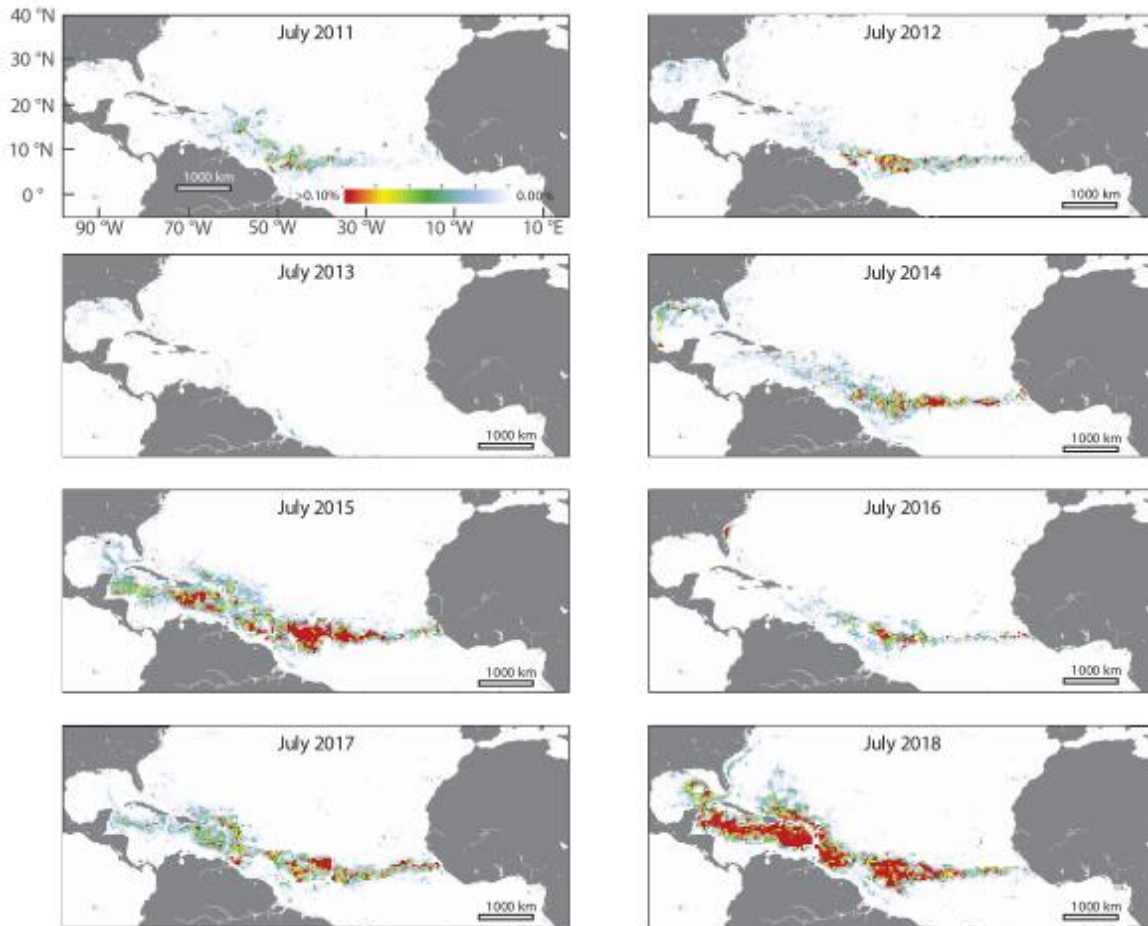
En la mayoría de las playas, el sargazo no fue recolectado por la falta de infraestructura, maquinaria y mano de obra, por lo tanto éste comenzó a descomponerse en la playa emitiendo olores fuertes por la formación de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), se ha demostrado que una exposición prolongada a este compuesto es nocivo para la salud [17]. Se han reportado dolores de cabeza, náuseas y problemas respiratorios en la población de la zona a causa de la inhalación de este compuesto [3].

En la figura 1.3, se observa el incremento en la cobertura de sargazo en el océano Atlántico a partir del año 2011, en el año 2018 el sargazo se extendió por más de 8,850 km, abarcando un área de 6,000 km<sup>2</sup> y alcanzando un peso mayor a veinte millones de toneladas de biomasa húmeda [8].



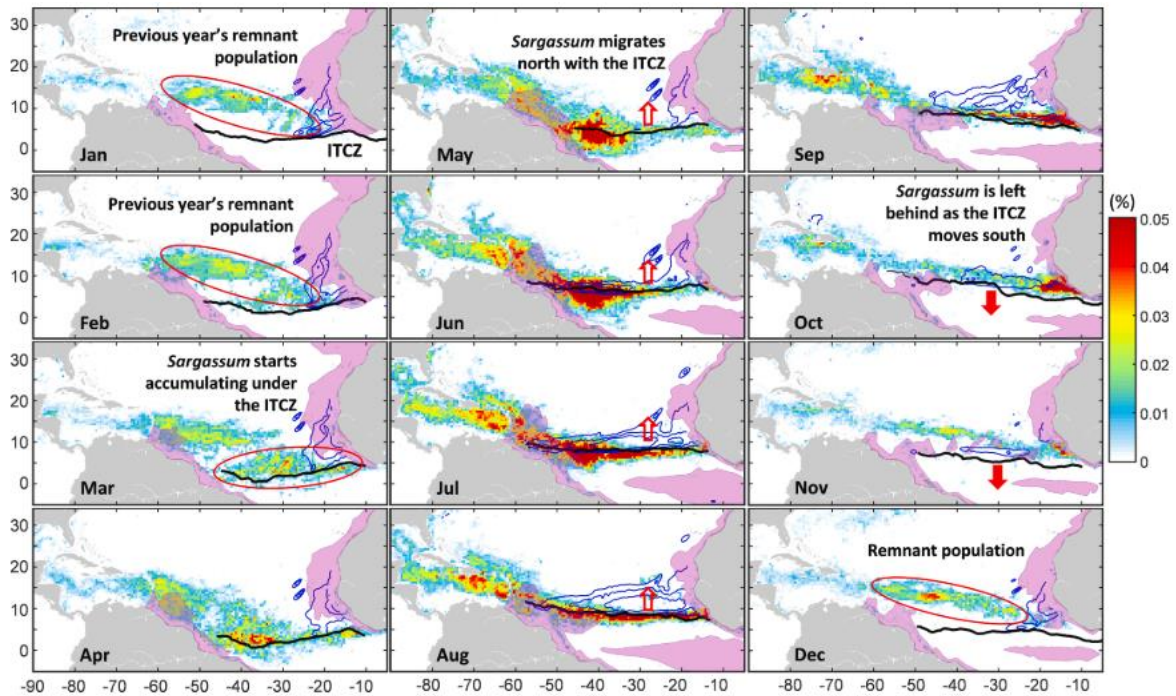
**Figura 1.3.** Cobertura de sargazo en km<sup>2</sup> en el océano Atlántico a lo largo de los años [8]

En los años posteriores al 2011, se observaron incrementos significativos en la densidad y en el volumen de sargazo presente en la región denominada el nuevo mar de los sargazos (figura 1.4). El único año donde no se presentó el fenómeno fue en 2013, sin embargo, en 2015 y 2018 se reportaron los mayores registros de densidad del alga hasta ese momento.



**Figura 1.4.** Presencia de sargazo en el mes de julio a partir del 2011 [8]

Johns *et al.* [16], realizaron un estudio sobre el comportamiento del sargazo en la última década y las repercusiones que podría traer, expusieron el comportamiento observado en la zona denominada el nuevo mar de los sargazos abarcando desde el 2010 hasta el 2018. Los promedios mensuales de densidad de sargazo se encuentran en la figura 1.5. La tendencia muestra que, durante los primeros meses del año, la biomasa presente en la región corresponde a la población remanente del evento del año anterior, durante el mes de marzo comienza la acumulación de nueva biomasa y la mayor densidad de sargazo generalmente se presenta en los meses de mayo hasta septiembre.



**Figura 1.5.** Promedios mensuales de la densidad de sargazo registrada de 2010 a 2018 [20]

Además de los impactos socioeconómicos del sargazo en el Caribe y los posibles impactos a la salud pública; su presencia se relaciona con afectaciones ecológicas; como la reducción de luz y oxígeno creando zonas de hipoxia en el mar, la acidificación del suelo por la producción de ácido sulfhídrico, daño a los corales, aumento en concentraciones de nitrógeno y fósforo favoreciendo la eutrofización, incremento en la concentración de materia orgánica particulada, pérdida de pastos marinos, afectaciones a la población de tortugas marinas, impacto a la fauna asociada al sargazo por la remoción en mar, erosión y pérdida de playas por la remoción en tierra, entre muchos otros.

Las playas del Caribe son ricas en términos de diversidad; la región del Caribe mexicano por sus características geomorfológicas e hidrológicas es especialmente vulnerable a la acumulación y mala disposición de este material.

### **1.3. Composición de las macroalgas**

La pared celular de las macroalgas generalmente se compone de alginatos, agar, carragenano, fucoídan, proteínas y celulosa; a partir de estos compuestos se pueden obtener productos con valor comercial [18].

Las algas marrones poseen entre un 30-50% de carbohidratos en peso seco, entre los cuales están presentes alginatos, laminarina, fucoídan, celulosa, hemicelulosa, glucosa, galactosa, ácido urónico, fucosa, manosa, xilosa y manitol [19].

Cuando las algas pardas están secas, los carbohidratos son el elemento dominante, representando entre el 40-60% del contenido de la célula; estos compuestos pueden ser utilizados para la producción de bioenergía [20].

#### **1.3.1. Alginatos**

Algunos compuestos extraídos de las algas tienen la propiedad de formar soluciones viscosas, a estos se les llama ficocoloides. Los principales ficocoloides de importancia comercial son el alginato, que se extrae de las algas pardas; el agar y la carragenina que se extraen de las algas rojas [21].

Los alginatos son polisacáridos encontrados en la matriz de la pared celular de algas pardas, se componen de moléculas de ácido  $\beta$ -(1→4)-D-manurónico (M) y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) en proporciones heterogéneas, unidos por enlaces glucosídicos, en la matriz celular se encuentra como una sal insoluble [22].

Los alginatos son los polisacáridos más abundantes en las algas, durante el verano se observa una mayor concentración de este compuesto, esto se puede explicar por el aumento en la temperatura del agua [20].

Las aplicaciones del alginato son muy variadas, se utiliza en la industria alimenticia como emulsionante, espesante y agente estabilizante; también es un componente en la fabricación de pastas dentales; puede funcionar como microencapsulador en las ciencias médicas; presenta propiedades prebióticas, algunas muestras de alginatos han presentado actividades anticancerígenas [23].

Las algas poseen alginatos en su estructura, una de las especies con mayores contenidos de alginatos es el *Sargassum natans* [24]. En la tabla 1.1 se presentan rendimientos obtenidos de alginato usando algas del género *Sargassum*.

**Tabla 1.1.** Rendimientos de alginatos en especies de *Sargassum*

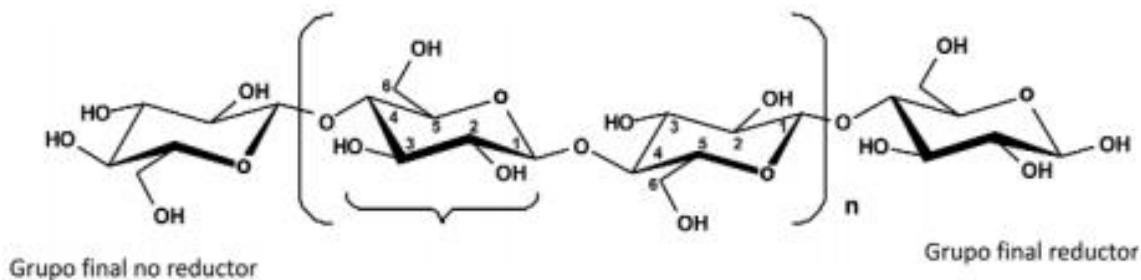
<b>Especie</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Rendimiento alginato (%)</b>	<b>Ref.</b>
<i>S. fluitans</i>	Cuba	24.5	[25]
<i>S. fluitans</i>	México	34.6	[25]
<i>Sargassum sp.</i>	Colombia	21.6	[25]
<i>Sargassum spp.</i>	Malasia	35	[26]

### 1.3.2. Celulosa

Es un polisacárido lineal de elevado peso molecular y un grado alto de polimerización, es el compuesto orgánico de mayor abundancia en la naturaleza, está formado de moléculas D-glucosa que se unen por medio de enlaces  $\beta$ -1,4 (figura 1.6); disposición que la hace estable, además de poseer enlaces de hidrógeno que une sus moléculas entre sí, confiriéndole sus conocidas propiedades como material estructural de la pared celular [27].

Las cadenas de celulosa son lineales y tienden a formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. Estas uniones con otras cadenas que están en el mismo plano, así como con cadenas en planos superiores e inferiores, dan lugar a la formación de microfibrillas. La unión de las microfibrillas da lugar a la formación de macrofibrillas, y la unión de éstas entre sí a la fibra de celulosa [28].

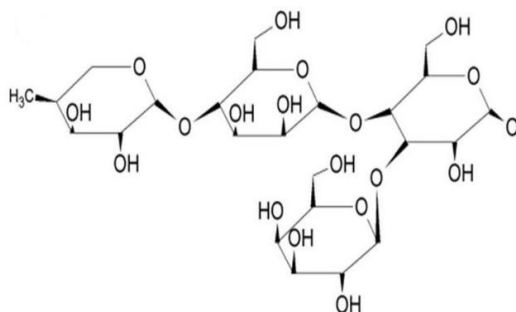
La celulosa se encuentra en mayor medida en forma cristalina, aunque una cantidad menor se encuentra desorganizada (amorfa); de esta manera es más susceptible a la degradación enzimática [29].



**Figura 1.6.** Estructura química de la celulosa [36]

### 1.3.3. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolímero compuesto por pentosas (D-xilosa y L- arabinosa), hexosas (D-glucosa, D-galactosa, L-galactosa, D-manosa, L- ramnosa y L-fucosa) y ácidos urónicos (ácido D-glucurónico y ácido D- galacturónico) [30] (figura 1.7).



**Figura 1.7.** Estructura molecular de la hemicelulosa [36]

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la pared celular vegetal después de la celulosa, comprenden alrededor del 30-35% del peso seco de pared celular de los vegetales. Los xiloglucanos y los galactomananos son algunos tipos de hemicelulosas, los cuales tienen una composición heterogénea de varios monómeros de azúcares.

Algunas hemicelulosas están asociadas a la porción celulósica, mientras que otras lo están a la lignina, actuando como matriz soporte para las microfibrillas de celulosa en la pared celular [31], son de menor masa molecular, más accesibles, más fácilmente degradables y más fáciles de



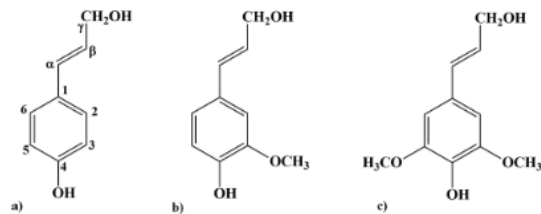
disolver que la celulosa. En la tabla 1.2 se presentan los contenidos de carbohidratos en las algas pardas.

**Tabla 1.2.** Composición de las algas pardas (ND: No determinado)

<b>Especie</b>	<b>% Humedad</b>	<b>% Ceniza</b>	<b>% Carbohidratos</b>	<b>Ref.</b>
<i>Sargassum sp.</i>	9.8 ± 1.1	21.2 ± 1.5	ND	[32]
<i>Sargassum spp.</i>	11.16±0.001	26.19±0.07	41.81	[33]
<i>S. angustifolium</i> (verano)	ND	35.5±0.6	ND	[34]
<i>S. angustifolium</i> (invierno)	ND	43.8±0.5	ND	[34]
Algas pardas	ND	ND	40-60	[35]
<i>Sargassum spp.</i>	11.16	26.19	41.48	[26]
Sargazo pelágico	81.98±0.89	46.94±1.31	11.68	[36]
<i>S. natans VIII</i>	86.45±0.10	34.26±0.59	21.76	[36]
<i>S. natans I</i>	87.41±0.23	35.71±1.27	18.97	[36]
<i>S. fluitans</i>	86.32±0.02	33.63±4.14	27.4	[36]

#### 1.3.4. Lignina

Es un polímero hidrofóbico compuesto de unidades fenilpropanoides también llamados monolignoles. Los monolignoles principales son los alcoholes *p*-coumárico, coniferílico y sinapílico (figura 1.8). Son precursores de las unidades de *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringilo (S) [37]. Contiene subunidades fenólicas y no fenólicas que representan del 10-30 y del 70-90% respectivamente [38].



**Figura 1.8.** Monolignoles principales asociados a la biosíntesis de la lignina. a) alcohol *p*-coumárico, b) alcohol coniferílico, c) alcohol sinapílico [39]

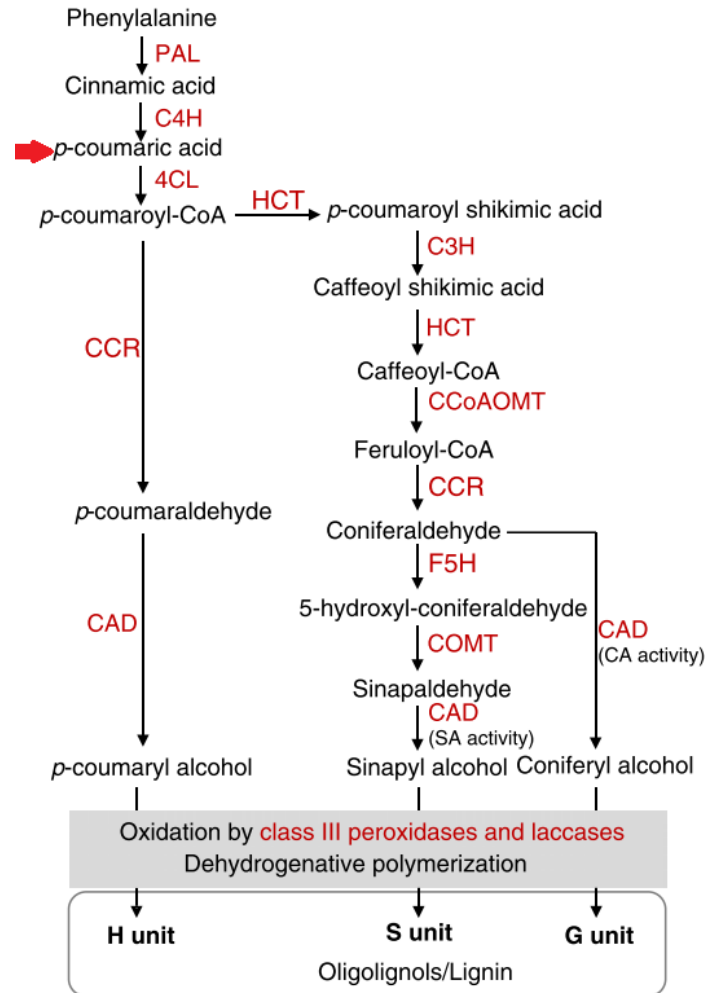
Los monolignoles se generan por medio de reacciones de desaminación, hidroxilación, reducción y metilación, en el citoplasma; se originan a partir de fenilalanina por medio de la ruta general de fenilpropanoide y la ruta específica de monolignoles [40], como se muestra en la figura 1.9.

La polimerización de la lignina ocurre por medio de reacciones acopladas de oxidación catalizadas por peroxidasas y lacasas. Las peroxidasas utilizan el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) para oxidar a los monolignoles, mientras que las lacasas usan oxígeno [41].

Su estructura forma redes basadas en unidades de *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringol (S), unidas por enlaces C-O y C-C [39]. El enlace más abundante en la estructura de la lignina es  $\beta$ -O-4, representando entre el 45-94% de los enlaces [38].

La lignina es producto de la condensación de varias moléculas, su estructura es altamente variable, dependiendo del tipo de planta, su estado fenológico y tasa fotosintética [42].

El problema de una definición precisa para la lignina se asocia con la naturaleza de sus múltiples unidades estructurales, las cuales no suelen repetirse de forma regular, dado que la composición y estructura de la lignina varían también de su origen y el método de extracción o aislamiento utilizado [43].



**Figura 1.9.** Biosíntesis de la lignina [40] (PAL: fenilalanina amoniocaliasa, C4H: cinamato 4-hidroxilasa, 4CL: 4-cumarato: CoA ligasa, HCT: *p*-hidroxicinamoil-CoA: quinato/ shikimato *p*-hidroxicinamoiltransferasa, CCR: cinamoil-CoA reductasa, CAD: alcohol cinamílico deshidrogenasa, C3H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa, CCoAOMT: cafeoil-CoA O-metiltransferasa, F5H: ferulato 5-hidroxilasa, COMT: ácido cafeico O-metiltransferasa)

La lignina es resistente a la hidrólisis ácida, fácilmente oxidable, soluble en bisulfito o soluciones alcalinas calientes, y fácilmente condensable con fenoles o tioles. En reacción con nitrobenzeno en una solución alcalina caliente produce principalmente vainillina, siringaldehído y *p*-hidroxibenzaldehído; en ebullición con una solución etanólica de ácido clorhídrico, forma una mezcla de cetonas aromáticas [43].

La presencia de lignina en la estructura de la pared celular generalmente se asocia a plantas terrestres, en algas se habla de compuestos fenólicos tipo lignina, estos compuestos cumplen el mismo rol que la lignina en las plantas vasculares, el cual es ofrecer soporte y protección [30].

Se ha reportado la presencia de lignina en la pared celular de las algas [44], al igual que materiales recalcitrantes como la lignina y compuestos polifenólicos en algas marinas [45].

La lignina se asocia a la biomasa terrestre; las macroalgas generalmente no contienen lignina [46], sin embargo, se ha encontrado la presencia de monolignoles asociados a la lignina en macroalgas recolectadas en Oaxaca, México [47]. Los compuestos fenólicos asociados a la lignina, se originan como un mecanismo de defensa en respuesta a condiciones de estrés [48].

Borines et al., [33] reportaron que el *Sargassum* puede ser usado para la generación de bioenergía, al ser una especie rica en carbohidratos y con bajos contenidos de lignina, a pesar de ello, existen otros trabajos que mencionan que algunas algas (sargazo pelágico) contienen cantidades apreciables de lignina.

Antúnez-Argüelles et al., encontraron la presencia de guaiacilo (G), *p*-hidroxifenilo (H) y alcohol sinapílico en la lignina de *Sargassum* sp. Atribuyeron el bajo rendimiento en la producción de biocombustibles a la presencia de estos compuestos [47].

En la tabla 1.3, se encuentran los contenidos de lignina y holocelulosa en especies de *Sargassum*, estos valores varían mucho dependiendo la zona y temporalidad del muestreo.

**Tabla 1.3.** Contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa en especies *Sargassum* (ND: Valor no determinado)

Especie	Ubicación	Celulosa %		Hemicelulosa %	Lignina %	Ref.
		Alfacelulosa	Holocelulosa			
		%	%			
<i>Sargassum sp.</i>	-	20.5	ND	43.2	7.4	[49]
<i>Sargassum sp.</i>	Oaxaca, México	15.2	ND	10.2	24.1	[47]
<i>Sargassum spp</i>	Bolinao, Pangasinan, Filipinas	20.35	46.08	25.73	>1	[33]
S.	Golfo Pérsico (verano)	ND	ND	ND	25.8±0.3	[34]
<i>angustifolium</i>	Golfo Pérsico (invierno)	ND	ND	ND	11.8±0.6	[34]

#### 1.4. Valorización del sargazo

Es necesario transformar el problema en una oportunidad para aprovechar un recurso; se han explorado diferentes usos para extraer y crear productos de interés comercial a partir del sargazo [50].

Para el aprovechamiento integral de la biomasa, se deben separar los diferentes componentes del material y así obtener el mayor número de productos con valor agregado, a este tipo de modelo se le conoce como biorrefinería. Las biorrefinerías ayudan a mitigar el calentamiento global, por el balance neutro entre la fijación del dióxido de carbono y el liberado durante la utilización industrial de la biomasa [51].

### 1.4.1. Obtención de alginato de sodio

La obtención de geles a partir de algas ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, los alginatos presentes en las algas del género *Sargassum* tienen una calidad poco aceptable, rendimientos bajos [52] y gran astringencia [53].

Se han encontrado metales pesados en la biomasa presente en el Caribe, es por ello que su uso para consumo humano se ha visto limitado [9].

La extracción de alginato (figura 1.10) consiste primeramente en un pretratamiento ácido el cual ayuda a solubilizar el alginato, para posteriormente realizar una extracción alcalina en donde el ácido alginico se transforma a alginato de sodio soluble el cual se separa por centrifugación o usando solventes, cuando el alginato de sodio/calcio se encuentre precipitado y separado, se seca con aire caliente para pulverizar y tamizarlo [23].



**Figura 1.10.** Diagrama del proceso de extracción de alginato [26]

### **1.4.2. Bioabsorción**

La biomasa presente en el nuevo mar de los sargazos tiene potencial en la biorremediación, ya que captura el CO<sub>2</sub> de la atmósfera y lo transforma a carbonato que a largo plazo se convertirá en roca sedimentaria, Paraguay-Delgado et al., mencionan que sería un error retirar el sargazo del mar y recomiendan removerlo cuando se encuentre cercano a las costas [54]. Todavía no se conoce como ocurre el mecanismo de transformación del CO<sub>2</sub> a calcita en las especies *Sargassum*.

### **1.4.3. Biocombustibles**

Son recursos energéticos procesados a partir de la biomasa, creados con la finalidad de liberar la energía contenida en sus componentes químicos por medio de una reacción de combustión [55], son la mejor alternativa para sustituir a los combustibles fósiles y reducir la emisión de gases de efecto invernadero [56].

Durante muchas décadas los combustibles fósiles han sido la principal fuente de energía; no obstante, la creciente demanda energética, la volatilidad del precio de los combustibles tradicionales y los problemas ambientales relacionados con ellos han obligado a explorar nuevas tecnologías para diversificar la matriz energética, los biocombustibles son una alternativa promisoría para contribuir a la reducción del uso de combustibles fósiles [57].

La materia prima empleada para producir biocombustibles debe estar disponible en grandes cantidades para satisfacer los requisitos de producción, debe estar disponible durante todo el año o gran parte de él y se debe obtener de cultivos sostenibles para no ocasionar efectos adversos en el medio ambiente [26].

Para la obtención de biocombustibles, se emplean tecnologías como la fermentación, transesterificación y la digestión anaerobia para producir bioetanol, biodiesel y biogás respectivamente [55].

El uso de biocombustibles puede tener un efecto en los precios de algunos alimentos y ocasionar la disminución de las reservas alimenticias a nivel mundial por el desvío de estos recursos para la producción de energéticos. Es importante mencionar que la obtención de la materia prima para la producción de biocombustibles puede emitir cantidades mayores de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como consecuencia de convertir hábitats naturales en zonas de cultivos energéticos [58]. Es por ello que se impulsa el uso de biocombustibles avanzados, que

son los que se obtienen a partir de materiales lignocelulósicos como los residuos agroindustriales y forestales [59].

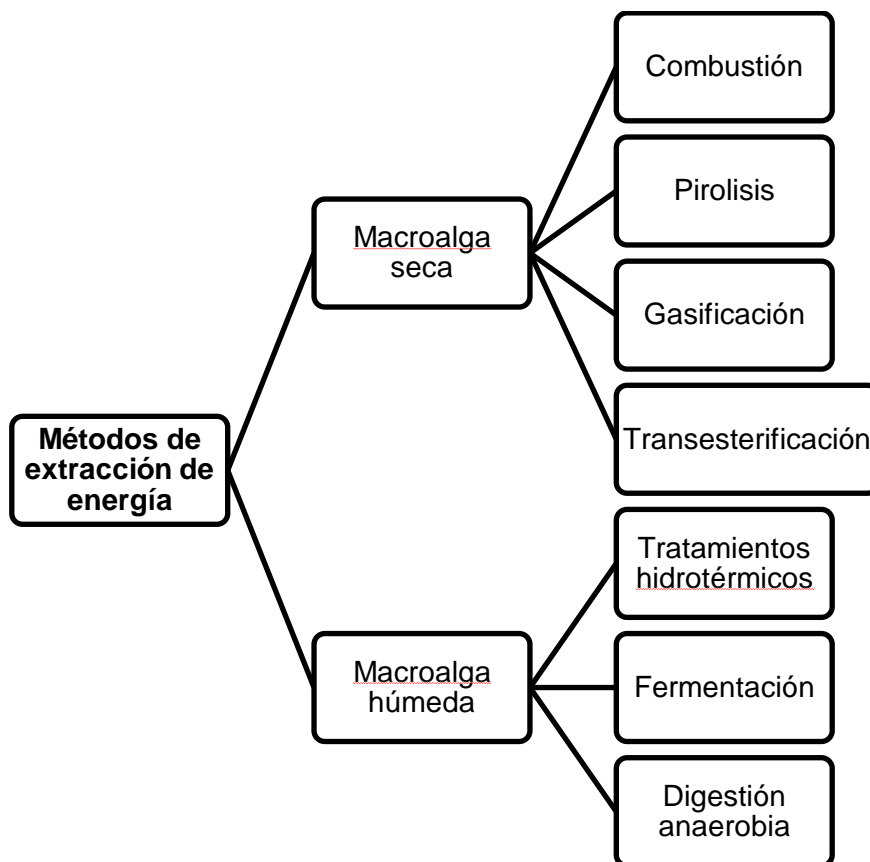
Se espera que los biocombustibles lignocelulósicos tengan un papel importante en la reducción de la dependencia energética de los combustibles fósiles, sin embargo, aún no existen plantas a escala comercial que se dediquen a fabricar biocombustibles con materiales lignocelulósicos, una de las principales limitantes es la lignina, ya que dificulta el acceso a la celulosa y hemicelulosa [46].

Se han realizado estudios para saber si el sargazo, se puede utilizar como materia prima para la elaboración de biocombustibles; los carbohidratos presentes se pueden transformar para generar energía en forma de biocombustibles como biogás [60][26][61][62] y bioetanol [33][34], sin embargo es necesario aplicar pretratamientos [63].

Los biocombustibles obtenidos de macro y micro algas son una opción prometedora para disminuir la dependencia a combustibles fósiles [59], gracias a su rápido crecimiento y a su alta densidad energética almacenada [55].

Utilizar biomasa acuática para obtener biocombustibles presenta numerosas ventajas, entre las que se encuentran: el no competir con el mercado alimenticio, no requieren extensiones de tierra, tienen la capacidad de remover cantidades considerables de CO<sub>2</sub> de la atmosfera al crecer por lo que el balance de emisión de gases de efecto invernadero es positivo [64], el rendimiento por unidad de área es mayor y no necesitan el uso de agua potable ya que crecen en el mar [19]. Además se menciona que la mayoría de las algas contienen cantidades bajas de lignina, lo que facilitaría su aprovechamiento [33]. En la figura 1.11, se presentan métodos que se pueden emplear para el aprovechamiento de las macroalgas en la generación de energía.





**Figura 1.11.** Métodos más usados para la extracción de energía en las macroalgas

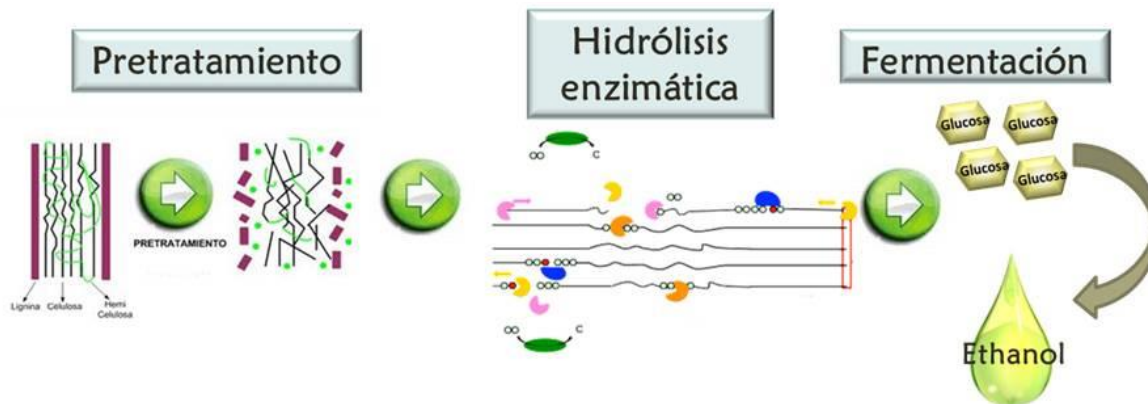
- **Bioetanol**

El bioetanol es un combustible líquido con un número de octano de 108 [65], puede ser usado en motores de combustión interna, emite menores sustancias tóxicas respecto a la gasolina y tiene un alto contenido de oxígeno, mejorando el rendimiento de los vehículos [19].

La producción de bioetanol de primera generación ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, debido a que las reservas de alimentos han disminuido, las estrategias para la generación de este biocombustible han comenzado a girar en torno al uso de biomasa como materia prima y a la integración de tecnologías de tercera generación [66].

El uso de biomasa residual presenta varios retos, uno de ellos es el fraccionamiento de los polímeros de celulosa en azúcares fermentables, así mismo, se le deben aplicar pretratamientos para eliminar la lignina y la hemicelulosa [19].

La producción de bioetanol lignocelulósico se compone por diversas etapas (figura 1.12), las cuales son el pretratamiento, la hidrólisis o sacarificación, la fermentación y la destilación. La sacarificación y la fermentación se pueden llevar a cabo de manera simultánea [67].



**Figura 1.12.** Proceso para la producción de bioetanol lignocelulósico [72]

El departamento de energía de los Estados Unidos estima que para producir 19,000 litros de etanol por hectárea por año, se requieren 59 toneladas secas por hectárea al año de algas pardas [19]. En la tabla 1.4, se muestran rendimientos de bioetanol obtenidos a partir de *Sargassum*, utilizando diferentes procesos para la obtención de este biocombustible.

**Tabla 1.4.** Rendimientos de bioetanol a partir de *Sargassum*

Especie	Proceso	Rendimiento bioetanol	Referencia
		0.386 g/ g	
<i>S. sagamianum</i>	Licuefacción térmica	azúcares reductores	[68]
		0.43-0.44 g/ g	
<i>S. sagamianum</i>	Licuefacción térmica	azúcares reductores	[69]
<i>Sargassum sp.</i>	Tratamiento con ácido y enzimático	19.9±0.3 g/L	[70]
		0.159 g/ g	
<i>Sargassum spp.</i>	Pretratamiento ácido y sacarificación enzimática	azúcares reductores	[33]
		3.6-4.0 g/L	
<i>S. angustifolium</i>	Biomasa recolectada en verano		[34]
	Biomasa recolectada en invierno	2.2-3.1 g/L	

- **Biogás**

Es una mezcla de gases, contiene en mayor cantidad metano (55-65%) y dióxido de carbono (35-45%), aunque pueden estar presentes otros gases como sulfuro de hidrógeno y amoníaco; se puede quemar para obtener calor y electricidad, esto contribuye a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero.

Los materiales usados para la producción de biogás son residuos agrícolas, excretas de animales, lodos residuales, entre otros; las macroalgas pueden ser utilizadas para este fin por su bajo contenido de lípidos y altos contenidos de carbohidratos [19].

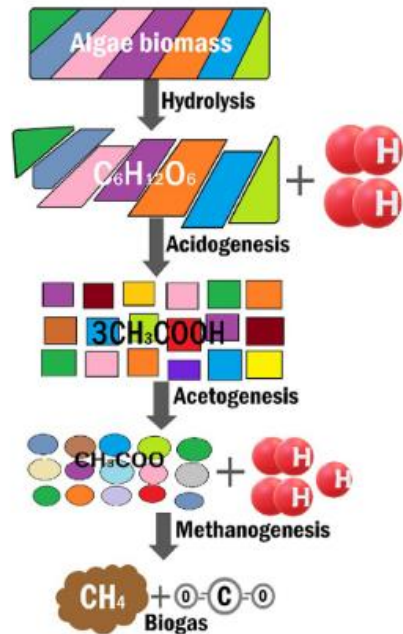
Se obtiene a través de la digestión anaerobia [71], se involucran cuatro procesos [26] en la producción de metano (figura 1.13):

- **Hidrólisis**, bacterias anaeróbicas secretan enzimas extracelulares que rompen los polímeros a compuestos orgánicos como proteínas, polisacáridos y lípidos; los polímeros lignocelulósicos son difíciles de degradar debido a sus complejas estructuras, es por ello que requieren pretratamientos, la lignina no puede despolimerizarse anaeróbicamente, ya que las enzimas involucradas en este proceso requieren oxígeno.
- **Acidogénesis**, los productos finales de la hidrólisis se consumen por acidógenos (anaerobios), los sustratos que se producen en esta fase son acetato, hidrógeno, dióxido de carbono, ácidos grasos y alcoholes.
- **Acetogénesis**, los sustratos formados en la acidogénesis son usados por homoacetógenos, que reducen el  $\text{CO}_2$  a acetato usando hidrógeno como donador de electrones, y acetógenos sintróficos para la conversión de acetato
- **Metanogénesis**, se involucran diversos tipos de organismos metanógenos: los metanógenos hidrogenotróficos y acetoclásticos, se clasifican según el sustrato que utilizan.

La hidrólisis es la etapa limitante en la velocidad de la digestión anaerobia, cuando los compuestos estructuralmente complejos como la lignina y la celulosa se convierten en unidades monoméricas, se generan partículas recalcitrantes que dificultan las etapas posteriores de la producción de metano [35].

El alto contenido de humedad facilita la transferencia de masa entre el sustrato y los microorganismos, acelerando el crecimiento microbiano y la bioconversión [72].

La bioconversión de algas pardas es baja, esto se atribuye a la presencia de polisacáridos complejos que no son fácilmente fermentables; así como a los altos niveles de sulfuro, polifenoles y salinidad [35]. Para contrarrestar la baja productividad de formación de metano, se han explorado diversos pretratamientos.



**Figura 1.13.** Producción de biogás a partir de algas [24]

El Sargazo posee una alta proporción de carbono-nitrógeno, por lo que es un excelente sustrato para la obtención de biogás, no obstante, se debe tomar en cuenta que es necesario reducir el contenido de sales antes de iniciar el proceso.

Concentraciones bajas de sales pueden favorecer el crecimiento de bacterias, pero concentraciones superiores a los 10 g/L inhiben los sistemas anaeróbicos por el aumento en la presión osmótica y la deshidratación de organismos metanogénicos. La concentración óptima de sodio para bacterias metanogénicas mesófilas es de 230 mg de Na/L [46].

La presencia de polifenoles en el sargazo inhibe la función de los organismos metanogénicos, produciendo una inestabilidad durante el proceso de generación de metano [20].

El bajo rendimiento de producción de metano usando algas se podría explicar por la presencia de polifenoles en el sustrato, los fenoles se caracterizan por poseer un grupo hidroxilo unido a un anillo de benceno, se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y algas, estos compuestos pueden afectar a las células microbianas al alterar la permeabilidad de su membrana, así mismo pueden provocar inhibición de sistemas enzimáticos esenciales. Algunos compuestos fenólicos encontrados en *S. muticum* han mostrado una actividad antimicrobial en

bacterias aerobias, sin embargo son pocos los estudios que han caracterizado los polifenoles presentes en las algas [73].

La gasificación es otra vía para la obtención de biogás; consiste en un proceso termoquímico que descompone el material al calentarlo a altas temperaturas (800-1000°C), el producto de este proceso es una mezcla de gases entre los que se encuentran el hidrógeno, monóxido de carbono, metano, etileno, nitrógeno, dióxido de carbono y vapor de agua [19].

Para iniciar el proceso mencionado anteriormente, se realiza una pirolisis usando la biomasa seca para obtener carbón, que posteriormente se gasifica generándose un gas de síntesis.

La principal limitación para realizar la gasificación es el contenido de humedad de las algas, valores altos de agua pueden disminuir la eficiencia del gasificador y el contenido total de energía [74].

La licuefacción hidrotermal, consiste en usar un reactor presurizado a temperaturas menores a 400°C, se requiere un catalizador, es un método adecuado para las macroalgas, ya que no se requiere eliminar toda el agua, el proceso no requiere solventes y las sales del sustrato pueden incrementar el rendimiento de biogás; no es utilizado para la producción de metano, ya que el biogás resultante se compone en su mayoría de hidrógeno [75].

### **1.5. Deslignificación**

Se estima que cada año se producen  $8 \times 10^8$  ton de lignina en el planeta, sin embargo este polímero no se acumula en la tierra gracias a los hongos y bacterias que degradan los componentes de la biomasa vegetal, estos microorganismos tienen un papel muy importante en el ciclo de carbono y su reciclaje [42].

Se han desarrollado procesos químicos para la deslignificación, sin embargo, hay una tendencia en el uso de métodos biotecnológicos de despolimerización de la lignina [76].

Para llevar a cabo procesos de bioconversión de la biomasa lignicelulósica, son necesarios pretratamientos, la lignina es el principal factor limitante en la degradación enzimática de los materiales lignicelulósicos [77]. Los pretratamientos tienen como objetivo remover la lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad de la biomasa para facilitar su sacarificación [78].

Durante la deslignificación, la lignina es modificada estructuralmente y parcialmente separada de la celulosa y la hemicelulosa; para el aprovechamiento de la celulosa y la hemicelulosa, la deslignificación es el paso crítico y que presenta mayores retos [39].

En los procesos que involucran el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica el enfoque se da principalmente en la celulosa, mientras que la lignina y la hemicelulosa son consideradas desechos. No obstante, se pueden obtener químicos aromáticos y polímeros a partir de la lignina [51].

### **1.5.1. Procesos químicos**

Se utilizan procesos termoquímicos para pretratar a la biomasa lignocelulósica con el fin de romper la estructura de material y separar a la lignina, algunos de los procesos más utilizados son la explosión de vapor, lavados alcalinos, hidrólisis ácida, expansión de fibra con amoníaco, oxidación húmeda con agua caliente, entre otros [29].

Entre los métodos químicos para despolimerizar a la lignina se encuentra la degradación térmica dando como resultado una lignina pirolítica, compuesta por un alquitrán marrón con compuestos de alto peso molecular derivados de la lignina [79].

El proceso de despolimerización de lignina por hidrogenólisis o hidrogenación consiste en someter a la lignina a una reacción de reducción en presencia de hidrógeno en un medio reactivo, los enlaces estructurales de la lignina sufren rupturas, la reacción se puede acelerar añadiendo catalizadores ácidos, se puede llevar a cabo en una o dos etapas, se obtienen compuestos aromáticos e hidrocarburos altamente hidrogenados [80].

Para la obtención de compuestos monoméricos polifuncionales se puede usar la despolimerización oxidativa, que consiste en tratar la lignina a presiones y temperaturas moderadas en presencia de un agente oxidante y un catalizador de oxidación [81].

- ***Deslignificación oxidativa***

En este tratamiento se obtiene un residuo rico en celulosa, ya que la hemicelulosa junto con la lignina son removidas. El peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) es un agente oxidante económico.

El peróxido de hidrógeno ha sido ampliamente utilizado para el blanqueamiento de la madera, en condiciones alcalinas se generan aniones de hidroperóxido ( $HOO^-$ ), los cuales eliminan grupos cromofóricos de la lignina. Tiene la capacidad de reaccionar con las estructuras

coloreadas de los grupos carbonilos formando fragmentos de compuestos carboxilos [82]. Sin embargo, es inestable en medios alcalinos y en presencia de algunos metales como el manganeso, hierro y cobre [83].

El peróxido de hidrógeno en presencia de iones metálicos, se descompone a iones hidroxilo, que son altamente reactivos, los cuales son responsables de la despolimerización de la lignina, obteniendo productos solubles en agua de bajo peso molecular, en algunas ocasiones además de la deslignificación este proceso puede causar degradación de la celulosa, por esa razón se deben encontrar las variables de operación óptimas que permitan la degradación de la lignina y la máxima retención de carbohidratos [84].

- ***Tratamientos alcalinos***

Los tratamientos alcalinos son ampliamente utilizados para separar la lignina de la biomasa y modificarla con el fin de facilitar la hidrólisis enzimática de los carbohidratos. En este tipo de tratamientos, la lignina se separa de los carbohidratos, se reduce la recalcitrancia del material al actuar en la matriz lignocelulósica y se limitan las reacciones de degradación de azúcares [84].

Los tratamientos alcalinos que se llevan a cabo con temperaturas y presiones bajas causan una menor degradación de azúcares y remueven sustancias amorfas como la lignina y la hemicelulosa [85].

Los procesos químicos generalmente requieren temperatura y presiones elevadas, el uso de solventes y valores extremos de pH, estos factores pueden llevar a la generación de inhibidores en la sacarificación, haciendo el proceso insostenible económica o ambientalmente, es por ello que el uso de enzimas es cada vez más estudiado [39].

### **1.5.2. Procesos biológicos**

Se ha observado la capacidad de algunos hongos de degradar la lignina, el uso de hongos en la deslignificación de la biomasa lignocelulósica presenta numerosas ventajas, los procesos requieren menores gastos energéticos, tienen un menor impacto ambiental respecto a los tratamientos fisicoquímicos, tienen una alta especificidad respecto al sustrato. Sin embargo, la aplicación de tratamientos biológicos a escala industrial aún se encuentra limitada por los tiempos del proceso que van desde 13 hasta 50 días [39].

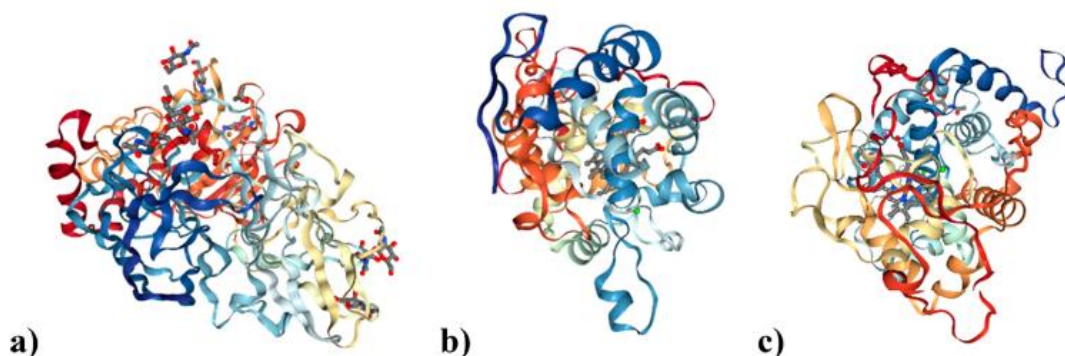


La degradación de esta biomasa involucra la acción sinérgica de un gran número de enzimas extracelulares, la deslignificación enzimática ha cobrado gran interés al ser más rápida que la biológica y al operar en rangos amplios de pH (3-8) y temperatura (25-80°C) [39].

Las enzimas involucradas en la degradación de la lignina catalizan reacciones oxidativas, estas enzimas modificadoras de lignina comprenden peroxidasas específicamente la lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), así como fenol-oxidasas del tipo lacasas (figura 1.14) [86].

La deslignificación se lleva a cabo por un proceso oxidativo en el que el peróxido de hidrógeno extracelular generado por enzimas fúngicas oxidasas, oxidan al polímero de la lignina en una reacción catalizada por enzimas con alto potencial redox como la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, entre otras [51].

Por otra parte, los hongos son pieza clave en el ciclo del carbono y se han usado como vehículos de sobreexpresión de enzimas de interés industrial [87]. Las mayores cantidades de lacasas se obtienen de hongos de la podredumbre blanca, estos organismos son capaces de degradar todos los componentes de la lignina a CO<sub>2</sub> y agua, los hongos secretan las lacasas en el medio donde crecen gracias a los micelios, algunos microorganismos que producen estas enzimas son *Trametes pubescens* (740,000 U/L), *Coriolus hirsutus* (83,830 U/L), *Trametes hirsuta* (19,400 U/L), *T. versicolor* (16,000 U/L), *Pycnoporus cinnabarinus* (10,000 U/L), *Neurospora crassa* (10,000 U/L), *Pleurotus ostreatus* (3,500 U/L) [29].



**Figura 1.14.** Estructura de las principales enzimas involucradas en la deslignificación. a) Lacasa obtenida de *Trametes versicolor*, b) Lignina peroxidasa obtenida de *Phanerochaete chrysosporium*, c) Manganeso peroxidasa obtenida de *P. chrysosporium* [39]

Algunas ventajas que presenta el uso de extractos enzimáticos para la deslignificación de la biomasa son la presencia de enzimas accesorias y mediadores en el extracto que ayudan en la degradación, también pueden contener enzimas celulasas que hidrolizan las fibras expuestas de celulosa facilitando la sacarificación de la biomasa deslignificada. Se pueden utilizar extractos enzimáticos lignolíticos y celulósicos de manera simultánea para ahorrar tiempo y energía [88].

La degradación de la lignina se da únicamente en condiciones aerobias [42]. Además de los hongos de la podredumbre blanca y marrón, también se han estudiado bacterias Gram positivas y negativas con capacidad para degradar lignina [43].

La adición de compuestos de bajo peso molecular capaces de intervenir en las reacciones redox, también llamados mediadores, ayuda en la oxidación de estructuras fenólicas y no fenólicas de la lignina [89]. Normalmente los mediadores tienen un potencial redox mayor a 0.9 V, los mediadores actúan como un portador de electrones entre la enzima y el sustrato [37].

Debido al tamaño molecular de las enzimas involucradas en la deslignificación, se dificulta el acceso a la pared celular secundaria, por ello se requieren mediadores, ya que en ausencia de ellos, solo se da la modificación de las fibras superficiales de la biomasa [89].

El mediador oxidado penetra en el sustrato oxidándolo; al oxidar el sustrato, el mediador se reduce a su forma original [37]. La elección del mediador tiene un rol importante en la efectividad del sistema enzima-mediador [90].

El uso de mediadores sintéticos en los sistemas enzimáticos conlleva altos costos y son potencialmente tóxicos, recientes estudios han explorado el uso de fenoles derivados de la lignina como mediadores en la deslignificación enzimática como una alternativa menos costosa y más amigable con el medio ambiente [51]. Los mediadores deben ser un buen sustrato para la enzima, su forma oxidada y reducida debe ser estable, adicionalmente, la conversión redox debe ser cíclica [91].

Las enzimas más estudiadas y utilizadas en los tratamientos enzimáticos son las lacasas y lignina peroxidasas.

- **Lacasas**

Las lacasas son oxidasas multicobre de compuestos aromáticos, reducen el oxígeno formando dos moléculas de agua a la vez que oxidan compuestos aromáticos [90], se caracterizan por

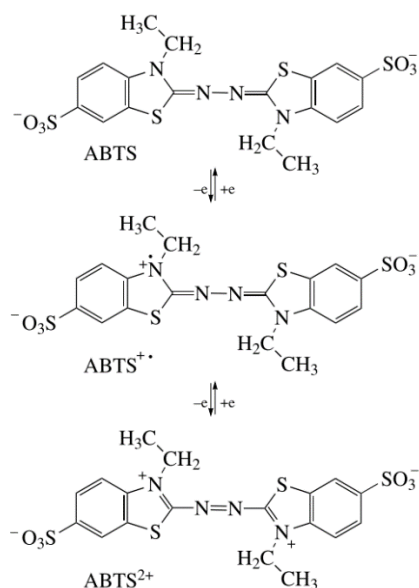
poseer 3 centros catalíticos, un centro mononuclear, donde el sustrato es oxidado y dos centros que forman un centro trinuclear donde el oxígeno molecular es reducido a agua [87].

Algunos sustratos para las lacasas son fenoles, polifenoles, anilinas, aril diaminas, hidroxindoles, benzenotioles y compuestos metálicos orgánicos e inorgánicos [92]. Por su potencial redox bajo (0.5-0.8 V), solo se oxidan las estructuras fenólicas de la lignina; las estructuras aromáticas no fenólicas (que representan el 80% de la estructura de la lignina) no son oxidadas por las lacasas [37].

Al tener un potencial redox bajo, no hay una degradación directa de la lignina, sin embargo, en presencia de compuestos que forman radicales estables, que actúan como mediadores, pueden oxidar a la lignina y a otros compuestos recalcitrantes [51].

El ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzo tiazolin-6 sulfónico) (ABTS) es el mediador de las lacasas más estudiado por su alta estabilidad y su química redox conocida, este compuesto, transfiere un electrón a la enzima para activarla, actuando como un co-oxidante [90].

La oxidación del ABTS por acción de las lacasas ocurre en dos pasos, como se muestra en la figura 1.15; el primero es el más rápido y consiste en la formación del radical catiónico  $ABTS^{\bullet+}$ , para después ser oxidado al dicatión  $ABTS^{2+}$  [91].



**Figura 1.15.** Oxidación del ABTS en presencia de la lacasa [91]

El ABTS<sup>+</sup> interactúa con los grupos fenólicos de la lignina, es necesaria la presencia del ABTS<sup>2+</sup> para la degradación de los grupos no fenólicos presentes en la lignina [91].

- ***Peroxidasas***

Estas enzimas se clasifican en oxidorreductasas cuya función es hacerle frente a la recalcitrancia y heterogeneidad de la lignina. Su alto potencial de óxido-reducción le permite oxidar los anillos bencénicos sin importar su grado de metoxilación y los enlaces presentes. [51].

Las lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas usan el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como cofactor para catalizar reacciones de oxidación del anillo aromático hasta cationes radicales o radicales fenóxido [43].

Tienen un potencial redox entre 1.15-1.25 V, lo cual le permite oxidar grupos fenólicos y no fenólicos de la lignina [37].

## Justificación

Las afectaciones relacionadas al fenómeno de las arribazones de sargazo no tienen precedentes, su mala disposición puede causar problemas no solo en la economía de la región, sino en el medio ambiente y en especies vulnerables, el sargazo debe abordarse como un recurso que puede ser aprovechado y del cual se pueden obtener beneficios. Sin embargo, algunas limitantes en cuanto a su uso es la presencia de metales pesados y de polifenoles asociados a la lignina, los cuales dificultan el acceso a compuestos aprovechables.

Por otra parte, debido a la creciente demanda energética y para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero asociadas al uso de combustibles fósiles, se ha impulsado la producción de biocombustibles, en especial los de segunda y tercera generación, no obstante, su mayor inconveniente es la recalcitrancia que presentan los sustratos estudiados, la cual se explica por la presencia de lignina. La lignina generalmente es una problemática, ya que dificulta el acceso a compuestos que pueden ser transformados en productos de alto valor.

Los grandes volúmenes de sargazo que arriban al Caribe y los altos costos asociados a su recolección y disposición, logran que sea factible convertir esta biomasa pasiva a un sustrato potencial en la generación de biocombustibles y productos con valor agregado, aun así, es necesario estudiar y desarrollar procesos para deslignificar sustratos con potencial para la generación de energía, en esta investigación se estudiaron tratamientos químicos y enzimáticos de deslignificación.

En reportes previos se han encontrado compuestos fenólicos en macroalgas presentes en el Caribe, a pesar de que pueden ser vistos como una problemática, éstos pueden ser utilizados como precursores en la síntesis verde de compuestos de interés, así mismo, los carbohidratos se pueden utilizar para la producción de fucooidanos, alginatos y biocombustibles. No obstante, antes de definir una ruta de valorización es necesario identificar los compuestos presentes en el sargazo, para lograr el máximo aprovechamiento, en esta investigación la identificación de dichos compuestos se realizó mediante técnicas cromatográficas.

## Hipótesis

La deslignificación de *Sargassum spp.*, usando tratamientos químicos y/o biológicos facilitará la obtención de compuestos con alto valor en paralelo con la generación de biocombustibles.

## Objetivos

### Objetivo general

Deslignificar el *Sargassum spp.*, mediante métodos químicos y enzimáticos, para obtener compuestos con alto potencial en la generación de biocombustibles.

### Objetivos particulares

- a) Caracterizar el *Sargassum spp.*, para conocer su composición estructural y fisicoquímica.
- b) Demostrar la presencia de lignina en el sargazo proveniente del Caribe mexicano y cuantificarla.
- c) Caracterizar los compuestos polifenólicos asociados a la lignina mediante HPLC y cromatografía gases-masas.
- d) Proponer un método para despolimerizar la lignina presente en el sargazo, usando métodos químicos y enzimáticos.
- e) Plantear una estrategia para el aprovechamiento del *Sargassum spp.*, bajo un concepto de cero residuos.

## Capítulo 2

### Materiales y métodos

#### 2.1. Estrategia experimental

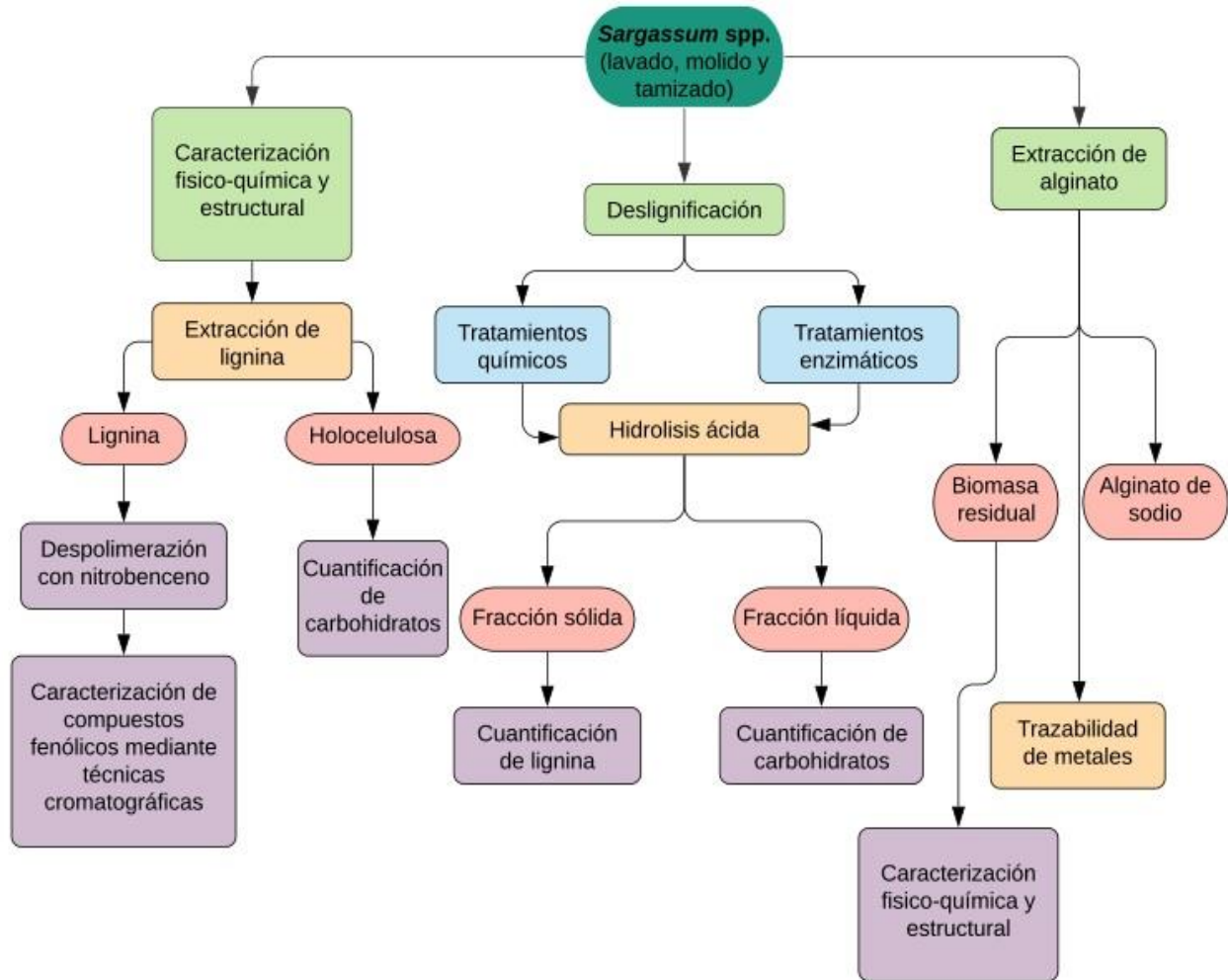
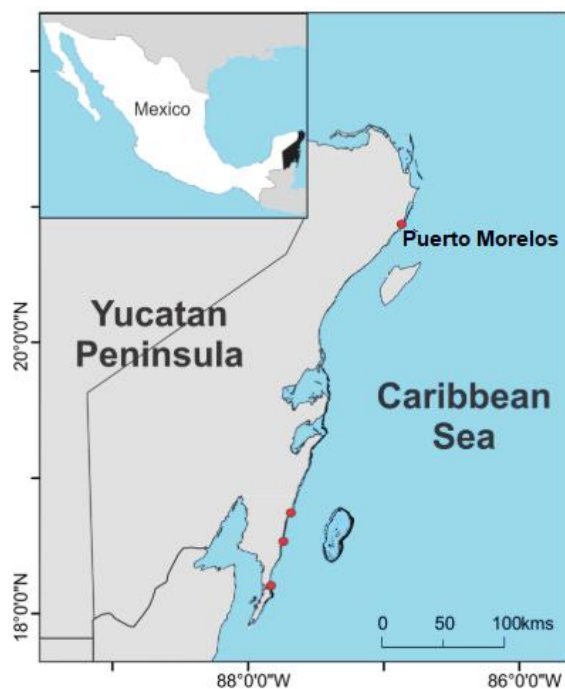


Figura 2.1. Diagrama de flujo de la estrategia experimental

## 2.2. Colecta y acondicionamiento de la materia prima

El sargazo fue recolectado en el municipio de Puerto Morelos, Quintana Roo, México (figura 2.2), el muestreo se realizó en septiembre 2020, a 150 metros de la orilla de la playa. Las muestras están constituidas por un consorcio de macroalgas de la especie *Sargassum* spp.



**Figura 2.2.** Costas del Caribe mexicano [11]

Se realizaron lavados de la materia prima utilizando agua potable, hasta alcanzar una conductividad de 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , después se secó al sol. El material seco se molió utilizando un molino *Pagani Serie 25* (figura 2.3) para posteriormente tamizarlo usando una malla No.50 y 20 con el fin de obtener partículas entre 300 y 850 micras.





**Figura 2.3.** Lavado del sargazo y molino Pagani Serie 25

## 2.3. Caracterización de la materia prima

### 2.3.1. Contenido de humedad y cenizas

La determinación del contenido de cenizas se realizó mediante el protocolo de la NREL/TP-510-42622 [93].

Se utilizó un crisol de porcelana, el cual se colocó durante 4 horas a 103°C en un horno “Binder” para alcanzar el peso constante, el peso se registró usando una balanza analítica “Ohaus Pioneer Mod. PA124C”, seguidamente se colocaron 0.5 gramos de sargazo en el crisol y se repitió el paso anterior para obtener el peso constante del crisol más la muestra, con dicho valor se puede obtener el contenido de humedad de la muestra siguiendo la siguiente ecuación.

$$\text{Humedad (\%H)} = \frac{M1 - M2}{M} \times 100$$

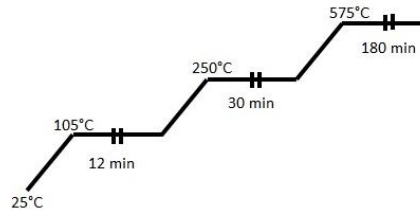
Donde:

M1= Peso del crisol + muestra húmeda

M2= Peso del crisol + muestra seca

M= Peso de la muestra

Para obtener el contenido de cenizas el crisol con la muestra, se introdujo a una mufla “Vulcan 3-550” equipada con programa de rampas, la muestra se calentó a 105°C la temperatura permaneció constante durante 12 minutos, luego se incrementó a 250°C donde se mantuvo 30 minutos, para finalmente alcanzar una temperatura de 575°C, la muestra se mantuvo en esas condiciones durante 180 minutos más (figura 2.4).



**Figura 2.4.** Rampa de calentamiento

El crisol se dejó enfriar en un desecador por aproximadamente una hora y posteriormente se registró el peso de las cenizas usando la balanza analítica. El proceso se realizó por triplicado. El porcentaje total de cenizas viene dado por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas totales} = \frac{(\text{Peso crisol} + \text{cenizas}) - \text{Peso crisol}}{g \text{ muestra}} \times 100$$

### 2.3.2. Contenido de fenoles totales

La concentración de fenoles totales se determinó por el método Folin-Ciocalteu [94], en el que se mide la formación de color azul, la técnica se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm [95].

Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un

complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la medida para evaluar el contenido en polifenoles [96].

La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría con base a una recta patrón de ácido gálico con concentraciones de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mg/mL [95].

Se agregaron 50  $\mu$ L de muestra a un tubo de ensayo con capacidad de 10 mL, junto con 1550  $\mu$ L de agua destilada y 100  $\mu$ L de reactivo Folin al 10% (v/v), se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos en la oscuridad, después se añadieron 300  $\mu$ L de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 7.5% (p/v), la mezcla se agitó suavemente y se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a 40°C. La absorbancia se leyó usando un espectrofotómetro “BioSpectrometer Eppendorf” a 765 nm.

### **2.3.3. Análisis de elementos orgánicos (CHNS)**

El análisis elemental se realizó en un equipo Thermo Scientific modelo Organic Elemental Analyzer Flash 2000, usando un Software Eager Xperience versión 1.4, con el fin de conocer la composición elemental orgánica de las muestras, se colocó entre 7 y 8 mg de muestra molida y tamizada a un tamaño de partícula entre 300 y 850 micras, se cuantificó el contenido porcentual de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre, cada muestra se procesó por duplicado.

### **2.3.4. Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)**

Las muestras se molieron y secaron antes de analizarlas. Los espectros infrarrojos se obtuvieron usando un espectrofotómetro Bruker modelo FT-IR Tensor II (Milton, ON, Canadá). Las muestras se analizan en Platinum ATR (Reflexión Total Atenuada) y los espectros se obtienen en la región de 4000–500  $\text{cm}^{-1}$ , a una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  con 32 escaneos [97].

### **2.3.5. Cuantificación de lignina y carbohidratos**

La extracción y cuantificación de lignina se realizó siguiendo el protocolo NREL/TP-510-42618 [98], descrito a continuación:

Se realizó una hidrolisis con ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 72% (v/v), la cantidad de muestra seca usada fue de 500  $\pm$  10 mg a la cual se le agregó 5 mL de ácido en tubos de ensayo de vidrio

con capacidad de 25 mL, se agitó manualmente con varilla de vidrio durante una hora en un baño de agua a  $30 \pm 3^\circ\text{C}$ , el proceso se realizó por triplicado.

Las muestras se transfirieron a frascos de vidrio con tapa y se añadió agua destilada hasta alcanzar un peso de 148.7 gramos, los frascos se llevaron a una autoclave durante una hora a  $121^\circ\text{C}$ .

Se utilizaron filtros Gooch con poro "M" a peso constante para recuperar la fracción sólida (lignina), ésta se lava como mínimo tres veces sobre el filtro para retirar los residuos de ácido. Los filtros con muestra se secan en un horno "Binder" a  $105^\circ\text{C}$  hasta alcanzar el peso constante. El contenido de lignina se calcula por diferencia de pesos, usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{(\text{Peso filtro} + \text{muestra seca}) - (\text{Peso filtro})}{g \text{ muestra}} \times 100$$

El análisis de carbohidratos presentes en el sargazo se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-High Performance Liquid Chromatography), se analizó la fracción líquida obtenida en la extracción ácida [99].

La separación cromatográfica se realizó usando una columna Metacarb 87H  $300 \times 7.8$  mm (Agilent) bajo las siguientes condiciones: fase móvil  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.005 M), velocidad de flujo 0.4 mL/min, y temperatura de la columna  $50^\circ\text{C}$ , la temperatura del detector se mantuvo a  $35^\circ\text{C}$ . Se inyectaron 20  $\mu\text{l}$  de muestra previamente filtrada con membrana 0.45  $\mu\text{m}$  (Agilent) [100].

#### **2.4. Identificación de compuestos fenólicos en la lignina**

La lignina obtenida del punto anterior fue sometida a una despolimerización para identificar compuestos fenólicos, para ello, se llevó a cabo una reacción con nitrobenzeno, según el procedimiento descrito por Reyes-Rivera [101], en el cual se agregan 200 mg de lignina a un vial de vidrio con tapa junto con 0.5 mL de nitrobenzeno y 7 mL de una solución de hidróxido de sodio 2 M a un reactor hidrotérmico de acero inoxidable (figura 2.5), el reactor se calentó a  $170^\circ\text{C}$  usando una mufla "Vulcan 3-550" durante dos horas y media, la solución obtenida de la reacción se almacenó en un vial ámbar a temperatura ambiente.



**Figura 2.5.** Reactor hidrotérmico

Posteriormente se realizaron tres extracciones con 60 mL de cloroformo, después de la primera extracción, se agregaron 2.5 mL de HCl (4M), las fases orgánicas recuperadas se mezclaron y se concentraron usando un rotoevaporador “IKA RV10” (figura 2.6), a 50 revoluciones por minuto y con un baño de agua “IKA HB 10” a 40°C.



**Figura 2.6.** Extracción con cloroformo y rotoevaporador IKA RV10

La muestra concentrada se filtró, usando pipetas Pasteur rellenas con silica gel 60 “Fluka” (figura 2.7) antes de ser analizadas usando técnicas cromatográficas.



**Figura 2.7.** Columna utilizada para filtrar las muestras

#### **2.4.1. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM)**

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases marca Agilent 7890B GC (figura 2.8), acoplado a un espectrómetro de masas Agilent, modelo 5977B GC/MSD. Para la separación de los compuestos se utilizó una columna marca Agilent Technologies HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 micras).

Se utilizó hidrógeno como gas acarreador en la columna, a un flujo de 1 mL/min. Las condiciones del horno fueron: una temperatura inicial de 70 °C en isoterma durante 5 minutos, seguida de una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta 200 °C manteniendo en isoterma durante otros 5 minutos, seguida por una última rampa de 20 °C/min hasta 290 °C manteniendo en isoterma durante 15 minutos. La temperatura del inyector fue de 300 °C. Se inyectó 1 microlitro de muestra al 10% w/v en cloroformo.



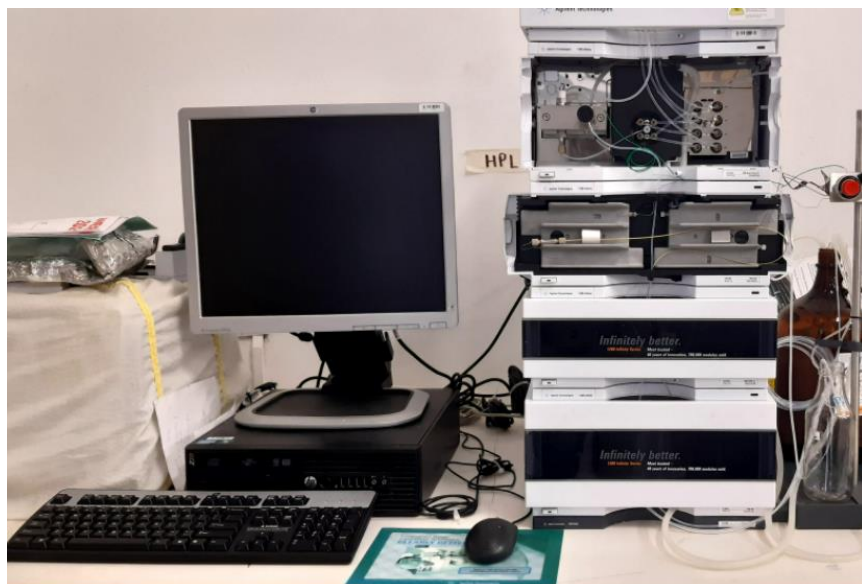
**Figura 2.8.** Cromatógrafo de gases Agilent 7890B GC acoplado a un espectro de masas Agilent 5977B GC/MSD

#### **2.4.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

La muestra se diluyó a una concentración de 1 mg/mL, usando una fase de Acetonitrilo (ACN) y agua grado HPLC en relación 1:1, posteriormente se pasaron por un filtro Agilent de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Se usó una columna Agilent Zorbax Eclipse C18 (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) (figura 2.9), la fase móvil utilizada se constituyó de una mezcla de A (Acetonitrilo) y B (Ácido fórmico al 1% v/v) en relación 14:86, la temperatura de la columna fue de 40°C, se usó un flujo constante de 1 mL/min, el volumen de inyección de la muestra fue de 20  $\mu\text{L}$ , se usó un detector UV a 290 nm, el tiempo de cada corrida fue de 22 minutos en total.

Se elaboró una curva de calibración usando mezclas de estándares a diferentes concentraciones, los estándares grado HPLC (SigmaAldrich) usados fueron ácido gálico, ácido vainíllinico, ácido *p*-coumárico y siringaldehído, las mezclas de estándares se prepararon con una mezcla de acetonitrilo y agua en relación 1:1, las concentraciones usadas para la curva de calibración variaron entre 0.125 y 0.015 mg/mL.



**Figura 2.9.** Cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC con columna Zorbax Eclipse C18

## **2.5. Deslignificación del sargazo**

El sargazo se sometió a diferentes tratamientos con el objetivo de retirar la lignina presente, y facilitar el acceso a los carbohidratos para ser aprovechados posteriormente. Se utilizaron tratamientos químicos y enzimáticos. A la fracción sólida obtenida de los tratamientos, se le determinó el contenido de lignina y fue analizada por espectrometría infrarroja (FTIR) para observar los cambios estructurales que sufre la biomasa.

### **2.5.1. Tratamiento con hidróxido de sodio**

Se siguió la metodología propuesta por Soares et al., [85], en donde la solución alcalina utilizada es el hidróxido de sodio (NaOH) al 1% y 3%, el proceso se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer a temperatura ambiente (25°C) durante 24 horas con agitación de 150 rpm, la carga de sólidos fue de 15% (w/v).

Este tratamiento ocasiona una menor degradación de azúcares y remueve sustancias como la lignina y la hemicelulosa [85], al finalizar el tratamiento, la solución obtenida se filtró, el sólido se lavó con agua purificada y se secó en un horno Binder a 70°C.



### **2.5.2. Oxidación con peróxido de hidrógeno**

En este tratamiento se utiliza peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), se alcanza una alta remoción de lignina y recuperación de celulosa y hemicelulosa. El mecanismo de acción consiste en la saponificación de los enlaces éter y éster  $\alpha$ -bencilo que unen a la lignina y la hemicelulosa, logrando su solubilización [102].

Se utilizó la metodología propuesta por Su et al., con modificaciones [103], la muestra se mezcló con una solución de  $H_2O_2$  al 2.5 y al 3.5%, se utilizó una carga de 1:20 (w/v), la suspensión se incubó a 35°C, con una agitación de 150 rpm y un tiempo de reacción de tres horas.

Después del tiempo de incubación, la solución se filtró, la parte sólida se lavó y secó a 60°C para su posterior análisis. En la fracción líquida se encuentra soluble la lignina.

### **2.5.3. Hidrólisis enzimática**

La carga enzimática empleada en los pretratamientos fue de 170 U de lacasa/g sustrato seco, la carga de sólidos usada fue del 12% (w/v), se utilizó buffer de acetatos como medio para realizar el tratamiento, las soluciones se incubaron durante 48 horas a 40°C con una agitación de 150 rpm. Se utilizó un extracto enzimático (EE) obtenido a partir de un hongo *Trametes hirsuta*, así como lacasas reactivas (SigmaAldrich). También se midió el efecto de la adición de un mediador en el proceso de deslignificación enzimática, el mediador utilizado fue ABTS (5  $\mu$ M).

#### **2.5.3.1. Cuantificación de actividad lacasa**

La actividad lacasa se determinó utilizando ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS SigmaAldrich). Una unidad de actividad lacasa se define como la cantidad necesaria para catalizar la formación de 1 mmol de ABTS oxidado por minuto [97].

La técnica consiste en agregar 100  $\mu$ L de buffer de acetatos a un tubo de ensayo con capacidad de 10 mL, seguido de 100  $\mu$ L de ABTS (5 $\mu$ M) y 700  $\mu$ L de agua destilada, posteriormente la solución se incubó a 40°C en oscuridad durante 5 minutos, pasado el tiempo de incubación, se añaden 100  $\mu$ L del extracto enzimático y se incubó por 20 minutos en la oscuridad a 40°C. La absorbancia se midió con un espectrofotómetro a 420nm.

$$\text{Actividad Lacasa} = \frac{(\text{Absorbancia} * \text{Dilución})(\text{Volumen de reacción} / \text{Volumen muestra})}{0.036 / \text{Tiempo de incubación}}$$

## 2.6. Extracción de alginato

Se usó la metodología propuesta por Ardalán et al., con modificaciones [34], las modificaciones consisten en utilizar carbonato de sodio en lugar de bicarbonato de sodio durante la hidrólisis alcalina. El proceso consiste en una preextracción ácida en la que se agregaron 75 mL de ácido clorhídrico (HCl) 0.2M a 10 gramos de sargazo seco, la mezcla se agitó manualmente y se dejó reposar 15 minutos, después del tiempo de espera, se separó la fracción sólida de la líquida usando un filtro Gooch C.

Finalizada la preextracción ácida, la fracción sólida se sometió a una hidrólisis alcalina agregando 250 mL de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 2% (p/v) y llevando la solución a un baño de agua con temperatura de 80°C durante 2 horas. La solución obtenida se filtró, la fracción líquida contiene ácido algínico soluble, que fue transformado a alginato de sodio. La fracción sólida denominada biomasa residual (BR) se secó por 24 horas a 45°C, esta fracción se considera un desecho en el proceso de extracción de alginato. La biomasa residual fue caracterizada para conocer su composición y encontrar alternativas para su aprovechamiento con el fin de obtener un proceso con cero residuos.

A la fracción líquida con ácido algínico soluble se le agregaron 375 mL de ácido clorhídrico (HCl 0.2M) para formar fibrillas insolubles de ácido algínico, las fibrillas se separaron y se le añadieron 250 mL de solución de carbonato de sodio al 2% (p/v) para transformar el ácido algínico insoluble a alginato de sodio soluble. El alginato de sodio se precipitó utilizando 250 mL de etanol anhidro, el líquido se descartó y el alginato de sodio insoluble se secó en un horno a 45°C durante 24 horas.

El rendimiento de alginato de sodio está dado por la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de alginato de sodio (\%)} = \frac{\text{Peso del alginato de sodio seco}}{\text{Peso de la macroalga seca}} \times 100$$

### **2.6.1. Trazabilidad de metales**

Se realizó un análisis del contenido de metales a las muestras de sargazo, biomasa residual y alginato de sodio, para conocer la trazabilidad de metales durante este proceso. Las muestras fueron digeridas por triplicado utilizando 0.5 gramos de muestra seca, a la cual se le añadieron 7 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), 1.5 mL de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 0.5 mL de fluoruro de hidrógeno (HF 40-45%) y 2 mL de agua desionizada, para el análisis se utilizó un espectrómetro de emisión óptica (ICP-OES) Perkin Elmer Optima 8000 [104].

### **2.7. Análisis estadístico**

Se utilizó el software STATISTICA 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, USA) para determinar las desviaciones estándar de los datos obtenidos, así como para realizar un análisis de varianza ( $P < 0.05$ ) para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de deslignificación.

## Capítulo 3

### Resultados y discusión

#### 3.1. Caracterización de la biomasa

Los resultados obtenidos de la caracterización del sargazo, se presentan en la tabla 3.1. La humedad de trabajo usada fue de 15.98%. Las cenizas representan el material inorgánico presente en la muestra como sales y metales, el contenido en el *Sargassum* spp recolectado en Puerto Morelos en 2020 fue del 21.13% y es menor a lo reportado por Milledge et al. [36] (31.82%) y Thompson et al. [105] (46.94%) en la biomasa recolectada en las Islas Turcas y Caicos en el verano del 2019 y en Barbados en el verano de 2018, respectivamente. Sin embargo, los valores concuerdan por lo reportado por Paraguay-Delgado et al. [54] y Aparicio et al. [106] en el sargazo que arribó a Quintana Roo durante 2019; los cuales variaron entre 20.27 y 23%. Esto significa que el contenido de cenizas depende de la localidad y la temporalidad en la que se realice el muestreo. Así mismo, Vazquez-Delfin et al. [107], reafirma las variaciones en función de la ubicación de muestreo, al analizar muestras colectadas en diferentes puntos de Quintana Roo, obteniendo valores entre el 18.1 y 23.9%.

En cuanto al contenido elemental, el porcentaje de carbono (C), hidrógeno (H), nitrógeno (N) y azufre (S) fue de 31.87, 4.92, 1.16 y 0.98, respectivamente. El contenido de carbono y nitrógeno se encuentra dentro de los valores reportados por Vazquez-Delfin et al. [107], los cuales son del 26.8 al 33% para carbono y de 0.9 a 1.2% para nitrógeno. Sin embargo, el contenido de carbono es mayor a lo encontrado en la biomasa recolectada en Barbados (27.50%) y en Islas Turcas y Caicos (27.41%) [105][36].

La relación carbono-nitrógeno (C:N) en este estudio fue de 27.51 la cual se encuentra en el rango óptimo para la digestión anaerobia en la producción de biogás (20-30) [62] y coincide con lo reportado por Vazquez-Delfin et al. [107] para las muestras de *Sargassum* spp., colectadas en Puerto Morelos en Junio 2018. A diferencia de los valores obtenidos por otros autores en muestras de sargazo recolectadas en Barbados (2018) y Turks and Caicos (2019) [105][36] los cuales fueron de 21.16 y 16.08, respectivamente. Confirmando la variación proximal de las muestras de sargazo en dependencia del sitio de colecta y la temporalidad de la misma.

El contenido de azufre es mayor a lo reportado por Milledge et al., [36] y Thompson et al., [105] cuyos resultados son 0.2% y 0.82%, el alto contenido de este elemento se pueden relacionar

con los reportes de la generación de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) durante la descomposición del sargazo, este gas es tóxico y puede generar problemas medio ambientales y de salud pública [6], al igual que el contenido de cenizas, el contenido elemental también varía en función del sitio y temporalidad de muestreo.

**Tabla 3.1.** Caracterización del *Sargassum* spp., en base seca. FT= Fenoles Totales

<b>Análisis</b>	<b><i>Sargassum</i> spp</b>
Humedad (%)	15.98 ± 0.31
Cenizas (%)	21.13 ± 0.25
C (%)	31.87 ± 1.82
H (%)	4.92 ± 0.09
N (%)	1.16 ± 0.02
S (%)	0.98 ± 0.03
C:N	27.51 ± 1.06
FT (%)	1.81 ± 0.21
Lignina (%)	29.52 ± 0.18
Carbohidratos totales (%)	24.62 ± 1.21

El contenido de fenoles totales (FT) es de 18.10 mg de GAE/g de sargazo, lo cual representa el 1.8% del peso de la biomasa en base seca, Milledge et al. [36] reporta diferencias entre el contenido de fenoles en la mezcla de sargazo pelágico (2.9%) y entre especies de *S. natans* y *S. fluitans* (0.25-0.66%). Mientras que en estudios a nivel de especies realizados en sargazo colectado en Jamaica en 2019, los porcentajes de fenoles varían entre 0.12 y 0.43% en peso seco [108]. Este amplio rango de variación, en el contenido de fenoles totales puede estar asociado a la temporalidad y ubicación de muestreo, debido a las condiciones de estrés a las que está sometido el sargazo durante su trayecto a las costas, por ejemplo, la radiación ultravioleta, incrementos en la temperatura del océano, entre otras [104].

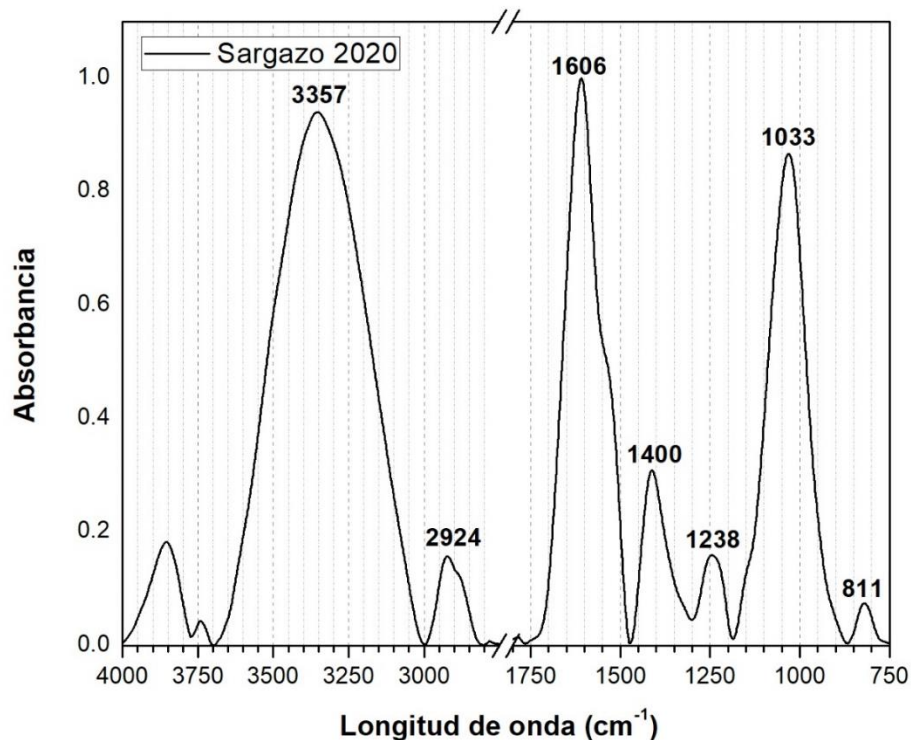
El contenido total de carbohidratos en el sargazo analizado es de 24.62%, entre los cuales se encuentran glucosa, xilosa y fucosa. La presencia de fucosa y de azufre, generalmente se relacionan con la presencia de fucooidanos, los cuales tienen un valor comercial (figura 3.1).



**Figura 3.1.** Contenido de carbohidratos en el *Sargassum* spp.

Se puede apreciar que el contenido de glucosa y xilosa representan un 46 % del total de carbohidratos y los cuales pueden asociarse a la presencia de celulosa y hemicelulosa, respectivamente; lo que coincide con lo reportado por Lopez-Sosa et al.[109] y Alzate-Gaviria et al. [104] para esta macroalga. Mientras que los carbohidratos no identificados podrían estar relacionados a los monómeros que componen a los alginatos.

Se realizó un análisis infrarrojo (FTIR) al sargazo, el espectro obtenido se presenta en la figura 3.2., la absorbancia presentada en la longitud de onda de los 3357 y 2924  $\text{cm}^{-1}$  representan los enlaces característicos del grupo funcional hidroxilo (-OH) y de enlaces C-H en grupos  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ , los cuales se atribuyen a diversos carbohidratos como celulosa, hemicelulosa y alginato [34][110]. La banda encontrada en la longitud de 1606  $\text{cm}^{-1}$ , es representativa de los enlaces conjugados del grupo carboxilo (C=O) [47], mientras la que está presente en la longitud de 1400  $\text{cm}^{-1}$ , se asigna a las vibraciones simétricas de los enlaces C-OH de los grupos carboxilos [111], este grupo funcional está presente en la estructura del alginato y de la lignina.



**Figura 3.2.** Espectro FTIR del *Sargassum* spp

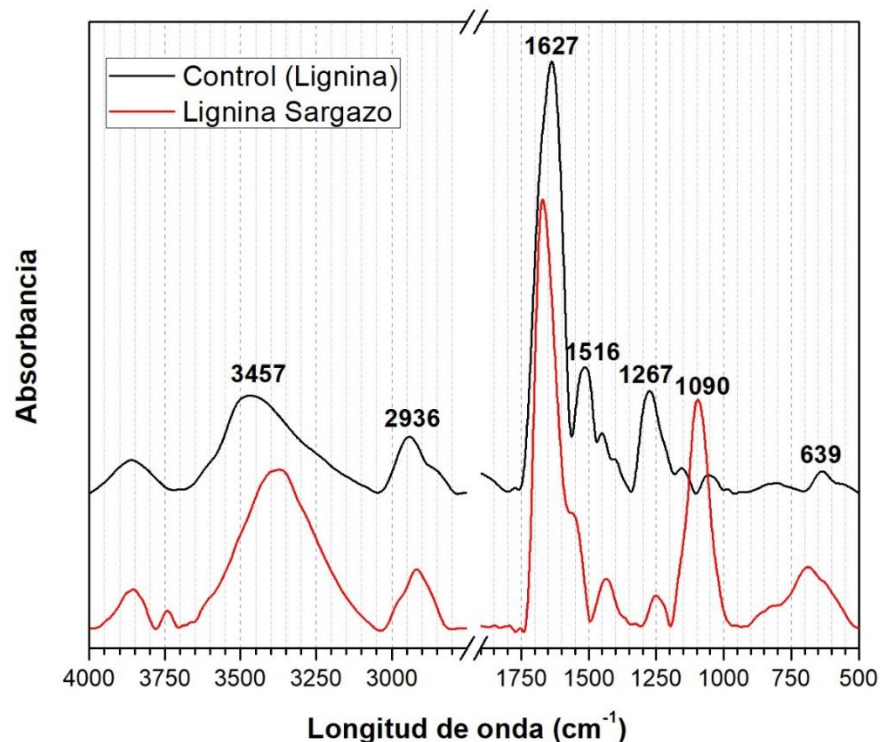
El pico presente en la longitud de onda alrededor de los 1238  $\text{cm}^{-1}$ , en las macroalgas, se debe a la presencia de grupos ésteres sulfatados ( $\text{S}=\text{O}$ ), los cuales están presentes en los fucoidanos y en polisacáridos sulfatados [111], la banda alrededor de la longitud en 1033  $\text{cm}^{-1}$  representa vibraciones características de las regiones anoméricas de los xilanos asociados a la hemicelulosa, mientras la señal encontrada en los 811  $\text{cm}^{-1}$  es propia de los enlaces C-H de las unidades de *p*-hidroxifenilos de la lignina [112].

### 3.2. Identificación de fenoles en la lignina

Existen reportes de compuestos asociados a lignina en especies de algas de *Calliarthron cheilosporioides* [44] y en macroalgas colectadas en el Pacífico [47], sin embargo, hasta el momento no hay reportes de la presencia de lignina en las algas del género *Sargassum* que arriban al Caribe mexicano.

Para las macroalgas que arriban al Caribe, Alzate-Gaviria et al. [104], reportaron la presencia de una material similar a la lignina con gran cantidad de polifenoles los cuales representan el 29.5% del peso seco del sargazo; así como la presencia de una pared celular secundaria lignificada. Además de ello, Aparicio et al. [106] mencionan la presencia de un material resistente a la hidrolisis ácida, el cual representa el 26.46% del peso en el sargazo. En este trabajo se obtuvo un 29.52% de un material recalcitrante, el cual es resistente a la hidrolisis ácida; con el objetivo de demostrar que dicho material es lignina; este fue sometido a una despolimerización para posteriormente analizar sus componentes e identificar compuestos que se asocian con la lignina.

Así mismo, antes de realizar la despolimerización con nitrobencono, se realizaron análisis infrarrojos al material recalcitrante que se obtuvo del sargazo y a una lignina alcalina grado reactivo (Chem Cruz SC-489763) para visualizar las similitudes en sus grupos funcionales. Los espectros infrarrojos de estos materiales se presentan en la figura 3.3.



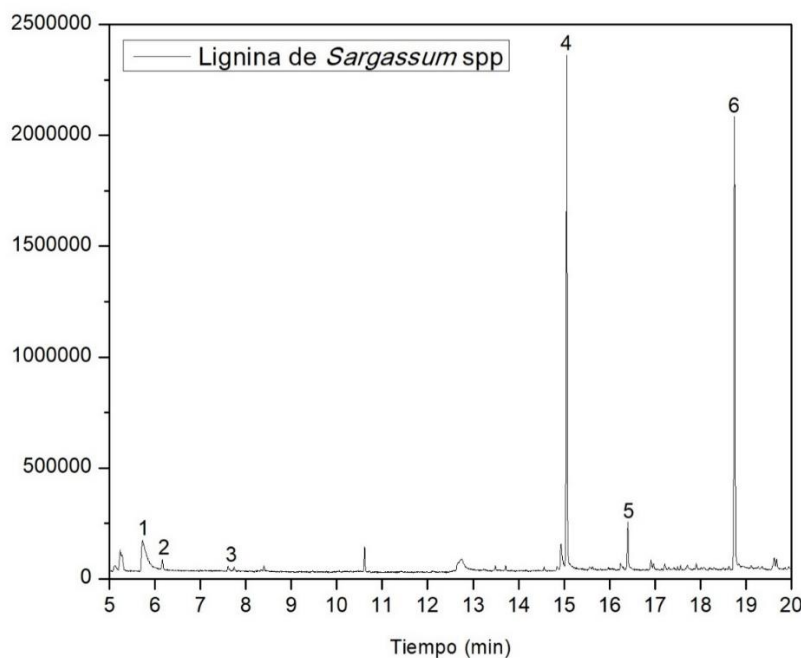
**Figura 3.3.** FTIR del control de lignina (SC-489763) comparada con la lignina obtenida del *Sargassum* spp y de la biomasa residual



Se encontraron similitudes en los grupos funcionales del control de lignina y de la lignina obtenida a partir del sargazo. Las bandas alrededor de los 3457 y 2936  $\text{cm}^{-1}$ , son características del grupo funcional hidroxilo (-OH) y de vibraciones de los enlaces C-H [34], respectivamente; mientras que el pico intenso presente entre los 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  representa enlaces conjugados y no conjugados del grupo carbonilo (C=O) de la lignina [47]. Las absorbancias encontradas en las longitudes de 1516, 1457, 817 y 638  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a la lignina, y representan las vibraciones de anillos aromáticos, vibraciones en los enlaces O-C-O del grupo carboxilo, enlaces C-H fuera del plano en las unidades de *p*-hidroxifenilo, así como estiramientos C-H de compuestos aromáticos, respectivamente [112][111]. Las bandas características de la muestra de sargazo coinciden con el control utilizado de lignina, las diferencias observadas se deben a que la composición de la lignina cambia según el origen de ésta y su método de extracción [43].




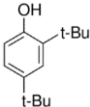
### 3.2.1. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

La lignina despolimerizada fue analizada mediante cromatografía de gases acoplada a masas, el cromatograma obtenido se presenta en la figura 3.4, se identificaron cuatro compuestos de interés en la muestra, los cuales se enlistan en la tabla 3.2.



**Figura 3.4.** Cromatograma obtenido por CG-EM de la lignina del *Sargassum*

**Tabla 3.2.** Compuestos encontrados mediante Cromatografía de Gases-Masas (T.R.= Tiempo de Retención)

Comp.	T.R (min)	Calidad (%)	Área (%)	Nombre	Estructura
1	5.24	87	0.94	1-etil 3-metil benceno	
2	5.73	91	9.61	Anilina	
3	7.74	95	0.48	1,2-dietil benceno	
4	15.06	97	27.79	2,4-diterbutil fenol	

Se encontró la presencia de varios compuestos aromáticos, el compuesto encontrado en mayor proporción fue el 2,4-diterbutil fenol. La reacción utilizada ataca los enlaces éster en la lignina, se puede inferir que dicha reacción es muy agresiva y por ello, los fenoles perdieron su grupo funcional hidroxilo, quedando únicamente el anillo de benceno.

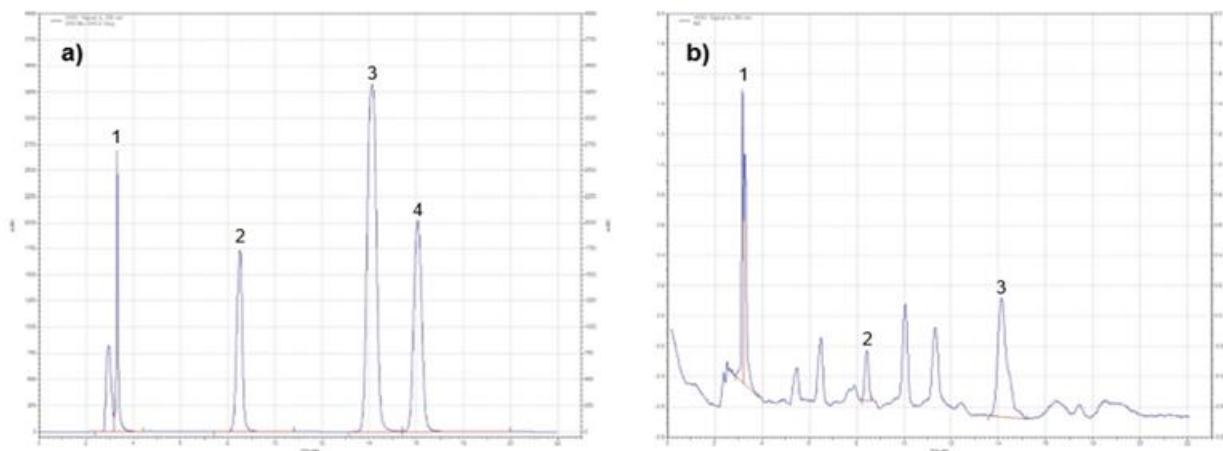
### 3.2.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

En la figura 3.5(a), se muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC de los estándares de ácido gálico, ácido vainillínico, ácido *p*-coumárico y siringaldehído utilizados para la identificación de compuestos, los cuales tienen un tiempo de retención (RT) de 3.31, 8.57, 14.26 y 16.20 minutos, respectivamente. El ácido *p*-coumárico se origina a partir de la fenilalanina, la cual es producto de la ruta de Shikimato en el metabolismo secundario de las plantas vasculares [43].

En la figura 3.5(b), se puede apreciar el cromatograma de la muestra de lignina despolimerizada; donde se encontraron 13 compuestos, de los cuales se pudieron identificar ácido gálico, ácido vainilínico y ácido *p*-coumárico.

La importancia de la identificación de ácido *p*-coumárico radica en la vinculación que tiene este compuesto en la biosíntesis de la lignina. Ya que es precursor de las unidades básicas fenilpropanoide (monolignoles) [43].



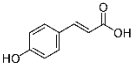
La presencia del ácido *p*-coumárico y los espectros FTIR confirman que el material recalcitrante en el *Sargassum* spp que arriba al Caribe mexicano es lignina, lo que ratifica la hipótesis planteada por Alzate-Gaviria et al., sobre los altos contenidos de polifenoles en las especies de *S. natans* y *S. fluitans*; así como la presencia de tejido lignificado, el cual forma una pared secundaria en ambas especies de *Sargassum* spp [104].



**Figura 3.5.** Cromatogramas obtenidos por HPLC a) Mezcla de estándares b) Muestra de lignina de *Sargassum*. \*1= Estándar de ácido gálico, 2= Estándar de ácido vainilínico, 3= Estándar de ácido *p*-coumárico, 4= Estándar de siringaldehído

La concentración de los compuestos identificados se presenta en la tabla 3.3, se obtuvieron contenidos entre 2.9 y 3.37 mg/g de sargazo seco. Estos fenoles podrían ser utilizados como precursores en la síntesis verde de compuestos químicos, obteniendo un mayor número de productos de valor agregado a partir del sargazo.

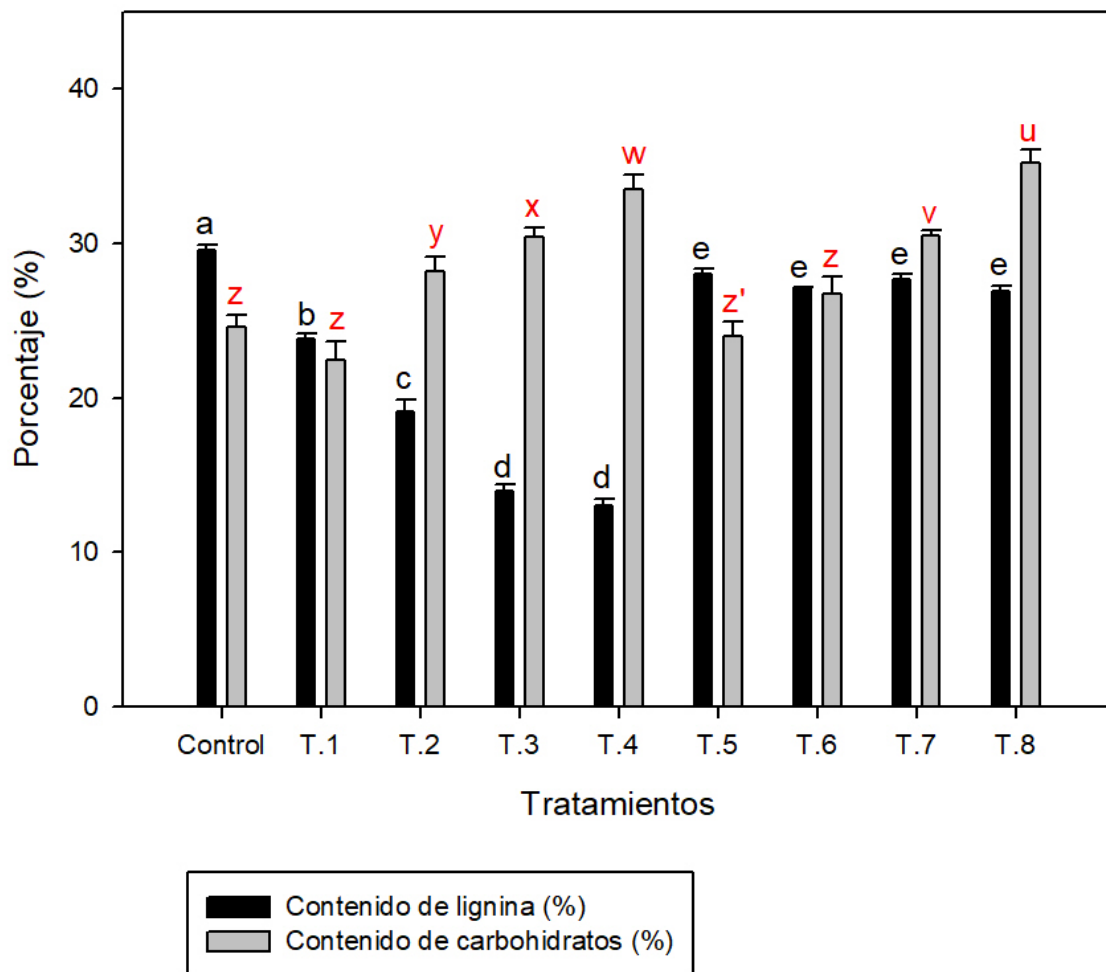
**Tabla 3.3.** Compuestos fenólicos encontrados en las muestras de lignina por HPLC (\*En base seca)

Compuesto	Estructura	Tiempo de retención (min)	mg/ g Sargazo*
Ácido gálico		3.12	2.90
Ácido vainillínico		8.49	3.37
Ácido <i>p</i> -coumárico		14.07	3.14

### 3.3. Deslignificación

Los tratamientos químicos mostraron mejores resultados de deslignificación que los enzimáticos. Los tratamientos con peróxido de hidrógeno dieron mejores resultados en cuanto a la remoción de la lignina, con porcentajes de deslignificación superiores al 50%. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la remoción de lignina al variar las concentraciones de peróxido entre un 2.5 y 3.5%, mientras que, para los tratamientos con hidróxido de sodio, sí hay una diferencia significativa en los resultados, dependiendo de la concentración utilizada, la concentración al 3% fue la que mostró mejores resultados de deslignificación (figura 3.6).

Los tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, además de mostrar las mayores remociones de lignina, también presentaron incrementos entre el 23.5 y 36.3% en la relación del contenido de carbohidratos, indicando que, con estos tratamientos únicamente se solubiliza la lignina y no los carbohidratos [84], permitiendo aprovecharlos para la generación de biocombustibles. Sin embargo, para el caso del tratamiento con NaOH al 1%, a pesar de la disminución en el contenido de lignina respecto al control, también se observó una disminución en la relación del contenido de carbohidratos, esto debido a la solubilización de la hemicelulosa [85]. Por esta razón en cuanto a los tratamientos químicos, los más prometedores son los que se realizaron con peróxido de hidrógeno.



**Figura 3.6.** Variación en el contenido de lignina y carbohidratos durante los tratamientos (las diferencias estadísticamente significativas están señaladas por las letras, letras iguales: NO hay diferencia estadísticamente significativa). T.1= Tratamiento con NaOH al 1%, T.2= Tratamiento con NaOH al 3%, T.3= Tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2.5%, T.4= Tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3.5%, T.5= Tratamiento con extracto enzimático (EE), T.6= Tratamiento con Lacasa Reactiva (LR), T.7= Tratamiento con EE+mediador, T.8= Tratamiento con LR+mediador

Los tratamientos enzimáticos presentaron porcentajes de deslignificación inferiores respecto a los químicos, el contenido de lignina no presentó diferencias significativas entre los cuatro tratamientos enzimáticos, sin embargo, sí hay diferencias respecto al control. La relación en el contenido de carbohidratos sí tuvo variaciones significativas.

Los tratamientos enzimáticos sin mediador no presentaron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos respecto al control, no obstante, sí hay diferencia entre utilizar

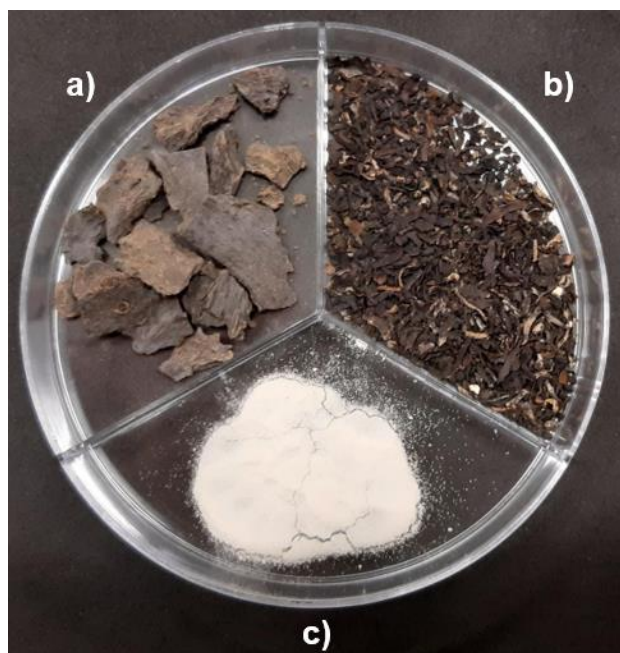
extracto enzimático y lacasa reactiva, siendo el tratamiento con lacasa reactiva el que presenta mejores resultados en cuanto al contenido de carbohidratos. En los tratamientos donde se utilizó un mediador (ABTS), se encontraron relaciones en el contenido de carbohidratos mayores, esto significa que a pesar de que no se logra una remoción completa de la lignina, ocurre una modificación estructural en ella, que permite acceder a los carbohidratos de mejor manera.

El tratamiento en el que se usó lacasa reactiva y mediador (T.8), logró un incremento del 43.13% en la relación del contenido de carbohidratos, respecto al control.

### **3.4. Rendimiento de alginato**

Se llevó a cabo la extracción de alginato, ya que éste es un producto comercializable, sin embargo, es necesario determinar la calidad del producto obtenido. Se obtuvo un 25% de rendimiento de alginato de sodio, el cual se encuentra entre los rangos aceptables para su aprovechamiento industrial (12-45%) [108], igualmente se obtuvo un 29% de rendimiento de biomasa residual, la cual fue analizada para determinar posibles usos (figura 3.7).

El sargazo tiene la capacidad de absorber metales, se ha reportado la presencia de metales pesados como cadmio, plomo y arsénico en el sargazo presente en el estado de Quintana Roo [104][9][108]. Una de las principales limitantes para el uso del sargazo en la producción de alginato es el contenido de metales que presenta, por ello, se realizó un estudio de su trazabilidad durante el proceso de la extracción de alginato, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.4.



**Figura 3.7.** a) Biomasa residual generada en la extracción de alginato b) *Sargassum* spp c) Alginato de sodio obtenido del *Sargassum*

### 3.4.1. Trazabilidad de metales

A pesar de que se obtuvieron buenos rendimientos de alginato, la presencia de metales limita el uso de los alginatos extraídos del *Sargassum*. Con el fin de conocer la calidad final del alginato obtenido, se realizó un análisis de la trazabilidad de metales durante su proceso de extracción y se analizó la biomasa inicial (*Sargassum* spp), la biomasa residual del proceso y el alginato de sodio producido.

El proceso de extracción de alginato utilizado en este estudio logró la reducción en la concentración de cinco elementos (Boro, Hierro, Manganeso, Niquel y Cobre), por debajo de su límite de detección, en el alginato de sodio obtenido; mientras que los elementos Zinc y Aluminio disminuyeron su concentración en un 95 y 75%, respectivamente, tomando en cuenta el contenido en el *Sargassum* spp al inicio del proceso. La remoción de los metales en el alginato abre una ventana de oportunidades para la comercialización de este producto y el uso del sargazo.

**Tabla 3.4.** Trazabilidad de metales durante el proceso de extracción de alginato

<b>Elemento</b>	<b>LDM (mg/L)</b>	<b><i>Sargassum</i> spp</b>	<b>Biomasa residual</b>	<b>Alginato de sodio de <i>Sargassum</i></b>
As	0.0235	LDM	LDM	LDM
B	0.0032	61.425	165.9	LDM
Fe	0.0031	11.755	28.925	LDM
Zn	0.141	2096	2688	96.2
Mn	0.0013	8.540	7.791	LDM
Cd	0.0006	LDM	LDM	LDM
Pb	0.007	LDM	LDM	LDM
Al	0.0011	89.202	104.635	22.065
Ni	0.0037	2.6855	5.319	LDM
Cu	0.0004	6.612	8.297	LDM

LDM: Menor al límite de detección, la concentración de metales está dada en mg/Kg

Los metales se mantienen en la biomasa residual, la cual no es aprovechada, sin embargo, ésta fue caracterizada para conocer su composición y proponer usos potenciales, los resultados de caracterización se muestran en la tabla 3.5. El contenido de cenizas se incrementó respecto al contenido original en el *Sargassum* spp., esto se debe a que los metales se mantienen retenidos en la BR. La composición elemental de esta biomasa fue de 29.79, 2.51, 1.46 y 1.48% para C, H, N y S, respectivamente y mantiene una buena relación C:N (20.35) para su uso en la producción de biogás [20].

El proceso de extracción de alginato logró reducir el contenido de lignina de 29.52 a 18.47%, facilitando el acceso a los carbohidratos, los cuales incrementan su relación en base seca de



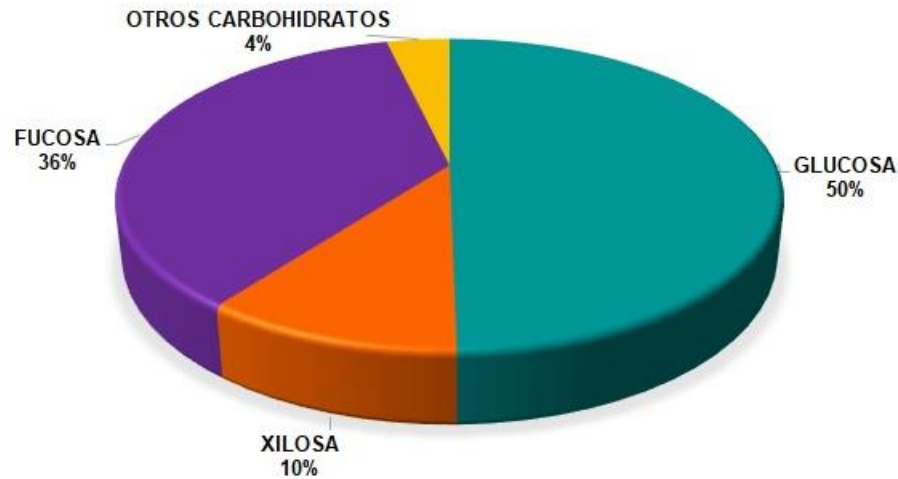
24.62 a 30.67%. Es por ello que esta biomasa tiene gran potencial para su uso en la producción de biocombustibles como el biogás o bioetanol.

**Tabla 3.5.** Caracterización de la biomasa residual. \*En base seca

<b>Análisis</b>	<b>Biomasa residual*</b>
Humedad (%)	8.40 ± 0.22
Cenizas (%)	36.23 ± 0.26
C (%)	29.79
H (%)	2.51
N (%)	1.46
S (%)	1.48
C:N	20.35
Lignina (%)	18.47 ± 0.36
Carbohidratos (%)	30.67 ± 2.25

En cuanto al contenido de carbohidratos en la biomasa residual, en la figura 3.8, se observa la disminución en el porcentaje de carbohidratos no identificados, respecto al *Sargassum* spp., esta disminución se puede asociar al proceso de extracción de alginato, en donde se extraen los monómeros de alginato. Lo que justifica el incremento en la relación porcentual de la glucosa, xilosa y fucosa.

## CARBOHIDRATOS EN LA BIOMASA RESIDUAL



**Figura 3.8.** Contenido de carbohidratos en la biomasa residual, después de la extracción de alginato

Por la presencia de fucosa y azufre en la biomasa residual, se puede asumir que los fucoidanos no se solubilizan durante el proceso de extracción de alginato, dejando abierta la posibilidad para el aprovechamiento de este compuesto, después de extraer alginato, así mismo, se observa que el carbohidrato presente en mayor proporción es la glucosa, la cual se puede transformar en biocombustibles.

El proceso utilizado para la obtención de alginato permite obtener un producto con menor contenido de metales, y la posibilidad de aprovechar el residuo generado en la producción de biocombustibles, entre las ventajas que presenta el uso de la biomasa residual se encuentran la remoción de un porcentaje de lignina, lo que permite una mayor accesibilidad a los carbohidratos, así como la posibilidad de obtener fucoidanos después de la extracción de alginato, también presenta una relación carbono-nitrógeno óptima para la producción de biogás. Bajo este concepto, se obtendría un proceso con cero residuos, lo que permitiría el aprovechamiento integral del sargazo.

## Conclusiones

Con la presencia del ácido *p*-coumárico se demostró que el material recalcitrante presente en el sargazo que arriba al Caribe mexicano es lignina, también se encontraron carbohidratos propios de la celulosa, hemicelulosa, fucoidan y alginato, los cuales pueden ser aprovechados para obtener compuestos de valor.

Los tratamientos de deslignificación químicos lograron los mejores resultados en cuanto a la remoción de lignina, siendo el de peróxido de hidrógeno al 2.5% el que removió más del 50% del contenido inicial de lignina.

Los tratamientos enzimáticos a pesar de no lograr los mejores resultados de deslignificación, mostraron un incremento en la relación de carbohidratos, lo que podría significar que no es necesario remover la lignina, si no modificarla estructuralmente para acceder a los compuestos de interés.

El proceso de extracción de alginato, logró la disminución en la concentración de cinco metales (Boro, Hierro, Manganeso, Niquel y Cobre) por debajo de su límite de detección, presentes en la biomasa de sargazo y reducir la concentración de Zinc y Aluminio en un 95 y 75%, respectivamente.

La biomasa residual obtenida en el proceso de extracción de alginato tiene una composición de carbono-nitrógeno óptima para la producción de biocombustibles.

## Perspectivas

En este estudio se probaron enzimas del tipo lacasa, sin embargo, las peroxidasas pueden explorarse por sí solas o combinándolas con el tratamiento con peróxido de hidrógeno, ya que éste funciona como cofactor en la reacción enzimática. Así mismo, se pueden probar mediadores más amigables con el medio ambiente.

Los compuestos fenólicos presentes en la lignina pueden ser utilizados en la síntesis verde de compuestos químicos, ampliando las aplicaciones del sargazo. De igual manera, se pueden explorar métodos menos agresivos para la despolimerización de la lignina y analizar los cambios que sufre el material al aplicarle los tratamientos de deslignificación.

El proceso de extracción de alginato utilizado en este trabajo, generó un residuo el cual, mostró potencial para la obtención de biocombustibles, fucoidanos y compuestos fenólicos. Demostrando que el *Sargassum* spp., es una materia prima prometedora que puede ser usada en una biorrefinería.

## Bibliografía

- [1] Aguirre Muñoz, A. (2019). El sargazo en el Caribe mexicano: de la negación y el voluntarismo a la realidad. *Sustentabilidad, Gaceta Digital Del Centro Interdisciplinario de Biodiversidad y Ambiente*, 2. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- [2] Álvarez-Buylla Rocas, M. E., Córdova Tapia, F., Calixto Pérez, E., Vázquez Rangel, G., Pescina Ávila, J. C., Flores Morado, E., & Gorbea Barcelata, J. C. (2019). Agenda de ciencia, tecnología e innovación para la atención, adaptación y mitigación del arribo de sargazo pelágico al Caribe mexicano. *Salud Pública de México*, 1(1), 6907–6930. <https://doi.org/10.1007/s10668-019-00520>
- [3] Rodríguez-Martínez, R., Van Tussenbroek, B. I., & Jordán-Dahlgren, E. (2017). Afluencia masiva de sargazo pelágico a la costa del Caribe mexicano. *Florecimientos Algas Nocivos En México*, 352–365.
- [4] Uribe-Martínez, A., Guzmán-Ramírez, A., Arreguín-Sánchez, F., & Cuevas, E. (2019). El sargazo en el Caribe mexicano, revisión de una historia impensable. *Gobernanza y Manejo de Las Costas y Mares Ante La Incertidumbre*, 743. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- [5] van Tussenbroek, B. I., Hernández Arana, H. A., Rodríguez-Martínez, R. E., Espinoza-Avalos, J., Canizales-Flores, H. M., González-Godoy, C. E., Barba-Santos, M. G., Vega-Zepeda, A., & Collado-Vides, L. (2017). Severe impacts of brown tides caused by *Sargassum* spp. on near-shore Caribbean seagrass communities. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1–2), 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.057>
- [6] Rodríguez-Martínez, R. E., Medina-Valmaseda, A. E., Blanchon, P., Monroy-Velázquez, L. V., Almazán-Becerril, A., Delgado-Pech, B., Vásquez-Yeomans, L., Francisco, V., & García-Rivas, M. C. (2019). Faunal mortality associated with massive beaching and decomposition of pelagic *Sargassum*. *Marine Pollution Bulletin*, 146(October 2018), 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.06.015>
- [7] Maurer, A. S., De Neef, E., & Stapleton, S. (2015). *Sargassum* accumulation may spell trouble for nesting sea turtles. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 13(7), 394–395. <https://doi.org/10.1890/1540-9295-13.7.394>

- [8] Wang, M., Hu, C., Barnes, B., Mitchum, G., Lapointe, B., & Montoya, J. (2019). The great Atlantic *Sargassum* belt. *Science*, 365, 83–87.
- [9] Rodríguez-Martínez, R. E., Roy, P. D., Torrescano-Valle, N., Cabanillas-Terán, N., Carrillo-Domínguez, S., Collado-Vides, L., & van Tussenbroek, B. I. (2020). Element concentrations in pelagic *Sargassum* along the Mexican Caribbean coast in 2018-2019. *PeerJ*, 8(e8667), 1–19. <https://doi.org/10.7717/peerj.8667>
- [10] Lacy, P., & Rutqvist, J. (2016). *Waste to wealth: The circular economy advantage*. Springer.
- [11] Dreckmann, K. M., & Senties, A. (2013). Las arribazones de algas marinas en el Caribe mexicano: evento biológico natural o basura en las playas. *CONABIO. Biodiversitas*, 107, 7–11.
- [12] Robledo, D., & Vázquez-Delfín, Er. (2019). Sargazo, conociendo al “enemigo.” *Revista Avance y Perspectiva*, 5(3).
- [13] Gower, J., Young, E., & King, S. (2013). Satellite images suggest a new *Sargassum* source region in 2011. *Remote Sensing Letters*, 4(8), 764–773.
- [14] Lapointe, B., West, L., Sutton, T., & Hu, C. (2014). Ryther revisited: nutrient excretions by fishes enhance productivity of pelagic *Sargassum* in the western North Atlantic Ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 458, 46–56.
- [15] NOAA. (2016). *State of the climate: Global analysis for annual 2015*. National Centers for Environmental Information.
- [16] Johns, E. M., Lumpkin, R., Putman, N. F., Smith, R. H., Muller-Karger, F. E., T. Rueda-Roa, D., Hu, C., Wang, M., Brooks, M. T., Gramer, L. J., & Werner, F. E. (2020). The establishment of a pelagic *Sargassum* population in the tropical Atlantic: Biological consequences of a basin-scale long distance dispersal event. *Progress in Oceanography*, 182, 102269. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2020.102269>
- [17] Doyle, E., & Franks, J. (2015). *Sargassum* Fact Sheet. Gulf and Caribbean Fisheries Institute.
- [18] Baweja, P., Kumar, S., Sahoo, D., & Levine, I. (2016). Biology of seaweeds. In *Seaweed in health and disease prevention*. Academic Press, 41–106.

- [19] Aparicio, E., Rodríguez-Jasso, R. M., Lara, A., Loredó-Treviño, A., Aguilar, C. N., Kostas, E. T., & Ruiz, H. A. (2020). Biofuels production of third generation biorefinery from macroalgal biomass in the Mexican context: An overview. In *Sustainable Seaweed Technologies*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817943-7.00015-9>
- [20] Thompson, T. M., Young, B. R., & Baroutian, S. (2020). Pelagic *Sargassum* for energy and fertiliser production in the Caribbean: A case study on Barbados. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 118 (October), 109564. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109564>
- [21] Hernández-Carmona, G., Rodríguez-Montesinos, Y., Arvizu-Higuera, D., Reyes-Tisnado, R., Murillo-Álvarez, J. I., & Muñoz-Ochoa, M. (2012). Technological advance for alginate production in Mexico. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, XIII(2), 155–168.
- [22] Blanco-Pascual, N., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2014). Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloids*, 37, 100–110.
- [23] Mazumder, A., Holdt, S. L., De Francisci, D., Alvarado-Morales, M., Mishra, H. N., & Angelidaki, I. (2016). Extraction of alginate from *Sargassum muticum*: process optimization and study of its functional activities. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3625–3634. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0872-x>
- [24] Mohammed, A., Bissoon, R., Bajnath, E., Mohammed, K., Lee, T., Bissram, M., John, N., Jalsa, N., Lee, K., & Ward, K. (2018). Multistage extraction and purification of waste *Sargassum natans* to produce sodium alginate: an optimization approach. *Carbohydr. Polym.*, 198, 109–118.
- [25] Rosado-Espinosa, L. A., Freile-Pelegrín, Y., Hernández-Nuñez, E., & Robledo, D. (2020). A comparative study of *Sargassum* species from the Yucatan peninsula coast: morphological and chemical characterisation. *Phycologia*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/00318884.2020.1738194>
- [26] Marquez, G. P. B., Santiañez, W. J. E., Trono, G. C., Montaña, M. N. E., Araki, H., Takeuchi, H., & Hasegawa, T. (2014). Seaweed biomass of the Philippines: Sustainable feedstock for biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 1056–1068. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.056>

- [27] Butt, D. (2006). Thermochemical processing of agroforestry biomass for furans, phenoles, cellulose and essential oils.
- [28] Cortes, W. (2014). Tratamientos aplicables a materiales lignocelulósicos para la obtención de etanol y productos químicos. *Revista de Tecnología*, 13, 39–44.
- [29] Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2013). Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: A Review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(4), 679–689. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000400019>
- [30] Mussatto, S. I., Dragone, G., Fernandes, M., Rocha, G. J. M., & Roberto, I. C. (2006). Efecto de los tratamientos de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina en la estructura del bagazo de Malta para liberación de fibras de celulosa. XXII Interamerican Congress of Chemical Engineering, CIIQ.
- [31] Laureano-Perez, L., Eymouri, F., Alizadeh, H., & Dale, B. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1081–1099.
- [32] Ali, I., & Bahadar, A. (2017). Red sea seaweed (*Sargassum* spp.) pyrolysis and its devolatilization kinetics. *Algal Research*, 21(January), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.011>
- [33] Borines, M. G., de Leon, R. L., & Cuello, J. L. (2013). Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum* spp. *Bioresource Technology*, 138, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.108>
- [34] Ardalan, Y., Jazini, M., & Karimi, K. (2018). *Sargassum angustifolium* brown macroalga as a high potential substrate for alginate and ethanol production with minimal nutrient requirement. *Algal Research*, 36, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.010>
- [35] Thompson, Terrell M., Young, B. R., & Baroutian, S. (2019). Advances in the pretreatment of brown macroalgae for biogas production. *Fuel Processing Technology*, 195(July), 106151. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106151>
- [36] Milledge, John James, Maneein, S., Arribas, E., & Bartlett, D. (2020). *Sargassum* inundations in Turks and Caicos: Methane potential and proximate, ultimate, lipid, amino acid, metal and metalloid analyses. *Energies*, 13, 1523.



- [37] Al-Zuhair, S., Abualreesh, M., Ahmed, K., & Abdul Razak, A. (2015). Enzymatic delignification of biomass for enhanced fermentable sugars production. *Energy Technology*, 3(2), 121–127. <https://doi.org/10.1002/ente.201402138>
- [38] Hilgers, R., Vincken, J. P., Gruppen, H., & Kabel, M. A. (2018). Laccase/mediator systems: their reactivity toward phenolic lignin structures. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(2), 2037–2046. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03451>
- [39] Tocco, D., Carucci, C., Monduzzi, M., Salis, A., & Sanjust, E. (2021). Recent developments in the delignification and exploitation of grass lignocellulosic biomass. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 9(6), 2412–2432. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c07266>
- [40] Nguyen, T., Son, S., Jordan, M. C., Levin, D. B., & Ayele, B. T. (2016). Lignin biosynthesis in wheat (*Triticum aestivum*): Its response to waterlogging and association with hormonal levels. *BMC Plant Biology*, 16(1), 16–28. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0717-4>
- [41] Wang, Y., Chantreau, M., Sibout, R., & Hawkins, S. (2013). Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 4(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00220>
- [42] Ortiz, M. (2009). Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquia*, 13(2), 137–144. <https://doi.org/10.22579/20112629.208>
- [43] Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (2013). Lignin, structure and applications: Depolymerization methods for obtaining aromatic derivatives of industrial interest. In *Avances en Ciencias e Ingeniería* (Vol. 4, Issue 4).
- [44] Martone, P. T., Estevez, J. M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M. W., Somerville, C., & Ralph, J. (2009). Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Current Biology*, 19(2), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.031>
- [45] Ward, A., Lewis, D., & Green, F. (2014). Anaerobic digestion of algae biomass: a review. *Algal Res.*, 5, 204–214.

- [46] Milledge, John J., Smith, B., Dyer, P. W., & Harvey, P. (2014). Macroalgae-derived biofuel: A review of methods of energy extraction from seaweed biomass. *Energies*, 7(11), 7194–7222. <https://doi.org/10.3390/en7117194>
- [47] Antúnez-Argüelles, E., Herrera-Bulnes, M., Torres-Ariño, A., Mirón-Enríquez, C., Soriano-García, M., & Robles-Gómez, E. (2020). Enzymatic-assisted polymerization of the lignin obtained from a macroalgae consortium, using an extracellular laccase-like enzyme (Tg-laccase) from *Tetraselmis gracilis*. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 55(6), 739–747. <https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1738171>
- [48] Mannino, A. M., & Micheli, C. (2020). Ecological function of phenolic compounds from mediterranean furoid algae and seagrasses: An overview on the genus *Cystoseira sensu lato* and *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(1), 12–17. <https://doi.org/10.3390/jmse8010019>
- [49] Rabemanolontsoa, H., & Saka, S. (2013). Comparative study on chemical composition of various biomass species. *RSC Advances*, 3(12), 3946–3956.
- [50] Chávez, V., Uribe-Martínez, A., Cuevas, E., Rodríguez-Martínez, R. E., van Tussenbroek, B. I., Francisco, V., Estévez, M., Celis, L. B., Monroy-Velázquez, L. V., Leal-Bautista, R., Álvarez-Filip, L., García-Sánchez, M., Masia, L., & Silva, R. (2020). Massive influx of pelagic *Sargassum* spp. On the coasts of the Mexican Caribbean 2014–2020: Challenges and opportunities. *Water (Switzerland)*, 12(10), 1–24. <https://doi.org/10.3390/w12102908>
- [51] Martínez, Á. T., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., del Río, J. C., & Gutiérrez, A. (2009). Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.002>
- [52] McHugh, D. (2003). A guide to the seaweed industry. *FAO Fisheries Technical Paper*, 441, 105.
- [53] Tsuchiya, Y. (1979). Polyhydroxyphenols in some brown algae. 545–550.
- [54] Paraguay-Delgado, F., Carreño-Gallardo, C., Estrada-Guel, I., Zabala-Arceo, A., Martínez-Rodríguez, H. A., & Lardizábal-Gutiérrez, D. (2020). Pelagic *Sargassum* spp. capture

CO<sub>2</sub> and produce calcite. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08969-w>

[55] Álvarez, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*, 359, 63–89.

[56] Conley, K. (2016). *Biofuels*. ABDO.

[57] Valencia, N. M., Rivera Madrid, I., Fulla, M., & Palacio, J. L. (2015). Combustibles de tercera generación proveniente de algas. 3 Encuentro Internacional de Tecnología e Ingeniería, Simposio I, 74.

[58] Hackenberg, N. (2008). Biocombustibles de segunda generación. *REDESMA*, 50–61.

[59] Dahiya, A. (2014). *Bioenergy: Biomass to biofuels*. Academic Press.

[60] Yokoyama, S., Jonouchi, K., & Imou, K. (2007). Energy production from marine biomass: fuel cell power generation driven by methane produced from seaweed. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 28, 320–323.

[61] Akila, V., Manikandan, A., Sahaya Sukeetha, D., Balakrishnan, S., Ayyasamy, P. M., & Rajakumar, S. (2019). Biogas and biofertilizer production of marine macroalgae: An effective anaerobic digestion of *Ulva* sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18(January), 101035. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101035>

[62] Oliveira, J. V., Alves, M. M., & Costa, J. C. (2015). Optimization of biogas production from *Sargassum* sp. using a design of experiments to assess the co-digestion with glycerol and waste frying oil. *Bioresource Technology*, 175, 480–485. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.121>

[63] Supattra, M., Milledge, J., Nielsen, B., & Harvey, P. (2018). A review of seaweed pre-treatment methods for enhanced biofuel production by anaerobic digestion or fermentation. *Fermentation*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation4040100>

[64] Demirbas, M. (2011). Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*, 88, 3473–3480.

- [65] Adekunle, A., Orsat, V., & Raghavan, V. (2016). Lignocellulosic bioethanol : a review and design conceptualization study of production from cassava peels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 518–530.
- [66] de Souza Abud, A. K., & de Farias Silva, C. E. (2019). Bioethanol in Brazil: status, challenges and perspectives to improve the production. *Bioethanol Production from Food Crops* . Academic Press, 417–443.
- [67] Garofalo, R. (2009). Algae and aquatic biomass for a sustainable production of 2nd generation biofuels. *AquaFUELS-Taxonomy, Biology and Biotechnology*, 6, 1–258.
- [68] Lee, H. Y., Lee, S. E., Jung, K. H., Yeon, J. H., & Choi, W. Y. (2011). Repeated-batch operation of surface-aerated fermentor for bioethanol production from the hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3), 323–331.
- [69] Jung, K. H. (2012). Development of a practical and cost-effective medium for bioethanol production from the seaweed hydrolysate in surface-aerated fermentor by repeated-batch operation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(1), 107–113.
- [70] Saravanan, K., Duraisamy, S., Ramasamy, G., Kumarasamy, A., & Balakrishnan, S. (2018). Evaluation of the saccharification and fermentation process of two different seaweeds for an ecofriendly bioethanol production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 444–449.
- [71] Chen, L., & Neibling, H. (2014). *Anaerobic digestion basics*. University of Idaho Extension, Moscow, 1–6.
- [72] Paul, R., Melville, L., & Sulu, M. (2016). Anaerobic digestion of micro and macro algae, pre-treatment and co-digestion-biomass: A review for a better practice. *International Journal of Environmental Science and Development*, 7(9), 646.
- [73] Milledge, John J., Nielsen, B. V., & Harvey, P. J. (2018). The inhibition of anaerobic digestion by model phenolic compounds representative of those from *Sargassum muticum*. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 779–786. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1512-4>
- [74] Romagnoli, F. (2010). Biogas from marine macroalgae: A new environmental technology. *Life Cycle Inventory for a Further LCA*, 4, 97–109.

- [75] Vasco-Correa, J., Khanal, S., Manandhar, A., & Shah, A. (2018). Anaerobic digestion for bioenergy production: Global status, environmental and techno-economic implications, and government policies. *Bioresource Technology*, 247, 1015–1026.
- [76] Lynd, L., Weimer, P., van Zyl, W., & Pretorius, I. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506–577.
- [77] Ayeni, A. O., Omoleye, J. A., Hymore, F. K., & Pandey, R. A. (2016). Effective alkaline peroxide oxidation pretreatment of shea tree sawdust for the production of biofuels: Kinetics of delignification and enzymatic conversion to sugar and subsequent production of ethanol by fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(1), 33–45. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160331s20140258>
- [78] Irfan, M., Gulsher, M., Abbas, S., Syed, Q., Nadeem, M., & Baig, S. (2011). Effect of various pretreatment conditions on enzymatic saccharification. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33(4), 397–404.
- [79] Brebu, M., & Vasile, C. (2010). Thermal degradation of lignin-A review. *Cellulose Chemistry and Technology*, 44, 353–363.
- [80] Yan, N., Zhao, C., Dyson, P., Wang, C., Liu, L., & Kou, Y. (2008). Selective degradation of wood lignin over noble-metal catalysis in a two-step process. *Chemistry & Sustainability Energy & Materials*, 1, 626–629.
- [81] Crestini, C., Crucianelli, M., Orlandi, M., & Saladino, R. (2010). Oxidative strategies in lignin chemistry: A new environmental friendly approach for the functionalisation of lignin and lignocellulosic fibers. *Catalysis Today*, 156, 8–22.
- [82] Sun, R., Tomkinson, J., Wang, S., & Zhu, W. (2000). Characterization of lignins from wheat straw by alkaline peroxide treatment. *Polymer Degradation and Stability*, 67(1), 101–109. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(99\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(99)00099-3)
- [83] Sun, R. C., Fang, J. M., & Tomkinson, J. (2000). Delignification of rye straw using hydrogen peroxide. *Industrial Crops and Products*, 12(2), 71–83. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00039-X)

- [84] Mittal, A., Katahira, R., Donohoe, B. S., Black, B. A., Pattathil, S., Stringer, J. M., & Beckham, G. T. (2017). Alkaline peroxide delignification of corn stover. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5(7), 6310–6321. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01424>
- [85] Soares, J., Demeke, M. M., Foulquié-Moreno, M. R., Van de Velde, M., Verplaetse, A., Fernandes, A. A. R., Thevelein, J. M., & Fernandes, P. M. B. (2016). Green coconut mesocarp pretreated by an alkaline process as raw material for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 216, 744–753. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.105>
- [86] Winqvist, E., Moilanen, U., Mettälä, A., Leisola, M., & Hatakka, A. (2008). Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 42(2), 128–132.
- [87] Revollo Escudero, E., Serna Daza, O., & Hernández Torres, J. (2012). Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: Demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella* sp y *Cellulosimicrobium* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 70–80.
- [88] Asgher, M., Ahmad, Z., & Iqbal, H. M. N. (2013). Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 44, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.005>
- [89] Flórez Pardo, L. M., Parra Paz, A. S., López Galán, J. E., & Figueroa Oviedo, J. I. (2015). Using a mediator system to increase the delignification of sugarcane residues with fungal enzymes. *CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro*, 6(2), 81–91. <https://doi.org/10.29047/01225383.22>
- [90] Solis, M., Bárzana, E., García-Garibay, M., & Viniegra-González, G. (2007). El ABTS agente oxidante de diversos compuestos químicos y su mecanismo de reciclado entre la lacasa y el sustrato. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(3), 275–281.
- [91] Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V., & Yaropolov, Y. I. (2007). Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5), 523–535. <https://doi.org/10.1134/S0003683807050055>

- [92] Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F., Balles-teros, A., & Alcalde, M. (2008). Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, 7(1), 32.
- [93] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). Determination of ash in biomass. NREL/TP-510-42622 Laboratory Analytical Procedure, 36(4), 302–305.
- [94] Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- [95] Ozer, H. K. (2017). Phenolic compositions and antioxidant activities of Maya nut (*Brosimum alicastrum*): Comparison with commercial nuts. *International Journal of Food Properties*, 20(11), 2772–2781. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1252389>
- [96] García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.
- [97] Tapia-Tussell, R., Avila-Arias, J., Maldonado, J. D., Valero, D., Olguin-Maciel, E., Pérez-Brito, D., & Alzate-Gaviria, L. (2018). Biological pretreatment of mexican caribbean macroalgae consortiums using Bm-2 strain (*Trametes hirsuta*) and its enzymatic broth to improve biomethane potential. *Energies*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/en11030494>
- [98] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2012). Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. NREL/TP-510-42618 Laboratory Analytical Procedure, 17.
- [99] Buchert, J., Siika-aho, M., Bailey, M., Puls, J., Valkeajärvi, A., Pere, J., & Viikari, L. (1993). Quantitative determination of wood-derived soluble oligosaccharides by HPLC. *Biotechnology Techniques*, 7(11), 785–790. <https://doi.org/10.1007/BF00153745>
- [100] Olguin-Maciel, E., Larqué-Saavedra, A., Lappe-Oliveras, P., Barahona-Pérez, L., Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacis, R., Domínguez-Maldonado, J., Pacheco-Catalán, D., Ruíz, H., & Tapia-Tussell, R. (2019). Consolidated bioprocess for bioethanol production from raw flour of *Brosimum alicastrum* seeds using the native strain of *Trametes hirsuta* Bm-2. *Microorganism*, 7(483).

- [101] Reyes-Rivera, J., Canché-Escamilla, G., Soto-Hernández, M., & Terrazas, T. (2015). Wood chemical composition in species of *Cactaceae* the relationship between lignification and stem morphology. *PLoS ONE*, 10(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123919>
- [102] Wilkinson, S., Smart, K. A., & Cook, D. J. (2014). Optimisation of alkaline reagent based chemical pre-treatment of Brewers spent grains for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 62, 219–227.
- [103] Su, Y., Du, R., Guo, H., Cao, M., Wu, Q., Su, R., & He, Z. (2015). Fractional pretreatment of lignocellulose by alkaline hydrogen peroxide: Characterization of its major components. *Food and Bioproducts Processing*, 94(Abril), 322–330.
- [104] Alzate-Gaviria, L., Domínguez-Maldonado, J., Chablé-Villacís, R., Olguin-Maciel, E., Leal-Bautista, R. M., Canché-Escamilla, G., Caballero-Vázquez, A., Hernández-Zepeda, C., Barredo-Pool, F. A., & Tapia-Tussell, R. (2021). Presence of polyphenols complex aromatic “Lignin” in *Sargassum* Spp. From Mexican Caribbean. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.3390/jmse9010006>
- [105] Thompson, Terrell M., Young, B. R., & Baroutian, S. (2020). Efficiency of hydrothermal pretreatment on the anaerobic digestion of pelagic *Sargassum* for biogas and fertiliser recovery. *Fuel*, 279(May), 118527. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118527>
- [106] Aparicio, E., Rodríguez-Jasso, R. M., Pinales-Márquez, C. D., Loredó-Treviño, A., Robledo-Olivo, A., Aguilar, C. N., Kostas, E. T., & Ruiz, H. A. (2021). High-pressure technology for *Sargassum* spp biomass pretreatment and fractionation in the third generation of bioethanol production. *Bioresource Technology*, 329(January), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124935>
- [107] Vázquez-Delfín, E., Freile-Peigrín, Y., Salazar-Garibay, A., Serviere-Zaragoza, E., Méndez-Rodríguez, L. C., & Robledo, D. (2021). Species composition and chemical characterization of *Sargassum* influx at six different locations along the Mexican Caribbean coast. *Science of the Total Environment*, 795. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148852>
- [108] Davis, D., Simister, R., Campbell, S., Marston, M., Bose, S., McQueen-Mason, S. J., Gomez, L. D., Gallimore, W. A., & Tonon, T. (2020). Biomass composition of the golden tide pelagic seaweeds *Sargassum fluitans* and *S. natans* (morphotypes I and VIII) to inform valorisation pathways. *Sci. Total Environ.*, 143134.



- [109] López-Sosa, L. B., Alvarado-Flores, J. J., Corral-Huacuz, J. C., Aguilera-Mandujano, A., Rodríguez-Martínez, R. E., Guevara-Martínez, S. J., Alcaraz-Vera, J. V., Rutiaga-Quiñones, J. G., Zárate-Medina, J., Ávalos-Rodríguez, M. L., & Morales-Máximo, M. (2020). A prospective study of the exploitation of pelagic *Sargassum* spp. as a solid biofuel energy source. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(23), 1–17. <https://doi.org/10.3390/app10238706>
- [110] Chandra Rajak, R., & Banerjee, R. (2015). Enzymatic delignification: An attempt for lignin degradation from lignocellulosic feedstock. *RSC Advances*, 5(92), 75281–75291. <https://doi.org/10.1039/c5ra09667g>
- [111] El Atouani, S., Bentiss, F., Reani, A., Zrid, R., Belattmania, Z., Pereira, L., Mortadi, A., Cherkaoui, O., & Sabour, B. (2016). The invasive brown seaweed *Sargassum muticum* as new resource for alginate in Morocco: Spectroscopic and rheological characterization. *Phycological Research*, 64(3), 185–193. <https://doi.org/10.1111/pre.12135>
- [112] Alves, T., Silva, L., Dário, H., & Zamora, Z. (2018). Effect of steam explosion pretreatment catalysed by organic acid and alkali on chemical and structural properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Waste and Biomass Valorization*, 9(11), 2191–2201. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9989-7>